

Tesis de Posgrado

Levaduras vínicas de las uvas de Mendoza

Dalvit, Pedro

1940

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

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

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

Cita tipo APA:

Dalvit, Pedro. (1940). Levaduras vínicas de las uvas de Mendoza. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0248_Dalvit.pdf

Cita tipo Chicago:

Dalvit, Pedro. "Levaduras vínicas de las uvas de Mendoza". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1940.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0248_Dalvit.pdf

" LEVADURAS VINICAS DE LAS UVAS DE MENDOZA"

T E S I S

Presentada para optar al título de Dr. en Química
en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales

Pedro Dalvit

1940

Tesis: 248





Este trabajo ha sido realizado totalmente en el Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, cuyo digno Director, el Dr. Alfredo Sordelli ha tenido la gentileza de facilitarnos todos los materiales necesarios en el laboratorio, y alentarnos y dirigirnos favoreciéndonos con sus consejos y aclaraciones. Aprovechamos esta ocasión para agradecer una vez más las atenciones recibidas y las facilidades que nos ha concedido al permitirnos efectuar este trabajo en el mencionado Instituto.

No menor es nuestro agradecimiento para el Ing. Agr. Santos Soriano, director inmediato de estos estudios, quien en todo momento nos ha guiado en el aprendizaje de los métodos bacteriológicos y nos ha ayudado a resolver las dificultades que se han presentado en el curso del trabajo.

Agradecemos también las atenciones e indicaciones de la Dra. María S. Cataldi, así como las de nuestro colega de estudios el Dr. Roberto Dubos quien realizando simultáneamente iguales experiencias sobre las levaduras de San Juan no ha dejado de alentarnos con su excelente espíritu de laboriosidad.

SUMARIO

I ANTECEDENTES:

II OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

III RECOLECCION DE MATERIAL:

1. Uvas
2. Mostos
3. Borrás

IV MEDIOS DE CULTIVOS:

1. Mosto de malta
2. Agar de mosto de malta
3. Mosto de uva
4. Medios para estudiar la esporulación:
 - a) Bloques de yeso
 - b) Zanahorias
 - c) Medio de Gorodkova
 - d) Cultivos de 3 á 4 meses
5. Gelatina-mosto de malta
6. Medio para la formación de micelio
7. Fermentación de hidratos de carbono
8. Nitratos como fuente de nitrógeno
9. Alcohol etílico como fuente de carbono
10. Resistencia al SO₂
11. Resistencia al alcohol

V METODOS DE INVESTIGACION:

A. Aislamientos:

1. En cajas de Petri
2. Unicelular de Lindner

B. Cultivos de las levaduras aisladas:

1. Cultivos en mosto de malta

2. Cultivos en mosto de uva
3. Cultivos en agar de mosto de malta, enestría
4. Colonias gigantes
5. Licuación de gelatina
6. Utilización de alcohol como fuente de C.
7. Utilización de nitratos como fuente de N.
8. Formación de micelio (Fortner)
9. Formación de micelio (Lodder)
10. Métodos para estudiar la esporulación:
 - a) Bloques de yeso
 - b) Zanahorias
 - c) Método de Gorodkova
11. Fermentación de hidratos de carbono

VI RESULTADOS OBTENIDOS:

1. Descripción de los cultivos en cámara húmeda- Morfología
2. Características de los cultivos:
 - a) Desarrollo en agar de mosto de malta, en cajas de Petri
 - b) Desarrollo en agar de mosto de malta, en estrías
 - c) Desarrollo en mosto de malta y en mosto de uva
 - d) Colonias gigantes
 - e) Formación de micelio
 - f) Esporulación
3. Características fisiológicas de los cultivos:
 - a) Licuación de gelatina
 - b) Utilización de alcohol etílico
 - c) Utilización de nitratos
 - d) Fermentación de azúcares

VII DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL:

1. Poder fermentativo

2. Curvas de fermentación
3. Resistencia al alcohol
4. Resistencia al SO₂
5. Sabor y bouquet
6. Sedimentación y clarificación

VIII CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS ESTUDIADAS:

1. Sistemática de las levaduras
2. Descripción de las especies estudiadas

IX CONSIDERACIONES SOBRE EL ESTUDIO REALIZADO

X CONCLUSIONES XI RESUMEN

XII BIBLIOGRAFIA

XIII ILUSTRACIONES

1 ANTECEDENTES

La idea de que la fermentación alcohólica tiene como causa a los organismos vivos pertenece originariamente a Linné.

En 1680 Leewenhoek sirviéndose del microscopio examinó las levaduras de la cerveza y las describió como cuerpos esféricos u ovoides, aunque sin sospechar siquiera sus funciones.

Fabroni aseguró en 1787 que las levaduras tenían la misma constitución que la materia animal. Según él, la levadura es una materia vegeto-animal, contenida en las uvas y en la cebada. Triturando las uvas, dicha sustancia glutinosa se mezcla con el azúcar, y al ponerse ambas en contacto se inicia la efervescencia y la fermentación.

En 1803 Thénard (1) en sus trabajos sobre fermentación y fermentos llegó a la conclusión de que los líquidos azucarados, al fermentar, espontáneamente, dan un depósito de aspecto semejante al de la levadura de cerveza y que tiene, como ella, la propiedad de producir la fermentación del agua azucarada. Consideró a esta levadura como de naturaleza animal y capaz de desprender por destilación, abundante amoníaco.

Por el año 1825, Cagnard de Latour, en observaciones microscópicas, estableció que la levadura es un ser organizado que se reproduce por brotación y pertenece al reino vegetal, y no una simple materia orgánica como entonces se suponía; por efecto de su metabolismo, la levadura, desprende anhídrido carbónico y transforma en alcohólicos los líquidos azucarados. (2)

A iguales conclusiones y por esa misma época llegaron Schwann en Jena (3), Kützing en Berlín (4), Quevenne (5), Turpin (9), Mitscherlich (7); según ellos, la levadura es una célula organizada y viviente, que se multiplica por brotación y está constituida como todas las vegetales o animales, por una membrana y por un contenido protoplasmático granular,

pero al establecimiento de las características verdaderas de la levadura alcohólica se deben a Pasteur. Este genio, tan extraordinario en los anales de la ciencia experimental echó las bases del método del aislamiento para la separación de los cultivos puros, lo cual le permitió estudiar morfológica y fisiológicamente cada microorganismo en su individualidad propia, fundamentando en esa forma su acción específica.

Rees, entre 1868 y 1870, observó la formación de endosporas en muchas especies y es el primero que nos da una cuidadosa descripción de los fermentos; siguieron a las suyas las interesantes investigaciones de incontables estudiosos y experimentadores como Engel, Hansen, Brefeld y de Bary. Este último en su "Morphology and Biology of the Fungi" clasificó ya a las levaduras entre una clase de los hongos, los "Ascomicetes".

Hansen inició en seguida un nuevo período en la historia de las levaduras. Perfeccionando los métodos de Pasteur obtuvo gracias a sus treinta años de ininterrumpida labor, el cultivo unicelular y en consecuencia la determinación precisa de sus características. Inició así la diferenciación de las especies y estableció los fundamentos de la sistemática. Propuso en los últimos años (1904) una clasificación, corroborada luego por los trabajos de Klöcker y Lindner, que hoy está universalmente admitida.

La literatura contemporánea en lo que al estudio de las levaduras se refiere es de una riqueza extraordinaria y alagadores son los resultados logrados con su aplicación a la cervecería y destilería en países como Inglaterra, Alemania, Holanda, Estados Unidos y otros; esta aplicación no ha sido menos satisfactoria en aquellos países vinícolas que como Francia, Italia y España, Marchan a la cabeza de los productores de vinos comunes o especiales.

En la República Argentina en cambio, y entrando ya de lleno en nuestro tema, en la provincia de Mendoza, poco es lo que hasta hoy se ha hecho a este respecto. Es digno de admiración el esfuerzo de quienes con su estudio y con su experiencia han contribuido al mejoramiento de la vinificación en las provincias andinas, ya que esta industria es hoy por hoy, sino la única, la principal fuente de su bienestar y riqueza.

Racottet en su obra "Vinificación en la provincia de Mendoza" nos ofrece un estudio sobre las levaduras y sus características; su selección, acostumbramiento al anhídrido sulfuroso, ventajas que su empleo reportan al valor del producto y a su bouquet.

Magistocchi (23) al enumerar los factores que influyen en la calidad de los vinos, como el suelo, clima, cepaje, composición química de los mostos, etc. destaca la necesidad de emplear fermentos seleccionados para evitar las fermentaciones nocivas que desmejoran nuestros vinos.

Ambos autores estudian además detenidamente el cuidado que es indispensable observar en la preparación y corrección de los mostos; en la limpieza previa de los recipientes y de las maquinarias, y en los métodos especiales de vinificación.

El primer trabajo hecho en el país para el aislamiento de las levaduras en las uvas de Mendoza (21) data del año 1915 y fué presentado como tesis para optar al título de Doctor en Química, por Luis M. Lejeunne, con el tema "Estudio de las levaduras de Mendoza".

Desde la toma de muestras, realizadas en óptimas condiciones, el autor emprende minuciosamente la tarea del aislamiento con el método de las diluciones sucesivas y de los cultivos en cajas de Petri, presentándonos unas treinta cepas clasificadas entre los distintos tipos de levaduras esporuladas, fijando sus características con miras a la aplicación industrial.

El autor arriba a las siguientes conclusiones:

- 1.- 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.
- 2.- Existen dos razas de *S. ellipsoideus* que por otra parte son bastante semejantes en sus caracteres fisiológicos; las mayores diferencias se observan en sus caracteres de cultivos.
- 3.- Una de estas razas, la levadura 22, posee la notable propiedad de aglutinarse enérgicamente, lo que representa una gran ventaja en la práctica de vinificación, permitiendo disminuir considerablemente el número de trasiegos y hasta eliminar la filtración o el colaje.
- 4.- La otra raza, que es la más abundante y la más activa, presenta numerosas variaciones individuales en sus cultivos.
- 5.- Uno de estos cultivos, la levadura 28, se distingue principalmente por su gran resistencia a las temperaturas elevadas y por el alto grado alcohólico de los vinos obtenidos.
- 6.- Las levaduras de Mendoza pueden producir vinos cuyo grado alcohólico llega al 15 por ciento en volumen.
- 7.- Una adición aún muy exagerada de azúcar a los mostos no molesta mayormente a estas levaduras.
- 8.- Aún operando a una temperatura muy elevada (36°) 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 sea algo más baja.
- 9.- 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.
- 10.- El *S. apiculatus* de Mendoza se distingue principalmente de las di-

ferentes razas europeas, por la facilidad con que licúa la gelatina.

Un segundo trabajo de selección de levaduras efectuado en el país con vistas a la aplicación industrial y tecnológica fue realizado el año 1929 en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires por el Ingeniero Agrónomo Julio A. Paso y se titula: "Contribución al estudio de las levaduras del Alto Valle del Río Negro".

En las primeras páginas presenta en detalle la descripción de la flora microbiana de las uvas y de los factores que influyen en las variaciones cualitativas y cuantitativas de las mismas.

El aislamiento fue emprendido sobre muestras de uva de General Roca -Río Negro- por el método de las diluciones sucesivas en cajas de Petri y la purificación por siembras en superficie.

Salta a la vista que la aplicación industrial de los fermentos seleccionados es la finalidad perseguida por el autor y por esa razón dedicó su atención a determinar, por el método de Buchner, la actividad fermentativa en diversas condiciones.

En la revista de la Facultad de Agronomía (Montevideo- Marzo de 1939, Nº 17) aparece un trabajo del Ingeniero Agrónomo Hugo González Toriño, titulado: "Selección de levaduras vínicas puras especializadas en la producción de altas graduaciones alcohólicas".

El autor da comienzo a sus experiencias, partiendo de un mosto de uva que separa en dos porciones; lleva una a 220 gramos por litro de azúcar, y la otra a 250 gramos por litro; terminada la fermentación espontánea, siembra con las borras, un mosto estéril y alcoholizado; iniciada la nueva fermentación hace diluciones con agua destilada y siembra en cajas de Petri sobre mosto gelatinizado; pica dos colonias diferenciadas y pasa a mosto en tubos.

Sin mayores determinaciones, concluye sorpresivamente su trabajo denominando a estas dos formas de levaduras, raza A y B, sometiénolas

a una serie de experiencias: rendimiento en alcohol, actividad en diferentes condiciones, producción de acidez volátil y acostumbramiento al anhídrido sulfuroso.

No poseemos datos de que realmente se hayan utilizado los fermentos aislados en nuestro país.

Haciendo pocas y honrosas excepciones, nuestra vinificación es absolutamente empírica; todo se espera de las buenas cualidades de las uvas y de los mostos y de la fermentación natural, sin contar con que en ella pueden predominar elementos menos aptos y hasta nocivos.

A pesar de este abandono inexplicable, se obtienen, en Mendoza por ejemplo, vinos cuya graduación alcohólica oscila entre 12° y 14°, de optimas cualidades organolépticas, lo que nos lleva a creer que existen en nuestras uvas levaduras indígenas muy bien aclimatadas; y que si el producto resulta algunos años más deficiente o de más difícil conservación, eso debe atribuirse o a descuidos graves en la vinificación, o a que excepcionales condiciones climatéricas han malogrado el fruto, o a un prevalecimiento de los fermentos menos aptos.

La calidad del vino, naturalmente generoso, su alta graduación alcohólica, su riqueza en materias extractivas, su acidez fija elevada, su poder de conservación, han sido sin duda los motivos fundamentales por los cuales no se ha dado importancia al empleo de las levaduras seleccionadas; todo se ha dejado librado a la naturaleza que sin duda ha sido pródiga con nuestros viñedos y nuestras uvas.

Pero si se verificara en cambio una vinificación racional, aislando y aprovechando las excelentes levaduras de la misma región que son las mejor adaptadas se conseguiría así mejorar notablemente nuestro vino, poniéndolo en condición de competir con los tipos extranjeros más generosos.

II OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

Como lo hemos establecido en el plan previo, de acuerdo a las indicaciones del Ing. S. Soriano, el objeto de este trabajo es el de aislar y clasificar las levaduras vínicas de las uvas de Mendoza.

En ningún momento llegamos a pretender que el presente trabajo alcanzara por completo la determinación de todas las características de los fermentos aislados. Hemos debido reducirnos a iniciar ese aislamiento en una porción muy limitada de la Provincia por lo cual no podrán generalizarse las conclusiones como definitivas a todas las demás regiones.

Como dijimos más arriba estamos convencidos de la existencia de levaduras indígenas de incalculable valor para la vinificación; eso nos movió a emprender la determinación de algunas características de las cepas aisladas para llevar a los industriales el convencimiento de las positivas ventajas que les reportará el empleo de fermentos, seleccionados de sus propias uvas.

Inmenso es el campo, inexplorado hasta hoy, que sobre este particular se abre a la investigación, fecundo en tesoros que nosotros solamente alcanzaremos a señalar. Debemos llegar, como lo han hecho las naciones europeas interesadas en esta industria, a la creación de Centros de Estudios y de Experimentación que muevan a los industriales a abandonar sus procedimientos empíricos para adoptar los otros más racionales y convenientes, que de tales estudios se derivan.

III RECOLECCIÓN DEL MATERIAL

Es sabido que para un trabajo de esta índole son necesarias ciertas precauciones en la toma y envase de las muestras, pues sino se corre el riesgo de introducir en ellas microorganismos ajenos a las uvas y mostos originales; estas precauciones se hacen mayormente necesarias cuando debiendo trasladar el material a lugares distantes, una posible infección podría conducir a conclusiones inaceptables. Por tanto la toma de las muestras y su conservación en condiciones adecuadas es de primordial importancia para la veracidad de los resultados y de sus aplicaciones prácticas, exigencias por otra parte indispensables para cualquier análisis químico.

Todas las muestras empleadas para este estudio fueron tomadas por nosotros, sin excepción, en la Provincia de Mendoza- Departamento de Maipú- Distrito de Rodeo del Medio, el año 1938, en las mejores condiciones de asepsia; colocadas en recipientes esterilizados de antemano según los métodos usuales y transportadas al Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, en cuyos laboratorios se efectuaron estos experimentos.

Se eligieron y tomaron muestras de uvas, mostos y borras; 1º Para las muestras de uvas empleamos frascos cilíndricos grandes (2 litros) de boca ancha, tapa metálica a rosca y guarnición de caucho; su fondo se cubrió con algodón y además fueron envueltos en papel; esterilizados por último en el horno de Pasteur a 160º.

Los racimos, elegidos entre los mejor formados de determinadas cepas, tomados con pinzas esterilizadas y cortados con tijeras flameadas los colocamos en el fondo de sendos frascos, sobre el algodón, cubriéndolos con otro algodón estéril y cerrándolos con sus tapas, designando en los respectivos rótulos la variedad de la uva.

Elegimos uvas de las variedades más desarrolladas en la Provincia, como el Malbec que representa el 70 % del cultivo total, y de algunos tipos especiales. Eran estas:

Malbec- Cabernet- Pinot Blanco- Criolla- Malvasía- Sauvignon- Barbera
Bonarda- Teróldéga- Sanjuanina- Rabosa del Piave.

Todas estas muestras llegaron en perfecto estado a Buenos Aires.

2º. Para la toma de muestras de mostos esterilizamos unos frascos de medio litro de capacidad, de paredes resistentes, con tapa de vidrio y guarnición asegurada con alambre acerado, de los que se emplean comúnmente en la conservación de frutas y legumbres al natural. Con una pipeta esterilizada vertimos en los frascos 5 c.c. de mosto, tomados de la cuba de fermentación y tapamos luego cuidadosamente los frascos, en la seguridad de que dado el gran volumen del frasco con relación a la cantidad de mosto, la presión del anhídrido carbónico desprendido no llegaría a comprometer la resistencia del envase.

A continuación detallamos los tipos de mostos elegidos:

- a.- Malbec; muestra tomada el 16 de Marzo al tercer día de la fermentación con 65,40 gr/l. de azúcar; su grado inicial era de 220 gr/l.
- b.- Malbec; el mismo mosto al cuarto día de fermentación, con 54,40 gr/l. de azúcar.
- c.- Malbec; al quinto día de la fermentación con 40 gr/l. de azúcar.
- d.- Refosco; muestra tomada el 16 de Marzo al tercer día de la fermentación con 186,50 gr/l. de azúcar; siendo su grado inicial de 230 gr/l.
- e.- Refosco; al cuarto día de la fermentación con 100 gr/l. de azúcar.
- f.- Refosco; al quinto día de la fermentación con 62,40 gr/l. de azúcar.
- g.- Borra de mosto, centrifugado antes de fermentar, con variedades de Sauvignon, Pinot y Gomé Blanco.

3.- Para las muestras de borras esterilizamos frascos como los empleados para los mostos y vertiendo en ellos directamente los depósitos formados en las vasijas, sin apelar para ello a instrumento alguno, evitando así posibles contaminaciones.

