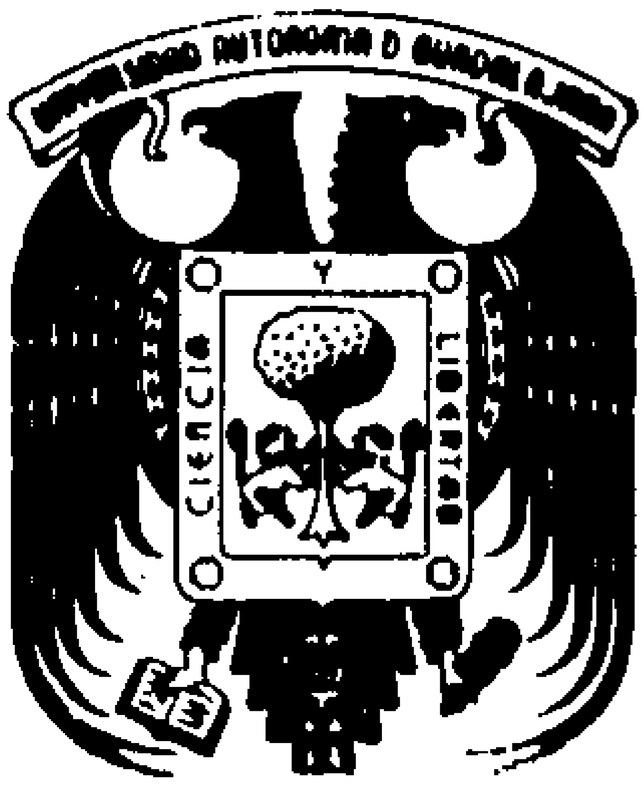
870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

12.
29

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



ALLS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS NATIVAS DE LOS VIÑEDOS DEL CAEZAC, CON PROPIEDADES ENOLOGICAS ESPECIFICAS.

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

VICTOR HUGO GUTIERREZ MATA

A S E S O R

Q.F.B. **ARACELI ESCOBEDO MAGALLON**

GUADALAJARA, JAL., ABRIL 1 9 8 6

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION

I.- GENERALIDADES SOBRE UVA, MOSTO FERMENTACION Y VINO

I.1. La Uva..... 7

I.2. El Mosto..... 8

I.3. Fermentación..... 10

I.4. Vinos..... 13

II.-GENERALIDADES SOBRE LEVADURAS

II.1. La Levadura y su Ecología..... 17

II.2. Importancia para el Hombre..... 17

II.3. Morfología y Estructura Celular..... 18

II.4. Reproducción de las Levaduras..... 20

II.5. Nutrición..... 23

II.6. Respiración..... 28

II.7. Influencia de los Factores Ecológicos en sus Funciones Vitales..... 29

II.8. Enzimas de las Levaduras..... 30

II.9. Clasificación..... 34

III.-MATERIAL Y METODOS

III.1. Aislamiento de las Levaduras..... 36

III.2. Identificación de las Levaduras..... 58

III.3. Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones..... 70

IV.- RESULTADOS

IV.1. Cepa 1..... 81

IV.2. Cepa 2..... 93

CONCLUSIONES..... 100

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 105

CON UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL

A MIS PADRES:

Jesús y Ma. del Carmen

A MI ESPOSA:

Paty

A MIS HIJOS:

Diana y César

A MIS MAESTROS:

Todos

A MIS AMIGOS:

Todos

AL DIRECTOR Y CONSEJERO DE ESTE TRABAJO:

Dr. Manuel I. Díaz Cervantes

INTRODUCCION

Dos vegetales son necesarios para hacer el vino: el fruto de la vid y las levaduras. La uva, elemento del Reino Vegetal cuyas propiedades y caracteristicas serán brevemente - tratadas en este trabajo. El otro elemento necesario para -- transformar el mosto de la uva en vino es la levadura, miembro de las talofitas, una de las divisiones del Reino Vege-- tal.

Cualquier persona que se haya tomado el trabajo de elaborar pan casero, ha oído mencionar la palabra "levadura" o la conoce como una masa blancuzca o amarillenta. Sin embargo resulta menos conocido que existen en el aire estos pequeños - seres que son capaces de provocar la fermentación de los frutos cuya pulpa quede al aire libre. La fermentación es básicamente la transformación de los azúcares de los frutos en - alcohol y bióxido de carbono.

Dosde tiempos muy remotos el hombre comprobó que este proceso de fermentación era capaz de producir una bebida alcohólica a partir prácticamente de cualquier líquido azucarado.

Pero, si la fermentación se realiza al azar la bebida final no siempre resulta del agrado general, más aún, la mayoría de las veces se descompone. Nuestros ancestros comprendieron esto y mostrando su ingenio decidieron que la mejor - manera de prevenir alguna desgracia era tomar como "fermentos" los restos de una bebida exitosa dejados en el fondo -- del recipiente.

Este es el paso inicial para la selección de levaduras.- De acuerdo a ciertos testimonios arqueológicos, parece ser -

que la selección de levaduras ya se conocía en el siglo IV - antes de Cristo y en la Edad Media ya se habían identificado varios tipos de fermentos.

Anton Van Leeuwenhoek observó directamente a aquel ser tan prodigioso, y más tarde Lavoisier, Gay Lussac y sobre todo - Pasteur contribuyeron a su mejor conocimiento.

Aún así no se ha logrado esclarecer completamente la - - complejidad de la acción de las levaduras. Son tantas las variedades de levaduras y tan diversas sus características que no simplemente producen alcohol etílico, sino otros productos secundarios que confieren efectos decisivos sobre el sabor de un brebaje.

La fermentación alcohólica es un proceso complicado en - el que se forman, a partir de la glucosa, los productos principales que son: el alcohol etílico y bióxido de carbono y - entre sus productos secundarios se encuentran los aldehidos- los ácidos acético y succínico, el butilenglicol, algunos alcoholes superiores y sobre todo los esteres. Todos los productos antes mencionados en la mayor o menor proporción con- que aparecen en el vino contribuyen a su formación y calidad.

Existe en la naturaleza una gran diversidad de especies- de levaduras y de cada especie numerosas razas, cada una de- las cuales tiene propiedades diferentes (asimilación o fer-- mentación de diferentes carbohidratos, asimilación o descomposición de diferentes compuestos orgánicos, capacidad para- tolerar o no concentraciones altas de alcohol) que lógicamente influyen en la elaboración de un vino.

Así, el mayor o menor poder fermentativo que se refleja en la producción de más o menos alcohol, la producción de ácidos volátiles en proporciones más o menos elevadas, la intensidad y clase de aromas dependen en gran parte de las clases de levaduras que llegaron a predominar en la fermentación de los mostos.

Sentado que los productos de fermentación de las distintas levaduras no son iguales, se hace patente que es de fundamental importancia reconocer las levaduras que realizan la fermentación de los mostos y determinar cuales son las propiedades de cada una de las especies que en ella intervienen.

Las condiciones de terreno, climas y otros factores son los que influyen para que la presencia de las levaduras difiera de un lugar a otro, sea en cuanto a especies o en cuanto a sus concentraciones.

El hecho de utilizar levaduras seleccionadas de entre las propias del terreno o de la localidad de donde procede la uva que se va a utilizar, es conveniente ya que varios problemas son evitados por este procedimiento.

El número relativamente alto de células y el conocido crecimiento característico de la especie adicionada producirá fermentaciones más rápidas y sobre todo predecibles.

Por todo lo anteriormente expuesto, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, más específicamente en el Centro de Investigaciones Agrícolas Norte-Centro (CIANOC) con sede en el Campo Agrícola Experimental de Zacatecas (CAEZAC) preocupado por lograr la tecnología adecuada para el avance -

de la agroindustria ha establecido con interés un programa de Enología, que cuenta entre sus fines el de lograr la microrregionalización de los vinos, mediante la realización de un estudio de las variedades de uva procedentes de diversos viñedos comprendidos en la zona de influencia del Campo Agrícola-Experimental de Zacatecas.

Dentro de este vasto proyecto, se inserta el estudio de las levaduras nativas cuyo inicio representa este trabajo breve ante la magnitud de la tarea e interesante por las perspectivas que abre.

La conjunción de uvas adecuadas por lo fino de la variedad y el equilibrio de su composición, y la elección de cepas de levaduras aisladas de los propios terrenos, con características enológicas adecuadas asegura la obtención de vinos de alta calidad y gran tipicidad.

Es necesario señalar que el estudio de las levaduras ha dado comienzo, debido a lo aventajado del trabajo de vinificación de muchos lotes de diferentes variedades y de diversos lugares, algunos mostos se han dejado fermentar al azar con resultados verdaderamente sorprendentes. Este hecho se ha repetido varias veces durante tres años en forma consecutiva.

Lo realmente notable, es el elevado grado alcohólico de los vinos elaborados con algunas variedades específicas de uva, como ejemplo la variedad Grenache, cuyos frutos procedentes de los propios viñedos del CAEZAC. Este vino ha alcanzado naturalmente los 18° GL. El análisis del grado alcohólico se ha repetido varias veces y mediante diversas técnicas.

Además de la determinación de alcohol, otros análisis físicos y químicos se efectuaron como acidez volátil, acidez total, PH, densidad, concentración de azúcares reductores, extracto seco y anhidrido sulfuroso.

El resultado de estos análisis aporta datos que hacen concluir que el vino resultante de la fermentación al azar es de calidad.

Se procedió pues al aislamiento de las levaduras en tres etapas:

1) Levaduras presentes en el grano de uva antes de la cosecha.
2) Levaduras presentes al inicio de la fermentación.
3) Levaduras presentes en el vino, una vez terminada la fermentación.

Se aislaron cinco cepas diferentes. Diversos análisis permitieron identificar la cepa que interesaba directamente y clasificarla. Aún así queda un vasto e interesante campo de acción.

C A P I T U L O I

GENERALIDADES SOBRE UVA, MOSTO, FERMENTACION Y VINO

I.1.- LA UVA

La uva es el fruto de la vid. Los racimos de las uvas se componen de raspón o escobajo y de granos de uva. Tales proporciones varían mucho dependiendo de la variedad de la vid, del clima, el terreno, la modalidad del cultivo, la maduración y la sobremaduración (CARBONELL 1970).

El raspón o escobajo es el soporte de los granos. La constitución del raspón varía en composición, dependiendo de su maduración, pero en general contienen agua, taninos, sales cálcicas y potásicas y ácidos orgánicos como el málico y tartárico (CARBONELL 1970).

El grano de uva consta de hollejo, pulpa y pepitas, en proporciones también muy variables, según la casta de las cepas y las condiciones del cultivo y del clima en cada situación y en cada año (MARCILLA 1974).

Los hollejos contienen celulosa, ácidos (tartárico y málico) y sales de los mismos y taninos, materias colorantes, sustancias nitrogenadas y sales minerales (MARCILLA 1974). Las pieles de las uvas contienen sustancias aromáticas y saborizantes así como las antocianinas (sobre todo oenina) que proporciona a las uvas negras su color (RHODES Y FLETCHER 1969). La pulpa puede ser carnosa, jugosa o pulposa (de poco jugo). La composición de la pulpa es muy semejante a la del mosto y está compuesta por:

AGUA	65 a 85%
AZUCARES	10 a 30%

ACIDOS	5%
MATERIAS MINERALES	
SUSTANCIAS NITROGENADAS	
SUSTANCIAS PECTICAS	

El azúcar de la pulpa es una mezcla de glucosa y fructosa en cantidades aproximadamente iguales al encontrarse el fruto en estado de madurez. Esta forma de azúcar es directamente -- formentable por la acción de las levaduras.

La materia nitrogenada y mineral es de gran importancia - para la alimentación de las levaduras.

Las pepitas o semillas.- Son ricas en taninos y en aceite conteniendo cantidades menores de materiales resinosos (WIN-- KLER 1976).

I.2.- EL MOSTO

El líquido obtenido por apisonado y estrujado de las uvas se conoce comunmente como mosto. Los mostos de uva son espe-- sos, algo viscosos, más densos que el agua.

Las densidades de los mostos varían mucho según su rique- za en azúcar y en otras sustancias no azucaradas, sobre todo- según la primera (MARCILLA 1974).

El PH de los mostos para vinos de mesa oscila entre 3.1 a 3.6, mientras que para vinos de postre puede variar desde 3.4 hasta 3.8 (AMERINE Y OUGH 1976). El PH viene determinado principalmente por su contenido en ácidos (tartárico y málico --- principalmente).

El mosto por lo tanto constituye un excelente medio de -- cultivo para microorganismos que puedan tolerar un medio áci- do y no necesita de macerado (como ocurre en la formentación-

de la cerveza) para hacer que se vuelvan fermentables los hidratos de carbono.

Al suprimir el macerado y hervido se simplifica la preparación del medio para la fermentación en la producción de vinos, pero existe un mayor riesgo de infección. A esto hay que añadir como una complicación más la presencia en la uva de microorganismos diversos, entre los que se encuentran las levaduras, mohos y bacterias además de las levaduras del vino que a menudo constituyen el inóculo natural que es característico de cada zona geográfica (RHODES Y FLETCHER 1969).

El problema se resuelve mediante esterilización parcial - por medio de anhídrido sulfuroso, bisulfitos o metabisulfitos. Se puede utilizar el metabisulfito de potasio a razón de 100-mg/Kg de uva (DIAZ 1982).

Estas sustancias son tóxicas para todos los microorganismos pero las levaduras más adecuadas para la vinificación toleran dosis que son muy perjudiciales para otros microbios, y en ello estriban algunas de las ventajas del empleo de estas-sustancias (MARCILLA 1974).

Por lo tanto la administración controlada de estas sustancias puede llevar a la preparación de un mosto cuya población microbiana esté compuesta principalmente por levaduras de vino.

Una gran cantidad de vino se produce por esta fermenta--ción espontánea, inducida por inóculos mezclados de levaduras que se dan en la naturaleza, y que en ciertos años pueden dar lugar a la producción de vinos especialmente buenos (RHODES Y FLETCHER 1969).

La falta de un control estricto del inóculo ha llevado a - la selección y cultivo in vitro de cepas apropiadas para la - elaboración de vinos.

De la composición y calidad de la uva dependerán las del- mosto y de este, en principio, las del vino.

Son diversos los agentes que influyen sobre la calidad -- del mosto. Entre los factores que más influyen tenemos: el -- clima, el terreno, la modalidad del cultivo (poda, abono, den sidad de plantación etc.), la lluvia y las enfermedades (CAR- BONELL 1970).

I.3.- FERMENTACION

La tansformación del mosto (líquido azucarado) en vino -- (líquido alcohólico) se produce por un fenómeno biológico co- nocido con el nombre de fermentación alcohólica.

Hace solo unos cuantos años fué descubierto que la fermen tación alcohólica podía ocurrir solo bajo la acción directa - de unos pequeños seres vivos, las levaduras.

El azúcar del mosto se transforma en alcohol y bióxido de carbono bajo la acción de ciertas enzimas segregadas por las- levaduras que se han multiplicado en el medio (NEGRE Y FRAN-- COT 1962).

Nuestros sentidos pueden apreciar fácilmente el fenómeno- de fermentación y se observa en efecto:

1º Una efervescencia, semejante a la del agua que hierve- y que se debe al desprendimiento de gas o bióxido de carbono- (CO_2).

2º Un aumento de temperatura en el seno de la masa que -- fermenta.

3º Un cambio de sabor en el líquido puesto en fermenta-- ción que de azucarado toma rápidamente un gusto alcohólico.

4º Una disminución de su densidad, que se aproxima a la- del agua y después se hace menor.

5º Un aumento de color, cuando está en contacto con ho-- llejos de uvas coloreadas.

El proceso de fermentación de una molécula de glucosa da como resultado 2 moléculas de alcohol etílico y 2 moléculas - de CO_2.

Esto fué formulado por Gay Lussac en 1810 dentro de la - ecuación que lleva su nombre:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3\text{-}CH_2OH + 2\ CO_2$$

De este modo 180 gramos de glucosa producirán un total de 92 gramos de etanol y 88 gramos de CO_2 cuando se completa la- fermentación (AMERINE Y SINGLETON 1976).

Esto representa el máximo rendimiento de etanol, el cual es 51.1% del peso del azúcar fermentado.

Pero en 1860, Pasteur indicó que la ecuación de Gay Lussac solo se realiza en la práctica en un 95%, y que por lo tanto- se forman otros productos secundarios, como glicerina y ácido succínico (CARBONELL 1970).

El mismo Pasteur demostró que la fermentación alcohólica era un proceso bioquímico resultante del metabolismo celular- en ausencia de oxígeno libre.

INFLUENCIA DE FACTORES FISICOS Y QUIMICOS EN LA FERMENTA- CION ALCOHOLICA

Existe una serie de factores físicos y químicos que alte-

ran la formentación pudiendo entorpecer o favorecer el trabajo de las levaduras determinando al final las características del vino.

A continuación se dan a conocer algunos de esos factores:

TEMPERATURA.- El proceso de fermentación desarrolla calor, el cual si no es eliminado adecuadamente causará un aumento de temperatura del mosto, afectando el gusto y aroma del vino.
En vinos blancos la temperatura adecuada para la fermentación oscila entre 17 y 21°C y en los tintos entre 23 y 26°C (DIAZ 1982).

PRESION.- Una presión elevada impide la actividad de las levaduras, paralizando la fermentación al dificultar el desprendimiento de CO_2 (CARBONELL 1970).

ANTISEPTICOS.- El más usado es el SO_2 por no dañar la salud.- El SO_2 desarrolla una acción enérgica y selectiva, ya que elimina bacterias y levaduras indeseables, dejando trabajar a las levaduras del vino, un exceso de sulfuroso puede paralizar la fermentación.

TANINO.- El tanino puede entorpecer la normal marea de una fermentación de mostos cuando su presencia es excesiva (CARBONELL 1970).

ACIDOS.- El PH del mosto es también factor importante en el desarrollo normal de una buena fermentación, siendo el PH de mejores resultados entre 3.1 y 3.6 (AMERINE Y C.S OUGH 1976).

I.4. VINOS

El VINO es un líquido hidroalcohólico ácido resultante -- del trabajo realizado por las levaduras sobre los azúcares.

VINO es la bebida que se elabora únicamente a partir del- jugo o mosto de la uva.

El concepto es muy específico y se refiere a los vinos de mesa blanco, tinto o rosado, los cuales se toman generalmente- en las comidas, también incluye a los vinos generosos que se - consumen cómo aperitivo o como postre y a los vinos espumosos- que se usan comúnmente en ciertas celebraciones.

Además de consumirse como fruta, la uva puede ser empleada en la elaboración de diferentes productos: jugos, jaleas, - uva pasa y vino.

La utilización depende de cada variedad y de la zona de - cultivo. Esto ha contribuido a que se haya efectuado una selección de variedades para vino en Zacatecas y se han definido algunas variedades con buenos resultados en la elaboración de -- vinos (DIAZ 1982).

VARIEDADES SOBRESALIENTES

TINTO: CABERNET SAUVIGNON

RUBY CABERNET

MALBEC

GRENACHE

BLANCO: CHENIN BLANC

EMERALD RIESLING

GEWURZTRAMINER

WHITE RIESLING

VARIEDADES DE MENOR CALIDAD

TINTO: ZINFANDEL

RUBY RED

CARIGNANE

BLANCO: FEHER SZAGOS

GRILLO

COMPOSICION QUIMICA DEL VINO.

