

Tesis de Posgrado

Estudio y selección de levaduras aisladas de uvas y mostos de la Provincia de San Juan

Dubos, Roberto A.

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:

Dubos, Roberto A.. (1940). Estudio y selección de levaduras aisladas de uvas y mostos de la Provincia de San Juan. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0287_Dubos.pdf

Cita tipo Chicago:

Dubos, Roberto A.. "Estudio y selección de levaduras aisladas de uvas y mostos de la Provincia de San Juan". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1940. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0287_Dubos.pdf

ESTUDIO Y SELECCION DE LESAMINAS AISLADAS DE UVAS Y MOSTOS
DE LA VITICULTA DE SAN JUAN

Tesis

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

Roberto M. Dabos

Diciembre 5 de 1940

A la memoria de mi Madre

Tesis: 287
[REDACTED]

SUMARIO

I).- INTRODUCCION.-

II).- ANTECEDENTES.-

III).- MATERIAL.-

- a) Uvas.-
- b) Mostos.-
- c) Borrás.-

IV).- MEDIOS DE CULTIVO.-

- 1) Mosto de malta.-
- 2) Mosto de uva.-
- 3) Agar de mosto de malta y de mosto de uva.-
- 4) Bloques de yeso de Hama.-
- 5) Placas de sílico-gal.-
- 6) Medio de Gorodkova.-
- 7) Agua de papa.-
- 8) Medio para fermentación de hidratos de carbono.-
- 9) Utilización de alcohol como fuente de carbono.-
- 10) Utilización de nitratos como fuente de nitrógeno.-

V).- MÉTODOS DE INVESTIGACION.-

A). Aislamientos

- a) En cajas de Petri.-
- b) Por cultivos a la pluma, según Lindner.-

B). Estudio en cultivo puro de los microorganismos aislados.-

1) Características morfológicas.-

- a) Morfología celular.-
- b) Esporulación
 - En bloques de yeso.-
 - En placas de sílico-gal.-
 - En medio de Gorodkova.-
- c) Micelio filamentos.-

2) Características de cultivo.-

- a) Colonias en agar de mosto de malta y de mosto de uva en cajas de Petri.-
- b) Colonias gigantes.-
- c) Desarrollo en mosto de malta y en mosto de uva.-
- d) Desarrollo en agar de mosto de malta y en agar de mosto de uva en estria.-

3) Características fisiológicas.-

- a) Fermentación de hidratos de carbono.-
- b) Utilización de alcohol etílico como fuente de carbono.-
- c) Utilización de nitratos como fuente de nitrógeno.-

4) Características de importancia industrial.-

- a) Rendimiento alcohólico.
Por pérdida de peso en CO₂.-
Por destilación.-
- b) Resistencia al alcohol etílico.-
- c) Resistencia al SO₂.-

VI).- RESULTADOS.-

A.- Agrupación de las cepas por su origen.-

B.- Características morfológicas.-

- 1) Morfología celular.-
- 2) Esporulación.-
- 3) Hifas filamentosas.-

C.- Características de cultivo.-

- 1) Colonias en agar de mosto de malta y de mosto de uva en cajas de petri.-
- 2) Colonias gigantes.-
- 3) Desarrollo en mosto de malta y mosto de uva.-
- 4) Desarrollo en agar de mosto de malta y de mosto de uva en estrías.-

D).- Características fisiológicas.-

- 1) Fermentación de hidratos de carbono.-
- 2) Utilización de alcohol etílico como fuente de carbono.-
- 3) Utilización de nitratos como fuente de nitrógeno.-

E.- Características de importancia industrial.-

- 1) Rendimiento alcohólico.-
- 2) Resistencia al alcohol etílico.-
- 3) Resistencia al SO₂.-

VII).- CLASIFICACION DE LAS LEVEDURAS ESTUDIADAS.-

- 1) Levaduras del tipo *S. cerevisiae-ellipsoideus*.-
- 2) Otros tipos de levaduras.-

VIII).- CONCLUSIONES.-

IX).- RESUMEN.-

BIBLIOGRAFIA.-

ILUSTRACIONES.-

I).- INTRODUCCION.- (*)

El autor ha elegido este tema de tesis por considerar que existe un gran campo de acción hasta ahora casi completamente inexplorado en la elaboración racional del vino en la República Argentina y en el estudio de esta rama de la Microbiología aplicada.-

A pesar de ser la industria vitivinícola la más importante de la zona cuyana, poco o nada se ha hecho hasta el presente para el mejoramiento de la calidad del vino, en cuanto a la utilización de levaduras seleccionadas se refiere; y si estas han sido empleadas, lo fueron circunstancialmente, en la mayoría de los casos con cepas traídas del extranjero, y no con las aisladas en el país.-

No es muy alentador comprobar que lo dicho por Lejeune (12) en 1915 pueda aplicarse exactamente en nuestros días:

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

(*) El autor se complace en agradecer al Prof. Dr. Alfredo Sordelli por haberle permitido efectuar este trabajo en el Instituto Bacteriológico poniendo a su disposición todo el material y el lugar ^{necesario} ~~de trabajo~~ para realizar las experiencias, así como por sus muy valiosos consejos. Agradece también al Prof. Ing. Agr. Santos Soriano, bajo cuya dirección se ha efectuado ^{investigación} ~~al presente trabajo~~. Por último, está muy reconocido a la Srta. Julia E. Sarmiento por su ayuda en cuanto a la redacción y ordenación del trabajo se refiere.-

2

La reciente creación de la Universidad de Cuyo es un motivo de esperanzas para creer que en su Escuela de Agronomía o en su Liceo Agrícola se investiguen metódicamente los problemas relacionados con la elaboración racional del vino y que en un futuro próximo las levaduras indígenas seleccionadas sean empleadas comúnmente en la citada industria.-

II).- ~~ANTICORRUPCIÓN~~

En la historia de la fermentación alcohólica debe diferenciarse entre las investigaciones que han tenido por objeto determinar las modificaciones químicas del medio fermentescible y las que estudian las causas del fenómeno.

Sylvius de La Bõe(a), en 1669, determinó la analogía existente entre el gas que se desprende de la fermentación y el que se obtiene mediante el ataque de los carbonatos por la acción de los ácidos.

En 1682, Becher(b), reconoció que sólo las materias azucaradas son susceptibles de fermentar, diferenciando este fenómeno del de la putrefacción, semejante en su mecanismo pero cuyos productos finales son diferentes.

Posteriormente Lavoisier estudió el fenómeno aplicándole el método de las pesadas y mediante su genial principio de "nada se crea, nada se pierde, todo se transforma", llegó a determinar la composición de los cuerpos que entran en la reacción estableciendo la igualdad:



Stahl, en 1697, explicó el fenómeno. Sabroni en 1797, indicó que la fermentación es debida a la presencia de una substancia nitrogenada en el medio, substancia semejante al gluten en la harina de trigo.

Thenard(c), en 1803, dijo que en todas las fermentaciones hay un depósito semejante, en su aspecto, al fermento de la cerveza de naturaleza azoal, rico en nitrógeno y que da NH₃ por destilación.

Gay-Lussac en 1820, observó que las materias azucaradas, calentadas a la temperatura del agua hirviendo en vasos que se cierran herméticamente, no se descomponían; dicho autor creía que la fermentación no se producía luego, debido a la falta de aire.

Para todos estos autores citados, la fermentación representaba un fenómeno puramente químico, sin intervención de fuerza vital alguna. Sin embargo,

ya en 1680 Leeuwenhoek, con ayuda del microscopio, recientemente inventado, había descubierto pequeñas partículas en los depósitos de líquido.

(a) Sylvius de La Bõe.- (b) Becher.- (c) Thenard, Annales de Chimie T. XXVI p. 247.- Citados por Ventres en (22).-

ción que dichas partículas podían tener en la fermentación.

Recién en la época en que Cagnat-Latour(d), en Francia, y Schwann(e) y Kützing(f), en Alemania, realizaron sus trabajos, se llegó a establecer una relación entre el fermento de la fermentación y las células redondas, cuya reproducción se efectuaba por brotación, que se encuentran en el medio. Los autores alemanos probaron que la materia fermentescible quedó inerte, cuando después de ser llevada a ebullición y enfriada, se le hizo llegar aire caliente, refutando de este modo la hipótesis de Gay-Lussac quien atribuyó a la falta de aire el detenimiento de la fermentación.

Pero quien realmente puso en su verdadero lugar todo cuanto se refiere a la fermentación alcohólica, es el eminente sabio francés, gloria de la Microbiología, el ilustre Dr. Pasteur, cuyos trabajos a este respecto pueden resumirse en la siguiente frase: "La fermentación alcohólica es un fenómeno vital e de nutrición intracelular". Él fue quien estableció las bases para el estudio mediante los cultivos con los cuales pudieron determinarse la morfología y fisiología de los organismos, fundamentando de este modo la acción específica que les corresponde(13)

Posteriormente Rees determinó la formación de endosporas en varias especies Hansen(7) perfeccionando los métodos de Pasteur, llegó a la obtención de los cultivos unicelulares estableciendo los fundamentos de la sistematización. En 1904 propuso una clasificación, completada posteriormente por Kildner y por Lindner, y hasta el día por los recientes trabajos de Stalling Deldor(13) y de Lodier(15).

Actualmente los países que marchan a la cabeza en cuanto a esta rama de la ciencia se refieren, con Alemania, Inglaterra, Estados Unidos y Holanda, en su aplicación a la cervecaría y destilería. Merecen destacarse

(d) Cagnat-Latour, Mémoire sur la fermentation vineuse. Ann. d. chimie et de physique. 1832. - (e) Schwann, Annales 1837, T. XII, p. 184. - (f) Kützing, Journ. für prakt. Chem. XI, pag. 335. - Citados por Venturo J. en (22), pag. 55-56. -

los trabajos realizados en Francia, Italia, y España, países que se destacan en la producción de vino finos y comunes.

En nuestro país pocos son los trabajos realizados hasta el presente, mereciendo destacarse los realizados por Paccotet (17) y por Magistochi (18), quienes encararon sus investigaciones desde el punto de vista de la elaboración industrial de los vinos, y las normas a seguir en la misma; desde el punto de vista que nos interesa especialmente, citaremos el trabajo "Estudio de las levaduras vínicas de Mendoza" realizado por Luis M. Lejeune (12). Este es un trabajo muy interesante, ya que inicia su estudio desde la cuidadosa recolección de las muestras llegando a la obtención de más de 30 cultivos de levaduras esporuladas con características óptimas para su posterior aplicación en la industria. Como conclusión, el autor encuentra varias razas de levaduras entre las cuales dos se destacan por su poder de aglutinación, resistencia a elevadas temperaturas, y alto grado alcohólico de los vinos obtenidos.

Otro trabajo efectuado en el país es el realizado en 1929 en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires por el Ing. Agr. Julio A. Passe, titulado "Contribución al estudio de las levaduras del Alto Valle del Río Negro" (18). El aislamiento de las especies fue obtenido por el método de las diluciones sucesivas en cajas de Petri, y purificación posterior por siembra en superficie. Fue la orientación industrial a la cual el autor dedicó su especial atención y es por ello que determinó por el método de Buchner la actividad fermentativa en diversas condiciones.

Por último, y como primer trabajo realizado en el país íntegramente con cultivos puros unicelulares, merece destacarse el de Pedro Delvit "Levaduras vínicas de las uvas de Mendoza con las cepas puras unicelulares" realizó un estudio detallado determinando por último algunas características de importancia industrial, habiendo encontrado varios tipos de levaduras buenas fermentadoras, entre las cuales predomina una raza de rápida fermentación, alto rendimiento alcohólico y de gran poder clarificante. Además, y por la resistencia al alcohol de las levaduras de las

tipo Intermedio, Torula y Mycoderma, ^{uno}recomienda la fermentación llamada supercuatro. (2)

III).- MATERIAL.-

El material, del cual posteriormente, fueron aisladas las levaduras, procede de los viñedos y bodega que la Soc. Anón. Del Bono Ltda. posee en la localidad de Las Casuarinas, Departamento 25 de Mayo, Provincia de San Juan.

a) La uva fué mandada desde su lugar de origen en bolsitas de papel, previamente esterilizadas, y recolectada de la manera más aséptica posible y envasada en pequeños cajones rellenos de paja o aserrín; se eligieron las uvas que llegaron completamente secas. A su llegada al laboratorio (48 horas después de su recolección), se las colocó en frascos de vidrio previamente esterilizados (botellas de crema de leche), se trituraron y llevaron a estufa (*) por espacio de 24 a 48 horas, con el objeto de provocar el desarrollo de las levaduras.

b) El mosto fué enviado en frascos de los empleados para solución fisiológica (100 cc.), los cuales se remitieron desde el Instituto Bacteriológico, convenientemente esterilizados, así como también los tapones de corcho que fueron envueltos en papel por separado. Los frascos venían con su correspondiente tapón de corcho atado, para evitar que saliera el mismo debido al estado de fermentación en que se hallaba el mosto. Dicho mosto fué recolectado de la superficie y de las partes medias e inferior de las piletas a los 8 días de empezada la cosecha.

c) Las barras fueron mandadas en frascos semejantes a los de los mostos y en la misma forma que estos últimos, cuando se realizó el primer trasiego, es decir, tres meses después de iniciada la fermentación tumultuosa.

- - - - -

(*) Todas las incubaciones del presente trabajo han sido realizadas en estufa de 28°C., salvo en los casos especiales que se indicarán.

IV).- MEDIOS DE CULTIVO.-

1) Mosto de malta.-

Se ha preparadosegún la modificación hecha por Soriano(20) al método de Harnberg(*),procediendo de la siguiente manera:

- "Harina de malta libre de raicillas,secada y molida. . . . 250grs.
- "Agua corriente litro.

"Se calienta el agua a 50°C.,se agrega la malta y se mantiene a baño María a 45°C.durante media hora,con el objeto de facilitar la difusión de las diastasas;se aumenta luego la temperatura hasta 60-62°C.en el espacio de media hora,y luego se mantiene esta por una hora más para efectuar la sacarificación del almidón.Se prueba por la reacción del iodo si todo el almidón ha sido transformado,en cuyo caso no debe dar coloración azul(aunque después de un rato se obtiene casi siempre una coloración débilmente azul a casusa de que hay granos de almidón en la harina gruesa,dificiles de atacar).Si se produce una coloración intensa,se prolonga el calentamiento a 60-62°C.hasta el momento en que no se obtiene reacción manifiesta con el agua de iodo(lo cual requiere, muchas veces,unas tres o cuatro horas).Al final se pasa todo por un lienzo para separar la parte sólida(granos gruesos,glumelas,etc.)estrujando fuertemente,y al líquido con el precipitado fino enfriado a 50°C.se le agrega una clara de huevo(batida en igual volumen de agua)y se lleva al autoclave a precipitar a 100°C.por media hora.Se filtra por papel se prueba la densidad con un sacarímetro y se diluye hasta 10°Brix o Balling(o con un densímetro hasta 10 % de azúcar).Luego se reparte y se esteriliza por tyndalización a 100°C.por media hora cada vez y durante tres días consecutivos"

En nuestros caso hemos realizado la esterilización calentando a 110°C por espacio de media hora,recemplazando de este modo la tyndalización,y obteniendo buenos resultados.



(**) Handbuch der Gärungsbakteriologie.2 ed.2 vol.P.Parey,Berlin.1926,citado por Soriano en(20).

2) Mosto de uva.-

Se toma uva fresca, se la pisa mediante una mano de madera en un recipiente enlozado y luego se la exprime para obtener la mayor cantidad de jugo posible. Por razones de comodidad la extracción del jugo se hizo mediante el empleo de una macrocentrífuga del tipo *convasto* y medidas siguientes: *Jíametro: 1 mt.; altura: 0.50 c., 850 r.p.m* (empleada en el Instituto Bacteriológico para la obtención de la insulina); la cual consiste en un gran recipiente cilíndrico dentro del cual se coloca un paño, sobre el que se deposita el material de tal manera que la separación del jugo se obtiene por una combinación de filtración y centrifugación. El líquido obtenido se coloca en frascos de 6 litros de capacidad (para mayor seguridad se vierten sólo 5 litros) y se esteriliza a 110°C. por 15 minutos. A medida que se utiliza este medio se lo pasa por papel de filtro común y se diluye hasta una densidad de 5.7°Bé., que equivalen, en tenor de azúcar, a 10°Brix (10 % de azúcar). Se reparte en tubos de ensayo y se esteriliza a 110°C.-115°C. por espacio de 15 minutos.