Los tipos de berras elegidos fueron de:

- a.- Vino criollo. Muestra tomada al final de la fermentación lenta, el 15 de Abril.
- b.- Vino tipo Malvasía. Muestra tomada durante la fermentación lenta, el 15 de Abril.
- c.- Vino tipo Malbec. Muestra tomada durante la fermentación tumultuosa con 35 gr/l. de azúcar.
- d.- Vino tipo Malvasía. Muestra tomada al final de la fermentación lenta, el 17 de Abril.
- e.- Vino tipo Malbec. Muestra tomada durante la fermentación tumultuosa, el 17 de Abril.
- f.- Vino tipo Malbec. Muestra tomada después del primer trasiego.
- g.- Vinoblanco. Muestra tomada después del primer trasiego (elaborado con variedades de Moscatel Romano y Malvasía).
- h.- Vino nuevo. (Elaborado con variedades del tipo Malvasía, Malbec, Refosco y Semillón).
- i.- Vino nuevo centrifugado. Elaborado con uva del tipo Sauvignon.

IV MEDIOS DE CULTIVO

Es nuestro propósito describir los medios de cultivo utilizados en el aislamiento y caracterización de las levaduras vínicas, que si bien en cierto son los indicados ordinariamente por los autores especializados en esta clase de trabajos, por otra parte han sido modificados diversamente según las circunstancias; a continuación detallaremos los medios que hemos juzgado más convenientes.

1º Mosto de malta.- Se modificó ligeramente la fórmula de Henneberg (17) del modo siguiente:

Harina de malta.....250 gr.

Agua corriente.....1 litro

Se pesan 250 gr. de malta en polvo - cebada germinada, secada y molida - la cual contiene parte del almidón del grano, dextrinas, sustancias pécticas y las diastasas amilolíticas y dextrinasas.

Caliéntase luego a 50º un litro de agua corriente y se le agrega la malta pesada, manteniendo la temperatura a 45º durante media hora para poner en libertad las diastasas. Elévese luego la temperatura a 60 ó 62º, la más apropiada para la acción diastásica de la amilasa sobre el almidón y de las dextrinasas sobre las dextrinas, en cuya hidrólisis sucesiva se elabora la maltasa fermentescible. Aunque algunos autores aconsejan prolongar el calentamiento sólo por una hora, se ha comprobado en la práctica que se necesitan varias, hasta 4, para obtener una hidrólisis más o menos total del almidón y aún así nunca es completa, ya sea por la existencia de gránulos grandes de difícil desdoblamiento, ya por defectos propios de la cebada germinada.

La presencia de almidón puede comprobarse por la reacción del Lugol (solución acuosa de I en IK) que da con él una coloración azul; mientras aparezca ésta intensa y rápida, es necesario mantener la temperatura establecida.

Se tamiza la masa mediante un lienzo de lino, comprimiéndola hasta separar bien el líquido y eliminar las sustancias terrosas, raicillas, granos de almidón, etc.

Al líquido enfriado se le agrega una clara de huevo, bien batida, en igual volumen de agua y durante 20 minutos se somete la mezcla a 100° en el autoclave abierto, para que al coagularse la albúmina arrastre consigo los grumos producidos por la precipitación de la malta. Se filtra luego en caliente con papel de filtro y se diluye a 5°, 3 Bé. (temperatura ambiente) o a 10° Brix que corresponde a 10% de azúcar. El líquido filtrado se reparte en tubos de ensayo, cerrados con tapa de algodón y se tinalizan en autoclave tres veces consecutivas durante 30 minutos diarios.

2° Agar de mosto de malta.- A un litro de mosto de malta preparado como se indicó anteriormente se le agregan 20 gr. (2 %) de agar, cortado en trozos pequeños; se lleva la mezcla en autoclave a 110° durante 20 minutos hasta lograr su fusión completa; se pasa por algodón (aún caliente para evitar la solidificación); se reparte en tubos de ensayo y se esteriliza a 110° por 15 minutos.

Constituye un medio de cultivo sólido más apropiado que la gelatina para el desarrollo de las levaduras a temperaturas superiores a las del ambiente pues no se funde sino a unos 80°, mientras la gelatina lo hace a temperaturas relativamente bajas (23° a 25°).

3°. Mosto de uva.- Se exprimen las uvas en un lienzo de lino, haciendo escurrir la mayor cantidad posible de líquido; se calienta este a 100° para que precipiten las sustancias protéicas, pécticas y gomosas; se lo filtra por papel; (se consiguen mejores resultados tratándolo con clara de huevo como indicamos para el mosto de malta); se reparte en tubos de ensayo y se esteriliza al autoclave por tinalización, pues a mayor tem-

peratura se carameliza.

En el caso de usarse con agar al 2 % como medio de cultivo sólido es necesario neutralizar previamente la acidez elevada del mosto, primero con HONa N. y después con solución 0,1 N. hasta pH 6,3; de lo contrario al enfriarse el agar no solidifica en buenas condiciones.

Para conseguir el punto deseado de acidez puede usarse como indicador el bromocresol púrpura el cual a pH 6,3 da una coloración violacea que permite apreciarlo mediante la escala de Clark y Lubs.

4* Medios para estudiar la esporulación.- Para determinar las levaduras esporuladas hemos utilizado los cuatro medios siguientes:

a) Bloques de yeso- (Hansen) Se vierte una papilla de yeso en un molde de hierro galvanizado, de base plana; el diámetro de ésta ha de ser menor que el de la boca (4 á 5 cm.) para facilitar la extracción de los bloques, de 1 á 1,5 cm. de altura que se necesita preparar. Los moldes se recubren previamente de parafina o vaselina para impedir que el yeso se adhiera fuertemente a sus paredes, y se secan en estufa de aire a 100°. Vuélvese luego el molde y golpeando suavemente contra una mesa los bloques se desprenden con facilidad. Sobre la base mayor de los mismos se practican dos ranuras en la dirección de dos diámetros perpendiculares y se enumeran los cuadrantes así obtenidos para proceder a la siembra de los distintos cultivos. Se colocan en el interior de sendas cajas de Petri y se esterilizan a 120° en autoclave.

b) Zanahorias - Con un sacabocado de diámetro grande (2 á 3 cm.) se preparan unos cilindros de zanahoria los cuales se cortan luego en pico de flauta; colócanse en tubos de Roux en cuyo fondo se ha vertido previamente un poquito de agua para evitar que se reseque la zanahoria. Se esterilizan a 120° en autoclave.

c) Medio de cultivo de Gorodkova - La composición del medio de cultivo utilizado por este autor es el siguiente:

Peptona..... 10 gr.
Cloruro de sodio..... 5 gr.
Glucosa..... 2,5 gr.
Agar..... 10 gr.
Agua destilada..... 1 litro

Se disuelve la peptona, la sal y la glucosa en agua caliente; se precipita llevándola a ebullición y se filtra por papel; se agrega el agar en pequeños trozos y se calienta en autoclave a 110° durante 15 minutos; se pasa por algodón, se entuba y esteriliza a 110°.

En el momento de usarlo, se calienta al baño-maría los tubos que contienen el medio de cultivo, hasta obtener la disolución, se vierten en cajas de Petri estériles y se deja enfriar marcando en el exterior de las cajas 8 sectores iguales para la siembra de los diversos cultivos.

d) Observación microscópica en cultivos de 3 á 6 meses.

5° Gelatina-mosto de malta. Agrégase un 15% de gelatina al mosto de malta preparado como se indicó anteriormente y se calienta hasta obtener su disolución completa; se neutraliza con solución sódica, llevando a reacción débilmente alcalina, pH 7 aproximadamente (la gelatina preparada a base de ácido sulfúrico comunicaría una acidez muy elevada al mosto). Se agrega una clara de huevo batida en agua y se lleva en autoclave a 100° durante media hora para conseguir una buena coagulación.

En la filtración se usa el embudo para filtraciones en caliente, o se pasa por algodón en embudo común, manteniendo la gelatina en autoclave abierto a 100°; procediendo con rapidez sin elevar inútilmente la temperatura se consigue obtener la gelatina límpida y capaz de soportar de 20 á 23° sin licuarse. Se esteriliza a 105° o mejor se tindaliza durante media hora diaria por tres días consecutivos, ya que el calentamiento a mayores temperaturas hace descender notablemente el punto de li-

cuación de la gelatina.

6° Medio de cultivo para la formación de micelio. Se preparó el medio de cultivo según las indicaciones de Lodder (22) en la forma siguiente:

- Papas trituradas..... 20 gr.
- Agua corriente..... 1 litro

Se tritura una papa bien mondada; se ponen 20 gr. en un litro de agua, dejando en maceración durante 4 horas; se hierve por media hora y se filtra. Se reparten 5 c.c. del líquido filtrado en tubos de ensayo, esterilizando luego a 120° por media hora.

7° Fermentación de hidratos de carbono. El medio básico de cultivo usado es el de Kulp y Rettger (39), Hunt y Rettger (38), modificado por Soriano:

- Caseína digerida.....100 c.c.
- Caldo de extracto de carne.....900 c.c.
- Bromocresol púrpura, soluc. alcohólica al 1 %....1 c.c.

a) Preparación de la caseína digerida. Se disuelven en caliente los 100 gr. de caseína en polvo en litro de carbonato de sodio al 1%; se enfría la solución hasta 40° y se le agregan de 0,5 á 1 gr. de tripsina fresca, activa, disuelta en un poco de agua. Se le agregan además de 10 á 20 c.c. de cloroformo, antiséptico que evita el desarrollo bacteriano sin impedir la acción de la diástasa y se lleva en la estufa a 37° por 48 horas, agitando de tanto en tanto el contenido para favorecer la digestión de la caseína.

Se neutraliza el medio con solución 0,1 N. de ácido clorhídrico hasta coloración ceniza con bromocresol púrpura calentando después a baño maría para eliminar completamente el cloroformo; se deja enfriar y se añade una clara de huevo batida en agua; se lleva en autoclave a 115° por 15 minutos; se filtra y se vuelve a someter a 115° por otros 15 minutos; la solución, obtenida se trasvasa a un Erlenmeyer, tapándola con

algodón y conservándola en una heladera hasta que llegue el momento de usarla.

b) Caldo de extracto de carne. Se prepara según la fórmula del "Manual of Methods" de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos (40):

- Extracto de carne (Liebig)..... 3 gr.
- Peptona(Witte o Parke Davis).....5 gr.
- Agua..... 1 litro

c) Preparación del medio definitivo. Se disuelven en 900 c.c. de agua 2,7 gr. de extracto de carne y 4,5 gr. de peptona; se agregan 100 c.c. de la caseína digerida ya preparada y se arregla la reacción a pH 7 aproximadamente; se lleva al autoclave a 115° por 15 minutos para que precipite, y se filtra; se agrega luego el agar (6,25 %) y el indicador, se disuelve en autoclave a 110°, se pasa por algodón y se reparte por último a razón de 10 á 15 c.c. en cada tubo de ensayo, cantidad suficiente para emplear después 1 c.c. por cada uno de los azúcares que deban ensayarse.

d) Preparación de los azúcares. Según la cantidad de cepas que deban estudiarse se preparan 100 ó 200 c.c. de solución acuosa al 10 % de cada uno de los azúcares abajo indicados y se reparten en ampollitas de 1 c.c. las que cerradas a la llama se tindalizan por tres días consecutivos:

- | | | |
|-----------|----------|-------------|
| Glucosa | Sacarosa | |
| Levulosa | Maltosa | |
| Manosa | Lactosa | |
| Galactosa | Rafinosa | Melibiososa |

8° Nitratos como fuente de N. Se prepara un litro de solución que tiene como única fuente de N. el nitrato de potasio:

Stelling-Dekker (34)

Nitrato de potasio..... 1 gr.
Fosfato monopotásico..... 1 gr.
Sulfato de magnesio..... 0,5 gr.
Glucosa..... 20 gr.
Agua destilada..... 1 litro

Disueltas las sales y el azúcar en el agua, se entubó y se esterilizó a 110° durante 20 minutos.

9° Alcohol etílico como fuente de carbono.

Se prepara el medio de cultivo empleado por Stelling-Dekker (34) en la forma siguiente:

Sulfato de amonio..... 1 gr.
Fosfato monopotásico..... 1 gr.
Sulfato de magnesio..... 0,5 gr.
Alcohol etílico..... 3c.c.
Agua corriente..... 1 litro

Se disuelven las sales y se reparte en tubos; se esteriliza a 110° por 15 minutos.

10° Resistencia al anhídrido sulfuroso.

Se disuelve 1 gr de metabisulfito ^{de h.} en un litro de mosto estéril con lo que se consigue una solución correspondiente a 0,5 mgr. de SO₂ por c.c.

El metabisulfito se pesa con cuidado en un vidrio de reloj esterilizado, cubriéndolo con un papel satinado para evitar en lo posible las infecciones.

Se preparan tantas series de 4 tubos estériles (de ensayo) como número de levaduras se deben estudiar. La proporción de metabisulfito que se vierte en cada tubo de la serie va aumentando en progresión geométrica cuya razón es 1,3; completando luego el volumen a 10 c.c. con mosto estéril se consiguen soluciones con cantidades crecientes de SO₂.

Se diluye previamente la solución madre de metabisulfito al 0,1 para obtener otra con 0,05 mgr. de SO₂ por c.c. que es la dosis inicial apropiada (5 gr/Hl.), vertiendo 1 c.c. en la serie de tubos I.

En la serie de tubos II se vierte $1 \times 1,3 = 1,3$ c.c. de la solución siendo su concentración en SO₂ de $5\text{gr} \times 1,3 = 6,5$ gr/Hl.; en los tubos de la serie III, $1,3 \times 1,3 = 1,7$ c.c. correspondientes a 8,5 gr/Hl. de SO₂; en los tubos de la serie IV, $1,7 \times 1,3 = 2,2$ c.c. y la concentración, 10,99 gr/Hl. de SO₂:

Tubos	I	II	III	IV
Soluc. de metab.	1,0	1,3	1,7	2,2 c.c.
Mosto estéril	9,0	8,7	8,3	7,8 c.c.

11º Resistencia al alcohol.

Para realizar esta experiencia se preparan tantas series de 5 tubos de ensayo, cuantos cultivos se hayan aislado, colocando en ellos soluciones de mosto con cantidades crecientes de alcohol, en progresión geométrica, a una razón de 1,4, partiendo inicialmente del 4%:

4 5,6 7,8 11 15,4 % de alcohol

En un Erlenmeyer de 1 á 2 litros de capacidad se esteriliza la cantidad necesaria de mosto como para repartir 5 c.c. en cada uno de los tubos de ensayo. Simultáneamente, en otro Erlenmeyer esterilizado, se prepara la cantidad de alcohol suficiente para alcanzar al mezclarlo con el mosto anterior, el porcentaje deseado; se calienta a bañomaría, se deja enfriar y se repite otra vez el calentamiento a fin de evitar infecciones.

Envuelta en papel satinado se esteriliza ^{en aparato repartidor} ~~una cámara~~ para entubar estérilmente, procediéndose en la forma siguiente: Se practican dos orificios a un tapón de goma perfectamente adaptable al Erlenmeyer del mosto; en uno de estos orificios se introduce un tubo de vidrio corto, doblado en ángulo recto, a cuya extremidad exterior se adapta con un trozo de

caucho, otro tubito con algodón; por el otro orificio del tapón se introduce un tubo que llegue hasta el fondo del recipiente, cuya parte exterior doblada en ángulo, continúa en un largo tubo de goma con pinza de presión; viene en seguida la cámara anteriormente mencionada.

Se vierte con cuidado el alcohol en el Erlenmeyer del mosto, cerrándolo con el tapón preparado y retirando sólo entonces el papel que lo envuelve, flameando antes el conjunto; se coloca el Erlenmeyer sobre un soporte en lugar algo elevado y con una perilla se inyecta aire a través del algodón del tubo menor, cargando así el otro tubo largo y la goma; se cargan los tubos de ensayo (estériles) hasta 5 c.c. aproximadamente, flameando de vez en cuando la cámara de carga. Se incuba por algunos días a temperatura conveniente para eliminar los que pudieran haberse infectado.

V MÉTODOS DE INVESTIGACION

Las distintas especies y razas de levaduras están mezcladas en las borras, mostos y uvas con otros hongos y bacterias. Para una buena selección cuyas conclusiones resulten así de indiscutible valor, es necesario asegurarse el cultivo puro, procedente de un sólo microorganismo, sin lo cual no será posible establecer sus características fisiológicas y morfológicas, ya que muchas levaduras tienen formas y funciones parecidas.

En un medio determinado y a una misma temperatura los organismos no viven y proliferan igualmente; algunas especies vegetan débilmente y son paulatinamente eliminadas por otras más vigorosas, imponiéndose en definitiva las más adaptadas al medio.

Pasteur para purificar por este método las levaduras agregó ácido tartárico al medio nutritivo, con lo que se obstaculiza el desarrollo de las bacterias; pero el método no es aplicable a la separación de los géneros y especies de levaduras de comportamiento muy semejante. En cambio se apela universalmente, y es lo que da mejores resultados, al cultivo en agar de mosto de malta.

Detallaremos a continuación los métodos seguidos en nuestro estudio para la separación y caracterización de las levaduras.

A. AISLAMIENTOS

Dos formas hemos ensayado para el aislamiento de las levaduras:

1.- Aislamiento en cajas de Petri. El método de sembrar las cajas empleado en este trabajo es original de Beijerinck; es sencillo y se presta a la observación macroscópica de las colonias y al trasplante de las mismas.

Se licúa a baño maría el agar de mosto de malta, en los tubos donde se conserva; se vierte el contenido de uno o dos tubos, previamente flameados, en una caja de Petri, levantando muy poco la tapa para

evitar así infecciones del aire, y se deja solidificar manteniendo la caja un tanto abierta, con lo que se elimina el agua proveniente de la evaporación. El espesor de la capa de agar debe ser de 2 á 3 mm.

Con una pipeta Pasteur se prepara una espátula corta, doblando en ángulo obtuso su extremidadx (1 cm.) en el micromechero; esterilizada previamente se aplica el cultivo, en estrías paralelas, sobre el medio sólido; se consigue así ir empobreciendo en levaduras el material hasta obtener las últimas estrías ya sin desarrollo. Se tapa la caja y se incuba a temperatura conveniente.

Como en nuestro caso se trataba de estudiar numerosas cepas, dividimos los fondos de las cajas por la parte exterior en 4 cuadrantes, trazando con lápiz para vidrio, dos diámetros perpendiculares.

A las 24 horas y a veces más tarde aparecen las colonias, algunas de forma circular perfecta, originadas probablemente por una sola célula; ciertas diferencias características permiten observar colonias de diversos tipos.

Se pican luego con ansa de platino las colonias de aspecto diferente y se trasplanta una mínima cantidad de cultivo a un medio líquido (mosto de malta) agitándolo para lograr una distribución uniforme y se hace otra nueva siembra en caja de Petri como en el primer caso. Repitiendo esta operación, se logra dentro de cierta probabilidad, un cultivo puro, que se replanta definitivamente en estría sobre agar de mosto de malta.

