

## LAS LEVADURAS VINICAS DE MENDOZA

P o r

C. BRIZ DE NEGRONI, O. L. MARSANO, M. L. P. DE MARZANO y P. NEGRONI

Pasteur (1867 y 1876) al abordar el problema de la vinificación, hizo notar la importancia que tiene la fermentación del mosto mediante levaduras seleccionadas, capaces de conferir al vino caracteres particulares. En su libro "Etude sur la bière", escribió: "le goût, les qualités du vin dépendent certainement pour une grande part de la nature spéciale des levures qui s'y développent pendant la fermentation de la vendange".

Los estudios de Hansen en Dinamarca (1883) condujeron al desarrollo de las técnicas de cultivo monocelular de las levaduras y a la identificación de cepas con propiedades fisiológicas particulares. Desde entonces, todos los investigadores que han abordado el problema de la fermentación vinaria bajo el punto de vista microbiológico, han reconocido el interés científico y la importancia económica del empleo de levaduras seleccionadas.

La importancia de la vinificación mediante el empleo de levaduras puras adquirió una importancia tal que, en algunos países de Europa, se crearon y subvencionan establecimientos oficiales encargados de la selección y distribución de las levaduras puras (Estación de Feisenheim de Ginebra, Klosterneuburg de Wädenswyl, Estación enológica de Odesa), utilizadas en conjunción con el sulfitado de los mostos. Esta última operación no daña el desarrollo y las funciones de las buenas levaduras, impidiendo, en cambio, el de los fermentos indeseables. Esta práctica combinada, conducida convenientemente, permite una fermentación de comienzo rápido, de curso regular y que finaliza en un tiempo relativamente corto. El azúcar se utiliza más completamente, lo cual asegura la conservación del producto y aumenta la formación de alcohol.

Holm, H. C. (1908) estudió las levaduras vínicas de California, designando unas cepas con números y otras como *Saccharomyces ellipsoideus*. Comprobó también, que las levaduras encontradas en uvas recogidas en zonas alejadas de las bodegas son inadecuadas o

perjudiciales en la fermentación del mosto (baja producción de alcohol, formación de película, turbidez u olores desagradables). Bioletti, F. T. (1911), comprobó que el *S. ellipsoideus* es la más común de las levaduras verdaderas y el *S. apiculatus*, la más común de las pseudo-levaduras cultivadas de los mostos de vino. Cruess, W. V. (1918) obtuvo cultivos de las levaduras siguientes, de los viñedos californianos: *S. ellipsoideus*, *S. pastorianus*, *Willia anomala*, *S. apiculatus*, *Mycoderma* y *Torula* (*Torulopsis*).

Renaud, J. (1935), en un estudio efectuado en los mostos de vino de Pouilly ordinario y Pouilly fumé, encontró el *S. ellipsoideus* y razas de *S. vini* Muntzii et Cramant en los de Pouilly-sur-Loire. El mismo autor en 1939, publicó el resultado de sus observaciones en los pozos de vinos de Val-de-Loire (Guincy, Sauvignon, Pouilly-sur-Loire, Gris-Meunier, Monts, Vouvray, Bourgueil, Saumur, Anjou, Muscadet nantais) de los que únicamente obtuvo cultivos de levaduras del género *Saccharomyces*: *ellipsoideus*, *cerevisiae* y *pastorianus*, siendo la primera y la última las más frecuentes. Estudió, además, entre otras propiedades de dichas cepas, su poder clarificante y alcohólico.

Castelli, T. (1935) obtuvo 379 cepas de levaduras de 87 mostos procedentes de varias localidades de la prov. de Perugia (Italia). 164 cultivos fueron clasificados como *S. ellipsoideus*, describió una variedad nueva: *S. ellipsoideus* var. *umbra* y una especie nueva: *Pichia derossi*, señalando por primera vez en los mostos de uva, la existencia de *Torulasporea rosei-guilliermondi* (21 cepas).

