

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las levaduras de Mendoza

Lejeune, Luis Manuel

1914

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Lejeune, Luis Manuel. (1914). Estudio de las levaduras de Mendoza. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0104\\_Lejeune.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0104_Lejeune.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Lejeune, Luis Manuel. "Estudio de las levaduras de Mendoza". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1914.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0104\\_Lejeune.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0104_Lejeune.pdf)

- UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES -

- Facultad de ciencias exactas, físicas y naturales -

---

- ESTUDIO DE LAS LEVADURAS DE MENDOZA -

---

TESIS

- Presentada para optar al grado de Doctor en Química por -

- LUIS MANUEL LEJEUNE -

---

---

- 1914 -

- Pedring de Fésis -

---

- Profesor EUCLANO HAUSMAN MERCK -

- Ingeniero Agrónomo -

---

---



SEÑORES COMEJEROS:

SEÑORES PROFESORES:

Las cosas de nuestro suelo, merecen indudablemente, tanto estudio y dedicación de nuestra parte, como lo han merecido y merecen las del viejo continente de parte de la falange de los sabios europeos; por eso he dedicado mi primera labor científica al estudio de uno de los asuntos más importantes para la industria nacional.-

Con ello no he hecho más que efectuar las investigaciones preliminares, indispensables para que las levaduras que he estudiado, puedan aplicarse a la elaboración de los vinos de los alrededores de la ciudad de Mendoza, que es la región argentina donde la viticultura ha tomado mayor desarrollo.-

Como se comprenderá y aunque este modesto trabajo fuese completo, el tema no estaría agotado, ni mucho menos, pues quedarían aún por estudiar las levaduras de cada una de las pequeñas regiones que componen esta gran región vinícola; pero pudiendo admitir a priori que las levaduras propias de cada una de estas pequeñas regiones, no difieren mucho de las que he estudiado, puede admitirse que estas podrían ser empleadas en toda la región, con las ventajas que reporta el uso de las levaduras puras seleccionadas.- Uno de mis anhelos sería que alguno de los numerosos viticultores de Mendoza, se decidiera a efectuar algunos ensayos prácticos, que bien realizados, tengo la seguridad, darían un excelente resultado.-

---

Pero antes de entrar en materia, me complazco en manifestar mi más sincero agradecimiento, a mi querido y distinguido maestro, el profesor Luciano Hauman Merck, por el interés que se ha tomado para que yo lleve a buen término el

presente estudio, y de cuyas interesantes clases de Microbiología, conservaré siempre el más grato recuerdo.-

Igualmente le agradezco el honor que me dispensa, al verme acompañado en este acto por uno de los hombres de ciencia que más honra a la Universidad de Buenos Aires.-

A los profesores, Doctores: Angel Gallardo, Eduardo L. Holmberg, Cristóbal Hicken, Horacio Damianovich y Julio J. Gatti, de cuyas sabias lecciones conserve también los más gratos recuerdos, les agradezco por los conocimientos que en ellas he adquirido.-

Aprovecho también la oportunidad, para agradecer al profesor Augusto Scala por las indicaciones que tan amablemente me ha dado; así también como las atenciones que he recibido en Mendoza de mi amigo el Dr. Juan B. Lara.-

Al Señor Raúl Coni que ha tenido la amabilidad de hacer las fotografías que acompañan este estudio, agradezco sinceramente el trabajo que se ha tomado.-

---

- INTRODUCCION -

- - - - -

La aplicación de las levaduras puras seleccionadas, ha hecho hacer enormes progresos a las industrias de fermentación.- Así vemos por ejemplo, la antigua fabricación de la cerveza, basada en métodos empíricos que originaban productos de mala conservación y de calidades muy diversas, dependientes de condiciones desconocidas y que el fabricante no podía dominar, transformarse desde la aplicación de las levaduras puras, en algo por así decirlo, matemáticamente exacto.- Y como el industrial en este caso conoce todas las condiciones de una buena fabricación, podrá obtener un producto que será siempre el mismo y cuya conservación estará asegurada.- En una palabra, el fabricante será dueño absoluto del terreno y obtendrá siempre el producto que quiera obtener.-

Lo que es cierto en cervecería, es también cierto en vinificación, aunque en menor grado, pues el fabricante de cerveza prepara él mismo su mosto y le dá la composición más conveniente; el bodeguero por el contrario debe trabajar con un mosto cuya composición será variable de un año a otro y que no podrá modificar sino en algunos de sus elementos.- El primero trabaja con un líquido esterilizado; en el mosto del segundo, pululan organismos muy diversos, útiles unos, sumamente peligrosos otros.-

Considerando únicamente las levaduras, que se encuentran en el mosto; podemos dividirles en dos grupos bien distintos; las levaduras útiles y las levaduras salvajes.- Entre las primeras encontraremos en un mosto, solo algunas razas de Saccharomyces ellipsoideus, entre las segundas encon-



tramos otras razas de esta misma levadura así también como distintas razas de Neckeraomyces apiculatus, puatorianus y diversas torulas.-

Si recordamos que conjuntamente con estos organismos, encontramos numerosos mohos y bacterios, será forzoso admitir que las levaduras útiles tendrán que luchar con numerosos microorganismos, para ser dueñas absolutas del terreno, condición indispensable para obtener un vino de buena calidad.-

Tan pronto como la uva ha sido pisada, todos los microorganismos presentes empiezan a desarrollarse activamente; si las razas útiles consiguen hacerlo más activamente que los otros fermentos, las especies nocivas serán eliminadas sucesivamente; la fermentación se hará normalmente y el vino obtenido será más o menos bueno o excelente.- Pero si los otros fermentos consiguen desarrollarse de un modo apreciable, molestarán enormemente a las buenas levaduras; la fermentación no será normal y el vino obtenido será malo y estará expuesto a enfermedades que lo transformarán rápidamente en un líquido no potable.-

Vemos pues como podremos facilitar el triunfo de las buenas levaduras, en la lucha que deberán emprender para hacerse dueñas del terreno; el método más sencillo será agregar al mosto una cantidad tal de estas levaduras que permita al mosto el entrar en fermentación, antes que los malos fermentos se hayan multiplicado; la condición de estos se hará cada vez más procaria debido al alcohol y a ciertas toxinas segregadas por las levaduras y la fermentación terminará normalmente.- El vino obtenido será bueno y se conservará perfectamente.-

Otro método más complicado pero también más seguro y más científico será la esterilización del mosto por el calor, por el anhídrido sulfuroso o por cualquier otro medio y la adición



posterior de una levadura pura seleccionada.-

De este modo el vinicultor será dueño absoluto de sus fermentaciones, pero es necesario recordar que la levadura pura seleccionada que debe emplearse, debe ser la más apta para hacer fermentar el mosto que poseamos.-

En la República Argentina existe entre los vinicultores un ambiente desfavorable al empleo de estas levaduras; pero hay que confesar que los fracasos obtenidos se deben a varias causas, entre las cuales se cuenta indudablemente la falta de preparación científica de las personas encargadas de la vinificación.-

Las levaduras puras seleccionadas que se han empleado han sido en general levaduras europeas; no es de sorprenderse que el resultado no haya sido bueno, lo contrario habría sido sinó extraordinario, por lo menos raro.-

Nuestros industriales se forjaron ilusiones acerca de los resultados; creyeron que haciendo fermentar sus mostos con levaduras de las más afamadas bodegas europeas, obtendrían vinos semejantes a los producidos en estas; es indudable que esto no podía suceder, pues si la levadura es mucho en una fermentación, no es todo, porque en ella interviene también la composición y la calidad del mosto, que depende de mil factores, imposibles de reunir sino en una región determinada.- Y como he dicho más arriba, la levadura empleada deberá ser la más adaptada a la composición del mosto.-

Por lo tanto no podremos emplear una levadura de Burdeos, en la Argentina, el resultado sería nulo; es preciso que la levadura seleccionada sea una levadura indígena, es decir una levadura perfectamente habituada a hacer fermentar el mosto que empleamos.- Esto no basta; es necesario que dicha levadura haya sido bien estudiada, para conocer perfectamente

sus exigencias, es decir la temperatura de fermentación, la concentración del mosto, la acidez más favorables, etc., etc.; en esas condiciones, no dudamos, el resultado será excelente.- No obtendremos seguramente un Burdeos ni un Chauterne, pero sí un producto tipo, de calidades bien definidas y que podrá tener tal vez tanto valor como los productos citados y que nuestros industriales tratan inutilmente de imitar.-

El vinicultor debe tratar de fabricar, el tipo de vino que su región puede producir, sin buscar imitar nada; en esa forma podríamos tener productos apreciados en nuestro país y en el exterior.-

La industria vinícola no ha alcanzado todavía en la República Argentina, el grado de perfeccionamiento a que ha llegado en otros países y ello se debe en gran parte al hecho que las levaduras de nuestras distintas regiones vinícolas no han sido aún, objeto de serios y pacientes trabajos de laboratorio, absolutamente indispensables para que nuestros industriales puedan vinificar en las mejores condiciones, obteniendo de esa manera productos de calidad superior y siempre iguales o muy semejantes en los distintos años.-

Para que esto suceda es indudablemente necesario la existencia de un instituto similar de los que existen en Europa, en donde el químico, el enólogo y el biólogo colaboren para el estudio científico de las levaduras de cada región vinícola de la República, y puedan suministrar al industrial, cultivos puros de las levaduras más apropiadas a cada caso, conjuntamente con los consejos e indicaciones necesarias para su empleo.-

Por las razones apuntadas, es que he efectuado este pequeño estudio que trata únicamente de las levaduras de los alrededores de la Ciudad de Mendoza y que debería completarse

! Determinaciones más, y sobre todo con algunos  
ricos.-

---

- RECOLECCION DE LAS MUESTRAS -



Después de visitar varias bodegas creí conveniente recoger las muestras en la Bodega y Viñedo Santa Ana, propiedad del Señor Luis Firaso, situada cerca de la ciudad de Mendoza, en el departamento de Guaymallén.-

Todas las muestras fueron recogidas en recipientes esterilizados que he llevado desde Buenos Aires.- Para las muestras de vino y de berra he utilizado frascos con tapón automático, de la misma clase que las botellas para leche pero de capacidad de 100 c.c. solamente.- Para las muestras de uva he empleado conservas de vidrio con tapa esmerilada, de una capacidad suficiente para contener un racimo.-

Antes de esterilizar coloqué en el fondo de estas, una buena cantidad de algodón, lo mismo que en la parte superior, con el objeto de evitar que los movimientos del transporte machucaran el racimo, al mismo tiempo que impedía toda contaminación.-

Los frascos fueron esterilizados a 120º al autoclave, teniendo la precaución de colocar en el fondo unas gotas de agua para asegurar la esterilización; las conservas a 120º en el horno Pasteur, habiéndolas envuelto previamente en papel, así también como los frascos antes citados; del mismo modo he procedido con varias cajas de Petri en las que había colocado una cierta cantidad de algodón.-

En la bodega y viñedo citado recogí: una muestra de vino tomada el último día de la fermentación principal, una de berra de un vino descubado diez días antes y una de uva Malbec.