Por nuestra parte hemos procedido del modo siguiente para el aislamiento de las levaduras: colocados los racimos de uva de las diversas muestras en sendos frascos esterilizados, fuimos exprimiendo el zumo de las uvas con una varilla, también estéril, tapando luego con algodón; los mostos así obtenidos, los sembramos con una espátula en estría en cajas de Petri y los llevamos a la estufa a 28° conjuntamente con los frascos de los mostos.

A las 24 horas volvimos a sembrar los mostos en estrías, repitiendo las siembras a las 48 y 72 horas. Perseguíamos con esto obtener primero las levaduras predominantes en las uvas, y luego, las más activas y prolíferas al cabo de unos días de fermentación, controlando los tipos predominantes con observaciones microscópicas diarias.

Las borras y los mostos los sembramos tomando con espátula una mínima cantidad de material y distribuyéndolo por estrías sobre agar-mosto de malta en cajas de Petri. En todos los casos picamos las colonias diferenciadas pasando a medio líquido; obtenido en este medio el desarrollo hicimos otra vez la siembra en caja de Petri; repetimos por tres veces esta operación, según el método de Beijerinck para lograr la purificación de los cultivos, teniendo siempre cuidado de anotar las formas características de las colonias.

Con todo este método no puede darnos la seguridad de que el cultivo sea puro, ni de que las colonias provengan de una sola levadura; por eso en las prácticas industriales de vinificación y especialmente cuando se hace la selección de las levaduras con miras a la clasificación de las mismas, se recurre al aislamiento por el método de Lindner; este es el método que hemos seguido en todos nuestros trabajos.

2.- Aislamiento unicelular o monocitogenético de Lindner.

Como dijimos por la absoluta seguridad que nos ofrece ^{este método para} la pureza de los cultivos, a pesar de tratarse en este estudio, de un elevado número de cepas, lo hemos seguido siempre para asegurar así la selección y valorizar en esa forma los resultados. Convendrá por tanto hacer del mismo una breve descripción.

A una de esas plumitas que se usan para el dibujo en tinta china, se le quita el cabito de madera y se le ~~adapta~~ ^{adapta} una varilla delgada de vidrio; se la esteriliza sumergiéndola en alcohol y se la acerca a una llama para que se queme el líquido adherido a la pluma.

Prepárase aparte una suspensión de levaduras en mosto de malta, tomándose de las colonias ya diferenciadas de los cultivos en estría; con una pipeta Pasteur, terminada en capilar, se absorbe un poco de líquido y se dejan caer dos o tres gotas sobre la pluma, sacudiéndola suavemente para escurrir el exceso. Luego sobre un cubre-objeto de 18x18 mm. flameado y tomado entre el índice y pulgar, se depositan en hilera y cerca de uno de sus vértices tres gotitas; debajo de esta hilera se hacen otras tres, pero de cinco gotitas cada una, concluyendo con una última hilera de tres gotitas; la hilera central debe coincidir con una de las diagonales del cubre. Se coloca el cubre contra el aro de vaselina depositado al rededor de la excavación de un porta, previamente flameado, y se cierra perfectamente, aplicando un poco de vaselina con un pincelito en los bordes del cubre.

Se observa al microscopio, cada una de estas gotitas, copiando el esquema de su distribución y señalando en él las que contienen una sola levadura.

Si esas gotitas contuvieran 5 ó 6 levaduras cada una, vuelve a prepararse otro cubre, procediendo como antes, pero diluyendo de antemano la suspensión de levaduras, 5 ó 6 veces con mosto estéril; así se conseguirá una dilución apropiada para obtener gotitas de una sola célula.

En nuestro caso las diluciones las fuimos haciendo progresivamente al trazar las diversas hileras de gotitas, en cada uno de los cubres.

En la estufa llevamos los preparados a 28°, y a las 24 horas hicimos una observación microscópica de las gotitas marcadas.

3.- Cultivos en mosto de malta.

Sembramos las levaduras aisladas en mosto de malta preparada como indicamos en los métodos generales de investigación; se incubó en estufa a 28° y observamos cada 24 horas la actividad fermentativa, y la formación de depósito y velo de las diversas cepas.

4.- Cultivos en mosto de uva.

En este medio de cultivo, preparado como indicamos anteriormente, hicimos las siembras de las cepas aisladas para comparar las observaciones con las realizadas en el caso del mosto de malta.

5.- Cultivos en agar estría.

Hicimos las siembras en el medio de cultivo, preparado según indicamos en los métodos de investigación, incubando a 28° para observar las distintas formas de desarrollo.

6.- Colonias gigantes.

Vertimos en sendas cajas de Petri el contenido de dos tubos de agar-mosto de malta para conseguir un abundante medio de cultivo y evitar la desecación; sembramos las levaduras en el centro de la caja por medio de una pipeta Pasteur de punta redonda, tomando todas las precauciones necesarias para evitar en lo posible las infecciones.

7.- Liquación de gelatina.

Los cultivos en gelatina de mosto de malta los hicimos sembrando tubos en punción e incubando a la temperatura del laboratorio (23°); colocamos luego los tubos en la heladera para ver si vuelve a solidificar la gelatina.

8.- Utilización del alcohol etílico como fuente de carbono.

Siguiendo el método de Stelling-Dekker, sembramos con anza de platino en el medio preparado según las indicaciones del mismo autor, incubando en estufa a 28°.

9.- Utilización de nitratos como fuente de N.

En el medio preparado según indicaciones anteriores, sembramos los cultivos aislados, incubándolos luego a 28°.

10.- Formación de micelio - Método de Fortner - Soriano (44)

Tómase un cubre por uno de sus vértices con una pinza de Cornet y se flamea una de sus caras; se deja enfriar y con una pipeta estéril de Pâteur se recubre con una tenue capa de agar de mosto de malta, previamente licuado y mantenido caliente en bañomaría. A los pocos instantes el medio se solidifica; se inclina el cubre sobre una caja de Petri para volcar el exceso de líquido, apoyando el vértice opuesto al de la pinza en el borde interior de la caja. Se toma el cubre con el índice y el pulgar de la mano izquierda, por dos de sus vértices diagonalmente opuestos y sosteniendo una de sus aristas con el dedo medio, córtanse los bordes de la película con una Gillette a una distancia de 3 á 4 mm. arrastrando hacia afuera las lonjas cortadas. Del cuadrado obtenido, aproximadamente de 1 cm. de lado, se cortan los vértices con igual inclinación y la capa de agar queda reducida a un octógono colocado en el centro del cubre; evítanse así posteriores infecciones. Tomando el cubre con el pulgar y el índice, apóyasele sobre el portaobjetos excavado, excavación que ha sido rodeada de un aro de vaselina y se presiona suavemente para asegurar un cierre perfecto.

Estírase en el micromechero, la extremidad de una pipeta Pasteur hasta formar un capilar estrecho, que se corta y cierra a la llama, formando una pequeña bolita en la punta; se toma con ella un cultivo fresco en agar de mosto de malta y se siembra en mínima cantidad sobre la película del cubre, retirado previamente del porta con el índice y el pulgar de la otra mano; se aplica otra vez el cubre sobre la excavación del porta y se cierra herméticamente la cámara,

aplicando en sus bordes con un pincelito, vaselina fundida. Se incuba a la temperatura necesaria y se observa al microscopio periódicamente el desarrollo del cultivo.

Con un poco de práctica pueden seguirse simultáneamente dos o tres de estos preparados.

11.- Formación de micelio - Método de Lodder.

Este autor ha comprobado suficientemente que el mejor medio para el estudio de la formación de micelio, es el agua de papas.

Algunas especies de levaduras sólo forman al principio, blastosporos y no Pseudomicelio, pero en un 2º ó 3º agregado de agua de papas, originan un pseudomicelio mientras otras no, considerándolas como levaduras no micelianas.

En el medio preparado como se indicó anteriormente, sembramos con anza de platino estéril los cultivos frescos, incubándolos a 28º, haciendo observaciones microscópicas en gota pendiente cada 24 horas.

12.- Métodos para estudiar la esporulación.

a.- Bloques de yeso - Hansen (45)

Una levadura en plena actividad y desarrollo, al ser privada de los elementos necesarios para su vida, entra en estado de inanición y esporula; es esta la forma de irse defendiendo ante la escasez de alimentos, hasta encontrar el medio apropiado para su vitalidad normal. Por eso es conveniente preparar de antemano la levadura en medios muy ricos en sustancias alimenticias, enriqueciendo así su contenido celular.

Para conseguirlo, en un tubo de ensayo, donde haya 5 ó 6 c.c. de mosto de malta estéril se siembra la levadura y se incuba a temperatura conveniente (25 á 28º) durante 24 horas, al cabo de las cuales pásase una parte de este cultivo a otro tubo con mosto fresco durante

otras 24 horas. Hecho esto se vierte la mayor parte del líquido y luego con una pipeta estéril de Pasteur se reparte el depósito en uno de los cuadrantes del bloque de yeso, añadiendo a la caja de Petri un tubo de agua estéril para mantener la humedad.

Cada 24 horas se preparan observaciones microscópicas, raspando con anza de platino el material depositado sobre los bloques y diluyéndolo en el porta objetos con una gota de agua; se aplica el cubre y se observa la preparación anotando enseguida la forma y el número de las endosporas.

b.- Zanahorias.

En el medio de cultivo preparado como indicamos anteriormente sembramos las levaduras activas en estría. Cada 24 horas se repite la observación microscópica.

c.- Método de Gorodkova. (46)

Este autor usa como única fuente de hidratos de carbono el azúcar, pero en mínima cantidad, de modo que al consumirlo rápidamente la levadura esporula por la falta de los alimentos indispensables para su vida normal.

Sembramos el cultivo fresco en el medio ya preparado, con espátula estéril e hicimos observaciones microscópicas cada 24 horas.

13.- Fermentación de hidratos de carbono. Soriano (33)

Se abren las ampollitas ya anteriormente preparadas con los azúcares para lo cual basta limar sus cuellos y forzar la punta con la otra mano; con una pipeta estéril de Pasteur, afinada, se retira la solución en ellas contenida y se vierten dos o tres gotas en unos tubitos apropiados (12/1 cm.) esterilizados y tapados con algodón, marcándolos con un número romano indicador del azúcar.

Se lóúa a bañomaría el medio básico de tantos tubos como levaduras han de sembrarse en el día y se entibia a 50º, temperatura

que ha de mantenerse para evitar la solidificación del agar. Flameando uno de los tubos se siembra con anza de patino un poco de levadura fresca, tomada de un cultivo sobre medio sólido; con una pipeta de 10 c.c. se pipetea para distribuir uniformemente y con la misma pipeta se reparte un c.c. en cada tubito de aquellos en que se había distribuido los distintos azúcares, señalando con una cifra arábica la cepa sembrada. Se llena además otro tubo sin azúcar para conservarlo como control del medio básico.

Debe prepararse por último un tubito de cada uno de los azúcares con medio básico sin sembrar, destinado a comprobar la pureza bacteriológica de los azúcares.

Se observan los cultivos a las 24, a las 48 horas y a los 5 ó 6 días para diferenciar a sí los de fermentación rápida y los de fermentación lenta. Un signo de buena fermentación es el viraje neto del indicador a una coloración amarilla estable; el viraje débil y pasajero, denota una fermentación incompleta. La producción de gas se denuncia por las burbujas que retiene el agar blando.

VI RESULTADOS OBTENIDOS

De las múltiples observaciones microscópicas de las borras y de los mostos en fermentación, que hemos realizado en el transcurso de este trabajo, podemos concluir que existen en las uvas de Mendoza varios tipos de levaduras. De todos los casos observados, las levaduras más numerosas son del tipo "cerevisiae" ^{y lipoides} de forma ovalada sin granulaciones protoplasmáticas en su contenido celular y de dimensiones mayores que las encontradas en las demás células; otra forma de levadura es la del tipo "torula" de células redondas con un gránulo muy refringente en su centro; una tercera forma la constituyen las levaduras alargadas y cilíndricas del tipo "micoderma", casi transparentes con grandes vacuolas; y por último hemos observado aunque raramente, levaduras en forma característica de limón del tipo "apiculatus".

Consignaremos en las páginas siguientes los resultados obtenidos en el estudio de los cultivos puros.

1.- Descripción de los cultivos en cámara húmeda. - Morfología

Si bien es cierto que la forma y dimensiones de las levaduras son factores de caracterización, con todo se comprueba de inmediato que estos factores son muy variables dentro de un mismo género o especie; a las 24 horas no resulta fácil establecer las diferencias morfológicas, aunque en el mismo tipo de levadura existen células de formas y dimensiones dominantes.

Una vez aisladas las cepas y preparados los cultivos de adhesión en cámara húmeda, según el método de Lindner, hicimos a las 24 horas una observación microscópica para estudiar la morfología y la multiplicación celular, reproduciendo la forma mediante la cámara clara, para establecer luego las dimensiones con micrómetro objetivo.

Hemos podido establecer así los siguientes grupos morfológicos:

a.- Células por lo general ovales y redondas, grandes; se multiplican por brotación; en término medio la relación de los diámetros es, (6,3 X 7,8), cultivos: ~~n 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-25-30-31-33-45-46-47-48-50-54-60-66-67-68-72-79-83-111-113.~~ 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-25-30-31-33-45-46-47-48-50-54-60-66-67-68-72-79-83-111-113.

b.- Células elípticas; abundan las ovales en cultivos frescos y en medios líquidos; en medios sólidos predominan más bien las formas elípticas; se multiplican por brotación, cultivos: (5,6 X 7,9); 24-26-34-43-49-51-52-53-55-56-57-58-59-61-62-63-75-81-82-95.

c.- Células cilíndricas y alargadas, en cultivos viejos tienen grandes vacuolas y permanecen unidas en cadenas; (4,8 X 8,3), cultivos: 64-71-75-94-97-102-103.

d.- Células en forma de limón con o sin brotes, pequeñas; (3,2 X 7,4) cultivos: 37-41-42-86-87-108.

e.- Células elípticas y cilíndricas largas; en cultivos viejos poseen grandes vacuolas por lo que aparecen transparentes y vacías; presentan filamentos largos y delgados, mezclados con células de diversas formas; se multiplican por brotación; (2,2 X 5,4), cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-39-40-89-92-99-100-106-105-107.

f.- Células redondas u ovales en menor cantidad con gránulo muy refringente; se multiplican por brotación; (5,9 X 5,9), cultivos: 20-21-22-23-27-28-29-65-69-70-73-74-76-77-78-88-90-91-93-98-109-112.

Las células de los ⁴⁴⁻¹¹⁰ cultivos son elípticas y muy pequeñas: (2,2 X 4,3)

2.- Características de los cultivos.

Detallaremos seguidamente los caracteres de los cultivos aislados que nos han servido de base para la diferenciación de los mismos.

a.- Desarrollo en agar de mosto de malta, en cajas de Petri.

Observados después de varios días estos cultivos en superficie, obtuvimos los siguientes tipos de colonias:

1. Colonias redondeadas, de bordes lisos, algo elevadas sobre el agar, húmedas, de consistencia cremosa; cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-25-30-31-33-45-46-47-48-50-54-60-66-67-68-72-79-83-111-113-24-26-34-43-49-51-52-53-55-56-57-58-59-61-62-63-75-81-82-103.

2. Colonias blanquecinas, opacas, muy desarrolladas en superficie, de aspecto seco y bordes irregulares; cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-40-89-92-96-99-100-105-106-107.

3. Colonias parecidas al tipo 1, pero más desarrolladas en superficie, menos brillantes, de bordes lobulados pero lisos; cultivos: 20-21-22-23-27-28-29-65-69-70-73-74-76-77-78-88-90-91-93-98-109-112.

4. Colonias muy brillantes, casi transparentes, de coloración marrón, de bordes lisos y de poco desarrollo; cultivos: 37-41-42-86-87-108.

5.- Colonias de coloración roja, muy húmedas, de bordes lisos: cultivos 44-110.

b.- Desarrollo en estría.

Por el aspecto de los cultivos en estría, sembrados en agar de mosto de malta, hemos podido caracterizar los siguientes grupos:

1. Estría muy elevada en el centro y longitudinalmente, de bordes lobulados pero lisos, aspecto opaco, brillante, húmeda, de consistencia cremosa; cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-24-25-26-30-31-33-34-43-45-46-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-60-61-62-63-

66-67-68-72-75-79-81-82-83-95-111-113.

2. Estría blanquecina, bien desarrollada en superficie, aspecto seco y harinoso, bordes irregulares y filamentosos; cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-39-40-89-92-96-100-105-106-107.

3. Estría bien desarrollada en superficie, brillante de aspecto pastoso, de bordes lobulados y lisos; cultivos: 20-21-22-23-27-28-29-65-69-70-73-74-76-77-78-88-90-91-93-98-109-112.

4. Estría de poco desarrollo, muy brillante, casi transparente, de coloración marrón y bordes lisos; cultivos: 37-41-42-86-87-108.

5. Estría de coloración roja, bastante elevada, húmeda, muy adherente, de bordes lisos; cultivos: 44-110.

c.- Desarrollo en mosto de malta y mosto de uva.

Dejamos constancia de que los ensayos de cultivos en mosto de malta y en mosto de uva nos llevan a los mismos resultados.

Observadas las siembras a las 48 horas, diferenciamos los siguientes grupos:

1. Levaduras que producen abundante desprendimiento de CO₂, el líquido es de una turbidez uniforme y el depósito granuloso; cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-24-25-26-30-31-33-34-43-45-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-61-62-63-64-66-67-78-71-72-75-79-80-81-82-83-84-94-95-97-102-103-111-113.

2. Levaduras que forman un velo seco, plegado, el líquido permanece poco turbio, casi sin depósito; cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-39-40-89-92-96-99-100-105-106-107.

3. levaduras que forman una película que sube por las paredes; líquido débilmente turbio con poco depósito; cultivos: 20-22-27-38-37-41-42-65-69-70-74-77-86-87-90-93-98-108-112.

4. Las levaduras de los cultivos, 21-23-73-76-78, no forman película, pero dan en cambio un líquido turbio, sin depósito.

En los mismos cultivos a los 7 días se hicieron las siguientes observaciones:

1. Depósito abundante, granulosos, bien adherido al fondo, líquido límpido, en los cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-~~9~~ 9-10-11-12-13-14-24-25-26-31-33-34-43-45-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-61-62-63-64-66-67-68-71-72-75-79-80-81-82-83-94-95-97-102-103-111-113.

2. Líquido muy turbio, depósito poco consistente, la película casi no se nota por el desprendimiento de CO₂; cultivos: 37-41-42-86-87-108.

3. Velo opaco, seco, plegado y amarillento; al agitar el tubo, el velo cae en copas al fondo; cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-40-89-92-96-99-100-105-106-107.