Los componentes del vino provienen de los cambios experimentados en la fermentación alcohólica y del propio mosto. La composición química del vino varía en el curso de su existencia debido a los fenómenos de oxido-reducción y la esterificación - - (CARBONELL 1970).

Entre los compuestos presentes en el vino tenemos:

AGUA.- Cuantitativamente es el más abundante y actúa como disolvente de los demás.

MONOALCOHOLES.- Etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, etc. (AMERINE Y OUGH 1976, ROSE AND HARRISON 1970).

POLIALCOHOLES.- Glicerina, 2,3-butanodiol, etc. (AMERINE Y OUGH 1976).

ACIDOS PROVENIENTES DEL MOSTO.- Cítrico, málico, tartárico y bitartratos.

ACIDOS PROVENIENTES DE LA FERMENTACION Y OTRAS SUCESIVAS.- Láctico, succínico, acético, carbónico, butírico, fórmico, etc. -- (AMERINE Y OUGH 1976, CARBONELL 1970).

MATERIAS COLORANTES Y AROMATICAS (FENOLES) PRESENTES EN LA - UVA.-

a) ANTOCIANINAS: Cianidina, peonidina, etc.

b) ANTOCIANOGENOS: Cianidanol, delfinidanol, etc.

c) CATEQUINAS: (+)-catequina, (-)-epicatequina, etc.

d) FLAVONOLES: Kempferol, quercetina, etc.

e) FLAVONONAS: Naringenina, naringina, etc.

Los compuestos fenólicos son importantes por diversas razones: proporcionan el color al vino, tienen sabor astringente y posiblemente son la causa de olores picantes. Todos los compuestos antes mencionados se encuentran principalmente en el pellejo de la uva (AMERINE Y OUGH 1976).

COMPUESTOS CARBONILICOS.- Acetaldehido, acetoína, diacetilo,- etc. (AMERINE Y OUGH 1976).

MATERIAS NITROGENADAS.- Un gran número de compuestos que contienen nitrógeno se han encontrado en los vinos tales como amoniaco, aminoácidos, vitaminas (B_1, B_2, B_6, B_{12}, biotina,- colina, etc.) aminas y nitratos (AMERINE Y OUGH 1976).

MATERIAS MINERALES.- K, Ca, Mg, Fe, Cl, etc. (CARBONELL 1970).

C A P I T U L O II

GENERALIDADES SOBRE LEVADURAS

II.1.- LAS LEVADURAS Y SU ECOLOGIA

Se puedon definir las levaduras como hongos cuya forma corriente y dominante de crecimiento es unicelular. Por lo regular estos microorganismos se reproducen por gemación.

Las levaduras no forman un grupo bien definido. No son -- una entidad taxonómica natural, aunque presentan uniformidad- morfológica y así, por lo escaso del criterio morfológico las especies de levaduras se diferencían menos en base a su morfología que a sus características fisiológicas.

Los hongos gemantes están ampliamente distribuidos en la- naturaleza y son diseminados por los insectos o el viento. Su habitat puede ser no solo las capas superiores del suelo, sino también muchas materias orgánicas, sobre todo de origen vegetal que contienen hidratos de carbono.

En muchas clases de suelos hay varias especies de levaduras. Ello demuestra su gran capacidad para sobrevivir en am-- bientes muy distintos en los que varían la composición, la -- temperatura, la luz y la humedad y algunos otros factores del suelo (PELCZAR, REID, CHAN 1977).

Las levaduras pueden aislarse especialmente del suelo de- los viñedos y huertos, de las superficies de uvas, manzanas y de la mayoría de los frutos dulces.

II.2.- IMPORTANCIA PARA EL HOMBRE

Las levaduras se conocen sobre todo por su capacidad para

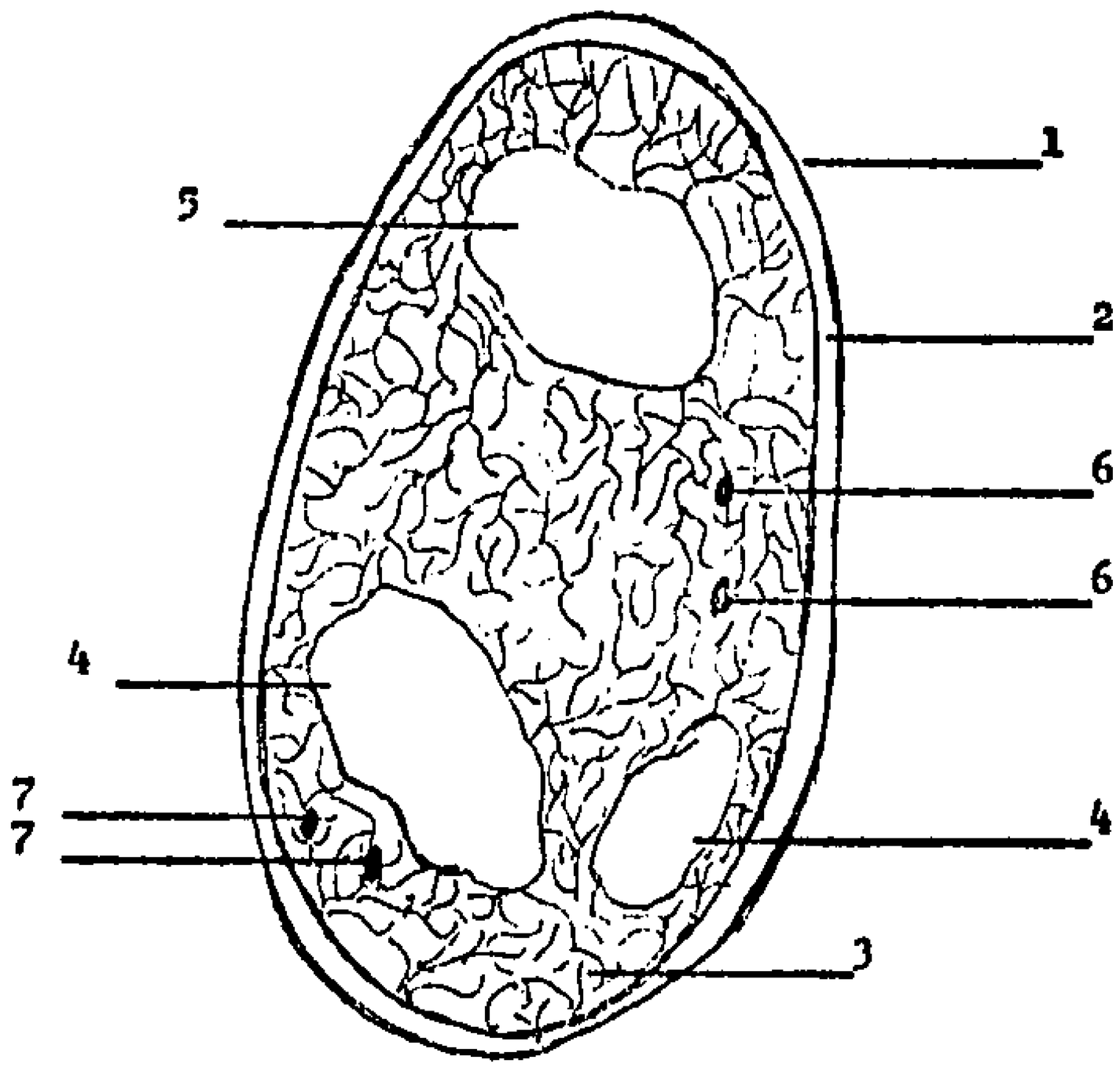
formentar carbohidratos, de aquí el nombre de SACCHAROMYCETES (Gr.Saccharon-azúcar y mykotes-hongos) que se les aplica. En-razón de esta propiedad y por el alcohol y el bióxido de carbono que producen, los cerveceros, vinateros y panaderos em-plean levaduras en sus industrias. Por selección y crias se han desarrollado ciertas cepas de levaduras que son, desde el punto de vista industrial, superioros a las naturales o sil-vestres. Sin embargo las levaduras silvestres desempeñan toda vía un muy importante papel en diversas formentaciones, tales como la del vino y la del cacao, productos a los cuales comunican su sabor aromático (ALEXOPOULOS 1977).

II.3.- MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA CELULAR

Las células individuales de levadura suelen ser osféricas, ovoideas o elipsoidales. Algunas pueden presentar células muy ensanchadas o alargadas. La forma de la célula activa no es un indicio para la identificación de especies. La forma de las levaduras está afectada fuertemente por la edad del cultivo y por las condiciones ambientales. Las células de levadura varían en dimensiones según la especie, nutrición, edad y otros factores. Pueden oscilar de 1-9 micras de ancho y de 2 a más de 30 micras de longitud (PRESSCOTT Y DUNN 1962).

Las levaduras son organismos eucarióticos y las estructuras que las forman son similares que las de otros eucarióticos (Ver Figura 1). La forma y estructura de las levaduras varían según especies (PELCZAR,REID,CHAN 1977). En general pueden estar constituidas por cápsulas, pared celular, membrana citoplasmática, protoplasma conteniendo ribosomas, or-

FIGURA 1.- ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE UNA LEVADURA



1.- PARED CELULAR

2.- MEMBRANA CITOPLASMATICA

3.- PROTOPLASMA

4.- VACUOLA

5.- NUCLEO

6.- GRANULOS DE VOLUTINA

7.- GLOBULOS DE LIPIDOS

ganelos y gránulos de volutina (CARPENTER 1969), núcleo, mitocondrias y vacuolas (Ver Fig.1).

II.4.- REPRODUCCION DE LAS LEVADURAS

La multiplicación de las levaduras se realiza en la mayor-parte de los casos por el proceso que recibe el nombre de gemación, porque en cada célula que va a dar origen a otra nueva - se produce un pequeño abultamiento o yema (MARCILLA 1974).

Este pequeño abultamiento sigue creciendo hasta que la membrana desarrolla la tendencia a cerrarse en la zona de inserción-con la célula madre. Por fin queda completa y se separa resultando dos células independientes. Hay ocasiones en que no hay-tal separación y las células quedan adheridas unas a otras - - formando verdaderos racimos, el resultado es una masa pseudomicélica compuesta incluso hasta por 64 células unidas (CARPENTER 1969).

Hay algunas especies de levaduras que presentan una multiplicación por fisiparidad transversal. Este tipo de reproducción al igual que la gemación es asexual. En este caso las células redondas u ovalos se alargan hasta cierto tamaño, y entonces se forma un tabique transversal en la parte media. Las-dos células se separan y los extremos se redondean.

En condiciones desfavorables de nutrición y desarrollo el proceso de la gemación no ocurre y en cambio se producen esporas que son de reproducción formas y permiten a las levaduras-conservarse viables.

La esporulación en este caso se refiere a la formación de-esporas sexuales (ascosporas y basidiosporas) asociadas con có

lulas diferenciadas (ascas o basidios) mediante un proceso - - meiótico. Existe también la esporulación asexual o vegetativa- ocurriendo la formación de esporas como conidias, artrosporas, blastosporas y clamidosporas (SENEZ 1976).

Entre las levaduras solamente la familia SACCHAROMYCETA- - CEAE es la que produce ascosporas, la familia BASIDIOMYCETA- - CEAE produce basidiosporas y la CRIPTOCCOCACEAE no forma esporas sexuales.

Esta característica permite colocar a las levaduras dentro de una familia de las señaladas.

Puede iniciarse la esporulación por falta de alimentos o - acumulación de productos tóxicos finales, y para que esto ocurra es necesario que las levaduras sean jóvenes, que exista humedad y oxígeno abundantes, que no existan sustancias inhibidoras y que la temperatura de incubación sea la adecuada (entre- 20 y 30°C)(PRESCOTT Y DUNN 1962).

El número de ascosporas varía de una a ocho dependiendo -- del género, es raro encontrar más de ocho pero en algunas especies hay hasta 16 ascosporas (Ver Cuadro 1).

La forma de las ascosporas es un caracter genérico y varía lo más frecuente es que sean esféricas, pero pueden ser reni-- formes, fusiformes, falciformes o incluso presentar un collar- que puede ser basal, dándole aspecto de sombrerillo o bien e-- cuatorial, en "anillo de saturno" (Ver Fig.4-C)(SENEZ 1976).

En las levaduras esporuladas, la espora es siempre haploide y se origina por división meiótica de una célula vegetativa diploide.

Cuando se conjugan dos estructuras haploides el resultado-

CUADRO 1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ASCOSPORAS DE LEVADURAS

GENERO	FORMA DE LA ESPORA	CARACTERISTICAS DE LA SUPERFICIE DE LA ESPORA	NUMERO USUAL DE ESPORAS POR ASCA
COCCIDIASCUS	Fusiforme		8
DEBARYOMYCES	Esférica	Verrucosa	1-2
ENDOMYCES	Oval o Tipo sombrero	Lisa	4
ENDOMYCOPSIS	Oval, falciforme, esférica, tipo saturno o sombrero	Lisa, ocasionalmente rebordeada	4
HANSENIASPORA	Esférica o de tipo sombrero	Lisa, ocasionalmente con rebordo	1-4
HANSENULA	Esferoidal o hemisfórica, tipo sombrero o saturno	Lisa, ocasionalmente con reborde en la base	1-4
LIPOMYCES	Oval	Lisa	4-16
MONOSPORELLA	Acicular		1
NADSONIA	Esférica	Verrucosa	1-2
NEMATOSPORA	Fusiforme (dos husos por asca)	Flagelo en un extremo (inmóvil)	8
PICHIA	Hemiesférica, esférica, angular	Lisa, ocasionalmente con reborde	1-4
SACCHAROMYCES	Esférica u oval	Lisa	1-4
SACCHAROMYCOIDES	Esférica	Lisa	4
SCHIZOSACCHAROMYCES	Esférica, reniforme u oval	Lisa	4-8
SCHWANIOMYCES	Esférica o de tipo nuez	Verrucosa con reborde ecuatorial	1

será un zigoto diploide. Este zigoto diploide formado por conjugación de esporas puede experimentar división asexual y formar células vegetativas corrientes (Ver Fig.2).

Ahora puede suceder que cada una de las esporas experimente gemación o fisión, produciendo células vegetativas haploides. Estas células al unirse formarán un zigoto diploide con-propiedades para experimentar gemación y esporulación cuando-las condiciones lo requieran (Ver Fig.3).

Hay cierto número de métodos para inducir la esporulación que implican el uso de materiales no nutrientes, de hortali-- zas o de hortalizas y frutas y de otro tipo de sustratos. La-incapacidad del medio para inducir la esporulación en una especie desconocida no significa necesariamente, que la levadura sea asporógena. Hay que utilizar un cierto número de métodos diferentes antes de llegar a esta conclusión.

Algunos de los medios más utilizados para inducir la esporulación son los siguientes: el medio de reserva de Mrak,Phaf y Douglas, el de presporulación de Lindegren, el de jugo de - vegetales de Henrici según la modificación de Wickerham, el - de agar infusión de zanahorias de McKelvey, medio de Worodkowa, zanahorias o brotes de patatas, cuñas de pepino, jugo de-uvas o ciruelas, agar pasas, salchichas esterilizadas y finalmente bloques o tubos inclinados de yeso (PRESCOTT Y DUNN -- 1976).

II.5.- NUTRICION

Todas las células necesiten de alimentos para llevar a cabo la serie de fenómenos bioquímicos que tienen lugar en la - economía de la célula.

ESQUEMAS REPRESENTATIVOS DEL CICLO BIOLOGICO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

FIG.2.- CICLO VEGETATIVO DIPLOIDE

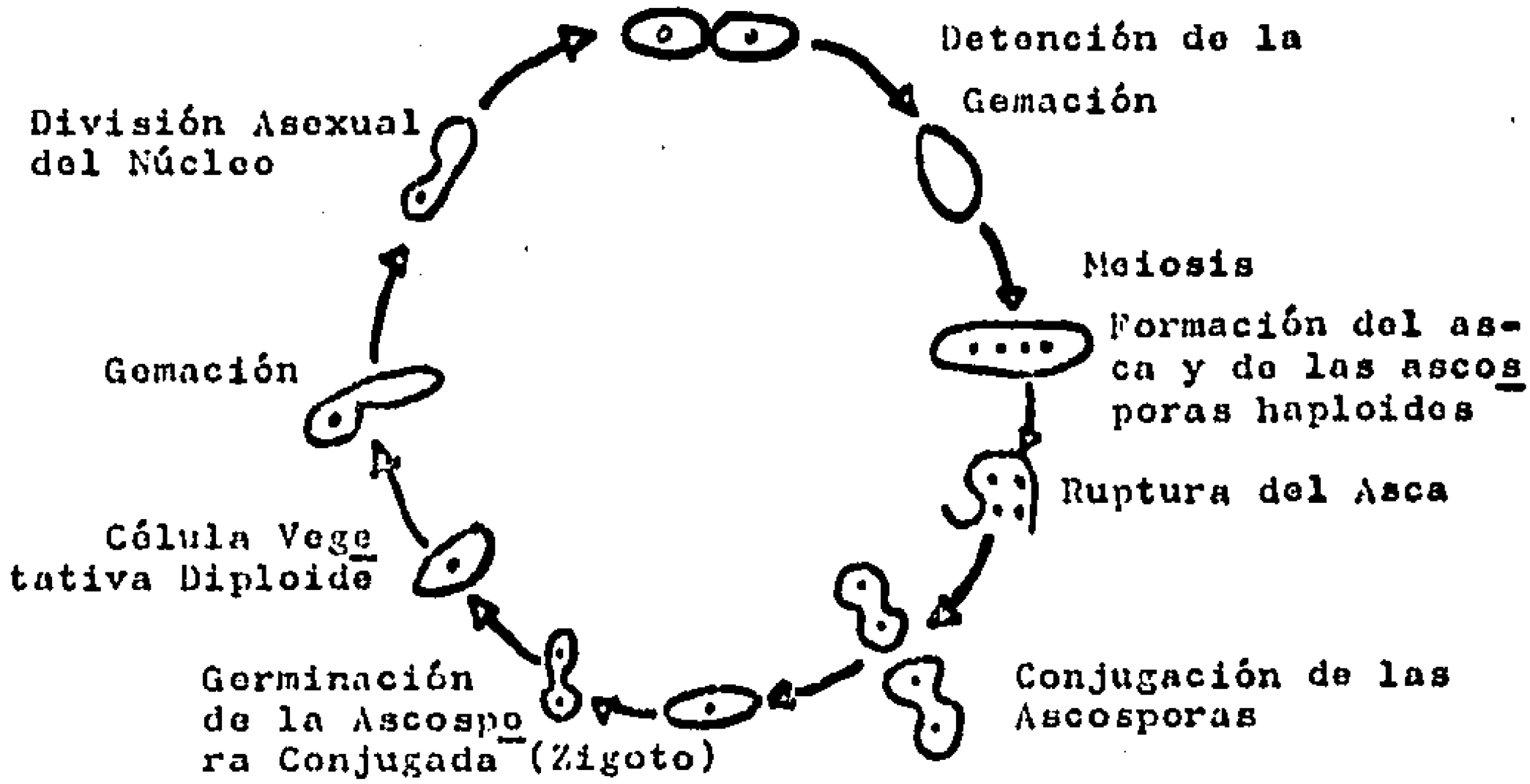
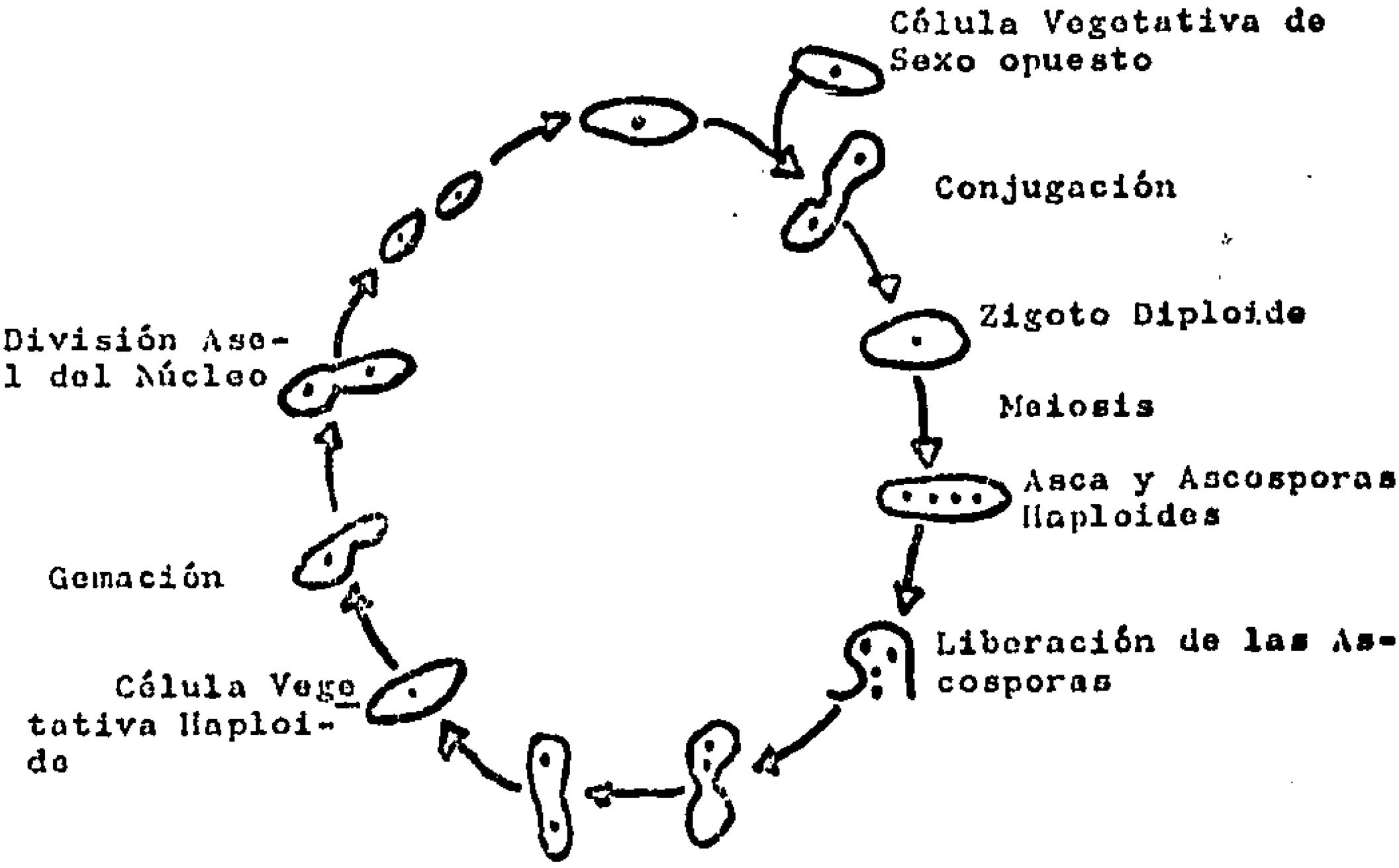