— Las muestras de vino y de berra provienen de esta mis-

ma clase de uva.- (=).-

Para recoger las muestras de vino y de borra procedí del modo siguiente: abierta la espita de la cuba o del tonel dejé salir una cierta cantidad de líquido, luego retiré el papel que envolvía el frasco, saqué el tapón sin tocar los bordes de la abertura, dejé caer en el frasco el chorro de líquido y cerré luego observando las mismas precauciones con el objeto de proceder asépticamente.-

En el frasco que contenía la muestra de vino tuve especial cuidado de dejar un espacio vacío, con el objeto que los gases provenientes del vino aún en fermentación tuvieran sitio para acumularse, evitando así que se produjera la explosión del recipiente; por otra parte varias veces durante el viaje tuve la precaución de dejar libre el cierre del frasco permitiéndole así que los gases se escaparan, volviendo a cerrar antes que la presión hubiera igualado la de la atmósfera, evitando así todo peligro de contaminación.-

Como los frascos que contenían estas muestras hubieran podido romperse por cualquier causa durante el transporte, resolví retirar otras muestras que debían servirme únicamente en este caso, para lo cual utilicé las cajas de Pétri de que he hablado: retiré el papel sin tocar la parte interior de éste, levanté la tapa y con una pinza cuya punta previamente había sido pasada por la llama de una lámpara de alcohol, tomé el algodón que se encontraba en la parte interior y lo mojé con el chorro de vino o de borra que salía por la espita de la cuba, coloqué nuevamente el algodón en la caja y envolví con el papel, procediendo lo más asépticamente posible.- Estas segundas muestras no he tenido necesidad de utilizarlas.-

---

(=) - La uva Malbec es uno de los cepajes más cultivados en la provincia de Mendoza, y conjuntamente con la Cabernet tiende a substituir casi completamente la antigua uva Criolla.-

Por lo que se refiere a la muestra de uva, fué recolectada del modo siguiente: elegí un racimo perfectamente sano, de un tamaño proporcionado al de la conserva destinada a recibirlo y que se encontraba bien aislado; retiré el papel que envolvía la conserva, hice destepar ésta y retirar el algodón superior con una pinza esterilizada, introduje el racimo en la conserva (sin tocarlo para nada) y corté el pedúnculo del racimo con una tijera esterilizada; por último coloqué encima de éste el algodón y luego la tapa de vidrio, envolviendo todo con el mismo papel.-

Como puede verse, estas muestras fueron recogidas con todas las precauciones necesarias para impedir que se contaminaran, ya sea en el momento de recogerlas, durante el transporte o bien durante su conservación posterior.-

La uva Criolla es cultivada en Mendoza desde el tiempo de la conquista; el tipo primitivo traído de Chile y que procedía de cepas europeas, se ha modificado de tal modo que en la actualidad es imposible identificarla con ninguna de las variedades europeas; por lo tanto debemos admitir que las levaduras que se encuentran sobre sus frutos están perfectamente adaptadas a las condiciones de vinificación de la provincia y constituyen las que podríamos llamar verdaderas levaduras de Mendoza.-

Esta deducción hecha a priori no implica decir que estos mismos fermentos no se encuentran también sobre las uvas de otras cepas cultivadas en la misma región.-

Sin embargo los bodegueros afirman que los fermentos de la uva Criolla son más activos y también más resistentes a las temperaturas elevadas.- Esto último he podido comprobarlo experimentalmente, como lo demuestro en la última parte de este estudio.-

Por las consideraciones expuestas anteriormente, hubiera sido mi deseo que las muestras procedieran de productos fabricados con la llamada uva "Criolla" pero como en la época que yo me encontraba en Mendoza no se vinificaba con esta clase de uva, no pude hacerle así, por lo que resolví traer a Buenos Aires unas dos kilogramos de esta uva, que recolecté en la Escuela Nacional de Vitivinicultura y con la cual practiqué una pequeña fermentación con el objeto de aislar luego las levaduras correspondientes.-

Debo dejar constancia que esta última muestra no ha sido recogida asepticamente, pues no había previsto el caso.-

---



- A I S L A M I E N T O S -



Los aislamientos fueron efectuados en mosto de uvas secas gelatinizado, que se prepara del modo siguiente: 200 gramos de pasas de uva se ponen en maceración en un litro de agua durante 24 horas en un sitio fresco o mejor en la heladera, luego se calienta lentamente hasta ebullición, la que se mantiene por espacio de media hora, luego se echa el todo sobre un género de hilo y se exprime fuertemente para recoger todo el líquido; por último se agrega 100 gramos de gelatina de primera calidad y una vez disuelta esta se completa a un litro si es necesario.- Sobre 5 o 10 c.c. se determina la acidez, empleando papel de tornasol como indicador y operando por toques, teniendo la precaución de lavar el papel indicador después de cada toque pues la gelatina dificulta mucho el viraje.- Conocido el título se agrega a la solución la cantidad necesaria de una solución de hidrato de sodio al 10 % para que aquella tenga solo una acidez de 1 por mil aproximadamente, evaluada en ácido tártrico.- Esta reducción de la acidez es completamente necesaria pues la gelatina, lo mismo que la gelosa calentada a 100° e 130° respectivamente con soluciones muy ácidas pierden la propiedad de solidificarse por enfriamiento.- (=).- Por otra parte he podido comprobar que algunas de las levaduras que he aislado no se desarrollan ya, con una acidez de 2 por mil.-

El medio de cultivo así preparado es completamente turbio, y como su clarificación sería casi imposible por filtración, se recurre al colage, para lo cual se agrega una clara de huevo bien batida, al líquido enfriado a una tempe-

(=) - L. Hauman Merak - Comunicación particular.-

ratura menor de 50°, se agita vivamente y se deja unos 20 minutos en el autoclave a 101 - 102 grados; después de lo cual se echa todo sobre un filtro, continuando la filtración en el mismo autoclave.-

Finalmente se reparte en tubos de ensayo tapados con algodón, y se esteriliza calentado a 100 gr. durante 15 minutos, dos veces sucesivas, con 24 horas de intervalo.-

El medio de cultivo así preparado es sumamente favorable para todas las levaduras, y como su transparencia es perfecta lo he empleado para todos los aislamientos a cultivos en gelatina que he efectuado en el curso del presente trabajo.-

Los aislamientos fueron efectuados por el método de las diluciones sucesivas, operando en cajas de Petri.- La primera dilución en agua destilada y las dos últimas en mosto gelatinizado.-

Para aislar los fermentos de las uvas Malbec y Criolla, tomé varios granos, que coloqué en un tubo de ensayo y aplasté luego con una varilla de vidrio.- El jugo de las uvas se cargaba así con los fermentos que se encontraban en la superficie.- Procedí con este líquido como si se tratara de vino o de borra, pero suprimiendo la primera dilución en agua, pues la riqueza en gérmenes era indudablemente mucho menor.-

Como he dicho en el capítulo anterior, la pequeña cantidad de uva Criolla que he traído de Mendoza, fué puesta en fermentación; al segundo día de esta, efectué los aislamientos.-

Todas estas operaciones y las siguientes fueron practicadas empleando recipientes y aparatos esterilizados, y e-

perando según la técnica corriente de la Microbiología que, cuando está bien empleada aleja toda posibilidad de contaminación; por lo tanto puedo afirmar que los fermentos aislados existían realmente en las muestras.-

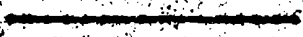
Las primeras operaciones del aislamiento fueron efectuadas a las 48 horas de recogidas las muestras, pero el transplante de las colonias obtenidas solo fué posible efectuarlo unas tres o cuatro semanas más tarde, pues como la temperatura ambiente era sumamente elevada en esa época, tuve que mantener las cajas de Pétri en la heladera (10-11 grados) para evitar la fusión del medio de cultivo.- Esto tuvo por consecuencia aumentar el tiempo del desarrollo, pero en cambio he podido observar que las diferencias entre las colonias así obtenidas son mayores que cuando se opera a una temperatura más elevada; lo que no deja de tener grandes ventajas.-

#### TRANSPLANTE DE LAS COLONIAS -

En algunas cajas se desarrollaron numerosas colonias de mohos, y como estos crecen muy rápidamente, me he visto obligado a efectuar el transplante de las colonias de levaduras que se encontraban en dichas cajas, cuando las colonias eran aún muy pequeñas; existiendo por otra parte probabilidades para que los cultivos resultaran impuros, efectué inmediatamente después del primer cultivo un segundo aislamiento en mosto gelatinizado.- Las cajas en que esto sucedió correspondían a los aislamientos directos de los gérmenes que se encontraban sobre las uvas; de ellas provienen las levaduras señaladas con los números 1 - 2 - 3 - 4 - 5 y 6.-

He aislado un total de 30 colonias que a primera vista

presentaban entre sí algunas diferencias.- El número de cultivos se redujo a 23 pues un cierto número de dichas colonias no eran tales, sino simples aglomeraciones de cristales (=)



(=) - Ciertas aglomeraciones de cristales (bitartrato de potasio) que suelen formarse en los medios de cultivos, pueden ser confundidas fácilmente en un principio con colonias de levaduras; estas aglomeraciones eran muy raras en las cajas donde existía gran número de colonias, haciéndose muy abundantes en el caso contrario.- Esto puede explicarse de dos modos; o bien las levaduras en vida aerobia transforman la sustancia que origina las aglomeraciones de cristales, o de lo contrario los productos formados por las levaduras impiden la cristalización de esta sustancia; esto último me parece poco probable.- En apoyo de la primera hipótesis se encuentran los trabajos de Laurent que demostró que las levaduras asimilan débilmente el tartrato de potasio y enérgicamente el tartrato de amonio (Véase Laurent - Recherches physiologiques sur les levures - pág. 56 y 57.-)

- PURIFICACION -

-----

Si se tratara de bacterios sería sumamente fácil comprobar la pureza de los cultivos así obtenidos; bastaría un simple exámen microscópico después de coloración, o la comparación de las colonias en placas de gelatina.-

Tratándose de levaduras el problema es mucho más difícil; la mayoría presentan formas, dimensiones y caracteres de coloración casi idénticos y el aspecto de sus colonias es también muy semejante.- Y cuando se supone que la impureza posible, puede ser no ya una especie diferente sino una raza de la misma especie, se comprende que los medios comunes no pueden aplicarse en el caso de las levaduras.-

Los métodos de purificación de las levaduras son bastante numerosos y se comprende que cada experimentador podrá modificar según su ingenio los ya existentes.- Sin embargo pueden reunirse en dos grupos: el primero lo constituye únicamente el llamado método fisiológico y el segundo, que comprende todos los demás, se designa con los nombres de método mecánico, de dilución o de culturas fraccionadas.-

El método fisiológico se basa en el hecho siguiente: cuando se siembra en un medio nutritivo determinado una mezcla de dos especies, es general que el medio sea más favorable a una de ellas; esta se desarrollará primero.-

Si cuando se inicia el desarrollo hacemos una nueva siembra en el mismo medio, favoreceremos nuevamente el desarrollo de la especie que se adapte mejor.- Repitiendo varias veces esta operación, tomando una muy pequeña cantidad de semilla llegaremos a tener un cultivo completamente puro.-

Es claro que puede suceder que el medio de cultivo sea

igualmente favorable para las dos o tres especies o razas que constituyen el cultivo primitivo; en este caso bastará operar con otro medio o hacerle variar la temperatura.-

A pesar de todo y especialmente cuando las impurezas están formadas por razas de la misma especie que tienen propiedades muy semejantes puede suceder que no se separen por este método; en este caso debemos recurrir a otro procedimiento.-

Este método pues exige muchos tanteos y no lleva necesariamente al resultado apetecido; cuando lo logramos, muchas veces no podemos comprobarlo, por las razones expuestas más arriba.- Podemos emplearlo solamente en casos especiales como por ejemplo: obtención de un cultivo puro de Saccharomyces apiculatus partiendo de una mezcla de éste y de S. ellipsoideus, pues el primero se desarrolla más rápidamente y sus caracteres morfológicos permiten reconocerlo fácilmente.-

El procedimiento de Lindner, conocido bajo el nombre de cultivo en gotitas (Tropfenkultur), lo he empleado del modo siguiente: una fracción de un cultivo joven se diluye en un medio nutritivo en la proporción de un décimo más o menos, se agita perfectamente y luego con un palito mordadientes cuya punta ha sido finamente aguada con una navaja y luego esterilizado en una caja de Pétri se depositan gotas sumamente pequeñas sobre un cubre-objeto, también esterilizado, el que se invierte sobre un porta-objeto con una concavidad central, teniendo la precaución de pegar los bordes del cubre-objeto con vaselina esterilizada, luego se cuenta al microscopio el número de células que hay en cada gota, se saca el término medio y se conoce de este modo la dilución que será necesario emplear para que en cada gota exista una sola célula; obtenida la dilución conveniente se procede otra vez del mismo modo colocando 3 x 3 o bien 4 x 4 gotas sobre un nuevo cubre-

objetos y luego se examina detenidamente con el microscopio cada una de estas gotitas, que se tiene especial cuidado de hacer del mismo tamaño que en el primer ensayo; las gotas que contengan una sola célula se marcan con tinta con un pequeño circulito y luego se coloca toda la cámara húmeda en la estufa a 25°; las levaduras se multiplican, y a las 48 horas cada una de las gotitas que contenían una sola célula se encuentra poblada por un gran número de estas, entonces se levanta el cubre-objeto y con un pequeño papel de filtro cortado en forma de triángulo y esterilizado y tomado con una pinza pasada por la llama se absorbe una de las pequeñas gotas que en el origen tenían una sola célula y se coloca en un tubo con mosto aséptico; por último se observa al microscopio si en la operación se ha tocado alguna otra gota cercana; en caso negativo podemos tener la seguridad que poseemos un cultivo puro.-