4. Velo mucoso, fermentación débil, líquido no clarificado; cultivos: 21-28-29-70-73-74-76-88-90-91-109-112.

Las levaduras de los cultivos: 20-23-22-27-38-65-69-77-78-88-93-98, sólo forman película; los cultivos 44 y 110 dan anillo y depósito rojo.

d.- Colonias gigantes.

Transcurridos 30 ó 40 días de la siembra, observamos las colonias con el siguiente resultado:

1. Colonia elevada en el centro, bordes lobulados pero lisos; brillante, húmeda, con estrías radiales y pliegues concéntricos; cultivos: 1-3-4-5-6-7-8-9-11-12-14-23-25-28-31-33-38-43-45-47-48-49-50-51-52-54-55-56-57-59-60-61-62-63-65-66-67-68-69-70-71-72-73-74-75-76-79-80-81-82-83-90-94-95-97-102-103-109-111-112-113; las levaduras de los cultivos: 2-10-13-24-26-34-53-58-64-77-78, forman colonia menos elevada.

2. Colonia poco elevada, bordes aserrados, aspecto seco, estrías radiales apenas perceptibles; cultivos: 27-29-88-91-93.

3. Colonia muy desarrollada en superficie, blanca, opaca, seca, bordes aserrados y filamentosos; cultivos: 16-17-18-19-32-35-36-40-89-92-96-99-100-105-106-107.

4. Colonia poco elevada, casi transparente, húmeda, brillante, amarillenta; cultivos: 37-41-42-86-87-108.

5. Colonia rojiza, húmeda, elevada, bordes lisos; cultivos: 44 y 110.

e.- Formación de micelio filamentososo.

Siguiendo el método de Fortner,^{Soriano} en observación microscópica a las 24, 48 y 72 horas hemos establecido los siguientes grupos:

1. Pseudomicelio constituido por filamentos ramificados, largos y delgados como salchichas; cultivos: 16-17-18-19-39-69-99.

2. Pseudomicelio rudimentario de células largas y gruesas con brotes; cultivos: 40-96.

3. Células formando cadenas como las del grupo 2 pero sin ramificaciones; cultivos: 70-100-105-106-107.

Según el método de Lodder, cultivos en agua de papas, los resultados fueron los siguientes:

1. Las levaduras de los cultivos: 16-17-18-19-32-39-40-96-99-100-106 y 74, forman un pseudomicelio de filamentos muy largos y ramificados, y blastosporos rudimentarios.

2. Sólo forman blastosporos las levaduras de los cultivos: 35-36-105.

f.- Esporulación.

Ensayados las cepas aisladas en los medios de cultivo ya descritos para el estudio de la esporulación, hemos llegado a los siguientes resultados:

1. Levaduras que forman de 2 á 4 ascosporas pero con dificultad y sólo después de 6 ó 7 días; cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-24-25-26-31-33-34-43-45-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-60-61-62-63-66-67-68-72-79-81-82-83-95-111-113.

2. Levaduras que esporulan rápidamente a las 24, ó 48 horas, predominando los ascos con 3 y 4 esporas; cultivos: 64-71-75-94-97-102-103.

Los demás cultivos no esporulan en ninguno de los casos estudiados.

3.- Características fisiológicas de los cultivos.

Para la determinación precisa de las cepas aisladas, hemos estudiado sus características fisiológicas, siguiendo las indicaciones detalladas en los métodos generales de investigación; a continuación expondremos los resultados.

a. Licuefacción de gelatina.

Observadas las siembras de los cultivos en gelatina de mosto de malta a los dos meses, obtuvimos los siguientes resultados:

Licúan completamente la gelatina los cultivos: 27-42-41-43-58-69-73-83-86-87-108-109.

b. Utilización de alcohol como fuente de carbono.

Al mes de hechas las siembras, hicimos las observaciones siguientes:

1. Forman depósito abundante y dan una película que trepa por las paredes, los cultivos: 16-17-18-19-20-21-27-28-29-32-35-36-39-40-69-70-73-74-76-77-78-87-88-89-90-91-92-93-96-98-99-100-105-106-107-109.

2. Forman solamente un depósito blanquizo que al agitar se levanta en copos, los cultivos: 6-13-14-49-54-55-58-61-62-63-64-72-82-94-95-97-102.

c.- Utilización de nitratos como fuente de Nitrógeno.

A los 15 días observamos los cultivos sembrados en el medio anteriormente indicado y podemos concluir que las cepas, 69-70-74-76-77-78-90-91-109-112, forman una película tenue que trepa por las paredes del tubo y dan un depósito blanco y abundante.

Después de los trabajos microbiológicos de E. Laurent y Mayer, parecería que los nitratos son nocivos para las levaduras, pues como deben ser reducidos previamente a nitritos, resultan en ese estado verdaderos tóxicos.

Pero Fernbach y Lizemberg, Fernbach y Nicolau llegaron en sus experiencias, a la conclusión de que los nitratos favorecen por el contrario la actividad fermentativa, obrando como aceleradores de la función enzimática.

Frente a tan discutidas opiniones juzgamos necesario efectuar un ensayo más decisivo que nos revelara cual había de ser el comportamiento de las levaduras en la utilización de los nitratos.

Preparamos para ello tres series de tres frasquitos cada una, muy limpios y tapados con algodón. Vertimos en la primera serie 50 c.c. del medio indicado más arriba. Substituimos en la segunda el nitrato por sulfato de amonio, sal utilizable por las levaduras como resulta de las experiencias de Pasteur. En la tercera suprimimos el nitrato, privando así al medio de su fuente de nitrógeno; todos estos frascos fueron esterilizados al autoclave.

Hicimos luego una suspensión fisiológica con las levaduras de los cultivos: 90, tipo torula que desarrolló en la primera experiencia; 106, tipo mycoderma; y 55, tipo saccharomyces; las agitamos para uniformar la distribución y con una pipeta estéril vertimos una gota, en cada uno de los frascos, previamente marcados con el medio empleado, señalando además con una cifra el número del cultivo.

Extrajimos de cada frasco con pipeta estéril 1 c.c. de la suspensión y la llevamos a una caja de Petri previamente esterilizada, vertiendo en ella el contenido de un tubo de agar de mosto de malta entibiado a 50º y teniendo cuidado de distribuir bien las levaduras mediante la rotación de la caja; incubamos a 28º conjuntamente con los frascos.

A las 24 y 48 horas repetimos la siembra en caja, contando cada vez las colonias desarrolladas en el agar para apreciar así la multiplicación celular.

Los resultados quedan consignados en el cuadro siguiente:

Cultivos	Número de colonias a las:				
	24 hs.	48 hs.	72 hs.	4 días	
90.....	con NO ₃ K	9	7	incont.	--
	con SO ₄ (NH ₄) ₂	5	3	incont.	--
	sin N.	12	10	8	13
55.....	con NO ₃ K	4	7	30	200
	con SO ₄ (NH ₄) ₂	9	5	11	150
	sin N.	6	8	10	7
106.....	con NO ₄ K	3	incont.	--	--
	con SO ₄ (NH ₄) ₂	7	5	incont.	--
	sin N.	6	incont.	--	--

Por la observación del cuadro podemos deducir que las tres levaduras ensayadas, se multiplican en el medio con nitratos y sal de amonio. Para los cultivos 90 y 55 no se nota multiplicación celular en el medio sin nitrógeno; contrariamente sucede con el cultivo 106. Aunque no podemos dudar de la limpieza de los frascos utilizados, podríamos tal vez atribuir la causa a algún resto de substancia orgánica, o menos verosimilmente a las sales de amonio existentes sobre el líquido; la dilucidación de este caso cae fuera de los propósitos de esta tesis y será objeto de un trabajo posterior.

Las levaduras del cultivo 90 formaron a los tres días un depósito abundante en los frascos y una película que se elevaba 2 cm. por las paredes, enturbiando el líquido, tanto en el medio con nitratos como en el de sulfato de amonio; en cambio en los frascos de los cultivos 55 y 106, el líquido era opalescente y no había formación de película.

En resumen, podemos concluir que algunas levaduras del tipo torula, utilizan los nitratos como única fuente de nitrógeno por lo menos en lo que atañe a su multiplicación celular.

d.- Fermentación de azúcares.

Siguiendo las indicaciones establecidas en los métodos de investigación, hicimos los ensayos de fermentación de los azúcares.

Además hicimos la prueba de fermentación de la melibiosa con el objeto de establecer los tipos de alta o baja.

Las levaduras de alta fermentan débilmente la rafinosa; este trisacárido se hidroliza por la acción diastásica desdoblándose en levulosa fermentescible y melibiosa, disacárido no fermentescible por las levaduras de alta; en estas condiciones el líquido de prueba permanece reductor en presencia del licor de Fehling.

Este ensayo lo hicimos con todos los cultivos aislados, colocando en los tubitos de fermentación un tapón de vaselina-parafina para retener los gases y medir aproximadamente el poder fermentativo total o parcial de la rafinosa. Hemos comprobado así que todas las cepas probadas pertenecen al tipo de levaduras de alta.

En los casos dudosos apelamos directamente a la fermentación de la melibiosa.

Resultados:

1. Las levaduras del tipo *Pseudosaccharomyces* y del tipo *mycoderma* solo fermentan glucosa (L.M.) = *torulosa, flavosa*.

2.- Las levaduras del tipo *torula* en general fermentan glucosa, sacarosa y maltosa; algunas razas sólo fermentan glucosa y sacarosa como las correspondientes a los cultivos 44 y 110; otras también fermentan galactosa.

3. Las levaduras del tipo *s. ellipsoideus* y *s. intermedius* fermentan glucosa, sacarosa, galactosa, manosa y maltosa; además aunque débilmente, rafinosa.

De las levaduras ensayadas, ninguna fermenta lactosa ni melibiosa.

Los resultados obtenidos en la fermentación de azúcares los ofrecemos en el cuadro adjunto:

Planilla de fermentación de azúcares

Cultivos	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Melibiososa	Cultivos	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Melibiososa
1	+	+	+	+	+	+	+	30	+	+	+	+	-	+	-
2	+	+	+	+	-	+	-	31	+	+	+	+	-	+	-
3	+	+	+	+	-	+	-	32	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	+	-	33	+	+	+	+	-	+	-
5	+	+	+	+	-	+	-	34	+	+	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	-	+	-	35	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	+	-	36	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	+	-	37	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	+	-	38	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	-	+	-	39	+	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	+	-	40	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	-	+	-	41	+	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	+	-	42	+	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	+	-	43	+	+	+	+	-	+	-
16	+	-	-	-	-	-	-	44	+	-	+	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	45	+	+	+	+	-	+	-
18	+	-	-	-	-	-	-	47	+	+	+	+	-	+	-
19	+	-	-	-	-	-	-	48	+	+	+	+	-	+	-
20	+	+	+	-	-	+	-	49	+	+	+	+	-	+	-
21	+	+	+	-	-	+	-	50	+	+	+	+	-	+	-
22	+	+	+	-	-	+	-	51	+	+	+	+	-	+	-
23	+	-	+	+	-	+	-	52	+	+	+	+	-	+	-
24	+	+	+	+	-	+	-	53	+	+	+	+	-	+	-
25	+	+	+	+	-	+	-	54	+	+	+	+	-	+	-
26	+	+	+	+	-	+	-	55	+	+	+	+	-	+	-
27	+	-	+	+	-	-	-	56	+	+	+	+	-	+	-
28	+	-	+	+	-	+	-	57	+	+	+	+	-	+	-
29	+	+	+	-	-	+	-	58	+	+	+	+	-	+	-

VII DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS DE IMPORTANCIA

INDUSTRIAL

Hemos emprendido la realización de este trabajo con el fin de aislar y clasificar las levaduras de las uvas de Mendoza con miras a su aplicación industrial, por lo cual creemos conveniente presentar en este capítulo las características de los fermentos, ensayadas bajo el aspecto tecnológico, es decir, su eficiencia fermentativa, rendimiento en alcohol, resistencia al anhídrido sulfuroso, etc., de todo lo cual daremos a continuación un breve resumen.

1.- Poder fermentativo.

Es de particular interés en la cervecería, destilería y vinificación conocer la eficiencia fermentativa de una levadura; su mayor o menor velocidad de fermentación, o sea el máximo de transformación azucarina que puede provocar en menos tiempo; su rendimiento en alcohol y su capacidad funcional en medios muy azucarados.

Aisladas ya y conocidas por su fisiología las especies de levaduras buenas y malas fermentadoras, procedimos a la determinación del poder fermentativo de las primeras y de algún caso típico de las segundas para comparar las respectivas eficiencias.

Para ello son varios los métodos que suelen emplearse.

a. En las cervecerías se sigue el método de la atenuación, medida por el cociente entre la diferencia del extracto seco del mosto inicial y de la cerveza en un momento dado, y el extracto seco del mismo mosto, referido a cien:

$$\text{Atenuación} = \frac{\text{Extr. del mosto} - \text{extr. de la cerveza}}{\text{Extracto del mosto}} \times 100$$

El extracto seco disminuye naturalmente a medida que adelanta la

fermentación, proporcionalmente al azúcar desdoblado en CO₂ y alcohol.

La atenuación real se mide como en el caso anterior pero después de eliminar por ebullición el CO₂ y el alcohol, restableciendo el volumen inicial con agua. La atenuación aparente se logra si se elimina solamente el CO₂ por agitación.

En la práctica se establece la atenuación sea real o aparente por la variación de densidad:

$$\text{Atenuación} = \frac{\text{Dens. del mosto} - \text{dens. de la cerveza}}{\text{Dens. de la cerveza}} \times 100$$

b. En vinificación es más corriente ^{de} determinar la eficiencia fermentativa de las levaduras ^{por densidad o} por el CO₂ desprendido, medido volumétricamente con un simple nitrómetro como lo hizo Slator, pero adaptando una válvula de ventilación de Meissl al frasco de fermentación como lo aconsejan Euler y Lindner.

De una manera más sencilla, puede medirse la cantidad de CO₂ desprendido, por la pérdida de peso del mosto, método que hemos empleado en este trabajo con excelentes resultados.

Adaptamos a un Erlenmeyer de 500 c.c. de capacidad, un tapón de goma bioradado; por uno de los orificios introducimos hasta el fondo del recipiente un tubo de vidrio, cuya extremidad exterior doblada en ángulo recto se cierra por un tubito de goma y un trozo de varilla; por el otro orificio del tapón, introducimos a su vez otro tubo de ramas cortas doblemente acodado; la rama interna termina debajo del tapón del frasco, mientras la exterior va unida a otro tubo en forma de U que contiene perlas de vidrio embebidas en ácido sulfúrico, destinado a retener el agua y el alcohol provenientes de la evaporación, mientras da salida al CO₂; termina el tubo de ácido sulfúrico en una rama horizontal con cierre de algodón para retener la humedad del ambiente.

Para proceder ahora a determinar la eficiencia de una levadura,

se desconecta el tubo de perlas de vidrio y se vierten en el Erlenmeyer 250 c.c. de mosto, cuya riqueza azucarina ya se conoce; se esteriliza el mosto en el autoclave; se deja enfriar y se siembra con pipeta estéril de Pasteur, 1 c.c. del depósito de levadura activa, procediendo con suma precaución para evitar las infecciones; se tapa, se adapta el tubo de ácido sulfúrico; se pesa y se incuba a 28°.

Vuelve a repetirse la pesada cada 24 horas haciendo antes un arrastre con aire libre de CO₂, para lo cual se hace burbujear previamente en una solución de HONa. A los 20 días prácticamente el peso es constante y por diferencia con la pesada inicial puede deducirse el peso total del CO₂ desprendido; por las tablas se averigua el alcohol total producido.

Gracias a esta experiencia hemos podido comprobar que el porcentaje de alcohol, deducido de la cantidad total de CO₂ es muy alto, superior al calculado teóricamente del peso del azúcar inicial.

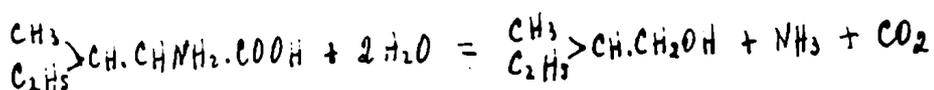
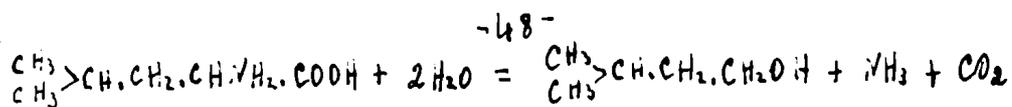
Pero no debemos olvidar que el CO₂ no depende únicamente del proceso clásico de fermentación, sino también de otras actividades de las levaduras.

Buchner y Kunz han comprobado que el ácido succínico no proviene del desdoblamiento del azúcar por acción de la levadura, puesto que el ácido no se produce en la fermentación de dicho azúcar por el jugo de levadura.

Según Ehrlich, el ácido succínico es un producto del metabolismo nitrogenado de las levaduras; éstas obran por oxidación sobre los aminoácidos; así el ácido glutámico por desaminación y descarboxilación pone en libertad amoníaco y CO₂:



De igual manera, en los vinos, los alcoholes superiores tienen origen en un proceso de hidrólisis de los ácidos monoaminados como la leucina e isoleucina:



Portanto el alcohol etílico no puede ser determinado exactamente por el CO₂ desprendido.

Con todo presenta este método la ventaja de ser la única forma práctica de medir aproximadamente la velocidad de fermentación de cada cultivo, pues la determinación directa del alcohol implica la modificación cuantitativa del mosto en estudio.

Para Pasteur la fermentación de los azúcares es efecto de una asfixia parcial de la levadura; en presencia de aire excesivo disminuye su actividad fermentativa en provecho de su multiplicación celular. En nuestro caso al hacer el arrastre diario de CO₂ con aire colocábamos a la levadura en condiciones que no son las naturales, ya que en definitiva debe ejercer su acción en presencia de cantidades mínimas de oxígeno.

Por todos estos motivos y por indicación del Dr. Sor-delli, introdujimos una leve modificación en el clásico aparato, con el fin de establecer directamente por destilación, al final de la fermentación, el grado alcohólico del vino.

Entre el Erlenmeyer y el tubo de perlas de vidrio intercalamos otro tubo en U, a bolas, vertiendo en él 5 c.c. de agua, destinada a retener el alcohol que se evapora en cantidades no despreciables en el intervalo de un mes y a temperaturas próximas a 30°; suprimimos además el arrastre diario.

En estas nuevas condiciones, el CO₂ diario, y el total desprendido y determinado por las pesadas, es inferior al obtenido por el primer método como se deduce de la comparación de las tablas respectivas.

Se observa además que el alcohol elaborado en la fermentación y deducido por el peso del CO₂ es superior aproximadamente en

un 1% al hallado por destilación al final de la experiencia.

Por otra parte, si se efectúa el arrastre diario, se producen pérdidas notables que impiden atribuir exclusivamente a la eliminación de CO_2 , la disminución del peso del mosto.

