
INFLUENCIA DE LA SELECCION DE LEVADURAS EN VINIFICACION

A. SANCHEZ-MARROQUIN, E. MEDELLIN y
C. ALVAREZ

Laboratorio de Microbiología Experimental. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
I. P. N., México, D. F.

La industria vinícola mexicana ha alcanzado ya un magnífico desarrollo, pues la producción en la zona de Baja California, solamente, oscila alrededor de 4 millones de litro por año y creemos que cualquier intento que se haga para estudiar los problemas con ella relacionados adquiere cierto interés, ya que de esa manera se contribuye al adelanto técnico que la referida industria comienza a tener en nuestro tiempo.

El presente trabajo pretende ocuparse del estudio de las levaduras que predominan en las heces de algunos vinos de la región de Saltillo y de su utilización, al estado de pureza, en la elaboración de vinos con una sola y con varias especies asociadas. Actualmente, la mayor parte de las fábricas de vino de nuestro país no emplea levaduras seleccionadas para la obtención de vinos de mesa de calidad, a excepción de los vinos espumosos que por su elaboración requieren cultivos puros de levaduras.

El buen éxito de las industrias de fermentación que utilizan levaduras depende desde luego de un número de factores relacionados con su actividad. (Bilford et al., 1942), entre los cuales pueden citarse: pH, temperatura, concentración de los azúcares fermentescibles, supresión de microorganismos indeseables, selección de las cepas o "razas" de levaduras, adición de sustancias nutritivas complementarias, etc.

En la mayoría de las industrias, principalmente las pequeñas, la fermentación se efectúa en forma natural o espontánea, pero en este caso las levaduras autóctonas interfieren durante la vinificación causando cambios indeseables o una tendencia a "enfermar". Sin embargo, existen levaduras autóctonas que pueden ocasionar cambios deseables que mejorarían el producto considerablemente. Por esta razón, en la actualidad, se tiende a emplear mezclas seleccionadas de cepas "puras" de levaduras afines, debidamente controladas, para asegurar la formación de mayor cantidad de ésteres y mejorar con ello el "bouquet" desarrollado durante la segunda fermentación, así como algunas otras características que contribuyen a la mejor calidad del producto.

En la presente comunicación se comparan, asimismo, los resultados obtenidos respecto a la obtención de vinos con una sola especie de levadura y con una mezcla de tres levaduras afines, previamente seleccionadas de acuerdo con sus principales características bioquímicas.

MATERIALES Y METODOS

Levaduras. Para el aislamiento y estudio de las levaduras se emplearon los siguientes medios: mosto simple; mosto preparado con jugos de uva americano (Welch's) y nacional (Ju-fruta); mosto de cerveza al 50% (tipo Lager, d 20/20 = 1.05933), con y sin lúpulo y otros medios similares. Con estos medios líquidos se prepararon también medios sólidos mediante la adición de agar al 2.5% o gelatina al 20%.

Los 35 cultivos obtenidos se purificaron según la técnica de Lindner. Una vez que se obtuvieron cultivos de origen monocelular se procedió a estudiar las características morfológicas y propiedades bioquímicas. La esporulación se investigó en los diversos medios recomendados para el objeto y la utilización de alcohol en el medio de Lodder, según Guilliermond-Tanner (1920). Para el estudio de la fermentación de la rafinosa, en particular, se siguió el método de Skinner y Bouthilet (1947). La clasificación de las levaduras se efectuó mediante la clave de Stelling-Dekker (1931) y el resumen que sobre la clasificación de la familia *Torulopsidaceae* de Lodder, viene en la monografía de Henrici (1941).