Este ingenioso procedimiento es uno de los pocos que pueden darnos una seguridad absoluta, pero exige el empleo de medios de cultivos y de aparatos que no contengan ninguna partícula extraña, las que dificultan enormemente la observación, por lo cual creo que es practicable únicamente cuando se trata de un pequeño número de cultivos; pero como he operado con un gran número de éstos me he visto obligado a abandonar éste método y substituirlo por otro, que si bien es cierto es mucho más largo es en cambio más practicable; me refiero al método de las diluciones sucesivas en un medio gelatinizado y desarrollo en cajas de Pétri.-

El cultivo que se desea purificar se agita enérgicamente para obtener una suspensión homogénea, luego se sumerge en él un alambre de platino esterilizado, en una longitud de un centímetro; se pasa luego por un primer tubo con mos-



te gelatinizado y con una pipeta Pasteur se toman 10 o 12 gotas que se pasan a un segundo tubo, se vierte el contenido de ambos tubos en dos cajas de Pétri; para activar el desarrollo he colocado las cajas en la estufa a 22°. Al cabo de 5 días las colonias tienen un diámetro de un milímetro; entonces se transplanta una de ellas en un medio nutritivo.- De esta manera se ha practicado una primera purificación.-

Esta operación la he repetido dos veces más llevando así a cuatro el número de aislamientos sucesivos.-

Pasaré ahora a hacer la crítica de este método.- Las investigaciones de Hansen, Miquel y Holm pusieron de manifiesto que una dilución de gérmenes, perfectamente agitada, no siempre conduce a una separación completa de éstos; en consecuencia un cierto número de colonias pudieran estar formadas por la reunión de dos o más especies o razas si el cultivo primitivo no es puro.- Holm demostró que para las levaduras este número es como máximo de un décimo, suponiendo que dos levaduras se encuentren en igual número en el cultivo primitivo; se comprende fácilmente que si una de las dos predomina, existen aun menor número de probabilidades para que una colonia tomada al azar, resulte impura.-

Es fácil calcular que si cuarto aislamiento las probabilidades para que los cultivos sean aún impuros, son menores de uno por diez mil, lo que en este caso equivale a decir que prácticamente los cultivos son perfectamente puros.-

- IDENTIFICACION Y DIFERENCIACION DE LAS DISTINTAS LEVADURAS -



Tenemos ahora maestros cultivos perfectamente puros, pero debemos suponer que habrá muchas levaduras iguales entre sí; se trata pues de eliminar las que se encuentran repetidas, para lo cual he efectuado una serie de ensayos que describo a continuación, con el objeto de diferenciar los distintos cultivos e identificar los que coinciden en todas sus propiedades.-

Son necesarios muchos caracteres para identificar dos o más levaduras y conocer el género y la especie a que pertenecen.- En efecto, la forma y las dimensiones de las células de las distintas especies, no presentan grandes diferencias, y estos caracteres son variables en una misma especie, según las condiciones físicas y químicas del medio y la edad de las células.- Los caracteres fisiológicos son más constantes pero no es raro que dos especies perfectamente definidas coincidan en un cierto número de caracteres.- Por lo tanto para asegurar que dos especies y sobre todo dos razas de levaduras son iguales, es absolutamente indispensable haber examinado un gran número de caracteres.-

Los que he utilizado son los siguientes:

Caracteres morfológicos:	{	Forma y dimensiones de las células.- Forma, número, disposición y dimensiones de los esporos.-
Caracteres de cultivos:	{	Aspecto del depósito.- Aspecto y forma de las colonias en mosto gelatinizado.- Colonias gigantes.- Cultivos en picadura.- " " estria.-



Las levaduras se desarrollan rápidamente durante las primeras horas, pero la débil cantidad de glucosa es agotada rápidamente; las células esporulan al cabo de dos o tres días.-

El método de Engel modificado por Hansen debe practicarse del modo siguiente: se toma un cultivo de una edad no mayor de 48 horas, durante cuyo tiempo se ha renovado 2 o 3 veces el medio nutritivo.- Se lava perfectamente la levadura con agua esterilizada, a fin de eliminar todo alimento(=) y se deposita sobre un bloc de yeso (con una superficie bien lisa) que se ha esterilizado en un pequeño cristizador con tapa, con una cierta cantidad de agua.- Se coloca el todo en una estufa a 25°.-

A las 24 horas muchas especies forman esporos; otras tardan algo más.-

Siguiendo este método he podido observar la mayor o menor rapidez en formar esporos y el número que contiene cada célula, así también como el mayor o menor número de células esporuladas.-

Transcribo solamente el resultado de la observación efectuada a las 48 horas (+).-

Nº DE LA LEVADURA	Nº DE ESPOROS
1.....	?
2.....	no hay.
3.....	"
4.....	"
5.....	"
6.....	"
7.....	..muy escasos.
8.....	"
9.....	..1 - 2 *
10.....	..muy abundantes 1-2 + - 3
11.....	..1 - 2 +

(=) Esta operación se efectúa cómodamente empleando una centrífuga.-

(+) - Las cifras acompañadas de un asterisco indican que predominan las células con ese número de esporos.-

## Nº DE LA LEVADURA

## Nº DE ESPOROS

12.....	1 - 2 - 3
15.....	..muy escasos.
16.....	1 - 2
17.....	..muy escasos 1-2
22.....	1 - 2 +
23.....	..no hay.
24.....	1 - 2
25.....	..no hay.
27.....	1 + - 2
28.....	1 - 2 - 3
29.....	1
30.....	..muy escasos 1.

ASPECTO DEL DEPOSITO - Los cultivos observados fueron hechos en agua de levadura (1) con 3 % de sacarosa y 2 % de glucosa.- Los he examinado diariamente para tener conocimiento del aspecto más o menos límpido o turbio que toma el medio durante el desarrollo y después de la fermentación, lo mismo que el aspecto del depósito, datos que según creo tienen cierta utilidad.-

Al quinto día del desarrollo todos los tubos presentaban un depósito formado por células de levaduras; su color es blanco sucio cuando se opera a baja temperatura, en el caso contrario es más o menos pardusco.-

Este depósito presenta un aspecto pastoso; cuando se agita se pone fácilmente en suspensión y el líquido toma un aspecto uniformemente turbio.-

---

(1) - El agua de levadura se prepara del modo siguiente: Se toma una cierta cantidad de levadura de cerveza (muy fresca) que se diluye en un gran volumen de agua, se filtra a través de un género de textura apretada para eliminar las impurezas y se deja reposar durante 24 horas en un lugar fresco.- Este tratamiento tiene por objeto hacer desaparecer las reservas hidrocarbonadas de las levaduras, que pasarían al medio de cultivo y molestarían en ciertos casos (p.ej. cuando se estudian los caracteres de fermentación de los azúcares).-

Se decanta el agua que sobrenada la levadura, se toman 100 gramos del depósito formado por ésta, que se diluye en un litro de agua y se lleva a la ebullición, la que se mantiene durante 5 minutos; se filtra en caliente, se agrega 5 a 10 % de azúcar y se esteriliza a 120°.- Si no se consigue obtener un líquido límpido se añaden unas gotas de una solución de ácido fosfórico y se neutraliza éste con agua de cal; se calienta a 120° y se filtra en caliente.- El líquido así obtenido es completamente transparente.-

Esto no sucede en el caso de la levadura 22, cuyo depósito se aglutina de tal modo que es imposible ponerlo en suspensión homogénea por más violenta que sea la agitación.- Esto permite reconocer inmediatamente esta levadura y diferenciarla de las demás.- Si la agitación no es muy enérgica la masa única que constituye el depósito, nada en el líquido conservando la forma del recipiente; agitando más vivamente se forman grumos más o menos gruesos, los que se dirigen rápidamente al fondo y aglutinan nuevamente en cuanto cesa la agitación, sobrenadando un líquido enturbiado por grumos más finos y algunas células aisladas.- En la última parte del presente estudio volveré a ocuparme de esta propiedad.-

Agitando enérgicamente todos los tubos y observando después de 30 minutos de reposo, el líquido presenta los aspectos siguientes:

Turbio uniformemente.- Levaduras 1, 2, 3, 4, 6, 23 y 25.

Casi límpido en todo el tubo.- Levadura 5.-

Perfectamente límpido en la parte superior.- Levaduras: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 22, 24, 27, 28, 29 y 30.-

He observado también el momento de la aparición de un velo o de un anillo o la ausencia de éste.- No quiero publicar estos datos para no aumentar demasiado el volumen de éste estudio, con datos que en este caso creo que no tienen mayor importancia.-

#### ASPECTO Y FORMA DE LAS COLONIAS EN MODO GELATINIZADO.-

Las levaduras estudiadas corresponden a los diferentes tipos de colonias que se desarrollaron en las cajas de Pétri al efectuar los aislamientos.- Las diferencias eran a veces muy notables, pero las colonias obtenidas a partir de los cultivos sucesivos, no presentan en muchos casos los ca-

caracteres de las primitivas colonias.- En algunos casos esto se debe a que las colonias han sido originadas por dos células de razas o especies diferentes, pero en otros casos es más lógico suponer que las levaduras esporuladas y desecadas que se encuentran en la superficie de las uvas producen colonias diferentes de las originadas a partir de un cultivo en mosto.- Algo análogo sucede si se comparan las colonias obtenidas partiendo de un cultivo en plena fermentación con otras obtenidas de un cultivo cuya fermentación ha terminado.