FIG.3.- CICLO VEGETATIVO HAPLOIDE



Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos -- que otras formas de vida: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, azufre, magnesio, hierro, -- zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos cinco metales mencionados se necesitan en cantidades ínfimas como componentes o activadores de enzimas (CARPENTER 1969).

Entre los compuestos del carbono, los azúcares juegan el papel más importante en la nutrición de las levaduras. Es -- digno de notarse que la facilidad de asimilación de un azúcar no siempre va acompañado de una capacidad para fermentar dicho azúcar (Ver Cuadros 2 y 3).

El catabolismo de la glucosa puede ser anaeróbico (fermentación) o aeróbico (respiración). El proceso más típico - es el catabolismo anaeróbico, también conocido como fermentación alcohólica. Los productos finales son el alcohol etílico y el bióxido de carbono.

Otras fuentes de carbono son algunos aldehidos, sales - de algunos ácidos orgánicos, glicerina y alcohol (PRESCOTT Y DUNN 1962).

En la producción de vinos puede ocurrir que alguna levadura una vez que cumplió su tarea formentativa, forme una especie de velo en la superficie del medio y las levaduras que lo producen tienen una cierta capacidad para oxidar el alcohol que han producido.

Las levaduras obtienen el nitrógeno que requiere su metabolismo para la síntesis de proteínas de fuentes orgánicas e inorgánicas, tales como peptonas, aminoácidos, urea, amoniaco y sales de amonio principalmente el sulfato, fosfato y -- cloruro.

CUADRO 2.- ASIMILACION Y FERMENTACION DE LOS GLUCIDOS POR LAS LEVADURAS DEL GENERO SACCHAROMYCES

ESPECIES	GLUCOSA		GALACTOSA		SACAROSA		MALTOSA		LACTOSA		RAFINOSA
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	F
PASTORI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MELLIS	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
BAILII	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIASPORUS	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
ACIDIFACIENS	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
STEINDACHII	+	+	+	+f	-	-	-	-	-	-	-
ROUXI	+	+	+	-	-	-	+	+f	-	-	-
ITALICUS	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
DONATI	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	1/3
CHEVALIERI	+	+	+	+f	+	+	-	-	-	-	1/3
ELEGANS	+	+	+f	-	+f	+	-	-	-	-	1/3f
VERONAE	+	+	+	-	+	+	+	±	-	-	1/3
FRUCTUUM	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1/3
MARXIANUS	+	+	+	+f	+	+	-	-	+f	-	1/3
EXIGUS	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1/3
FERMENTATI	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1/3
BAYANUS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1/3
MICROELLIPSOID	+	+	+	+f	+	+	-	-	-	-	3/3
OVIFORMIS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1/3
PASTEURIANUS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	2/3
STEINERI	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
HETEROGENEICUS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
WILLIANUS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1/3
FLORENTINUS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	3/3
CARLSBERGENSIS	+	+	+	+f	+	+	+	+	-	-	3/3
CEREVISIAE y var. ELLIP.	+	+	+f	+f	+	+	+	+	-	-	1/3
LOGOS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	3/3
UVARUM	+	+	+	+f	+	+	+	+f	-	-	3/3
LACTIS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1/3
FRAGILIS	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	1/3

A=ASIMILACION +=POSITIVO +f=DEBIL O LENTO
F=FERMENTACION -=NEGATIVO ±=MAYORIA DE LAS CEPAS POSITIVAS
∓=MAYORIA DE LAS CEPAS NEGATIVAS

CUADRO 3.- ASIMILACION Y FERMENTACION DE LOS GLUCIDOS Y ASIMILACION DE LOS NITRATOS POR LAS LEVADURAS DEL GENERO CANDIDA

ESPECIES	GLUCOSA		GALACTOSA		SACAROSA		MALTOSA		LACTOSA		RAFINOSA	NITRATO
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	F	A
KRUSEI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-
BRUMPTI	+	+f	+	-	-	-	+	-	-	-		-
MELINI	+	+f	-	-	+	+f	+	+f	-	-		-
SOLANI	+	+	+f	-	+	+f	+	-	-	-		-
PULCHERIMA	+	+	+f	+f	+	-	-	-	-	-		-
PARAPSILOPSIS	+	+	+	+f	+	∓	+	-	-	-		-
TENUIS	+	+	+	+	+	-	+	-	+f	-		-
UTILIS y UT.var MAJOR	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1/3	+
GUILLERMONDI y var. MEMBRA	+	+	+	∓	+	+	+	∓	-	-	1/3	-
MELIBIOSIS	+	+	+	∓	+	+	+	-	-	-	2/3	-
ALBICANS	+	+	+	+f	+	∓	+	+	-	-		-
TROPICALIS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ROBUSTA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1/3	-
PSEUDOTROPICALIS y var. LAC.	+	+	+	±	+	+	-	-	+	+	1/3	-
MYCODERMA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
LYPOLITICA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
RUGOSA	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
JAPONICA	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-		-
SCOTII	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-		+

A=ASIMILACION +=POSITIVO +f=DEBIL O LENTO
F=FERMENTACION -=NEGATIVO ±= MAYORIA DE LAS CEPAS POSITIVAS
∓= MAYORIA DE LAS CEPAS NEGATIVAS

La diferencia en la capacidad para utilizar nitritos y nitratos y para desaminar aminoácidos ayuda a diferenciar las cepas o las especies (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

Las levaduras necesitan además para su crecimiento, otro tipo de sustancias estimulantes, como las vitaminas. Entre las vitaminas las más importantes para la nutrición de la mayor parte de las levaduras son las siguientes: biotina, mio-inositol, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido p-aminobenzoico, ácido pteroilglutámico, piridoxal, piridoxamina, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina y riboflavina (PRESCOTT Y DUNN 1962).

II.6.- RESPIRACION

Las levaduras necesitan energía para poder reproducirse, regenerarse y conservarse y la obtienen mediante un proceso metabólico en el cual hay degradación de moléculas de azúcares y proteínas. Esta reacción de ruptura es exotérmica y por consecuencia produce una elevación de la temperatura del medio.

Una molécula de glucosa puede ser degradada hasta bióxido de carbono y agua con desprendimiento de hasta 673 Kcal/mol, con la colaboración directa del oxígeno, en un proceso de degradación oxidativo, o no llegar más que a alcohol y bióxido de carbono con desprendimiento de 56 Kcal/mol (AMERINE Y SINGLETON 1976). El primer proceso se llama respiración y el segundo corresponde a la fermentación.

La reacción siguiente esquematiza el proceso de respiración:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

II.7.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES ECOLOGICOS EN SUS FUNCIONES VITALES

Los principales factores que influyen en pro o en contra-- de las funciones normales de las levaduras son: el oxígeno,--- el Ph, concentración de bióxido de carbono, la temperatura y-- el agua.

OXIGENO. El oxígeno libre es esencial para las levaduras, pero en su presencia se estimulan los procesos vegetativos aumentando los rendimientos de levadura. Y por el contrario en ausencia de oxígeno libre, el proceso de reproducción y crecimiento de la levadura será más lento y estará condicionado por los nutrientes presentes en el medio, principalmente azúcares.

PH. Está perfectamente reconocido que la influencia de la concentración de iónes hidrógeno en los mostos de fermentación es fundamental para lograr un buen desarrollo de las- levaduras.

En general se sostiene que las levaduras se desarrollan -- mejor en medios de reacción ácida, preferentemente entre - PH 3.5 y 3.8 (PELCZAR,REID,CHAN 1977), se favorecen las -- reacciones enzimáticas además de impedir el crecimiento de microorganismos indeseables (MARECA 1973).

BIOXIDO DE CARBONO. Este gas es un producto del metabolismo de la respiración normal de la célula,un au-- mento en el medio disminuye la reproduc- - ción de las levaduras.

TEMPERATURA. Para cada especie de levadura puede fijarse temperatura mínima y máxima de multiplicación, es decir, que para cada levadura hay una temperatura por debajo de la cual no se multiplica, otra temperatura, la óptima es aquella a la que se multiplica con mayor rapidez y finalmente por encima de la temperatura máxima pierde la facultad de reproducirse - - (MARCILLA 1974).

Las levaduras crecen en un amplio margen de temperatura desde 0 a 47°C. La temperatura óptima suele situarse entre 20 y 30°C (CARPENTER 1969).

AGUA. En términos generales, las levaduras necesitan un poco -- más de agua que los mohos, pero menos que las bacterias.- La cantidad de agua mínima en la cual pueden cultivarse - las levaduras es difícil de estimar y depende generalmente de la presión osmótica y la solubilidad de las sustan- alimenticias.

Todos los factores ecológicos antes tratados cuando se ba-- lancean convenientemente dan por resultado un magnífico producto y alto rendimiento. Si falta algún factor, la levadura pre-- senta modificaciones morfológicas o funcionales que le alteran- las propiedades de asimilación, fermentación o su poder repro-- ductivo.

II.8.- ENZIMAS DE LAS LEVADURAS

Aunque Pasteur reconoció que la fermentación es catalizada - por enzimas, postuló en 1860 que estas se hallaban ligadas con- la estructura y la vida de las células de levadura (LEHNINGER - 1979).

Está perfectamente establecido que estas enzimas actúan - en el interior de las células (endoenzimas) o bien son excretadas al exterior de la célula (exoenzimas) que las elaboró.

Las enzimas tienen una acción marcadamente específica y - actúan solo con una sustancia o un grupo de sustancias que -- tengan una composición química similar. Por ejemplo, las especies de levadura que no contengan invertasa son incapaces de- fermentar la sacarosa y así SACCHAROMYCES rouxi puede fermentar la maltosa, pero no la sacarosa porque contiene maltasa y no invertasa (Ver Cuadro 2).

Un hidrato de carbono puede o no ser fermentado o asimilado según la clase de enzimas que elabore la levadura. Los polisacáridos en general no son fermentados. A la lactosa la -- fermenta el SACCHAROMYCES fragilis (Ver Cuadro 2) pero no SACCHAROMYCES cerevisiae, ni SACCHAROMYCES ellipsoideus, que representan los tipos de levaduras mejor conocidas, probable-- mente las más repartidas en la naturaleza.

Las enzimas de las levaduras pueden clasificarse en los-- grupos: Hidrolasas, Oxidorreductasas, Transferasas, Isomera-- sas y Liasas principalmente (CONN Y STUMPF 1967, LAGUNA 1967).

A continuación se da un resumen de las enzimas de las levaduras, principalmente las que intervienen en la degradación de azúcares y las que actúan en la fermentación alcohólica, - (su acción sobre el sustrato y productos formados) (Ver Cuadro 4).

I.- HIDROLASAS

1.- CARBOHIDRASAS

INVERTASA

MALTASA

LACTASA

MELIBIASA

TREHALASA

2.- ENZIMAS PROTEOLITICAS

PROTEASAS

PEPTIDASAS

II.- <u>TRANSFERASAS</u>

HEXOKINASA (1)*

FOSFOFRUCTOKINASA (3)*

FOSFOGLICEROKINASA (7)*

FOSFOGLICEROMUTASA (8)*

PIRUVATOKINASA (10)*

III.- <u>ISOMERASAS</u>

FOSFOHEXOISOMERASA (2)*

ISOMEROSA DE FOSFOTRIOSA (5)*

IV.- <u>LIASAS</u>

ALDOLASA (4)*

CARBOXILASA PIRUVICA (11)*

V.- <u>OXIDORREDUCTASAS</u>

DESHIDROGENASA DE FOSFOTRIOSA (GLICERALDEHI

DO-FOSFATO DESHIDROGENASA) (6)*

ENOLASA (9)*

ALCOHOL DESHIDROGENASA (12)*

*VER CUADRO 4

CUADRO 4.- REACCIONES Y ENZIMAS QUE INTERVIENEN

DURANTE LA FERMENTACION ALCOHOLICA (Tomado de Tablas Científicas)

No.	REACCIONES INTERMEDIAS	ENZIMA QUE CATALIZA LA Rx.
1	GLUCOSA + TRIFOSFATO DE ADENOSINA(ATP) ⟶ 6-FOSFATO DE GLUCOSA + DIFOSFATO DE ADENOSINA (ADP)	HEXOKINASA
2	6-FOSFATO DE GLUCOSA ⟶ 6-FOSFATO DE FRUCTOSA	FOSFOHEXOISOMERASA
3	6-FOSFATO DE FRUCTOSA + ATP ⟶ 1,6-DIFOSFATO DE FRUCTOSA + ADP	FOSFOFRUCTOKINASA
4	1,6-DIFOSFATO DE FRUCTOSA ⟶ 3-FOSFOGLICERALDEHIDO + FOSFATO DE DIHIDROXIACETONA	ALDOLASA (CIMOHEXASA)
5	FOSFATO DE DIHIDROXIACETONA ⟶ 3-FOSFOGLICERALDEHIDO	ISOMERASA DE FOSFOTRIOSA
6	2 [3-FOSFOGLICERALDEHIDO + DIFOSFOPIRIDIN NUCLEOTIDO(DPN) + FOSFATO] ⟶ ACIDO 1,3-DIFOSFOGLICERICO + $DPNH_2$	DESHIDROGENASA DE FOSFOTRIOSA
7	2 ACIDO 1,3-DIFOSFOGLICERICO + ADP ⟶ ACIDO 3-FOSFOGLICERICO + ATP	FOSFOGLICEROKINASA
8	2 ACIDO 3-FOSFOGLICERICO ⟶ ACIDO 2-FOSFOGLICERICO	FOSFOGLICERONUTASA
9	2 ACIDO 2-FOSFOGLICERICO ⟶ ACIDO FOSFOPIRUVICO + H_2O	ENOLASA
10	2 ACIDO FOSFOPIRUVICO + ADP ⟶ ACIDO PIRUVICO + ATP	PIRUVATOKINASA
11	2 ACIDO PIRUVICO ⟶ ACETALDEHIDO + CO_2	CARBOXILASA PIRUVICA
12	2 ACETALDEHIDO + $DPNH_2$ ⟶ ETANOL + DPN	ALCOHOL DESHIDROGENASA

BALANCE:

$$\text{GLUCOSA} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{FOSFATO} \longrightarrow 2\ \text{ETANOL} + 2\ CO_2 + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan además - uno o más componentes proteicos llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico o bien una molécula orgánica llamada coenzima.

Además el PH influye en la actividad de las enzimas y esto se debe principalmente a cambios en el estado de ionización de la proteína enzimática y de los otros componentes de la mezcla de reacción(PLUMMER 1981).

Las enzimas actúan de mejor manera a una temperatura óptima, y por lo tanto valores de temperatura por debajo y por encima del punto óptimo trae como consecuencia la inactivación - de laenzima.

Las levaduras se consideran como microorganismos capaces-- de producir alcohol, proteínas, grasas, bióxido de carbono,etc. partiendo de hidratos de carbono y de compuestos minerales nitrogenados.

II.9.- CLASIFICACION

Como se ha mencionado antes las levaduras son hongos cuya- forma común y corriente de crecimiento es unicelular. La clasificación de los hongos presenta innumerables dificultades y cabe aclarar que no todo en Micología está establecido y que las diferencias de opinión entre los micólogos sobre la clasificación son tan numerosas que a menudo se encuentran serias discrepancias en la literatura especializada.

Las categorías que utilizan en la clasificación de los hongos son las siguientes : REINO, DIVISION, CLASE, ORDEN,FAMILIA, GENERO y ESPECIE (ALEXOPOULOS 1977).

El REINO es la mayor de las categorías e incluye muchas divisiones, cada división puede a su vez incluir muchas clases,- y así succsivamente hasta llegar a especie que es la unidad de clasificación. Trataremos aquí aspectos generales sobre las categorías que conduzcan a las levaduras.

Para los sistemáticos modernos el Reino Vegetal comprende muchas divisiones, y los hongos constituyen la división Mycota o Fungi (Ver Cuadro 5).