Si no se necesita toda la cantidad filtrada, se coloca el líquido filtrado y no diluido en frascos de 1 litro y se esteriliza como se indicó anteriormente.

3) Agar de mosto de malta y de mosto de uva. - $\frac{1}{2}$

Al medio de malta o de uva, líquido, se añade agar cortado en pequeños trozos en la proporción del 2%, se calienta a 110°C (con objeto de disolver el agar) por espacio de media hora; se filtra el líquido en caliente por algodón, se reparte en tubos, se esteriliza a 110°C. por 15 minutos. La cantidad que se vierte en cada tubo depende del uso a que destinan estos medios; para tubos sería 3-5 cc., para punción, alrededor de 7-10cc.

4) Bloques de yeso de Hansen $\frac{1}{2}$

Se ha modificado ligeramente la técnica *común* descrita por Soriano $\frac{1}{2}$ y

 $\frac{1}{2}$ descrita la preparación del agar de mosto de malta por Soriano en
 $\frac{1}{2}$

procediendo de la siguiente manera: Se preparan bloques de yeso en forma de cono truncado invertido con las siguientes medidas aproximadas: diámetro superior, 5 c., diámetro inferior 4 c., altura 1 c., de manera que quepan en las cajas de Petri. La base mayor se divide en cuatro partes para permitir el ensayo simultáneo del mismo número de cultivos; los bloques secos se colocan en cajas de Petri y se llevan a estufa seca a 140°C. durante 3 a 4 horas.

5) Placas de sílice-gel.-

Se ensayó el método descrito por Castelli-Tomasso (*) basado en el empleo de la sílice galatinosa. La constitución del medio es la siguiente:

Se prepara la sílice mezclando volúmenes iguales de HCl (Densidad: 1.0075) y silicato de Na (Densidad: 1.06); la mezcla se vierte en cajas de Petri en cantidad de 10 cc; se dejan transcurrir 24 horas para permitir el endurecimiento del medio, y se siembra.

6) Medio de Gorodkova.-(*)

La constitución del medio es la siguiente:

Peptona	10 grs.
Cloruro de sodio.	5 grs.
Glucosa	2.5 grs.
Agar	10 grs.
Agua destilada.	1 litro.

Se disuelve la peptona, la sal y la glucosa en el agua, en caliente; se hace hervir un rato para precipitar, se filtra por papel, se agrega el agar cortado en pequeños trozos; se lleva al autoclave a 110°C. por 15 minutos para disolverlo; se pasa por algodón, se reparte y esteriliza a 110°C. por 15 minutos.

7) Agua de papa.-

Se empleó el agua de papa al 0.2 %, según la técnica de Talice (*) indicada a continuación: Se pela una papa, se corta finamente, se hace hervir durante 2 a tres horas, se filtra y entuba; se esteriliza a 115°C. por 15 minutos y se siembra cuando el medio está frío.

(*) Gorodkova A. A. Bull. Jard. Imp. Bot. St. Petersburg. 8:165. 1908, citado por Soriano en (20).

(*) Talice R. V. Sur la filamentation des monilla. Ann. Parasitologie 8:394-

11

8) Medio para fermentación de hidratos de carbono.-

se empleó el medio de cultivo de cultivo de Kulp y Rettger(11) y de Hunt y Rettger (9), modificado por Soriano(20) y detallado a continuación:

a) Preparación de agar blando en medio nutritivo básico privado de azúcar, cuya composición es la siguiente:

Caseína digerida	100 cc.
Caldo de extracto de carne	900 cc.
Bromo cresol púrpura (en sol. alcohólica al 1.6%)	1 cc.

La caseína digerida se prepara disolviendo poco a poco y en caliente 100 grs. de caseína en polvo en un litro de agua destilada conteniendo CO_3Na_2 al 1 %. Se deja enfriar a 40°C.; se añade 0.5 a 1 gr. de tripsina fresca activa disuelta en un poco de agua destilada; se mezcla bien, se añaden 10-20 cc. de cloroformo, se coloca un tapón de algodón que se cubre con papel, se ata y lleva a estufa de 37°C. por espacio de 48 a 72 horas, agitando de tanto en tanto. Cuando la caseína está bien digerida, lo cual se ve por el aclaramiento casi total y el color amarillo del líquido, se neutraliza la alcalinidad del medio con HCl hasta obtener con el Bromo Cresol Púrpura un color ceniza (no violado ni amarillento), se calienta hasta 100°C. para eliminar el cloroformo, se deja entibiar a 50°C., se añade clara de huevo y calienta en autoclave a 115°C. por espacio de 15 minutos para coagular, se filtra, reparte en porciones de 50-100 cc., y se calienta a 110°C. por 20 minutos.

El caldo de extracto de carne se prepara de acuerdo a la fórmula del Manual of Methods(24) de la Sociedad de Bacteriológos Americanos disolviendo 3 grs. de extracto de carne (Liebig) y 5 grs. de Peptona Witte en 900 cc. de agua destilada (en nuestro caso se empleó Peptona Parke Davis y luego Difco, obteniéndose resultados satisfactorios en ambos casos)

Para el medio definitivo se llevan 100 cc. de caseína digerida hasta 1 litro mediante agua destilada, se añaden 4.5 grs. de Peptona, 2.7 grs. de extracto de carne; se arregla la reacción aun pH aproximado de 7, se coloca en autoclave el medio y se lleva a 115°C. por 15 minutos para pasteurizar,

(*) 410, citado por Soriano en(20).

se filtra, añade el agar cortado en pequeños trozos (en la proporción de 5 por mil) y luego el indicador; se lleva a 110°C. por 15 minutos para disolver el agar, se filtra por algodón, se reparte, en tubos en cantidad de 8-10 cc., y se esteriliza a 110°C. por 15 minutos.

b) Preparación de una solución acuosa al 10 % de cada uno de los azúcares que se ensayan. Estas soluciones se reparten en ampollas de 1 cc. y se esterilizan por tyndalización. En el momento de usarse se saca el líquido de la ampolla y se vierten una o dos gotas en cada uno de los tubos empleados en el ensayo (el contenido de cada ampolla sirve para 20-25 tubos).

9) Utilización de alcohol.-(19)

La composición del medio empleado está dada a continuación, según la técnica de Stelling-Dukker:

Sulfato de amonio	0.1 %
Fosfato monopotásico	0.1 %
Sulfato de Magnesio	0.05 %
Alcohol etílico	3.0 %
Agua corriente	100 cc.

Se prepara el medio sin alcohol, se distribuye en tubos mediante una bureta aforada, en cantidad de 10 cc. por tubos; se esteriliza a 110°C. durante 15 minutos, una vez frío se agrega el alcohol de manera a tener una concentración de 3 % en cada tubo.

10) Utilización de nitratos.-(19)

Se utilizó el medio de Stelling-Dokker(19) y su técnica correspondiente; la constitución del medio es la siguiente:

Nitrato de Potasio	0.1 %
Sulfato de Magnesio	0.05 %
Fosfato monopotásico	0.1 %
Glucosa	2.0 %
Agua destilada	100 cc.

Se distribuye el medio en tubos (10 cc. por tubo), se esteriliza a 110°C. por 15 minutos; se deja enfriar y siembra con cultivo fresco.



V).- METODOS DE INVESTIGACION.-

A.- Aislamientos.-

Los frascos conteniendo las uvas, mostos y borras, se colocaron en estufa durante 48 horas y luego se procedió a su siembra en cajas de Petri conteniendo agar de mosto de malta (o de uva), para los aislamientos que se llevaron a cabo en la siguiente forma:

a) En cajas de Petri.

Se siembra una pequeña cantidad de la muestra en la superficie de una caja de Petri conteniendo agar de mosto de malta (o de uva) mediante una asa de platino, y con una espátula de vidrio se extiende dicho material en estrías, hasta seis por caja, de acuerdo con el método de Beijerinck (*). Se pone a incubar en estufa durante 24 horas al cabo de las cuales se pican las colonias que ofrecen alguna diferencia apreciable por su tamaño o aspecto. Estas colonias se siembran en nuevas cajas de Petri, y se aíslan las más características haciendo una tercera y última siembra; finalmente se pican las colonias diferentes y se las siembra en tubos estría de agar de mosto de malta (o de agar de mosto de uva).

b) Por cultivos a la pluma, según Lindner (*).

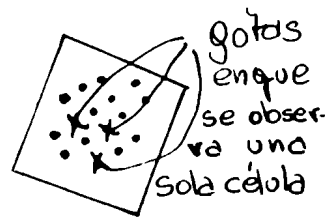
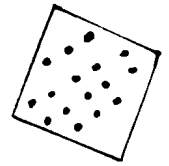
Por el procedimiento anterior se obtienen cultivos puros, posiblemente a partir de una sola célula; pero para tener la certeza de que estos sean unicelulares, es menster recurrir a la técnica de Lindner¹ descrita por Soriano en (20), que detallaremos a continuación

Con un asa platino se toma una pequeña cantidad de material y se lo diluye en 5 cc. de mosto de uva estéril colocados en tubo de ensayo; se agita bien, se toma 1 cc. de esta dilución y se le agregan 4cc. de mosto de uva estéril. Mediante un capilar (pipeta Pasteur afinada en su extremidad) se deposita una pequeña cantidad de esta dilución sobre un plumín (de los empleados para dibujar con tinta china), el cual servirá

(*) Modificado por Soriano y descrito en (20) pág. 247.

(*) Descrito por Soriano en (20).

para depositar las gotas sobre un cubreobjeto de 13 x 13 e., de modo que se tengan cuatro hileras de gotas dispuestas en tal forma que la primer hilera conste de tres gotas, la segunda y tercera de cinco gotas cada una y la cuarta de tres gotas (ver esquema adjunto). El cubreobjeto flameado a la llama antes de trazar las gotas, se invierte y coloca sobre un portaobjetos excavado. Para que la adherencia entre cobre y porta sea lo más perfecta posible, se traza un aro de vaselina alrededor de la excavación del porta; una vez colocado el cobre, se pasa el pincelito con vaselina sobre los bordes de éste para evitar ulterior infección y desecamiento del preparado. Se observa al microscopio cada una de las gotas de la diagonal vertical contando el número de células observadas en cada gota; el promedio de las cuatro gotas nos dará la dilución aproximada que deberemos hacer para que en un nuevo preparado tengamos por lo menos una gota con una sola célula. Se marcan las gotas en que se observa una sola levadura y se coloca en estufa durante 24 horas. Para facilitar la operación se dibuja un esquema de las gotas sobre un papel y en este se marcan las que nos interesan (ver esquema adjunto). Si hubo desarrollo se pica una de las gotas marcadas con un microcapilar de vidrio y se siembra en un tubo de mosto de malta o de uva; al cabo de 24 horas se siembra en agar estria (de malta o de uva).



B.- Estudio en cultivo puro.-

1. Características morfológicas

a) Morfología celular.

Se observó las formas de las células en cultivos de 24 horas provenientes de agar de mosto de malta. Se hizo la observación en cultivos de adhesión de mosto de uva, y mediante el microscopio binocular Zeiss con un aumento de 1000 diámetros (Objetivo 15 x ; ocular 40). Los dibujos se hicieron con ayuda de la cámara clara de Abbe.

b) Esporalación.

Para observar la formación de esporas se emplearon los siguientes métodos:

1) El de los bloques de yeso de Hansen. ¶ ¶

Se dejan enfriar los bloques y coloca una o dos gotas del depósito del cultivo de la levadura en mosto de uva (*). En el fondo de la placa de Petri se vierte una pequeña cantidad de agua estéril para mantener el grado de humedad conveniente. Se lleva a estufa y observan los cultivos haciendo preparados entre porta y cubre, a partir de las 24 horas, mediante el agregado de una gota de agua. La observación se hizo diariamente hasta el séptimo día; hasta quince días se observó cada tres; entre 15 días y un mes, una vez por semana.

2) En placas de sílico-gel de Castelli Tomasso. (/)

Se ensayó el método descrito por Castelli Tomasso basado en el uso de la sílice gelatinosa; cuando el medio ha adquirido la suficiente consistencia, se procede a la siembra de los cultivos como en el método anterior. La caja se divide en ocho partes y ensaya igual número de cultivos.

Se hicieron pocos ensayos ya que este método no presenta ventaja alguna sobre el de los bloques de yeso en lo que se refiere a preparación del medio, economía de tiempo, material, etc. En cambio presenta el inconveniente del mayor peligro de infección de los cultivos.

3) En el medio de Gorodkova. ¶ ¶

Este método se ensayó con aquellas levaduras que no formaban esporas en bloques de yeso. El ensayo se hace en cajas de Petri, dividiendo la superficie del agar en ocho sectores (lo cual se consigue fácilmente marcando el fondo de las cajas, desde el exterior, con líneas trazadas

() ~~El medio utilizado en la siembra citada por Soriana en ¶~~

(*) ~~Citadas por Soriana en ¶~~

(*) La levadura a ensayar proviene de un cultivo sembrado 24 horas antes en mosto de uva, el que a su vez proviene de otro cultivo fresco de tal modo que todas las células sean jóvenes y estén en el máximo de su desarrollo al ser colocadas en los bloques de yeso.

con lápiz para vidrio), cada uno de los cuales se siembra con un cultivo proveniente de agar de mosto de malta o de uva. También aquí, desde las 24 horas en adelante se hacen preparados de los cultivos para observar la aparición de esporas.

c) Micelio filamentososo.-

Se empleó la técnica de Talice ~~descrita por~~ ^{descrita por} ~~W. S. Kuntz~~ (20).

La observación se hace a las 24 y 48 horas mediante un preparado entre cobre y porta. En los casos de duda se hacen cultivos de adhesión empleando el mismo medio y se observa la formación del pseudo micelio por espacio de 5 a 6 días.

2) Características de cultivo.-

a) Colonias en agar de mosto de malta y de mosto de uva en cajas de Petri. (20)

Se siembra una pequeña cantidad del cultivo fresco sobre la superficie de una caja de Petri mediante un asa de Platino y se extiende con la espátula de Beijerinck. Se observan las colonias a las 24 y 48 horas. La constitución del medio empleado está dada en el capítulo IV de medios de cultivo.

b) Colonias gigantes.-

Se hace este ensayo en frascos de solución fisiológica conteniendo agar de mosto de malta en cantidad tal que se tenga una capa de tres c. de profundidad, se esteriliza a 110°C. por 15 minutos; se coloca en estufa durante 24 horas hasta que la capa superior esté completamente seca. Se siembra mediante un hilo de platino, tocando suavemente el centro de la superficie del agar, se lleva a estufa durante tres o cuatro días y luego se deja a temperatura ambiente. Se observa el desarrollo al cabo de 15 días y al mes. La sola diferencia notada entre estas dos observaciones es la de un aumento de tamaño.

17

c) Mosto de malta y mosto de uva.-

Se siembra el cultivo fresco en mosto de malta y en mosto de uva y se hacen las observaciones a las 24 y 48 horas. (Ver preparación de este medio en el capítulo IV).

d) Agar de mosto de malta y de mosto de uva en estria.-

Se siembran los cultivos fresco en las tubos estria (cuya composición ha sido dada en el capítulo IV) de agar de mosto de malta y de mosto de uva y se hace la observación a las 24 y 48 horas.

3) Características fisiológicas.-

a) Fermentación de hidratos de carbono.-

Con el medio de agar blando nutritivo básico y las soluciones esterilizadas de azúcar a utilizar, ya descriptos en el capítulo IV y preparados de acuerdo con las técnicas de Kulp y Rettger⁽¹¹⁾ y de Hunt y Rettger⁽⁹⁾, modificadas por Soriano⁽²⁰⁾, se ha seguido la técnica que detallamos a continuación, dada también por Soriano en ξ ξ :
por el último autor mencionado

a) Esterilización de tubos (12 x 1) tapados con algodón en número suficiente como para ensayar simultáneamente la acción de las cepas aisladas sobre cada uno de los hidratos de carbono utilizados.