Los caracteres de las colonias originadas a partir de estos últimos cultivos son completamente fijos para una misma levadura, siempre que no se modifiquen las condiciones físicas y químicas del medio.- Es a estas colonias a las que me refiero en el presente capítulo.-

Consideraré únicamente las colonias superficiales, pues las profundas presentan en general diferencias casi insignificantes.-

Se distinguen netamente cuatro grupos: el 1º lo constituye únicamente la levadura 1 con colonias muy grandes desarrolladas al nivel de la gelatina, de forma irregular, color blanco sucio, y aspecto cremoso; cada colonia está rodeada de prolongaciones, formadas por la juxtaposición de pequetísimas colonias profundas, que se dirigen en todas direcciones lo que dá al borde de la colonia un aspecto parecido a las de Proteus vulgaris.-

El segundo grupo formado por las levaduras 2, 3, 5, 6, 23 y 25, presenta colonias blanquiscas, circulares, de borde liso y poco elevadas; el aspecto es también más o menos cremoso.-

El tercer grupo comprende únicamente la levadura 4; sus colonias tienen los mismos caracteres que las del grupo anterior, pero después de varios días de desarrollo toman un co-



lor rosado que permite distinguirlos fácilmente.  
demás.- Este carácter unido a la ausencia de  
toriza a colocar estas levaduras dentro del grupo  
las coloreadas.-

El cuarto y último grupo lo forman las  
10, 11, 12, 15, 16, 17, 22, 24, 27, 28, 29 y 30; sus  
elevadas, generalmente filiformes, color blan-  
queciento consistente; las colonias son a veces  
por acción de la gravedad en extremidad libre  
ta llegar a tocar la superficie de la gelati-  
namente la colonia presenta la forma de un a

COLONIAS GIGANTES - Se llaman así a las que  
disponiendo de una gran cantidad de alimento  
tritivo empleado es el mosto de cerveza gela  
cantidad de gelatina puede variar entre 10 y  
según la temperatura ambiente; he empleado m  
sa negra con 13 por ciento de gelatina; neut  
exceso de ácidos con hidrato sódico, hasta q  
mayor de 1 por mil.-

El medio de cultivo así preparado se di-  
jas de vidrio de tapa sobrepuesta y de un ta-  
para contener unos 150 c.c. de aquel, quedan  
espacio libre.- Se esteriliza a 100° en el a-  
ces consecutivos con 24 horas de intervalo,  
y se siembra en el centro una pequeña cantidad  
dura que se desea estudiar.-

Después de 30 o 40 días la colonia ha a-  
tamaño poseyendo caracteres diferenciales e-  
bles.- Sería largo describir los de cada una  
ras aquí tratadas; en la última parte de est-

contrarán descripciones y fotografías de algunas de ellas.-

Si en vez de operar con un medio ácido lo hacemos con un medio ligeramente alcalino (1 por mil de NaOH) los caracteres diferenciales se transforman, acentuándose de una manera muy notable.-

Los caracteres suministrados por las colonias gigantes en medio ácido y alcalino son muy útiles para la identificación de dos o más cultivos de levaduras.-

Operando en mosto ácido, he obtenido colonias de 7 tipos diferentes lo que me permite agrupar las levaduras estudiadas del modo siguiente:

- 1º tipo.....Levaduras.....1
- 2º " ....."......2
- 3º " ....."......3, 5 y 6
- 4º " ....."......4
- 5º " ....."......23 y 25
- 6º " ....."......22
- 7º " ....."......comprende todas

las restantes.-

Las levaduras comprendidas en el tipo 7 no forman colonias exactamente iguales; por el contrario hay diferencias bastante notables, distinguiéndose algunas por el gran número de líneas radiales y concéntricas que se distribuyen en su superficie; las primeras pueden ser muy finas o bien tomar el aspecto de pliegues más o menos anchos y numerosos.-

CULTIVOS EN PICADURA - He operado en tubos de ensayo; en cada tubo distribuí unos 10 c.c. de mosto de uvas gelatinizado.- Previa esterilización y una vez frío y solidificado el medio de cultivo practiqué las siembras en picadura.-

A los 8 días comparé los diferentes aspectos que presentan los cultivos así obtenidos.-

Se observan 4 tipos bien definidos:

1º Tipo - Levadura 1; desarrollo abundante en superficie y en profundidad, licuante en superficie, en profundidad aspecto miccoides.-

2º Tipo - Levaduras 2,3,4,5 y 6; desarrollo abundante en la superficie, muy escaso en profundidad; la levadura 2 forma una colonia prominente.- Las restantes están más o menos hinchadas, lo que indudablemente indica un principio de licuación de la gelatina; tanto en este ensayo como en todos los demás la levadura 4 es inconfundible, por el color rosado que presenta.-

3º - Tipo.- Levaduras 7,8,9,10,11,12,15,16,17,22,24,27,28,29 y 30; desarrollo muy abundante, tanto en superficie como en profundidad, no licuan la gelatina en ningún caso; el desarrollo en profundidad se presenta en forma de granos más o menos grandes dispuestos unos encima de otros; estos granos cuyo tamaño disminuye al llegar a la extremidad inferior, pueden ser más o menos esféricos o afectar la forma de discos superpuestos.-

Después de 8 o 10 días aparecen fallas en el medio del cultivo debido al despreñamiento de los gases originados durante la fermentación.-

4º Tipo - Levaduras 23 y 25; desarrollo abundante en superficie y en profundidad; la gelatina es licuada en forma de embudo alargado de paredes sinuosas.-

CULTIVOS EN ESTRIA - He operado con el mismo medio de cultivo que he empleado en el ensayo anterior pero dejando enfriar los tubos en posición casi horizontal a fin de disponer de una gran superficie.- Después de efectuar las siembras, el desarrollo se continuó a la temperatura ambiente (15º - 20º).-

A los 10 días los cultivos eran bien aparentes, y la observación fué practicada entonces.-

Lo mismo que en el ensayo anterior, se distinguen netamente cuatro grupos, aunque cada uno de ellos no comprende las mismas levaduras que en aquel.-

1º Grupo - Levadura 1; abueca y licua la gelatina formando colonias separadas que se ramifican en todo sentido.-

2º Grupo - Levadura 2; forma una estria ancha que no licua la gelatina; color blanco grisáceo, aspecto brillante, borde liso.-

3º - Grupo - Levaduras 3,4,5,6,23 y 25; forman una estria ancha y profunda, producida por la licuación de la gelatina; las levaduras junto con el líquido formado corren hacia la parte inferior del tubo.-

4º - Grupo - Constituido por todas las levaduras restantes; forman estrias anchas de borde desgranado, los granos pueden ser gruesos o bien muy delgados, se insertan sobre la parte media y elevada de la estria.- El conjunto de ésta presenta un aspecto parecido al que se dá a las cadenas de montañas en los mapas en relieve.- Su color es blanco mate; ninguna licua la gelatina.-

Es claro que no todas las levaduras de este grupo, dan origen a estrias exactamente iguales; por el contrario, cada una se diferencia de las restantes por la altura, y el tamaño de los granos, pero como puede formarse una verdadera escala entre las estrias con granos gruesos y las de granos finos no es posible subdividir este grupo.-

ACCION SOBRE LA GELATINA - Como hemos visto en los dos ensayos anteriores, hay un cierto número de levaduras que atacan la gelatina desde el principio de su desarrollo; otras

en cambio no lo hacen o lo hacen muy lentamente.-

Después de cuatro meses he examinado nuevamente los tubos que había utilizado en los ensayos anteriores.- Los tubos en que se habían efectuado cultivos en picadura presentaban la gelatina:-

Licuada totalmente: levadura 1.-

Licuada casi totalmente; (la licuación ha progresado horizontalmente) levaduras 2,3,4,5, y 6.-

Licuada en su tercera parte; (la licuación ha progresado en forma de embudo con la extremidad hacia abajo) levaduras 23 y 25.-

Licuada muy poco o no licuada; (la observación es difícil por cuanto la gelatina presenta numerosas fallas debidas al anhídrido carbónico desprendido durante la fermentación) éste grupo comprende las levaduras restantes.-

La observación es más fácil en los tubos que corresponden al ensayo en estris; se forman tres grupos.-

1º - Licúan abundantemente: levaduras 1,2,3,4,5,6,23 y 25.-

2º - Licúan ligeramente, pero lo suficiente para que el líquido formado corra hacia la parte inferior: levaduras 7, 10,12, y 15.-

3º - No licúan: levaduras 8,9,11,16,17,22,24,27,28,29 y 30.-

En este último grupo algunas levaduras tienen una tendencia más o menos marcada a atascar la gelatina, pero ninguna llega a licuarla manifiestamente.-

ENSAYO DE FERMENTACION EN LIQUIDO MINERAL - He empleado el líquido de Mayer, cuya composición es la siguiente:

Sacarosa.....150 gr.

24

31

Fosfato de potasio (monobásico).....5 gr.  
 Sulfito de magnesio.....5 "  
 Fosfato de calcio (bibásico).....0,75 "  
 Nitrato de amonio.....0,75 "  
 Agua.....1000 "  
 Caldo peptonado y salado.....80 c.c.

En diversas matraces de 500 c.c. coloqué 250 c.c. de este líquido y después de esterilizar sembré en cada uno una pequeña cantidad de levadura.-

He podido observar que este medio de cultivo es poco apropiado para las levaduras, pero para el objeto que me proponía podía utilizarse perfectamente.- La fermentación solo se inició después de varios días y fué sumamente lenta a pesar de operar a 25°, temperatura muy favorable.-

Después de 13 días la fermentación había terminado en la mayoría de los matraces; agregué entonces a cada uno 50 c.c. de una solución esterilizada de sacarosa al 50 % es decir 25 gr. a cada ensayo; 10 días más tarde siendo ya muy débil la fermentación agregué nuevamente a cada matras 55 c.c. de una solución de 800 gr. de azúcar disuelto en agua hasta ocupar un volumen total de 900 c.c. lo que corresponde a 48 gr. de sacarosa a cada ensayo.-

En este momento el volumen total es de  $\pm$  355 c.c.; la sacarosa  $\pm$  110 gr., es decir 31 gr. por cien centímetros cúbicos, lo que equivale a 37 gr. de glucosa que podrían transformarse en 17,8 gr. de alcohol o sea cerca de 52 por ciento de alcohol en volumen, suponiendo que el azúcar agregado fuera puro y que su transformación en alcohol se hiciera según la correspondiente ecuación química.-

De este modo cada levadura podrá producir el máximo de alcohol que será capaz de soportar en esas condiciones.-

Cuando la fermentación se había hecho muy perniciosa aireé todos los ensayos, haciendo pasar una corriente de aire estéril y agitando vivamente.-

Después de dos meses de fermentación, y habiendo ésta terminado completamente, procedí al dosage del alcohol, destilando 100 c.c. de líquido y tomando luego la densidad del destilado a 15°.-

No he efectuado este ensayo con las levaduras 1, 2, 3, 4, 5 y 6, pues estas no producen fermentación.-

Los resultados obtenidos van a continuación:

NR DE LA LEVADURA	ALCOHOL % EN VOLUMEN
7	10,5
8	10,7
9	10,5
10	10,6
11	10,5
12	11,4
13	10,6
14	9,2
17	11,0
22	10,4
23	0,5
24	10,2
25	0,4
27	9,7
28	10,6
29	10,3
30	9,3



Vemos pues observando el cuadro anterior, que es posible separar las levaduras que estudiamos en tres grupos:

1ª - Las que no producen alcohol N<sup>o</sup>: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.-

2ª - Las que en estas condiciones producen  $\pm$  0,5 % de alcohol N<sup>o</sup> 23 y 25.-

3ª - Las que en estas condiciones producen de 9,3 a 11,4 de alcohol, que son todas las restantes.-

CULTIVOS EN MEDIO ALCALINO - 0,5 o/oo Na OH.- He operado en

tubos de ensayo a 25<sup>o</sup>, empleando como medio de cultivo agua de levadura adicionada de 3% de sacarosa 2 % de glucosa y 0,5 o/oo de hidrato de sodio.- Los cultivos fueron observados diariamente // con el resultado siguiente:

Primer día: - Hay desarrollo, sin fermentación en los tubos: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 22, 24, 28 y 29.-

Segundo día: - Hay desarrollo sin fermentación en 16, 23 y 25.-

Hay fermentación en: 7, 8, 9, 10 (muy enérgica), 11, 12, 15, 17 (muy débil), 22 id. 24 (muy enérgica) 27, 28, 29 y 30.-

Tercer día: - Desarrollo sin fermentación en: 1, 2 (con velo, 3 id., 4 id., 5 id., 6.-

Nota: - El 6<sup>o</sup> día la fermentación ha terminado; la levadura 6 ha formado velo.- La 1 se ha desarrollado en forma de colonias ramificadas.-

CULTIVOS EN MEDIO ALCALINO - 1 o/oo Na OH.-

Primer día -

Hay desarrollo sin fermentación en 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 23, 24, 25, 27, 28, 29 y 30.-

Segundo día -

Aparece un velo superficial en los cultivos 23 y 25 (muy ténses).-

Tercer día.-

Hay desarrollo en: 1 (aspecto idéntico al del ensayo anterior), 2 (con velo), 3 id., 4 (velo únicamente), 5 (velo) 6.-

Hay fermentación en los demás tubos.- En los tubos 10, 23 y 25 el desarrollo es muy abundante pero la fermentación es muy débil.-

Al final de la fermentación la reacción es francamente ácida en todos los tubos.-

CULTIVOS EN MEDIO MUY ACIDO: 20 o/oo DE ACIDO TARTRICO.-

Medio de cultivo: agua de levadura + 3 % sacarosa + 2 % glucosa + 20 o/oo ácido tártrico.- Temperatura 25°.-