La comparación de los datos del cuadro adjunto permite comprobar las observaciones deducidas en este capítulo.

Eficiencia fermentativa de las levaduras aisladas

Cultivos	Mosto Bé.	Azúcar gr/l.	CO ₂ pesado gr/100	Alcoh. calcul. gr/100	Alcohol % en volumen	Dens. soluc. alcoh. á 15%	Alcohol % deducido	Observaciones
1	14	257,0	9,85	11,36	14,31	0,9830	13,25	sin arrastre
2	"	"	12,21	14,26	17,98	--	--	arrastre diario
3	"	"	12,27	13,71	17,29	--	--	"
4	"	"	11,63	13,40	16,89	--	--	"
5	"	"	11,68	13,42	16,92	--	--	"
6	"	"	11,41	13,12	16,53	--	--	"
7	"	"	11,53	13,26	16,71	--	--	"
8	"	"	11,42	13,13	16,54	--	--	"
9	"	"	11,61	13,35	16,82	--	--	"
10	"	"	12,96	14,90	18,78	--	--	"
11	"	"	12,35	14,39	18,14	--	--	"
12	"	"	11,42	13,13	16,54	--	--	"
13	"	"	11,25	12,90	16,26	0,9820	14,70	sin arrastre á 18%
14	"	"	10,86	12,48	15,73	0,9820	14,20	"
23	"	"	5,17	5,99	7,54	0,9910	6,40	"
24	"	"	10,93	12,53	15,79	0,9817	14,48	"
25	"	"	10,61	12,50	15,37	0,9820	14,40	" á 16%
26	"	"	10,49	12,32	15,29	0,9820	14,20	"
31	"	"	10,94	12,57	15,84	0,9820	14,20	"
33	"	"	9,78	11,21	14,13	0,9825	13,72	"
34	"	"	11,13	12,40	15,63	0,9815	14,68	"
35	"	"	1,49	1,71	2,16	0,9977	1,54	"
43	"	"	10,61	12,15	15,31	0,9820	14,40	" á 16%
45	"	"	11,36	13,06	16,45	0,9811	14,94	"

Cultivos	Mosto Bé.	Azúcar gr/l.	CO ₂ pesado gr/100	Alcoh. calcul. gr/100	Alcohol % en volumen	Dens. soluc. alcohólica á 15%	Alcohol % deducido	Observaciones
47	14	257,0	10,56	12,13	15,29	0,9828	13,50	sin atrastre
48	"	"	10,71	12,31	15,51	0,9826	13,83	" á 16%
49	"	"	11,04	12,65	15,95	0,9817	14,68	" á 16%
50	"	"	10,77	12,38	15,60	0,9828	13,44	"
51	"	" ^b	10,13	11,65	14,68	0,9836	12,89	" á 16%
52	"	"	11,00	12,65	15,95	0,9822	14,01	"
53	"	"	10,37	11,92	15,04	0,9831	13,16	"
54	"	"	10,01	11,51	14,51	0,9832	13,06	"
55	"	"	10,20	11,73	14,78	0,9833	12,97	"
56	"	"	10,20	11,73	14,78	0,9829	13,34	"
57	"	"	10,21	11,74	14,80	0,9830	13,25	"
58	"	"	10,09	11,60	14,62	0,9823	13,91	"
59	"	"	10,30	11,86	14,95	0,9828	13,44	"
61	"	"	10,11	11,63	14,66	0,9824	13,82	"
62	"	"	9,95	11,44	14,41	0,9826	13,63	"
63	"	"	8,77	10,08	12,70	0,9842	12,14	"
64	"	"	8,74	10,05	12,67	0,9847	11,68	"
66	"	"	9,71	11,17	14,08	0,9832	13,06	"
67	"	"	9,07	10,43	13,15	0,9841	12,23	"
68	"	"	10,24	11,78	14,85	0,9830	13,25	"
71	"	"	9,78	11,34	14,24	0,9838	12,50	"
72	"	"	10,31	11,86	14,95	0,9836	12,69	"
75	"	"	9,31	10,70	13,49	0,9845	11,86	"
76	"	"	3,60	4,14	5,22	0,9938	4,29	"
79	"	"	9,88	11,36	14,31	0,9837	12,59	"
81	"	"	10,35	11,90	14,99	0,9829	13,34	"

Cultivos	Mosto Bé.	Azúcar gr/l.	CO ₂ pesado gr/100	Alcoh.calcul. gr/100	Alcohol % en volumen	Dens.scluc. alcoh. & 15%	Alcohol deducido	Observaciones
82	14	257,0	10,14	11,66	14,69	0,9832	13,06	sin arrastre
83	"	"	10,31	11,89	14,95	0,9830	13,25	"
87	"	"	2,51	2,88	3,64	0,9956	3,00	"
94	"	"	9,34	10,74	13,53	0,9845	11,86	"
95	"	"	9,52	10,95	13,81	0,9836	12,69	"
97	"	"	9,72	11,18	14,09	0,9841	12,23	"
102	"	"	10,39	11,95	15,06	0,9831	13,16	"
103	"	"	10,31	11,86	14,95	0,9833	12,97	"
111	"	"	10,43	11,99	15,10	0,9828	13,44	"
113	"	"	10,69	12,29	15,48	0,9826	13,63	"

2.- Curvas de fermentación.

Las curvas representativas del poder de fermentación estudiado en el capítulo anterior las hemos construido sobre un sistema de coordenadas, tomando en las ordenadas el peso de CO₂ (gr), deducido por la pérdida de peso del mosto en fermentación, y en las abscisas los intervalos de tiempo, de 24 en 24 horas, durante 20 días pues al final de estos las variaciones son ya despreciables.

Observando las curvas se nota que las levaduras de los cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-11-12-13-26-31-33-50-51-52-53-55-56-57-58-59-61-62-63-64-67-68-71-72-75-81, alcanzan el máximo de desprendimiento de CO₂ al segundo día para decrecer luego rápidamente; son levaduras de fermentación rápida.

En cambio para las levaduras de los cultivos: 8-9-10-14-24-25-34-43-47-48-49-54-66-79, es mayor el desprendimiento de CO₂ al tercer día; la fermentación es más lenta.

Algunas ~~cepas~~^{cepas} de *S. ellipsoideus* como las correspondientes a los cultivos, 2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-24-25-26-31-34-43-45-49 y 52 han evidenciado ser excelentes fermentadoras, elaborando más de 14 % de alcohol en volumen, al cabo de un mes de actividad y a temperatura de 28°, rendimiento próximo al teórico, deducido del grado azucarino del mosto, 257,0 gr/l. o sea 14° Bé. Producen un depósito compacto de coloración marrón, difícil de desprender del fondo del recipiente, y un vino muy límpido.

Las levaduras de los cultivos, 6-7-95-97-102-103-111-113, son de fermentación rápida (ver curvas), clarifican muy bien, pero el depósito se dispersa fácilmente por agitación, enturbiando el líquido.

Hay ~~cepas~~^{cepas} que producen un bouquet característico, pronunciado, como las levaduras de los cultivos, 43-75-52-95 y 97; algunas son

de menor rendimiento alcohólico pero debidamente asociadas a las anteriores pueden mejorar las cualidades de los vinos.

Las levaduras del tipo *mycoderma* producen fermentación muy débil (1,5 % de alcohol) y acetifican rápidamente el líquido, enturbándolo uniformemente y comunicándole un aroma penetrante que recuerda la esencia de banana.

Las levaduras del tipo *pseudosaccharomyces* son también de fermentación débil; elaboran de 3 á 4 % de alcohol; no clarifican bien y dan poco depósito, fácilmente dispersable por agitación.

Entre las levaduras del tipo *torula* las hay que producen hasta 5 y 6 % de alcohol, poco depósito, líquido turbio; algunas de estas razas comunican al vino un aroma pronunciado.

3.- Resistencia al alcohol.

Es un hecho por demás conocido que la actividad fermentativa de las levaduras se modifica rápidamente por el alcohol elaborado, el cual constituye en ciertos límites un tóxico paralizante.

Experiencias realizadas por Röhling señalan al *pseudosaccharomyces* como la levadura vinica menos resistente al alcohol; sin agregado de alcohol, para una célula sembrada en mosto, al fin del proceso fermentativo, había 514 células; en mosto con 2,86 % de alcohol, 182 células; y sólo 86 células en mosto de 4,62 % de alcohol inicial.

El *pseudosaccharomyces* es de los géneros más sensibles a la acción de este antiséptico y el *S. ellipsoideus* el más resistente, siendo de resistencia intermedia el *S. intermedius*.

La determinación de la resistencia al alcohol resulta de capital interés para los casos de vinos de alta graduación alcohólica.

Para realizar esta experiencia procedimos de acuerdo a las indicaciones dadas en los métodos generales de investigación, sembrando los cultivos en mostos con proporciones crecientes de alcohol y examinándolos cada 24 horas. Los resultados quedan consignados en el cuadro siguiente:

Resistencia al alcohol de las levaduras aisladas

Alcohol	Entre 2 y 3 días	Entre 4 y 7 días
4 %	<p>Fermentan; cultivos: 1-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-25-26-31-33-34-45-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-61-62-63-64-66-67-71-72-75-81-82-83-94-95-102-103-111-113.</p> <p>Forman velo; cultivos: 16-39-96.</p> <p>Forman película; cultivos: 17-18-19-27-29-32-35-36-40-88-89-90-92-93-96-98-99-106.</p>	<p>Fermentan; cultivos: 2-3-23-24-43-47-70-79-97-112.</p> <p>Forman velo seco y fermentan; cultivos: 16-17-18-19-35-39-40-88-89-92-96-99-105-106-107.</p> <p>Forman película y fermentan; cultivos: 20-21-22-32-38-69-73-74-76-77-78-90.</p> <p>Forman velo mucoso y fermentan; cultivos: 28-90-91-98-109.</p> <p>No fermentan; cultivos: 37-41-42-44-86-87-100-108.</p>
5,6%	<p>Fermentan; cultivos: 1-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-25-26-31-33-34-45-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-58-59-61-62-63-64-67-68-71-75-81-82-83-94-95-102-103-111-113.</p> <p>Forman velo; cultivos: 16-39-96.</p> <p>Forman película; cultivos: 17-18-19-29-27-35-36-40-89-90-92-93-98-88-106-107.</p>	<p>Fermentan; cultivos: 2-3-23-24-43-47-70-79-94-112.</p> <p>Forman velo seco y fermentan; cultivos: 16-17-18-19-35-36-40-88-92-96-99-105-106-107.</p> <p>Forman velo mucoso y fermentan; cultivos: 29-28-90-91-109.</p> <p>Forman película y fermentan; cultivos: 27-32-38-70-72-73-74-76-77-78-93.</p>

Alcoh.	Entre 2 y 3 días	Entre 4 y 7 días
7,8 %	<p>Fermentan; cultivos: 1-4-5-6-7-8-11-12-13-23-25-26-34-43-48-51-52-53-54-57-58-59-61-62-63-64-66-67-71-75-82-94-96-102-103-31-33.</p> <p>Forman velo seco; cultivos: 16-96</p> <p>Forman película; cultivos: 17-18-19-27-35-39-40-88-89-92-93-98-99-106-107.</p>	<p>Fermentan; cultivos: 2-3-9-10-14-24-45-49-50-55-56-68-72-79-81-83-97-103-111-112.</p> <p>Forman velo y fermentan; cultivos: 17-18-19-36-39-40-28-91-99-105-106-109.</p> <p>Forman velo y no fermentan; cultivos: 35-70-88-89-92.</p> <p>Forman película y fermentan; cultivos: 27-38-69-74-76-77-78-93-98.</p> <p>Forman película y no fermentan; cultivos: 20-21-22-32-</p> <p>No fermentan; cultivos: 37-41-42-44-47-86-87-100-108-110.</p>
11 %	<p>Fermentan; cultivos: 1-5-6-7-12-14-26-31-33-51-52-54-59-61-62-63-66-67-71-75-95.</p> <p>Forma velo; cultivo: 16</p> <p>Forman película; cultivos: 17-39-88-90-96-99-106.</p>	<p>Fermentan; cultivos: 73-78.</p> <p>Forman velo y fermentan; cultivos: 16-17-19-36-39-89-96-106.</p> <p>Forman velo y no fermentan; cultivos: 18-32-40-88-92-105.</p> <p>Forman película y fermentan; cultivos: 27-29-38-93-98.</p> <p>No fermentan; cultivos: 2-3-4-8-9-10-11-13-20-21-22-23-24-26-32-34-35-43-41-42-44-45-47-49-50-53-55-56-57-58-60-63-65-64-67-68-48-70-72-74-79-80-81-82-83-86-87-91-97-100-102-103-108-109-110-111-113-112.</p>

En mosto de uva al 4 % de alcohol, después de 24 horas, ningún cultivo ha determinado la fermentación. Transcurridas 48 horas, observamos franca fermentación en los tubos de los cultivos: 1-4-5-6-10-11-12-25-33-33-52-31-53-55-56-61-62-63-71-72-81-82-94; forman velo las levaduras: 16-39-96; otras del tipo mycoderma y del tipo torula forman película.

A los 7 días no fermentan las levaduras del tipo pseudosaccharomyces y la 100 del tipo mycoderma.

En concentración de 5,6 % de alcohol, a los 7 días no fermentan la mayoría de las levaduras del tipo torula, algunas del tipo mycoderma y las del tipo pseudosaccharomyces.

En concentración de 7,8 %, pocas levaduras del tipo mycoderma y del tipo torula forman velo o película y fermentan, otras sólo forman velo o película.

A 11 %, algunas levaduras del tipo mycoderma y del tipo torula forman velo o película y fermentan, otras del tipo mycoderma solamente velo. Muchas levaduras del tipo ellipsoideus, intermedius, pseudosaccharomyces no fermentan a los 7 días.

En concentración de 15,4 % de alcohol a los 7 días y más ninguna levadura produce fermentación franca; solamente algunas razas del tipo ellipsoideus enturbian débilmente el líquido, forman un pequeño depósito y desprenden muy poco CO₂; estas son las correspondientes a los cultivos: 6-8-9-14-31-52-55-61-64-81-112.

4.- Resistencia al anhídrido sulfuroso.

En los mostos, el SO_2 , posee una propiedad tóxica para los gérmenes nocivos de la fermentación constituyéndose así en agente de selección para las buenas levaduras.

Por otra parte su empleo en la vinificación se extiende de día en día, sobre todo en años que por sus condiciones climatéricas excepcionales resultan desastrosos para la madurez de la uva, de por sí tan propensa a fermentaciones extrañas y al desarrollo de toda clase de gérmenes comprometedores de las bondades y de la conservación del vino.

El SO_2 contribuye además a la precipitación de las sustancias pécticas, gomosas y terrosas de los mostos, favoreciendo su clarificación; pone en libertad muchos ácidos orgánicos y especies cromógenas del hollejo, aumentando en consecuencia la acidez fija de los vinos y enriqueciéndolos en materias extractivas.

Agregado a un mosto en dosis conveniente, como lo comprueba con sus experiencias J. Ventre, obstaculiza la vitalidad de las malas levaduras convirtiéndose como decíamos arriba en un medio excelente de selección.

El tipo de levadura menos resistente a este antiséptico es el pseudosaccharomyces; la resistencia es mayor en los tipos *S. intermedius*, *mycoderma* y *torula*, siendo máxima en el tipo *S. ellipsoideus*.

Linossier sostiene que el *mycoderma vini* es el tipo más resistente al SO_2 ; J. Ventre ha demostrado que con frecuencia en mostos de uva muy ácidos y con dosis de antiséptico muy elevada, el *S. ellipsoideus* afecte la forma de *mycoderma*, formando anillo ó velo.

Resulta muy difícil establecer en un mosto la dosis paralizante de SO_2 ; casi todos los autores indican cantidades distintas;

dependiendo éstas de las condiciones físicas y químicas de cada mosto, los ensayos deben ser necesariamente regionales.

La acción tóxica del SO_2 depende de varios factores que vamos a detallar:

1º El medio: es sabido que el SO_2 puede combinarse lábilmente con los azúcares aldehídicos y cetónicos; como únicamente el SO_2 libre tiene propiedades tóxicas, podemos deducir a priori que para enmudecer a un mosto la dosis necesaria será tanto mayor cuanto mayor sea el tenor en azúcar del medio ensayado.

2º Vitalidad de las levaduras: La dosis paralizante para cada especie de levadura es función de la vitalidad de la misma, siendo por tanto más resistente la que presenta mayor vitalidad.

3º Temperatura; En las mismas condiciones de medio y con idénticas dosis de SO_2 , la levadura inicia más prontamente la fermentación, cuanto más baja sea la temperatura; a temperaturas relativamente altas el mosto se empobrece más rápidamente en SO_2 .

El SO_2 suele usarse como antiséptico en varias formas: el proveniente de la combustión del azufre; el SO_2 líquido más controlable pero con la desventaja de requerir medidores especiales; y el metabisulfito de potasio, que se expende en pastillas de color blanco, cuyo rendimiento en SO_2 es teóricamente del 57 % (en práctica el 50 %). Su manejo y control son muy sencillos.

La dosis de SO_2 para inmovilizar un mosto por 48 horas es, según varios autores, la de 5 á 7 gr. por Hl.

Sembramos las cepas aisladas en el medio descrito en los capítulos anteriores, observando la fermentación a las 24, 48 y 72 hora, y a los 4 y 7 días.

Los resultados pueden verse en el cuadro siguiente:

Planilla de resistencia al SO₂

SO₂
gr/Hl.

Cultivos que fermentan a:

	las 24hs.	las 48 hs.	las 72 hs.	4 días	7 días
5		1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-	16-17-18-19-20	22-79-	36-40-44-
		11-12-13-14-23-24-25-	21-27-28-29-35	89-112	88-92-100-
		26-31-32-33-34-35-37-	38-39-41-42-66		105-110.
		43-45-46-47-48-49-50-	67-70-77-86-87		
		51-52-53-54-55-56-57-	90-91-93-96-98		
		58-59-61-62-63-64-65-	99-102-106-109		
		68-69-71-72-73-74-75-	113.		
		76-78-81-82-83-86-94-			
		95-97-103-108-111.			
		1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-	16-17-18-19-20	21-22-	36-40-44
6,5		11-12-13-14-23-24-25-	27-28-29-32-	79-89-	88-92-100-
		26-31-33-34-43-45-49-	35-37-38-39-	98-112	110.
		50-51-52-53-54-55-56-	41-42-46-47-		
		57-58-59-61-62-63-64-	48-66-67-70-		
		65-68-69-72-73-74-76-	71-77-86-87-		
		78-81-82-83-94-97-111	90-91-93-95-		
			96-99-102-103		
		106-108-105-			
		109-113			

Cultivos que fermentan a:

	las 24hs.	las 48 hs.	las 72 hs.	4 días	7 días
02 r/H1.		1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-	11-14-16-17-18-	20-21-22	36-40-44-
		12-13-23-24-25-26-31-	19-28-29-34-37-	27-32-35	88-92-98-
		33-43-49-51-52-53-54-	38-39-41-42-45-	79-89-93	100-105-
,5	_____	55-56-57-58-59-61-62-	46,47-48-50-66-	99-102-	110-112.
		63-64-65-68-69-72-74-	67-70-71-73-77-	106-108	
		76-81-94-97-111.	78-82-83-86-87-	109.	
			90-91-95-96-103		
			113		
		1-2-3-4-6-7-9-10-12-	5-8-11-14-16-	18-20-29-	22-36-40-
		13-24-25-26-33-43-51	17-19-23-31-34	35-38-48	44-27-28-
		52-53-54-55-56-57-58	39-49-50-65-68	21-37-41	32-79-88-
,99	_____	59-61-62-63-64-72-75	70-69-71-74-78	42-45-46-	92-93-98-
		76-81-94.	82-90-91-95-96	47-66-67	99-100-102
			97-111-113.	73-77-83	103-105-
				86-87-89	108-110-
				109.	112.

