

## Tesis de Posgrado

# Tolerancia alcohólica de levaduras

Bronzini, Ricardo Luis

1957

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Bronzini, Ricardo Luis. (1957). Tolerancia alcohólica de levaduras. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0936\\_Bronzini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0936_Bronzini.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bronzini, Ricardo Luis. "Tolerancia alcohólica de levaduras". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0936\\_Bronzini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0936_Bronzini.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

RESUMEN DEL TRABAJO DE TESIS  
"TOLERANCIA ALCOHOLICA DE LEVADURAS"

Guillermont y Tanner en 1920, estudiando la actividad de distintas levaduras, demostraron que el poder fermentativo puede ser muy variable.-

La posibilidad de que estas discrepancias de poder fermentativo fueran debidas a diferencias en su tolerancia alcohólica fué sugerida por primera vez por W. Gray en 1941.-

En esa oportunidad demostró que una levadura varia en su capacidad fermentativa segun cual sea la concentración de alcohol en el medio.-

Partiendo de un número relativamente grande de especies distintas, y simulando condiciones similares a las que existen en una fermentación normal, pudo establecer que en general el porcentaje de glucosa utilizado se halla en relación inversa con la concentración alcohólica.-

En base a estos trabajos, W. Gray, denominó arbitrariamente tolerancia alcohólica para una determinada levadura:

"Al máximo porcentaje de alcohol que en estas condiciones experimentales permite fermentar glucosa en una proporción no inferior en uno por ciento a la que acusa un ensayo control realizado sin alcohol".-

De acuerdo con esta definición clasificó a las levaduras por él estudiadas en cinco grupos, a saber:

- 1er. Grupo: Levaduras de muy baja tolerancia alcohólica, comprendida entre 4,76 y 4,82 %.-
- 2do. Grupo: Levaduras de tolerancia alcohólica baja; entre 5,71 y 5,79 %.-

Res. de Tesis: 830

# F E N A

3er. Grupo: Levaduras de tolerancia alcohólica comprendida entre 6,66 a 7,72 %.-

4to. Grupo: Levaduras de tolerancia alcohólica media; entre 8,56 y 9,52.-

5to. Grupo: Levaduras de tolerancia alcohólica alta; comprendida entre 10,47 y 10,61 %.-

El presente trabajo de tesis tiene por objeto estudiar la tolerancia alcohólica de las levaduras observando la influencia que sobre ella podría ejercer la variación de las distintas condiciones experimentales (temperatura, tiempo de incubación, concentración de azúcar en el medio, etc); y posteriormente irradiarlas con luz ultravioleta para obtener posibles mutantes de mayor tolerancia alcohólica.-

Se ensayó con distintos tipos de levaduras, las que fueron suministradas por instituciones del país y firmas industriales.-La mayor parte provino del Instituto de Microbiología Agrícola.-

El medio de cultivo utilizado fué el propuesto por W. Gray en el trabajo del año 1946.- Se caracteriza por la ausencia de material en suspensión, porque es fácil y rápido de preparar, y tiene composición definida siendo ésta la siguiente:

Extracto de levadura Difco.....	0,7 %
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0,5 %
Glucosa.....	1,25 %
Agua c. s. p.....	100 ml
pH.....	4,3 a 4,6

En la imposibilidad de conseguir extracto de levadura Difco se usó extracto de levadura sin sal, obteniéndose los mismos resultados.-

Se asignó un valor numérico a cada cepa para indicar su respectiva tolerancia alcohólica, valor que se estableció realizando las fermentaciones en frascos erlenmeyera de 50 ml; éstos contenían un volumen final

# NOTA

de 25 ml (teniendo en cuenta el medio de cultivo, suspensión de levadura y concentración alcohólica).-

Se colocaron primero 20 ml de medio de cultivo esteril, el agregado de alcohol (95,0 a 96,0 %) se hizo en cantidades crecientes, de 4,75 a 11,5 % a los sucesivos frascos, en forma tal que lo único que variaba era la concentración del mismo; reservándose un frasco control sin alcohol.

Se completó el volumen a 24,5 ml con agua esteril.-

La inoculación se preparó a partir de colonias de 72 horas de desarrollo en agar estría, suspendidas y lavadas con agua destilada esteril, centrifugadas y llevadas a una concentración de 0,25 g/ml.- Se sembró 0,5 ml en cada frasco, siendo la concentración final de levadura en él de 0,005 g/ml y el volumen final de 25 ml.-

Se incubó durante 24 horas a 30° C.- Al finalizar el periodo de incubación se determinó el azúcar residual por el método de Stiles, Peterson y Fred (1926).-

Una vez estudiados los distintos métodos para aumentar la tolerancia alcohólica, se trató de irradiar las cepas de levaduras con luz ultravioleta con el objeto de obtener posibles mutantes de mayor tolerancia.-

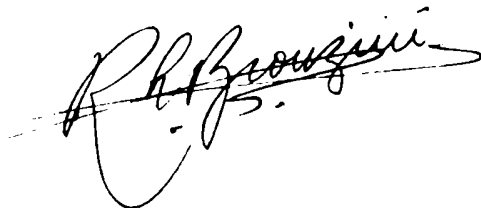
Se utilizó una lámpara Dr. Ing F. Müller Quarzlampe Fabrik.- Essen W. 4 220.- Casa Otto Hess.- Corriente de encendido 3,5 Amp. Durante su funcionamiento consume 1,5 a 1,8 Amp.-

La irradiación se realizó sobre cultivos sembrados en cajas de Petri por el método de estrías sobre superficie de agar.- Una vez sembradas las cajas de Petri se irradiaron con luz ultravioleta a una distancia de 20 cm.- Se incubaron por un periodo de 48 horas aislándose las colonias y determinándose nuevamente las tolerancias alcohólicas según la técnica anterior.-

De los 86 ejemplos utilizados puede decirse que en ningún caso se aislaron colonias que tuvieran mayor tolerancia alcohólica que la primitiva, al contrario, todos presentaron una disminución en la misma, y solo algunas tenían un valor semejante a la cepa original.-

Los trabajos realizados sobre cepas que originariamente poseían una tolerancia alcohólica de 8,6 ‰, una vez irradiadas, dieron un 8,31 ‰ de colonias con la misma tolerancia; un 68,9 ‰ de tolerancia comprendida entre 6,5 y 7,6 ‰ y un 22,8 ‰ de tolerancia 5,7 ‰.- Por lo tanto en todos los ensayos realizados se obtuvieron datos completamente variados de tolerancia alcohólica como era de esperar.- Esto parece estar de acuerdo, en principio, con los trabajos de Duraiswami.-

Una de las críticas de mayor importancia que puede hacerse a los experimentos de irradiación es que los resultados obtenidos no son fáciles de reproducir.- La longitud de onda emitida, la intensidad, la distancia, la interposición de cualquier medio absorbente, la temperatura de irradiación, el pH del medio, la edad de las colonias, y la técnica de inoculación, deben ser tenidos en cuenta en todas las investigaciones para obtener resultados similares, fáciles de comparar.-



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
ooooooooooooooooooooooo ooo oooooooooooooo ooooooooooooo

FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y NATURALES

TOLERANCIA ALCOHOLICA DE LEVADURAS

TESIS presentada por:

RICARDO LUIS BRONZINI

Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Padrino de Tesis:

Doctor RAUL FERRAMOLA

-----1957----- TESIS: 300

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

-

**A MIS PADRES**

## PLAN DE TESIS

### Tolerancia alcohólica de levaduras

#### A) Labor experimental en el laboratorio.-

- 1°) Obtención de muestras.-
- 2°) Métodos de selección de cepas.-
- 3°) Discusión de técnicas empleadas.-
- 4°) Determinación de la tolerancia alcohólica de levaduras.-
- 5°) Tratamiento con luz ultravioleta
- 6°) Discusión

#### B) Bibliografía.-



## PALABRAS PREVIAS

Al iniciar este trabajo, se hace llegar el mas profundo agradecimiento al Doctor Raul Ferranola, padrino de tesis, quien propuso el tema que se va a desarrollar, asesorando durante su realización y brindando oportunos consejos en la redacción final del mismo.-

Se agradece también al personal técnico del Instituto de Microbiología Agrícola, por haber proporcionado las cepas necesarias para este trabajo, como asimismo a las autoridades de Compañía Argentina de Levaduras E.N. (Fábrica Fermolac) por la autorización para realizar las investigaciones en sus laboratorios.-

## INTRODUCCION

Entre los factores que pueden originar la detención del crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo pueden citarse:

- 1°) Agotamiento de las sustancias nutrientes del medio.-
- 2°) Condiciones desfavorables de desarrollo.-
- 3°) El llamado efecto de envejecimiento, debido fundamentalmente a la acumulación de productos resultantes del metabolismo celular.-

En un principio se creyó que el primer factor era el que tenía mayor importancia.- Sin embargo, pronto pudo verificarse que en general la can tidad de nutrientes que existen en un medio de cultivo sobrepasa a las necesidades de los microorganismos que en él se desarrollan, salvo el ca so de los que se encuentran en muy pequeña concentración y que son de fundamental importancia para su metabolismo.-

El segundo factor, a saber, condiciones ambientales (temperatura, ten sión de oxígeno, etc.) inadecuadas, debe lógicamente ser tenido en con sideración. Pero si el cese de crecimiento o la muerte sobrevienen cuando hay amplio suministro de nutrientes y las condiciones ambientales son adecuadas, debe buscarse la explicación del fenómeno en la acumulación de sustancias resultantes del metabolismo microbiano y que interfiera el normal desarrollo cuando su concentración llega a un determinado lí- mite.-

Esto pudo verificarse precisamente en la industria del alcohol. Se comprobó que la concentración máxima de esta sustancia, en los caldos de fermentación, era siempre la misma para una determinada cepa, aun en las condiciones mas favorables de desarrollo. Aparentemente las células de- tenían su crecimiento al llegar a una determinada concentración alcohó- lica.-

Ensayos posteriores demostraron que diferentes clases de levaduras, (por ejemplo: las utilizadas en destilerías y en la elaboración de vinos) producían distintas cantidades de alcohol, fenómeno que se comprobó que era debido a que existía una variación en sus respectivas tolerancias alcohólicas.-

Debió descartarse la influencia posible del anhídrido carbónico generado en el proceso de fermentación, ya que su acción inhibitoria sólo se manifiesta en concentraciones muy elevadas (superiores a las que pueden encontrarse en las cubas de fermentación).-