1º - 2º y 3º día.-

No hay desarrollo.-

4º día.-

Hay fermentación en: 12 (débil), 16, 27 (débil), 28, 29 (enérgica) y 30.-

5º día.-

La fermentación se manifiesta en los tubos siguientes: 7 (débil), 9 (id), 17 (id), 22 (id) y 25.-

6º día.-

Aparece la fermentación en: 7, 10, 11, 15 y 24.-

10º día.-

Habiendo terminado la fermentación en todos los cultivos en que se ha manifestado, se observa que la levadura 25 forma velo y se desarrolla abundantemente mientras que la 23 que es también un *Saccharomyces apiculatus* no forma velo y su desarrollo es casi nulo.-

CULTIVOS A 37° -

Medio de cultivo: agua de levadura + 3 % sacarosa + 2 %

glucosa.-

La fermentación se manifiesta desde el primer día, salvo en los cultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 23 y 25.- Es relativamente débil, excepto en el tubo correspondiente a la levadura 28 que fermenta tan activamente como a 25f.-

#### CULTIVOS A 39f.-

Medio de cultivo: el mismo que en el ensayo anterior.-

#### Primer día.-

Desarrollo abundante; fermentación franca en 7 ++, 8 ++, 9 ++, 10 ++, 11 ++, 12 +, 13 +++, 17 ++, 22 +, 24 ++, 27++, 28 +++, 29 +++, y 30 +++.-

Los signos + indican la mayor o menor actividad de la fermentación.- Este ensayo y los siguientes no se han efectuado para las levaduras 1 a 6, 23 y 25 por haber sido negativo el cultivo a 37f.-

Colocados los tubos en la estufa a 28f la fermentación ha continuado activamente en todos, salvo en el 16 donde no hubo desarrollo.-

#### CULTIVOS A 41f.-

Medio de cultivo: el mismo que en los 2 ensayos anteriores.-

#### Primer día.-

Hay desarrollo en: 7, 15 y 28.-

#### Segundo día.-

El desarrollo se manifiesta también en los cultivos: 9, 17 y 29.-

#### Tercero y cuarto día.-

Lo mismo que el 2º día.- Habiendo colocado los cultivos en la estufa a 28f he observado lo siguiente:

Primer día.-

Hay fermentación en 7, 15, 17, 22, 23 y 29.- Los demás han quedado en el mismo estado, durante todo el período de la observación.-

CULTIVOS A 42° -

Medio de cultivo: el mismo que en los 3 ensayos anteriores

Primero y Segundo día.-

Hay desarrollo en: 7, 9, 15, 17, y 23 (muy débil).-

Los cultivos fueron llevados a la estufa a 28° grados.-

Primer día.-

Fermentación muy débil en el cultivo 7; aparece un ligero desarrollo en el 29.-

Segundo día.-

Fermentación franca en: 7, 9, 15, 17 (muy activa) y 23.-

Se acentúa el desarrollo en la levadura 29.-

CARACTERES DE FERMENTACION DE LOS AZUCARES -

Aunque no haya utilizado este dato para la identificación, creo conveniente consignar aquí el modo operatorio, por cuanto he efectuado esta determinación para completar el estudio de las 3 razas con las cuales he proseguido mi trabajo.-

Quando se dispone de una cantidad suficiente del azúcar con el cual se desea operar puede efectuarse el ensayo con una solución al 5 o 10 por ciento en agua de levadura.- Pero cuando se trata de productos raros o caros como la manosa o la gulosa se emplea el método de Lindner, que consiste en colocar una gota de agua de levadura conteniendo una dilución de gérmenes en una cámara húmeda; se agrega con un alambre de platino una pequeña cantidad del azúcar que se desea examinar, previamente pulverizado; se cubre con un cubre-objeto

bordeado con vaselina y se coloca en la estufa a 25°.-

Al día siguiente se examina la preparación.- Si se ha producido una fermentación el cubre-objeto se encuentra algo levantado, habiéndose derramado una parte del líquido que llenaba la célula y encontrándose en ésta una gran burbuja de gas.-

Puede comprobarse que este gas es anhídrido carbónico dejando caer sobre los bordes del cubre-objeto unas gotas de hidrato de potasio.- La burbuja de gas se encoje inmediatamente y desaparece.-

#### RESUMEN -

Con estos datos podemos identificar las levaduras pertenecientes a una misma especie o raza y diferenciar al mismo tiempo las distintas especies o razas.-

Creo lógico agrupar las distintas levaduras aquí tratadas, del siguiente modo:

1º grupo	Levadura 1	}	(=)
2º "	" 2		
3º "	" 3, 5 y 6		
4º "	" 4	Torula sp.	
5º "	" 23 y 25	Saccharomyces apiculatus.-	
6º "	" 22	Saccharomyces ellipsoideus.-	
7º "	" 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 24, 27, 28, 29 y		

30 Saccharomyces ellipsoideus.-

Ahora bien, de los diversos ensayos practicados se deduce inmediatamente, que no todas las levaduras colocadas en

---

(=) - No he determinado la especie o el género de las levaduras que constituyen los 3 primeros grupos, pues como no originan la fermentación alcohólica no nos interesan en éste caso.-

un mismo grupo son idénticas; por el contrario en cada grupo se encuentran variaciones individuales.-

En el 7º grupo es donde las variaciones individuales son más apreciables.- Cualquier carácter que tomemos para identificarlas, no nos dará una concordancia absoluta entre los diferentes cultivos, sino toda una graduación de caracteres, lo que nos autoriza a considerar todos los cultivos de este grupo como pertenecientes a una misma raza, que por ser la más abundante y la que casi exclusivamente se encuentra en los vinos y borras de la región de origen, podríamos llamar raza de Mendoza.-

- PRINCIPALES CARACTERES DE LAS LEVADURAS 12, 22 y 28 -



Practicada la identificación y diferenciación de los distintos cultivos, con el resultado expuesto anteriormente, resolví estudiar más detenidamente tres de ellos, los que presentaban en mayor grado un carácter útil.- La levadura 12 por el elevado grado alcohólico que originó en el ensayo de fermentación en líquido de Mayer (más adelante se verá que de las tres levaduras aquí estudiadas es la 28 la que en un mosto natural que contenga mucho azúcar, origina más alcohol); la levadura 22 por poseer la curiosa propiedad de aglutinarse enérgicamente, circunstancia muy útil en vinificación por disminuir considerablemente el número de trasiegos necesarios para obtener un vino limpio; y finalmente la levadura 28 por ser la más resistente a las temperaturas elevadas.- (véase el capítulo anterior págs. 34 a 36)

En este capítulo reuniré los caracteres principales de estas levaduras.-

LEVADURA 12 -

Caracteres morfológicos.- Células elipsoidales, algunas veces esféricas; dimensiones:  $4,5\mu$  -  $10\mu$  de largo por  $4,5\mu$  -  $7\mu$  de ancho.- La fotografía adjunta (fig. 1) representa células procedentes de un cultivo de 24 horas.-

Esporos.- Operando en las condiciones fijadas anteriormente (pág. 21.) un cierto número de células esporulan; al cabo de 24 horas a 25° pueden observarse esporos bien formados.- Cada célula contiene de 1 a 4 esporos, siendo muy raro observar una célula que contenga este último número de esporos; las más comunes son las de 2 y 3 esporos.- Estos son esféricos, de superficie lisa, como corresponde a la especie, y de un diámetro de  $2,3\mu$  -  $3,6\mu$  (fig. 2).-

Caracteres del depósito.- Color blanco sucio, aspecto pastoso; al agitar el medio de cultivo, se pone fácilmente en suspensión.-

Colonias en placas.- Filiformes, muy elevadas, color blanqueco, aspecto mate, bordes regulares.- (fig. 3).-

Cultivos en estria.- Estria ancha muy prominente en el centro. Color y aspecto idéntico al de las colonias en placas, borde aserrado; no se observan líneas longitudinales (véase la fot. de la fig. 4).-

Colonias gigantes en medio ácido.- Colonias prominentes, con bordes lobulados hundidos en la gelatina, aspecto ceroso; el conjunto de la colonia presenta la apariencia de un pequeño volcán.- Existen finísimas estrias que partiendo del cráter terminan en la periferia.-

A una distancia media entre el centro y los bordes existe un segundo borde de aspecto seco.- La fotografía de la fig. 5 dará una idea más perfecta que cualquier descripción minuciosa.-

Colonias gigantes en medio alcalino.- Se caracterizan por la aparición de numerosos círculos concéntricos que dan a la colonia un aspecto muy bonito.- (véase la fig. 5).-

Orden de las células de las colonias gigantes.- En el cráter de la colonia las células son esféricas o ligeramente elípticas, tienen un protoplasma granuloso y muchas poseen esporos.-

En la periferia: células redondas elípticas y alargadas, tamaño muy variable, protoplasma hialino o granuloso.- En la parte de abajo: células en general muy alargadas (5 a 6 veces el ancho) con varios vacuolos y con protoplasma homogéneo.-



Acción sobre la gelatina.- Esta levadura ataca ligeramente la gelatina (véase el capítulo anterior pág. 29 ).-

Caracteres de fermentación de los hidratos de carbono.- Esta levadura origina la fermentación alcohólica de los siguientes hidratos de carbono: dextrosa, levulosa, manosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa (de esta última solamente 1/3); no tiene acción alguna sobre la lactosa, la melibiosa, y la destrina, pero estos pueden ser utilizados como alimentos, pues las levaduras se reproducen en los medios de cultivos que no contengan más que estos hidratos de carbono.-

#### LEVADURA 22 -

Los caracteres morfológicos, los de las colonias en placas y los caracteres de fermentación de los azúcares son los mismos que los de la levadura 12.-

Aspecto del depósito.- Como he dicho anteriormente (pág. 23 ) esta levadura se caracteriza por la enérgica aglutinación de sus células.- En la suposición que esta propiedad fuera debida al desarrollo de una autoaglutinina, he efectuado algunos ensayos: terminada la fermentación, al líquido filtrado por bujía le he agregado una emulsión de otra levadura; no hubo ninguna aglutinación.- A una nueva porción añadí una cierta cantidad de azúcar y una pequeña cantidad de otra levadura, la fermentación se efectuó normalmente sin aglutinación.- A otro ensayo agregué azúcar y sembré en él una pequeña cantidad de la misma levadura 22: la aglutinación no fué mayor.-

Estas rápidas experiencias deben hacernos abandonar la hipótesis de una autoaglutinina.- Se trata seguramente de una propiedad específica de la célula misma o de su membrana.-

Esporos: - Cada célula de las esporuladas contienen 1 o 2 esporos; es sumamente raro encontrar células con 3 esporos.- Mi-

den estos  $3,1 \mu$  -  $3,9 \mu$ .