Una vez separadas en grupos y estudiadas taxonómicamente, se seleccionaron 4 de aquellas levaduras que por su crecimiento y propiedades bioquímicas se consideraron provisionalmente como más activas y se investigó el óptimo respecto al pH, temperatura y concentración del substrato. Este último estudio se efectuó mediante la estimación del CO₂ desprendido, haciendo observaciones cada 12 horas. La velocidad de fermentación se apreció

controlando las variaciones del sustrato, el alcohol producido y las fluctuaciones de la acidez, en el siguiente medio azúcar invertido 24.95 g.; sulfato de amonio 0.5 g.; sulfato de magnesio 0.24 g.; fosfato dipotásico 0.25 g.; peptona 1.0 g. y agua c. b. p. 100 ml.

TABLA N° I
CARACTERES BIOQUIMICOS DE LAS LEVADURAS ESTUDIADAS

CEPAS	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES (Método Auxanográfico)						ASIMILACION DE:					
	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	NITROGENO				CAR	
													Peptona	Asparra	Urea	Nitros	Sulfato de amonio	Alcohol
L-1	+	+	+	+	-	1/3	+	+	+	-	-	±	+	+	-	-	-	-
L-2	+	+	+	+	-	1/3	+	+	±	±	-	-	+	+	-	-	-	-
L-3	+	-	±	+	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
L-4	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Para iniciar la fermentación normal se preparó un "pie de cuba" adecuado y antes de añadirle el volumen total de mosto (1,225 ml., más 225 ml. de pie de levadura) se le determinó el contenido de azúcares remanentes, el porcentaje de alcohol y la acidez total y volátil, siguiéndose para ello los métodos de la A. O. A. C. (1945). Las cantidades de alcohol y acidez encontradas se restaron de los valores obtenidos en las pruebas parciales de las alícuotas tomadas cada cuatro horas durante los 7 días de fermentación. De estos valores se dedujo la velocidad de fermentación de cada cepa.

Fermentación. Una vez establecidos los óptimos para las cepas más activas se procedió a efectuar una fermentación en mayor escala empleando en un caso (vino I), una sola especie de levadura seleccionada y en otro (vino II), una mezcla de tres especies diferentes de levaduras seleccionadas. Para la elaboración del vino se usó mosto de uva de la variedad Tokay y se siguió, en términos generales, el proceso que comúnmente se emplea en la industria (Pacottet, 1920; Cruess, 1934, 1942 y 1943; Amerine, 1940; Salinas, 1943; Norris, 1945; Sannino, 1948), comprendiendo las siguientes fases: preparación del mosto; adición de SO₂; corrección de los mostos mediante el control de los azúcares presentes y la acidez total; preparación del "pie de cuba"; aeración durante la fermentación, según el método de Traube; primera fermentación; descubre de las tinajas; segunda fermentación; trasiego, clarificación y filtración y por último, añejamiento y pasteurización.

La segunda fermentación se efectuó en barricas cerradas de 20 litros conservando el vino durante un mes a temperatura ambiente.

El estudio de los clarificantes se practicó añadiendo previamente 1% de tanino q. p. al vino y observando las pruebas de fotocolorímetro Evelyn. Como clarificantes se emplearon: albúmina de huevo mezclada con sal común (10 g. por cada 4 g. de albúmina seca) en dosis media de 8 g./hect. bentonita 25 g./hect.; caseína (12 g. hectl.), y pectinol añadido antes de la fermentación en proporción de 4.8 g. por litro.

El añejamiento se efectuó por el proceso natural de la acción solar (González, 1939; Tuneu, 1941).

Los vinos obtenidos se pasteurizaron a 60-65° C. durante 30 minutos.

Análisis. La determinación de los caracteres físicos, incluyendo el peso específico, aspecto, color, etc., se efectuó siguiendo los métodos de la A. O. A. C. (1945). Las estimaciones de alcohol, extracto, glicerol, cenizas alcalinidad de las cenizas, ácido tartárico total, bitartrato de potasio, ácido tartárico libre, sulfatos, acidez total, acidez volátil, acidez fija, tanino materia colorante, SO₂ total y SO₂, libre, se practicaron según métodos de la misma A. O. A. C. (1945). La determinación de azúcares se efectuó mediante el método de Lane-Eyon citado por Browne y Zerban, (1941). La cuantificación de cloruros se realizó por el método de Mohr, citado por Kolthof, (1943). Por último, el ácido fosfórico se valoró según los métodos consignados por Browne y Zerban (1941) y Scott (1944).