En 1920 Guillermond y Tanner (24), estudiando la actividad de distintas levaduras, demostraron que su poder fermentativo puede ser muy variable. La posibilidad de que estas diferencias de poder fermentativo fuesen debidas a una variabilidad en su tolerancia alcohólica fué sugerida por primera vez por Gray en 1941.-

Gray (19) demostró en esa oportunidad que una levadura varía en su capacidad fermentativa según cual sea la concentración de alcohol en el medio. Partiendo de una cantidad relativamente numerosa de especies distintas, y simulando condiciones similares a las que existen en una fermentación normal, pudo establecer que en general el porcentaje de glucosa utilizado se halla en relación inversa con la concentración alcohólica.-

Asignó un valor numérico a cada cepa para indicar su respectiva tolerancia alcohólica, valor que estableció en la siguiente forma para cada levadura.-

Realizó las fermentaciones en frascos erlenmeyers de 50 ml, que contenían un volumen final de 25 ml (teniendo en cuenta el medio de cultivo, el alcohol y la suspensión de levadura ).-

Usó como medio de cultivo agua de levadura al 10 %, con 1,25 % de glucosa aproximadamente y pH 4,3 a 4,38.-

El agua de levadura al 10 % se preparó sometiendo al autoclave 100 gramos de levadura fresca (libre de almidón), en 1000 ml de agua destilada, centrifugando, y usándose 20 ml por cada frasco.-

Luego agregó alcohol (95,2 a 95,5 %) en cantidades crecientes (4,66 a 17,14 %) a los sucesivos frascos de modo que lo único que variaba era la concentración del mismo y reservó un frasco control sin alcohol.-

La inoculación se preparó a partir de colonias de 72 horas de desarrollo en agar estría; la levadura fué retirada por medio de agua destilada y luego resuspendida, siendo la concentración de la inoculación de 0,25 g/ml.- Se pipeteo en los frascos de cultivo, cada uno recibió 0,5 ml de inoculación, por lo tanto su concentración final de levadura fué aproximadamente de 0,005 g/ml; las colonias se mantuvieron estériles durante toda la experiencia. Después de inocular se determinó inmediatamente la concentración inicial de azúcar, los frascos se incubaron durante 24 horas a 30 °C y se midió la concentración final de azúcar.-

Un ejemplo típico de los resultados que se obtienen está dado por el cuadro N°1 transcripto del trabajo de W. Gray del año 1941.-

Como puede verse la levadura ensayada utilizaba casi toda la glucosa disponible en medios que contenían concentraciones de alcohol etílico no mayores de 7,61 % en peso. A partir de esta concentración cae bruscamente el porcentaje de azúcar utilizado.-

Tabla 1

Efecto de la concentración alcoholica sobre el porcentaje de azucar utilizado. Concentración inicial en cada frasco 10 mg/ml.-

Frascos N°	% de alcoh. en peso	Conc de azu. desp. 24 hs.	% de azuc. utilizado
1	4,76	0,242	97,58
2	5,71	0,241	97,59
3	6,66	0,256	97,44
4	7,61	0,325	96,75
5	8,57	1,150	88,50
6	9,52	7,024	29,76
7	10,47	8,487	15,13
8	11,42	8,527	14,73
9	12,38	9,900	1,00
10	13,32	10,080	0,00
11	14,28	10,210	0,00
12	15,23	10,230	0,00
13	16,18	10,340	0,00
14	17,44	10,400	0,00
Control	0,00	0,238	97,62

Arbitrariamente Gray denominó tolerancia alcohólica para una determinada levadura:

"Al máximo porcentaje de alcohol que en estas condiciones experimentales permite fermentar glucosa en una proporción no inferior en uno por ciento a la que acusa un ensayo control realizado sin alcohol"

De acuerdo con esta definición clasificó a las levaduras por él estudiadas en los siguientes grupos:

Grupo N° 1.-

Levaduras de muy baja tolerancia alcohólica, comprendida entre 4,76 y 4,82 %. Entre ellas se pueden mencionar *Willia anomala* Steuber, Levadura negra, etc.

Grupo N° 2.-

Levaduras de baja tolerancia alcohólica, siendo su concentración de 5,71 a 5,79 %. En este grupo se encuentran *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, *Zygosaccharomyces soja* B y *Torula lactosa*.-

Grupo N° 3.-

Levaduras de tolerancia alcohólica comprendida entre 6,66 y 7,72 . Se pueden citar, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "D.C.L.", *Torula cremoris*, *Schizosaccharomyces mellacei*.-

Grupo N° 4.-

Levaduras de tolerancia alcohólica media, comprendida entre 8,56 y 9,52 %. Pueden citarse como ejemplos: *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen, *Schizosaccharomyces pombe*, Levadura del vino Tokay, *Saccharomyces Cerevisiae* Hansen "Raza XII", Levadura del vino Borgoña.-

Grupo N° 5.-

Levaduras de alta tolerancia alcohólica comprendidas entre 10,47 y 10,61 ‰. Ejemplos: dos clases de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, variedades R y M.-

Como el valor de la tolerancia alcohólica de las diferentes especies varía ampliamente según el método de determinación, no es fácil tener una idea clara de la situación; por esta razón las diferentes escuelas dan datos discrepantes. Sin embargo es generalmente aceptado que levaduras que no producen alcohol tienen baja tolerancia para éste.-

Los investigadores que trabajan en vinos tienen una escala de valores completamente distinta a la de W. Gray. Cruces en el año 1943 dió los siguientes ejemplos: Raza Picchia y Hansenula, 11 a 14 ‰; *Mycoderma vini* 13 ‰; *S. ellipsoideus* incluyendo la raza "Jerez" alrededor de 16 ‰; razas especiales de *S. ellipsoideus* y *Torulopsis* hasta 18 ‰. La adición repetida de pequeñas cantidades de jarabe o jugo de uva aumenta el límite a 20 ‰.-

Obtención de muestras y discusión de las técnicas empleadas, para la determinación de tolerancia alcohólica.-

Se ensayaron con distintos tipos de levaduras, las que fueron suministradas por instituciones del país y firmas industriales, entre todas se seleccionaron las que mas convenían para el presente trabajo. La mayoría fué cedida por el Instituto de Microbiología Agrícola. Se usó la nomenclatura que figura en el catálogo de cultivos de dicho Instituto correspondiente al año 1952. Las cepas se hallaban sobre agar con extracto de malta, y cubiertas por una capa de aceite mineral estéril para evitar así los sucesivos repiques, que podrían causar una mutación en el metabolismo de las mismas.-

Las cepas utilizadas fueron:

- 1°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-1 1946"
- 2°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-11 N° Y-567"
- 3°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-25 cepa termophilus  
STEINER DEKKER 1948"
- 4°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-31 cepa anamensis Will  
y HEINRICH 1948"
- 5°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-30 cepa fulliensis  
STEINER DEKKER 1948"
- 6°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "L-1-21 cepa Saké (YABE)  
DEKKER 1948"
- 7°) *Saccharomyces cerevisiae* Hansen "Cepa Fermolac"

El medio de cultivo utilizado por W. Gray, tenía como inconveniente, la imposibilidad de obtener una solución límpida, como asimismo en la mayoría de los casos, la obtención de resultados discordantes para una misma cepa, los cuales se atribuían al distinto porcentaje de proteínas y anhídrido fosfórico, de las levaduras prensadas.-



Fué así que estudiando el trabajo de W. Gray del año 1946 (21) se halló la preparación de medios claros, sin material en suspensión.-

Los primeros experimentos consistieron en la obtención de un medio límpido, donde la glucosa debía ser utilizada en igual proporción que con el agua de levadura al 10 %. Los componentes eran: extracto de levadura Difco,  $PO_4H_2K$ , agua, y azúcar en una cantidad próxima a 1,25 %.-

Después de un gran número de ensayos W. Gray llegó a obtener el medio que se detalla a continuación:

Extracto de levadura Difco.....	0,7 %
$PO_4H_2K$ .....	0,5 %
Glucosa.....	1,25 %
Agua c. s. p. ....	100 ml
pH .....	4,3 a 4,6

En la imposibilidad de conseguir extracto de levadura Difco se usó extracto de levadura sin sal.- (1)

Las aparentes ventajas de usar un medio de composición uniforme, fácil y rápido de preparar, indujeron a realizar ensayos comparativos con medio de cultivo Gray (19) y medio con extracto de levadura sin sal.-

A continuación se detallan ensayos realizados con distintas levaduras prensadas para los mismos tipos de cepas. Las cepas utilizadas fueron la N° 2 y la N° 4.- Las determinaciones de glucosa se hicieron por el método de Stiles, Petersen y Fred (1926) (63).-

(1) Extracto de levadura sin sal: producto elaborado por Compañía Argentina de Levaduras E.N.-

Tabla 2

Influencia de la composición del medio sobre el porcentaje de azúcar consumido

Cepa N° 2

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 10,30 mg/ml

Temperatura de incubación : 30°C

Tiempo de incubación : 24 horas.-

Alcohol agr.	Porcentaje de azúcar consumido				
	% en peso	Levadura prensada			Extrac. sin sal
		1	2	3	
4,7	97,0	96,6	96,8	97,6	
5,7	97,1	96,5	96,8	97,6	
6,5	97,1	96,0	96,8	97,6	
7,6	97,1	96,0	96,2	97,6	
8,6	97,1	41,0	45,0	97,5	
9,5	48,3	20,0	22,0	59,8	
10,5	20,2	8,0	7,2	29,2	
11,5	5,4	3,6	4,2	9,6	
--0--	97,1	96,7	96,9	98,1	

Tabla 3

Influencia de la composición del medio sobre el porcentaje de azu-  
car consumido.-

Cepa N° 4

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 10,30 mg/ml

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas.-

Alcohol agre. % en peso	Porcentaje de azucar consumido	
	Levadura pren- sada	Extr. sin sal
4,7	96,9	97,7
5,7	95,9	97,7
6,5	93,4	97,7
7,6	65,5	90,0
8,6	30,6	55,7
9,5	7,9	21,9
10,5	6,9	6,9
11,5	3,9	3,6
--0--	96,9	97,8

Los resultados obtenidos indican discrepancias que estan dentro de las variaciones originadas por el uso de distintas partidas del medio de W. Gray (19) con levadura prensada.-

Se ha verificado como complemento de estos ensayos la influencia que las variaciones de otros factores experimentales podrían tener en los valores de tolerancia alcohólica obtenidos para una determinada cepa.-

Entre ellos evidentemente estarían el tiempo y la temperatura de incubación.-

Se ha realizado una serie de ensayos modificando estas variables y utilizando como medio de cultivo el preparado con extracto de levadura sin sal .- (Medio 2)

Los resultados obtenidos con estos ensayos se detallan en los cuadros siguientes:

Tabla 4

Influencia del tiempo de fermentación en la determinación de la tolerancia alcohólica.-

Cepa N° 5

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 9,2 mg/ml

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 y 48 horas.-

Alcohol agregado % en peso	Porcentaje de azúcar consumido	
	24 horas	48 horas
4,7	97,9	97,9
5,7	97,9	97,9
6,5	97,8	97,8
7,6	97,8	97,6
8,6	63,8	97,6
9,5	40,5	70,2
10,5	19,5	35,2
11,5	14,6	14,5
—0—	98,0	98,2

Tabla 5

Influencia del tiempo de fermentación en la determinación de la tolerancia alcohólica.-

Cepa N° 1

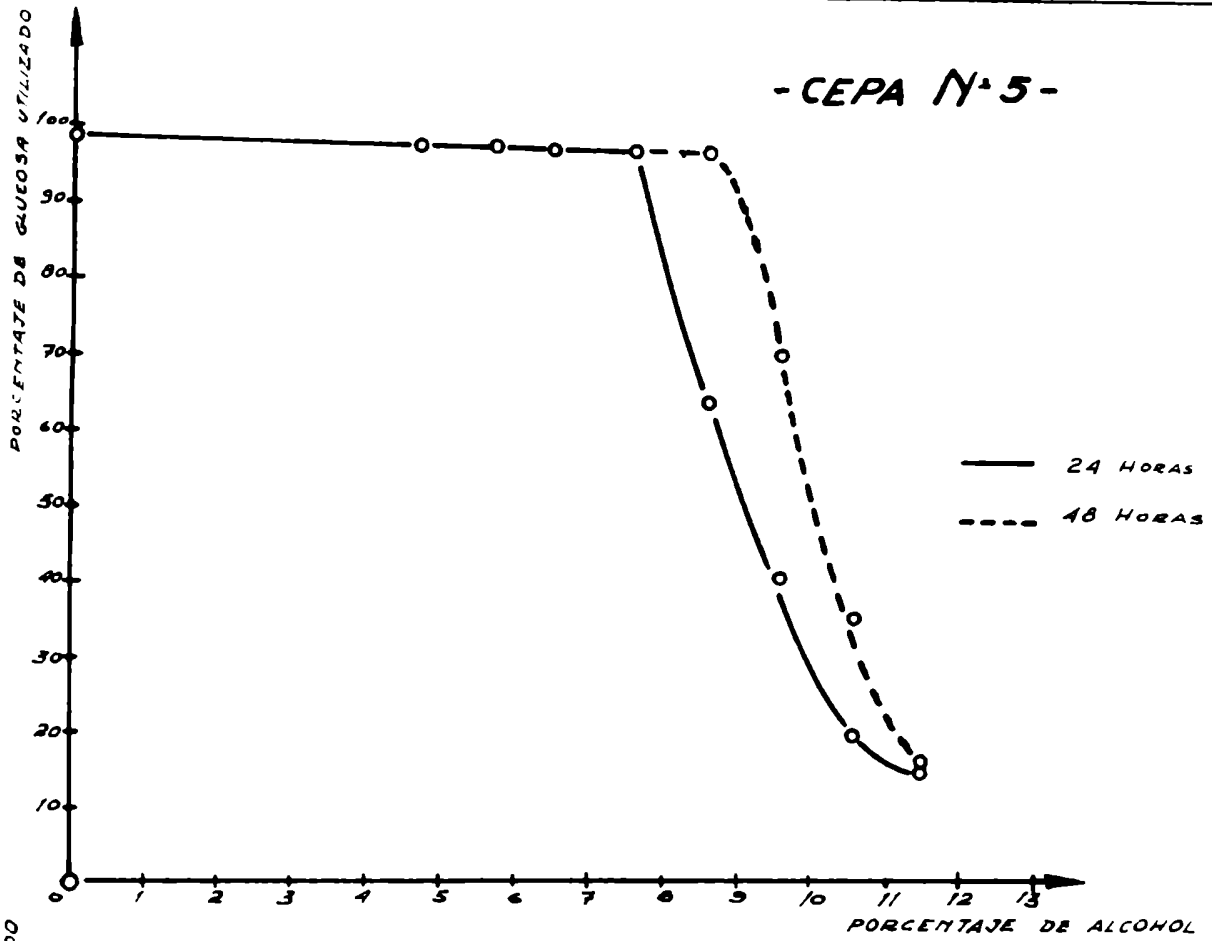
Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: para 24 horas: 10,30 mg/ml  
para 48 horas: 9,20 mg/ml

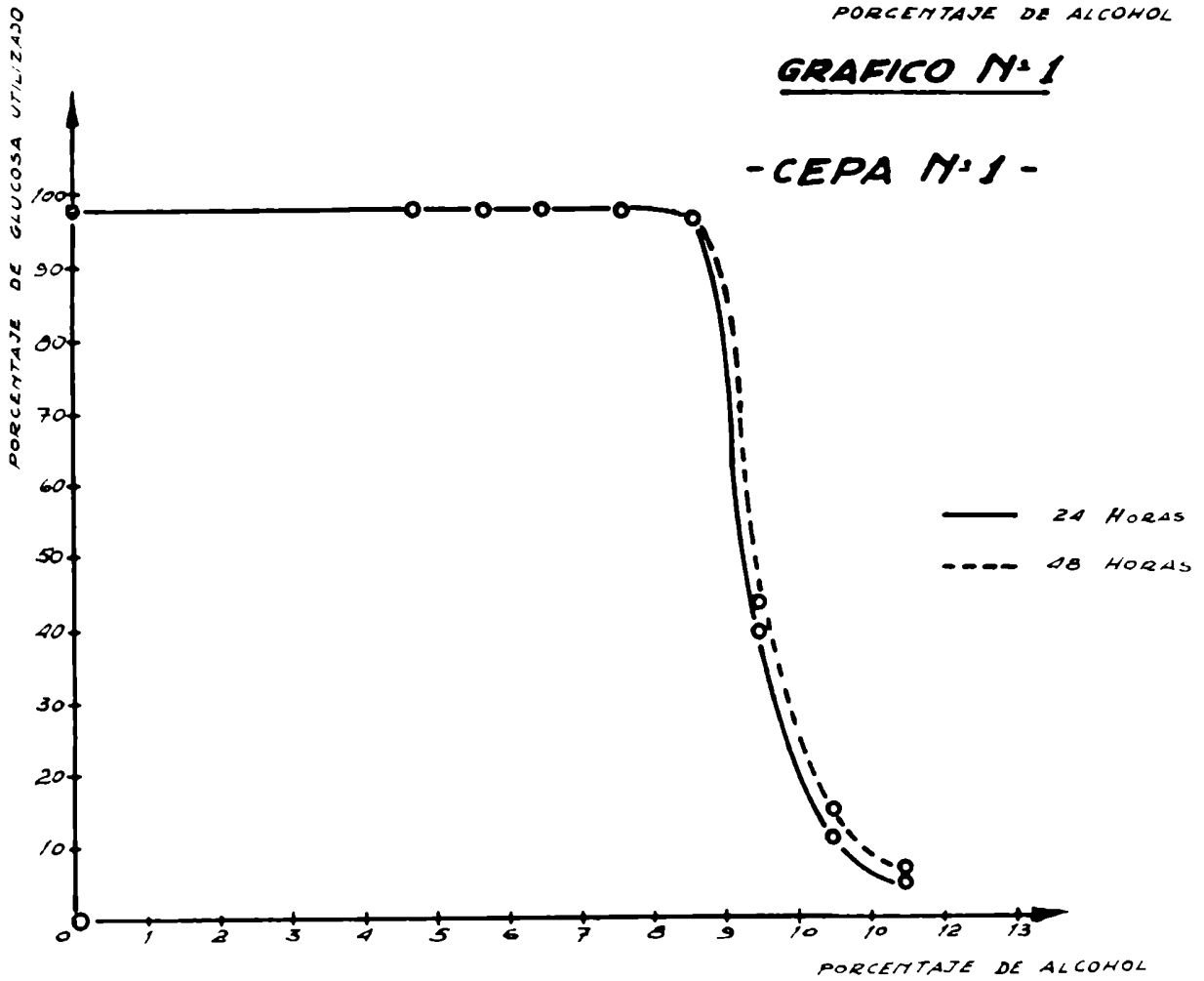
Temperatura de incubación: 30°0

Tiempo de incubación: 24 y 48 horas.-

Alcohol agregado % en peso	Porcentaje de azúcar consumido	
	24 horas	48 horas
4,7	97,7	98,1
5,7	97,7	98,0
6,5	97,7	98,0
7,6	97,7	97,7
8,6	96,3	97,4
9,5	39,5	43,4
10,5	11,0	14,5
11,5	4,5	6,8
—0—	97,9	98,1



**GRAFICO N° 1**



**GRAFICO N° 2**

Los resultados obtenidos indican que casi la totalidad de la glucosa fermenta en las primeras 24 horas y que desde el punto de vista práctico no habría ventajas en prolongar el período de fermentación hasta las 48 horas.-

Con respecto a la influencia de la temperatura se ha ensayado la de 30°C indicada por W.Gray (19) y la de 35°C.-

Los resultados obtenidos en los ensayos efectuados se detallan en la Tabla 6 y el gráfico N° 3.-



Tabla 6

Influencia de la temperatura sobre la determinación de la tolerancia alcohólica.-

Cepa N° 4

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 9,2 mg/ml

Temperatura de incubación: 30°C y 35°C

Tiempo de incubación: 24 horas.-

Alcohol agregado % en peso	Porcentaje de azúcar consumido	
	30°C	35°C
4,7	97,7	97,6
5,7	97,7	97,6
6,5	97,7	67,1
7,6	90,0	11,6
8,6	55,7	9,8
9,5	21,9	5,4
10,5	3,6	2,9
11,5	3,6	2,9
—0—	97,8	97,8