El mismo autor obtuvo de mostos de vino de la región Toscana cultivos de las siguientes especies: *Saccharomyces*: *ellipsoideus*, *ellipsoideus* var. *umbra*, *uvarum*, *bayanus*, *pastorianus*, *cerevisiae*, *ellipsoideus* var. *major*, *oviformis* var. *bisporus*, *carlsbergensis* var. *mandsúricus*, *exiguus*, *italicus*, *manginii* var. *tetrasporus*; *Zygosaccharomyces florentinus*; *Zygopichia chiantigiana*; *Pichia chodati* var. *trumpyi*, *derossi*, *membranaefaciens uvae*; *Pseudosaccharomyces apiculatus*, *magnus*; *Torulasporea rosei* y *Torulopsis pulcherrima*.

Casale, L y Mensio, C. (1936) en un estudio efectuado en los mostos de la región septentrional de Italia, comprobaron lo observado por diversos autores en otras regiones vitivinícolas, que al comienzo de la fermentación predomina el *S. (Kloeckera) apiculatus*, en tanto que en las fases sucesivas predomina el *S. ellipsoideus*. La primera levadura nunca produce una cantidad de alcohol superior a 6 %, la acidez volátil llega a veces a 2 por mil, produciendo, en cambio, elevada cantidad de ésteres.

De Rossi, G. (1938) de 87 muestras de mostos de la región Umbria (Italia) obtuvo 379 cepas de levaduras con la siguiente dis-

tribución por especie: 164 *S. ellipsoideus*; 142 *Pseudosacch.* (Kloeckera) *apiculatus*; 39 *Pseudosacch. magnus*; 21 *Torulaspora rosei* y 2 de cada una de las especies siguientes: *S. bayanus*, *S. ludwigii* y *T. pulcherrima*. Termina recomendando para la región de Umbria el *S. ellipsoideus* por su alto poder alcohólico.

Mrak y Clung (1940) aislaron de muestras de uva y mostos de California 159 cepas de levaduras esporuladas y 82 de levaduras imperfectas distribuidas en el orden siguiente por su frecuencia: *Saccharomyces* 118; *Candida* 26; *Torulopsis* 25; *Kloeckera* 16; *Zygosaccharomyces* 13; *Hanseniaspora* 11; *Pichia* 6; *Rhodotorula* 6; *Hansenula* 4; *Mycoderma* 6; *Debaryomyces* 3; *Zygopichia* 2; *Asporomyces* 2; *Kloeckeraspora*, *Torulaspora* y *Schizoblastosporium* 1 cepa de cada una. Las especies de *Saccharomyces* cultivadas fueron las siguientes: *cerevisiae*, *cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *oviformis*, *chodati* y *carlsbergensis*; especies de *Zygosaccharomyces*: *priorianus* y *borkeri*; *Pichia*; *alcoholifila*, *membranaefaciens*, *neerlandica*, *belgica*; *Zygopichia* *chevalieri*; *Debaryomyces*: *globosus* y *matruchoti*; *Hansenula* *anomala* var. *sphaerica*; *Torulaspora* *rosei*; *Hanseniaspora* *guilliermondii* y *Kloeckeraspora* *uvorum*.

Recientemente Florenzano, G. (1949) clasificó 355 cultivos de 27 muestras de mostos y vinos de la región Toscana, siendo las especies más frecuentes: *S. ellipsoideus* 42/48 muestras; *Candida pulcherrima* 26/48 muestras; *K. apiculata* 19/48 y *T. rosei* 11/48.

En la Argentina, el único estudio sistemático de las levaduras vínicas que hemos podido consultar, es el efectuado por Dalvit, P. (1940) quien obtuvo 100 cultivos puros y las siguientes especies: *S. ellipsoideus*, *intermedius*; *Kloeckera apiculata*, *Rhodotorula minuta* y especies de *Torulopsis* y *Mycoderma*.

### Material y métodos empleados

En el año 1945 recibimos una primera partida de 31 muestras de mostos recogidas en ampollas estériles, enviadas por el Ing. Jorge van Olphen, jefe a la sazón, de Industrias de Fermentación y Microbiología del Ministerio de Economía, Obras Públicas y Riego de Mendoza y fueron estudiadas en colaboración con la Srta. I. Fischer.