Observando las tablas deducimos que ~~que~~ hasta después de transcurridas 24 horas ninguna levadura había iniciado la fermentación en los mostos ensayados. A concentraciones bajas de antiséptico, las levaduras del tipo pseudosaccharomyces quedan inactivadas hasta por tres días; las levaduras del tipo intermedius y del tipo mycoderma son más resistentes y sólo a concentraciones de 8,5 gr/Hl. de SO₂ son paralizadas por 2 ó 3 días. A concentración de 11 gr/Hl. ninguna de las levaduras de los tres tipos nombrados inicia la fermentación hasta los 4 ó 7 días.

La mayoría de las levaduras del tipo ellipsoideus en los casos experimentados han demostrado actividad a las 48 horas, poniendo en evidencia su mayor resistividad a dicho antiséptico.

5.- Sabor y bouquet.

El buen vino lo da la buena uva, la más armónica en su composición, dice Magistocchi.

Afirma Rosenstiehl en cambio, en uno de sus notables trabajos, que si bien la naturaleza del aroma depende de la uva, su intensidad es función de la levadura. Esta obraría no solo sobre el azúcar para transformarlo en CO₂ y alcohol, sino también sobre otras sustancias de la uva, cierta especie de glucósido, al que llamó anthóforo; la levadura anthógena segrega una distasa específica capaz de actuar sobre aquél; los productos odorantes de su desdoblamiento intensifican el bouquet.

Las levaduras no son anthógenas indiferentes, esto es, no obran sobre cualquier anthóforo; su acción es específica para determinado ~~ant~~ glucósido.

En consecuencia, aunque el bouquet de un vino depende de los principios aromáticos de la uva y de los ésteres, aldhidos, áci-

dos y alcoholes elaborados en el proceso fermentativo, con todo, cada levadura, por una actividad que le es propia, aporta un aroma característico.

No siempre existe una proporción entre la cantidad de ésteres formados y la de ácidos y de alcoholes presentes; algunos ésteres son producidos directamente por la levadura. Por lo tanto será posible con un mismo mosto obtener, hasta cierto límite, productos distintos, por la acción de diversas levaduras.

Pero es evidente que será imposible modificar fundamentalmente el aroma de vinos elaborados con uvas Moscatel, Barbera, Refosco e híbridos Americanos (Filadelfia), pues las sustancias odorantes de las mismas son extraordinariamente penetrantes y aunque en parte se destruyen durante la fermentación, pasan en cantidad al vino; el débil aroma aportado por la levadura no influirá mayormente en el bouquet definitivo.

Tampoco debe olvidarse que el añejamiento trae consigo una mejora en las características organolépticas del vino, proceso lento de esterificación y oxidación que se ha intentado acelerar por ozonización, por conservación en recipientes porosos de madera, etc.

Empleando un sólo tipo de levadura se obtienen vinos con bouquet muy simple e incompleto; de aquí la conveniencia de hacer intervenir en la fermentación varios tipos diferentes.

Hemos comprobado en el curso de nuestras experiencias que las levaduras del tipo *intermedius* (cultivos: 71-75-95-97-102-103) comunican al vino un bouquet pronunciado; muy característico que lo distingue perfectamente del elaborado con otros tipos de levaduras. Algunas cepas del tipo *ellipsoideus* (cultivos: 34-45-49-52-81-83) determinan un aroma suave pero menos pronunciado.

Asociando varias especies de levaduras hemos conseguido vinos

de sabor más completo y agradable que en el caso de vinificar con un sólo tipo de levadura.

6.- Sedimentación y clarificación.

Una de las cualidades apreciadas en los vinos es su brillantez y transparencia cristalina; un vino no bien clarificado pierde mucho de su valor y no puede tener aceptación en el comercio.

Es indispensable en toda vinificación racional preparar un pie de cuba con levaduras seleccionadas que naturalmente clarifican bien y forman un depósito compacto y de rápida sedimentación.

Entre las especies de levaduras aisladas y estudiadas en este trabajo, encontramos las del tipo pseudosaccharomyces de poco rendimiento alcohólico que comunican al vino una turbidez persistente y uniforme; durante su actividad la sedimentación es muy lenta y el depósito formado no es compacto, dispersándose fácilmente por agitación.

Otro tanto puede decirse de las levaduras del tipo mycoderma; éstas originan además un velo grueso y opaco que desprendiéndose de la superficie cae en copos al fondo del recipiente con el consiguiente enturbiamiento del líquido.

Las levaduras del tipo torula de mayor rendimiento alcohólico que las anteriores, sin embargo no fermentan totalmente el mosto, conservando éste un sabor azucarado empalagoso; son levaduras de sedimentación y clarificación defectuosa.

Las levaduras del tipo ellipsoideus, al terminar la fermentación tumultuosa dejan un depósito abundante, bien consistente que no se dispersa fácilmente por agitación pero sí se eleva en forma de nubarrones que caen luego clarificando rápidamente al líquido.

Las levaduras del tipo intermedius, clarifican notablemente

al líquido, pero el depósito formado durante el proceso fermentativo no es compacto y se dispersa fácilmente enturbiando la masa líquida.

En consecuencia las levaduras del tipo ellipsoideus son las más indicadas para preparar el pié de cuba y lograr por su especial actividad una excelente sedimentación y clarificación.

VIII CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS ESTUDIADAS

1.- Sistemática de las levaduras

En la clasificación de las levaduras aisladas, hemos seguido las nuevas sistemáticas de Stelling-Dekker y de Lodder, autores de indiscutible autoridad, quienes en trabajos monográficos especiales han recopilado, adaptado o modificado en parte, todos los estudios realizados hasta hoy sobre el tema.

Ya sea con métodos propios, ya modificando levemente los métodos clásicos, han dado un carácter más racional a la sistemática de las levaduras.

Haremos un breve resumen de la clasificación publicada por los mencionados autores.

Stelling-Dekker reúne las levaduras esporuladas en la familia de las "Endomycetaceae", con los caracteres siguientes: son levadura que forman micelio, pseudomicelio, oidios o conidios, presentándose juntos o separados; se multiplican por división o por brotación; los ascos se originan partenogenéticamente o después de una copulación iso o heterogámica; las ascosporos son de forma redonda, hemiesférica, triangular, falciforme o en forma de husos, de superficie lisa rugosa o rodeada por un anillo; a esta familia pertenecen las especies oxidantes y que producen fermentación alcohólica.

A su vez el autor divide a la familia de las Endomycetaceae en 4 subfamilias:

A.- Eremascoideae; células que crecen solo por micelio; se multiplican por división; esporulan después de una copulación isogámica; los ascos poseen de 4 á 8 ascosporos en forma de galerita; comprende el único género.....1 Eremascus-Eidam.

B.- Endomycoideae; levaduras que forman micelio con conidios o solo oidios; se multiplican por división; esporulan, unas después de copulación iso o heterogámica, otras partenogénicamente; comprende dos géneros:

a. Levaduras que forman micelio y oidios; esporulan previa copulación heterogámica o partenogénicamente.....2 Endomyces-Reess

b. No forman micelio pero sí oidios; esporulan previa copulación isogámica.....3 Schizosaccharomyces-Lindner

C.- Saccharomycoideae; células que crecen por medio de micelio con conidios o por sola brotación; se multiplican por división o brotación bipolar; esporulan previa copulación iso o heterogámica, o partenogénicamente; forma tres tribus:

I. Endomycopseae; las células crecen por medio de micelio con conidios; se multiplican por división y por brotación; las esporas se forman después de una copulación isogámica o partenogénicamente; comprende un único género de células que crecen por medio de micelio con conidios y a veces oidios; los ascosporos se forman previa copulación isogámica o partenogénicamente; las esporas son de forma hemiesférica, oval o falciforme de superficie lisa, rugosa o rodeados por un anillo; género.....4 Endomycopsis-Dekker

II. Saccharomyceteae; levaduras que crecen sin micelio; se multiplican por brotación, a veces producen pseudomicelio; esporulan parte-

nogenéticamente o previa copulación iso o heterogámica; esta tribu comprende seis géneros:

1) Levaduras de forma redonda o alargada; a veces producen pseudomicelio; esporulan partenogénicamente o previa copulación isogámica.
.....5 Saccharomyces (Meyen) Reess

A su vez este género comprende dos subgéneros:

- a. Células que esporulan partenogénicamente...Saccharomyces s.s.
- b. Células que esporulan partenogénicamente y por copulación iso o heterogámica.....Zigosaccharomyces

2) Levaduras redondas que esporulan, habiendo vestigios de copulación; las esporas son de superficie lisa.....6 Torulospira-Lindner.

3) Levaduras ovales y alargadas con formación de pseudomicelio; esporulan partenogénicamente o previa copulación iso o heterogámica; las esporas son hemiesféricas, irregulares y angulosas o en forma de galerita; de fermentación débil o nula; no asimilan nitratos.....
.....7 Pichia-Hansen

Comprende dos subgéneros:

- a. Levaduras de esporulación partenogénica.....Pichia s.s.
- b. Levaduras de esporulación partenogénica o copulación iso o heterogámica.....Zigopichia

4) Levaduras ovales o alargadas con formación de pseudomicelio; esporulan partenogénicamente; esporas en forma de galeritas, ovales y achatadas o en forma de Saturno con línea saliente; fermentan energicamente y asimilan nitratos.....8 Hansenula-Sydow.

5) Levaduras en general redondas, también ovales; a veces producen pseudomicelio; esporulan por copulación isogámica pero más frecuentemente heterogámica; las esporas son de superficie rugosa.....
.....9 Debaryomyces-Klöcker.

6) Levaduras ovales; con vestigios de copulación; esporas redondas, de superficie rugosa con un anillo saliente.....

.....10 Schwanniomyces-Klöcker.

III Nadsoniae; levaduras que a veces forman pseudomicelio; se multiplican por brotación bipolar con base más o menos ancha; esporulan partenogénicamente o previa copulación heterogámica; esta tribu comprende tres géneros:

1) Levaduras en forma de limón; esporulan partenogénicamente; esporas redondas, que copulan al germinar...11 Saccharomyces-Hansen.

2) Levaduras en forma de limón; esporulan partenogénicamente; esporas redondas, generalmente en forma de galeritas.....

.....12 Hnseniospora-Zikes

3) Levaduras de forma ovalada o de limón; esporulan después de la copulación de una célula madre con su brote; de la cigota resulta un segundo brote del que se forma luego el asco, conteniendo una ascosporo; esporas redondas y de superficie rugosa.....

.....13 Nadsonia-Sydow.

D.- Nematosporoideae; levaduras con varios brotes; producen micelio esporulan partenogénicamente o previa copulación isogámica; esporas finas y alargadas o en forma de hoz con una prolongación filiforme; comprende tres géneros:

1) Levaduras ovales; esporulan partenogénicamente; esporas largas y finas; una por cada asco.....14 Monosporella-Keilin.

2) Levaduras ovales, irregulares y alargadas formando micelio; esporulan partenogénicamente; esporas alargadas con una prolongación filiforme; 2 á 8 por asco.....15 Nematospora-Peglion.

3) Levaduras redondas y ovales; esporulan previa copulación isogámica; esporas alargadas; 8 por asco.....16 Coccidiascus-Chatton.

Lodder divide a las levaduras anascosporógenas o no esporuladas en tres grandes familias:

A.- Nectaromycetaceae; comprende a las levaduras que forman conidios.

B.- Torulopsidaceae; levaduras que no forman conidios y no contienen pigmentos de naturaleza carotinoidea; comprende dos subfamilias:

I. Torulopsoideae; levaduras que se multiplican por brotación, sin o solo con pseudomicelio rudimentario, pero no producen aparato esporífero.

Incluye el autor en esta subfamilia los género encontrados por Cifferri y Redaelli en 1929 y 1930, y los géneros *Trigonopsis*, *Mycoderma* Persoon, *Klockera*, *Eutorulopsis* y *Torulopsis*.

II. Mycotorulodeae; levaduras que forman un pseudomicelio y poseen un aparato esporífero

C.- Rhodotorulaceae; organismos que se multiplican por brotación; elaboran un pigmento rojo o amarillo de naturaleza carotinoidea (diferencia con la subfamilia *Torulopsidaceae*); no forman blastosporos; no fermentan o solo fermentan débilmente hidratos de carbono.

La monografía de Lodder solo contiene la descripción de las especies de la subfamilia *Torulopsoideae* (= *Torulopsidaeae* de Cifferri y Redaelli) y de la familia *Rhodotorulaceae*.

Finalmente Cifferri y Redaelli en el año 1930-1931 y 1935 (41) (42) (43) describen diversas especies de la familia *Torulopsidaceae* incluyendo representantes de especies de la subfamilia *Mycotoruleae* (= *Mycotorulodeae* Lodder).

2.- Descripción de las especies estudiadas.

Establecidas pues las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras y siguiendo la sistemática de los autores mencionados en el párrafo anterior, las hemos agrupado en tres grandes familias:

1a. Endomycetaceae, Stelling-Dekker (=Saccharomycetaceae, Guillermond) que comprende a las levaduras esporuladas.

Las ^{no} esporuladas comprenden dos familias:

2a. Torulopsidaceae, Lodder

3a. Rhodotorulaceae, Lodder

la Familia: Endomycetaceae

Estas levaduras no forman micelio ni pseudomicelio, conidios ni oidios; se multiplican por brotación; forman ascos esféricos partenogenéticamente; de fermentación muy activa. Las levaduras vínicas aisladas correspondientes a esta familia podemos incluirlas en la subfamilia de las Saccharomycoidae que crecen por medio de micelio o por sola brotación; se multiplican por división o por brotación bipolar; esporulan previa copulación iso o heterogámica o partenogenéticamente; tribu, Saccharomycetae, levaduras que crecen sin micelio; se multiplican por división o por brotación; las esporas se forman después de una copulación isogámica o partenogenéticamente; género, Saccharomyces, levaduras de forma redonda, oval o alargada; a veces producen pseudomicelio; esporulan partenogenéticamente o previa copulación isogámica; subgénero, Saccharomyces s.s. (sensu stricto), levaduras que esporulan partenogenéticamente.

En este subgénero hemos podido diferenciar dos especies:

a) Saccharomyces cerevisiae, variedad ellipsoideus (Hansen), Stelling-Dekker.

Son células de forma oval o elíptica; se multiplican por

brotación; no utilizan nitratos como fuente de nitrógeno ni alcohol etílico como fuente de carbono; no licúan la gelatina; producen en los mostos fermentación muy activa; en agar de mosto de malta se desarrollan en estría muy elevada, brillante, húmeda, de consistencia cremosa y coloración blanquecina; la colonia gigante es elevada, con estrías radiales y pliegues concéntricos tenues; en bloque de yeso forman de dos a cuatro esporas pero con dificultad y solo después de 6 á 7 días; fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y débilmente rafinosa; no fermentan melibiosa; son levaduras de alta muy resistentes al alcohol y al SO₂.

Pertenece a esta especie las levaduras de los cultivos: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-24-25-26-31-33-34-45-47-48-49-50-51-52-53-54-55-56-57-58-59-60-61-62-63-66-67-68-72-79-81-82-83-95-111-113.

Stelling-Dekker sostiene que no existen diferencias fundamentales para separar la especie *S. ellipsoideus* de la especie *S. cerevisiae*; las variaciones son de orden puramente morfológico, por lo cual denomina a estas levaduras *S. cerevisiae*, variedad *ellipsoideus*.

Por nuestra parte en las cepas aisladas, encontramos preponderantemente las formas ovales del tipo *S. cerevisiae*, pero en ningún caso bajo la forma clásica de *S. cerevisiae*, descrita por los autores, formando cadenas de 2 ó 4 células; esta diferenciación morfológica nos ha inducido a incluirlas sin excepción en la especie *ellipsoideus*.

b) *Saccharomyces intermedius*, Hansen, (*S. pastorianus* II)

En esta especie predominan las formas elípticas o cilíndricas alargadas, mezcladas con ovales pequeñas; en agar de mosto de malta forman estría muy brillante y húmeda, de bordes lisos; en su comportamiento fisiológico son muy semejantes al *S. ellipsoideus*, diferenciándose en que esporula rápidamente a las 24 ó 48 horas,

predominando los ascos con tres y cuatro esporas; son de menor eficiencia fermentativa y menos resistentes al alcohol y al SO₂.

Hemos reunido en esta especie las levaduras de los cultivos: 64-71-75-94-102-103.

2a. Familia: Torulopsidaceae

Las levaduras no esporuladas, que se multiplican por brotación, no forman conidios y no contienen pigmentos carotinoideos, pertenecen a esta familia, a la cual Lodder subdivide en dos subfamilias: Torulopsoideae y Mycotoruloideae.

Las cepas aisladas por nosotros, pueden incluirse en la subfamilia Torulopsoideae por no formar pseudomicelio ni verdaderos blastosporos. Hemos diferenciado tres géneros:

1) Klockera-Janke; células en forma de limón, ovals o largas, solas o con brotes; después de tres días en mosto de malta, células del depósito en forma de limones o de salchichas; al fermentar dan una película tenue, anillo y depósito; licúan la gelatina y sólo fermentan glucosa. Las levaduras aisladas con estas características pertenecen a la especie;

Klockera apiculata-Janke (= Saccharomyces apiculatus-Reess; Pseudo-saccharomyces apiculatus-(Rees, Klöcker)).

Son células de forma característica de limón; se multiplican por brotación; no esporulan; en agar de mosto de malta forman estrías poco desarrolladas de color marrón; no utilizan nitratos como fuente de nitrógeno ni alcohol como fuente de carbono; licúan la gelatina; fermentan débilmente la glucosa con desarrollo de película superficial y anillo tardíamente; muy poco resistentes al alcohol y al SO₂; son malas clarificadoras. Pertenecen a esta especie las levaduras de los cultivos: 37-41-42-86-87-108.