En el vino II (obtenido con mezcla de las levaduras L-1, L-3, y L-4) se determinaron además las impurezas en el

destilado por los métodos de la A. O. A. C. Los alcoholes superiores se estimaron según el método de Rocques.

RESULTADOS

De las heces de vinos blanco y tinto procedentes de la Compañía Vinícola de Saltillo, S. A., se aislaron 35 cepas de levadura que quedaron finalmente reducidas a cuatro grupos representativos, que se designaron arbitrariamente como L-1, L-2, L-3 y L-4 y que por el estudio taxonómico correspondieron a las especies *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (L-1 y L-2), *Sacch. pasteurianus* (L-3) y *Sacch. fragilis* (L-4). Sus principales características bioquímicas se dan en la Tabla I.

Se encontró, asimismo, un grupo de levaduras anascosporadas, no productoras de carotenoides, que clasificamos dentro del género *Torulopsis*, pero que no se estudiaron en el presente trabajo.

Los óptimos para el crecimiento de las tres especies señaladas fueron los siguientes: pH 4.5-5.0, temperatura 28-30° C.

La influencia de la concentración del substrato, estimada por el desprendimiento de CO₂ se muestra en las gráficas 1, 2, 3, y 4, de cuya observación puede estimarse que las cepas L-1, L-2 y L-3 dieron una mayor cantidad de CO₂.

Los resultados del control de la velocidad de la fermentación, según las variaciones del azúcar consumido, alcohol producido, acidez volátil, acidez fija y acidez total, se muestran en las gráficas 5, 6, 7 y 8 y como puede verse, los máximos resultados correspondieron a las cepas L-1, L-2 v L-4. Para construir estas gráficas se tomó para las variaciones del azúcar consumido, la mitad del valor encontrado; la acidez volátil se multiplico, por 300 y en el caso de la acidez total, por 100, con objeto de hacer más perceptibles sus variaciones.

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos respecto a la selección de clarificantes. El mejor resultado correspondió a la mezcla de albúmina de huevo y bentonita.

TABLA No. II

DATOS RESPECTO A LA SELECCIÓN DE CLARIFICANTES

CLARIFICANTES EMPLEADOS	DOSIS UTILIZADAS (g. por hectolitro)	pH DEL MEDIO	LECTURA DEL GALVANOMETRO % TRANSMITANCIA	DENSIDAD OPTICA L-2-log. Gx10
ALBUMINIA DE HUEVO Y BENTONITA	8 25	3.6	100	0.00
BENTONITA Y PECTINOL	25 480	3.9	98.25	0.077
BENTONITA	25	3.6	96.50	0.155
ALBUMINA DE HUEVO	8	3.7	96.25	0.144
PECTINOL	480	3.8	92.75	0.324
CASEINA	12	3.7	79.25	1.010

Lecturas a 19° C. en todos los casos, empleando fotocolorímetro Evelyn.

TABLA N° III

CARACTERES FISICOS DE LOS VINOS ESTUDIADOS COMPARADOS CON DOS VINOS SIMILARES

CARACTERES FISICOS	VINO I (Una sola levadura)	VINO DE SALTILLO	VINO ESPAÑOL	VINO II (Mezcla de 3 levaduras)
--------------------	----------------------------	------------------	--------------	---------------------------------

Aspecto	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Color	Amarillo-rojizo	Amarillo-oro	Amarillo-pálido	Amarillo
Olor	SO ₂ ligeramente	Vinoso	SO ₂ ligeramente	Vinoso
Sabor	Semiseco	Semiseco	Seco	Seco
Tipo	Quieto	Quieto	Quieto	Quieto

Los caracteres físicos de los vinos obtenidos de la fermentación de mosto de uva con una levadura seleccionada (Cepa L-1 de *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*) y con mezclas de levaduras (Cepas L-1 de *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, L-3 de *Sacch. pasteurianus* y L-4 de *Sacch. fragilis*), se consignan en la Tabla III, en tanto que los resultados de los análisis químicos de estos mismos vinos se dan en la Tabla IV.