- CEPRA N° 4 -

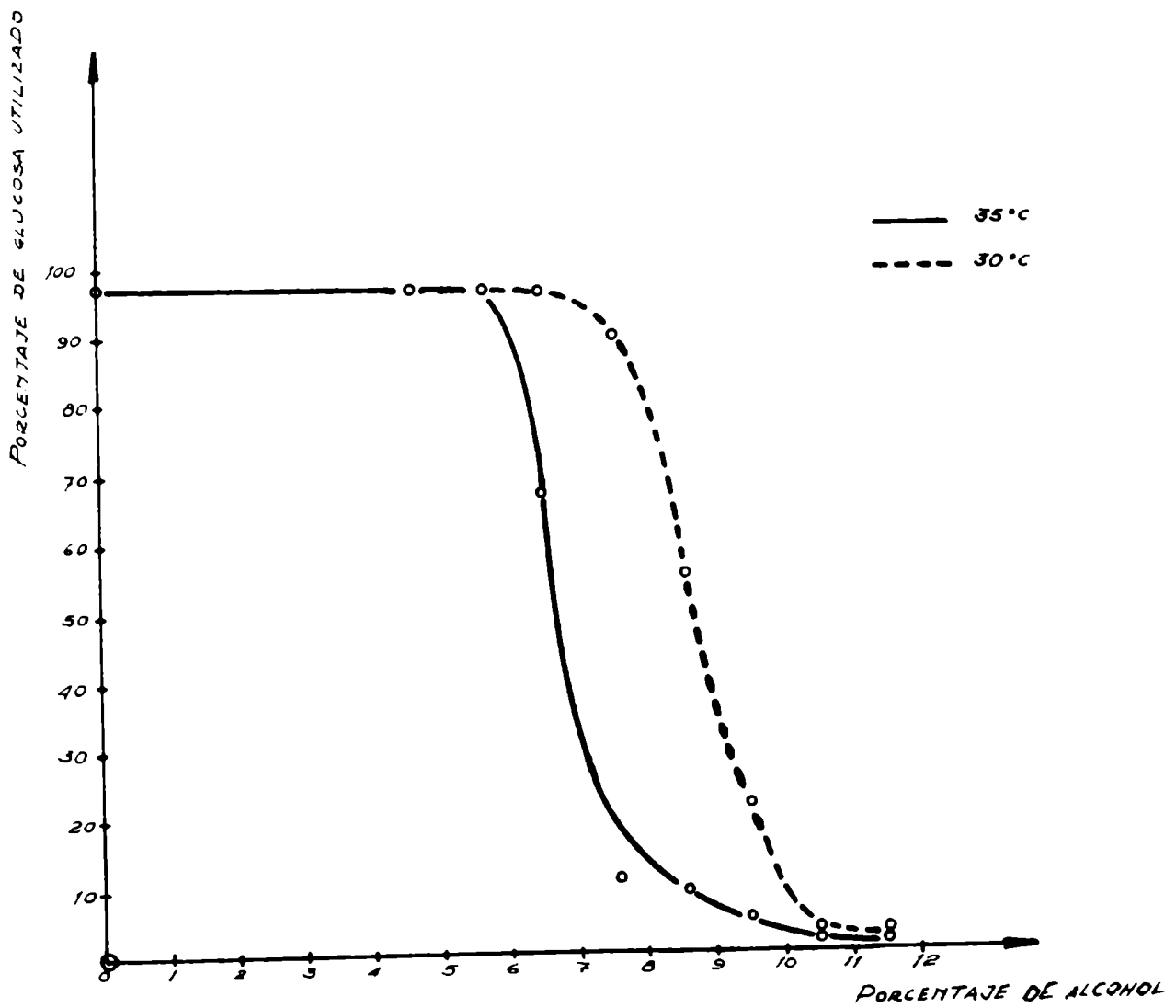


GRAFICO N° 3

Puede observarse el marcado poder inhibitor del alcohol en el proceso fermentativo cuando se eleva la temperatura de 30°C a 35°C.-

La concentración de alcohol de 7,6 % reduce el porcentaje de azúcar fermentado de 90,3 a solo 11,6 %.-

Se puede concluir de acuerdo con estos ensayos y con la escasa bibliografía sobre el tema, que el método para la determinación de la tolerancia alcohólica de una levadura es empírico.-

Si se desean obtener resultados comparativos debe seguirse una técnica determinada en todos los ensayos que se efectuen.- Esta técnica puede ser la de Gray, pues no hay razones aparentes para modificarla, salvo el uso de un extracto de levadura de composición constante en todos los ensayos.-

Eso es lo que se ha hecho en el presente caso.- Sin embargo antes de realizar los ensayos que motivan esta tesis se ha determinado la influencia que pudiese tener en los resultados, variaciones en la concentración de glucosa, dentro de las cifras que pudieran presentarse en las condiciones experimentales usadas (concentración por esterilización del medio, arrastre de agua por el CO<sub>2</sub>, etc).-

Los resultados obtenidos en estos ensayos se consignan en la tabla 7, y demuestran que dentro de los límites de trabajo no hay influencia apreciable.-

Tabla 7

Ensayos de variación de concentración de azúcar entre los límites  
0,969 y 1,29 g/100 ml.

Cepa N° 2

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 0,969 g/100 ml y 1,29 g/100 ml

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas

Alcohol agregado % en peso	Porcentaje de azúcar consumido	
	con. inicial de glucosa 0,969 g/100 ml	Concen. inici. glucosa 1,29 g/100 ml
4,7	97,4	97,6
5,7	97,4	97,6
6,5	97,4	97,6
7,6	97,0	97,5
8,6	97,5	97,3
9,5	58,9	60,3
10,5	27,2	29,0
11,5	6,9	7,9
--0--	97,4	97,6

Determinación de la tolerancia alcohólica de levaduras.-

Se usó como medio de cultivo el N° 2 (ver apéndice), (20 ml en c/frasco)

El agregado de alcohol (95,0 -96,0 %) se hizo en cantidades crecientes (4,7 a 11,5 %) a los sucesivos frascos en forma tal que lo único que variaba era la concentración del mismo, reservándose un frasco control sin alcohol.-

La inoculación se preparó a partir de colonias de 72 horas de desarrollo en agar estría, suspendidas y lavadas con agua destilada, centrifugadas y llevadas a una concentración de 0,25 g/ml.- Se sembraron 0,5 ml, siendo la concentración final de levadura de 0,005 g/ml y el volumen final en cada frasco 25 ml.-

Todos estos pasajes fueron hechos en las máximas condiciones de asepsia. Una vez inoculados los erlenmeyers fueron incubados a 30°C durante 24 horas.- Los resultados obtenidos en estos ensayos se consignan en la tabla 8, que da los valores de la tolerancia alcohólica de las cepas 1 a 7.-

Al finalizar el período de incubación se hicieron las determinaciones de glucosa por el método de Stiles, Peterson y Fred (1926) (63).-

Tabla 8

Tolerancia alcohólica de las cepas utilizadas.-

Cepas N° 1,2,3,4,5,6,7.-

Volumen a fermentar : 25 ml

Glucosa inicial en cada frasco: 10,30 mg/ml (1,2,3,4,)  
 10,00 mg/ml (5)  
 9,2 mg/ml (6 y 7)

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación 24 horas.-

Alcohol agreg. % en peso	Porcentaje de azúcar consumido						
	1	2	C 3	E 4	P 5	A 6	S 7
4.7	97.8	97.6	98.1	97.7	97.9	98.0	97.6
5.7	97.8	97.6	98.1	97.7	97.9	97.9	97.6
6.5	97.8	97.6	97.2	97.7	97.8	97.6	97.6
7.6	97.8	97.6	89.9	90.0	97.8	97.5	97.6
8.6	96.3	97.5	42.5	55.7	63.8	96.7	97.5
9.5	39.5	59.8	18.6	21.9	40.5	32.4	58.4
10.5	11.0	29.2	6.5	6.9	19.5	17.6	34.4
11.5	4.5	9.6	0.0	3.6	16.6	15.4	13.6
—0—	97.9	98.1	98.3	98.2	98.0	98.0	97.7

### Irradiación con luz ultravioleta.-

Fué recién a partir de 1930 que pudo hablarse de la formación de posibles mutantes en levaduras, producidos por irradiación con luz ultravioleta con los trabajos efectuados por Stevens (62) sobre *Glomerella cingulata*. Luego en 1932, Dickson (9) investigó colonias de *Chaetomium cochliodes*. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los trabajos de W. Gray sobre tolerancia alcohólica de levaduras, (19),(20),(21),(22) se pensó en irradiar las cepas con luz ultravioleta con el objeto de establecer posibles mutantes de mayor tolerancia alcohólica.-

Posteriormente a la iniciación de este trabajo se publicaron las investigaciones efectuadas por Sarachek (58), quien, en 1953, trabajando con poliploides de *Saccharomyces* demostró que el promedio de velocidad de inactivación es mayor cuanto mayor es el grado del poliploide.- Al hacer la representación gráfica de los resultados anteriores, comprobó que el proceso se puede dividir en dos partes: una de inducción y otra de inactivación logarítmica, siendo la velocidad de pasaje de la primera a la segunda mayor cuando aumenta el grado del poliploide.-

En el año 1954, Sarachek (59), estudió el efecto de la irradiación ultravioleta sobre el retardo de la división celular y la inactivación en la familia de los poliploides de *Saccharomyces*. Se utilizaron los organismos haploide (I), diploide (II), triploide (III) y tetraploide (IV), la proporción de ácido desoxiribonucleico formado fue respectivamente 1:2:3:4 de I a IV. Los tiempos requeridos para una división del 70 % para III y IV fueron de 2,5 horas; para I, 4,5 horas y para II 3,5 horas. Al hacer las representaciones gráficas se obtuvieron curvas de retardo sigmoideas para II, III y IV y exponencial para I.-

A continuación se hará un resumen de los trabajos realizados sobre irradiación de levaduras.-

Los primeros ensayos fueron de caracter cualitativo y efectuados en la zona visible del espectro, posteriormente pasaron a la zona del ultravioleta y después a la de irradiación gamma.-

En un principio para obtener una longitud de onda determinada se usaron los filtros líquidos, los que posteriormente fueron reemplazados por el monocromador, además en ese tiempo no hicieron medidas absolutas de la intensidad de la luz irradiada, sino comparaciones de diferentes exposiciones, utilizando las mismas intensidades necesarias para producir el mismo efecto en diferentes levaduras, o diferentes efectos en las mismas levaduras.-

Von Recklinghausen (67), en 1914, determinó el tiempo en que se destruye una suspensión de levaduras en agua, irradiándolas con luz ultravioleta con una intensidad aproximadamente seis veces mayor que la necesaria para matar bacterias.-

En 1930 Dillon-Weston-Halman (10), demostraron que el efecto inhibitorio y letal de la irradiación es directamente proporcional a su intensidad.-

Posteriormente se ensayaron métodos para la determinación de la intensidad usando la célula fotoeléctrica o la termopila. Los autores de estos trabajos fueron: Wyckoff y Luyet (73), Schreiber (60) y Oster (52), los cuales estudiaron y representaron el porcentaje de células sobrevivientes teniendo en cuenta la energía de la luz utilizada.-