Cultivos en estria.- Estria no muy ancha, borde lobulado, no se observan líneas longitudinales (véase la fig. 4).-

Colonias gigantes en mosto ácido y alcalino.- Son también prominentes y con los bordes lobulados, hundidos en la gelatina; en mosto ácido los círculos concéntricos son visibles solamente con una iluminación oblicua, en mosto alcalino las colonias no poseen ningún círculo concéntrico y su tamaño es mucho más reducido que en mosto ácido.- En ambos casos se observan numerosas y finas estrias radiales (fig. 7 y 8).-

30 a 35 % de las células provenientes del cráter de la colonia desarrollada en mosto alcalino están esporuladas; muchas tienen 5 y 6 esporos pequeños y de tamaño desigual.-

#### LEVADURA 28 -

Las propiedades morfológicas y fisiológicas de esta levadura son las mismas que la de la levadura 12 (se comprende que así sea, pues pertenecen a la misma raza; véase el resumen del capítulo anterior).- Sin embargo existen algunas pequeñas diferencias: Esta levadura parece más activa, su mayor resistencia a las temperaturas elevadas la hace más apta para la vinificación en las condiciones de Mendoza, a esto se une un grado alcohólico más elevado del vino producido (véase el capítulo siguiente).-

Entre sus caracteres de cultivo debe señalarse que los cultivos en estria presentan líneas longitudinales bien marcadas (fig. 4).-

---

Por lo tanto las levaduras 12, 22 y 28, se diferencian principalmente:

12 - Por el aspecto del depósito.-

- 21 - Por el número y el tamaño de sus esporos.-
- 31 - Por las características de sus colonias gigantes en mosto ácido y alcalino.-
- 41 - Por las características de sus cultivos en estria.-
- 51 - Por la mayor o menor actividad a las temperaturas elevadas (55°).-
- 61 - Por la facultad de licuar la gelatina.-
-

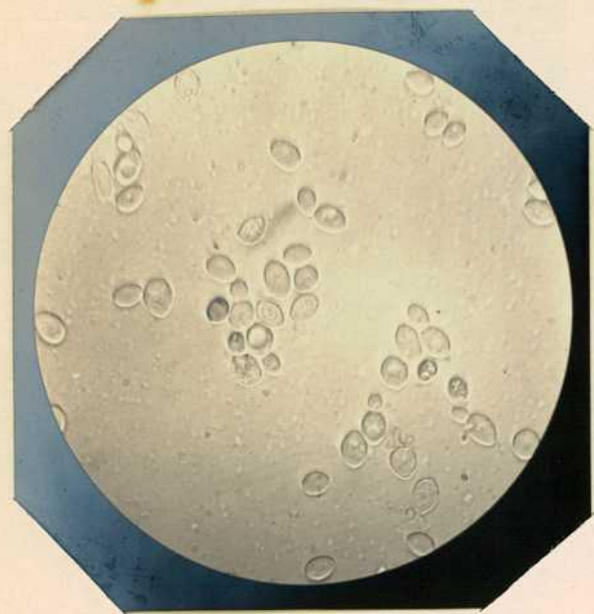


Figura 1.  
Levadura 28 - Células en brotación

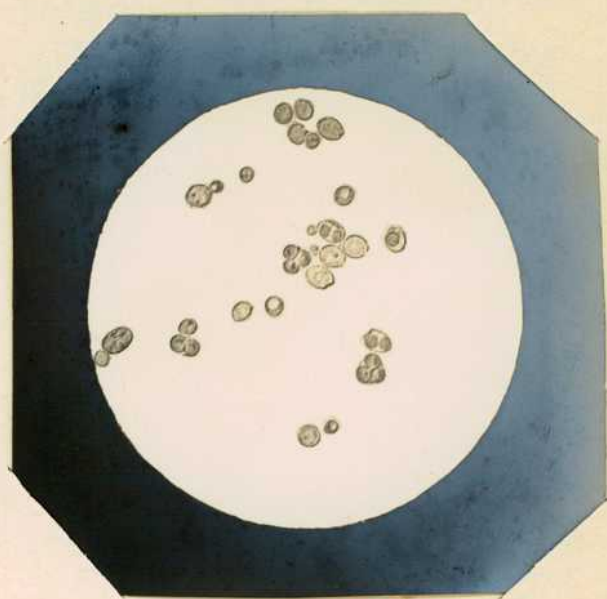


Figura 2.  
Levadura 28 - Células esporuladas.

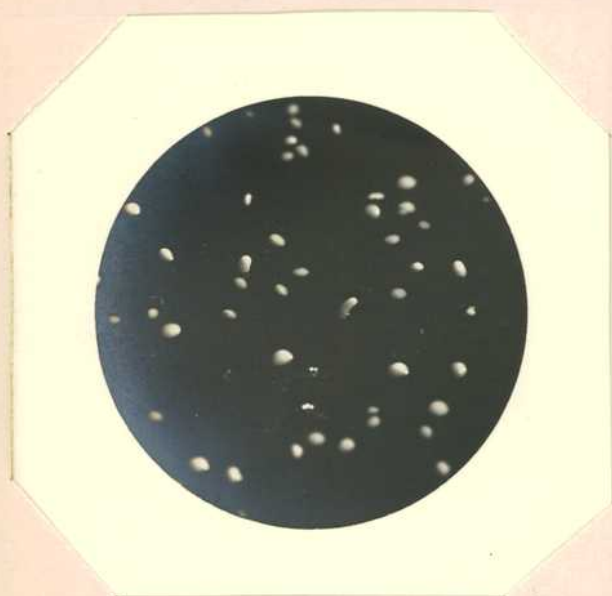


Figura 3.  
Levadura 28 - Colonias en placas.  
Aumento  $\frac{2}{1}$

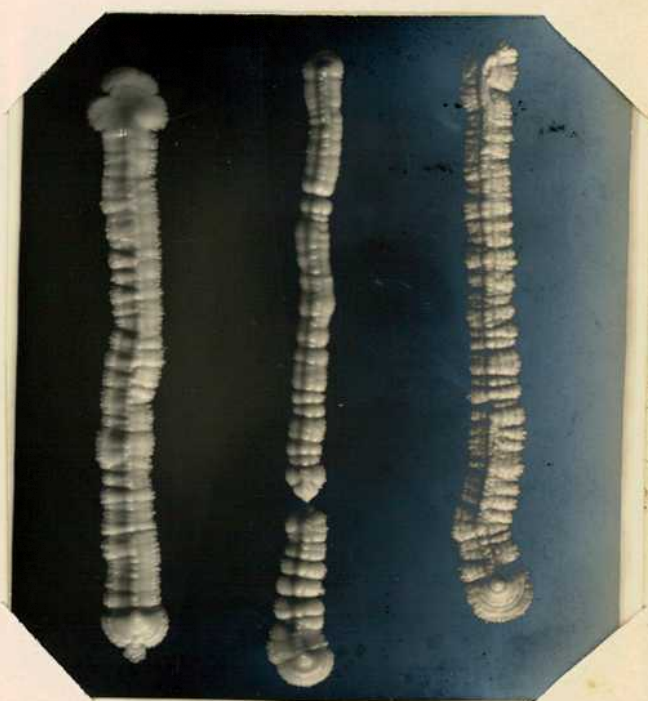


Figura 4.  
Levadura 12, 22 y 28 - Cultivos en estria.- Fanaño natural.



- COLONIAS GIGANTES -

30 días de desarrollo, salvo para la colonia de la fig. 9 que solo tiene 17 días.

figura 5  
Levadura 12 en mosto ácido.



Figura 6  
Levadura 12, en mosto alcalino



Figura 7  
Levadura 22, en mosto ácido.

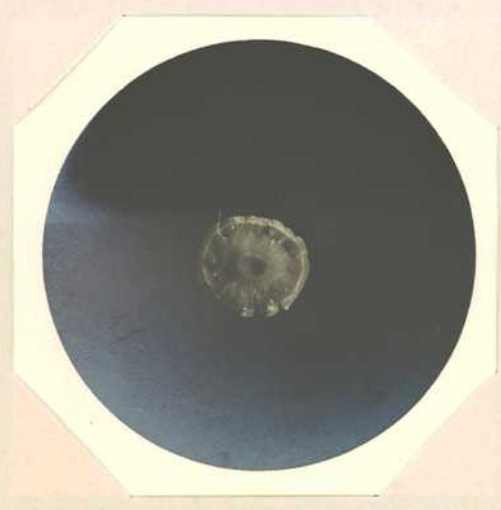


Figura 8.  
Levadura 22, en mosto alcalino



Figura 9  
Levadura 28, en mosto ácido.



Figura 10  
Levadura 28, en mosto alcalino



- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD -



La determinación de la actividad de una levadura puede hacerse por varios métodos; uno de ellos, indudablemente el más rápido y el más sencillo, es el de la atenuación.-

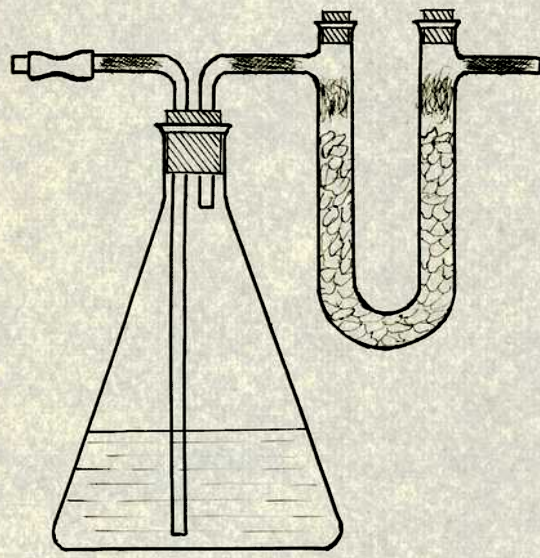
Por atenuación se entiende la disminución de densidad que se produce en un mosto por la eliminación del azúcar durante el curso de la fermentación.- Se llama atenuación aparente la que se observa directamente, determinando la densidad del líquido fermentado o en fermentación; pero es preciso recordar que la disminución observada en la densidad, no se debe únicamente a la desaparición del azúcar del mosto, pero también al alcohol originado a expensas de este azúcar.- Por consiguiente si tomamos la densidad del líquido fermentado, privándolo previamente del alcohol, por ebullición, conociendo la densidad primitiva del mosto a la misma temperatura, tendremos los elementos necesarios para calcular la atenuación real.-

Por otra parte teniendo en cuenta que la disminución de densidad originada en el vino, por el alcohol, es la misma que en el agua, podemos también, conociendo la cantidad de alcohol, la densidad primitiva del mosto y la del vino fabricado, calcular la atenuación real.-

Este método muy empleado para determinar la actividad de las levaduras de cerveza, lo es poco para las levaduras de vino; sin embargo lo he utilizado conjuntamente con el procedimiento siguiente, que es más exacto pero también más delicado; es un método exclusivamente de laboratorio, mientras que el de la atenuación es más bien un método industrial.



El aparato (fig.11) consta de un vaso de Erlenmeyer de unos 400 c.c., tapado por un tapón de corcho (=) atravesado por dos tubos, obturados a sus salidas con un poco de algodón, uno de los cuales llega hasta el fondo del recipiente y se cierra exteriormente con un pedazo de tubo de goma y un fragmento de varilla de vidrio, el otro, que termina cerca de la



parte interna del tapón, está soldado exteriormente con una de las ramas laterales de un tubo en U lleno de piedra pomez embebida en ácido sulfúrico; los cuellos del tubo en U se tapan también con tapones de corcho, inter-

Fig. 11.-

poniendo entre estos y la piedra pomez una cierta cantidad de algodón de vidrio; la otra rama lateral del tubo en U comunica con la atmósfera, pero se coloca en su interior un poco de algodón, para disminuir la absorción de una pequeña cantidad de vapor de agua de la atmósfera, por el ácido sulfúrico (hubiera sido más conveniente terminar el aparato con un tubo de goma formando válvula neumática).-

Este aparato se esteriliza vacío en el horno Pasteur a 160º, luego se coloca la piedra pomez embebida en ácido sulfúrico, el cierre del tubo lateral; y se pesa.-

Finalmente se vierte en el vaso de Erlenmeyer unos 250

(=) - Como el aparato deberá ser esterilizado por el calor seco a 160º, no es posible emplear tapones de goma, pues esta substancia es destruida a esa temperatura.-



c.c. de mosto de uvas y 1 c.c. de un cultivo de la levadura a estudiar; se pesa nuevamente y se coloca en la estufa a la temperatura deseada.-

Los aparatos así preparados se pesan diariamente para determinar la cantidad de anhídrido carbónico, producida en cada día.- Cuando ésta cantidad es pequeña ( 2 gr.) se hace pasar por el aparato, antes de cada pesada, una corriente de aire, que arrastra el  $\text{CO}_2$ , al mismo tiempo que aumenta la actividad de las células.-

Finalmente, después de 50 o 40 días, cuando la fermentación ha terminado, se analizan los vinos así obtenidos, determinando la cantidad de alcohol, y el azúcar residual.-

Operando de este modo he efectuado tres series de ensayos: la primera a 25° con mosto de uvas natural; la segunda a la misma temperatura, pero agregando 25 gr. de Sacarosa pura a cada ensayo, que después de hidrolizarse por la invertina de la levadura se transformarán en 20,316 gr. de azúcar invertida; y la tercera serie también con mosto natural, pero operando a la temperatura de 36°.-