Por último, en la Tabla V están los datos obtenidos de la determinación de impurezas en el destilado del vino II o sea el preparado con mezclas de tres levaduras.

Todos los análisis se refieren a determinaciones efectuadas después de cinco meses de haber terminado la primera fermentación.

DISCUSION

Al utilizar una sola levadura para la elaboración del vino se obtuvo un rápido rendimiento alcohólico en la fermentación del mosto, lo que representa una ventaja, ya que se acorta el tiempo de la segunda fermentación, así como el de clarificación y añejamiento del vino. Sin embargo, al emplear mezclas de tres levaduras los resultados alcanzados fueron comparativamente mejores.

Si se utiliza una sola levadura, sólo es posible exigir una fermentación regular y completa, una clarificación rápida y la producción del aroma característico según la levadura empleada. Si, por el contrario, se emplean mezclas de levaduras, se obtendrán algunas mejoras respecto a algunos de los productos que determinan la buena calidad.

Comparando los caracteres de estos vinos con otros similares de reconocida buena calidad, se pudo notar que presentan más o menos los mismos caracteres físicos y que sólo difieren en algunos aspectos de la composición química, siendo en lo general buenos, pero el vino II resulta más robusto.

Con el empleo de las mezclas de levaduras (vino II) se pudieron apreciar las siguientes características: a) se obtuvo mayor desdoblamiento o consumo del azúcar y por lo tanto, un vino de mayor grado alcohólico, con un aumento de 2.18% en volumen respecto al vino I; b) el vino II presentó una acidez volátil baja, lo que indica la no participación de otras levaduras diferentes a las de la mezcla empleada, así como que el vino está sano, ya que una acidez volátil alta es un factor negativo en la conservación de los vinos y c) la cantidad de anhídrido fosfórico en el vino II fue mayor que en el vino I preparado con una sola levadura. No obstante las ventajas del uso de mezclas de levaduras, éstas no deben emplearse arbitrariamente, sino después de haberse seleccionado de acuerdo con sus características bioquímicas generales, para obtener un valor estimativo más justo respecto a su actividad fermentativa y ensayar luego mezclas de ellas en los diferentes mostos, hasta lograr una asociación de aptitudes afines, para su adaptación tanto al mosto como a los diversos factores que afectan el proceso de la vinificación. Esto permite obtener altos rendimientos alcohólicos y características físicas y químicas deseables durante la primera fermentación, quedando un porcentaje baja de azúcares remanentes, que durante la segunda fermentación se transforman en un tiempo menor.

TABLA N°IV

RESULTADO DE LOS ANALISIS DEL VINO OBTENIDO CON UNA LEVADURA SELECCIONADA, VINOS SIMILARES Y VINO OBTENIDO CON UNA MEZCLA DE LEVADURAS SELECCIONADAS.

Determinaciones	Vino I (una levadura selec.)	Vino de Saltillo	Vino Español	Vino II (Mezcla de levadura)
-----------------	------------------------------	------------------	--------------	------------------------------