Dicha representación era una curva de tipo sigmoide.. Varias interpretaciones se hicieron al respecto, así: a) algunos autores consideraban los factores del medio ambiente como productos de las desviaciones del tipo logarítmico; b) otros, como multiples cuánticos de energía irradiada sobre una región sensible de las células; c) por último, los demás decían que



era una curva de probabilidad debida a resistencias individuales de las células a la irradiación.-

En la actualidad la teoría más aceptable es la del golpe cuántico aunque ninguna parte de la célula puede ser considerada como la más sensible.- Por un proceso matemático desarrollado por Mme. Curie es posible calcular el número de golpes cuánticos necesarios para matar una célula conociendo el porcentaje de células sobrevivientes y la cantidad de energía suministrada.-

Holweck y Lacassagne (28), determinaron que son necesarios 9 golpes para matar células de levaduras expuestas a una radiación mixta de 2.800 y 3.800 A°. Posteriormente Schreiber (60) demostró que eran necesarios seis golpes a 2.450 A°.-

Oster(53), halló que la ley es válida sólo para un 30 % de la luz incidente. Schreiber (60), también observó que la ley se mantiene dentro de ciertos límites, pero debajo de éstos una exposición larga con baja intensidad de luz es mucho más efectiva que una exposición corta con una intensidad mas alta.-

Por su parte, Lacassagne (33), dividió las células de levaduras expuestas a la irradiación ultravioleta en tres clases:

- a) Células que sufren un retraso en su división y después recobran su poder reproductor.-
- b) Células que se dividen una vez y mueren.-
- c) Células que mueren sin dividirse.-

Además Oster (52) creó una clase intermedia entre a y b caracterizada por el retardo de las funciones metabólicas de las células; las cuales se ponen de manifiesto por una menor consumición de oxígeno.-

Se tendran en cuenta a continuación diversos factores que influyen sobre la irradiación con luz ultravioleta.-

Acción del medio de cultivo.-

La composición del medio y su estado de ionización pueden alterar los efectos producidos por la irradiación.-

Los medios nutrientes sólidos, o líquidos, absorben radiaciones selectivas con respecto a la longitud de onda por lo tanto, no solo la intensidad total sino también la calidad de la luz son afectadas.-

El medio puede también incidir marcadamente sobre el poder letal de la irradiación porque actúa como protector. Cualquier colonia situada debajo de la superficie no recibe los efectos completos de los rayos; esto fué estudiado por Dillon-Weston-Halnan (10).-

Hinrichs (26) atribuyó la muerte de las células a la formación de sustancias originadas por la irradiación, que son tóxicas para la levadura.-

La presencia de sales en el medio tiene también importancia, así T. M. Kondrat'eva (32) investigó la acción protectora de las de calcio, a los efectos de los rayos de luz ultravioleta.-

Primeramente agitó una suspensión de levaduras en solución 0,001 - 0,5 M de  $Cl_2Ca$  por un período comprendido entre 48 y 72 horas aumentando considerablemente la resistencia a la acción del ultravioleta (seis a siete veces con relación al frasco control). El grado de protección es proporcional a la concentración de la sal de calcio.-

Por su parte Nadson y Phillipov (51), irradiando colonias en cajas de Petri, observaron que el mayor crecimiento se presenta en los bordes y no en el centro como era de esperar; La estimulación fué atribuída a pequeñas dosis de irradiación espaciada en el medio.-

### Acción del tiempo de irradiación.-

Con respecto a este factor los investigadores obtuvieron resultados completamente dísparos.-

Abramov comprobó que irradiando levaduras durante cortos períodos decrece la capacidad de las células para dividirse y aumentando la duración terminan por morir.-

Wyckoff y Luyet (73), Schreiber (60) y Smith (61) no obtuvieron signo de estimulación en el crecimiento de levaduras con pequeñas dosis de ultravioleta.- Chavarria y Clark (5) llegaron a la conclusión que las exposiciones cortas servían para estimular el crecimiento, mientras que las largas eran letales; trabajaron con colonias de *Montoyella*.-

Esta discrepancia fué debida posiblemente a la diferencia en el tiempo transcurrido desde la irradiación hasta el momento en que se efectuó la medida de la estimulación del crecimiento.-

Los trabajos de Smith (61) comprobaron estas suposiciones, ensayó sobre colonias de *Fusarium*, al irradiarlas obtuvo una estimulación temporal, la que siempre iba precedida de un previo retardo. Después de un corto período el porcentaje volvía a ser normal.-

### Acción de la temperatura de irradiación y de la edad de las colonias.-

Otro factor que influye es la temperatura de irradiación, la cual es muy difícil de mantener constante, sobre todo cuando la intensidad es muy grande. Los cambios en las temperaturas no sólo son motivados por la acción de los rayos infrarrojos emitidos sino que además influyen las radiaciones absorbidas por el medio, y por las células, transformándose en calor.-

Oster estudió el efecto de la temperatura a la cual fué irradiada una cepa. Hizo cuatro ensayos, entre 8 y 29 °C obteniendo 1,10 como valor p<sub>ng</sub>

medio para el coeficiente de temperatura de acción letal.- Este valor es tá de acuerdo con el obtenido por acción bactericida.-

Schreiber investigó los efectos combinados de la temperatura y la radiación observando que son muy complicados. No calculó coeficientes, pero trazó numerosas curvas que revelan la complejidad de las reacciones.-

Los mismos investigadores estudiaron el efecto de la edad en la sensibilidad de las colonias de levaduras al ultravioleta obteniendo resultados contradictorios.-

Oster (53) halló que era necesario 20 a 30 % mas de energía incidente para producir un efecto dado en una colonia de 15 días que en una de 24 horas.- Mientras que Schreiber (60) halló que la edad de la colonia tiene poco efecto en la sensibilidad de las células de levaduras.-

#### Formación de sustancias que favorecen el crecimiento.-

A continuación se pasará revista a las sustancias que aparecen al irradiar células de levaduras con luz ultravioleta y que favorecen el crecimiento.-

En este sentido se puede citar a Davidson J.N (8), quien observó que exponiendo las células vivas a la luz ultravioleta segregaban al medio una gran cantidad de sustancias nitrogenadas provenientes de su desintegración. Estas sustancias, tenían por objeto favorecer el crecimiento. Como ejemplo figuran los compuestos adenina-nucleótidos y sus derivados, aunque no son los principales elementos que promueven el desarrollo.-

Por su parte Loofbourow, Dwyer y Cronin (45), hicieron estudios de irradiación sobre células vivas y muertas. Observaron que al irradiar las vivas, el mayor porcentaje de sustancias que favorecen el crecimen-

to (hormonas), se producían cuando el tiempo estaba muy próximo al necesario para matarlas. Las hormonas aumentaban cuando en el medio había sustancias como  $H_3PO_4$ , carbohidratos y proteínas, y en especial con el aumento de  $CO_2$ .- Hicieron los mismos ensayos con células muertas y obtuvieron resultados diferentes, esto demuestra que la formación de hormonas es una respuesta específica de las células vivas a la irradiación.-

Posteriormente Loofbourow y Webb (44), ensayaron con suspensiones de levaduras irradiadas (A) y no irradiadas (B), demostrando que se obtenía gran cantidad de biotina, ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina y riboflavina.- Establecieron una comparación entre A/B llegando a cifras tales como 91,5 para el ácido pantoténico y 2,3 para el inositol.- Todas estas sustancias son factores de crecimiento del grupo de la vitamina B.-

En 1954, Sarachek (59), expuso células de levaduras a la acción del ultravioleta en sus etapas sucesivas de desarrollo, notándose en las células sobrevivientes la presencia de ácido desoxiribonucleico que favorece el crecimiento.-

Cook E.S. (6 y 7) observó que la adenosina y guanosina, solas o combinadas actúan como factores de crecimiento en las levaduras. Esas sustancias están presentes después de la irradiación de las células y actúan ligeramente sobre el metabolismo lo cual puede ser observado con un manómetro.- Parecería que estas sustancias ejercen su efecto sobre la velocidad de proliferación de las células.-

#### Influencia de la radiación sobre la respiración de las células.-

Anderson y Duggan (2) observaron los cambios fisiológicos producidos en las células de levaduras al irradiarlas con luz ultravioleta de una longitud de onda de  $2650 \text{ \AA}$ , comprobaron que la respiración aeróbica de

las celulas es sensible al calor pero no se altera con la irradiación.-

Por el contrario en 1947 G. Giese y W. Swanson (17), comprobaron que la irradiación con luz ultravioleta estimula la respiración endógena y retarda el metabolismo exógeno.- El dinitro-fenol tiene una acción similar siendo los dos efectos aditivos bajo las mismas condiciones. Esta aceleración en la respiración es insensible a la azida cesando a 100°C.-

Parte experimental.-

Característica de la lámpara de luz ultravioleta: Se usó una lámpara Dr. Ing. F. Müller Quarzlampe Fabrik.- Essen W.4 220.- Casa Otto Hess Corriente de encendido 3,5 Amp. Durante su funcionamiento consume 1,5 a 1,8 Amp.- Es necesario un período de tres minutos para estabilizar la lámpara.-

Procedimiento: La irradiación se realizó sobre cultivos sembrados en caja de Petri por el método de estrias sobre superficie de agar.-

El medio consistía en:

Extracto sin sal.....	0,7 %
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0,5 %
Glucosa.....	10,0 %
Agar .....	2,5 %
Agua c.s.p. ....	100 ml
pH .....	4,4

Una vez sembradas las cajas de Petri, se irradian con luz ultravioleta a una distancia de 20 cm.- Se incuban a 30 °C durante un período de 48 horas y se aíslan las colonias. La técnica a seguir es similar a la utilizada en la primera parte de la tesis para la determinación de la tolerancia alcohólica de las levaduras. Ver página 20

Condiciones de la irradiación de la cepa N°1

de azúcar utilizado

CONDICIONES

6	7	8	9	10	11	12
96,7	96,5	97,4	96,6	96,4	97,7	96,6
96,7	96,5	97,3	96,6	96,4	97,7	96,5
96,7	96,5	97,3	96,5	96,1	97,7	96,5
96,6	96,5	97,5	96,6	85,4	97,5	95,6
59,2	93,5	84,6	81,1	54,2	96,5	70,4
11,3	56,8	32,4	20,6	31,1	36,4	24,2
5,4	3,7	15,2	12,5	9,6	10,2	12,3
1,7	2,9	4,1	4,0	2,1	2,4	3,1
96,8	96,8	97,4	96,7	96,5	97,7	96,6