Para casos como el presente en que debe probarse el comportamiento de un gran número de cepas sobre una gran cantidad de azúcares se empleó la técnica de Soriano⁽²⁰⁾: Al efectuar el ensayo se preparan tantos lotes de tubitos como número de azúcares se han de ensayar, estando compuesto cada lote de un número de tubitos igual al número de cepas que se sembrarán en el día, más un tubo para el control de esterilidad por cada azúcar. Los tubitos de cada lote se marcan con una misma cifra romana indicadora de la sustancia que se ensaya. A continuación se reparten en estos tubos los azúcares a probar (ver en los medios). Una vez repartidos los azúcares, se forman nuevos lotes cada uno de los cuales está compuesto por un tubo de cada azúcar y un tubo vacío para el control de pureza del cultivo; a cada grupo le corresponderá el número del

cultivo respectivo, el cual se indica con cifras arábigas. El lote sobrante se utilizará como control de los hidratos de carbono empleados. Por último se utiliza un tubito conteniendo sólo el medio básico que sirve para controlar la pureza bacteriológica de dicho medio. Tanto en es tubo, como en los que contienen azúcar y medio, y en los que contienen medio con cultivo (pero sin azúcar) no deberá producirse fermentación alguna.

b.) Se licúa el medio básico haciendo hervir en baño María, y luego dejando enfriar hasta 50°C. Cada tubo del medio básico licuado y entibado se siembra con una pequeña porción de cada una de las cepas a ensayar, provenientes de sus respectivos cultivos frescos.

c.) Hecha la siembra del cultivo activo de la cepa a ensayar, el medio básico así sembrado se mezcla bien y se reparte en los tubitos con la ayuda de una pipeta graduada y en cantidad de un cc. por tubito. Se colocan todos los tubos en gradillas de metal (con capacidad para 200 tubos de 20 x 10 c.) separados convenientemente para facilitar la lectura y se llevan a estufa, revisandolos cada 24 hora durante 6 días.

Un viraje total del indicador indica una buena producción de acidez, mientras que un viraje incompleto es signo de acidificación débil. La producción de gas, cuando existe, se ve por la formación de burbujas en el seno del agar blando.

Los controles de cultivos sin azúcares no deben virar y los de azúcares sin siembras de cultivos no deben dar desarrollo alguno.

b) Utilización de alcohol etílico como fuente de carbono.

Se prepara el medio de Stelling Dekker (19) cuya composición ha sido dada en el capítulo anterior, se siembra con el cultivo fresco y se observa a las 24 y 48 horas. Es conveniente emplear tubos de control sin el agregado de alcohol para poder observar mejor el desarrollo.

c) Utilización de nitratos como fuente de nitrógeno.

El medio descrito en el capítulo anterior, también de Stelling-Dekker (19), se deja enfriar y se siembra con cultivo fresco; se observa a las 24-48 horas y tres días. Conjuntamente con el ensayo anterior se siem-

han los mismos cultivos en el medio ya descrito pero sin el agregado de nitrato de potasio, con el fin de poder comparar la eficiencia de los nitratos como fuente de nitrógeno. Sólo en los casos en que se nota apreciable diferencia se deben dar por positivos lo cual no es dable observar muy claramente.

4) Características de importancia industrial.

a) Rendimiento alcohólico.

1 Por pérdida de CO2.

Se colocan 250 cc. de mosto de uva filtrada (aproximadamente de 15°Bé.) en Erlenmeyer de 500 cc., se le adapta un dispositivo especial (ver fotografía) y se esteriliza a 110°C. por 15 minutos. Una vez frío el medio, se siembra con el cultivo fresco y se pesa. Se coloca en estufa; al día siguiente se vuelve a pesar; esta operación se realizará cada 24 horas cada 15 días.

El método original de Lejeune (12) indicaba el pasaje de aire para arrastrar el CO2 antes de cada pesada, pero esta operación no se ha efectuado ya que el error que se comete es mínimo; en cambio se reemplazó dicha operación por la de la agitación del recipiente antes de cada pesada. La cantidad total de CO2 desprendido se reduce a 100 y se multiplica por el factor 1.15 para tener el equivalente alcohólico en peso, mediante las tablas se tiene el equivalente alcohólico en volumen %.

2 Por destilación.

Para mayor exactitud se determinó la cantidad de alcohol por destilación y densidad del destilado mediante la balanza hidrostática.

Para la determinación se procede de la siguiente manera: Se toman 100 cc. del líquido fermentado, se destila en sus dos terceras partes, completando el volumen con agua destilada (hasta 100 cc.). Mediante la balanza de Mohr y Westfal se determina la densidad a 15°C/, y con ayuda de las tablas (8), tendremos el equivalente alcohólico.

El rendimiento alcohólico determinado por pesada ha sido en ge-

neral mayor que el tomado por destilación, siendo ello debido a que por el segundo procedimiento se determina la cantidad exacta de alcohol contenida en el líquido; en cambio, por el primer procedimiento, hay un error por exceso debido a que todo el CO₂ perdido no proviene sólo de la fermentación de acuerdo con la sencilla ecuación:

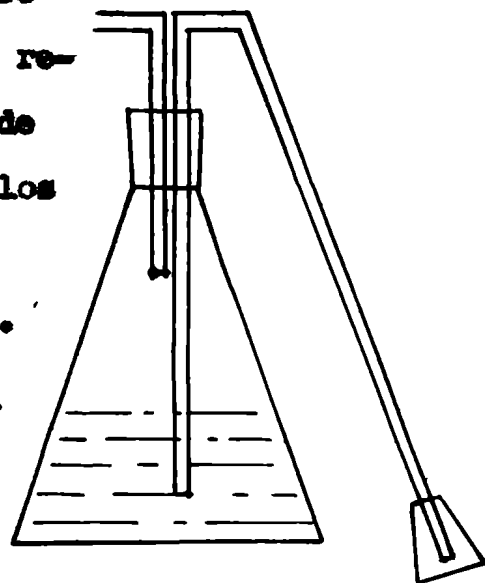


sino también de la descomposición de los ácidos orgánicos (tartárico, málico, etc) existentes en el mosto, y además de las fermentaciones secundarias.

b) Resistencia al alcohol etílico.-

Se determina la capacidad de resistencia al alcohol sembrando los cultivos en mosto de uva sin diluir (15°Bé) al cual se agregaron cantidades variables de alcohol de modo a tener una serie de cinco términos en la cual el primer término es 1, la razón geométrica 1.3, y el último término 15.4 .

La técnica empleada es la siguiente: Se esteriliza un litro de mosto de uva a 115°C. por 15 minutos en un aparato especial (ver esquema adjunto), una vez frío se le añade la cantidad de alcohol correspondiente y se reparte en tubos de ensayo en cantidad de 5-7 cc. Se repite esta operación con cada uno de los términos de la serie y luego se siembran todos los tubos con los cultivos a ensayar. Se deja un tubo de cada serie sin sembrar para control de esterilidad del medio. Se observa luego el desarrollo cada 24 horas por espacio de 6 días, dando como positiva la reacción cuando se observa actividad fermentativa, o en su defecto un gran aumento del depósito, o enturbiamiento del líquido y formación de velo.



c) Resistencia al SO₂.-

Tanto el dispositivo como la técnica y observaciones se hacen ~~como~~ tamente como para el ensayo anterior, empleando SO₂ bajo la forma de metabisulfito en vez de alcohol etílico. En este caso las series son cuatro y el primer término es de 0.625 mgrs/litro. Para los cálculos se parte de la base que un gramo de metabisulfito desprende 0.5 grs. de SO₂ según lo establece Ventre(12).

VI).- RESULTADOS.-A) Origen de las cepas.

Uva moscatel (55 cultivos): 2 - 3 - 8 - 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 29 a 31 - 33 - 35 a 37 - 40 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 67 - 69 a 80 - 22(a) - 34(b) - 47(?) .-

Mosto de uva moscatel (28 cultivos): 119 a 122 - 124 a 131 - 133 - 135 - 137 - 139 a 142 - 145 a 148 - 152 - 154 - 157 a 158 - 133(b) (1) .-

Borra de uva moscatel (21 cultivos): 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 - 238 .-

Uva criolla (16 cultivos): 82 - 83 - 85 a 89 - 92 - 94 - 95 - 105 - 107 - 110 & 112 - 115 .-

Mosto de uva criolla (38 cultivos): 159 - 160 - 162 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 182 - 185 a 191 - 193 a 196 - 198 a 200 - 203 a 206 - 207 a 210 .-

Borra de uva criolla (57 cultivos): 239 a 249 - 252 - 254 a 269 - 271 a 273 - 275 a 285 - 289 - 290 - 292 - 293 - 296 a 299 - 301 a 304 .-

Uva cereza (3 cultivos): 98 - 99 - 102 .-

En consecuencia:

De uva, mosto y borra de criolla, se aislaron 114 cepas.

De uva, mosto y borra de moscatel, se aislaron 105 cepas.

De uva cereza, se aislaron 3 cepas.

En total se obtuvieron, pues 217 cepas.

B) Características morfológicas.-1) Morfología celular.

De acuerdo con su morfología hemos observado los siguientes tipos:

Tipo I, células redondeadas, ovaladas y elípticas con granulaciones y de (6.2x8µ). Corresponden a esta forma los cultivos: 3 - 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 77 - 86 - 87 - 119 a 122 - 124 a 131 - 133 - 135 - 137 - 139

145 a 148 - 152 - 154 - 157 a 160 - 162 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 -
 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 - 195 - 196 - 200 - 203 a 205 -
 207 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 -
 238 a 241 - 243 a 249 - 254 a 266 - 268 - 269 - 271 a 273 - 275 a 287 -
~~289~~ - 290 - 292 - 293 - ~~295~~ a 299 - 301 a 304 - 23(a) - 34(b) - 133(b)(1) -
 (son 179 cultivos).-

Tipo II, células de forma apiculada de ($4.8 \times 2 \mu$), corresponden a esta forma
 los cultivos: 2 - 8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(?) -
 (son 10 cultivos).-

Tipo III, células de forma ~~redondeada~~ y ovalada, chicas, de ($2.3 \times 5.1 \mu$), corres-
 ponden a esta forma los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 -
 95 - 98 - 198 - 199 - (son 12 cultivos)

Tipo IV, células de forma ^{redondeada} elíptica de ($4.9 \times 5.1 \mu$), corresponden a esta forma
 los cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - 115 - 242 - 252 - 267 -
 296 - (son 10 cultivos) (Tienen un punto refringente).

Tipo V, células de forma ovalada a elípticas, grandes; corresponden a esta
 forma los cultivos: 76 - 78 - 79 - 80 - 92 - 194 - (Sus medidas son: $(3.2 \times$
 $6.1 \mu)$) (son seis cultivos).-

2) Esporulación.-

En bloques de yeso, en medio de Corodkova y en placas de sílico-
 gel esporulan 179 cultivos.

En cambio, en las mismas condiciones, no esporularon los cultivos
 que se citan a continuación: 2 - 8 - 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 -
 76 - 78 - 79 - 80 - 82 - 83 - 85 - 88 - 89 - 92 - 94 - 95 - 98 - 99 -
 102 - 105 - 107 - 110 - 111 - 112 - 115 - 194 - 198 - 199 - 242 - 252 -
 267 - 296 - 47(?) - (son 36 cultivos)

3) Micelio filamentoso.-

Formaron pseudo micelio filamentoso los cultivos siguientes:
 76 - 78 - 79 - 80 - 92 - 194 - 102 - (son 7 cultivos)

No formaron micelio ni pseudo micelio, los 210 cultivos restantes.

8) Características de cultivos.

1) Colonias en agar de mosto de malta y de mosto de uva en cajas de ~~100 ml~~

a) En agar de mosto de malta se observaron los tipos de colonias siguientes:

Tipo I, colonias blancas, brillantes, húmedas, transparentes, de borde liso y elevadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 48 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 73 - 77 - 119 a 122 - 124 a 128 - 131 - 133 - 135 - 137 - 139 - 140 - 142 - 145 a 148 - 154 - 157 a 160 - 162 - 163 - 165 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 - 195 - 196 - 200 - 206 a 208 - 209 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 - 238 a 241 - 243 a 249 - 254 a 260 - 263 - 269 - 271 a 273 - 275 a 287 - 289 - 290 - 292 - 295 - 297 a 299 - 301 a 304 - 22(a) - 34 (b) - 133(b) (1) - (sum(171 cultivos))

De características semejantes a los anteriores, pero de borde festoneado, cultivos: 5 - 86 - 87 - 129 - 130 - 141 - 152 - 164 - (sum 9 cult.)

Tipo II, colonias marrones, brillantes, traslúcidas, de borde liso y achatadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 2 - 6 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(?) - (sum(10 cultivos))

Tipo III, colonias blancas, opacas, de borde festoneado y achatadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 29 - 30 - 51 - 55 - 63 - 64 - 65 - 85 - 96 - 98 - 198 - 199 - (sum(12 cultivos))

Tipo IV, colonias blancas, brillantes, traslúcidas, de borde festoneado poco elevadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - 113 - 242 - 252 - 267 - 296 - (sum(10 cultivos))

Tipo V, colonias rosadas, algo traslúcidas, de borde liso y achatadas, corresponden a esta descripción los cultivos: 76 - 78-79a 80 92 - 194 - (sum(6 cultivos))

b) En agar de mosto de uva en cajas de petri se observaron los tipos de colonias siguientes:

Tipo I, colonias blancas, brillantes, húmedas, transparentes, de borde liso y elevadas, correspondiendo los cultivos siguientes a esta descripción: 3 - 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 77 - 87 - 119 a 122 - 124 a 151 - 133 - 137 - 139 a 142 - 146 - 152 - 154 - 157 a 160 - 162 - 163 - 165 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 - 195 - 196 - 200 - 203 a 205 - 207 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 - 238 a 241 - 243 a 249 - 254 a 269 - 271 a 273 - 275 a 287 - 289 - 290 - 292 - 293 - 298 - 299 - 301 a 304 - 32(a) - 34(b) - 133(b) (1) - (~~304~~ 172 cultivos)

Semejante a los anteriores, pero de bordes irregulares, cultivos: 86 - 135 - 145 - 147 - 148 - 164 - 297 - (~~304~~ 7 cultivos)

Tipo II, colonias marrones, brillantes, translúcidas, de borde liso y achatadas; corresponden a esta descripción los cultivos siguientes: 2 - 8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(?) - (~~304~~ 10 cultivos)

Tipo III, colonias blancas, opacas, de borde festoneado, poco elevadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 - 95 - 98 - 198 - 199 - (~~304~~ 12 cultivos)

Tipo IV, colonias marrones translúcidas, de borde liso y achatadas (Menos brillantes que las del Tipo II); corresponden a esta descripción los cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - 115 - 242 - 252 - 267 - 296 - (~~304~~ 10 cultivos)

Tipo V, colonias rosadas, algo translúcidas, de borde liso y elevadas, correspondiendo a esta descripción los cultivos: 76 - 78 - 79 - 80 - 92 - 194 - (~~304~~ 6 cultivos)

2) Colonias gigantes.

Tipo I, colonias de color blanco amarillento, brillantes, borde casi liso, elevadas, superficie poco estriada, de 2 a 3 c de diámetro; corresponden a esta descripción los cultivos: 3 - 14 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 -

37 - 41 - 42 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 87 -
116 - 119 a 122 - 124 a 131 - 133 - 135 - 137 - 141 - 142 - 145 a 148 -
152 - 154 - 157 a 160 - 162 - 163 - 165 - 169 - 171 - 175 - 179 - 185 -
186 a 190 - 193 - 195 - 196 - 203 a 205 - 207 a 210 - 212 - 214 - 217 a
223 - 225 - 227 - 229 - ~~235~~ - 236 - 238 a 241 - 243 a 249 - 254 a 266 -
268 - 269 - 271 a 273 - 275 a 287 - 289 - 290 - 292 - 293 - 297 a 299 -
301 a 304 - 22(a)-34(b) - 133(b)(1) - (~~222~~(158 cultivos))

Las colonias de los cultivos: 15 - 40 - 86 - 140 - 174 - 180 - 200 -
213 - 224 - 231 - 232 - 234 - presentan un aspecto algo diferente al an-
terior pues son de color blanco amarillento, brillantes, de bordes lobula-
dos, elevadas, de superficie presentandose sectores de distinta tonalidad.
(~~222~~(12 cultivos))

Colonias también semejantes a las del Tipo I, pero de borde liso con
rebordo y de superficie estriada; corresponden a esta descripción los
cultivos: 164 - 173 - 182 - 191 - (~~222~~(4 cultivos))

Colonias de aspecto semejante al Tipo I, pero de color blanco poco
brillante, borde casi liso, elevadas y de superficie rugosa; corresponden a
esta descripción los cultivos: 77 - 139 - 166 - 167 - 177 - (~~222~~(5 cult.))