El mosto empleado proveniente de uvas de Mendoza tenía la siguiente composición:

	En 100 gr. de mosto.	En 100 cc.
Densidad a 15°.....	1,0970	
Acidos en $\text{SO}_4 \text{H}_2$ .....	0,297 gr.	0,326 gr.
Azúcar invertida.....	20,291 "	22,26 "
Extracto a 105°.....	21,725 "	23,82 "
" sin azúcar.....	1,422 "	1,56 "
Materias minerales.....	0,349 "	0,383 "

Los resultados de estos ensayos pueden verse en los siguientes cuadros de fermentación:-



Cantidad de mosto (=)			
Volumen del mismo			
CO <sub>2</sub> desprendido el 1º día			
"	"	" 2º	"
"	"	" 3º	"
"	"	" 4º	"
"	"	" 5º	"
"	"	" 6º	"
"	"	" 7º	"
"	"	" 8º	"
"	"	" 9º	"
"	"	del 10º al 12º día.	
"	"	" 13º	" 19º "
"	"	" 20º	" 35º "
CO <sub>2</sub> total			
"	producido por 100 gr. mosto		
"	"	"	de azúcar transformado
Grado alcoholico del vino obtenido			{ en volú
			{ en peso
Azúcar residual			

(=) - Inclusive 1 c.c. de pié de cuba.-

- ENLAYO DE FERMENTACION A 25° EN MODO NATURAL -

-----

	LEVADURA 12	LEVADURA 22	LEVADURA 28
	276,327 gr.	275,949 gr.	275,721 gr.
	251,9 c.c.	251,6 c.c.	251,3 c.c.
	2,457 gr.	1,802 gr.	2,562 gr.
	12,203 "	10,210 "	10,996 "
	6,280 "	5,361 "	6,092 "
	2,994 "	3,232 "	3,290 "
	1,398 "	2,075 "	1,677 "
	0,947 "	1,653 "	1,198 "
	0,344 "	0,914 "	0,535 "
	0,157 "	0,480 "	0,261 "
	0,073 "	0,290 "	0,136 "
	0,137 "	0,505 "	0,195 "
	0,030 "	0,503 "	0,061 "
	---	0,054 "	---
	27,020 "	27,069 "	27,013 "
	9,77 "	9,80 "	9,79 "
ar transferido	48,42 "	48,52 "	48,72 "
o { en volumen	13,91	13,81	13,62
o { en peso	10,96	10,96	10,81
	0,272 "	0,226 "	0,497 "

Cantidad de mosto (=)			
Volumen del mismo			
Azúcar total (==)			
CO <sub>2</sub> desprendido el 1º día			
"	"	"	2%
"	"	"	3%
"	"	"	4%
"	"	"	5%
"	"	"	6%
"	"	"	7%
"	"	"	8%
"	"	"	9%
"	"	del 10º al 12º día	
"	"	13%	19%
"	"	20%	35%
CO <sub>2</sub> Total			
"	producido per 100 gramos de mosto		
"	"	"	azúcar transfo
Grado alcohólico del vino obtenido			{ en volumen
			{ en peso
Azúcar residual (==)			

(=) - Inclusive 1 c.c. de pié de cuba y 25 gr. d  
 (==) - Calculada en azúcar invertida.-

DE FERMENTACION A 25º EN MOSTO A 10% DE SACAROSA -

=====

	LEVADURA 12	LEVADURA 22	LEVADURA 28
	300,637 gr.	301,153 gr.	300,354 gr.
	267,00 c.c.	267,47 c.c.	266,73 c.c.
	82,245 gr.	82,351 gr.	82,189 gr.
	1,690 "	1,513 "	1,660 "
	11,952 "	11,447 "	10,402 "
	7,421 "	5,423 "	6,198 "
	3,760 "	3,317 "	3,728 "
	2,037 "	2,051 "	2,237 "
	1,491 "	1,777 "	1,987 "
	0,800 "	1,245 "	1,280 "
	0,477 "	0,377 "	0,339 "
	0,301 "	0,510 "	0,549 "
lía	0,469 "	1,165 "	1,073 "
"	0,222 "	0,861 "	1,107 "
"	—	0,129 "	0,163 "
	30,620 "	30,315 "	31,223 "
mosto	10,18 "	10,06 "	10,39 "
azucar transformado	46,72	47,90	47,66 "
alimento {	en volumen	14,48	14,29
	en peso	11,49	11,30
	16,70 gr.	19,07 gr.	16,68 gr.

cuba y 25 gr. de Sacarosa.-

cantidad de mosto			
Volumen del mismo			
Azúcar total			
CO <sub>2</sub> desprendido el primer día			
"	"	"	2 <sup>a</sup> "
"	"	"	3 <sup>a</sup> "
"	"	"	4 <sup>a</sup> "
"	"	"	5 <sup>a</sup> "
"	"	del	6 <sup>a</sup> al 7 <sup>a</sup> día
"	"	"	8 <sup>a</sup> " 10 <sup>a</sup> "
"	"	"	11 <sup>a</sup> " 12 <sup>a</sup> "
CO <sub>2</sub> total			
"	producido por 100 gr. de mosto		
"	"	"	" " azúcar transf
Grado alcohólico del vino obtenido			(en volú (en peso
Azúcar residual			

(=) - Terminada la fermentación a 36° los ensay  
niente de CO<sub>2</sub> lo que demuestra<sup>que</sup> la acción  
levaduras en condiciones mas favorables.-

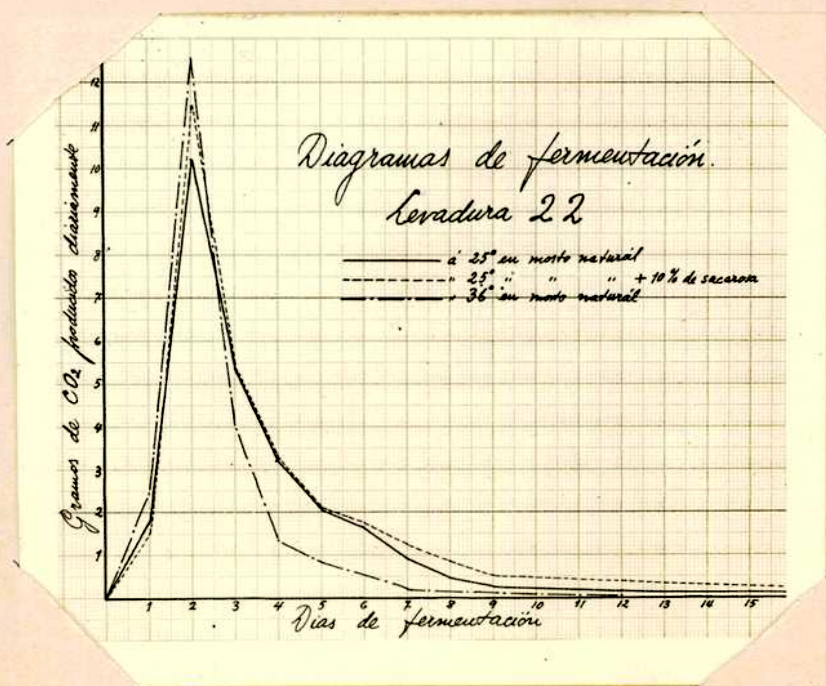
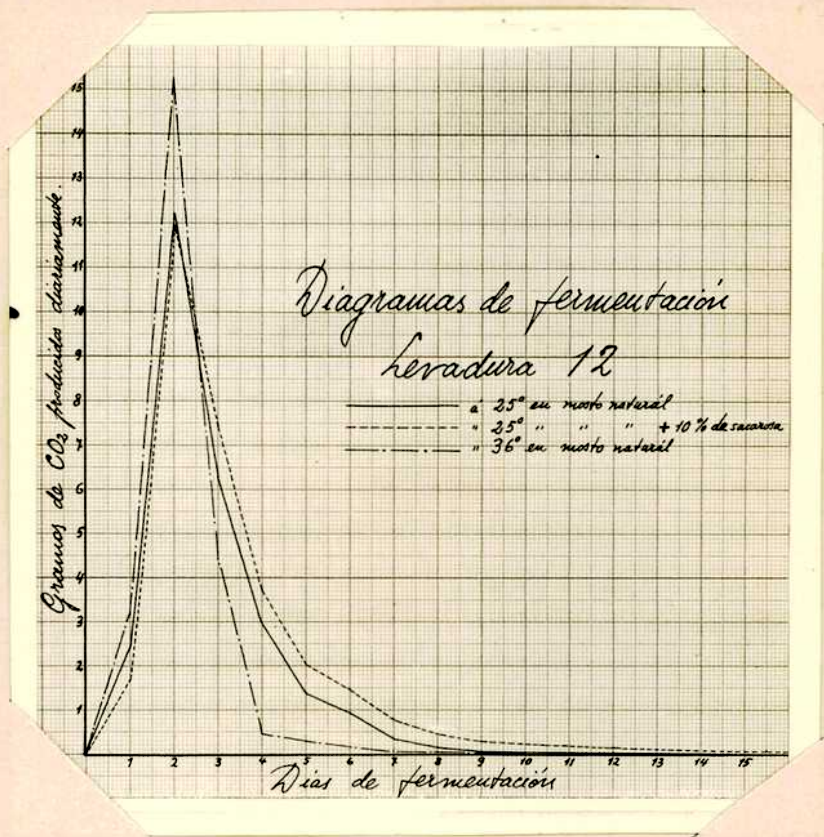
- ENSAYO DE FERMENTACION A 36° EN MOSTO NATURAL (=) -

-----

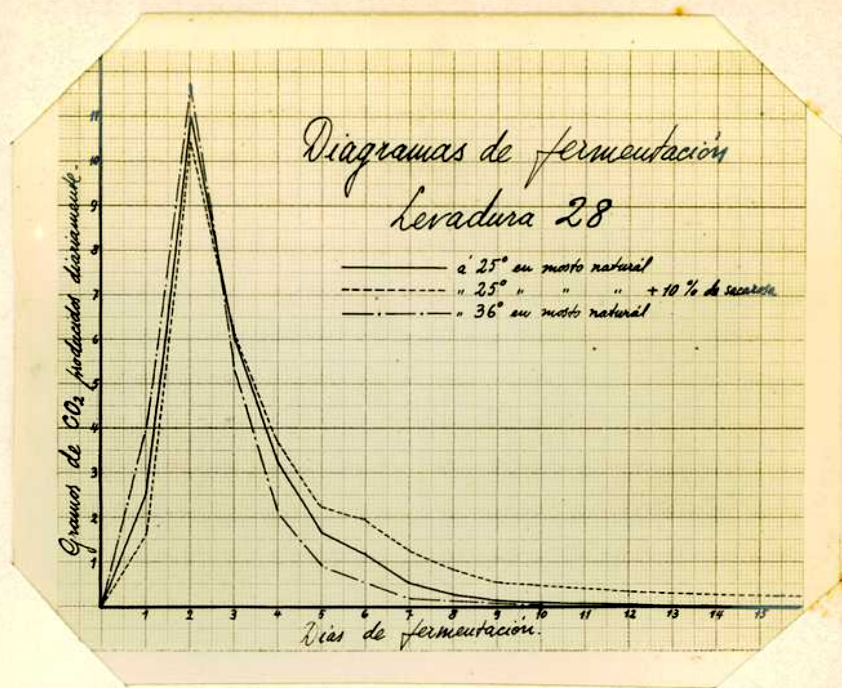
	LEVADURA 12	LEVADURA 22	LEVADURA 23
	276,568 gr.	275,162 gr.	278,335 gr.
	252,11 c.c.	250,83 c.c.	253,72 c.c.
	56,120 gr.	55,835 gr.	56,478 gr.
	3,182 "	2,432 "	3,924 "
	15,279 "	12,564 "	11,706 "
	4,422 "	4,044 "	5,405 "
	0,470 "	1,366 "	2,161 "
	0,302 "	0,840 "	0,931 "
dña	0,113 "	0,400 "	0,374 "
"	0,049 "	0,276 "	0,167 "
"	0,044 "	0,067 "	0,036 "
	23,861 "	21,989 "	24,704 "
mosto	8,62 "	7,99 "	8,87 "
azúcar transformado	50,40 "	49,32 "	50,85 "
erido { (en volúmen	11,13	10,61	12,05
{ (en peso	8,84	8,42	9,56
	8,778 "	11,252 "	7,896 "