Determinación de la tolerancia alcohólica de las colonias provenientes de la irradiación de la

colonias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

volumen a fermentar: 25 ml

glucosa inicial: 10 mg/ml

temperatura de incubación: 30°C

tiempo de irradiación: 45"

tiempo de incubación : 24 horas

		P e r c e n t a j e d e a s u c a r u t i l i z a d a								
Alcohol agregado % en peso	Cepa 1	C O L O N I A S								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4,5	97,8	96,6	96,6	96,6	96,8	96,6	96,7	96,5	97,4	96,6
5,7	97,8	96,5	96,6	96,5	96,8	96,6	96,7	96,5	97,3	96,6
6,5	97,7	96,2	96,5	96,6	96,7	96,6	96,7	96,5	97,3	96,5
7,6	97,7	94,4	96,2	96,5	96,7	96,5	96,6	96,5	97,5	96,6
8,6	97,3	55,8	87,3	83,5	80,2	89,1	59,2	93,5	84,6	81,1
9,5	39,5	9,45	6,62	21,4	18,5	39,1	11,3	56,8	32,4	20,6
10,5	11,0	0,22	0,22	13,9	8,9	3,0	5,4	3,7	15,2	12,5
11,5	4,5	0,22	0,22	4,3	1,7	0,5	1,7	2,9	4,1	4,0
—0—	98,1	96,9	96,9	96,1	96,8	96,1	96,8	96,8	97,4	96,7

Provenientes de la irradiación de la copa N° 2

---

de azúcar utilizado

---

C O L O N I A S

---

5	6	7	8	9	10	11	12
97,4	97,3	97,6	97,6	97,6	97,4	97,4	97,6
97,4	97,3	97,6	97,6	97,6	97,4	97,3	97,6
97,4	97,3	97,6	97,6	96,1	95,7	97,4	97,6
97,1	97,3	97,1	97,4	96,1	68,2	66,1	65,3
95,2	46,5	97,1	97,0	46,2	19,0	33,1	27,1
52,6	23,3	51,7	52,0	19,2	4,1	11,2	12,1
29,1	2,8	23,2	19,9	2,5	2,0	4,3	8,3
6,1	0,0	5,8	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
97,6	97,3	97,7	97,9	97,8	97,4	97,7	98,1

---

tes de la irradiación de la cepa N° 2

---

de azúcar utilizado

---

L O N I A S

---

6	7	8	9	10	11	12
97,3	97,6	97,6	97,6	97,4	97,4	97,6
97,3	97,6	97,6	97,6	97,4	97,3	97,6
97,3	97,6	97,6	96,1	95,7	97,4	97,6
97,3	97,1	97,4	96,1	68,2	66,1	65,3
46,5	97,1	97,0	46,2	19,0	33,1	27,1
23,3	51,7	52,0	19,2	4,1	11,2	12,1
2,8	23,2	19,9	2,5	2,0	4,3	8,3
0,0	5,8	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
97,3	97,7	97,9	97,8	97,4	97,7	98,1

---

Colonias provenientes de la irradiación de la cepa N° 3.-

taje de asuear utilizado								
C O L O N I A S								
	5	6	7	8	9	10	11	12
,4	97,4	96,5	96,2	97,6	96,8	95,8	97,1	96,1
,7	96,9	94,3	95,9	97,6	95,4	94,9	97,1	95,9
,0	82,8	89,1	90,6	97,6	47,2	89,3	97,2	81,6
,3	41,0	80,9	74,1	68,2	32,0	69,3	66,3	70,1
,8	11,8	37,3	30,6	19,0	4,6	28,7	45,1	27,3
,1	9,3	15,6	15,2	4,1	3,1	12,5	9,3	11,4
,1	0,0	3,1	2,1	2,0	0,0	2,1	2,7	7,6
,1	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	2,1	1,0
,3	97,6	96,7	97,5	97,6	96,9	96,3	97,3	96,1

Determinación de la tolerancia alcohólica de las coloni

Colonias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial : 10 mg / ml

Tiempo de irradiación: 30 "

Temperatura de incubación: 30 °C

Tiempo de incubación: 24 horas

Alcohol agregado % en peso	Copa 3	P o r c e n t a			
		1	2	3	4
		4,7	98,1	97,8	97,8
5,7	98,1	91,4	97,7	91,9	95,7
6,5	97,2	47,3	97,1	46,5	66,0
7,6	89,9	32,0	83,0	35,0	30,3
8,6	42,5	4,6	57,5	14,1	13,8
9,5	18,6	3,1	9,6	10,9	6,1
10,5	6,5	1,0	3,1	3,1	2,1
11,5		1,0	3,1	3,1	2,1
—0—	98,3	98,1	98,1	97,9	97,3

ojos provenientes de la irradiación de la cepa N° 4.-

Porcentaje de azúcar utilizado

C O L O M B I A S

	5	6	7	8	9	10	11	12
1,4	97,1	97,7	97,6	97,6	96,3	97,2	96,9	96,3
1,9	96,0	97,3	96,3	96,6	96,3	96,3	96,7	95,9
1,8	74,1	89,7	89,6	96,6	65,0	76,1	96,7	5,7
1,0	30,6	70,0	69,8	60,4	28,2	43,1	84,2	90,9
1,2	14,3	22,1	49,9	32,5	12,1	9,1	54,1	57,6
1,1	1,1	17,1	22,1	18,6	5,1	1,1	30,1	26,4
1,0	0,0	2,1	2,1	2,1	2,1	0,0	9,8	1,5
1,0	0,0	2,1	1,3	0,0	2,1	0,0	1,0	1,0
1,4	97,1	97,7	97,8	97,5	96,5	97,2	96,9	96,9

Determinación de la tolerancia alcoholica de las colonias

Colonias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial: 5,2 mg/ml

Tiempo de irradiación: 60 "

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas.-

---

A O R O E

Alcohol agregado % en peso	Copa 4				
		1	2	3	4
4,5	97,7	97,6	97,6	97,6	97,4
5,7	97,7	96,2	96,7	96,8	90,9
6,5	97,7	90,8	66,0	96,7	80,8
7,6	90,0	65,4	29,3	89,3	40,0
8,6	55,7	27,5	12,1	64,4	9,2
9,5	21,9	12,3	5,1	22,1	1,1
10,5	6,9	3,6	2,1	6,1	0,0
11,5	3,6	1,0	2,1	3,1	0,0
—0—	98,2	97,7	97,8	97,8	97,4

---

Amias provenientes de la irradiación de la copa N° 5 .--

Porcentaje de azúcar consumido								
C O L O K I A S								
	5	6	7	8	9	10	11	12
3	97,0	97,6	97,6	97,6	97,6	97,7	97,6	97,7
9	96,6	97,6	97,0	97,6	97,5	97,4	97,3	97,5
2	96,3	97,6	96,2	97,6	91,1	97,4	97,4	90,1
1	85,7	83,6	56,4	97,6	84,3	71,3	72,3	84,1
4	29,3	68,7	32,1	63,2	61,1	30,6	30,6	60,2
7	24,7	32,3	14,8	39,7	34,7	12,3	12,3	34,7
3	11,3	12,1	4,8	18,7	19,9	2,3	2,1	16,7
5	3,1	6,1	0,0	10,3	12,1	2,3	2,1	10,0
6	97,5	97,8	97,6	97,8	97,6	97,8	97,8	97,8



Determinación de la tolerancia alcohólica de las colonias

Colonias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial: 10 mg/ml

Tiempo de irradiación: 45"

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas.-

Alcohol agregado % en peso		P o r e e n					Copa
		5	1	2	3	4	
4,7	97,9	97,6	97,6	97,3	97,3	9	
5,7	97,9	97,5	97,5	97,0	96,9	9	
6,5	97,8	91,3	91,3	96,1	96,2	9	
7,6	97,8	85,2	85,2	70,6	71,1	8	
8,6	63,8	68,7	61,8	31,8	36,4	2	
9,5	40,5	32,3	29,5	26,8	25,7	2	
10,5	19,5	10,0	6,4	3,1	10,3	1	
11,5	14,6	1,1	0,0	1,0	2,5		
—0—	98,0	97,8	97,9	97,7	97,6	9	

Las provenientes de la irradiación de la cepa N° 6

Porcentaje de azúcar utilizado

C O L O N I A S

5 6 7 8 9 10 11 12

0	97,5	97,6	97,1	97,5	97,5	97,9	97,6	97,5
0	97,4	97,6	97,8	97,5	97,5	97,9	97,1	97,5
8	97,4	97,6	95,0	97,5	96,0	97,9	90,0	97,6
1	52,9	91,0	49,0	51,6	68,1	89,0	60,1	52,3
6	38,8	30,7	25,0	34,5	28,3	49,6	24,3	25,6
9	17,1	7,4	10,0	18,1	12,3	8,9	8,7	12,1
4	6,3	5,2	3,1	11,3	9,8	2,1	3,0	10,3
2	0,0	0,0	0,0	3,1	3,3	2,1	2,0	3,2
4	97,7	97,6	97,8	98,1	97,5	97,9	97,6	97,6

Determinación de la tolerancia alcohólica de las colonias p

Colonias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

Volumen a fermentar: 25 ml

Tiempo de irradiación: 35 "

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas

Glucosa inicial: 10 mg/ml

Alcohol agregado % en peso	P o r c e n C				
	Copa 6	1	2	3	4
4,7	98,0	97,9	97,5	97,8	97,0
5,7	97,9	97,9	97,5	97,5	97,0
6,6	97,6	97,9	97,5	95,6	96,8
7,6	97,5	66,4	52,6	63,2	58,1
8,6	95,0	29,2	36,5	30,2	37,6
9,5	52,4	15,8	18,3	20,1	26,9
10,5	17,6	11,9	12,3	12,1	11,4
11,5	15,4	2,5	2,5	2,7	6,2
—0—	98,1	98,1	97,5	97,8	97,4

as provenientes de la irradiación de la cepa N° 7

---

centaje de azúcar utilizado

---

C O L O N I A S

---

5            6            7            8            9            10           11           12

---

97,3	97,3	97,6	97,3	97,4	97,4	97,4	97,4
97,1	97,1	97,3	97,2	97,6	97,6	97,2	97,2
96,1	96,8	97,1	96,8	96,6	96,6	96,2	97,1
90,0	81,0	96,5	71,4	89,0	97,4	49,1	68,2
72,0	52,0	52,1	52,1	72,1	58,1	24,1	45,6
55,1	31,1	29,2	30,1	54,3	39,1	14,2	30,1
20,0	9,1	9,2	9,8	19,1	14,2	8,2	8,1
7,3	3,6	3,1	0,0	2,1	2,1	2,1	3,0
97,3	97,4	97,7	97,7	97,5	97,4	97,4	97,4