Tipo II, colonias de color blanco mate, borde casi liso, poco eleva-
das, superficie estriada y centro chato, de $1\frac{1}{2}$ a 2 c. de diámetro; corres-
ponden a esta descripción los cultivos: 2 - 8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 -
99 - 111 - 47(?) - (~~222~~(10 cultivos))

Tipo III, colonias blancuzcas, opacas, de borde irizado, chatas y de su-
perficie poco estriada, secas y de 3 a $3\frac{1}{2}$ c. de diámetro; corresponden a
esta descripción los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 95 -
98 - 198 - 199 - (~~222~~(12 cultivos))

Tipo IV, colonias de color blanco brillante, borde liso, poco elevadas,
superficie estriada, traslúcidas; corresponden a esta descripción los cul-
tivos: 102- 105 - 107 - 110 - 112 - 115 - 242 - 252 - 267 - 296 - (Son
10 cultivos)

Tipo V, colonias rosadas, brillantes, borde liso, elevadas, de $1\frac{1}{2}$ a 2 c.
de diámetro; corresponden a esta descripción los cultivos: 76 - 78 - 79 -
80 - 92 - 194 - (~~222~~(6 cultivos))

3) Mosto de malta y mosto de uva.-

a.) Por su comportamiento en mosto de malta hemos agrupado los cultivos según 4 tipos diferentes que son:

Tipo I, buena fermentación, forman gran cantidad de depósito, no enturbian el líquido; corresponden a este tipo los cultivos: 14 - 15 - 20 - 21 - 36 - 37 - 40 a 42 - 44 - 46 - 50 - 56 - 57 - 59 - 61 - 67 - 69 a 71 - 77 - 86 - 120 - 121 - 126 - 129 a 131 - 135 - 140 - 141 - 145 - 147 - 148 - 152 - 157 - 160 - 162 - 164 - 165 - 169 - 175 - 179 - 182 - 185 - 186 - 189 a 191 - 193 - 195 - 196 - 204 - 205 - 207 - 212 a 215 - 217 a 223 - 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 235 - 239 a 241 - 243 a 249 - 252 - 254 a 259 - 261 - 262 - 265 a 269 - 272 - 273 - 275 a 282 - 284 - 286 - 287 - 289 - 290 - 292 - 299 - 302 a 304 - 171 - 173 - (~~304~~ 119 cul.)

Tipo II, buena fermentación, forman gran cantidad de depósito, enturbian el líquido; corresponden a este tipo los cultivos: 3 - 17 - 33 - 43 - 45 - 48 - 51 a 55 - 60 - 62 - 66 - 72 a 75 - 87 - 119 - 122 - 124 - 125 - ~~128~~ - 128 - 133 - 137 - 139 - 142 - 146 - 154 - 158 - 159 - 163 - 166 - 167 - 174 - 177 - 187 - 188 - 200 - 203 - 208 a 210 - 224 - 234 - 242 - 260 - 263 - 264 - 271 - 283 - 285 - 293 - 297 - 298 - 301 - 22(a) - 34(b) - 133(b) (1) - (~~344~~ 60 cultivos)

Tipo III fermentación débil, forman poco depósito, no enturbian el líquido; corresponden a este tipo los cultivos: 2 - 8 - 76 - 78 - 79 - 80 - 82 - 83 - 88 - 89 - 92 - 94 - 99 - 102 - 105 - 107 - 110 - 111 - 112 - 115 - 180 - 194 - 236 - 238 - 296 - 47(?) - (~~364~~ 26 cultivos)

Tipo IV, forman película y depósito, cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 - 95 - 98 - 198 - 199 - (~~344~~ 12 cultivos)

b.) El comportamiento de los cultivos en mosto de uva es exactamente el mismo que en mosto de malta.

4) Agar de mosto de malta y de mosto de uva en estria.-

a.) Por su comportamiento y forma de los cultivos en agar de mosto de malta se agruparon los cultivos de la siguiente manera:

Tipo I, ^{desarrollo} ~~estrias~~ de color blanco brillante, borde lobulado, elevadas, de superficie lisa, traza continua; corresponden a esta descripción los

cultivos: 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 77 - 119 a 122 - 124 a 128 - 131 - 133 - 135 - 137 - 139 - 140 - 142 - 145 a 148 - 154 - 157 a 160 - 162 - 163 - 165 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 - 195 - 196 - 200 - 203 a 205 - 207 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 - 238 a 249 - 252 - 254 a 266 - 268 - 269 - 271 a 273 - 275 a 277 - 289 - 290 - 292 - 293 - 297 a 299)
301 a 304 - 22(a) - 34(b) - 133(b)(1) - (~~son~~ 173 cultivos)

^{desarrollo}
~~Estrias~~ semejantes a las del tipo anterior, pero de superficie estraloga; cultivos: 3 - 86 - 87 - 129 - 130 - 141 - 152 - 164 - (~~son~~ 8 cult.)

^{desarrollo}
Tipo II, estrias de color blanco brillante, transparentes, borde irregular, chatas, discontinuas; corresponden a esta descripción los cultivos: 2 - 8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(?) - (~~son~~ 10 cultivos)

^{desarrollo}
Tipo III, estrias de color blanco, secas, opacas, borde lobulado, traza entera, poco elevadas; corresponden a esta descripción los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 - 95 - 98 - 115 - 198 - 199 - 267 - 296 - (~~son~~ 15 cultivos)

^{desarrollo}
Tipo IV, estrias de color marrón por transparencia y blancas por reflexión, borde poco liso, chato, ponen el agar marrón; cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - (~~son~~ 5 cultivos)

Tipo V, estrias de color rojo, brillantes, borde algo liso, poco elevadas, traza continua; corresponden a esta descripción los cultivos: 76 - 78 - 79 - 80 - 92 - 194 - (~~son~~ 6 cultivos)

b. Por las estrias que dan los cultivos en agar de mosto de uva, se los agrupó de la forma siguiente:

^{desarrollo}
Tipo I, estrias de color blanco, brillantes, borde liso, elevadas, traza continua; corresponden a esta descripción los cultivos: 3 - 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 46 - 48 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 77 - 87 - 119 a 122 - 124 a 131 - 133 - 137 - 139 a 142 - 146 - 152 - 154 a 160 - 162 - 163 - 165 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 a 196 - 200 - 203 a 205 - 207 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 a 229 - 231 - 232 - 234 a 236 -

238 a 249 - 252 - 254 a 266 - 268 - 269 - 271 a 273 - 275 a 287 - 289 -
290 - 292 - 293 - 298 - 299 - 301 a 304 - 22(a) - 34(b) - 133(b)(1) -
(~~944~~ 874 cultivos)

Semejantes al tipo anteriores, pero de borde festoneado, los cultivos:

86 - 135 - 145 - 146 - 148 - 164 - 297 - (~~844~~ 7 cultivos)

Tipo II, ^{desarrollo} ~~estirias~~ de color marrón, brillantes, traslúcidas, borde liso, chatas, traza entera; corresponden los cultivos: 2 - 8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(7) - (~~844~~ 10 cultivos)

Tipo III, ^{desarrollo} ~~estirias~~ de color blanco, secas, opacas, traslúcidas, borde festoneado, chatas, traza entera; cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 - 95 - 98 - 198 - 199 - (~~844~~ 12 cultivos)

Tipo IV, ^{desarrollo} ~~estirias~~ de color blanco, brillantes, traslúcidas, borde festoneado, poco elevadas, traza entera; cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - 115 - 267 - 296 - (~~844~~ 8 cultivos)

Tipo V, ^{desarrollo} ~~estirias~~ de color rojo, muy brillantes, algo traslúcidas, borde liso, traza continua; cultivos: 76 - 78 - 79 - 80 - 92 - 194 - (Son 6 cultivos)

D.- Características fisiológicas.-

1) Fermentación de hidratos de carbono.-

Se ensayaron los azúcares siguiente: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, melibiosa y rafinosa.

Ninguno de los cultivos fermentó lactosa; todos ellos fermentarán glucosa, con excepción de los cultivos 76 - 78 - 80 - 194 - que no fermentaron ningún azúcar.

En cuanto a los demás azúcares, damos los resultados en el cuadro siguiente:

Quadro de fermentación de hidratos de carbono

Sa- lao- to- sa.	Sa- ca- ro- sa.	Mal- to- sa.	Ra- fi- no- sa.	C U L T I V O S
+	+	+	+	3 - 14 - 15 - 17 - 20 - 30 - 31 - 37 - 40 a 45 - 48 50 - 51 - 53 a 57 - 59 - 61 - 62 - 65 - 66 - 69 a 74 - 77 - 82 - 85 a 87 - 94 - 98 - 99 - 102 - 110 - 112 - 115 - 119 a 122 - 124 - 126 - 128 - 130 - 133 137 - 139 a 142 - 145 a 147 - 152 - 154 - 157 a 160 162 a 166 - 169 - 171 - 173 - 177 - 179 - 180 - 182 186 a 190 - 198 - 200 - 203 a 205 - 208 a 210 - 214 215 - 217 - 219 a 225 - 227 - 231 - 232 - 234 - 235 239 a 249 - 252 - 254 a 258 - 260 - 262 a 266 - 268 269 - 271 a 273 - 275 a 285 - 289 - 290 - 292 - 293 297 a 299 - 301 a 304 - 22(a) - 34(b) - 133 (b) (1) - 304 (162 cultivos)
+	+	+	-	21 - 36 - 55 - 60 - 67 - 75 - 105 - 125 - 129 - 135 148 - 167 - 185 - 195 - 198 - 212 - 218 - 229 - 238 304 (19 cultivos)
+	+	-	+	127 - 174 - 175 - 199 - 207 - 213 - 304 6 cultivos
-	+	+	+	35 - 46 - 193 - 259 - 261 - 267 - 286 - 296 - 304 6 cultivos
+	-	+	+	88 - 89 - 304 2 cultivos
+	+	-	-	33 - 39 - 107 - 131 - 304 4 cultivos
-	+	+	-	29 - 63 - 64 - 95 - 236 - 304 5 cultivos
-	-	+	+	2 - 8 - 111 - 47(?) - 304 4 cultivos
-	-	-	-	79 - 83 - 92 - (Fermenten glucosa) (304 3 cultivos)

En malibiosa, todos los cultivos dieron resultado negativo, por lo cual se las considera como levaduras de alta.

2) Utilización de alcohol etílico como fuente de carbono.-

Utilizan alcohol etílico con formación de velo y depósito, enturbando el líquido, los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 92 - 95 - 98 - 102 - 105 - 107 - 110 - 198 - 199 - 232 - 267 - 296 - 301 - (~~304~~ 20 cultivos)

También utilizan alcohol, pero sólo enturbando el líquido, formando depósito y sin formar velo, los cultivos: 112 y 115 - (~~304~~ 2 cultivos)

No utilizan alcohol los 195 cultivos restantes

3) Utilización de nitratos como fuente de nitrógeno.-

Utilizan nitratos con formación de velo, depósito, y enturbiando el líquido, los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 95 - 98 - 236 - 267 - 296 - 302 - (13 cultivos)

También utilizan nitratos, formando depósito y enturbiando el líquido pero sin formar velo, el cultivo: 115 - (1 cultivo)

No utilizan nitratos los 203 cultivos restantes.

- - - - -

E) CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL.-

Una de las principales razones que han motivado la realización del presente trabajo, es la de la posible aplicación posterior a la industria, de las levaduras aisladas y estudiadas en el mismo; es por ello que hemos creído necesario la determinación de algunas características tales como la determinación del poder fermentativo, la resistencia al alcohol y la resistencia al SO₂, de tal manera que estos datos permitan sacar algunas conclusiones interesantes desde el punto de vista práctico.

Las técnicas empleadas para la determinación de tales características ya han sido dadas en el capítulo de Métodos, motivo por el cual nos concretaremos en este párrafo a expresar los resultados y las consecuencias que los mismos nos sugieren.

1) Rendimiento alcohólico.-

En los cuadros de las páginas siguientes, están consignados los datos obtenidos; en la primera columna están indicados los números de los cultivos; en la segunda y tercera, la graduación obtenida por destilación y su equivalente deducido de las tablas (8). En la cuarta, quinta y sexta columna, la graduación alcohólica por pérdida de peso; en la cuarta tenemos la cantidad % de CO₂, en peso, deducidas de nuestras experiencias. El dato siguiente se obtiene multiplicando por el factor 1.15 el anterior, y obtenemos el % de alcohol, en peso. Por deducción en las tablas (8), tenemos el dato de la sexta columna que nos indica el % de alcohol en volumen. En la séptima columna se expresan las diferencias obtenidas.

nidas entre el rendimiento alcohólico por pesada y el rendimiento alcohólico por destilación, diferencia cuyas causas han sido explicadas anteriormente.

CUADROS DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO

No. de cultivo	por destilación		por pesada			Diferencia.
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	CO % en peso	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	
2	0.9969	8.61	1.82	1.86	2.35	0.34
3	0.9860	10.53	9.84	11.31	14.25	3.72
8	0.9969	2.87	1.99	2.29	2.90	0.03
14	0.9846	11.77	8.90	10.24	12.90	1.13
15	0.9858	10.70	9.21	10.59	13.35	2.65
17	0.9858	10.70	8.44	9.71	12.22	1.52
20	0.9856	12.59	11.69	13.43	16.92	1.43
21	0.9856	10.87	9.34	10.74	13.53	2.66
29	0.9949	3.48	2.76	3.17	3.98	0.50
30	0.9953	3.19	2.52	2.89	3.64	0.45
31	0.9950	3.39	3.24	3.73	4.69	1.30
33	0.9861	10.46	9.21	10.59	13.35	2.89
35	0.9922	5.41	2.91	3.34	4.20	-1.21
36	0.9848	11.59	9.68	11.13	14.00	2.43
37	0.9857	10.79	9.28	10.65	13.42	2.63
40	0.9851	11.33	9.10	10.48	13.19	1.86
41	0.9856	10.87	8.58	9.86	12.42	1.55
42	0.9855	10.96	9.15	10.52	13.26	2.30
43	0.9856	10.87	8.73	9.93	12.51	1.64
44	0.9840	12.32	9.73	11.18	14.19	1.87
45	0.9856	10.87	9.67	11.12	14.01	3.14
46	0.9853	11.14	9.28	10.67	13.45	2.31
48	0.9853	11.14	8.34	9.59	12.19	1.05

CUADROS DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación			Por pesada		Diferencia
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	CO % en peso.	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	
50	0.9853	11.14	9.00	10.35	13.05	1.91
51	0.9828	13.43	10.20	11.73	14.77	1.34
52	0.9842	12.13	10.00	11.50	14.49	2.36
53	0.9851	11.35	9.65	11.09	12.72	1.39
54	0.9833	12.96	10.37	11.92	15.02	2.06
55	0.9835	12.78	9.67	11.12	14.02	1.23
56	0.9856	10.87	8.43	9.29	12.53	1.46
57	0.9865	10.09	8.23	9.52	12.00	1.91
59	0.9853	10.70	8.51	9.78	12.32	1.62
60	0.9860	10.52	8.68	9.98	12.58	2.06
61	0.9839	12.41	9.08	10.44	13.16	0.75
62	0.9854	11.05	8.53	9.81	12.42	1.37
63	0.9943	3.55	2.77	3.18	4.00	0.45
64	0.9953	3.19	2.58	2.89	3.64	0.45
65	0.9922	5.41	3.91	3.34	4.20	- 1.21
66	0.9855	10.95	9.91	10.36	13.06	2.11
67	0.9860	10.53	8.48	9.75	12.29	1.76
69	0.9889	8.06	7.98	9.17	11.55	3.49
70	0.9881	10.43	8.64	9.93	12.51	2.08
71	0.9854	11.05	8.60	9.89	12.46	1.42
72	0.9876	9.14	9.56	10.99	13.85	1.71
73	0.9840	12.32	10.24	11.77	14.82	2.50
74	0.9835	12.78	9.99	11.50	14.49	1.71
75	0.9856	10.87	8.59	9.87	12.56	1.69
76	0.9989	0.72	0.80	0.92	1.16	0.44
77	0.9850	11.42	8.96	10.30	13.01	1.59
78	0.9993	0.45	0.40	0.46	0.58	0.13
79	0.9989	0.72	0.80	0.92	1.16	0.44