Peso específico 20/20	1.0128	1.0097	1.0020	1.0024
Alcohol en vol. 20/20	12.12	15.54	11.53	14.30
Alcohol en peso 20/20	9.72	12.54	9.29	9.72
Extracto: (g/100)				
a) real	4.30	4.35	2.79	3.0
b) aparente	5.80	5.54	3.18	4.45
pH	3.75	3.85	4.25	3.82
Glicerol g/lt.	6.80	6.30	6.53	6.78
Cenizas g/lt.	2.29	2.90	1.58	3.08
Bitartrato de potasio g/lt.	1.54	1.93	2.58	1.60
Acido tartárico libre g/lt.	1.09	0.82	1.17	1.75
Acidez total (ac. Tartárico g/lt.)	5.50	8.60	6.42	5.0
Acidez volátil (ac. Acético) g/lt.	1.38	3.25	0.80	0.36
Acidez fija (ac. Tartárico) g/lt.	3.72	4.81	0.43	2.09
Reductores directos (glucosa) g/lt.	21.22	38.00	18.55	14.5
Reductores totales (Sacarosa) g/lt.	—	—	—	0.80
Sulfatos g/lt.	Huellas	—	—	1.52
Cloruros g/lt.	Huellas	—	—	Huellas
Tanino y materia colorante g/lt.	0.68	0.84	0.59	0.50
SO ₂ total g/lt.	0.29	0.01	0.37	0.28
Fosfatos (P ₂ O ₅) g/lt	0.18	0.25	0.09	0.32

TABLA N° V

DETERMINACION DE IMPUREZAS EN EL DESTILADO DEL VINO II

Grado alcohólico del destilado.....	13.16% en volumen
Acidez en mg. Acido acético/100 ml. De alcohol anhidro.....	127.0 mg.
Esteres, en mg. Acetato de etilo/100 ml. De alcohol anhidro...	120.0 mg.
Furfural en mg./100 ml. De alcohol anhidro.....	0.37 mg.
Alcoholes superiores.....	Prueba negativa
Aldehidos, en mg. Acetaldehido/100 ml. De alcohol anhidro...	128.0 mg.
Total de impurezas en alcohol anhidro.....	375.37 mg.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.- Se presenta un estudio de algunas levaduras aisladas de heces de vinos tinto y blanco de la región de Saltillo, seleccionando aquellas cuya actividad resultó óptima frente a los factores principales que intervienen en una fermentación: pH, temperatura, concentración de substratos y velocidad de fermentación.
2. - Con una levadura seleccionada (cepa L-1 de *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*) se preparó un vino blanco (vino I) cuyas características físicas y composición química se compararon con otro (vino II) obtenido con mezclas de tres levaduras (L-1, L-3 y L-4), así como con dos vinos similares de reconocida buena calidad.
3. - Las diferencias primordiales encontradas respecto a la composición y calidad del vino II comparado con el

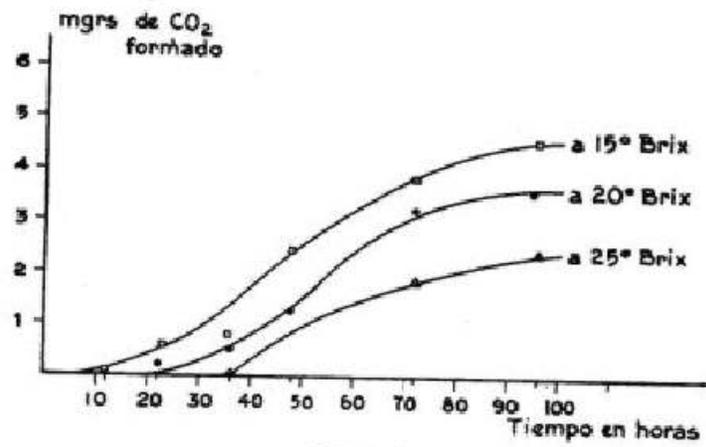
vino I fueron las siguientes: a) aumento en el grado alcohólico hasta en un 2.18% en volumen; b) baja acidez volátil y C) mayor proporción de anhídrido fosfórico.

4. - Se concluye que el empleo de la mezcla de levaduras, en las condiciones estudiadas, influyó favorablemente en la calidad del Vino obtenido.