2) Torulopsis-Berlese; organismos de forma redonda u ovales; se multiplican por brotación; no forman pseudomicelio ni blastosporos; de débil fermentación, producen en los mostos un velo mucoso o película, a veces anillo; hay especies que utilizan nitratos como fuente de nitrógeno, otras no; especies que licúan la gelatina; en agar de mosto de malta forman estría brillante, húmeda de consistencia pastosa, de superficie lisa; las colonias gigantes son poco desarrolladas sin estrías. Pertenecen a este género las levaduras de los cultivos: 20-21-22-23-27-28-29-38-65-69-70-73-76-77-78-88-90-91-93-98-109-112.

3) Mycoderma-Persoon, Leberle; células de forma variable, en cultivos viejos alargadas, redondas y ovales, grasosas, vacías casi transparentes, unidas por una base ancha y con frecuencia en cadenas; forman en agua de papas un micelio rudimentario y blastosporos poco desarrollados; desde el principio de la fermentación producen un velo seco, opaco, amarillento que luego se pliega; sólo fermentan glucosa y oxidan enérgicamente los ácidos orgánicos.

Las levaduras pertenecientes a este género las hemos incluido en la especie, Mycoderma vini-Desmazières (= Saccharomyces mycoderma-Reess); no asimilan nitratos; en medio con alcohol etílico como única fuente de carbono forman una película que trepa por las paredes del tubo y dan un depósito blanco; no licúan la gelatina; oxidan enérgicamente el alcohol a acético. Pertenecen a esta especie las levaduras de los cultivos: 16-17-18-19-32-36-40-65-89-92-96-99-100-105-106-107.

3a. Familia: Rhodotorulaceae

Comprende el único género, Rhodotorula-Harrison; organismos que se multiplican por brotación; elaboran un pigmento rojo o amarillo de naturaleza carotinoidea (diferencia con la familia de las Torulopsi-

daceae); no forman blastosporos ni ascos; no fermentan o débilmente hidratos de carbono.

Las levaduras de los cultivos 44 y 110 parecen pertenecer a la especie, Rhodotorula minuta-Saito, Harrison (= Torula minuta-Saito Torulopsis minuta-(Saito)-Cifferri y Redaelli); son células de forma elíptica, pequeñas; fermentan débilmente glucosa y sacarosa, formando anillo y depósito rojo a los 7 días; no licúan la gelatina; no utilizan nitratos como fuente de nitrógeno ni alcohol como fuente de carbono.

IX CONSIDERACIONES SOBRE EL ESTUDIO REALIZADO

Los elementos constituyentes del vino, aquellos que le comunican sus cualidades características, alcoholes, ácidos fijos y volátiles, glicerol, aldehidos etc., provienen de la acción de los microorganismos de las uvas sobre el mosto, proceso que se denomina fermentación.

De unas mismas uvas pueden aislarse razas de levaduras buenas fermentadoras, otras de poco rendimiento alcohólico, y muchas francamente nocivas porque aportan al vino aromas extraños, aumentan su acidez volátil disminuyendo la fija y comprometen su clarificación.

Por tanto es necesario conocer las características de los fermentos de la región y favorecer en la medida posible la acción de las unas e impedir la influencia perjudicial de las otras.

En muchos casos se ha pretendido substituir los fermentos naturales de las uvas por otros extranjeros de cualidades muy específicas, pero los resultados no han sido siempre satisfactorios en la industria de la vinificación.

La levadura no lo es todo en la vinificación; existen otros factores de primordial importancia que por desgracia han sido descuidados por los industriales cuyanos.

Ya Luis Casale en el "Anuario della Regia Stazione Enologica Sperimentale d' Asti" (1938), escribía a este respecto que el mosto por sus propiedades físicas y químicas, por sus relaciones con el ambiente y el cepaje del cual proviene, ejerce en el fermento, la misma función que el suelo y el clima en las plantas. Como hay climas y terrenos cuya naturaleza puede ser apta para una determinada planta y no para otras, así en los mostos hay factores

que pueden favorecer la actividad de una raza de levadura y perjudicar la acción de otras. Por eso sembrar buenos fermentos en un mosto cuyas propiedades no son propias a las necesidades de aquellas, no significa lograr un mejoramiento en la vinificación; en cambio esto puede conseguirse seleccionando las levaduras en el mismo mosto en que han de sembrarse. Existe pues una adaptación natural de los fermentos al medio en que viven.

Por otra parte una raza sola de levadura no es susceptible de dar a un vino todas las cualidades organolépticas que lo hacen agradable al paladar. Entre las especies de poco rendimiento alcohólico, hay razas que aportan al vino un aroma específico y que asociadas a las buenas fermentadoras contribuyen a la armonización del bouquet.

Se impone en consecuencia el estudio de los fermentos naturales de las uvas y de los mostos de cada zona agrícola para seleccionar luego las mejor adaptadas y las ^{ms} propias en la vinificación.

Esa ha sido la finalidad de este trabajo: aislar los fermentos de las uvas de la provincia vitícola por excelencia; estudiar su actividad e influencia en la vinificación; conocer algunas de sus características industriales y presentar así razas locales de relevantes cualidades, para usarse como pie de cuba en una vinificación racional.

Resulta ridícula la pretensión de obtener un vino tipo Bordeaux, Bourgogne, Sauternes, Champagne, etc. con levaduras propias de estas regiones sembrándolas en los mostos de Mendoza, ya que las cualidades del vino son fundamentalmente, como ya lo hemos indicado, función de las uvas, y estas del clima, de la constitución del terreno, de la irradiación solar, de la humedad, del riego, etc. Es necesario entonces preparar previamente la materia prima, es decir, cultivar el cepaje propio de los vinos que desean elaborarse.

Racionalizando la vinificación a base de levaduras aisladas

de los propios mostos, se lograrán vinos caracterizados, de alta graduación alcohólica, muy armónicas y constantes en sus cualidad organolépticas y de segura conservación.

En nuestro país no se ha practicado la vinificación en base a levaduras seleccionadas sino en casos aislados y con levaduras extranjeras; por eso los desengaños se contaron por los ensayos.

Por fermentación natural de los mostos de Mendoza, el tenor alcohólico alcanzado, oscila entre 12 y 14 % en volumen. Teniendo en cuenta que las levaduras nocivas utilizan el azúcar sin desdoblarse totalmente en CO_2 y alcohol, podemos concluir que existe en la región fermentos indígenas de buen rendimiento alcohólico y que si el producto no es constante esto se debe al predominio de una levadura sobre otra en las diversas vendimias.

Las experiencias realizadas por J. Ventre en 1904 evidencian el distinto consumo de azúcar para la producción de 1% de alcohol por los diversos tipos de levaduras; en igualdad de condiciones el *S. ellipsoideus* consume 17,5 gr., término medio de azúcar por grado de alcohol elaborado; el *pseudosaccharomyces*, 21 gr. y el *intermedius* 20 gr.

De aquí resulta que en la vinificación debe tenerse en cuenta esta acción fisiológica diferencial para favorecer por todos los medios el desarrollo del fermento *ellipsoideus*.

Es opinión corriente que el *pseudosaccharomyces* predomina naturalmente en las uvas y en los mostos al principio de la fermentación; es más prolífico, produce aromas desagradables en los vinos y mucha acidez volátil, y destruye algunos ácidos fijos como el málico y el tartárico ya de por sí escasos en las uvas de la región cuyana.

Martinard y Röhlíng, Muller y Thugaud han encontrado en la

levaduras del género pseudosaccharomyces propiedades capaces de perturbar y aún paralizar la acción del género *S. ellipsoideus*.

G. Magistocchi atribuye a esta acción nociva del pseudosaccharomyces la mala vinificación producida en Mendoza el año 1916; los vinos anormales, defectuosos y de difícil conservación fueron muchos.

En las vendimias del año 1937 y del 1938 he observado personalmente con ayuda del microscopio los mostos frescos del lagar en los primeros días de la fermentación, para constatar el hecho del predominio del pseudosaccharomyces, pero en la flora microbiana se descubre raramente la presencia de tal fermento. Además sometí en la selección de laboratorio, las muestras de uvas y de mostos a las mismas observaciones, llegando a idéntica conclusión. Finalmente, de las 100 y más cepas aisladas, solo 6 pertenecen a este género, todo lo cual nos autoriza a sostener que en las uvas de Mendoza, y aún en sus mostos, no predomina naturalmente, y que si en algunos años pudo atribuirse a su acción preponderante el desarrollo defectuoso de la fermentación, no hay datos y observaciones que permitan sostener esa afirmación; a mi entender se trata de una deducción analógica con los casos similares ocurridos en Europa. Con todo, esta constatación, no excluye la posibilidad de que en determinados años, y debido a condiciones excepcionales del clima pueda ser verosímil, aunque eso no sea lo ordinario.

Una vinificación a base de pié de cuba con héces de vinos aunque óptimos es improcedente no obstante el acostumbramiento al SO_2 de la flora microbiana de esas berras; ya que existen razas del tipo torula y del tipo mycoderma muy resistentes, y capaces de provocar la fermentación hasta en mostos sulfitados con dosis paralizantes para algunas razas del tipo ellipsoideus, según hemos podido

constatarlo en las experiencias realizadas (véase cuadro)

Indiscutiblemente el pié de cuba debe prepararse a base de fermentos seleccionados, bien conocidos desde el punto de vista industrial, y mejor aún con la siembra de varias cepas que se complementan en sus funciones por el aporte específico del sabor, aroma, alcohol, etc.

Únicamente con estas precauciones podrá ofrecer resultados satisfactorios el sistema de pié de cuba en la vinificación; de otro modo habrá siempre sorpresas imprevistas y desalentadoras, como ya ha sucedido repetidas veces, engendrando la desconfianza entre los vinificadores y el convencimiento de la inutilidad de un método racional, tan ventajosamente empleado en países europeos.

Otro tanto debemos decir del sistema de vinificación llamado "super cuatro".

Si bien es cierto que los fermentos del tipo pseudosaccharomyces en mosto con 4 % de alcohol cesan en su actividad, también lo es que algunas razas del tipo mycoderma y del tipo torula, no son paralizadas y desarrollan velo o película, acetificando o modificando las cualidades de los vinos aún en mostos cuyo grado inicial de alcohol es del 11 %,

El sistema de "super cuatro" es defectuoso; la selección que determina no alcanza a las levaduras más aptas y convenientes.

En la vendimia de 1938 hicimos algunos ensayos de fermentación con levaduras aisladas, reconocidas ya como buenas fermentadoras y acostumbradas al SO₂. Para ello procedimos en la forma siguiente: esterilizamos en frascos grandes, 2 litros de mosto fresco, disolviendo en él una cantidad de metabisulfito correspondiente a 5 gr/Hl. de SO₂, y sembramos luego la levadura tomada de un culti-

vo sobre medio sólido, incubando a 28°. Ordinariamente a las 24 horas se inicia la fermentación; añadimos nuevas cantidades de metabisulfito para detener la fermentación que se reinicia al cabo de algunas horas, y repetimos la operación por 4 ó 5 días para aumentar la resistencia de la levadura a dosis elevadas del antiséptico; sembramos luego esta levadura activa en unos 100 litros de mosto fresco sulfitado; la fermentación tumultuosa era a las 24 horas muy enérgica, de menor duración que en los mostos testigos no sembrados, de clarificación más rápida; los vinos obtenidos eran de mayor graduación alcohólica y de bouquet más específico y pronunciado.

En el laboratorio hemos ensayado ~~las mismas~~ la influencia de las levaduras del tipo pseudosaccharomyces, del tipo torula y del tipo intermedius, asociadas a las del tipo ellipsoideus, sobre la marcha de la fermentación y sobre las cualidades del vino.

Realizada esta experiencia en muy pequeña escala y con mosto de pasas de ~~una~~ uva no creemos pueda generalizarse a la gran industria los resultados obtenidos.

Es nuestro propósito realizar este ensayo de fermentación, asociando varios tipos de levaduras, con cantidades apreciables de mosto fresco, para poder presentar a la industria datos experimentales que resulten de utilidad en el proceso de vinificación.

X. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- La microflora de las uvas y de los mostos de la provincia de Mendoza estudiadas en este trabajo se componen de formas correspondientes a diversas especies, unas de apreciable valor en la vinificación, otras de poca efectividad fermentativa, por sus funciones pueden aportar a los vinos, cualidades organolépticas específicas, y por último algunas especies netamente perjudiciales.
- 2.- Existen levaduras del tipo *Saccharomyces ellipsoideus* muy bien adaptadas al medio natural y de excelentes características para una vinificación racional.
- 3.- La mayor parte de las levaduras de la especie nombrada permiten iniciar la fermentación con mostos muy concentrados hasta de 30 y 35 grados Bé. obteniéndose vinos con 15% de alcohol, aunque estos vinos conservan un sabor algo azucarado por el desdoblamiento incompleto del azúcar.
- 4.- Los cultivos: 2-3-6-7-8-9-10-11-12-56-111-113, que corresponden a la especie *Saccharomyces ellipsoideus* son las más aconsejables en la vinificación por la velocidad de fermentación, por el alto rendimiento de alcohol, por su poder clarificante al formar un depósito compacto que favorece la decantación y el trasiego.
- 5.- Los cultivos: 1-4-5-13-14-24-25-31-33-34-43-47-48-49-50-51-52-53-54-55-57-58-59-61-62-63-66-67-68-72-79-81-82-83, de la misma especie, son de fermentación más lenta, pero al término de un mes hemos comprobado que el porcentaje de alcohol es tan elevado como en el caso anterior.
- 6.- Algunas cepas de levaduras del tipo *mycoderma*, *torula* e *intermedius* son resistentes al SO_2 ; por lo cual es necesario acostumbrar las levaduras óptimas

duras óptimas a dosis elevadas de este antiséptico si se desea obtener un pié de cuba eficiente.

7.- Las levaduras del tipo mycoderma son en general resistentes al alcohol (a más de 11 %), al que oxidan enérgicamente a ácido acético; en consecuencia los vinos deben elaborarse con alta graduación alcohólica para no comprometer su conservación.

8.- El método de vinificación llamado "super cuatro" no parece muy racional, puesto que las levaduras del tipo intermedius, torula y mycoderma son activas en mostos de esa concentración alcohólica.

XIX RESUMEN

El presente estudio sobre "Selección de las levaduras vínicas de Mendoza" está dividido en XIII capítulos.

En el primero se resumen los trabajos ya realizados en el país. Uno del Dr. Luis M. Lejeune, sobre el tema "Estudio de las levaduras de Mendoza", y otro del Ing. Agr. Julio A. Paso, titulado "Contribución al estudio de las levaduras del Alto Valle del Río Negro".

Exponemos en el segundo la finalidad de nuestro trabajo consistente en aislar y clasificar las levaduras vínicas de las uvas de Mendoza, y en determinar sus principales características industriales

En el tercero detallamos la elección de uvas, mostos y borras necesarios para el aislamiento, las precauciones requeridas para ello y la traslación de las mismas al Instituto Bacteriológico de Buenos Aires donde se han cumplido todas estas experiencias.

Figuran en el cuarto y quinto capítulos, los medios de cultivos empleados, así como los métodos adoptados para la investigación.

En el sexto entramos a exponer los resultados conseguidos; figuran en él las descripciones de los cultivos, el aislamiento monocigotético y las características morfológicas y fisiológicas.

En el séptimo se describen las características de importancia industrial.

Ya en el octavo y después de dar un somero resumen de la sistemática de Stelling-Dekker sobre las levaduras esporuladas y de la modernísima de Lodder sobre las no esporuladas, incluimos en ellas las levaduras aisladas por nosotros.

Deducimos luego en el noveno las consideraciones a que nos llevan los estudios presentes, concretándolas en las conclusiones del décimo capítulo.

En el capítulo once se da un resumen del trabajo completo.

Presenta el capítulo doce la bibliografía del país y la extranjera sobre el tema, mientras el trece y último contiene las ilustraciones, fotografías y microfotografías de los cultivos en los diversos medios.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Annales de Chimie T. XXVI p. 247
- (2) Annales de Chimie et de Physique 2e. série T.LXVIII
- (3) Schwann, Poggend. Annales 1837 T.XLI p. 184
- (4) Journ. fur prakf. Chem. XI p. 385
- (5) Journ. de pharm. T. XXIV
- (6) Compte rendu de l'Academie IV p. 369
- (7) Poggend. Annales LV p. 225
- (8) Atenza M. Vinificación en las provincias de Cuyo, Mendoza y San Juan. 1938
- (9) Beauverie L. Quelques propriétés des ascospores de levures- Technique pour leur différenciation-Com.Rend.Soc.Biol.80.1917
- (10) Casale L. Annuario della Regia Stazione Enologica Sperimentale di Asti- Serie II, 1935-1937
- (11) Ehrlich Sur les conditions de formation des alcools dans la fermentation alcoolique, Journal de pharmacie et de chimie 1907
- (12) Euler H. and Lindner P. Chemie der hefe unter der alkoholischen Gärung, Leipzig 1915
- (13) Flamand J. et Ketelbant E. Chimie analytique appliquée- Malterie, Brasserie, 1938
- (14) Guilliermond A. Clef dichotomique pour la détermination des levures, 1928
- (15) Guilliermond A. Les levures
- (16) Guilliermond-Tanner The yeasts, 1919
- (17) Henneberg W. Handbuch der Gärungs-bakteriologie 2 ed. 2 vol.P. Parey, Berlin, 1924
- (18) Hugo González Toriño Selección de levaduras vínicas puras especializadas en la producción de altas graduaciones alcohólicas

cas- Revista de la F. de Agronomía de Montevideo N° 17,
p. 57-145, 1939

(19) Kayser Les levures

(20) Kluyver A.J. The chemical activities of Micro-organisms, 1931

(21) Lejeune L.M. Estudio de las levaduras de Mendoza- Anales de la
Sociedad Científica Argentina-Tesis- T.LXXXIX p.93, 1915

(22) Lodder J. Die Hefesammlung des "Centralbureau voor Schimmelcultu-
res. Beitrage zu einer monographie der Hefearten. II Teil
Die Anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte Kon Akd.Wet.Amster-
dam (Tweide Sectie), 32: 1-256, 1934

(23) Magistocchi G. Tratado de Enología, 1934

(24) Mensio C., Forti C. Enologia- La fermentazione alcolica- La chimi-
ca e la tecnica dell'Enologia, 1928

(25) Pacottet Vinificación en la provincia de Mendoza, 1911

(26) Pacottet Vinificación

(27) Paso J.A. Contribución al estudio de las levaduras vínicas del
Alto Valle del Río Negro- Tesis, 1929

(28) Pasteur Etudes sur le vin, Paris, 1866

(29) Pasteur, Mémoire sur la fermentation alcoolique- Ann. de Chim. et
de phys. LVIII, 1860

(30) Rosenstiehl, Cépages, levures et bouquet des vins- Revue de vini-
culture, Paris, 1908

(31) Schützenberger P. Les fermentations, 1875

(32) Sclator S. Jour. Che. Soc. 89, 1906, 128

(33) Soriano S. Estudio microbiológico del proceso de fermentación de
la chicha- Revista del Instituto Bacteriológico, vol.VIII
Octubre 1938-N° 3- p.231 y sig.