CUADRO DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación		Por pesada			
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	002 % en peso	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	Diferencia.
80	0.9993	0.45	0.40	0.46	0.53	0.13
82	0.9975	1.66	1.82	2.09	2.64	0.98
83	0.9964	2.42	1.57	1.80	2.27	-0.15
85	0.9903	6.92	5.71	6.56	8.26	1.34
86	0.9838	12.51	9.50	10.92	13.76	1.25
87	0.9908	6.54	5.69	6.54	8.20	1.66
88	0.9957	2.91	2.24	2.57	3.24	0.33
89	0.9956	2.98	2.73	3.13	3.94	0.96
92	0.9989	0.73	0.80	0.92	1.16	0.44
94	0.9963	2.49	2.16	2.49	3.11	0.62
95	0.9957	2.90	2.12	2.43	3.05	0.15
96	0.9957	2.90	2.29	2.63	3.29	0.39
99	0.9952	3.26	2.75	3.16	3.97	0.71
102	0.9993	0.73	0.59	0.66	0.83	0.10
105	0.9992	0.52	0.53	0.61	0.76	0.24
107	0.9983	1.13	0.76	0.87	1.10	-0.03
110	0.9991	0.58	0.53	0.61	0.76	0.18
111	0.9972	1.87	1.68	1.93	2.44	0.57
112	0.9996	0.26	0.52	0.60	0.75	0.49
115	0.9961	2.63	2.33	2.45	3.09	0.46
119	0.9846	11.77	9.50	10.92	13.76	1.99
120	0.9852	11.23	8.61	9.90	12.47	1.24
121	0.9827	13.53	10.37	11.92	15.03	1.49
122	0.9845	11.86	9.42	11.02	13.89	2.03
124	0.9852	11.23	8.41	9.67	12.19	0.96
125	0.9825	13.71	10.33	11.88	14.97	1.26
126	0.9854	11.05	8.78	10.09	12.77	1.72
127	0.9836	12.69	10.50	11.84	14.92	2.23

CUADRO DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación			Por pesada		
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	CO ₂ % en peso	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	Diferencia.
128	0.9859	12.41	9.52	10.93	13.77	1.36
129	0.9859	10.62	8.23	9.46	11.74	1.12
130	0.9833	12.96	8.89	10.22	12.89	-0.07
131	0.9845	11.07	8.61	9.90	12.47	1.40
133	0.9827	13.53	9.24	10.63	13.40	-0.13
135	0.9860	10.53	9.11	10.48	13.21	2.68
137	0.9868	9.83	9.90	11.38	14.34	1.51
139	0.9861	10.44	8.19	9.42	11.69	1.25
140	0.9874	10.17	8.27	9.51	11.99	1.82
141	0.9841	12.23	8.61	9.95	12.54	0.31
142	0.9850	11.42	8.47	9.74	12.27	0.85
145	0.9854	11.08	7.46	8.57	10.80	-0.25
146	0.9874	9.32	6.52	7.48	9.42	0.10
147	0.9846	11.77	9.75	11.26	14.19	2.42
148	0.9858	11.23	7.40	8.51	10.72	-0.51
152	0.9799	16.21	9.28	10.67	13.45	-2.76
154	0.9806	15.52	8.83	10.15	12.80	-2.72
157	0.9822	13.99	8.82	10.26	12.94	-2.19 - 1.05
158	0.9824	13.80	7.25	8.34	10.51	-3.29
159	0.9821	14.05	7.63	8.77	11.05	-3.00
160	0.9833	12.96	8.91	10.25	12.92	-2.04
162	0.9869	9.74	8.24	9.48	11.95	2.24
163	0.9890	7.97	7.03	8.14	10.26	2.29
164	0.9885	8.39	7.17	8.24	10.39	2.00
165	0.9866	10.87	9.02	10.38	13.09	2.22
166	0.9872	9.49	7.71	8.87	11.17	2.24 1.68
167	0.9874	9.32	7.98	9.18	11.56	-2.10 2.24
169	0.9839	12.41	6.43	7.39	9.51	-3.10

CUADRO DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación		Por pesada		Alcohol % en volumen	Diferencia.
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	alcohólico CO ₂ % en peso	Alcohol en peso %		
171	0.9877	9.06	7.35	8.45	11.65	2.59
173	0.9859	10.62	8.96	10.50	12.99	2.37
174	0.9840	12.32	9.93	11.42	14.39	2.07
175	0.9850	11.42	9.26	10.65	15.42	2.00
178	0.9846	11.77	9.10	10.57	13.32	1.55
179	0.9864	10.17	8.63	9.93	12.51	2.34
180	0.9847	11.63	9.00	10.55	13.05	1.37
182	0.9879	8.89	7.71	8.87	11.17	2.28
185	0.9850	11.42	7.73	8.89	11.20	-0.22
186	0.9888	10.70	8.57	9.86	12.42	1.72
187	0.9859	10.62	9.72	11.18	14.09	3.47
188	0.9856	10.87	9.68	11.13	14.03	3.16
189	0.9866	10.00	8.48	9.75	11.29	2.29
190	0.9878	8.89	7.36	8.46	10.76	1.87
191	0.9890	7.97	7.96	8.00	10.09	2.12
193	0.9879	8.89	7.64	8.80	11.09	3.20
194	0.9923	0.45	0.40	0.46	0.58	0.07
195	0.9882	8.64	7.80	9.07	11.43	2.79
196	0.9861	11.44	8.84	10.17	12.83	2.39
198	0.9990	0.65	0.58	0.77	0.98	0.33
199	0.9978	2.01	0.80	0.92	1.10	-0.91
200	0.9880	8.81	7.80	9.07	11.43	2.62
203	0.9857	10.79	9.16	10.53	13.37	2.58
204	0.9871	9.58	8.60	9.90	12.48	2.90
205	0.9874	9.32	8.20	9.43	11.89	2.57
207	0.9875	9.23	8.04	9.25	11.65	2.42
208	0.9860	8.81	7.48	8.60	10.84	2.03
209	0.9878	8.98	7.48	8.60	10.84	1.86

CUADRO D. RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación		Por pesada			
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	CO2 en peso	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	Diferencia
210	0.9873	9.40	7.84	9.02	11.36	1.96
212	0.9856	10.87	9.54	10.96	13.81	2.94
213	0.9872	9.49	8.00	9.20	11.59	2.10
214	0.9880	8.81	7.76	8.92	11.24	2.43
215	0.9840	12.32	10.00	11.50	14.49	2.17
217	0.9875	9.23	9.92	11.41	14.37	6.14
218	0.9862	10.35	8.12	9.34	11.76	1.41
219	0.9850	10.53	9.04	10.40	13.11	2.58
220	0.9868	9.83	8.72	10.03	12.64	2.81
221	0.9860	8.81	7.20	8.23	10.44	1.63
222	0.9875	9.23	8.44	9.71	12.24	3.01
223	0.9879	8.89	7.32	8.42	10.61	1.72
224	0.9864	10.17	8.63	9.98	12.58	2.41
225	0.9840	12.32	8.64	9.94	12.52	0.20
227	0.9855	12.78	8.43	9.75	12.29	-0.49
229	0.9855	10.96	8.16	9.38	11.32	0.86
231	0.9848	11.59	7.92	9.11	11.48	-0.11
232	0.9855	10.96	8.96	10.30	12.99	2.03
234	0.9839	12.41	9.20	10.62	13.39	0.98
235	0.9870	9.76	7.64	8.79	11.08	1.32
236	0.9872	9.49	2.80	3.22	4.05	-5.44
238	0.9940	4.12	2.76	3.17	3.99	0.13
239	0.9852	11.23	9.10	10.53	14.52	3.29
240	0.9851	11.53	8.43	9.75	12.29	0.96
241	0.9832	13.05	9.80	11.27	14.20	1.15
242	0.9864	10.17	9.23	10.67	13.45	3.28
243	0.9847	11.68	7.32	8.42	10.61	-0.07
244	0.9876	9.14	7.84	8.92	11.23	2.09

CUADRO DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación		Por pesada			Diferencia
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento	CO ₂ en peso	Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	
245	0.9855	10.96	8.64	9.94	12.52	1.56
246	0.9864	10.17	7.64	8.79	10.97	0.90
247	0.9869	10.62	7.76	8.92	11.23	0.61
248	0.9834	12.87	8.64	9.94	12.52	-0.35
249	0.9838	12.51	8.80	10.12	12.26	0.25
252	0.9843	12.04	8.60	9.90	12.48	0.44
254	0.9848	11.59	8.92	10.27	12.95	1.36
255	0.9852	11.23	8.48	9.75	12.29	1.06
256	0.9865	10.26	8.80	9.90	12.48	2.22
257	0.9868	9.83	7.12	8.19	10.32	0.49
258	0.9865	10.26	7.80	8.97	11.30	1.04
259	0.9872	9.49	8.08	9.29	11.70	2.21
260	0.9874	9.32	7.76	8.92	11.24	1.92
261	0.9850	11.42	8.84	10.70	12.82	1.40
262	0.9851	11.33	9.92	11.41	14.38	3.05
263	0.9879	8.89	7.04	8.10	10.21	1.32
264	0.9857	10.79	7.36	8.46	10.66	-0.13
265	0.9847	11.68	8.44	9.71	12.24	0.56
266	0.9831	13.15	9.44	10.86	13.69	0.54
267	0.9858	8.84	2.44	2.81	3.54	0.70
268	0.9854	11.05	8.08	9.30	11.79	0.74
269	0.9838	12.51	8.40	9.66	12.16	-0.35
271	0.9853	11.14	7.88	9.06	11.41	0.27
272	0.9852	10.35	8.48	9.75	12.29	1.94
2723	0.9835	12.78	9.28	10.67	13.45	0.67
275	0.9851	11.33	9.24	10.63	13.40	2.07
276	0.9840	12.32	9.68	11.13	14.02	1.70
277	0.9827	13.62	10.80	12.42	15.66	2.04

CUADRO DE RENDIMIENTO ALCOHOLICO (continuación)

No. de cultivo	Por destilación		COE en peso.	Por pesada		Diferencia
	Densidad	Rendimiento alcohólico por ciento		Alcohol en peso %	Alcohol % en volumen	
278	0.9842	12.13	8.80	10.12	12.78	0.63
279	0.9845	11.86	9.04	10.40	13.11	1.25
280	0.9854	11.05	8.08	9.30	11.71	0.66
281	0.9858	10.74	7.64	8.79	11.08	0.34
282	0.9860	10.53	7.76	8.85	11.15	0.62
283	0.9845	11.36	9.04	10.40	13.11	1.75
284	0.9852	11.33	8.48	9.75	12.29	0.96
285	0.9857	10.79	9.08	10.44	13.16	2.37
286	0.9848	11.59	8.64	9.94	12.52	0.93
287	0.9848	11.59	8.84	10.17	12.82	1.23
289	0.9835	12.78	10.40	11.96	15.08	2.30
290	0.9852	11.23	8.40	9.56	12.18	0.95
292	0.9854	11.05	7.96	9.15	11.52	0.47
293	0.9861	8.72	6.84	7.64	9.62	0.90
296	0.9936	4.42	2.72	3.23	3.94	-0.48
297	0.9851	11.33	7.80	8.97	11.30	0.03
298	0.9848	11.59	8.68	9.98	12.58	0.99
299	0.9852	11.23	9.00	10.35	13.05	1.82
301	0.9861	10.44	7.44	8.56	10.79	0.35
302	0.9857	10.79	7.84	9.02	11.36	0.57
303	0.9851	11.33	8.48	9.75	12.29	0.96
304	0.9911	6.35	4.32	4.97	6.26	-0.09
22(a)	0.9846	11.77	8.48	9.75	12.29	0.52
34(b)	0.9864	10.17	7.64	8.79	11.08	0.91
47(?)	0.9961	2.69	4.20	4.83	6.09	3.40
133 (b) (1)	0.9850	11.42	8.72	10.05	12.64	1.22

10

Como aclaración del cuadro anterior, se ordenaron los cultivos en cuatro grupos de acuerdo a la cantidad de alcohol producida por cada cepa, tomando los datos de la tercer columna del cuadro anterior por considerarlos más exactos que los de la sexta (ver consideraciones en el capítulo V):

Grupo I. Pertenecen a este grupo los cultivos cuyo rendimiento oscila entre 0.1°-4.0°, dichos cultivos son: 2 - 8 - 30 - 31 - 63 - 64 - 76 - 78 - 79 - 80 - 82 - 83 - 88 - 89 - 92 - 94 - 95 - 98 - 99 - 102 - 105 - 107 - 110 - 111 - 112 - 115 - 194 - 198 - 199 - 267 - 47(?) - ~~(144)~~ (35 cultivos)

Grupo II. Pertenecen a este grupo los cultivos cuyo rendimiento está comprendido entre 4.0. y 8.0°, dichos cultivos son: 35 - 65 - 85 - 87 - 163 - 191 - 238 - 296 - 304 - ~~(144)~~ (9 cultivos)

Grupo III. Pertenecen a este grupo los cultivos cuyo rendimiento está comprendido entre 8.01-12.00°, dichos cultivos son: 3 - 14 - 15 - 17 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 43 - 45 - 46 - 48 - 50 - 53 - 56 - 57 - 59 - 60 - 62 - 66 - 67 - 69 a 72 - 75 - 77 - 119 - 120 - 122 - 124 - 126 - 129 - 131 - 135 - 137 - 139 - 140 - 142 - 145 a 148 - 162 - 164 a 167 - 171 - 173 - 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 - 186 a 190 - 193 - 195 - 196 - 200 - 203 a 206 - 207 a 210 - 212 a 214 - 217 - 224 - 229 - 231 - 232 - 235 - 236 - 239 - 240 - 242 a 247 - 254 a 265 - 268 - 271 - 272 - 275 - 279 a 287 - 290 - 292 - 293 - 297 a 299 - 301 a 303 - 22(a) - 34(b) - 133(b)(1) - ~~(144)~~ (137 cultivos)

Grupo IV. Pertenecen a este grupo los cultivos cuyo rendimiento está comprendido entre 12.01° y más, dichos cultivos son: 20 - 44 - 51 - 52 - 54 - 55 - 61 - 73 - 74 - 86 - 121 - 125 - 127 - 128 - 130 - 133 - 141 - 152 - 154 - 157 - 158 - 159 - 160 - 169 - 174 - 215 - 225 - 227 - 234 - 241 - 248 - 249 - 252 - 266 - 269 - 273 - 276 a 278 - 289 - ~~(144)~~ (40 cult.)