DIVISION MYCOTA. El soma varía desde una sola célula microscópica hasta un micelio muy profuso. La reproducción es sexual y asexual. Las unidades de propagación son las esporas. - Reconocemos dos subdivisiones: los MIXOMYCOTINA y los EUMYCOTINA, los hongos verdaderos (ALEXOPOULOS 1977).

SUBDIVISION EUMYCOTINA. Organismos de paredes celulares y tiene estructura típicamente filamentosa aunque se presentan - algunos tipos celulares.

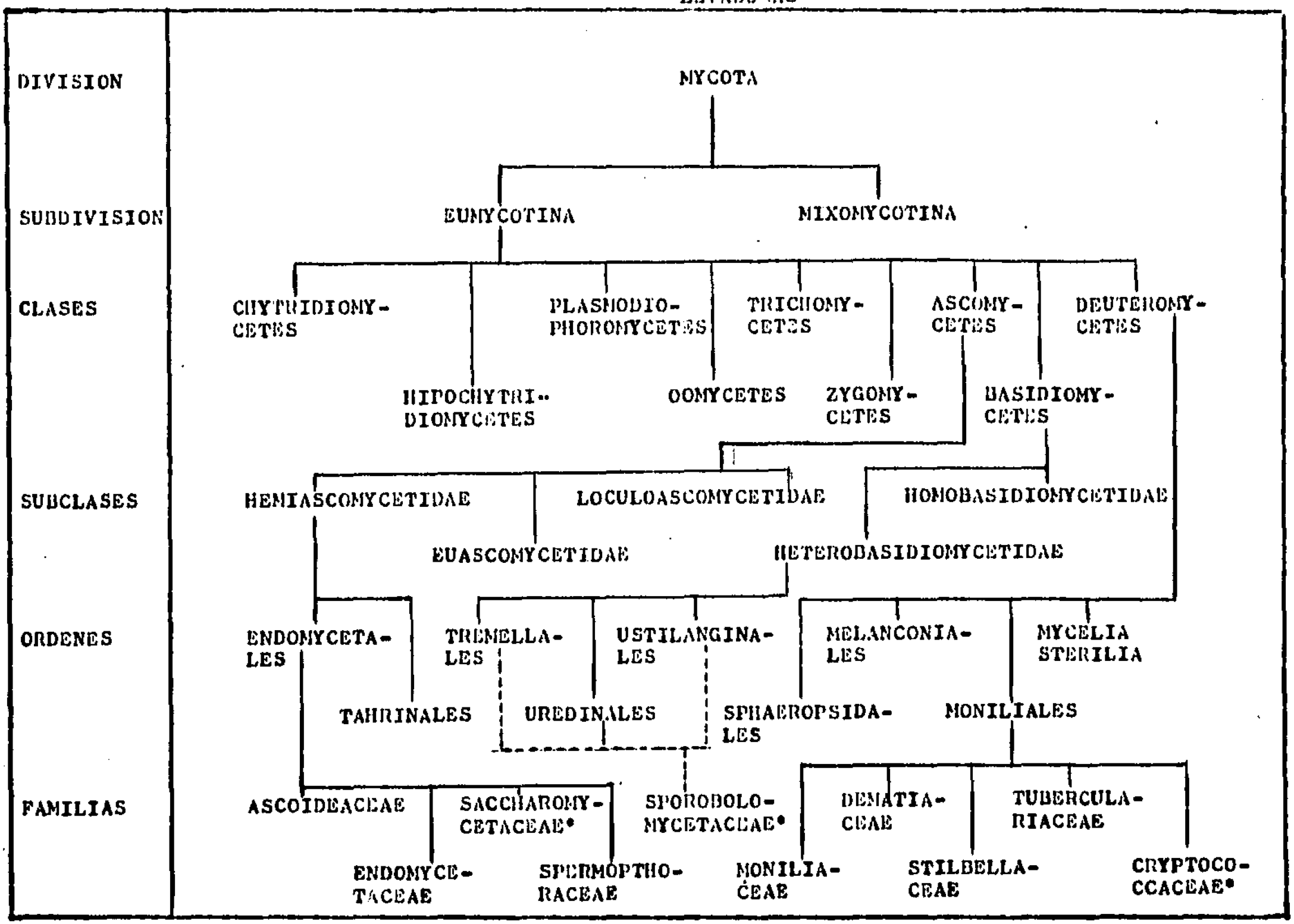
Los EUMYCOTINA se subdividen en nueve clases (Ver Cuadro-5) como sigue: CHYTRIDIOMYCETES, HYPOCHYTRIDIOMYCETES, PLASMODIOPHOROMYCETES, OOMYCETES, TRICHOMYCETES, ZYGOMYCETES, ASCOMYCETES, BASIDIOMYCETES y DEUTEROMYCETES.

Las levaduras caen dentro de tres de estas clases y son:- ASCOMYCETES, BASIDIOMYCETES y DEUTEROMYCETES o FuNGI IMPERFECTI.

CLASE ASCOMYCETES

Los hongos de esta clase se caracterizan por poseer micelio bien desarrollado (excepto las levaduras), de la fusión se

CUADRO 5.- UBICACION TAXONOMICA DE LAS TRES GRANDES FAMILIAS DE LEVADURAS*



xual resulta la formación de un saco o ascosporas. Las esporas asexuales (conidios) nacen externamente en las puntas de las - hifas, por ejemplo TRICHOPHYTON, MICROSPORUM y BLASTOMYCES (JAWETZ 1975).

Hay tres subclases de ASCOMYCETES (Ver Cuadro 5) divididos en base al método que utilizan para formar ascas y las estructuras de las ascas. La subclase HEMIASCOMYCETIDAE, a veces también llamados PROTOASCOMYCETIDAE, es considerada por la mayoría de los micologos como las más primitiva, en esta subclase- se incluyen las LEVADURAS.

SUBCLASE HEMIASCOMYCETIDAE.- Son de estructura simple y se manifiesta por el micelio a menudo escaso o totalmente ausente,- por la formación directa de ascas sin la intervención de un -- sistema de hifas ascógenas, y por la completa ausencia de asco carpos. Se incluyen las levaduras y los organismos levaduriformes, además de algunos saprobios micelianos que crecen sobre - exudados vegetales.

Se reconocen solamente dos ordenes (Ver Cuadro 5): ENDOMYCETALES y TAPHRINALES, clasificándose las levaduras dentro de- los ENDOMYCETALES.

ORDEN ENDOMYCETALES.- Organismos en los cuales el zigoto, formado por la copulación de dos células, se transforma directa-- mente en asca. En otras formas el zigoto diploide origina por- gemación una gran cantidad de células diploides, las que a su- vez se desarrollan en ascas (ALEXOPOULOS 1977).

Los ENDOMYCETALES son de interés económico pues aquí se -

incluyen las LEVADURAS que son importantes en la industria.

Este orden se subdivide en 4 familias: ASCOIDEACEAE, ENDOMYCETACEAE, SACCHAROMYCETACEAE y SPERMOPTHORACEAE (Ver Cuadro-5)(ALEXOPOULOS 1977).

FAMILIA SACCHAROMYCETACEAE.- Hay formación de micelio, pseudomicelio (Ver Fig. 4-A), artrosporas y células gemantes colaterales o aisladas.

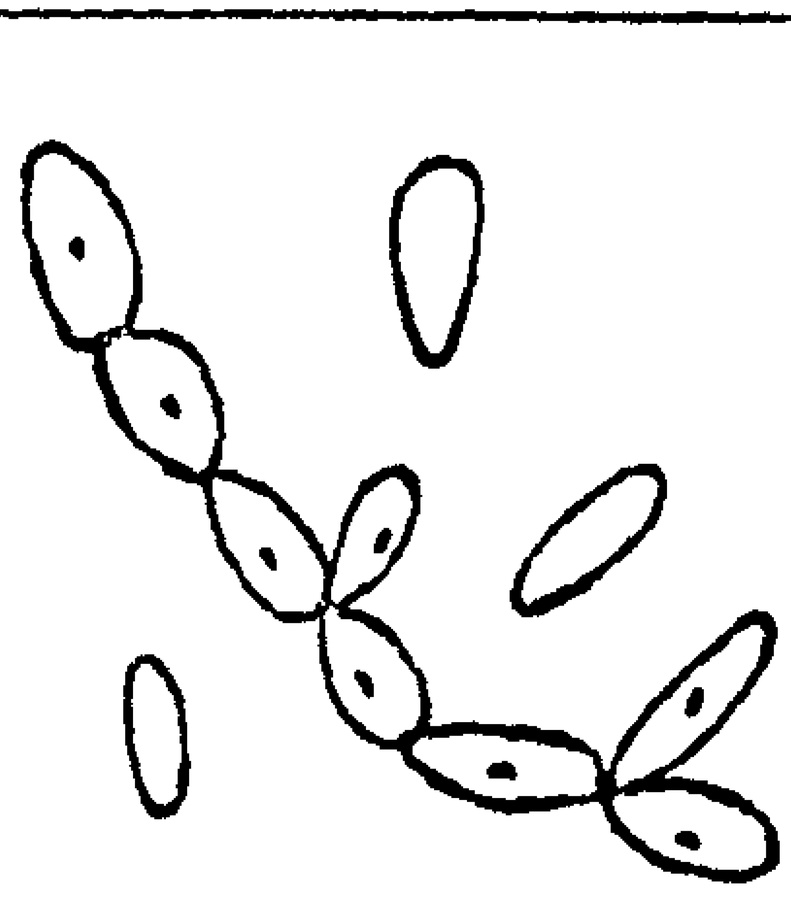
Su reproducción vegetativa es por escisión o gemación - - (Ver Fig. 4-B). Las ascas pueden formarse tras conjugación isógama o heterogama, con frecuencia hay una fase de reproducción vegetativa entre la diploidización y la formación de ascas. Ascosporas de variadas formas (Figura 4-C). Se presenta con frecuencia, junto a un metabolismo oxidante otro fermentativo - - (PRESCOTT Y DUNN 1962).

La familia SACCHAROMYCETACEAE se subdivide en 5 subfamilias (Ver Cuadro 6) y son:

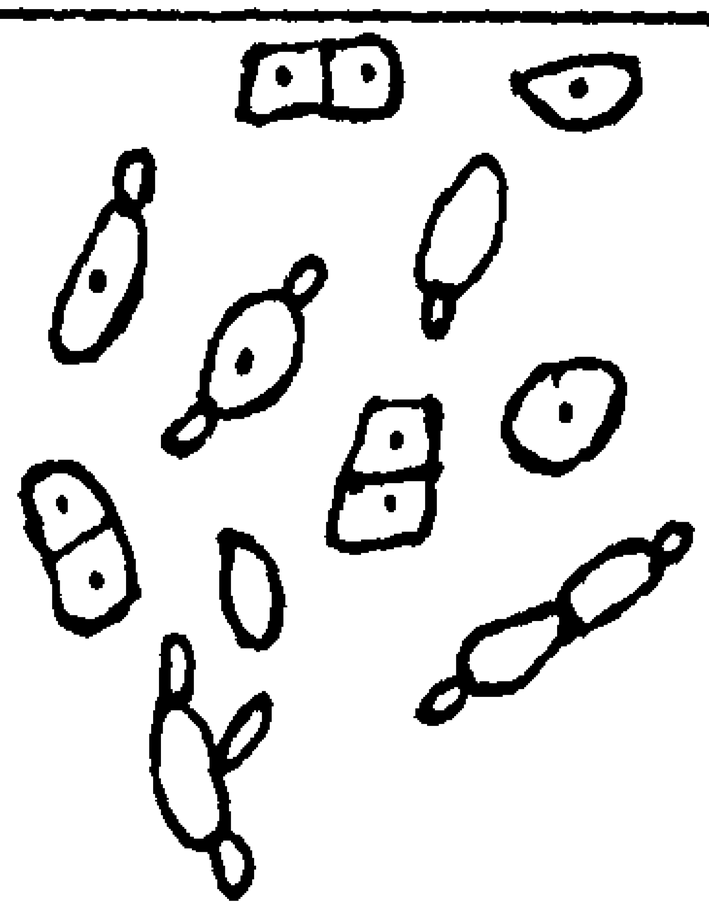
A) SUBFAMILIA EREMASCOIDEAE. Presentan micelio solo, reproducción vegetativa por escisión, formación de ascas tras una precedente conjugación, hasta ocho esporas por asca, metabolismo oxidante. Se encuentra solo un género, no fermentativo (PRESCOTT Y DUNN 1962) y es :

GENERO 1 EREMASCUS. No es una levadura verdadera, pero es posible que la mayoría de las levaduras hayan evolucionado de ésta. La forma celular es micelial solamente. Reproducción vegetativa por fisión y catabolismo oxidativo (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

FIG. 4.- ESTRUCTURAS REPRESENTATIVAS DE LA FAMILIA SACCHAROMYCETACEAE



A.- PSEUDOMICELIO



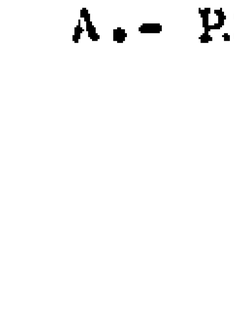
B.-REPRODUCCION VEGETATIVA POR GEMACION Y ESCISION

YELMO

AGUJA

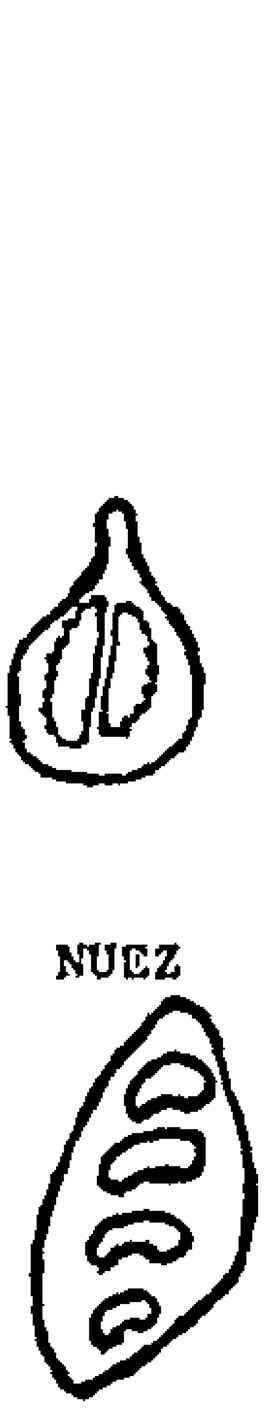
NUEZ

SATURNO



ESFERICA

OVAL



RIÑON

SOMBRERO

C.- DIFERENTES TIPOS DE ASCOSPORAS

B) SUBFAMILIA ENDOMYCETOIDEAE. Muestra micelio y artrosporas, o uno de ambos, reproducción vegetativa por escisión, formación de ascas generalmente tras una conjugación precedente, esporas redondas, ovales o en forma de sombrero, metabolismo oxidante o fermentativo (PRESCOTT Y DUNN 1962). Existen dos géneros:

GENERO 1 ENDOMYCES. Presenta micelio y artrosporas cilíndricas u ovales, reproducción vegetativa por escisión. Hifas ramificadas con gametangios que forman ascas después de la conjugación. Esporas con aspecto de sombrero u ovales (PELCZAR,REID, CHAN 1977).

GENERO 2 SCHIZOSACCHAROMYCES. Se presentan en forma de células cilíndricas, rectangulares, ovales o redondas, forman micelio verdadero y artrosporas, se reproducen vegetativamente por esciparidad, gametangios ausentes. Las ascas contienen de cuatro a ocho esporas ovales o redondeadas, catabolismo oxidativo y fermentativo. Es un excelente microorganismo alcohológeno. No asimilan nitratos (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

C) SUBFAMILIA SACCHAROMYCETOIDEAE. Presenta micelio, pseudomicelio y células gemantes. Reproducción vegetativa por escisión y gemación o solo esta última, esporas de varias formas, 1 a 4 por asca, metabolismo oxidativo estrictamente hasta predominantemente fermentativo.

Existen tres tribus (Ver Cuadro 6) que son: SACCHAROMYCETEAE, NADSONIEAE y ENDOMYCOPSEAE (PRESCOTT Y DUNN 1962).

TRIBU ENDOMYCOPSEAE. Micelio y células gemantes. Reproducción por escisión y gemación multilateral, metabolismo oxidante y-

débilmente fermentativo.

GENERO 1 ENDOMYCOPSIS. Muestra un micelio verdadero, blastospo ras, pseudomicelio y células gemantes. Se reproducen por fisión y gemación. Forma ascas con más de 4 esporas (Ver Cuadro 1 y- Fig. 4-C). Es principalmente oxidativo, aunque débilmente fermentativo. Los cultivos viejos en medio líquido se transforman en una masa espesa (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

TRIBU SACCHAROMYCETEAE. Sin micelio, con pseudomicelio y células gemantes sueltas (o uno de ambos). Reproducción vegetativa por gemación multilateral, metabolismo oxidante a predominantemente fermentativo (PRESCOTT Y DUNN 1962).

GENERO 2 SACCHAROMYCES. Células redondas, ovales o alargadas.- Presentan pseudomicelio, reproducción vegetativa por gemación- unilateral. La conjugación puede preceder o no a la formación- de ascas. Formación de 1-4 ascosporas (Ver Cuadro 1 y Fig. 4-c). Las esporas pueden conjugarse. El catabolismo cambia perfectamente de oxidativo a dominantemente fermentativo.

Los nitratos no son asimilados. Este género abarca a las- LEVADURAS clásicas, agentes causales de la fermentación alcohólica.

Actúan sobre los cultivos líquidos formando un depósito y en algunas ocasiones constituyen un velo tardío o simplemente- islotes aislados.

La especie típica es el SACCHAROMYCES cerevisiae, la levadura de la cerveza, de las fábricas de aguardientes o de la panificación. En general se caracterizan por una eficiente con--

CUADRO 6.- CLASIFICACION DE LA FAMILIA SACCHAROMYCETACEAE

SUBFAMILIA — EREMASCOIDEAE
- **GENERO**
  1) EREMASCUS

SUBFAMILIA — ENDOMYCETOIDEAE
- **GENEROS**
  1) ENDOMYCES
  2) SCHIZOSACCHAROMYCES

SUBFAMILIA — SACCHAROMYCETOIDEAE

SUBFAMILIA — NEMATOSPOROIDEAE
- **GENEROS**
  1) MONOSPORELLA
  2) NEMATOSPORA
  3) COCCIDIASCUS

SUBFAMILIA — LIPOMYCETOIDEAE
- **GENERO**
  1) LIPOMYCES

TRIBU — ENDOMYCOPSEAE
- **GENERO**
  1) ENDOMYCOPSIS

TRIBU — SACCHAROMYCETEAE
- **GENEROS**
  2) SACCHAROMYCES
  3) PICHIA
  4) HANSENULA
  5) SCHWANIOMYCES
  6) DEBARYOMYCES

TRIBU — NADSONIEAE
- **GENEROS**
  7) SACCHAROMYCOIDES
  8) HANSENIASPORA
  9) NADSONIA

versión de azúcares en alcohol, además de rápida sedimentación después de la fermentación. Da lugar a grandes industrias y -- cuando se habla de levaduras generalmente se entiende esta es- pecie (PRESCOTT Y DUNN 1962, PELCZAR,REID,CHAN 1977, GIRARD Y- ROUGIEUX 1964).