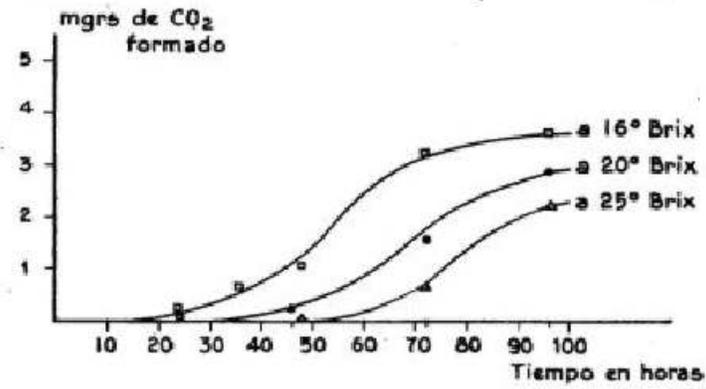
Agradecemos al Sr. Ing. Juan Manuel Noriega Jr., algunas valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- A. O. A. C. 1945. Official and Tentative Methods of Analysis, 6^a. Ed. Washington. D. C.
- AMERINE, M. A. y M. A. Joslyn. 1940 Commercial Production of Table Wine. California Agr. Exp. Sta. Bull. 639.
- BROWNE. C. A., y F. W. Zerban. 1941. Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis, 3a. Ed. John Wiley and Sons. Inc. Nueva York.
- BILFORD, H. R.. R. E. SCALF, W. H. STARK y P. J. KOLACHOW. 1942 Alcoholic fermentation of molasses. Ind. Eng. Chem. (Ind. Ed.) 34: 1406.
- CRUESS, W. V. 1942 Research in Enology. Proc. Inst. Food Technol, p. p. 152-161.
- 1943 The role of microorganisms and enzymes in wine making. *Adv. in Enzym.* 3: 349 - 386.
- 1934 *The Principles and Practice of Wine Making*. The Avi Publishing Co. Nueva York.
- GUILLIERMOND, A., y F. W. Tanner, 1920 *The yeasts*. John Wiley and Sons. Nueva York
- GONZALEZ TORINO, H., y R. TUNEU. 1939 Envejecimiento de vinos bajo la influencia de la acción solar. Rev. Fac. Agr. (Univ. de Montevideo) . No 18:18.
- HENRICI, A.T. 1941 The yeasts. Genetics, Cytology, Variation Classification and Identification. Bact. Rev., 5: 97-179.
- KOLTHOF, I. M., y E. B. Sandell. 1943 Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. The Macmillan Company, Nueva York.
- NORRIS, S. R 1945 The Chemical Industrial Process. Mc. Graw-Hill Book Co. Inc. Nueva York.
- PACOTTET, J 1920 Vinificación, 2a. Edición, Salvat Editores. Barcelona.
- SANNINO, F. A. 1948 Tratado de Enología. Versión Española de la 2a. Edición Italiana. Gustavo Gil, Ed. Buenos Aires.
- SKINNER, C.E., y R. BOUTHILET. 1947 Melibiose-broth for classifying yeast. Jour. Bact. 53 (1): 37-43.
- SALINAS IRANZO, J. 1943 Enología. Ed. Consejo de Cultura Superior. Univ. de Nuevo León, Monterrey, N. L. (México).
- SCOTT, W. W. 1944 Standard Methods of Chemical Analysis, Tomo II. N. H. Furman, Editor. Nueva York.
- STTELLING-DEKKER, N. M. 1931 Die Hefesammyung des Central bureau voor Schimmel-cultures, I Teil. Die Sporogenen Hefen. Amsterdam.
- TUNEU, R. 1941 Envejecimiento de vinos bajo la influencia de la acción solar Rev. Fac. Agr. (Univ. de Montevideo) No. 24: 49.