- - - - -

La marcha de la fermentación ha sido seguida por las pesadas realizadas diariamente durante 15 días, los datos obtenidos (reducido a 100

cc. de mosto, pues en las experiencias se han tomado 250 cc.) permitieron trazar los gráficos que se ordenaron en 10 grupos de acuerdo a sus características:

Grupo I. Los cultivos de este grupo son los de mejor fermentación, tanto por su rendimiento alto, como por su rápida fermentación. Pertenecen a este grupo los cultivos: 3 - 14 - 42 - 44 - 51 - 74 - 77 - 130 - 131 - 186 - 188 - 200 - 204 - 219 - 254 a 256 - 258 a 263 - 266 - 268 - 269 - 271 a 273 - 275 - 277 - 278 - 292 - 298 - 299 - 133(b) (b) - (~~son~~ 36 cultivos)

Grupo II. Los cultivos de este grupo también son de buena fermentación, pero se diferencian del anterior por la anomalía que presentan en el día 6 al volver a aumentar el desprendimiento de CO₂. Pertenecen a este grupo los cultivo: 173 - 174 - 177 - (~~son~~ 3 cultivos)

Grupo III. Los cultivos de este grupo son de menor poder fermentativo, siendo la marcha de la curva semejante a la del grupo I. Pertenecen a este grupo los cultivos: 17 - 36 - 37 - 48 - 50 - 54 - 60 a 62 - 66 - 67 - 69 - 86 - 119 a 124 - 126 - 128 - 129 - 137 - 139 - 140 - 147 - 148 - 157 - 175 - 185 - 189 - 190 - 195 - 196 - 213 - 214 - 217 - 218 - 2280 - 225 - 234 - 235 - 240a249 - 252 - 257 - 276 - 279 a 284 - 286 - 287 - 289 - 290 - 293 - 302 - 305 - 22(a) - 34(b) - (~~son~~ 69 cultivos)

Grupo IV. Semejantes a los del grupo anterior. Pertenecen a este grupo los cultivos: 15 - 20 - 21 - 33 - 40 - 41 - 43 - 45 - 46 - 53 - 56 - 57 - 59 - 70 a 73 - 75 - 127 - 135 - 141 - 152 - 154 - 179 - 187 - 191 - 195 - 203 - 205 - 207 a 210 - 212 - 215 - 239 - (~~son~~ 36 cultivos)

Grupo V. Los cultivos de este grupo son de menor poder fermentativo y actividad lenta, ya que alcanzan el máximo en el día 4; pertenecen a este grupo los cultivos: 55 - 133 - 142 - 145 - 146 - 221 a 224 - 227 - 229 - 231 - 232 - 264 - 265 - 285 - 297 - (~~son~~ 17 cultivos)

Grupo VI. Semejantes al anterior pero de menor superficie de fermentación y actividad algo más rápida (máximo en el día 3). Pertenecen a este grupo los cultivos: 87 - 158 a 160 - 162 a 167 - 169 - 171 - 301 - 304 - (~~son~~ 14 cultivos)

Grupo VII. De rendimiento alcohólico aproximado al anterior pero la curva de marcha anormal al presentar un máximo en el día 4 y otro en el sexto. Pertenecen a este grupo los cultivos: 180 - 182 - (~~504~~ 2 cul)

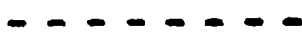
Grupo VIII. Bajo rendimiento alcohólico, perteneciendo a este grupo la mayoría de las levaduras del tipo *Mycoderma*, *Torula* y *Apiculatus*. Cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 82 - 83 - 85 - 88 - 89 - 94 - 95 - 98 - 102 - 105 - 107 - 110 a 112 - 115 - 119 - 198 - 199 - 236 - 238 - 247 - 296 - 47(?) - (~~244~~ 30 cultivos)

Grupo IX. Semejantes a la del tipo anterior, pero dan fin a la fermentación primaria al día 10. Pertenecen a este grupo los cultivos: 2 - 8 - 99 - (~~244~~ 3 cultivos, todos ellos del tipo apiculado)

Grupo X. De rendimiento alcohólico casi nulo, insinúan una leve fermentación el primer día para volver a fermentar muy levemente el día 13. Pertenecen a este grupo los cultivos de las *Rhodotorulaceas*: 76 - 78 79 - 80 - 92 - 194 - (~~304~~ 6 cultivos)

Todas las cepas del tipo *S. cerevisiae-ellipsoideus* tienen sus curvas comprendidas en los siete primeros grupos, a excepción del cultivo 119, 236 y 238. Las cepas de los otros tipos están comprendidas en los tres grupos restantes (VIII a X) a excepción de los cultivos 242 y 252 que están incluidos en el tercer grupo.

Los tipos de curvas están representados en la parte correspondiente a ilustraciones.



2) Resistencia al alcohol.-

El alcohol, producto de la actividad celular, puede resultar nocivo para la levadura. Su poder tóxico varía de acuerdo con la cantidad existente y el tipo de levadura sobre el cual actúa. Ensayos realizados por algunos autores han demostrado que dosis de alcohol superiores al 5 % no son soportados por el *S. apiculatus*. Los *S. ellipsoideus* pueden llegar hasta fermentaciones de 17-18 %, pero en general la acción del alcohol comienza a hacerse sentir en dosis que pasen del 13 %. Según Jules Ventre (22) el agregado del 15 % de alcohol bruscamente a un medio sin

actividad, elimina toda acción fermentativa ulterior. Pero si el medio ya entró en actividad, pueden agregarse hasta 16 % notándose únicamente un paro parcial, ya que pasando un cierto tiempo el medio entra en fermentación.

En este trabajo se emplearon dosis hasta del 15.4 % y en gran parte se obtuvo sólo un retardo en la actividad de fermentación entre las levaduras de buena fermentación. A continuación se dan los resultados obtenidos separando en el mismo cuadro los cultivos de fermentación lenta de los de rápida. Además se ordenaron los cultivos en seis grupos de acuerdo a su resistencia al alcohol.

	24-48 horas	3-6 días
4 % de alcohol	2 - 33 2 <u>2 cultivos</u>	3 - 76 - 78 - 79 - 80 - 82 - 92 94 - 102 - 105 - 110 - 180 - 194 13 <u>13 cultivos</u>
5.6 % alcohol		89 - 1 <u>1 cultivo</u>
7.8 % alcohol	191 - 272 - 2 <u>dos cultivos</u>	83 - 107 - 158 - 169 - 198 - 199 - 260 - 292 - 304 - 9 <u>9 cultivos</u>
11 % de alcohol	20 - 21 - 40 - 42 - 54 - 57 - 59 - 71 - 73 - 74 - 75 - 112 119 - 121 - 124 - 126 - 127 - 130 - 133 - 135 - 137 - 142 - 146 - 147 - 162 - 185 - 193 213 - 214 - 221 - 232 - 243 276 - 277 - 282 - 287 - 299 37 <u>37 cultivos</u>	3 - 29 - 30 - 31 - 36 - 44 - 46 - 50 - 51 - 53 - 55 - 60 - 64 - 65 - 69 - 98 - 99 - 111 - 120 - 121 - 129 - 131 - 139 - 140 - 145 - 152 - 159 - 160 - 163 a 167 - 173 - 174 - 175 - 177 - 179 - 182 - 186 - 187 - 189 - 190 - 195 - 196 - 200 - 212 - 215 - 222 - 227 - 236 - 238 - 239 a 242 - 244 - 246 - 248 - 256 - 261 - 266 - 268 - 271 - 278 - 279 a 281 - 283 - 284 - 289 - 296 - 298 - 301 - 47(?) - 133(b)(1) 76 <u>76 cult.</u>
15.4 % alcohol	15 - 45 - 51 - 66 - 67 - 70 72 - 88 - 122 - 128 - 141 - 166 - 204 - 207 - 208 - 214 221 - 223 - 224 - 249 - 252 259 - 264 - 265 - 267 - 269 273 - 275 - 279 - 297 - 303 31 <u>31 cultivos</u>	14 - 17 - 35 - 37 - 43 - 52 - 56 - 61 - 62 - 63 - 77 - 85 - 97 - 95 - 115 - 148 - 154 - 186 - 203 - 205 - 188 - 209 - 210 - 217 - 218 - 219 - 220 - 225 - 229 - 231 - 234 - 235 - 245 - 248 - 254 - 255 - 257 - 258 - 262 - 263 - 282 - 285 - 286 - 290 - 293 - 302 - 22(a) 34(b) - 43 <u>43 cultivos</u>

HH
No fermentan en ninguna de las concentraciones de alcohol ensayadas
los cultivos: 296 - 302 - (~~296~~ (2 cultivos))

De acuerdo con los resultados obtenidos, se ve que sólo 15 de los 39
cultivos de las levaduras consideradas como malas fermentadoras no
desarrollan en dosis de alcohol superiores al 4 % , lo cual nos hace
pensar de la inutilidad de la aplicación a la industria de la llamada
fermentación "supercuatro"

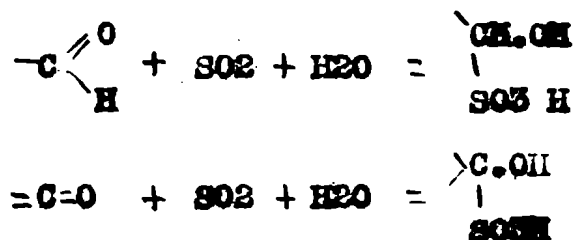
La fermentación supercuatro consiste en lo siguiente: Semichon M.
en 1923 propuso un procedimiento de vinificación (cuya prioridad es
discutida por Senérgons de Argelia) basado en la selección de las leva-
duras por el alcohol. De acuerdo con este autor, si se realiza una fer-
mentación continua introduciendo mosto alcoholizado de tal manera que
la mezcla encierre más de un 4 % de alcohol etílico (de ahí el nombre
de supercuatro) dando al procedimiento, existirán en el medio sólo los
fermentos puros productores de alcohol. (22).-

3) Resistencia al SO₂.-

El SO₂ empleado en dosis convenientes puede realizar una selección
natural de las levaduras ya que aquellas de buena calidad fermentativa
resisten altas cantidades de esta substancia, cantidad que resulta mor-
tal para la gran mayoría de los otros gérmenes que se encuentran en los
mostos en el momento de iniciar la elaboración. Ventres (22), en 1904, es-
tudiando la resistencia de los diferentes tipos de levaduras existen-
tes en los mostos, vió que esta resistencia iba en aumento desde el S. sa-
piculatus, al S. intermedius, y al S. ellipsoideus.

En cuanto a la dosis mortal, varía de acuerdo con el medio en que
se agrega pues está probado que cantidades de 50 mgrs./litro, de SO₂, en
agua, son suficientes para provocar la inactividad de la levadura; en
cambio estos mismos gérmenes resisten cantidades superiores a 500 mgrs.
por litro si el líquido es mosto de uva. La causa de este fenómeno es
debida, en primer término, al hecho que la levadura, al encontrarse en un
medio favorable a su crecimiento, aumenta su resistencia. En segundo tér-

mino, y quizá sea esto lo más importante, el SO₂, como lo demostró Rooques en 1897 (*), posee la propiedad de combinarse con los azúcares aldehídico y cetónicos formando compuestos del tipo:



El mecanismo de reacción es semejante al de la esterificación, en el cual el límite de la reacción depende de la masa de los cuerpos reaccionantes, y su velocidad de combinación es función de la temperatura, siendo dicha velocidad rápida en un principio disminuyendo a medida que la reacción se acerca a su punto de equilibrio.

Ventre J. y Dupont E. (3) han demostrado que al cabo de un tiempo de añadir SO₂ a un mosto, sólo una pequeña parte queda al estado libre, siendo esta porción la que realmente posee el poder antiséptico.

Esta dosis mortal, que como ya hemos dicho, depende del tipo de levadura empleada, de la constitución del medio y del tiempo, es aquella a la cual el mosto queda completamente inerte; algunos autores han establecido que dicha cantidad oscila alrededor de los 300 mgrs./litro. En nuestro caso se han empleado dosis hasta 1.375 grs./litro y algunas cepas han dado desarrollo (Ver cuadro siguiente). Por otra parte es conveniente

recordar que una tercera porción del SO₂, por acción de los oxidantes del mosto, pasa al estado de SO₃ y por combinación posterior a sulfatos, aumentando de este modo el tenor de los mismos en el vino. Como la ley no permite más de una cierta cantidad de sulfatos en los vinos, y que nuestros mostos ya tienen de por sí una cantidad bastante elevada, el SO₂ que puede agregarse es entonces muy pequeña o sea que la influencia que dicha substancia pueda tener en el vino es casi completamente nula. Este problema es de suma importancia para los vinos de San Juan, que por ser vinos dulces deben poseer una graduación alcohólica muy elevada para poder ser estables ya que hasta el presente este es el único

(*) Revue Chimique des Vins, Ventre en (22)

antifermentativo práctico que se ha podido hallar y que esté permitido por la ley, ya que el alcohol etílico (también permitido), presenta el inconveniente de encarecer el producto al cual se agrega. (*)

A continuación se dan los resultados en cuatro series de mostos a los que se añadieron diferentes cantidades de SO₂ bajo la forma de metabisulfito. En la primera columna se da la concentración de SO₂ con que fueron ensayadas las cepas; en la segunda columna están dados los cultivos de fermentación rápida (1-2 días); y en la tercera aquellos cultivos que fermentaron más lentamente (3-6 días):

CUADRO DE RESISTENCIA AL SO₂

	24 - 48 horas	3 - 6 días
0.625 gr. de SO ₂ /lt.	21 - 35 - 55 - 70 - 75 - 112 119 - 121 - 122 - 135 - 140 143 - 148 - 154 - 179 - 200 204 - 209 - 214 - 225 - 240 243 - 249 - 265 - <u>son 24 cultivos</u>	15 - 29 - 31 - 40 - 41 - 63 - 64 - 65 - 66 - 95 - 110 - 120 169 - 199 - 207 - 236 - 246 - 248 - 269 - 271 - 275 - 276 - 284 - 285 - 287 - 289 - 290 - 297 - 298 - <u>son 29 cultivos</u>
0.312 gr. de SO ₂ /lt.	42 - 45 - 48 - 72 - 73 - 126 127 - 128 - 237 - 141 - 147 152 - 156 - 165 - 167 - 177 182 - 189 - 205 - 212 - 213 215 - 217 - 219 - 223 - 224 227 - 229 - 235 - 244 - 252 256 - 257 - 258 - 260 - 261 263 - 268 - 273 - 281 - <u>son 40 cultivos</u>	5 - 20 - 43 - 69 - 153 - 166 - 203 - 221 - 247 - 266 - 272 - 282 - 293 - 22(a) - <u>son 14 cultivos</u>
1.062 gr. de SO ₂ /lt.	17 - 37 - 50 - 51 - 67 - 125 159 - 160 - 162 - 163 - 164 171 - 173 - 174 - 185 - 187 183 - 190 - 195 - 198 - 218 220 - 231 - 232 - 234 - 242 245 - 254 - 259 - 262 - 264 277 a 280 - 133(b) (1) - <u>son 36 cultivos</u>	14 - 44 - 48 - 62 - 71 - 74 - 86 - 175 - 186 - 193 - 222 - 239 - <u>son 12 cultivos</u>
1.575 gr. SO ₂ /lt.	36 - 52 - 255 - <u>son 3 cultivos</u>	133 - 142 - <u>son 2 cultivos</u>

(*) Estas consideraciones, y los resultados obtenidos que hemos consignado en el cuadro, nos han inducido a la realización de un trabajo a iniciar posteriormente sobre el SO₂, ensayándolo en alguna de las cepas que por sus cualidades especiales se hacen útiles en la vinificación.

rt

No desarrollan en ninguna de las concentraciones de S02 ensayadas los
 cultivos: 2 - 8 - 30 - 33 - 46 - 53 - 54 - 56 - 60 - 61 - 76 - 77 -
 78 - 79 - 80 - 82 - 83 - 85 - 87 - 88 - 89 - 92 - 94 - 98 - 99 - 102 -
 105 - 107-~~111~~ - 115 - 124 - 129 - 130 - 131 - 139 - 141 - 157 - 180 -
 194- 198 - 208 - 210 - 238 - 241 - 267 - 283 - 286 - 296 - 299 - 301-
 302 - 303 - 304 - 47(?) - (~~304~~ 52 cultivos)

- - - - -

40

VII).- CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS ESTUDIADAS.

Habiendo establecido las características morfológicas, de cultivo, y fisiológicas, y de acuerdo con la sistemática de Stelling-Dekker(19) y de Lodder(13), resumida por Dalvit(2) en su trabajo ya mencionado, y siguiendo la ordenación hecha por dicho autor, hemos agrupado las cepas en tres grandes familias:

1a. Endomycetaceae, Stelling-Dekker (ó Saccharomycetaceae, Guilliermond (4)(5)(6))--en la cual están incluidas las levaduras esporuladas.

Las levaduras no esporuladas están comprendidas en las dos familias siguientes:

2a. Torulopsidaceae, Lodder.

3a. Rhodotorulaceae, Lodder.

Familia de las Endomycetaceae.

Estas levaduras presentan las siguientes características: no forman micelio, pseudomicelio, conidios ni oidios; su multiplicación se efectúa por brotación; sus ascos son esféricos y se forman por partenogénesis; son de fermentación activa y de gran rendimiento alcohólico. Se pueden incluir las levaduras vínicas aisladas en la subfamilia de las Saccharomycoidae que desarrollan por medio de micelio o por sola brotación; su multiplicación se realiza por división o por brotación dipolar; esporulan previa copulación iso o heterogámica o bien partenogénicamente; están comprendidas además en la tribu Saccharomyces, levaduras que crecen sin micelio; cuya multiplicación se hace por división o por brotación; se forman sus esporas después de una copulación isogámica o bien partenogénicamente; el género es el Saccharomyces, levaduras de forma redonda, oval o elíptica; a veces producen pseudomicelio; esporulan partenogénicamente o previa copulación isogámica; sub género Saccharomyces g.g. (sensu stricto), levaduras que esporulan partenogénicamente.