SACCHAROMYCES cerevisiae var. ellipsoideus.- Esta es la - verdadera levadura del vino. Se encuentra junto a otras razas- en las uvas maduras. No se diferencia de la forma precedente - más que en su morfología. Se distingue por su poder fermentati vo (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

J.P van der Walt, en la obra de Lodder (1970) ha hecho -- una reagrupación de SACCHAROMYCES ellipsoideus, SACCHAROMYCES- tetrasporus y SACCHAROMYCES willianus en SACCHAROMYCES cerevi- siae. Sin embargo comúnmente se sigue empleando la nomenclatu- ra SACCHAROMYCES ellipsoideus para las levaduras aisladas del- vino, en vez de llamarle SACCHAROMYCES cerevisiae var. ellip-- soideus (RIBEREAU GAYON et al 1975).

SACCHAROMYCES oviformis.- Constituye una levadura con -- elevado poder alcohológeno. Ha sido aislado del vino de jerez. Es capaz de oxidar alcohol originado, forma velos tardios a ma nera de islotes sobre los vinos que ha producido.

SACCHAROMYCES pasterianus.- De poca intensidad alcohológena, - constituye más bien una contaminación que es necesario evitar.

SACCHAROMYCES lactis y SACCHAROMYCES fragilis.- Se han encontrado en productos lácteos ya que son capaces de provocar - la fermentación de la lactosa(GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

GENERO 3 PICHIA.- Muestra pseudomicelio o células con gemación multilateral. Hay de 1-4 esporas por asca (Ver Cuadro 1 y Fig. 4-C). Estas levaduras de tipo no fermentario, forman un velo - con frecuencia muy espeso, inmediato a la superficie de los medios de cultivo líquidos. No asimilan los nitratos y oxidan -- los glúcidos, dando como productos finales el agua y el bióxido de carbono (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

GENERO 4 HANSENULA.- Células ovales o alargadas habitualmente- con pseudomicelio. Reproducción vegetativa por gemación multilateral. Conjugación isogámica o heterogámica que puede o no - preceder a la formación de ascas de 1 a 4 esporas (Ver Cuadro 1 y Fig. 4-C).Metabolismo oxidante y frecuentemente muy fermentativo. En medio líquido hay formación de película opaca y de- aspecto seco. Asimilan los nitratos (PRESCOTT Y DUNN 1962, --- PELCZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 5 SCHWANNIOMYCES.- Células en forma de huevo, no forman pseudomicelio. Su reproducción vegetativa es por gemación multilateral. A las ascas les aparecen protuberancias simulando - tubos de conjugación, la cual no ocurre. 1 o 2 esporas por asca (Ver Cuadro 1 y Fig. 4-C). Catabolismo principalmente fer-- mentativo. En cultivos líquidos forman sedimentos y anillo. No

asimilan los nitratos (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 6 DEBARYOMYCES.- Células redondas u ovales. Rara vez - forman pseudomicelio. Su reproducción vegetativa es por gemación multilateral. Usualmente conjugación heterogama que precede inmediatamente a la formación de ascas. Forma 1 o 2 esporas raramente 4 (Ver Cuadro 1). Metabolismo oxidativo, ocasionalmente formentativo débil. Pueden o no formar una película opaca y seca. Los nitratos no son asimilados (PRESCOTT Y DUNN 1962).

TRIBU NADSONIEAE. Sin micelio, ocasionalmente pseudomicelio,- reproducción vegetativa por gemación bipolar. Metabolismo oxidativo y fermentativo.

GENERO 7 SACCHAROMYCOIDES.-Células en forma de limón o salchicha. Pseudomicelio ocasional. Gemación bipolar, y por cada asca se forman 4 esporas (Ver Cuadro 1). Metabolismo oxidativo y fermentativo. En medios líquidos se forma sedimento y anillo. No se asimilan nitratos (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 8 HANSENIASPORA.-Células en forma de limón, elípticas u ovales. Sin pseudomicelio. 1 o raramente 2 esporas por asca (Ver Cuadro 1). Metabolismo oxidante y fermentativo. No asimilan nitratos (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 9 NADSONIA.-Células en forma de limón. No hay protuberancias. No hay pseudomicelio. Metabolismo oxidante y fermentativo. En medios líquidos formación de película. No asimilan ni

tratos (PELCZAR,REID,CHAN 1977, PRESCOTT Y DUNN 1962).

D) SUBFAMILIA NEMATOSPOROIDEAE. Presentan micelio o células gemantes o ambas. Reproducción vegetativa por gemación y esci-- sión. Esporas fusiformes o aciculares, con o sin flagelo. Metabolismo oxidativo y fermentativo (PRESCOTT Y DUNN 1962).

GENERO 1 MONOSPORELLA.- Sin micelio, células ovales, sin conjugación, 1 por asca (Ver Cuadro 1).

GENERO 2 NEMATOSPORA.- Micelio y pseudomicelio, gemación multilateral o fisión. Contiene 8 esporas por asca (Ver Cuadro 1).- Catabolismo oxidativo y fermentativo. No asimilan los nitratos.

GENERO 3 COCCIDIASCUS.- Células redondas u oblongas, sin micelio. Ascas con 8 esporas (Ver Cuadro 1). Metabolismo oxidativo y fermentativo.

E) SUBFAMILIA LYPOMYCETOIDEAE. Células gemantes solamente, ascas en forma de saco. Esporas ovales, ligeramente rojizas hasta 16 por asca. Metabolismo estrictamente oxidante (PRESCOTT Y DUNN 1962).

GENERO 1 LIPOMYCES.- No forman pseudomicelio, gemación multi-- lateral, de 4-14 ascosporas color ámbar (Ver Cuadro 1). Cultivo de apariencia lamosa. Producen grasa en abundancia (PELCZAR, REID,CHAN 1977).

CLASE BASIDIOMYCETES

Como consecuencia de la fusión sexual se forma un órgano-claviforme llamado Basidio. La superficie de este lleva 4 productos meióticos (BASIDIOSPORAS). Las esporas asexuales nacen-externamente en las puntas de las hifas (JAWETZ 1975). La clase BASIDIOMYCETES se subdivide en dos subclases: HETEROBASIDIOMYCETIDAE y HOMOBASIDIOMYCETIDAE (Ver Cuadro 5).

SUBCLASE HETEROBASIDIOMYCETIDAE. Basidio septado, o puede hallarse formando una espora perdurante de pared gruesa llamada teleutospora, la que da lugar a un corto tubo sobre el cual van las basidiosporas.

Los micólogos coinciden en no estar de acuerdo en cuanto-a la división de esta clase en ordenes y familias. Sin embargo Alexopoulos (1977) adopta los siguientes ordenes: TREMELLALES, UREDINALES y USTILANGINALES (Ver Cuadro 5). Cabe aquí señalar-la existencia de la familia SPOROBOLOMYCETACEAE cuya afinidad-es incierta, y que no ha sido posible hasta la fecha incluirse en ninguno de los ordenes existentes por lo cual no se mencionarán las caracteristicas de ninguno de los ordenes señalados-con anterioridad.

FAMILIA SPOROBOLOMYCETACEAE.-

Los SPOROBOLOMYCETACEAE constituyen una pequeña familia de hongos simplificados, levuriformes, que producen conidios so-bre esterigmas y los descargan violentamente como balistospo-ras. La familia incluye 5 géneros (Ver Cuadro 7): SPOROBOLOMY-

CUADRO 7.- CLASIFICACION DE LA FAMILIA SPOROBOLOMYCE-TACEAE

FAMILIA SPOROBOLOMYCETACEAE

GENEROS

1) SPOROBOLOMYCES
2) BULLERA
3) TILLETIOPSIS
4) ITERSONILIA
5) SPORIDIOBOLOS

MYCES, BULLERA, SPORIDIOBOLUS, ITERSONILIA y TILLETIOPSIS. Los dos primeros permanecen levuriformes durante todo el ciclo de- vida. Los otros tres producen micelio, por lo menos en ciertas condiciones (ALEXOPOULOS 1977). Son de metabolismo oxidativo y forman sobre los medios sólidos colonias color rojo-salmón li- geramente vellosas. Y se les distingue fácilmente gracias al - fenómeno conocido con el nombre de espejo cuando es causado -- por el lanzamiento de las balistosporas que se adhieren por de- bajo de la tapa que cubre al medio y que da una especie de re- flejo de la colonia.

GENERO 1 SPOROBOLOMYCES. Células ovales, alargadas, micelio y/o pseudomicelio, pigmentos color rojo o salmón. Reproducción --- principalmente por gemación. Las esporas sexuales arriñonadas- o como media luna sobre esterigmas aéreos. En medio líquido -- predomina el desarrollo superficial.

GENERO 2 BULLERA. Células redondas u ovales. Reproducción vege- tativa por gemación, esporas redondas u ovales en esterigmas - aéreos. Desarrollo en la superficie de medios líquidos princi- palmente.

CLASE DEUTEROMYCETES

Este no es un grupo filogenético verdadero sino más bien- un grupo taxonómico convencional. Se incluyen aquí las formas- en donde no ha sido demostrada la reproducción sexual (JAWETZ- 1975). Hasta donde se sabe no forman zigotos, ascosporas ni ba-

sidiosporas.

Los caracteres utilizados en la clasificación de los DEUTEROMYCETES son el tipo de fructificación, forma, color y tabicamiento de los conidios. Los ordenes siguientes pertenecen a los DEUTEROMYCETES (Ver Cuadro 5): SPHAEROPSIDALES, MELANCONIALES, MONILIALES y MYCELIA STERILIA (ALEXOPOULOS 1977).

Aquí nos encargaremos de mencionar el orden MONILIALES.

MONILIALES.- Constituyen el orden-forma más grande de los DEUTEROMYCETES comprendiendo más de 10 000 especies (ALEXOPOULOS-1977).

Se reproducen por conidios que no están en acérvulos, por oidios o gemación. Se incluyen numerosas familias, pero varia-dependiendo del sistema seguido por cada autor (ALEXOPOULOS -- 1977). Acepta cuatro familias de hongos miceliamos (MONILIACEAE, DEMATIACEAE, STILBELLACEAE y TUBERCULARIACEAE) y una familia - de falsas levaduras, los CRYPTOCOCCACEAE (Ver Cuadro 5).

Cabe mencionar que otros especialistas en la materia Lo-- dder-Sloof y Kreger-Van Rij, incluyen los SPOROBOLOMYCETACEAE-entre las falsas levaduras.

FAMILIA CRIPTOCOCCACEAE. Levaduras falsas y hongos levuriformes que forman micelio. Reproducción por gemación y/o escisión. Células hialinas nunca negras o pardas. Metabolismo estrictamente oxidante, o asociado al fermentativo. Puede haber pigmentos carotenoides. Algunas especies se usan como alimento, otras como Cryptococcus neoformans y Candida albicans, son patógenos humanos (PRESCOTT Y DUNN 1962) (Ver Cuadro 8). Encontramos tres-subfamilias y son:

CUADRO 8.- CLASIFICACION DE LA FAMILIA CRYPTOCOCCACEAE

FAMILIA CRYPTOCOCCACEAE

SUBFAMILIA	SUBFAMILIA	SUBFAMILIA
CRYPTOCOCCOIDEAE	TRICHOSPOROI-DEAE	RHODOTORULOIDEAE
GENEROS	**GENERO**	**GENERO**
1) CRYPTOCOCCUS	8) TRICHOSPORUM	9) RHODOTORULA
2) TORULOPSIS		
3) PHYTOSPORUM		
4) BRETTANOMYCES		
5) CANDIDA		
6) KLOECKERA		
7) TRIGONOPSIS		

A) SUBFAMILIA CRYPTOCOCCOIDEAE. Células gemantes, micelio sin- artrosporas y/o pseudomicelio.

GENERO 1 CRYPTOCOCCUS.- Células redondas, ovales, elípticas o- polimorfas. Gemación multilateral, formación de blastosporas.- Catabolismo oxidativo,la mayor parte son ureasa positivos (BU- RROWS 1974). En medios sólidos, las colonias frecuentemente -- son mucoides. En medios líquidos se forma sedimento, anillo y- algunas veces película. Por lo general asimilan inositol (PELC ZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 2 TORULOPSIS. Células redondas, ovales o alargadas, a - veces encapsuladas. Reproducción vegetativa por gemación multi lateral. Catabolismo oxidativo aunque frecuentemente fermenta- tivo. En cultivos líquidos forman sedimento, anillo y película. No asimilan inositol (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 3 PHYTOSPORUM. Células ovales o en forma de botella. No forman micelio ni pseudomicelio. Catabolismo oxidativo (PELC-- ZAR,REID,CHAN 1977).

GENERO 4 BRETTANOMYCES. Levaduras ovales, redondas, alargadas- o frecuentemente en forma de ojiva. Metabolismo oxidativo y -- fermentativo. Reproducción por gemación. Se caracterisa por -- una fuerte producción de ácido succínico (GIRARD Y ROUGIEUX -- 1964).

GENERO 5 CANDIDA. Reproducción por blastosporas, puede formar-

micelio verdadero o pseudomicelio. Ureasa negativa y no utilizan inositol (MOORE Y JACIOW 1979). Puede presentar blastosporas y gemación multilateral. Catabolismo oxidativo, aunque en muchas especies es fuertemente fermentativo. En medios líquidos hay formación de película (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

Se conocen varias especies de digno interés:

- CANDIDA utilis.- Se utiliza como levadura alimenticia.
- CANDIDA lypolítica.- Hidroliza las grasas. Causa alteraciones en la fabricación de la margarina.
- CANDIDA pseudotropicalis.- Se encuentra sobre productos lácteos.
- CANDIDA mycoderma.- Levadura capaz de oxidar el alcohol. Forma velos plegadizos. Es lo que forma la llamada "flor del vino". Actualmente se le llama CANDIDA vini (RIBEREAU GAYON et al - - 1975).
- CANDIDA albicans.- Agente causal de enfermedad en el humano- (candidiasis). Forma clamidosporas.

GENERO 6 KLOECKERA.- Células apiculadas. Gemación polar o bipolar. Ocasionalmente pseudomicelio. Catabolismo oxidativo y fermentativo.

La especie KLOECKERA apiculata (levadura apiculada de los vinos) es fermentativa pero no soporta más de 4°alcohólicos.

Juega un papel importante en la formación de los esteres- aromáticos de los vinos (GIRARD Y ROUGIEUX 1964). No asimilan- los nitratos.

GENERO 7 TRIGONOPSIS. Células ovales o triangulares. Gemación-multilateral o triangular. Catabolismo oxidativo. No asimilan-nitratos. Formación de islotes de película (PELCZAR,REID,CHAN-1977).

B) SUBFAMILIA TRICHOSPOROIDEAE. Células gemantes, pseudomice-lio, micelio y artrosporas. Ocasionalmente fermentativa. No -- forman pigmentos carotenoides (PRESCOTT Y DUNN 1962).

GENERO 1 TRICHOSPORUM.- Presenta micelio, pseudomicelio, artrosporas, blastosporas o células levaduriformes. Unas veces clamidosporas. Metabolismo principalmente oxidativo (PELCZAR,REID,-CHAN 1977).

C) SUBFAMILIA RHODOTORULOIDEAE. Células gemantes, ocasionalmente pseudomicelio, no hay artrosporas. No hay fermentación. Color amarillo a rojo (pigmentos carotenoides) (PRESCOTT Y DUNN-1962).

GENERO 1 RHODOTORULA. Células redondas, alargadas, pseudomicelio. Gemación multilateral. Los cultivos son amarillos a rojos (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

C A P I T U L O III

MATERIAL Y METODOS

El reconocimiento e identificación de levaduras es una tarea ardua y lenta, que requiere la participación de varias personas especializadas en la materia. Las pruebas para identificación en realidad están basadas en técnicas de siembra y cultivo, similares a las aplicadas en Bacteriología.

Para el estudio de las levaduras es necesario del estudio de medios de cultivo líquidos y sólidos, además pruebas de asimilación de compuestos ya sean nitrogenados o carbohidratos.-- Pruebas usuales para formación de esporas sexuales, formación o no de un micelio verdadero y otros.

III.1. AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS

Para llevar a cabo el estudio completo de las levaduras-- se necesita cultivarlas o hacerlas crecer en medios de cultivo apropiados. Como los medios de cultivo se presentan en estado líquido, sólido y semisólido, y pueden estar contenidos en tubos o cajas, las técnicas de siembra también son diversas según sea el estado y el envase del medio.

Todos los hongos levuriformes son capaces de asimilar la- glucosa por vía oxidativa. Por lo tanto es necesario el empleo de medios glucosados para el aislamiento de levaduras.

El aislamiento de las levaduras se practica sobre placas- petri, en medios sólidos; se puede hacer cuantitativo si se re

siembra en cada placa cantidades conocidas o dilusiones de titu lo conocido correspondiente al sustrato que se va a examinar.

Cuando las levaduras se desarrollan en medios de cultivo - adecuados, las colonias de levaduras varían de aspecto, textura y margon. Así algunas son lisas, otras rugosas, algunas son a-- planadas, otras elevadas, tienen bordes bien definidos o irregu lares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta, la cual con el tiempo se vuelve más espesa y seca, pueden producir pigmentos (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

En el presente trabajo el aislamiento de las levaduras se- hará de lavado de granos de uva, del mosto de la misma uva al - inicio de la fermentación y al termino de ella (determinadas am bas por medio de la densidad del mosto).

Se practicará el aislamiento de muestras homogéneas ya sea de agua de lavado de granos de uva o de vino nuevo, sobre me- - dios en caja de petri.

Los medios sobre los cuales se puede realizar el aislamien to de las levaduras son los siguientes:

- Agua de Touraillons glucosada gelosada (1)•
- Gelosa de Saboraud (2)•
- Medio Glucosado de patata (3)•
- Medio Glucosado en extracto de Levadura (4)•
- Mosto de cerveza gelosado (5)•

El aislamiento se logrará tomando una asada de la muestra- a ensayar y practicando una serie de estrías sobre el medio de-

cultivo. La forma de practicar las estrías sobre el medio es -- importante para lograr el crecimiento de colonias bien separa-- das y poder así distinguir las particularidades de la colonia - en cuestión.

Las colonias aparecen sobre los medios antes mencionados - transcurridas por lo menos 48 horas de incubación a 24°C.

III.2. IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

Antes de realizar las pruebas de identificación, repicar - las cepas reunidas sobre un medio de gelosa inclinada en tubo, - tal como el mosto de cerveza gelosado (5)* o el agua de Tourai- llons glucosada gelosada (1)*.

La identificación de las levaduras descansa sobre los si-- guientes criterios:

1.- CARACTERES MORFOLOGICOS

Del medio en tubo con agar inclinado, confeccionar suspen- siones de levadura en agua destilada (9)* o en solución fisiol- gica estéril (10)*.

A partir de estas suspensiones resembrar:

- Dos placas de petri ocupadas por mosto de cerveza gelosado (5)* o medio glucosado de patata (3)* mediante la técnica de exten-- siones superficiales.

- Dos tubos de mosto de cerveza líquido (17)*

- Dos tubos de mosto de uva estéril (20)*

A partir de cultivos iniciales sobre gelosa inclinada, resembrar con la ayuda del asa de platino:

- Un tubo con medio Gorodkowa (6) mediante depósito de 3 o 4 puntos de siembra en la superficie.

- Un tubo conteniendo un trozo de zanahoria (7) y sembrado en estrías. Aquí se pueden utilizar otros medios de preparación similar a base de patata o salchicha.