En el año 1951 recibimos una segunda remesa de 26 muestras dobles, una recogida al comienzo y otra al final de la fermentación principal (4 a 6 días de intervalo) enviadas por los Dres. Oscar L. Marsano y María Luisa P. de Marsano. En esa oportunidad las muestras se recogieron embebiendo torundas de algodón estéril introducidas en sendos frascos estériles para su remisión.

En el laboratorio se procedió al aislamiento de las colonias con caracteres macroscópicos diferentes desarrolladas al cabo de 5 días de incubación a 28° C. en agar mosto distribuido en cajas de Petri.

*Estudio micológico:* De cada cepa se anotaron las caracteres macromorfológicos en agar mosto inclinado y en mosto líquido al cabo de 48 horas y de 15 días de incubación a 28° C. así como los de la colonia gigante desarrollada en mosto gelatinado al 12 % al cabo de 1 mes.

*Caracteres micromorfológicos:* forma y dimensiones de los elementos vegetativos y de los ascos en los medios mencionados y en agua de papas para observar la formación de seudomicelio; medio de Gorodkova, bloque de yeso y zanahoria para la producción de endosporos.

*Caracteres fisiológicos:* zimograma (acción fermentativa) empleando el agua de levaduras como medio básico; estudio auxanográfico de las fuentes de carbono y de nitrógeno, capacidad de desarrollarse en un medio de composición definida con 3 % de alcohol etílico como única fuente de carbono, acción sobre la gelatina y sobre la leche simple y tornasolada.

### Resultados

*Primera serie.* — Las muestras de mostos fueron recogidas indiferentemente al cabo de 24 h. y al final de la fermentación principal entre el 22 de marzo y el 7 de abril de 1945. Procedían de bodegas que trabajaron las siguientes variedades de uva: criolla, Barbera, Malbec, moscatel rosado y cereza, Lambrusco, peras Harenberg, Pedro Giménez, Pinot, semillón, Rieling, deliciosa Huydobro K. D., R. Beauty Deliciosa Jonathan, procedentes de las siguientes localidades: Las Heras, C. de Araujo, Jocoli, Lavallo, San Rafael, Tunuyan, Ugarteche, M. Drumond, Tupungato, Chacras de Coria, Perdiel, Rodeo del Medio, Agrelo, Corralitos, F. M. Beltrán Rivadavia, Junín, San Martín y alrededores, Consulta, Vista Flores, La Paz Las Catitas y Godoy Cruz (1).

Se obtuvieron cultivos de 33 cepas clasificadas en las siguientes especies: *Saccharomycetes steineri* Lodder et van Rij: 14; *S. cerevisiae* Hansen 7, *S. heterogenicus* Osterwalder 3, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) 3, *S. carlsbergensis* Hansen 1, *S. oviformis* Osterwal-

(1) La temperatura de fermentación fué de 22° C a 32° C y todas las muestras a excepción de 2, habían recibido de 13 a 80 g. de anhídrido sulfuroso por Hl.

der 1, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner 1, *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Kloecker) Janke 2, *Torulopsis famata* (Harrison) Lodder et van Rij 1.

Muestras con dos especies: *S. steineri* y *K. apiculata* 2 muestras; *S. steineri* y *T. famata* 1; *S. cerevisiae* y *S. carlsbergensis* 1; *S. cerevisiae* y *S. pombe* 1.

*Segunda serie.* — Las variedades de uva y su procedencia fueron las mismas que en la primera serie. Se trabajó con cubas conteniendo entre 100 y 2.500 Hl. de mosto con una temperatura inicial, más baja, de 17° C. y la temperatura final más alta registrada fué de 56° C. El Baumé inicial osciló entre 10 y 14,3 y, el final, entre 0,0 y 6,6. El tratamiento con anhídrido sulfuroso fué de 10 a 30 gr. por Hl.

Se clasificaron 48 cepas con la siguiente distribución por especie: *Saccharomyces steineri* L. et van R. 32; *S. cerevisiae* H. 9; *S. heterogenicus* O. 5; *S. oviformis* O. 2.