En este subgénero hemos podido identificar la especie:

Saccharomyces cerevisiae, variedad ellipsoideus (Hansen), Stelling-Dekker, que tiene las siguientes características: células en forma oval, ligera-

mente redondeadas o elípticas; se multiplican por brotación; no utilizan nitratos ni alcohol como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente; producen fermentación activa tanto en el mosto de malta como el de uva; en agar de mosto de malta y de uva desarrollan estria elevada, brillante, húmeda, de color blanquecino y consistencia cremosa; colonias gigantes elevadas, con estria radiales, pliegues concéntricos, tenues, borde ondulado o liso, en algunos casos presentando sectores de diferente tonalidad; en bloque de yeso forman 2-3-4 esporas al cabo de 24 horas y hasta 6 días, deformando las células en algunos casos; fermentan generalmente glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa; en ningún caso fermentan lactosa y melibiosa; son levaduras de alta muy resistentes al alcohol y al SO₂, salvo raros casos.

Pertenecen a esta especie las levaduras de los cultivos: 3 - 14 - 15 - 17 - 20 - 21 - 33 - 36 - 37 - 40 a 46 - 48 - 50 a 57 - 59 a 62 - 66 - 67 - 69 a 75 - 77 - 86 - 87 - 119 a 122 - 124 a 131 - 133 - 135 - 137 - 139 a 142 - 145 a 148 - 152 - 154 - 157 a 160 - 162 a 167 - 169 - 171 - 173 a 175 - 177 - 179 - 180 - 182 - 185 a 191 - 193 - 195 - 196 - 200 - 205 a 206 - 207 a 210 - 212 a 215 - 217 a 225 - 227 - 229 - 231 - 232 - 234 a 236 - 238 a 241 - 243 a 249 - 254 a 266 - 268 - 269 - 271 a 273 - 275 a 287 - 289 - 290 - 292 - 293 - 297 a 299 - 301 a 304 - 22(a) - 34(b) - 133(b) (1) - (son 179 cultivos)

De rendimiento alcohólico más bajo: 165 - 304 -

Son poco resistentes al SO₂ las levaduras: 46 - 53 - 54 - 56 - 60 - 61 - 87 - 124 - 129 a 131 - 139 - 141 - 157 - 208 - 210 - 283 - 286 - 299 - 301 - 303 - 304 -

De acuerdo con lo sostenido por Stelling-Dekker en cuanto a la separación entre las especies S. ellipsoideus y S. carvisialis, que no presentan en realidad diferencias fundamentales sino únicamente de orden morfológico, hemos agrupado las levaduras en la especie S. carvisialis, variedad ellipsoideus pues consideramos, como el citado autor, que la diferencia que puede haber entre una y otra especie es muy pequeña como para permitir el hacer una subdivisión

Familia de las Torulopsidaceae.-

Las levaduras no esporuladas, que se multiplican por brotación, no contienen pigmento carotinoideo y no forman conidios pertenecen a esta familia. Todder las subdivide en dos subfamilias: Torulopsidaceae y Mycotorulidaceae.

Incluimos en la subfamilia de las Torulopsidaceae las levaduras que se han aislado y en las cuales se han diferenciado los géneros siguientes:

1) Klökera-Janke; células en forma de limón, ovales y largas, solas o con brotes; fermentan muy débilmente en mosto de malta y uva; fermentan débilmente glucosa, rafinosa; en algunos casos fermentan además galactosa, maltosa y sacarosa. Son poco resistentes al alcohol y al SO₂. Pertenecen estas levaduras a la especie: Klökera apiculata-Janke (ó Saccharomyces apiculatus-Rees; ó Pseudosaccharomyces apiculatus-Rees, Klöcker).

Son células con forma característica de limón; se multiplican por brotación; no esporulan; dan ostria poco desarrollada, de color marrón en agar de mosto de malta y de uva; no utilizan nitratos como fuente de nitrógeno ni alcohol como fuente de carbono; fermentan débilmente glucosa, y en algunos casos muy débilmente galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa; son poco resistentes al alcohol y al SO₂, su rendimiento alcohólico es muy bajo.

En esta especie están comprendidas las levaduras de los cultivos: 2-8 - 82 - 83 - 88 - 89 - 94 - 99 - 111 - 47(?) - (sum (10 cultivos))

2) Mycotorula-Parsons, Leberle; células de formas variables, 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, en algunos casos no forman pseudo micelio (Tales como en las levaduras que hemos aislados), y blastosporos poco desarrollados; desde el principio de la fermentación, producen un velo seco, opaco que luego se pliega; fermentan glucosa y débilmente los demás azúcares en algunos casos; oxidan enérgicamente los ácidos orgánicos.

cos. Las levaduras pertenecientes a este género se han incluido en la especie Mycoderma vini-Desmazières (ó Saccharomyces-mycoderma-Rees); asimilan nitratos; asimilan alcohol etílico, y en ambos casos forman un depósito blanco y una película que trepa por las paredes del tubo; oxidan el alcohol a ácido acético.

Pertenecen ~~a esta especie~~ ^a esta especie las levaduras de los cultivos: 29 - 30 - 31 - 35 - 63 - 64 - 65 - 85 - 95 - 98 - 198 - 199 - (12 cultivos) -

3) Torulopsis-Berlese; células de forma redonda u oval; se multiplican por brotación; forman sólo en raros casos pseudomicelio y no forman blastosporos; de fermentación débil, producen en los mostos un velo mucoso o película, a veces anillo; hay especies que utilizan nitratos como fuente de nitrógeno y otras no; en agar de mosto de malta forman estrias muy brillantes, húmeda y de consistencia pastosa, de superficie lisa; colonias poco desarrolladas, sin estria; en agar de mosto de malta son marrones por transparencia en algunos casos formando un halo alrededor de la estria.

Pertenecen a esta especie las levaduras de los cultivos: 102 - 105 - 107 - 110 - 112 - 115 - 242 - ~~252~~ - 267 - 296 - (10 cultivos)

Sólo el cultivo 102 forma pseudomicelio muy rudimentario

Familia de las Rhodotorulaceae.

Comprende el género Rhodotorula-Harrison; organismos que se multiplican por brotación; elaboran un pigmento rojo de naturaleza carotinoidea (diferencia con la familia de las Torulopsidaceae); no forman blastosporos ni ascos; no fermentan (o lo hacen muy débilmente) los hidratos de carbono. Forman un pseudomicelio muy rudimentario.

Las levaduras de los cultivos: 76 - 78 - 79 - 92 - 80 - 194 - (6 cultivos) parecen pertenecer a la especie Rhodotorula minuta-Saito, Harrison (ó Torula minuta-Saito, ó Torulopsis minuta-Saito-Cifferri-Radaelli); son células de forma elíptica; a excepción de los cultivos 79 y 92, que fermentan débilmente glucosa, no fermentan ningún hidrato de carbono, formando anillo y depósito rojo (todos los cultivos); no utilizan ni alco-

VIII).- CONCLUSIONES.-

De acuerdo con las observaciones hechas, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, llegamos a las conclusiones siguientes:

1°.- En las uvas y mostos del departamento 25 de Mayo, Provincia de San Juan, se encuentran diferentes especies de levaduras de la familia de las Endomyces, en su mayoría buenas fermentadoras, y que por los caracteres que dan al vino, se hacen recomendables para la elaboración del mismo empleándolas en escala industrial.-

2°.- Además las buenas fermentadoras, se encuentran otras especies de bajo rendimiento alcohólico del tipo Torulopsis que podrían influir en el bouquet sabor del vino.-

Por último están las levaduras que pueden considerarse como de infección, de los tipos Apiculata^{do}, Micoderma y Rhodotorula, ya que al no conferir ningún carácter que mejore al vino, hacen peligrar su estabilidad ^{dando lugar,} a productos de mala calidad.-

3°.- El rendimiento alcohólico de las cepas buenas fermentadoras oscila alrededor de 10-12%, habiendo cepas que han llegado a dar hasta 14-16 % de alcohol, tales como los cultivos correspondientes al tipo I de curvas de fermentación que merecen tenerse en consideración para una posible aplicación posterior a la industria.-

4°.- La mayor proporción de levaduras muy buenas fermentadoras, citadas en el párrafo anterior, han sido aisladas de las uvas, mostos y borras de tipo "Criolla", por lo cual se aconseja su empleo para la vinificación, por su mejor adaptación al medio natural.-

5°.- Contrariamente a lo supuesto por la mayoría con respecto a la fermentación vinica en la República Argentina, pero de acuerdo con los resultados obtenidos también por Dalvit(2), las levaduras del tipo apiculada no se encuentran predominando en ninguna de las etapas estudiadas en nuestras experiencias; por lo cual se llega a la conclusión ^{de} que

en nuestro país este tipo de levaduras no es el que inicia la fermentación, sino que esta se realiza desde el comienzo por las ~~celulas~~ del tipo ellipsoides.-

6°- Es conveniente el acostumbramiento previo de las levaduras buenas fermentadoras al S02 en dosis elevada para obtener mejores resultados en la práctica ya que las del tipo Mycoderma resisten también grandes dosis de dicha ~~substancia~~.-

7°- Debido a la resistencia al alcohol manifestada por algunas de las levaduras consideradas como de infección, no se cree en la utilidad de la fermentación llamada "supersuavizado".-

8°- Considerando la gran resistencia al S02 que ofrecen las levaduras buenas fermentadoras, y teniendo en cuenta la pequeña cantidad permitida por la ley para impedir la fermentación de los vinos dulces de poco tenor alcohólico en la provincia de San Juan, será necesario determinar la cantidad mínima de S02 libre indispensable para evitar la ^{provocar} prosecución de la fermentación que puede ~~causar~~ el agregado de azúcar en la elaboración de los vinos de esa clase.-

- - - - -

IX).- RESUMEN.-

En el presente trabajo se han estudiado las levaduras, aisladas por el método de Lindner, de uvas, mostos y borras de mostal, oriolla y ce-
reza del departamento 25 de Mayo de la provincia de San Juan.-

Es de una breve reseña histórica de la fermentación alcohólica y se
consignan los antecedentes sobre los trabajos realizados en el país
mereciendo destacarse los de Lejeune L.H. (12), Paso J.A. (13), y Dalvit P.
(2).-

Se hizo el estudio empleando los medios de cultivo y los métodos de
investigación clásicos para este tipo de trabajo; algunos de ellos se
modificaron convenientemente.-

De acuerdo con los resultados obtenidos con las 217 cepas aisladas
y clasificadas, se obtuvieron:

<u>179 cepas</u> del tipo <u>S. cerevisiae-ellipsoides</u>	(81.6%).
<u>13 cepas</u> del tipo <u>lyoblastus</u>	(5.5%).
<u>10 cepas</u> del tipo <u>apiculada</u>	(4.6%).
<u>10 cepas</u> del tipo <u>Zarullensis</u>	(4.6%).
<u>6 cepas</u> del tipo <u>Rhodotorula</u>	(2.0%).-

Fueron pocas las levaduras apiculadas aisladas en el transcurso de
las experiencias, por lo cual no se cree que sean estas las que inician
la fermentación alcohólica de los mostos en la República Argentina.-

Por la resistencia al alcohol que presentan gran parte de las leva-
duras consideradas como mala fermentadoras (el 50 %, resisten superiores
a 4°), no se cree conveniente la aplicación de la fermentación llamada
"supercuatro".-

Siendo el principal objeto de este trabajo la aplicación posterior
a la industria de las buenas levaduras indígenas de fermentación, se
hicieron varios ensayos para determinar el rendimiento alcohólico, la
resistencia al alcohol y la resistencia al SO₂. Por su alto poder fer-
mentativo y rápida fermentación, se distinguen las levaduras correspon-

dientes al tipo I de las curvas de fermentación.-

Todos estos hechos se resumen en 3 conclusiones, en el capítulo correspondiente.-

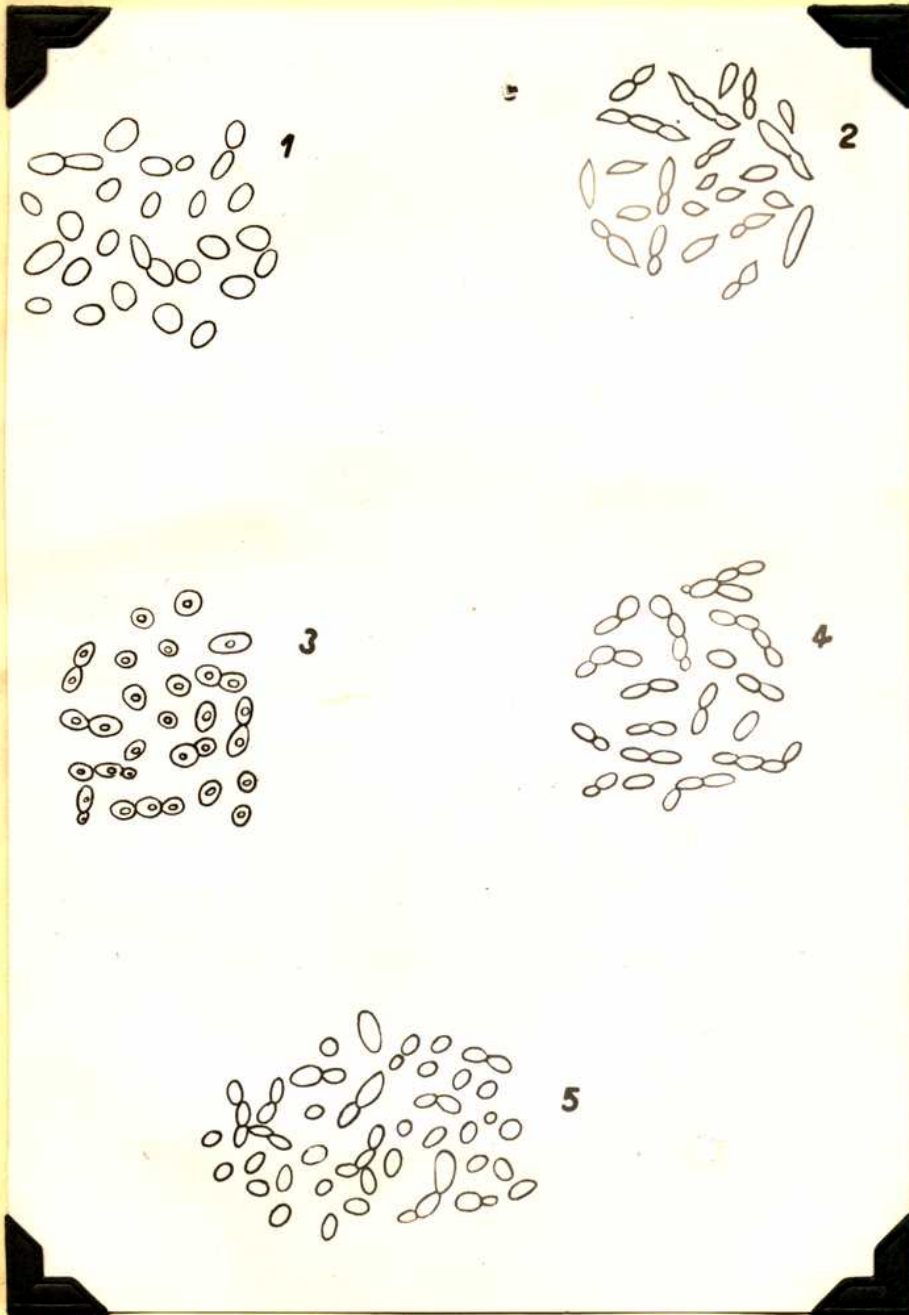
En la parte final del trabajo se dan 24 fichas bibliográficas; además fotografías de los distintos tipos de desarrollo en estría en agar de mosto de malta, dibujos a la pluma de los diferentes tipos de levaduras, y una fotografía del aparato empleado para determinar el rendimiento alcohólico.-

Por último figuran también 10 gráficos de los correspondientes tipos de curvas de fermentación; los 7 primeros corresponden a levaduras del tipo S. cerevisiae ellipsoidea y los tres últimos a las restantes.-