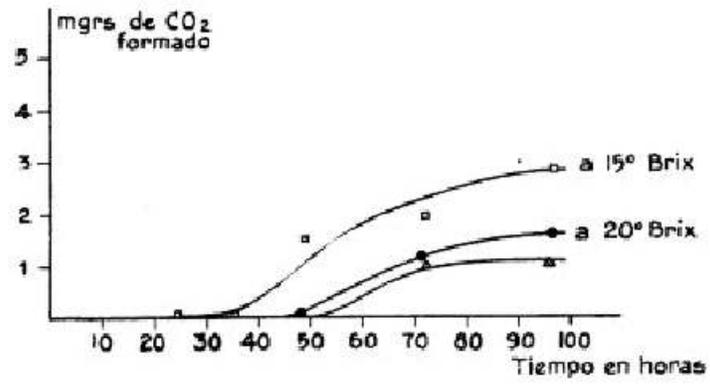


GRAFICA 1.

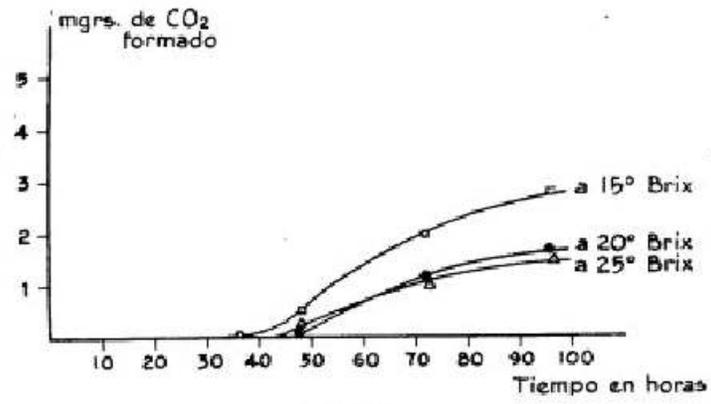


GRAFICA 2.

Gráficas 1 y 2, indicando el CO₂ desprendido por las cepas L-1 y L-2 respectivamente, a diferentes concentraciones de azúcar invertido.

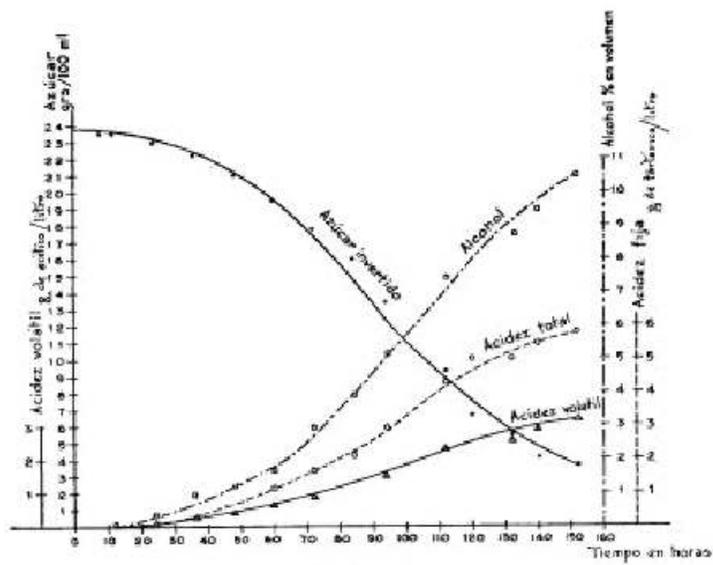


GRAFICA 3.