---

Determinación de la tolerancia alcohólica de las colonias

Colonias: 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.-

Volumen a fermentar: 25 ml

Glucosa inicial: 9,5 mg/ml

Tiempo de irradiación: 35"

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 24 horas.-

		P o r o			
Alcohol agregado % en peso	Cepa				
	7	1	2	3	4
4,7	97,6	97,3	97,3	97,6	97,6
5,7	97,6	97,3	97,3	97,6	97,1
6,6	97,6	96,2	97,1	96,1	96,1
7,6	97,6	80,1	55,1	96,1	64,1
8,6	97,5	52,1	41,2	46,2	50,1
9,5	58,4	30,3	32,1	19,1	21,2
10,5	34,4	9,2	11,1	2,1	15,3
11,5	13,6	0,0	2,1	0,0	6,1
—0—	97,7	97,3	97,3	97,5	97,7

### DISCUSION

Los ensayos de tolerancia alcohólica realizados con las cepas estudiadas demuestran que el método utilizado por W. Gray es empírico y permite obtener resultados comparativos, no de valor absoluto, puesto que de acuerdo con la definición dada, estos pueden variar según las condiciones del medio.-

En consecuencia la tolerancia alcohólica de cada levadura debería ser ligeramente mayor que el valor asignado porque después de 24 horas de fermentación se produce algo de alcohol, sin embargo, éste no excede de 0,5 % puesto que la cantidad de glucosa suministrada es pequeña. En cambio, en los últimos frascos, debido a la alta concentración de alcohol parte de éste se pierde por la temperatura de incubación como asimismo por el desprendimiento de CO<sub>2</sub>.-

Estos ensayos permiten determinar con aproximación el grado de tolerancia alcohólica y se utilizan para seleccionar las diferentes cepas de uso industrial.-

No en todos los casos las cepas que tienen mayor tolerancia alcohólica son industrialmente convenientes.-

Se han consultado los distintos métodos para aumentar la tolerancia alcohólica y se trató de irradiar las cepas de levaduras con luz ultravioleta con el objeto de obtener posibles mutantes, aislando las colonias y determinando sus nuevas tolerancias.-

De los 86 ejemplos utilizados puede decirse que en ningún caso se aislaron colonias que tuvieran mayor tolerancia alcohólica que la primitiva, al contrario todas presentaban una disminución en la misma, ce

no puede verse en las tablas respectivas, y sólo algunas tenían un valor semejante a la cepa original.-

Observando las colonias correspondientes a las cepas, 1, 2, 6, 7, que originariamente tenían una tolerancia alcohólica de 8,6 , una vez irradiadas se obtiene 8,31 % de colonias que poseen la misma tolerancia, un 68,9 % de tolerancia comprendida entre 6,5 % y 7,6 % , y un 22,8 % de tolerancia 5,7 %.- Por lo tanto todos los ensayos realizados dieron datos completamente variados de tolerancia alcohólica como era de esperar.-

Esto parece estar de acuerdo, en principio, con los trabajos de, Duraiwami (12 y 13).-

Una de las críticas de mayor importancia que puede hacerse a los experimentos de irradiación es que los resultados obtenidos no són fáciles de reproducir. La longitud de onda emitida, la intensidad, la distancia, la interposición de cualquier medio absorbente, la temperatura de irradiación, el pH del medio, la edad de las colonias, y la técnica de inoculación, deben ser tenidos en cuenta en todas las investigaciones para obtener resultados similares, fáciles de comparar.-

RESUMEN

1°) Se recopiló la breve bibliografía sobre tolerancia alcohólica de levaduras, haciendo un resumen de los trabajos existentes.

2°) Se estudiaron los distintos métodos de selección de cepas, utilizando en la parte experimental el de célula única por ser el más conveniente. Se introdujeron algunas modificaciones a dicho procedimiento de acuerdo a las necesidades del trabajo.-

3°) Una vez aisladas las colonias se ensayaron los diferentes métodos de reconocimiento y purificación, aplicando medios sólidos y líquidos.-

4°) Se hicieron ensayos con medios de cultivo de composiciones diferentes, tratando de ver si se llegaba a los mismos resultados expuestos por W. Gray.-

5°) Además, se estudiaron las influencias que podrían tener sobre la variación de tolerancia alcohólica las distintas concentraciones del medio, el tiempo de incubación, la temperatura de incubación, etc.,-

6°) Se irradiaron las cepas con luz ultravioleta, utilizando distintos tiempos de irradiación, se determinó la tolerancia alcohólica de las colonias aisladas y transcribieron los resultados de mayor valor dentro de todos los hallados.-



## APENDICE

A continuación se darán los distintos métodos y procedimientos seguidos, en el curso del presente trabajo con el fin de aislar cepas, controlar su pureza y conservarlas.-

### 1°) Aislamiento de cepas.-

#### Método de célula única:

Este método fué desarrollado por E. Chr. Hansen y Alfred Jorgensen (30). Se suspende una cierta cantidad de levadura en agua destilada estéril y acidulada al 1 % en caso de usar ácido sulfúrico y al 10 % tratándose de ácido acético (para facilitar la separación de las células).

Se hacen diluciones decimales, hasta tener aproximadamente 60.000 a 100.000 células por ml. Luego se toma 0,1 ml y se siembra en 10 ml de medio de cultivo con agar, obteniéndose una concentración de 600 a 1000 células por ml aproximadamente.-

Se mezcla bien evitando la formación de espuma, y se separa con una espátula estéril una gota que se deposita en una cámara húmeda, donde el cubre-objeto se encuentra dividido en 16 cuadraditos.-

Se observa al microscopio con aumento 50 a 100 diámetros anotando la ubicación de los sectores donde hay una sola célula.- Después se incuba a 30° C hasta la formación de las colonias.-

En la imposibilidad de conseguir dicho cubre-objeto, se introdujo una modificación al método anterior, la cual se describe a continuación

Se usó un porta-objeto excavado con diámetro de 14 mm. La aislación se efectuó de la siguiente forma.-

Se pasa el portaobjeto por la llama, se extiende aceite en sus bordes y una gota de agua estéril en el centro.- Se cierra con un cubre objeto estéril, en el que se han depositado pequeñas gotitas de suspensión de levadura en medio de cultivo (con un plumín), de acuerdo a las diluciones antes establecidas.-

Se observa al microscopio, con un aumento de 130 diámetros, tratando de localizar gotas con una sola célula.- Una vez obtenidas, se marca en un papel, con un circulito, la posición de las mismas y se incuban a 30°C.- Este método permite seguir el desarrollo de las células de levaduras microscópicamente.-

Después de 24 horas se absorbe la gota con papel de filtro previamente esterilizado (cortado en forma rimbica para que presente puntas) y se siembra en un tubo con medio de cultivo.-

La identificación de las contaminaciones se hace en base al método de White que se detalla a continuación.-

## 2°) Siembra en medio líquido.-

Aconseja White (69) un método diferencial, el cual fué modificado cambiando el extracto Difco por "Extracto de Levadura sin sal".- La composición del medio es el siguiente:

Extracto de levadura sin sal.....	10 gramos
Rafinosa.....	5 gramos
Lactosa.....	10 gramos
Manitol .....	5 gramos
Glicerol .....	5 gramos

Todo se lleva a un litro con agua destilada, se filtra , se coloca en tubos de ensayos (10 ml aproximadamente) y se esteriliza.-

Este método detecta una célula en 0,1 gramo de levadura prensada o centrifugada.-

El procedimiento se basa en el hecho de que, ese medio es inadecuado para la levadura porque no contiene ningún azúcar fermentable; en cambio existen azúcares y sustancias proteicas que facilitan el desarrollo de la mayoría de las bacterias.- Estas concentraciones fueron los resultados de un sinnúmero de trabajos experimentales.-

Hay que evitar durante la inculación de introducir azúcares fermentables que provengan de los medios de cultivo de las levaduras.-

Por consiguiente al procedimiento mas conveniente es el siguiente: centrifugar la suspensión de levaduras y lavarla varias veces con solución salina esteril al 0,5 % de ClNa.-

Las concentraciones óptimas son  $1/10^6$ ,  $1/10^7$ ,  $1/10^8$  gramos de levadura por mililitro de solución salina, inoculándose 1 ml de estas suspensiones.-

Los tubos se dejan de tres a cuatro días, a una temperatura de 28 a 30°C y se observan.- Si no hay contaminación las células de levaduras se depositan en el fondo del tubo de ensayos, el líquido sobrenadante es límpido.- Si hay contaminación se ve una suspensión en el seno del mismo, películas en la superficie, cambio de pH o de color.-

### 3°) Conservación de cepas bajo capa de aceite.-

Se utilizó este método para la conservación de cepas por ser el más conveniente (34,37,38).- Se preparan tubos de ensayos con medio de cultivo a base de extracto de malta (Balling 10), 0,7 % de extracto sin sal y 2,5 de agar, agregando unos centímetros cúbicos de aceite mineral (libre de inhibidores).- Se esterilizan y dejan enfriar en posición oblicua.

Los tubos son inoculados directamente a través del aceite en la superficie del agar y la levadura crece normalmente debajo de aquel.- Se incuban a 30 °C hasta la formación de colonias y conservan en heladera.-

Este proceso reduce las contaminaciones por mohos, dado que estos no pueden crecer en esas condiciones.- Además previene la desecación del agar, haciendo posible conservar las colonias por mas de seis meses.-

Medio N° 1

Glucosa .....	1,25	%
Agua de levadura al 10 % .....	100	ml
pH .....	4,3 a 4,6	

Este medio se preparará, tomando 200 g de levadura prensada (libre de almidón) y suspendiéndole en 200 ml de agua; la mezcla es calentada en autoclave a 120°C C durante 10 minutos.- El líquido es centrifugado, y ajustado su pH - 4,3 , 4,6.- Se debe agregar glucosa en una concentración de 1,25 % y se esteriliza.-

Medio N° 2

Extracto de levadura sin sal .....	0,7	%
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	0,5	%
Glucosa .....	1,25	%
Agua o. s. p. ....	100	ml
pH .....	4,3 a 4,6	