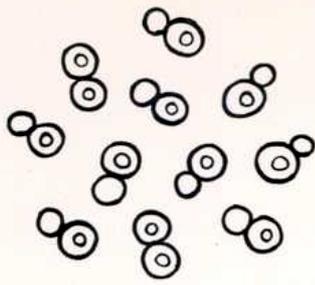
(34) Stelling-Dekker ,N.1931. Die sporogenen Hefen. Kon. Akad. Wet.
Amsterdam.

- (35) **Ventre J.** *Traité de vinification pratique et rationnelle*, vol. I, ~~Le vin~~ **Le vin, sa composition, ses maladies, sa conservation**, 1929
- (36) **Ventre J.** *Les levures en vinification*- Montpellier, 1911
- (37) **Fortner J.** 1929. Die **Mikroskopie** der Aeroben und Anaeroben Oberflächekolonien; auf hängenden Agar. *Zentralbl. f. Bakt. I* Abt.Orig. 115:96.
- (38) **Hunt C.A., and Rettger L.** 1930. A comparative study of members of the **Lactobacilli** of Soil and Grain. *Journ.Bact.*20;61-84
- (39) **Kulp and Rettger**,1924. Comparative study of **Lactobacillus acidophilus** and **Lactobacillus bulgaricus**. *Jour.Bact.* 9;357
- (40) **Society of American Bacteriologists.** Committee on Bacteriological technic. 1923. *Manual of methods for pure culture study of bacteria.* Geneva, New-York.
- (41) **Cifferri R.** Contribuzione alla sistematica delle **Torulopsidaceae** 1930 *Archiv. f. Protistenkunde* 71: 405-452
- (42) **Cifferri R.** Contribuzione alla sistematica delle **Torulipsidaceae** 1931 *Microbiologia* 35: 140:146
- (43) **Cifferri R. y Redaelli P.** 1935- Contribuzione alla sistematica delle **Torulopsidaceae** **IV-XXXIII**: Chiavi analitiche e caratteristiche dei generi **Mycotoruleae** 1 ap. 67-71 *Archiv. f. Mikrobiologie* 6: 9-72
- (44) **Soriano S.** 1938-Folia Biológica N^o 83-84,Febrero y Marzo- Método para la obtención y observación de filamentos en las levaduras no esporuladas.
- (45) **Hansen E. Chr.-Compt. Rend. Trab. Lab. Carlsberg. T.2**,p. 13 (188) diese Abhandlung auch in:*Ges. theor. Abhandl.ü. Gärungsorganismen* 1911,p.125;citado por **Stelling-Dekker.**

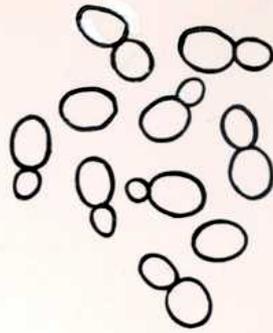
- (46) Gorodkova A.A. 1908, Bull. Jard. Imp. Bot. St. Petersbourg T.8,
p.165; citado por Stelling-Dekker.
- (47) Talice R.V., Sur la fermentation des monilia, Ann. Parasitologie
8: 394-410.

Pro. Pedro Zahrt

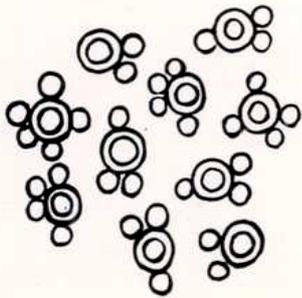
1



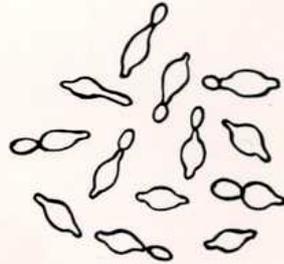
2



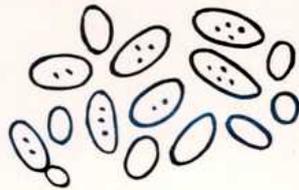
3



4



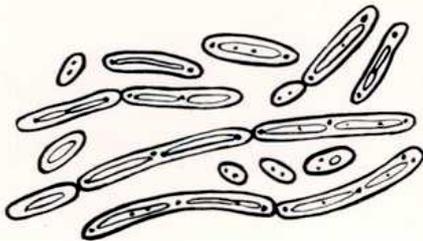
5



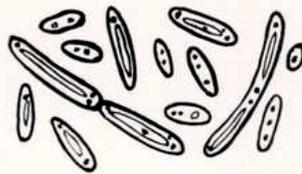
6



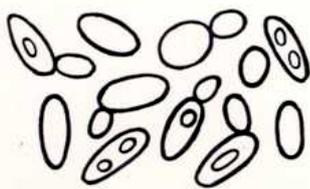
7



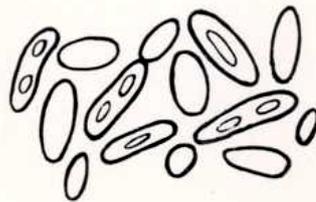
8



9



10

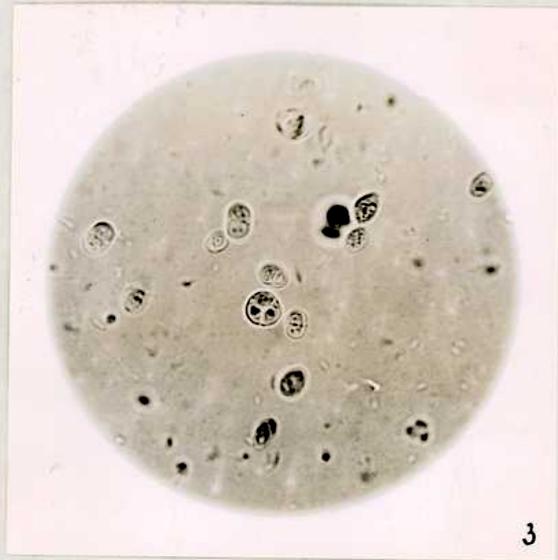
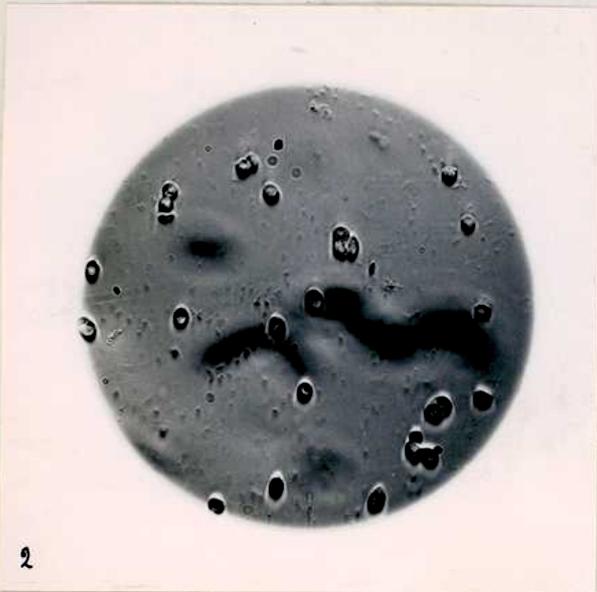


Formas típicas de levaduras: 1, tipo torula; 2, tipo ellipsoideus; 3, tipo torula; 4, *T. Pseudosaccharomyces*; 5, *t. ellipsoideus* (en mosto); 6, *t. el anterior* en agar; 7, *t. mycoderma*; 8, *el mismo* (en agar); 9, *t. intermedius* (en mosto); 10, *el mismo* en agar.

ESPORAS

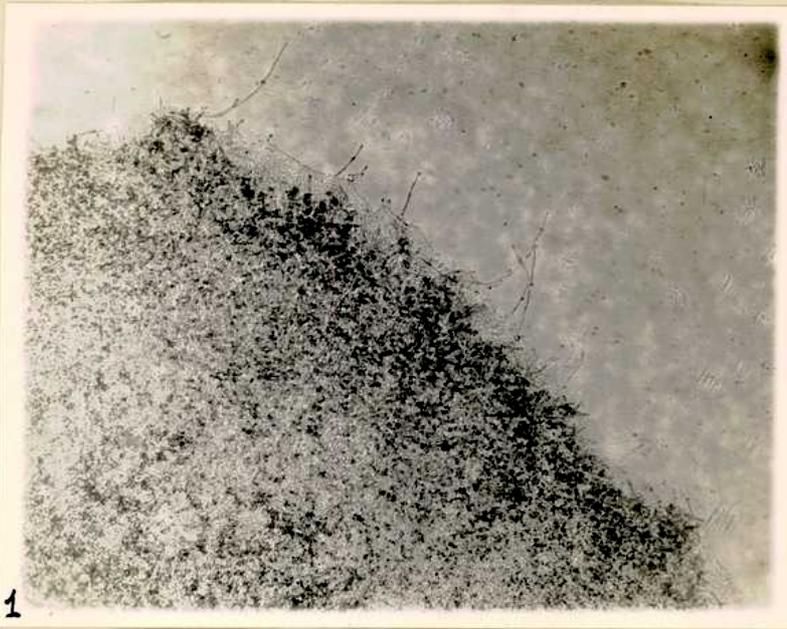


1, del tipo intermedius-- aumento, x 700



2, del tipo intermedius; 3, del tipo ellipsoideus- aumento, x 700

MICELIO FILAMENTOSO



1

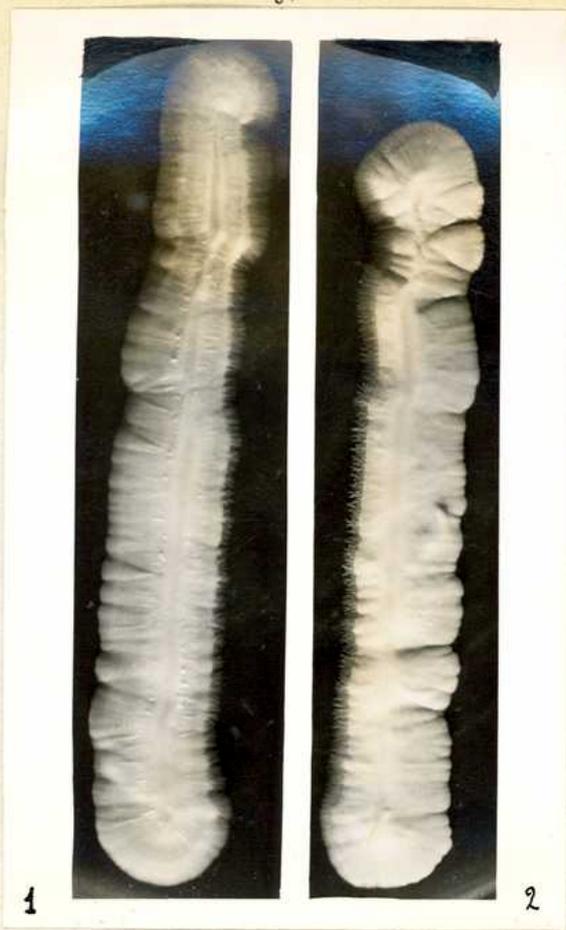
1, del tipo mycoderma (sobre película de agar)- aumento, x 100



2

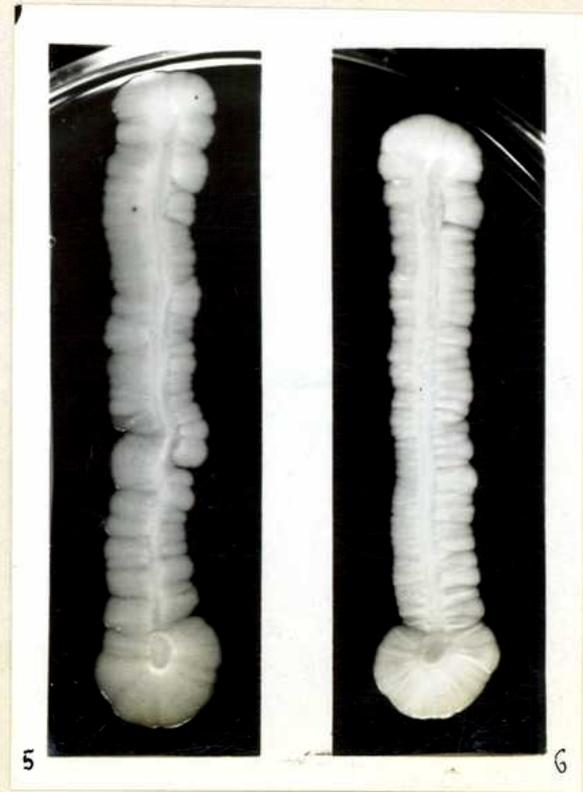


2, del mismo tipo 1 (sobre agar de agua de papas); 3, de tipo mycoderma- aumento, x 300



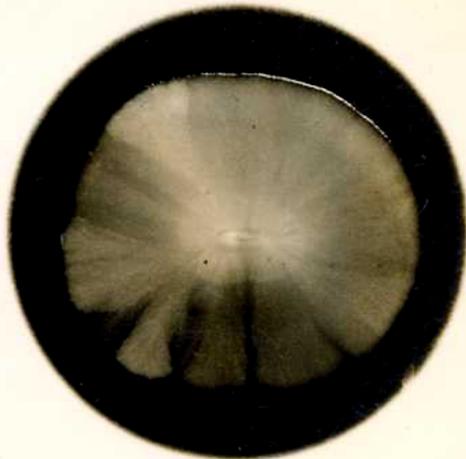
CULTIVOS en estria sobre
agar de mosto de malta

1 y 2 del tipo torula (cultivos de 1 mes)- tamaño algo mayor que el natural.



3, tipo. Pseudosaccharomyces; 4, t. torula; 5, t. ellipsoideus; 6, t. intermedius- tamaño natural.

COLONIAS GIGANTES



1

2



3

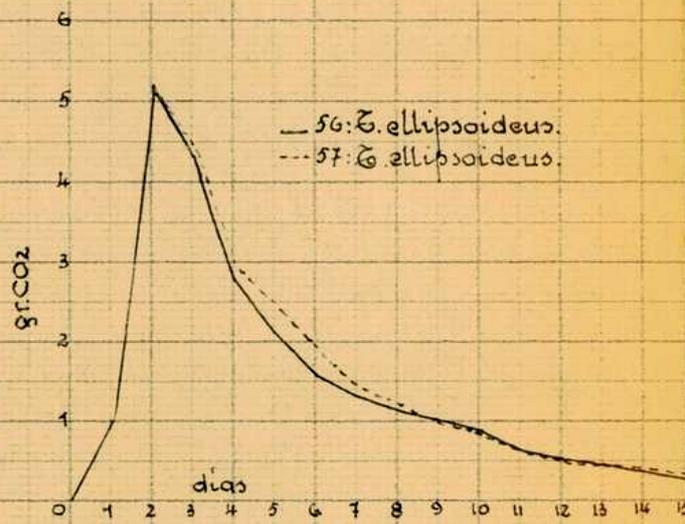
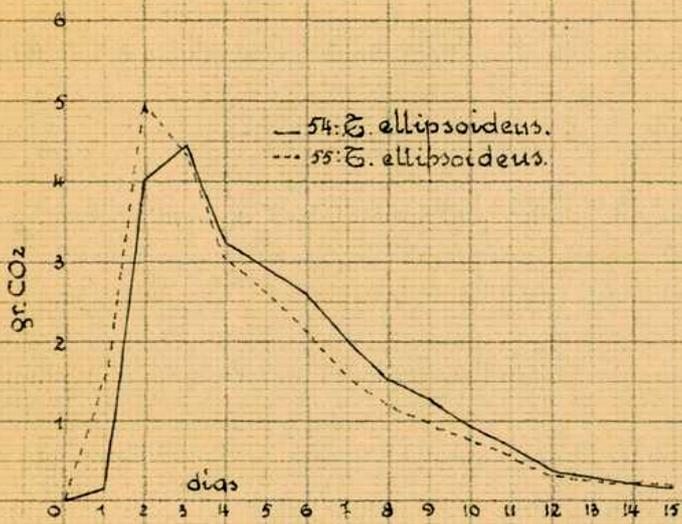
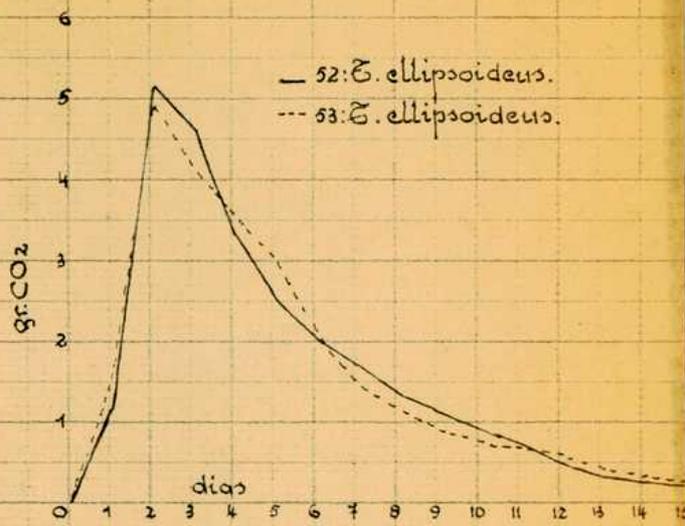
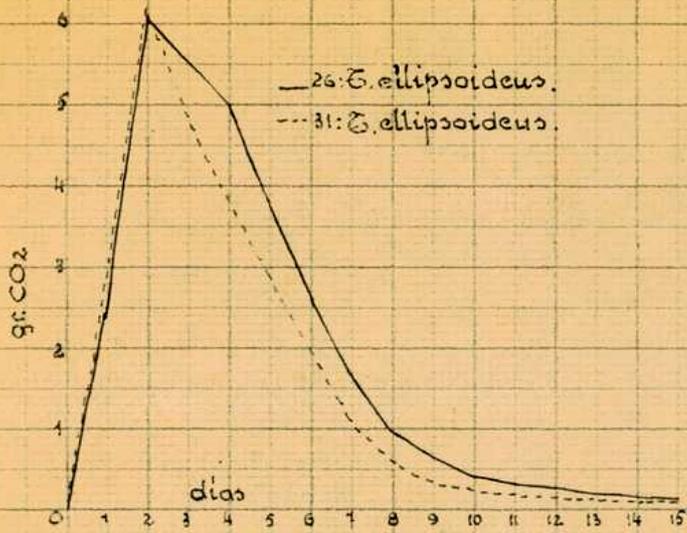


4

1, del tipo ellipsoideus; 2 y 3, del tipo Pseudosaccharomyces;
4, del tipo mycoderma- tamaño natural.



Aparato usado en la determinación del poder fermentativo.



CURVAS DE FERMENTACION