- Un tubo con el medio P.C.B (11), sembrar en estría apretada en el fondo del tubo, terminando después en una línea recta ligeramente hundida en la gelosa.

Llevar las placas y los tubos resembrados a una estufa que esté a la temperatura de 24°C.

Posteriormente se procederá a determinar las siguientes cuestiones:

1) ASPECTO DE LAS COLONIAS SOBRE MEDIOS SOLIDOS. Apreciar con cuidado el aspecto de las colonias aisladas que se han desarrollado sobre el medio gelosado en placas de petri. Las colonias se observan al microscopio con el objetivo 10x.

Las características de cada tipo de colonia que deben ser observadas son: color, topografía de la superficie, textura, tamaño y apariencia de los bordes (SHAPTON Y GOULD 1969).

- Las colonias del género RHODOTORULA son esféricas, abombadas, brillantes y de color rojo salmón.

- Las colonias que pertenecen a SPOROBOLOMYCETACEAE son de contorno irregular y color rojo salmón. Presentan el fenóme

no de espejo.

- Las colonias de la especie CANDIDA mycoderma se presentan de contorno irregular, plegadas, blanquecinas o de color gamuza.

- Las colonias de los SACCHAROMYCES se presentan redondas, blancas o de un blanco gamuza, con bordes netos, semiesféricas o con el centro puntiagudo.

Si se les deja desarrollar hasta que alcancen un diámetro aproximado de 1 cm (colonias gigantes) pueden presentar aspectos típicos para determinadas especies (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

2) FORMA Y DIMENSIONES DE LAS CELULAS. La forma y dimensiones de las levaduras pueden ayudar a la determinación de algunos géneros o especies (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

Tomar una gota de cultivo en medio de mosto de cerveza líquido (17)* que tenga por lo menos un tiempo de incubación que oscile entre 2 y 3 días y observar entre portaobjetos y cubreobjetos sus características morfológicas y tamaño.

Una técnica util es el examen en una gota de tinta china. También se pueden examinar después de una coloración a base de lugol, que permite detectar la presencia de glucógeno o mediante el Sudán III que pone en evidencia a los glóbulos lipídicos.

3) FACULTAD PARA FORMAR ESPORAS. La formación de esporas constituye un caracter fundamental que permite agrupar a las levaduras estudiadas en una de las 3 grandes familias.

La facultad de esporulación no es siempre tan sencillo de poner de manifiesto, sobre todo si se trata de antiguas cepas seleccionadas, o después de haber realizado numerosos repicados sobre medios ricos.

Es muy útil considerar la forma de las esporas ya que nos pueden ayudar en la identificación.

Se realiza un examen al estado fresco, en una gota de agua. Las levaduras recogidas a partir del medio Gorodkowa (6)*, pasados por lo menos 3 días de incubación. Observar si hay ascas, ascosporas, su forma y número, de la misma forma examinar los cultivos obtenidos sobre el trozo de zanahoria y patata, transcurridos por lo menos 8 días de incubación.

Si los resultados son negativos, antes de emitir el fallo proceder a hacer una prueba sobre el bloque de yeso (8)* colocando en la excavación una gota de cultivo de levaduras obtenido de mosto de cerveza líquida (17)*, con por lo menos 48 horas de incubación. Llevar el bloque a incubación a 25°C durante 7 u 8 días, examinar cada 24 horas.

4) TIPO DE REPRODUCCION VEGETATIVA. Recoger una gota de cultivo obtenido sobre uno de los medios que contengan mosto de cerveza líquida, con 2 o 3 días de incubación.

Realizar un examen fresco de la citada gota entre porta y cubreobjetos. Apreciar la forma de las células, dimensiones y sobre todo su tipo de reproducción vegetativa, la cual puede ser por gemación, escisión o ambas como por ejemplo los géneros ENDOMYCOPSIS o TRICHOSPORUM.

Se reconoce que las levaduras tienen un aspecto más homogéneo cuando se cultivan en medios líquidos que sobre medios sólidos.

5) APTITUD PARA CONSTITUIR UN MICELIO O PSEUDOMICELIO. La formación de un pseudomicelio o de un micelio se presenta sobre medios de cultivo pobres o agotados.

Cuando la reproducción vegetativa es por escisión, puede haber formación de un micelio verdadero, dando lugar a la formación de artrosporas. Esto ocurre en el género SCHIZOSACCHAROMYCES (PELCZAR,REID,CHAN 1977).

Cuando se reproducen por gemación se puede presentar la formación de un rosario de células o pseudomicelio (Ver Fig. 4-A). Puede haberlos con formación de blastosporas. La formación de pseudomicelio es generalmente útil para poner en evidencia a las levaduras asporógenas. En ocasiones puede resultar dificil diferenciar un micelio verdadero de un pseudomicelio, sobre todo en ocasiones en que son cultivos antiguos. Un medio de cultivo adecuado para evidenciar micelio o pseudomicelio es el P.C.B (JUDE,ESSARTS Y DELGA 1968).

También se utiliza el medio de agar harina de maíz (sin glucosa) conteniendo Tween 80 al 1% en caja de Petri. Se siembra también en estrías profundas (HUPPERT, HARPER, JUN Y DELANEROLLE 1975).

Para poder observar las estructuras antes dichas es necesario examinar los cultivos sobre el medio P.C.B transcurridos por lo menos 3 a 5 días de incubación.

Retirar un pequeño formento de geloza de la parte resembrada en línea profunda, aplastarla sobre un portaobjetos mediante el cubreobjetos y observar si hay formación de micelio o pseudomicelio.

II.- EXAMEN DE LOS CARACTERES FISIOLOGICOS

1) ASPECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE MEDIO LIQUIDO. El diferente comportamiento que presentan las levaduras en medios de cultivo líquidos, sirve para poder establecer la determinación de géneros o de ciertas especies.

Respecto a esto las levaduras se pueden agrupar en dos categorías:

a) Las levaduras con metabolismo fermentativo dominante.- Se caracterizan por un desprendimiento gaseoso más o menos abundante (GIRARD Y ROUGIEUX 1964).

Puede ser que una vez terminado el proceso fermentativo - la levadura forme una especie de velo en el medio, generalmente las que lo forman son capaces de reoxidar el alcohol producido.

b) Las levaduras con metabolismo oxidativo dominante. Casi todas ellas forman, sobre el medio líquido, un velo inmediato, en ocasiones reducido a un simple anillo. El velo con frecuencia es espeso,plegado y seco. Otras levaduras no forman velo,-. pero sí un depósito y no hay proceso fermentativo.

Para obtener los resultados es necesario apreciar con cui

dado los cultivos líquidos (mosto de cerveza y mosto de uva es tóril) después de 2 o 3 días de incubados a 25°C y nuevamente transcurridos 15 y 30 días de incubación. Observar principalmente la forma de crecimiento de las levaduras, ya sea superficial o en el fondo del medio.

2) FERMENTACION DE LOS GLUCIDOS. Se utilizan los siguientes azúcares: glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa y galactosa (13), además se añade en las pruebas fermentativas la rafinosa (PRESCOTT Y DUNN 1962).

El estudio del metabolismo de los glúcidos por vía fermentativa se realiza en tubos de medio líquido y es conveniente tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Todas las levaduras son capaces de asimilar la glucosa por vía oxidativa.
- Todos los azúcares fermentados por una levadura, son igualmente asimilados por vía oxidativa, pero la recíproca no se cumple.
- Las levaduras que hacen fermentar a la maltosa, generalmente son incapaces de hacerlo con la lactosa.
- El metabolismo de la rafinosa es de interés estudiarlo solo en las levaduras que hacen fermentar la sacarosa.

La rafinosa es un trisacárido compuesto de levulosa-glucosa-galactosa.

La técnica más empleada para este tipo de pruebas es la de Durham.

Se utiliza para estas pruebas un tubo de ensayo en el cual es introducida una campana de Durham, agua peptonada (12)* y un 2% del azúcar a ensayar (13)*.

Se resiembra profundamente mediante una suspensión de levadura con asa de platino, incubar a 25°C. Observar a las 24 - horas los resultados:

Es positivo si hay presencia de burbujas de gas dentro de la campana. Clasificar a las levaduras en función de los resultados (ver cuadors 2 y 3).

En el caso particular de la rafinosa, se utiliza la técnica de la campana de Durham. Después de haber introducido en el tubo 1cc aproximado de una solución estéril de rafinosa al 30%, incubar a 25°C.

Transcurridos por lo menos 8 días de incubación, una vez que la fermentación ha terminado, caracterizar la naturaleza del azúcar residual mediante el método basado en la circunstancia de que la rafinosa no es un azúcar reductor, mientras que la melibiosa si lo es.

Se procede como sigue:

Retirar 1cc de líquido de cultivo de levadura sobre rafinosa, añadir 1cc de Fehling (14)* hacer hervir durante 3 minutos.

Se pueden presentar dos casos:

- Ausencia de azúcar reductor. La rafinosa es totalmente utilizada se dice entonces que la levadura fermenta totalmente la rafinosa.

- Presencia de azúcar reductor. Puede ser la melibiosa o la galactosa. Muchas levaduras son capaces, después de excindir la molécula en el puente de unión fructosa-glucosa, de provocar - la fermentación de la fructosa sin atacar a la melibiosa. Se - dice entonces que son capaces de fermentar una tercera parte - de la molécula de rafinosa (ver cuadro 2).

En caso que el azúcar residual sea la galactosa se dice - que las levaduras son capaces de fermentar dos tercios de la - rafinosa. Es necesario comentar que son pocas las levaduras -- que rompen el puente de unión entre la glucosa y la galactosa- (ver cuadros 2 y 3).

Para diferenciar en el segundo de los casos, la categoría a que pertenecen las levaduras es necesario mendionar que las- levaduras que provocan la fermentación de la rafinosa en sus - dos terceras partes son sumamente raras y que sus restantes caracteres morfológicos y fisiológicos, son lo suficientes para- poderlas diferenciar, y por el contrario las levaduras que fermentan un tercio de la rafinosa son numerosas (ver cuadros 2 y 3). Sin embargo se puede investigar la naturaleza del azúcar - residual mediante métodos bioquímicos recurriendo a la cromatografía. A continuación se da un método cromatográfico eficas y sencillo:

Utilizando una tira de papel filtro Whatmann No. 1 o 3, - colocar con un capilar una microgota de los carbohidratos de - prueba y una del problema. Las manchas de las gotas deben que-

dar separadas entre sí por lo menos 3 cm. El cromatograma se -- desarrolla en forma ascendente utilizando el solvente adecuado- (19)* hasta la altura deseada. Se deja secar perfectamente al - aire y se revela (21)*.

Después de que el exceso de revelador se ha secado al aire se coloca el papel sobre una placa caliente durante 10 minutos- para que se observen las manchas. Determinar los valores de Rf- y Rx del problema y deducir que carbohidrato es el que existe - en el problema.

3) ASIMILACION DE LOS GLUCIDOS POR VIA OXIDATIVA. Las pruebas de asimilación de carbohidratos es una de las principales - pruebas bioquímicas para la identificación de levaduras, esta - prueba determina la habilidad de una cepa de levadura para utilizar uno o varios carbohidratos como única fuente de carbono.

Son tres las principales técnicas que se utilizan: Técnica auxonográfica, técnica en caldo de Wickerham y técnica de - asimilación en agar inclinado (MOORE Y JACIOW 1977).

METODO AUXONOGRAFICO.- Esta técnica introducida originalmente por Beijerinck. Esta técnica incluye la colocación de cantidades pequeñas de varios carbohidratos conocidos dentro de un agar base sembrado con levaduras. El crecimiento alrededor del- disco es señal de asimilación y la formación de un halo claro - (no hay desarrollo alrededor del azúcar) indica la no utilisación del azúcar.

TECNICA EN CALDO DE WICKERHAM.- Introducida originalmente por Wickerham y Burton, esta técnica emplea un medio similar - al empleado en el método auxonográfico pero en forma de caldo.

TECNICA DE ASIMILACION EN AGAR INCLINADO.- Esta técnica - es una modificación de la de Wickerham en caldo incluyendo la- adición de una solución indicadora, neutralizando el PH a 7 y- solidificando el carbohidrato individual en tubos de agar ni-- trógeno-levadura.

El método de elección es el auxonográfico y a continuación se describo el procedimiento:

Depositar en una placa de petri, unas gotas correspondientes a una suspensión espesa de levadura en estudio, después de verter un medio gelosado fundido y enfriado a 40°C. El medio - puede ser un medio mineral exento de glúcidos (15) °o bien a base de gelosa con extracto de levadura (4)°. Homogeneizar. Dejar solidificar, y secar la superficie del medio en una estufa durante unos minutos.

Una vez seca la superficie, disponer de unos discos de papel estériles impregnados de cada uno de los azúcares que se - van a ensayar glucosa, sacarosa, maltosa, galactosa y lactosa.

Incubar a 25°C durante 24 a 48 horas. La interpretación - de los resultados se da en la descripción del método.

4) ASIMILACION DEL NITROGENO DE LOS NITRATOS. La asimila-- ción del nitrógeno de los nitratos constituye un caracter de -

género para las levaduras esporógenas y un caracter de especie para las levaduras asporógenas (GIRARD Y ROUGIEUX 1979).

La técnica utilizada para la caracterización de este fenómeno es el método auxonográfico.

Se utilizarán discos de papel estériles impregnados de sulfato de amonio como testigo y nitráto de potasio.

El medio base utilizado es un medio mineral purificado carente de nitrógeno asimilable (16)*.

Incubar a 25°C y observar los resultados a las 48 horas. Estos se interpretan de manera similar a la asimilación de azúres.

5) CONSERVACION DE LAS CEPAS REUNIDAS. Para la conservación de cepas se recomienda utilizar cualquiera de los siguientes medios:

- Mosto de cerveza en matraz (17)*
- Agua de Touraillons en matraz (1)*
- Medio melazado (18)* Repicado cada tres meses
- Mosto de cerveza gelosado (5)* Repicado en estría cada 3 o 6 meses.

* El número entre paréntesis indica el orden que le corresponde en la lista siguiente donde se señala de que sustancias consta y su manera de preparación.

III.3 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

A) MEDIOS DE CULTIVO ESTERILIZADOS AL AUTOCLAVE, LIQUIDOS Y SOLIDOS

1) AGUA DE TOURAILLONS

PEPTONA BACTERIOLOGICA----------	2gr
FOSFATO DIAMONICO----------	5gr
FOSFATO MONOPOTASICO----------	2gr
ACIDO TARTARICO----------	1gr
SULFATO DE AMONIO----------	0.5gr
SACAROSA----------	10gr
*AGUA DE TOURAILLONS----------	1000cc

Después de obtenida la disolución filtrar.

Distribuir en tubos, matraces Pasteur, etc. Taponar con algodón. Esterilizar durante 20 minutos a 120°C.

*Preparación del agua de Touraillons.- En un saco de tela, introducir 15 gr de touraillons (gérmenes secos de la cebada). - Sumergir el saco en el agua y someter a ebullición durante 30- minutos. Filtrar y completar hasta un volumen de 1 litro.

2) GELOSA SABORAUD

PEPTONA----------	10gr
GLUCOSA----------	20gr

GELOSA---------- ---------- 20gr

AGUA---------- 1000cc

Distribuir en tubos.

Taponar con algodón.

Esterilizar durante 20 minutos a 120°C.

3) MEDIO DE PATATA

PATATAS PELADAS CORTADAS

EN CUBOS---------- 2Kg

GLUCOSA---------- 20gr

GELOSA---------- 20gr

AGUA---------- 1000cc

Dejar macerar las patatas en 500cc de agua durante una me-
dia hora como mínimo, hirviendo más tarde el macerado durante-
30 minutos.

Filtrar sobre una gasa.

Añadir la gelosa.

Completar hasta un litro.

Fundir la gelosa.

Filtrar en caliente sobre algodón.

Añadir la glucosa.

Completar a un volumen de 1 litro.

Distribuir en tubos o cajas de petri.

Esterilizar durante 15 minutos a 115°C.

En el momento de su utilización, añadir asépticamente 1cc de una solución estéril de ácido tartárico al 10%, en un tubo- que contenga el medio fundido y enfriado a unos 40°C para al--

canzar un Pll que esté aproximadamente entre 3.5 y 4.

4) GELOSA AL EXTRACTO DE LEVADURAS

EXTRACTO DE LEVADURA EN POLVO----- 5gr
GELOSA---------- 20gr
AGUA---------- 1000cc

Esterilizar durante 20 minutos a 120°C.

Este medio puede ser glucosado, a razón de 20 gr por litro (Medio Mossel). En este caso en el momento de su utilización,- añadir 0.35cc de una solución de ácido tartárico al 10% esté-- ril para conseguir el PH de 4.

5) MOSTO DE CERVEZA GELOSADO

GELOSA---------- 18gr
MOSTO DE CERVEZA---------- 1000cc

Esterilizar 15 min. a 120°C.

6) MEDIO DE GORODKOWA

EXTRACTO DE CARNE LIEBIG------ 1gr
CLORURO DE SODIO---------- 0.5gr
PEPTONA---------- 1gr
GELOSA---------- 15gr
AGUA DESTILADA---------- 1000cc

Fundir la gelosa.Filtrar en caliente. Añadir 2.5gr de glu cosa. Distribuir en tubos o cajas de petri. Esterilizar en auto

clave 15 minutos a 120°C.

7) FRAGMENTOS DE ZANAHORIA

Cortar en el sentido de su longitud, zanahorias frescas debidamente peladas.

Introducir una media zanahoria en un tubo provisto de un-estrangulamiento en la base.

Llenar de agua destilada el fondo del tubo.

Taponar con algodón. Esterilizar durante 15 minutos a 120°C.

8) BLOQUE DE YESO

Preparar un bloque de yeso (de forma cúbica o rectangular) y en una de sus caras hacer una excavación.

Colocar el bloque dentro de un cristalizador y llenar de-agua hasta que cubra medio bloque. El conjunto formado por bloque-esterilizador-agua, será esterilizado durante 15 minutos a 120°C.

9) AGUA ESTERIL

Distribuir en tubos de 17,9cc de la solución anterior, en cada uno de ellos.

Taponar los tubos con algodón. Esterilizar durante 15 minutos a 120°C.

10) SOLUCION FISIOLOGICA

CLORURO DE SODIO---- --------- 9gr

AGUA DESTILADA---------- 1000cc

Distribuir en tubos de 17, 9cc de la solución anterior, en cada uno de ellos.

Taponar los tubos con algodón. Esterilizar durante 15 minutos a 120°C.

11) MEDIO DE P.C.B

PULPA DE PATATAS---------- 20gr

PULPA DE ZANAHORIAS--------- 20gr

AGUA DEL GRIFO---------- 1000cc

Dejar en maceración a las pulpas en el agua durante una hora. Hervir durante 5 minutos. Filtar sobre algodón. Añadir gelosa 20gr. Fundir la gelosa. Filtrar. Completar hasta un litro. Distribuir en tubos. Taponar con algodón. Esterilizar durante 15 min. a 120°C.

12) AGUA PEPTONADA

PEPTONA BACTERIOLOGICA EXENTA DE INDOL---------- 15gr

CLORURO DE SODIO---------- 5gr

AGUA DESTILADA---------- 1000cc

Distribuir en tubos. Taponar los tubos con algodón. Esterilizar durante 15 minutos a 120°C.