### Resumen

Los mostos de uva de Mendoza tienen una microflora particular. En tanto que en otros países vitivinícolas *Kloeckera apiculata* es la levadura predominante en la fermentación inicial y *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* al final de la fermentación principal, en los mostos de Mendoza estudiados por nosotros *S. steineri* ha sido identificado en 46/81 cepas. Le siguen luego, por orden de frecuencia, las siguientes levaduras verdaderas: *S. cerevisiae* 16/81; *S. heterogenicus* 8/81; *S. oviformis* 3/81; *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* 3/81; *S. carlsbergensis* 1 y *Schizos. pombe* 1. Falsas levaduras: *Kloeckera apiculata* 2/81 y *Torulopsis famata* 1/81.

*Saccharomyces steineri* fué cultivado en 5/26 muestras de mostos al comienzo y en 17/26 al final de la fermentación principal.

### Summary

Grape musts from Mendoza have particular microflora. In most wine-making countries *K. apiculata* was found at the beginning and *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* at the end of the fermentation. Over half of the cultures isolated by us from Mendoza's musts were classified as *S. steineri* (46/81 cultures). The remaining yeasts were the following: *S. cerevisiae* 16/81; *S. heterogenicus* 8/81; *S. oviformis*

3/81; *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* 3/81; *S. carlsbergensis* and *Schizos. pombe* 1 among the true yeasts. Nonsporulating yeasts: *Kloeckera apiculata* 2/81 and *Torulopsis famata* 1.

*Saccharomyces steineri* was found in 5/26 samples of grape musts at the beginning and in 17/26 samples at the end of the fermentation.

### CUADRO I

Distribución de las especies de levaduras al comienzo y final de la fermentación principal

| N.º de muestra | Levaduras            | <i>S. steineri</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. heterog-nicus</i> | <i>S. oviformis</i> |
|----------------|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| 1              | comienzo .....       |                    | +                    |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 2              | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          |                    | +                    |                         |                     |
| 3              | comienzo .....       |                    | +                    |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 4              | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 5              | comienzo .....       |                    |                      | +                       |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 6              | comienzo .....       |                    | +                    |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 7              | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 8              | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 9              | comienzo .....       |                    | +                    |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 10             | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 11             | comienzo .....       | +                  |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 12             | comienzo no desar.   |                    |                      |                         |                     |
|                | final .....          | +                  |                      |                         |                     |
| 13             | comienzo .....       | +                  |                      |                         |                     |
|                | final infectada .... |                    |                      |                         |                     |
| 14             | comienzo .....       | +                  |                      |                         |                     |
|                | final no desar. .... |                    |                      |                         |                     |

## CUADRO I (Continuación)

| N.º de muestra | Levaduras            | S. steineri | S. cerevisiae | S. heterogenicus | S. oviformis |
|----------------|----------------------|-------------|---------------|------------------|--------------|
| 15             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final .....          | +           |               |                  |              |
| 16             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final no desar. .... |             |               |                  |              |
| 17             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final .....          | +           |               |                  |              |
| 18             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final no desar. .... |             |               |                  |              |
| 19             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final .....          | +           |               |                  |              |
| 20             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final no desar. .... |             |               |                  |              |
| 21             | comienzo .....       |             |               | +                | +            |
|                | final .....          | +           |               |                  |              |
| 22             | comienzo .....       |             |               |                  | +            |
|                | final .....          |             | +             |                  |              |
| 23             | comienzo .....       | +           |               |                  |              |
|                | final .....          |             | +             |                  |              |
| 24             | comienzo .....       | +           | +             | +                |              |
|                | final .....          | +           | +             |                  |              |
| 25             | comienzo .....       | +           |               | +                |              |
|                | final .....          | +           |               |                  |              |
| 26             | comienzo .....       |             |               | +                |              |
|                | final no desar. .... |             |               |                  |              |

## BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA GOIS, L. A. E VIEIRA, M. — *Anais Inst. Sup. Agron. (Lisboa)*, 9, 171, 1938.
- AMERINE, M. A. AND JOSLYN, M. A. — *Commercial production of table wines. Univ. California College of Agric. Agricultural Exper. St., Berkeley, California, Bulletin* 639, 1940.
- BERTIN, C. — *Bull Internat. du vin*, N°22, 56, 1930.
- CASALE, L. E MENSIO, C. — *Studio dei fermenti indigeni delle regioni sttentrionali d'Italia. Asti*, 1936.
- CASTELLI, T. — *Bol. Ist. Sierter. Milanese*, 14, 911, 1935. *Bol. Sez. Italiana Soc. Internaz. Microbiol.*, 7, 123, 1935.
- DALVIT, P. — *Rev. Inst. Bacteriológico (Buenos Aires)*, 9, 360, 1940.
- DE ROSSI, G. — *Quarto Congr. Internaz. Vigni e vino Lausanne, 1935. Ref.: Zentralb. f. Bakt. II Abt.*, 98, 469, 1938.

- DVORNIK, R. — *Zentralb. f. Bakt., II Abt.*, 98, 315, 1938.
- ESCOMEL, E. — *Obras científicas* 2, 528, 1929.
- FAWCET, G. L. — *Industrial y Agric. Tucumán*, 11 (788, 150, 1920).
- FLORENZANO, G. — *Ann. Sperim. Agraria*, 3, 877, 1949.
- GÉZA REQUINGI. — *Bull. Intern. du vin*, N° 20, 61, 1930.
- GONZÁLEZ TORIÑO H. — *Rev. Fac. Agronomía Montevideo*, 17-18, 57, 1939.
- GUILLIERMOND, A. — *Bol. Direc. Est. Biológicos (México)*, 2, 22, 1917.
- LEJENNE, L. M. — *An. Soc. Cient. Argentina*, 79, 93, 1915.
- Levaduras alcohólicas en vinificación.* — *Rev. vinícola y de Agric. (Zaragoza)*, 51 (2), 17, 1935.
- LODDERT, J. AND KREGERT-VAN RIJ, N. J. W. — *The Yeasts North-Holland Pub. Co.* Amsterdam, 1952.
- LOOS, E. W. — *Bol. Agrícola*, 6, (6 y 7), 24, 1938.
- Microbiological examination etc.* — *Am. J. Public Health*, 33, 725, 1943.
- MOREAU, L. ET VINET, E. — *Ann. Fermentation*, 1, 101, 1935.
- MRAK, E. M. AND MC CLUNG, L. S. — *J. of Bact.*, 40 (3), 395, 1940.
- MRAK E. M. AND PHAFF, H. J. — *Rep.: Ann. Rev. Microbiol.*, 1948.
- NISHIWAKI, Y. — *Zentralb. f. Bakt., II Abt.*, 78, 403, 1929.
- OLIVERAS MASSÓ, C. — *Vinos, viñas y frutas*, 40, (475), 321, 1945.
- CRUZ, M. C. — *Vendimias y levaduras seleccionadas.* Min. Agri. Stgo. Chile, 1940.
- PASTEUR, L. — *Étude sur la bière.* París, 1876.
- PORCHET, B. — *Ann. Ferment.*, 4, 578, 1938.
- RENAUD, J. — *Ann. Ferment.*, 1, 468, 1935. — *C. R. S. Soc. Biologie*, 125, 622, 1937; id., 131, 681, 1939; *C. R. S. Ac. Sci.*, 208, 1926, 1939.
- RUIZ, M. — *An. Inst. Biol.*, 9, 49, 1938.
- SÁNCHEZ-MARROQUIN, A., MEDELLIN, E. y ALVAREZ, C. — *Rev. Soc. Mexicana Hist. Nat.*, 9, 199, 1948.
- SORIANO, S. — *Rev. Inst. Bacter. (Buenos Aires)*, 8, 251, 1938.
- STEINER, J. M. — *Étude sur les levures actives des vins valaisans. These, Fac. Sc., Geneve*, 1924.
- TAIROFF, B. — *J. Microbiol.*, 9, 185, 1929.
- VENTRE, J. — *Influence de quelques levures elliptiques sur la constitution des vins Montpellier.* Coulet et fils Ed., 1913.
- Ann. Ferment.*, 2 (5), 301, 1936.
- ZIMMERMAN, J. G. — *Zentralb. f. Bakt., II Abt.*, 95, 369, 1936-37.