36° los ensayos se colocaron en la estufa a 25°, pero no hubo un nuevo desprendi-  
 que  
 tra la acción nociva de la temperatura persiste aún de pués de haber colocado las  
 s favorables.-

Los diagramas que se encuentran a continuación, representan gráficamente la marcha de la fermentación de las levaduras estudiadas, en las condiciones fijadas.-







Observando los cuadros anteriores podemos deducir lo siguiente:

En los ensayos a 25° en mosto natural se ha manifestado una fermentación normal; la casi totalidad del azúcar ha desaparecido dando origen a vinos secos con 13,8 a 13,6 % de alcohol.— Vinos que por lo tanto se encuentran en excelentes condiciones para conservarse sanos.— Esta elevada graduación alcohólica, obtenida con mosto de uvas de Mendoza, se observa muy difícilmente en los vinos de esa provincia, fabricados con mosto no adicionado de azúcar, lo que viene a comprobar lo que he dicho anteriormente sobre la superioridad de las levaduras puras seleccionadas.—

La cantidad de anhídrido carbónico (48,42 a 48,72) originada por 100 gr. de azúcar es ligeramente inferior a la cantidad teórica (48,86).—

Examinando los diagramas (línea llena) vemos que la marcha de la fermentación ha sido perfectamente regular, sin inflexiones pronunciadas en la parte descendente de la curva y que la fermentación secundaria ha sido nula o casi nula



(salvo para la levadura 22) pues casi todo el azúcar ya había desaparecido al terminar la fermentación principal.-

En los ensayos a 25° en mosto adicionado de 10 % de sacarosa la fermentación ha sido también perfectamente normal, pero la cantidad de anhídrido carbónico (46,72 a 47,90), originada por 100 grs. de azúcar, es aún más inferior a la cantidad teórica que en el ensayo anterior.-

Los vinos obtenidos tienen de 14,29 a 14,67 % de alcohol, lo que garantiza suficientemente la buena conservación del vino, a pesar de contener aún una cantidad exagerada de azúcar 6,25 - 7,13 y 6,25 % respectivamente para los vinos fermentados con las levaduras 12, 22 y 28.-

En la práctica podría llegarse fácilmente con esta levadura, a producir vinos con más de 15 % de alcohol, pues es necesario recordar que como por las exigencias mismas del ensayo, he aireado repetidas veces los mostos al final de la fermentación, se ha perdido forzosamente una pequeña cantidad de alcohol.-

Los diagramas (líneas de punto) indican que la fermentación ha sido también muy regular, habiéndose tomado gran importancia la fermentación secundaria.-

Vemos pues que la elevada concentración del mosto (32 % de azúcar) no ha molesto absolutamente a las levaduras.-

Los ensayos efectuados a 36° han puesto de manifiesto la acción nociva de una temperatura tan elevada; sin embargo los vinos obtenidos están aún en buenas condiciones de conservación; especialmente el vino fermentado con la levadura 12.- Sus graduaciones alcohólicas son: 11, 13, 10, 61 y 12,05,- y el azúcar restante es 3,48, 4,48 y 3,11 % respectivamente para las levaduras 12, 22 y 28.-

La cantidad de CO<sub>2</sub> producida por 100 grs. de azúcar es

en este caso notablemente superior a la cantidad teórica (=).-

Por los diagramas (líneas de rayas y puntos) vemos que la fermentación se ha proseguido de un modo normal aunque debido a la elevada temperatura, la acción nociva del alcohol se ha ejercido más pronto, deteniendo la fermentación antes que todo el azúcar hubiera desaparecido.- La influencia de la temperatura se manifiesta principalmente para la levadura la cuya curva exageradamente elevada al 2º día, baja rápidamente presentando una inflexión muy marcada al 4º día, terminando con esto la fermentación principal.-

---

Como he dicho más arriba, he efectuado, conjuntamente con los ensayos anteriores y en las mismas condiciones, ensayos de atenuación; en el siguiente cuadro se encuentran los resultados obtenidos.- Las densidades fueron determinadas a 24º, por serme más cómodo operar a esa temperatura, pero por la definición misma de atenuación, se comprende que es indiferente operar a cualquier temperatura.-

---

(=) - Esta discrepancia debe sorprendernos; es preciso tener en cuenta, que encontrándose la levadura en condiciones desfavorables, aumenta la cantidad de sustancias de decasimilación, pudiendo así hacer variar la cantidad de CO<sub>2</sub> que se desprendería, si todo el azúcar desaparecido se transformara en alcohol y anhídrido carbónico.- Recordemos también las palabras de Pasteur (Études sur la Bière) "La ecuación de una fermentación es esencialmente variable con las condiciones en las cuales ha tenido lugar,.....Cada fermentación tiene una ecuación que puede indicarse de un modo general, pero que, en el detalle depende de las miles de variaciones que implican los fenómenos de la vida".-

Por otra parte es indudable que una cierta cantidad de alcohol ha sido arrastrada por el CO<sub>2</sub> y contada como tal, lo que unido a una mayor cantidad de aldehído producida y eliminada y por consiguiente contada también como anhídrido carbónico, puede explicar fácilmente el exceso de esta substancia en estos ensayos.-

NUMERO DE LA LEVADURA		12
Densidad primitiva del mosto		1,096
"	el primer día	1,086
"	" 2º "	1,036
"	" 3º "	1,004
"	" 4º "	0,997
"	" 5º "	0,996
"	" 6º "	0,990
"	" 7º "	—
"	del vino	0,989
"	" " privado del alcohol	1,008
Grade de atenuación aparente		107%
"	" " " real	88%

- CUADRO DE ATENUACION -

-----

	a 25% en mosto natural			a 25% en mosto +	
	12	22	28	12	22
0 DE LA L. V. D. N. A.					
va del mosto	1,096	1,096	1,096	1,125	1,125
er día	1,088	1,095	1,088	1,121	1,124
"	1,036	1,045	1,035	1,076	1,080
"	1,004	1,023	1,010	1,042	1,053
"	0,997	1,008	0,998	1,027	1,042
"	0,996	0,999	0,991	1,017	1,030
"	0,990	0,994	0,990	1,012	1,024
"	—	0,993	—	1,010	1,021
o	0,989	0,989	0,990	1,016	1,017
privado del alcohol	1,008	1,006	1,008	1,034	1,035
ión aparente	107%	107%	106%	109%	108%
real	88	90%	88%	91%	90%

BO DE ATENCION -

-----

tural	a 25% en mosto + Sacarosa			a 36% en mosto natural			
	28	12	22	28	12	22	28
1,096	1,125	1,125	1,125	1,096	1,096	1,096	1,096
1,088	1,121	1,124	1,118	1,083	1,090	1,083	1,083
1,035	1,076	1,080	1,073	1,027	1,041	1,029	1,029
1,010	1,042	1,053	1,046	1,001	1,017	1,006	1,006
0,999	1,027	1,042	1,032	0,997	1,010	0,998	0,998
0,991	1,017	1,030	1,023	0,995	1,006	0,994	0,994
0,990	1,012	1,024	1,013	---	---	---	---
---	1,010	1,021	---	---	---	---	---
0,990	1,016	1,017	1,013	1,007	1,012	1,002	1,002
1,008	1,034	1,035	1,032	1,021	1,026	1,017	1,017
106	109	108	112	89%	84%	94%	94%
88%	91%	90%	93%	75%	70%	79%	79%

En el cuadro anterior observamos que en la generalidad de los casos la densidad pasa por un mínimo, para luego ser mayor que éste mínimo en el vino ya fabricado.-

Este hecho que a primera vista parece paradójal se explica muy fácilmente, recordando que durante la fermentación, el mosto se encuentra saturado de anhídrido carbónico, lo que disminuye mucho su densidad; en cambio, en el vino, dicho gas ha sido eliminado naturalmente y por lo tanto la densidad observada es la verdadera.-

Vemos pues examinando el cuadro anterior que es también posible tener una idea de la actividad de una levadura por medio de la atenuación.-

Por otra parte, conociendo como en el caso presente la atenuación de una levadura, es posible en la práctica tener una idea de la marcha de la fermentación, por la simple determinación de la densidad primitiva del mosto y la del mosto en fermentación privado de su anhídrido carbónico o de su  $CO_2$  y de su alcohol; método que indudablemente es mucho más rápido que la determinación del azúcar residual, empleado por muchos industriales.-



- CONCLUSIONES -

Voy a indicar aquí, únicamente las principales conclusiones que se desprenden de este trabajo.-

1º - Sobre la uva y en los vinos de Mendoza se encuentran varias razas de levaduras, algunas de las cuales son incapaces de provocar la fermentación alcohólica.-

2º - Existen dos razas activas de *Saccharomyces ellipsoidens*, que por otra parte son bastante semejantes en sus caracteres fisiológicos; las mayores diferencias se observan en sus caracteres de cultivos.-

3º - Una de estas razas, la levadura 22, posee la notable propiedad de aglutinarse enérgicamente, lo que representa una gran ventaja en la práctica de la vinificación, permitiendo disminuir considerablemente el número de trasegos y hasta eliminar la filtración o el colaje.-

4º - La otra raza, que es la más abundante y la más activa, presenta numerosas variaciones individuales en sus cultivos.-

5º - Uno de estos cultivos, la levadura 28, se distingue principalmente por su gran resistencia a las temperaturas elevadas y el alto grado alcohólico de los vinos obtenidos.-

6º - Las levaduras de Mendoza pueden producir vinos cuyo grado alcohólico llega a 15 % de alcohol en volumen.-

7º - Una adición aun muy exagerada de azúcar a los mostos no molesta mayormente a estas levaduras.-

8º - Aun operando a una temperatura muy elevada (36º) mantenida durante todo el transcurso de la fermentación, pueden obtenerse con ellas vinos de buena conservación (12 % de

alcohol) pero es preferible que la temperatura de fermentación sea algo más baja.-

98 - Estas levaduras son mucho más activas tanto por la rapidez de la fermentación, por la resistencia a las altas temperaturas, al alcohol y al azúcar en exceso, que las levaduras de Montevideo y de Sayago estudiadas por Vande Venne (2).-



101 - El *Saccharomyces apiculatus* de Mendosa se distingue principalmente de las diferentes razas Europeas por la facilidad con que licua la gelatina.-

*Wm. Manuel Herrera*

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias N. P. y N. Marzo - Diciembre de 1914.-



(2) - Véase Obras consultadas.-



- OBRAS CONSULTADAS -

Comisión Nacional - Informe presentado al Ministerio de agricultura por la Investigación vinícola 1903. Anales del Ministerio de Agricultura.-

Dop et Gautié - Manuel de technique botanique.-

Duclaux - Traité de Microbiologie.-

Guilliermond - Les levures.-

" - Recherches cytologiques sur les levures (Thèse).-

Harden - La fermentation alcoolique.-

Jacquemin - Production rationnelle et conservation des vins.-

Kayser - Les levures.-

" - Microbiologie agricole.-

Laurent - Recherches physiologiques sur les levures (extrait des Annales de la Société belge de Microscopie (memoires) T.XIV 1890)

Lindner - Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde.-

Korosa et Lévy - Traité complet de la fabrication des bières.-

Pacottet - Vinification.-

" - Vinificación en la provincia de Mendoza.-

Pasteur - Etudes sur la bière.-

Semichon - Maladies des vins.-

Schützenberger - Les fermentations.-

Vande Venne - Estudios sobre levaduras de vino Uruguayas (Extractado de la "Revista" nº IV de la sección Agronomía)

Villar - Contribución al estudio de los vinos de la provincia de Mendoza.(Tesis).-