13) SOLUCIONES ESTERILES DE AZUCARES

Preparar soluciones al 30% en agua destilada de los siguientes azúcares: Glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y galactosa.

Distribuir en tubos. Taponar con algodón. Esterilizar durante 15 min. a 110°C.

La solución no debe presentar un tinte amarillento en el momento de su salida del autoclave.

NOTA: La solución de sacarosa se hidroliza en el autoclave. Para evitarlo, esterilizar la solución mediante filtrado a través de una bujía.

15) MEDIO MINERAL EXENTO DE GLUCIDOS

FOSFATO MONOPOTASICO	1gr
SULFATO MAGNESICO	0.5gr
SULFATO AMONICO	0.5gr
AGAR LAVADO	20gr
AGUA DESTILADA	1000cc

Esterilizar 15 min. a 121°C.

16) MEDIO MINERAL PURIFICADO

GLUCOSA PURIFICADA	1gr
GELOSA LAVADA	20gr
FOSFATO MONOPOTASICO	1.5gr
SULFATO DE MAGNESIO	0.25gr

BIOTINA---------- 10^{-9}gr

TIAMINA---------- 10^{-6}gr

ACIDO NICOTINICO---------- 10^{-6}gr

AGUA DESTILADA---------- 1000cc

Esterilizar durante 15 min. a 120°C.

PREPARACION DE LA GELOSA PURIFICADA.- Hervir por lo menos durante 10 minutos una solución de glucosa pura al 20%, a la que se le agrega carbón activado. Filtrar. Completar el volumen a 1 litro, después de haber disuelto en el mismo los diferentes componentes del medio.

17) MEDIO DE CERVEZA NO LUPULADO

En un gran recipiente (5 litros) introducir:

MALTA MOLIDA---------- 400gr

AGUA---------- 2000cc

Llevar suavemente a una temperatura de 50°C. Mantener ésta temperatura agitando durante 45 minutos. Aumentar lentamente la temperatura hasta los 70°C a razón de 1°C por minuto. -- Mantener esta temperatura durante 30 minutos. Filtrar. Completar hasta un volumen de 2 litros. Verificar mediante el lugol que ha desaparecido todo el almidón.

Para clarificar el medio, llevar al autoclave durante 45 minutos. Para esto es conveniente añadir clara de huevo. Dejar enfriar el líquido. Filtrar. Distribuir en tubos o matraces -- Pasteur. Taponar con algodón. Esterilizar durante 15 min a 110°C.

18) MEDIO DE MELAZA

MELAZA DE FABRICA DE AZUCAR-------- 30gr

FOSFATO DIAMONICO---------- 2gr

SULFATO DE AMONIO NEUTRO---------- 1gr

FOSFATO MONOPOTASICO---------- 1gr

SULFATO DE MAGNESIO---------- 0.5gr

AGUA DESTILADA---------- 1000cc

Ajustar el PH a 4.5. Distribuir en tubos o matraces Pasteur. Taponar con algodón. Esterilizar durante 15 min. a 115°C.

20) MOSTO DE UVA ESTERIL

Exprimir a través de un saco de tela, granos de uvas maduras recogiendo el jugo, que será distribuido en tubos de ensaye o matraces. Taponar con algodón y esterilizar durante 15 min. a 120°C.

SOLUCIONES

14) LIQUIDO DE FEHLING (INVESTIGACION DE AZUCARES REDUCTORES)

SOLUCION A.- SULFATO DE COBRE..... 40gr
AGUA DESTILADA..... 1000cc

SOLUCION B.- TARTRATO DOBLE DE AMONIO
Y DE SODIO..... 200gr
SOSA EN PASTILLA..... 150gr
AGUA DESTILADA..... 1000cc

En el momento de su empleo, mezclar las soluciones A y B en partes iguales.

19) MEZCLA DE DISOLVENTES PARA LA CROMATOGRAFIA DE AZUCARES

Puede emplearse cualquiera de las siguientes:

a) ISOPROPANOL-AC.ACETICO-AGUA (3:1:1)

b) BUTANOL-AC.ACETICO-AGUA (4:1:2) o (40:6:15)

c) ACETATO DE ETILO-AC.ACETICO-AGUA (3:1:3)

Preparar la cantidad necesaria para el tanque que se va a emplear.

21) DISOLUCIONES REVELADORAS QUE PUEDEN EMPLEARSE PARA LA CROMATOGRAFIA DE AZUCARES

a) 9gr de ácido oxálico en 200 ml de agua, más 2 ml de anilina.

b) 1.23gr de p-anisidina más 1.66 gr de ácido ftálico disueltos en 100 ml de etanol.

c) NaOH al 1% en etanol al 60%, disolver calentando a 100°C durante 2 minutos.

C A P I T U L O IV

RESULTADOS

Empleando las técnicas de aislamiento y a partir del agua de lavado de granos de uva se aislaron 5 cepas. La atención de este trabajo se centra en dos cepas.

A continuación se darán los resultados obtenidos del proceso de aislamiento e identificación de levaduras nativas de los viñedos del Campo Agrícola Experimental de Zacatecas.

IV.1. CEPA No 1

I.- AISLAMIENTO. Cepa aislada en tres etapas:

a) De agua de lavado de granos de uva variedad GRENACHE

b) De mosto de uva de la misma variedad al inicio de la fermentación (su densidad era 1.13470 gr/cm^3 a 20°C)

c) Al termino de la fermentación (su densidad era 0.99940 gr/cm^3 a 20°C).

El medio utilizado para el aislamiento fué papa dextrosa agar (PDA). Se logró aislar una serie de colonias de la muestra de lavado de granos, todas ellas analizadas y estudiadas por separado. De la muestra del mosto al inicio de la fermentación y al termino de la misma, se aisló un solo tipo de colonia que al final resultó ser igual que una de las cepas aisladas del agua de lavado de granos. Por lo tanto los datos dados a continuación describen a las cepas aisladas de las tres etapas como una sola.

II.- CARACTERIZACION MORFOLOGICA

a) DESCRIPCION COLONIAL. Para éste propósito el medio utilizado fué el de papa dextrosa agar (PDA) y las observaciones fueron realizadas con el microscopio estereoscópico.

El aspecto que presentaron las colonias a los 2 días de incubación a 24°C fué el siguiente: colonias de aproximadamente 3 mm de diámetro, brillantes, circulares, bordes lisos, elevada y de un color blanco crema.

El aspecto que presentaron las colonias a los 15 días de incubación a 24°C es notorio: se distingue un cambio de color ya que se aprecian más blancas que al principio. El desarrollo de las colonias alcanza a medir aproximadamente 1 cm de diámetro. De bordes lisos, brillosas y con una marcada elevación -- puntiaguda en el centro (colonia umbilicada).

El examen al estado fresco en agua destilada estéril de -- las colonias a 2 días de desarrollo, mostró células ovoides en su mayoría, y algunas esféricas o semiesféricas. Se observó su forma de reproducción siendo palpable la gemación y en su mayoría de tipo polar.

La observación microscópica en estado fresco de las colonias a los 15 días de incubadas denotó a la mayoría de células con forma ovoide, en gemación polar y algunas en gemación bipolar. No hay micelio, ni tampoco esporas.

b) EXAMEN DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS LIQUIDOS.

Medios utilizados: 1.- Mosto de uva esterilizado

2.- Mosto de cerveza esterilizado

1.- Mosto de uva esterilizado. En tubos incubados a 24°C, sembrados a partir de una suspensión de agua destilada estéril de levaduras obtenidas de medio PDA inclinado en tubo.

Aspecto del medio a los 2 días de incubado: hay producción de espuma a consecuencia de que ocurre la fermentación. Observandose además en el fondo un depósito blanco muy abundante.

Examen en fresco entre porta y cubreobjetos: desarrollo de células de forma ovoide de aproximadamente 4-6 8-10 micras. Su reproducción vegetativa es por gemación, con 1 o 2 yemas a lo máximo.

Aspecto del mosto de uva a los 30 días de incubado a 24°C: se percibe claramente la aparición de islotes aislados y escasos en la superficie del medio. Ausencia total de fermentación.

Examen en fresco del mosto a los 30 días: Células ovoides de aproximadamente 4-6 8-10 micras y su reproducción vegetativa es por gemación polar.

2.- Mosto de cerveza esterilizado. Sembrados a partir de una suspensión de levaduras obtenidas del medio PDA inclinado en tubo.

Aspecto del medio a los 2 días de incubado a 24°C: el medio presenta un depósito blanco en el fondo del tubo, además de un ligero desprendimiento gaseoso, denotado por la presencia de espuma en la superficie del medio. No se observa crecimiento superficial.

Examen microscópico en fresco: se aprecia perfectamente un crecimiento homogéneo de las células levaduriformes, de forma ovalada con dimensiones de 4-5 8-10 micras aproximadamente.

Su reproducción vegetativa se manifiesta por gemación polar con una sola yema.

Aspecto del medio a los 32 días de incubado a 24°C: la fermentación ha cesado totalmente, no hay producción de espuma, en el fondo del tubo hay sedimento abundante y de color blanco.

Es muy notorio en la superficie del medio, el desarrollo de pequeños islotes aislados.

Examen en fresco: se observaron células levaduriformes ovoides en gemación con una sola yema de dimensiones ya descritas.

Se encontraron además, formas de configuración arrosariada, constituyendo un falso micelio, como se muestra en la figura 4-A. Las estructuras encontradas en forma arrosariada no fueron abundantes además de que en cuanto su longitud, eran hifas relativamente cortas.

Esta forma de desarrollo o crecimiento fué observada de la toma del crecimiento en la superficie del medio.

De acuerdo con estos resultados se puede considerar a esta levadura capacitada para constituir un falso micelio. Pero, además, y muy importante es el hecho de que se pueda desarrollar en la superficie del medio, tiempo después de terminada la fermentación esto la hace ser una levadura capaz de oxidar el propio alcohol producido.

c) FACULTAD PARA FORMAR ESPORAS.

Medios utilizados: 1.- Trozo de papa inclinado en tubo

2.- Trozo de zanahoria inclinado en tubo

3.- Bloque de yeso estéril

1.- Trozo de papa inclinado en tubo e incubado a 24°C: en el - examen en fresco a los 9 diás de incubado se vieron estructu-- ras celulares en proceso de formacion de 1 ascospora, algunas- muestran ya una ascospora esférica, de superficie no muy lisa.

La muestra vista en agua destilada estéril se presenta muy heterogénea. No se observaron células en proceso de reproduc-- ción vegetativa mediante gemación.

Examen en fresco a los 30 días de incubado a 24°C: presencia de ascas con 1,2,3 y 4 ascosporas circulares y de bordes - lisos y bien definidos. Aún se observaron estructuras en proceso de formación de ascosporas. Por consiguiente es una muestra de desarrollo heterogéneo.

2.- Trozo de zanahoria inclinado e incubado a 24°C: el examen- en fresco (en agua destilada estéril) a los 9 días de incubada muestra la presencia de estructuras con formación de ascospo-- ras (ascas), similar a lo encontrado en el medio de papa.

Aunque aquí se logró observar ascas con 1,2 y 3 esporas - por asca, circulares y de superficie no muy bien definida pero un poco rugosa.

La muestra tomada al azar se presenta un poco más homogénea que la observada en el medio a base de papa.

Examen en fresco a los 30 días de incubada a 24°C: se nota la presencia de ascas con 1,2,3 y 4 esporas circulares y de superficie bien definida como lisa. No se encontró ninguna célula en proceso de reproducción vegetativa y muy pocas estructuras celulares en proceso de formación de ascosporas.

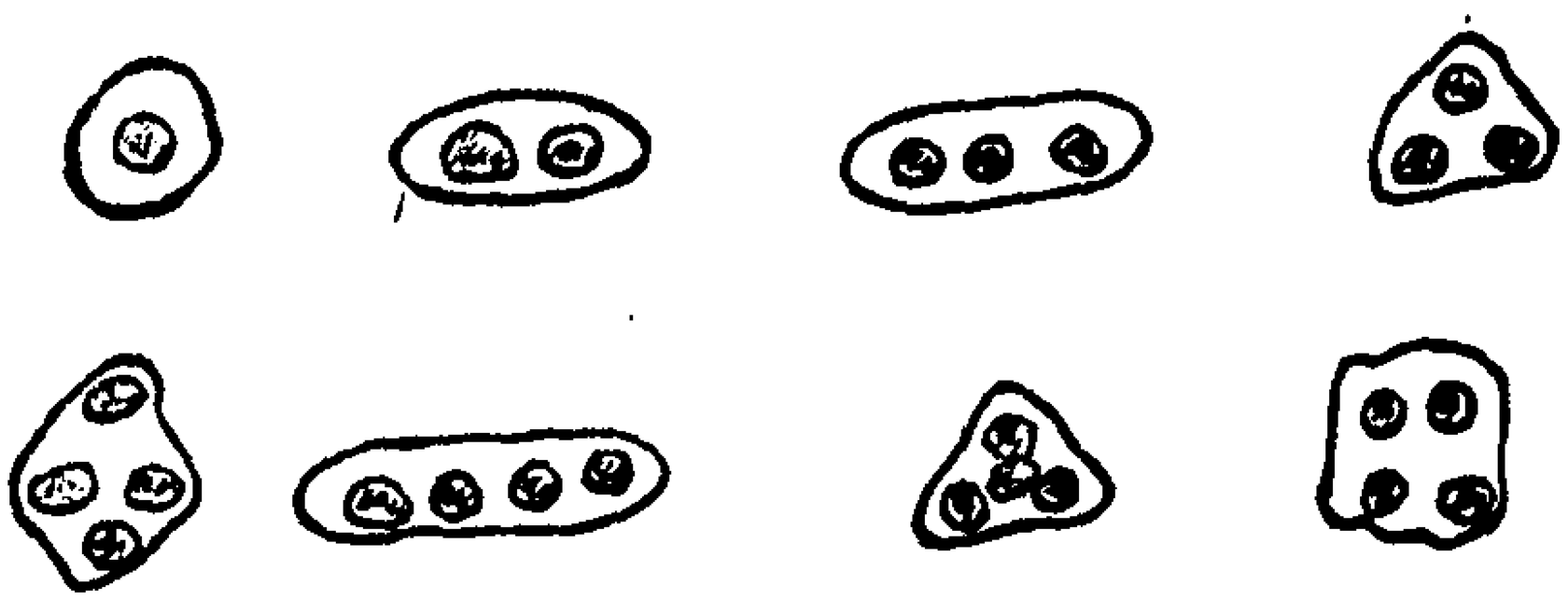
Se presentan en más abundancia las estructuras celulares con 3 y 4 ascosporas.

Es importante señalar que los medios con papa y zanahoria fueron resembrados a partir de colonias ya aisladas y contenidas en el medio papa dextrosa agar inclinado en tubo. Fueron resembradas con asa de platino y en forma de estrías no muy apretadas.

3.- Bloque de yeso sembrado a partir de un medio líquido con-- mosto de cerveza previa incubación de 2 días: es depositada una gota del medio líquido (con células en suspensión) sobre la excavación que presenta el bloque.

Examen en fresco a los 10 días de incubado a 24°C: presencia de ascas con 1,2,3 y 4 esporas esféricas y de superficie - lisa.

La muestra se presenta mucho más homogénea que las que se vieron en los dos medios anteriores. También aquí abundan las- ascas con 3 y 4 esporas, no hay células en reproducción vegetativa, ni pseudomicelio. La forma de las ascas variaba dependiendo de la posición de las esporas dentro de la misma, como- se esquematiza a continuación:



Como ya se ha mencionado en el transcurso de la recopilación de datos concernientes a las levaduras, la formación de esporas sexuales sirve para ubicar a las levaduras dentro de alguna de las 3 grandes familias.

Además hay que recordar que la forma, el número y la textura de las esporas nos puede ayudar a clasificar genéricamente a las levaduras.

d) FACULTAD PARA CONSTITUIR UN MICELIO O PSEUDOMICELIO.

Medio utilizado: Medio P.C.B inclinado en tubo incubado a 24°C durante 3 a 5 días. Este medio es resembrado a partir de una muestra de levadura contenida en medio PDA inclinado en tubo.

La resiembra se utiliza en estría profunda y apretada terminando en línea recta y hundida ligeramente en el medio.

Examen en fresco después de 5 días de incubación a 24°C: no se encontraron células todavía en gemación.

Examen en fresco a los 10 días de incubación a 24°C: se encontraron ascas con 1,2,3 y 4 esporas circulares y lisas. Además formas arrosariadas, constituyendo hifas muy cortas y escasas. Por lo tanto formación de pseudomicelio. No así, un micelio verdadero que más fácilmente es observable y más complejo.

De acuerdo a los datos obtenidos hasta ésta parte del trabajo, como son los siguientes:

- Caracteristicas morfológicas de las colonias
- Caracteristicas morfológicas de las colonias días después de inoculadas
- Forma, dimensiones y reproducción vegetativa
- Caracteristicas de crecimiento en medios líquidos

- Su facultad para formar esporas dentro de ascas
- Su facultad para formar pseudomicelio

En base a los aspectos teóricos que se mencionan en el segundo capítulo podemos ubicar a la cepa de levadura con la - - cual se está trabajando dentro de los siguientes grupos taxonómicos:

Reino:PLANTAE

División:MYCOTA

Subdivisión:EUMYCOTINA

Clase:ASCOMYCETES

Subclase:HEMIASCOMYCETIDAE

Orden:ENDOMYCETALES

Familia:SACCHAROMYCETACEAE

Subfamilia:SACCHAROMYCETAIDEAE

Tribu:SACCHAROMYCETEAE

Género:SACCHAROMYCES

III.- CARACTERIZACION FISIOLOGICA. La caracterización fisiológica que presenta esta cepa de levaduras en los medios de cultivo líquidos manifiestan una clara inclinación hacia la fer-- mentación (característica de pocas especies de levaduras) como caracter fisiológico dominante. Pero es notorio un metabolismo oxidativo, débil, pero se puede apreciar.

a) FERMENTACION DE AZUCARES. Para determinar que azúcar - era capaz de fermentar esta cepa de levaduras se empleó la técnica de la campana de Durham. Los azúcares utilizados para esta prueba son: glucosa,sacarosa,lactosa,galactosa,maltosa y ra

finosa.

Todos ellos en solución al 2% en agua peptonada. Excepto la rafinosa que se preparó al 30% en agua peptonada. La temperatura a la cual fueron incubados los tubos de prueba fué de - 24°C.

Los azúcares antes mencionados fueron esterilizados en autoclave, excepto la sacarosa que se esterilizó por medio de -- filtración utilizando un filtro milipore de 0.45 micras.

Los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas a la temperatura de incubación antes señalada se muestran en el cuadro 9.

CUADRO 9.- RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE AZUCARES

AZUCAR	FERMENTACION
GLUCOSA	POSITIVO
SACAROSA	POSITIVO
LACTOSA	POSITIVO
GALACTOSA	POSITIVO
MALTOSA	POSITIVO
RAFINOSA	POSITIVO 1/3

Una vez establecido que ocurrió la fermentación de la rafinosa (la presencia de gas en la campana de Durham) se procedió a determinar en que grado ocurrió esta fermentación y para esto, se inició el estudio para la distinción de azucares residuales.

Se detectó la presencia de azúcar reductor (indicativo de

fermentación parcial) mediante la reacción de Fehling. La prueba resultó positiva debido a la presencia de un precipitado color rojo ladrillo, por lo tanto presencia de azúcar reductor, pudiendo ser melibiosa o galactosa.