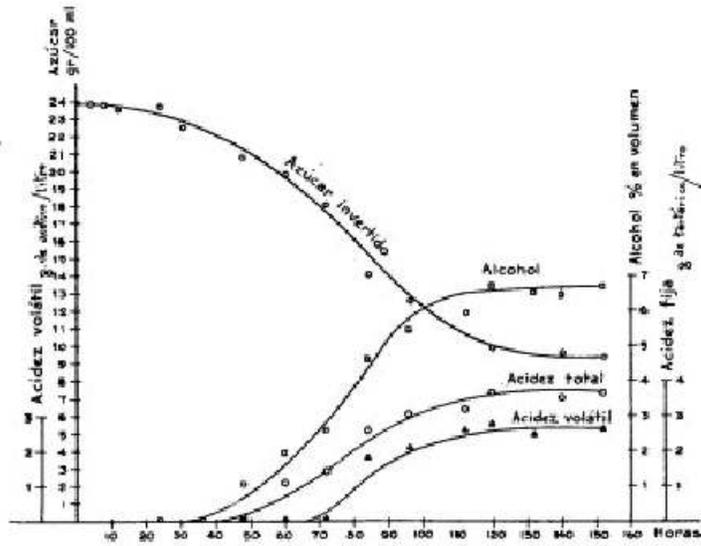


GRAFICA 4.

Gráficas 3 y 4. CO₂ desprendido por las cepas L-3 y L-4 respectivamente.

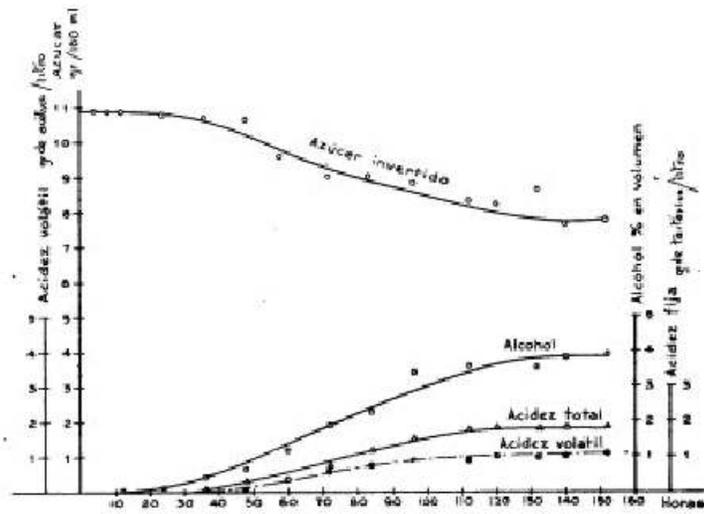


GRAFICA 5.

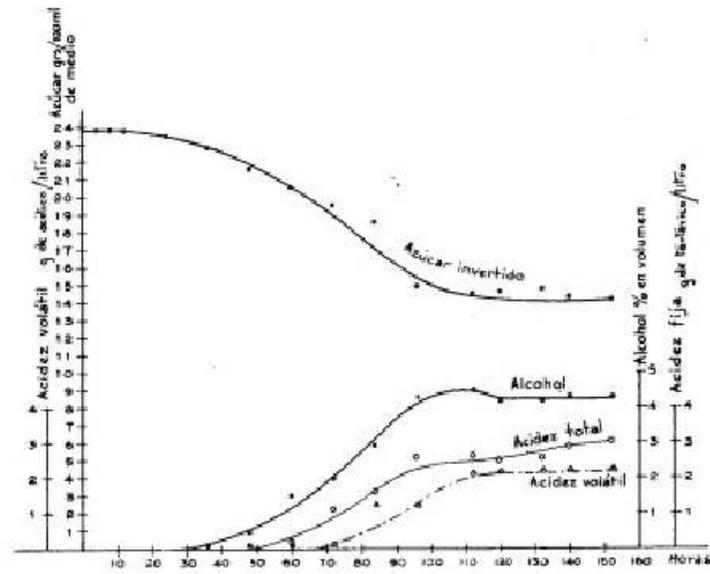


GRAFICA 6.

Gráficas 5 y 6. Velocidades de fermentaciones de las cepas L-1 y L-2 respectivamente.



GRAFICA 7.



GRAFICA 8.

Gráficas 7 y 8. Velocidades de fermentación de las cepas L-3 y L-4 respectivamente.