BIBLIOGRAFIA

- 1) A.O.A.C. Methods of Analysis, 1945.-
- 2) Anderson, T. F., and B.M. Duggar. Physiological changes produced in yeast by ultraviolet light. Science 90,358,1939.-
- 3) Atkin, L., W.Moses, and P.P. Gray, Wallerstein Lab. Comm., 12, 39, 1949.-
- 4) Buchta, G., Z.F.B, 41, 349, 1914.-
- 5) Chavarria, A.P., and J.H. Clark. The reaction of pathogenic fungi to ultraviolet light and the role played by pigment in this reaction. Amer. Jour. Hyg. 4, 639-49, 1929.-
- 6) Cook, E.S., and G. Cronin. Studies Inst. Div. Thomac, 3, 205-22 1941.-
- 7) Cook, E.S., and G. Cronin. Nature 150, 93-4 , 1942.-
- 8) Davidson, N.J. Biochem. J. 34, 1537, 1940.-
- 9) Mickson, H. Saltation induced by X rays in seven species of Chaetomium . Annals Bot., 47, 735-54, 1933.-
- 10) Dillon-Weston, W.A.R. and E. T. Halnan. The fungicidal action of ultra-violet radiation. Phytopath. 20, 959-965, 1930
- 11) Dunn, C. G., Wallerstein Lab. Comm. 41, 121-138, 1950.-
- 12) Duraiswami, S.J. Indian Inst, Sci. 34, 107-17 (1952.-
- 13) Duraiswami, S.J. and M.K. Subramanian., Proc. Indian Acad. Sci. 35 B, 155-66, 1952.-
- 14) Fener, Bertram y Tamm, Jour. of Industr. and Engin. Chem., 12,740, 1920.-
- 15) Fink J., Industr. alim. agr., 439, 1956.-

- 16) Flamañd, J., y E. Detelbant. *Chimie Analytique Appliques (Málterrie-Brasserie)* 1938
- 17) Giese, A.C., y W.H. Swanson. *Studies on the respiration of yeast after irradiation with ultraviolet light.- J. Cellular Comp. Physiol.* 30,283-301, 1947
- 18) Glaubitz, M. *Atlas der Gärungsorganismen*, 1932
- 19) Gray, W.D., *J. Bact.* 42,561-574, 1941
- 20) Gray, W.D., *J. Bact.* 49, 445-452, 1945
- 21) Gray, W.D., *J. Bact.* 52, 703-709, 1946
- 22) Gray, W.D., *J. Bact.* 55, 53, 1948.-
- 23) Green, S.R. y P.P. Gray, *W allerstein Lab. Comm.* #3, 357, 1950
- 24) Guillermond A y F. W. Tanner, *The Yeast*, 1920
- 25) Hersberg, B., J. Loefbourow y I. Sizer, *J. Cellular Comp. Physiol.* 40, 269-78, 1953
- 26) Hinrichs, M.A., *Ultraviolet radiation; stimulation and inhibition in lower organisms. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 26, 157-177. 1928
- 27) Holm, J. *Che. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen*, N° 20, 1891
- 28) Holweck, F. and A Lacassagne. *Action sur les levures des rayens X nous (K dur fer). Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)* 103: 60-62 1930.-
- 29) Ingram, M. *AndIntroduction to the biology of Yeast* (1955)
- 30) Jørgensen, A., *Micro-organismus and fermentation.* 1948
- 31) Kilkenny, R., y W. Hinshelwood. a) *Proc. Royal Society B.* 138-375, 1951.-
- 32) Kondrat'eva, T.M. *The protective action of calcium salts against*

- the effect of ultraviolet rays on yeast. *Microbiology (U.S.S.R.)* 8, 899-903 ( in English 904) 1939.-
- 33) Lacassagne, A. Différence de l'action biologique provoquée dans le levures par diverses radiations. *Compt. Rend. Acad. Sci (Paris)* 190: 524-526. 1930.-
- 34) Lindegren, C.C. *Wallerstein Lab. Com m.* 19, 49, 1956
- 35) Lindegren, C.C. *Bact. Revs.*, 9, 111-170, 1945
- 36) Lindegren, C.C. y W. Hamilton. *Bot. Gaz.*, 105, 316, 1944.-
- 37) Lindegren, C.C. y G. Lindegren, *Wallerstein Lab. Comm.*, 12 37-205, 1949.-
- 38) Lindegren, C.C. y M.S. Palleroni, *Wallerstein Lab. Comm.* 16, 52-92, 1953
- 39) Lindegren, C.C. *Congreso Internacional de las Industrias Agrícolas (Paris)* , 1948
- 40) Loefbourow, J.R., S. Oppenheim, O. Loefbourow y Yeats, C. *Biochem. J.* 41-122, 1947.-
- 41) Loefbourow, J.R. , *Biochem. J.* 36 , 631, 1942 a
- 42) Loefbourow, J.R. , *Biochem. J.* 36 , 737, 1942 b
- 43) Loefbourow, J.R., *Biochem. J.* 41 , 119, 19, 1947
- 44) Loefbourow, J.R., A.M. Webb, D.G. Loefbourow y R.K. Abramowitz, *Biochem. J.* 36, 513 , 1942
- 45) Loefbourow, J.R. , C.M. Dwyer, C.M. Cronin. *Biochem. J.*, 35, 603, 1941.-
- 46) Lhiers H, y H Cristoph, *Z.F.B.* 59, 8, 1923.-
- 47) Lutman B.B. *Microbiology*, New York, Mc Graw-Hill Company, 1929
- 48) Mailler, Ch. y S. Grosfilley, *Le controle chimique en Distillerie*, 1939



- 49) Meyerof, O., Wallerstein Lab. Comm. 12, N° 39, 255, 1949.-
- 50) Mitchell, H.K. y R.J. Williams, Biochem. J. 34, 1532, 1940.-
- 51) Madson, G.A., y G.S. Philippov, Action excitante des rayons ultra-violetts sur le développement des levures et des moisissures. Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris) 98, 366-368, 1928.-
- 52) Oster, R.H. Results of irradiating *Saccharomyces* with monochromatic ultra-violet light. I. Morphological and respiratory changes. Jour. Gen. Physiol. 18, 71-88, 1934.-
- 53) Oster, R.H. Results of irradiating *Saccharomyces* with monochromatic ultra-violet light. II. The influence of modifying factors Jour. Gen. Physiol. 18, 251-254, 1934.-
- 54) Phaff, H.J., y E.M. Krak, Wallerstein Lab. Comm. 12, N° 36, 29, 1949.-
- 55) Prescott, S.C., y C.G. Dunn, Industrial Microbiology, 1949.-
- 56) Rogosa, M., J. Bact. 47, 159, 1944.-
- 57) Salle, A.J. Fundamental Principles of Bacteriology 1943.-
- 58) Sarachek, A., y W.H. Lucke Ultraviolet inactivation of polyploid Sacch. Arch. Biochem. Biophys. 44, 271-9, 1953.-
- 59) Sarachek, A. Ultraviolet inactivation of Sacch. during the budding cycle. Expl. Cell. Research. 6, 45-55, 1954.-
- 60) Schreiber, H. Strahlenbiologische Untersuchungen Besonders im ultravioletten Spektralbezirk an *Saccharomyces turbidans* Hansen. Strahlentherapie 49, 541-595, 1934-
- 61) Smith, E.C., Effects of ultra-violet radiation and temperature on *Fusarium*. II. Stimulation. Bull. Torrey Botan. Club 62, 151-164, 1935.-

- 62) Stevens, F. L. The response to ultra-violet irradiation shown by various races of *Glomerella cingulata*. Amer. Jour. Bot. 17, 870-881, 1930.-
- 63) Stiles, H.R., Peterson, W.H., y E.B. Fred, Bact. 12, 428-435, 1926
- 64) Strandskov, F.B., y J.B. Bockelman 1954.-
- 65) Subramanian, M.K., y Spreepatthi, S. Proc. Indian Acad. Sci. 35 B, 1-27, 1952.-
- 66) Tanner, F.W. The Microbiology of Foods. 1944.-
- 67) Von Recklinghausen, M. Purification of water by the ultra-violet rays. Jour. Amer. Water Works Assoc. 1, 565-568, 1914.-
- 68) Webb, A.M., y J.R. Loofbourow. Biochem. J. 41, 114-19, 1947.-
- 69) White, J. Yeast technology 1954.-
- 70) White, J. Wallerstein Lab. Comm. 13, N° 41, 267, 1950.-
- 71) Wit, E. Accion de algunos herbicidas selectivos sobre microorganismos, Tesis, 1953.-
- 72) Woods, R. Yeast 2, N° 5, 1954.-
- 73) Wyckoff, R.W.G., y B.J. Luyet. The effects of X-rays, cathode and ultraviolet rays on yeast. Radiology 17, 1171-1175, 1931.-

*R. H. Whittaker*

*M. J. Luyet*

## I N D I C E

Páginas

### TOLEMANCIA ALCOHOLICA DE LEVADURAS

Introducción	1
Tabla 1. Efecto de la concentración alcohólica sobre el porcentaje de azúcar utilizado.-	4
Definición de tolerancia alcohólica	5
Obtención de muestras y discusión de las técnicas empleadas para la determinación de tolerancia alcohólica.-	7
Influencia de la composición del medio sobre el porcentaje de azúcar consumido.-	
Tabla 2 - Cepa N° 2	9
Tabla 3 - Cepa N° 4	10
Influencia del tiempo de fermentación en la determinación de la tolerancia alcohólica.-	
Tabla 4 - Cepa N° 5	12
Tabla 5 - Cepa N° 1	13
Gráficos N° 1 y N° 2	14
Influencia de la temperatura sobre la determinación de la tolerancia alcohólica.-	
Tabla 6 - Cepa N° 4	16
Gráfico N° 3	17
Ensayos de variación de concentración de azúcar entre los límites 0,969 y 1,29 g/100 ml.-	
Tabla 7 - Cepa N° 2	19
Determinación de la tolerancia alcohólica de levaduras	20
Tolerancia alcohólica de las cepas utilizadas	
Tabla 8 - Cepas N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.	21
<b>IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA</b>	
Introducción	22
Acción del medio de cultivo	25
Acción del tiempo de irradiación	26
Acción de la temperatura de irradiación y de la edad de las colonias.-	26

	<b>Páginas</b>
<b>Formación de sustancias que favorecen el crecimiento</b>	<b>27</b>
<b>Influencia de la radiación sobre la respiración de las células.-</b>	<b>28</b>
<b>Parte experimental</b>	<b>30</b>
<b>Determinación de la tolerancia alcohólica de las colonias provenientes de la irradiación de la cepa N° 1</b>	<b>31</b>
<b>Idem de la cepa N° 2</b>	<b>32</b>
<b>Idem de la cepa N° 3</b>	<b>33</b>
<b>Idem de la cepa N° 4</b>	<b>34</b>
<b>Idem de la cepa N° 5</b>	<b>35</b>
<b>Idem de la cepa N° 6</b>	<b>36</b>
<b>Idem de la cepa N° 7</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>40</b>
<b>APENDICE</b>	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>