BIBLIOGRAFIA

- (1) Castelli T. L'uso della silice gelatinosa per lo studio della sporificazione dei blastomiceti. Boll. dell'Inst. Sierot. Milnes. 14: 954-57. Año 1935.-
- (2) Dalvit P. Levaduras vinicas de las uvas de Mendoza. Tesis. Marzo 1940.-
- (3) Dupont E. et Ventre J. L'acide sulphureux en vinification. Compt. rend. Acad. Sci. Paris. 1903.-
- (4) Guilliermond A. Clef dichotomique pour la détermination des levures. Le François, ed., Paris. 1928.-
- (5) Guilliermond A. Les levures. Encycl. Scient. Doin, ed., Paris. 1912.-
- (6) Guilliermond A. Tannar The yeasts. John Wiley and Sons, ed., New York. 1919.-
- (7) Hansen E. Ch. Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. T. 2, p. 13. Año 1893.-
- (8) Hodgman Ch. D. Handbook of Chemistry and Physics, pag. 1171-77. Twenty first ed. Chemical Rubber Publishing ed., Cleveland. 1936.-
- (9) Hunt C. A. y Rettger L. A comparative study of members of the lactobacilli of Soil and Grain. Jour. Bact., 20: 61-84. Año 1930.-
- (10) Klöcker A. Die Gärungsorganismen 447 KVIII, 189 fig., 3 ed. Urban u Schwarzenberg, Berlin. 1924.-
- (11) Kulp van Rettger L. Comparative study of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. Jour. Bact., 9: 357. Año 1924.
- (12) Lojeune L. M. Estudio de las levaduras de Mendoza. Tesis. Anales de la Soc. Cient. Argentina. T. LXXXIX, p. 93. Año 1915.-
- (13) Lodder J. Die Hofesammlung des Centralbureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer monographie der Hefearten. II. Teil Die Anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. Kon. Akd. Wet. Amsterdam (Tweede Sectie), 32: 1-256. Año 1934.-
- (14) Magistocchi G. Tratado de Enología. Mendoza. 1934.-
- (15) Pasteur L. Memoires sur la fermentation alcoolique. Ann. de Chimie et de Phys. LVIII. 1860.-
- (16) Pasteur L. Etudes sur le vin. Paris. 1866.-
- (17) Paottet P. Vinificación en la provincia de Mendoza. J. B. Bailliere e hijos, ed., Paris. 1911.-

- (18) Paso J.A. Contribución al estudio de las levaduras vínicas del Alto Valle del Río Negro. Tesis. 1929.-
- (19) Salling-Dekker N. Die sporogenen Hefen Kon. Akad. Wet. Amsterdam, 1931.-
- (20) Soriano S. Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la chicha. Rev. del Inst. Bact., vol. VIII. Octubre 1938, N° 3, p. 231-321.-
- (21) Soriano S. Método para la obtención y observación de filamentos en las levaduras no esporuladas. Folia Biologica N° 83-84, Febrero-Marzo 1938.-
- (22) Ventre Jules Traité de Vinification pratique et rationnelle. Vol. I, Le Vin, sa composition, ses maladies, sa conservation. Coulet, ed., Montpellier. 1929.-
- (23) Ventre Jules Les levures dans la Vinification. Coulet, ed., Montpellier. 1911.-
- (24) Society of American Bacteriologists. Committee on bacteriological Technic. 1923. Manual of methods for pure culture study of bacteria. Geneva. New-York

FORMAS DE LEVADURAS EN AGAR DE MOSTO DE MALTA

1, tipo elipsoideus; 2, tipo apiculada;
 3, tipo torula; tipo Mycoderma (4);
 5, tipo Rhodotorula.

Ampliación : 1000 X

CULTIVOS EN ESTRIA EN AGAR DE MOSTO DE MALTA

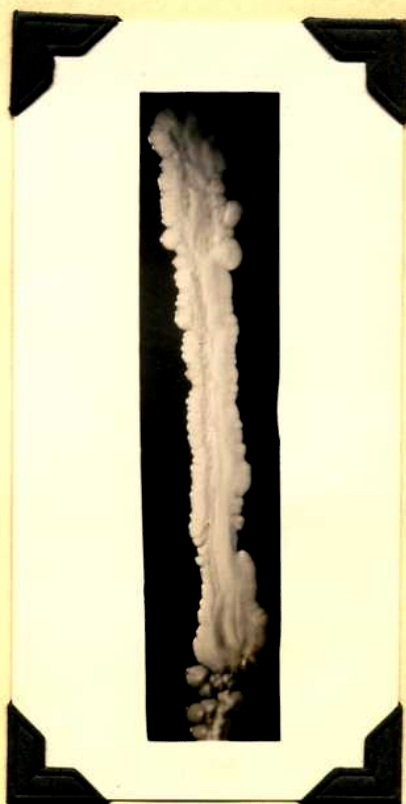
Tipo Mycoderma



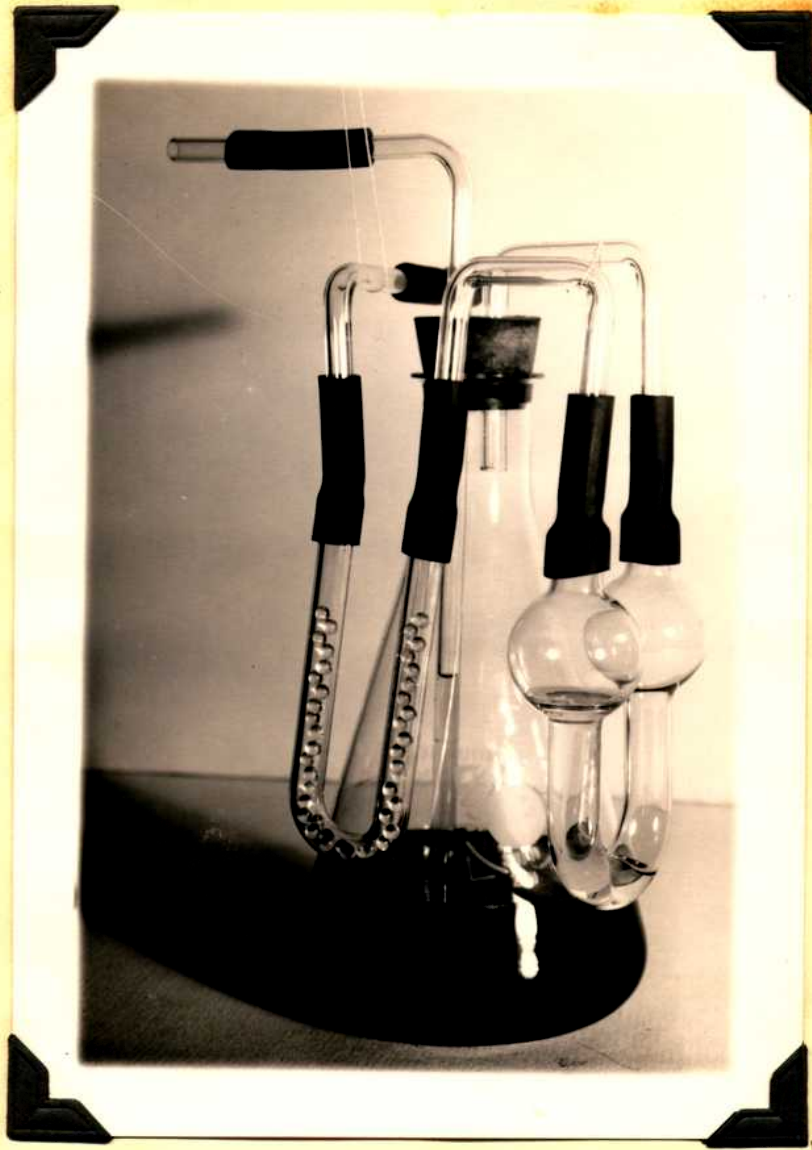
Tipo ellipsoideus



Tipo torula

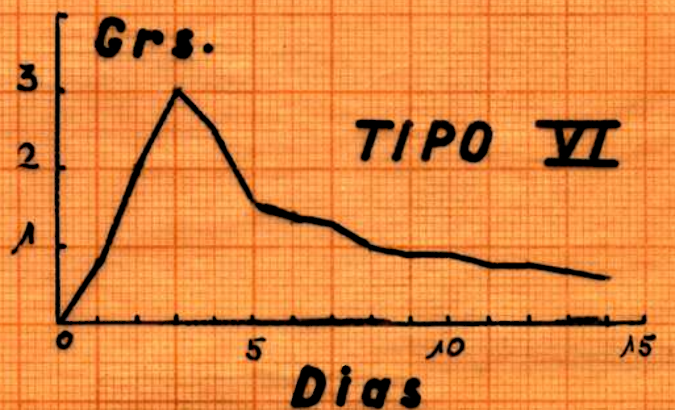
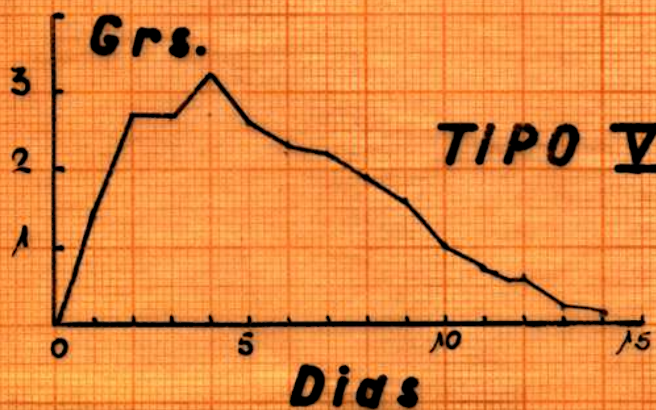
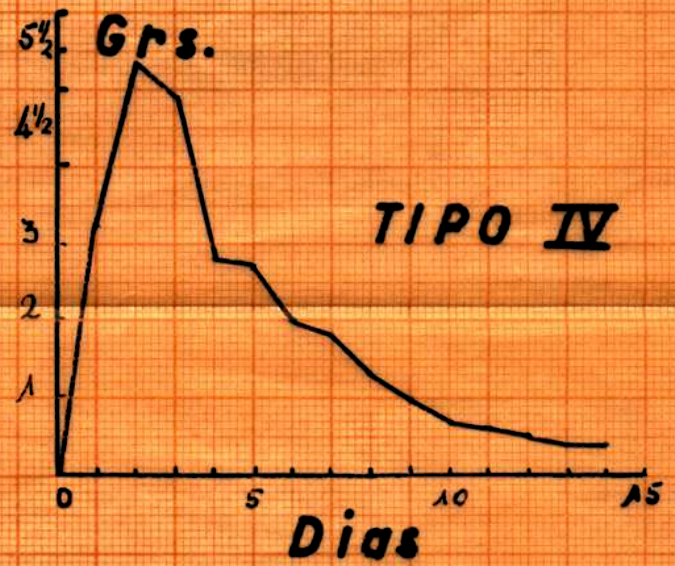
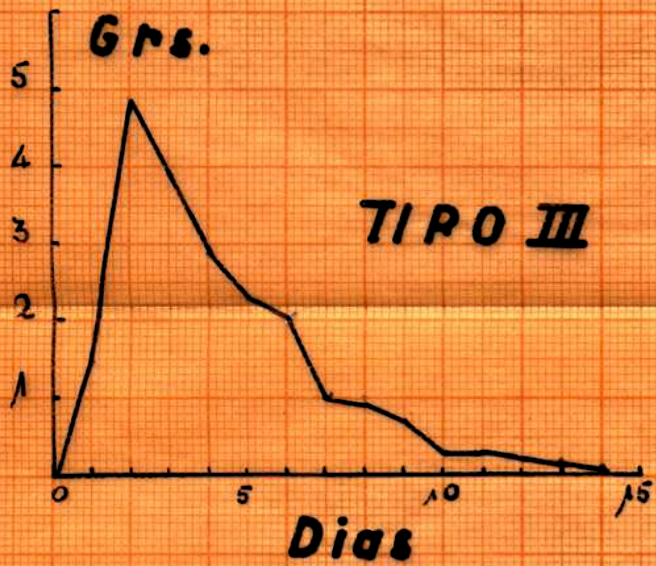
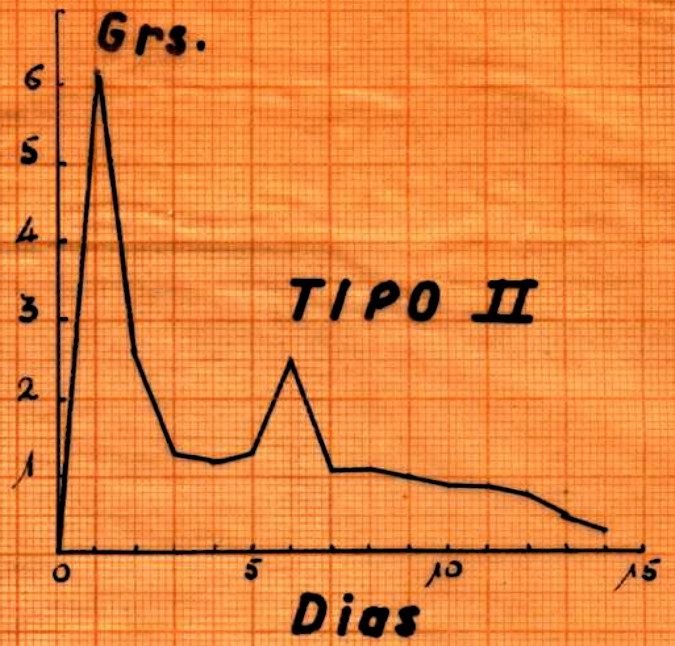
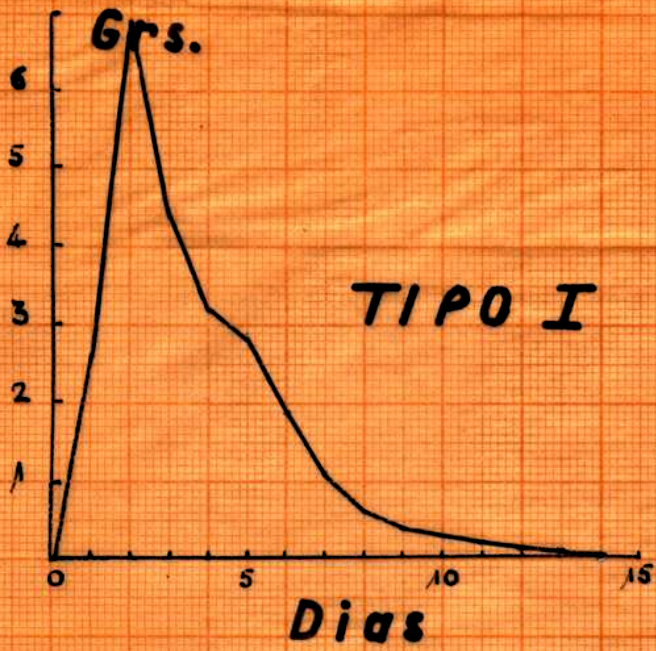


Tipo Rhodotorula



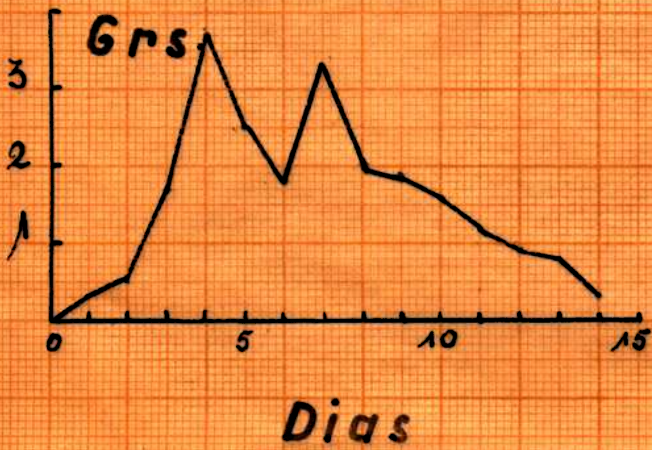
Aparato empleado para la determinación
del poder fermentativo

Curvas de fermentación



Curvas de fermentación

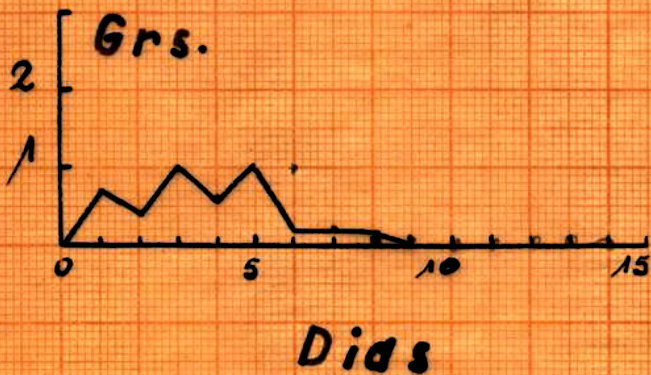
TIPO VII



TIPO VIII



TIPO IX



TIPO X



Volubetina