Si el azúcar residual es la melibiosa, significa que la cepa fermenta un tercio de la rafinosa, este tipo de levaduras son las más comunes y frecuentes. Si el azúcar residual es la galactosa es porque la levadura fermenta dos tercios de la rafinosa, estas cepas son más raras.

En base a los datos morfológicos y fisiológicos que se han obtenido desde el inicio de este estudio, se puede deducir que se trata de una cepa de levaduras que fermenta un tercio de la rafinosa. Sin embargo, este resultado podría parecer poco sólido. Por tal razón y a fin de confirmar directamente el resultado anterior, se procedió a identificar el tipo de azúcar residual, mediante la cromatografía en papel, que se repitió 3 veces a fin de obtener resultados más exactos.

El cromatograma se realizó sobre papel Wattman # 3. La muestra consistió en 1 ml de la solución de rafinosa fermentada, que fué centrifugada a fin de eliminar las levaduras. Como solvente se empleó Isopropanol-Ac. Acético-Agua (3:1:1 vol). La cromatografía tuvo una duración de 3 horas con 50 minutos y una vez terminada, se reveló mediante un rociado con NaOH al 1% en etanol al 60%.

Por otra parte sobre el mismo cromatograma, se empleó una referencia. Lo más preciso debió ser el empleo de una solución de galactosa y otra de melibiosa. Sin embargo no fué posible -

aplicar la melibiosa por carecer de ella. De esta manera, la - conclusión debió ser indirecta.

La fermentación de la rafinosa puede ser total y en ese - caso no hay presencia de azucares residuales, o parcial como - ocurrió en el presente caso. Si es parcial pueden existir como azucares residuales la galactosa si la fermentación de la rafinosa es de 2/3 o la melibiosa si la fermentación de la rafinosa es de 1/3.

El cromatograma mostró como resultado:

Rf de la galactosa	0.420
Rf de la solución problema	0.203

de donde se puede deducir que los azucares residuales no son - galactosa y puesto que no pueden ser sino galactosa o melibiosa, se trata de la melibiosa, lo que equivale a decir que la - cepa en estudio fermenta 1/3 de la rafinosa.

b) Asimilacion de los glúcidos por vía oxidativa. Para determinar la asimilación de los azucares por vía oxidativa se utilizó el método auxonográfico. Se empleó como medio de cultivo gelosa al extracto de levaduras.

Los resultados de la asimilación se dan en el Cuadro 10.

CUADRO10.- RESULTADOS DE LA ASIMILACION DE AZUCARES

AZUCAR	ASIMILACION
GLUCOSA	POSITIVO
SACAROSA	POSITIVO
LACTOSA	NEGATIVO
GALACTOSA	POSITIVO

c) ASIMILACION DEL NITROGENO DE LOS NITRATOS. Para determinar- si es asimilado o no el nitrógeno de los nitratos se utilizó - el método auxonográfico.

Se emplearon discos de papel filtro impregnados de una so lución de sulfato de amonio (testigo) y de nitrato de potasio. El medio utilizado fué un medio mineral purificado exento de - nitrógeno asimilable.

Los resultados sobre la asimilación del nitrógeno de los- nitratos se dan en el Cuadro 11.

CUADRO 11.-RESULTADOS DE LA ASIMILACION DEL NITROGENO DE LOS NITRATOS

SUBSTRATO	ASIMILACION
SULFATO DE AMONIO	POSITIVO
NITRATO DE POTASIO	NEGATIVO

En base a los datos contenidos en el Cuadro 2 y a los resultados obtenidos de los ensayos de fermentación y asimilación de los azucares, así como la no asimilación del nitrógeno de - los nitratos, nos hace ubicar a la cepa de levaduras, continuando con los grupos taxonómicos como sigue:

Especie:CEREVISIAE

d) CONSERVACION DE LA CEPA. Para lograr conservar viable esta- cepa de levaduras se utilizó el mosto de cerveza gelosado in-- clinado en tubo. El repicado se realizará cada 6 meses.

IV.2.CEPA No 2

I.- AISLAMIENTO. Cepa aislada a partir de agua de lavado de - granos de uva variedad GRENACHE procedentes de los viñedos -- del CAEZAC.

Medio utilizado: Papa dextrosa agar (PDA).

II.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

a) DESCRIPCION COLONIAL. Colonias semicirculares con bordes no muy bien definidos y de aproximadamente 2 mm de diámetro, blancas, resecas, opacas y con pliegues.

Examen en estado fresco en agua destilada estéril: células alargadas, ahovadas, ovoides y semicirculares.

Las dimensiones de las células variadas, pero en general median aproximadamente 2-4×4-6 micras, excepto las formas a-- largadas que median de 2-4 × 10-12 micras. La mayoría de las - células experimentaban gemación múltiple.

Aspecto de las colonias a los 21 días de incubación: colonias de aproximadamente 1 cm de diámetro blancas, semirre-- dondas, resecas y plegadas. Se aprecia alrededor un crecimiento ligeramente filamentoso.

b) EXAMEN DEL CULTIVO EN MEDIOS LIQUIDOS.

Medios utilizados : 1.- Mosto de uva esterilizado

2.- Mosto de cerveza esterilizado

1.- Aspecto del mosto de uva a los dos días de incubado a

24°C. Se nota la presencia de una película blanca, reseca, plegada y gruesa. Depósito blanco en el fondo del tubo (escaso).

Aspecto del medio a los 12 días de incubado a 24°C: la película se ha separado del medio y es muy notorio, esto indica desprendimiento gaseoso y por lo tanto fermontación.

Examen en fresco del cultivo en mosto de uva a los 2 días de incubado: células ovaladas, semicirculares y alargadas, de dimensiones ya descritas y con gemación múltiple. Estructuras con forma de hifas cortas (pseudomicelio).

2.- Aspecto del mosto de cerveza incubado durante 2 días a 24°C: presencia de película superficial, gruesa, blanca, delgada . Depósito blanco en el fondo del tubo (escaso).

Examen en estado fresco: células ahovadas, ovaladas, semicirculares y alargadas. De dimensiones ya descritas. Gemación polar y en general gemación múltiple.

Aspecto del mosto de cerveza a los 15 días de incubado a 24°C: se nota la separación de la película de la superficie del medio, esta separación es de aproximadamente 2 mm. Se encuentra aún el depósito blanco en el fondo. La separación de la película significa que ahy un desprendimiento gaseoso y por consiguiente fermentación.

Examen al estado fresco a 15 días de incubado: se encontraron células de morfología, dimensiones y tipo de reproducción ya descritas. Abundante crecimiento pseudomicelial con blastoporas.

c) FACULTAD PARA FORMAR ESPORAS.

Medios utilizados: 1.- Trozo de zanahoria inclinado en tubo

2.- Trozo de papa inclinado en tubo

3.- Bloque de yeso estéril

1.- Trozo de zanahoria inclinado en tubo, incubado a 24°C: En el examen en fresco a los 9,18 y 30 días no se encontraron ascosporas, se observaron estructuras miceliales con blastosporas y clamidosporas. Presencia de formas vegetativas en gemación múltiple.

2.- Trozo de papa inclinado en tubo, incubado a 24°C: en el examen en fresco a los 9,18 y 30 días hay ausencia de ascas, formas vegetativas en gemación. Presenta estructuras miceliales con blastosporas y una que otra clamidospora.

3.- Bloque de yeso sembrado con una gota de mosto de cerveza conteniendo levaduras (a dos días de incubado a 24°C). - Examen en fresco a los 2,5 y 8 días después de incubado:ausencia de ascosporas, presencia de formas vegetativas en gemación y micelio con blastosporas y muy escasas clamidosporas.

d) FACULTAD PARA CONSTITUIR UN MICELIO O PSEUDOMICELIO.

Medio utilizado:Medio P.C.B inclinado en tubo, incubado a 24°C durante 3 a 5 días.

Examen en fresco a los 3 y 6 días:presencia de micelio -- abundante, blastosporas, formas vegetativas en gemación.

Con los resultados obtenidos hasta aquí, como los siguientes:

- Aspectos morfológicos de las colonias a los 2 días de incubadas
- Aspectos morfológicos de las colonias a 21 días después de incubadas
- Caracteristicas morfológicas y de reproducción vegetativa
- Caracteristicas de desarrollo en medios líquidos
- Incapacidad para formar esporas sexuales
- Formación de estructuras miceliales
- Formación de esporas asexuales (Blastosporas principalmente)

y basándonos en los aspectos teóricos mencionados en el Capitulo sobre generalidades de Levaduras podemos ubicar a esta cepa en los siguientes grupos taxonómicos:

Reino:PLANTAE

División:MYCOTA

Subdivisión:EUMYCOTINA

Clase:DEUTEROMYCETES

Orden:MONILIALES

Familia:CRIPTOCOCCACEAE

Subfamilia:CRIPTOCOCCOIDEAE

Género:CANDIDA

III.- CARACTERISTICAS FISIOLOGICAS

Esta cepa de levadura se considera con metabolismo oxida-

tivo dominante. Consideración tomada por la aparición de un inmediato crecimiento superficial. Aún así se observó una débil-fermentación.

a)FERMENTACION DE AZUCARES

Técnica utilizada: Técnica de la campana invertida de Durham.

Azúcares utilizados: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa y maltosa. Todos ellos incubados a 24°C.

La sacarosa fué esterilizada mediante filtro millipore de 0.45 micras.

Los siguientes resultados son a las 48 horas de incubación.

AZUCAR	FERMENTACION
GLUCOSA	POSITIVO
SACAROSA	NEGATIVO
MALTOSA	NEGATIVO
GALACTOSA	NEGATIVO
LACTOSA	NEGATIVO

b) ASIMILACION DE LOS CARBOHIDRATOS POR VIA OXIDATIVA

Técnica utilizada:Técnica auxonográfica

Medio utilizado: gelosa con extracto de levadura

Los resultados se dan en el siguiente cuadro.

AZUCAR	ASIMILACION
GLUCOSA	POSITIVO
SACAROSA	NEGATIVO
MALTOSA	NEGATIVO
GALACTOSA	NEGATIVO
LACTOSA	NEGATIVO

c) ASIMILACION DEL NITROGENO DE LOS NITRATOS

Técnica utilizada:Técnica auxonográfica

Medio utilizado:Medio mineral purificado

SUBSTRATO	ASIMILACION
SULFATO DE AMONIO	POSITIVO
NITRATO DE POTASIO	NEGATIVO

En base a los resultados obtenidos de los ensayos de fermentación y asimilación de azúcares, así como a la prueba de - asimilación del nitrógeno y consultando el Cuadro 3 podemos ubicar por último a esta cepa de levadura en el siguiente grupo taxonómico:

Especie:MYCODERMA

d) CONSERVACION DE LA CEPA

Medio utilizado:Mosto de cerveza gelosado inclinado en tubo. El repicado se hará cada 6 meses.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

El estudio de las levaduras nativas dentro del proceso de elaboración de vinos de alta calidad reviste una doble impor-- tancia.

Por una parte, determinadas cepas nativas de los viñedos- de Zacatecas pueden participar conjuntamente con variedades se lectas de uva para lograr la elaboración de vinos altamente ti pificados.

Los elementos positivos de la variedad de uva como son el equilibrio adecuado de azucares y ácidos, la calidad de los -- compuestos responsables del aroma, el tipo y concentración de- compuestos fenólicos presentes, podrán verse enriquecidos por- la acción de determinadas cepas de levaduras. Cepas que logran un adecuado proceso fermentativo, con la formación de produc-- tos secundarios que perfeccionan el aroma del vino, y que pro- ducen bajas concentraciones de sustancias indeseables como el- ácido acético.

Por otra parte, es importante conocer las levaduras nati- vas ya que esto permitiría detectar las cepas dañinas y contro larlas oportunamente.

Se debe admitir que los fermentos alcohólicos que se en-- cuentran en los mostos dejados fermentar al azar, es siempre - el fermento más vigoroso y resistente, el que al mismo tiempo- será el más alcohológeno, el que condiciona la constitución -- del producto fermentado, y esto, no solo desde un punto de vis ta químico, sino también desde el punto de vista organoléptico.

Sin embargo, no se puede decir siempre, que una levadura seleccionada sea mejor que otra, esto depende de la variedad de uva con que se va a trabajar.

El hecho de disponer de cepas de levaduras aisladas, bien identificadas y caracterizadas, adecuadamente conservadas permitirá su empleo posterior, sea como cepa aislada o como mezcla de cepas, para obtener determinadas características buscadas en los vinos.

Este trabajo hasta donde se dispone de información es de los primeros en cuanto a elaboración de vinos se refiere y representa un esfuerzo por conjugar todos los elementos que deben converger en la calidad y tipicidad.

De las cinco cepas aisladas de la uva, del mosto y del vino dos han sido identificadas y se han presentado en este estudio. Tres cepas más están en proceso de identificación.

La primera de las dos cepas identificadas se encontró en los granos de uva, en el mosto al inicio y al final de la fermentación. Lo más importante de esta cepa en cuanto a su metabolismo se refiere, es su elevado poder alcohologénico.

Los cinco azúcares experimentados: glucosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa (1/3) fueron fermentados muy activamente.

Debe señalarse la importancia de trabajar con una serie de medios de cultivo para evidenciar características morfológicas y fisiológicas. De esta manera, el mosto de cerveza resultó más efectivo que el mosto de uva.

En lo que se refiere a formación de ascosporas, el medio

en bloque de yeso pone de manifiesto una mezcla más homogénea- de ascas con esporas, todo esto sin dejar de ver los medios -- constituidos por vegetales también dan buenos resultados.

Basados en los aspectos teóricos y apoyados con los si- - guientes resultados: capacidad fermentativa, forma ovoide, crecimiento superficial tardío y escaso, incapacidad de asimilar- nitratos y las pruebas bioquímicas nos hacen concluir que esta cepa de levadura aislada del vino es SACCHAROMYCES cerevisiae- variedad ellipsoideus. Cabe aquí aclarar que se considera como variedad ellipsoideus, no por haber realizado pruebas para su- determinación, sino, basados en las referencias que indican -- que la única diferencia entre SACCHAROMYCES cerevisiae y SACCHAROMYCES cerevisiae var. ellipsoideus es su morfología.

De manera similar se logró la identificación de otra cepa de levadura, considerada patógena para los vinos, y esta es -- CANDIDA mycoderma.

Los resultados logrados hasta aquí, se pueden considerar- como los más importantes en cuanto a vinos se refiere, por un- lado una cepa nativa con cualidades para considerarse como levadura selecta para elaboración de vinos. La otra cepa también de interés enológico debido a su frecuente aparición en la superficie de los vinos como contaminante.

Se conservarán las cepas y se tratará de darles utilidad, ya sea, aplicándolas una para elaborar vinos y la otra como referencia para continuar con los estudios de identificación.

La realización de este trabajo encontró dificultades de -

diversa índole que van desde la carencia de literatura especia lizada hasta la de recursos económicos suficientes.

Sin embargo se puede considerar como elemento positivo el hecho de haber iniciado este tipo de estudios.

Este trabajo no ha concluido. Ha abierto una gama de in-- quietudes y de preguntas que requieren respuestas. Es necesa-- rio terminar la identificación de las otras tres cepas. Es pre ciso caracterizar más a fondo las cepas que han sido identifi- cadas sobre todo en lo que se refiere a la producción de pro-- ductos secundarios.

Debe pensarse en la necesidad de extender este estudio a- las levaduras nativas del CAEZAC al viñedo zacatecano y avan-- zar así en el camino de la micro-regionalización, que busca de terminar las zonas de mayor posibilidad enológica.

Se considera que con este avance se logrará elaborar poco a poco vinos más selectos, por una parte teniendo levaduras na tivas seleccionadas para vinificar y por otro conociendo las - levaduras de mayor contaminación en el lugar y así poder con-- trolarlas.

Ojalá este estudio haya despertado interés por estos mi-- croorganismos que participan como protagonistas principales de la gran industria vinícola y que frecuentemente ignoramos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.- ALEXOPOULOS CONSTANTINE JOHN. Introducción a la Micología.Buenos Aires.Editorial McGraw Hill.1977

2.- AMERINE MAYNARD A. AND VERNON L. SINGLETON. Wine.USA.University of California.1976

3.- AMERINE M.A AND C.S OUGH. Análisis de Vinos y Mostos.España. - Editorial Acribia.1976

4.- BURROWS WILLIAM. Tratado de Microbiología.México.Interamericana.1974

5.- CARBONELL MATEO RAZQUIN. Tratado de Vinicultura.Barcelona.Editorial AEDOS.1970

6.- CARPENTER L.P. Microbiología.México.Editorial Interamericana.- 1969

7.- C.H JAULMES,A.JUDE,J.QUERANGAL DES ESSARTS Y J.DELGA.Práctica- de Laboratorio.Barcelona España.1968

8.- CIBA-GEIGY.Tablas Científicas.Bailea Suiza.Publicada por CIBA-GEIGY SA.1971

9.- CONN E. ERIC AND STUMPF P.K. Bioquímica Fundamental.México. Editorial Limusa-Wiley.1967

10.-DIAZ CERVANTES MANUEL I. Elaboración casera de Vinos de Mesa - Blancos y Tintos.Zacatecas México.SARH/INIA.1982

11.-GIRARD AND ROUGIEUX R. Técnicas de Microbiología Agrícola.España.Editorial Acribia.1964

12.-HUPPERT,HARPER GLORIA,JUNG H. SU AND V.DELANEROLLE. Rapid Methods for Identification of Yeasts.USA.Journal of Clinical Microbiology Vol.2.1975

13.-JAWETZ ERNEST. Microbiología Médica.México.Editorial El Manual Moderno.1975

14.-LAGUNA JOSE.Bioquímica.México.Editorial La Prensa Medica Mexicana.1975

15.-LEHNINGER L.ALBERT. Bioquímica.España.Editorial Omega.1979

16.-MARCILLA ARRAZOLA JUAN. Tratado Práctico de Viticultura y Enología Española Tomo II.Madrid.Editorial SAETA.1974

17.-MARECA CORTES ILDEFONSO. Enología.España.Editorial Alhambra.-1973

18.-MOORE S. GARY AND DOUGLAS M. JACIOW. Micology for the Clinical Laboratory.USA.1979

19.-NEGRE E. AND FRANCOT P. Vinificación y Conservación de los Vinos.España.Editorial Montoso.1962

20.-PELCZAR,REID AND CHAN. Microbiology.USA.Editorial McGraw Hill-Book Co.1977

21.-PLUMMER T. DAVID. Bioquímica Práctica.Colombia.Editorial McGRAW Hill Book Co.1981

22.-PRESCOTT S.C AND DUNN C.G. Microbiología Industrial.España 1962

23.-RHODES ALAN AND FLETCHER L. DEREK. Principios de Microbiología Industrial.España.Editorial Acribia.1969

24.-RIBEREAU GAYON et al. Sciences et Techniques du vin Tomo II. Paris.Editorial DUNOD.1975

25.-ROSE H. ANTONY AND HARRISON U.S. The Yeast.Volume 3.London - and New York. Yeast Technology AcademicPress.1970

26.-SENEZ C. JACQUES. Microbiología General.España.Editorial Alhambra.1976

27.-SHARTON D.A AND GOULD G.W. Isolation Methods for Microbiologists.USA.1979

28.-WINKLER A.J. Viticultura.México.Editorial C.E.C.S.A.1976