

ZIMOSIS EN VINOS

POR MARIA J. A. RIGONE DE PRITZ¹ Y ARMANDO LLOP²

SUMMARY

We have isolated one sporulate yeast strain that produce a thick pellicle on the top of a disease wine.
It has been made the taxonomyc study in pure culture and it was analysed it's probable systematic position. It has been reproduced the disease in a lot of wines.

The analitic results reveal that the alcohol is kept without harmful but the total acidity is considerably reduced by the yeast effect.

En nuestro medio la formación de películas en vinos se debe en especial a bacterias del gen. *Acetobacter* y a levaduras de la especie *Candida mycoderma*.

Hemos estudiado una especie que forma película en dicho medio y provocado experimentalmente ese fenómeno en distintos tipos de vinos.

Iniciamos el trabajo aislando en cultivo puro la levadura que formaba una película seca, grisácea, rugosa con múltiples plegamientos y consistente en la superficie de un vino tinto.

Las características de la película, la circunstancia de que al caer no se regeneraba, que la levadura aislada resultó capaz de esporular (1 a 4 esporos) aunque en pequeña proporción, nos inclinó a considerar que estaríamos en presencia de una especie del género *Pichia*, dado que simultáneamente hicimos los respectivos auxonogramas de nitrógeno que nos hicieron descartar al género *Hansenula*.

No obstante, la forma y tamaño de las células, los hábitos vegetativos, (brotación intermedia, múltiple y predominio de haploidía), la no formación de película tipo "Kahmhaut" en mosto de malta y finalmente la falta de filamentización en los clásicos microcultivos en agar papa, nos llevaron a analizar la posibilidad de un *Debaryomyces*. Si bien la cepa aislada posee numerosos caracteres propios de este género: forma, tamaño, brotes multipolares, predominio de haploidía, película en vinos, etc., los caracteres fermen-

¹ Profesora adjunta a cargo de la Cátedra (2) Ayudante de Laboratorio. Trabajo realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias.

tativos y la no filamentización ya señalada en mosto de malta, la apartan demasiado del *Debaryomyces* descrito para el vino que es, precisamente, una especie de transición entre el género *Debaryomyces* y *Pichia*. Quedaba en consecuencia la posibilidad de un *Saccharomyces* dado que los brotes multipolares y otros caracteres hacen difícil entrar a considerar su posible inclusión en *Hanseniaspora*.

Las dificultades anunciadas nos hacen dejar postergada la exacta ubicación de esta especie para lo cual hemos realizado las consultas de rigor con centros del exterior. Pero es de interés dar a conocer los resultados preliminares que incluyen el estudio en cultivo puro y la reproducción de la enfermedad en vinos del comercio, de distinto tipo: tinto, rosado y blanco de diferente graduación alcohólica (entre 11.0° y 13.6°).

En consecuencia describimos en primer lugar el estudio de la levadura en cultivo puro y luego su comportamiento en distintos tipos de vinos.

I. ESTUDIO EN CULTIVO PURO

1. *Desarrollo en mosto de malta, a 25°C.*

Fermentación a las 24 hs. Formación de anillo y sedimento a los 3 días. A la semana, isletas. Al mes, anillo e isletas, adherencia a las paredes; células redondas y ovales con brotes multipolares aisladas (3.5 - 5.5 × 3.5 - 6.9), en pares o en cortas cadenas de 4 células.

2. *Agar de mosto de malta.*

Células redondas y ovales aisladas y de a pares. Predominan las ovales (3.9 - 6.3 × 3.9 - 7.5).

3. *Agar agua de levadura autolizada.*

Muy similar a 2.

4. *Micro cultivo en agar-papa.*

No se observa pseudomicelio, ni células alargadas. Cadenas cortas de 4 ó 6 células redondeadas. A veces pequeños racimos de 8 a 12 células.

5. *Esporulación.*

Se usaron las siguientes técnicas:

a) bloques de yeso humedecidos con agua.

b) bloques de yeso en solución buffer (fosfato bi y monopotásico) pH 6.5.

- c) medio de FOWELL: agar-acetato de sodio al 0,5 %.
- d) bloques de papa.
- e) bloques de zanahoria.
- f) agar de GORODKOWA.
- g) agar de papa glucosado al 2 %.

El mejor resultó ser el agar de papa glucosado, le siguió el medio de Fowell y el agar-papa según J. LODDER.

Los porcentajes fueron siempre reducidos y fue necesario prolongar las observaciones hasta el mes. Además la capacidad de esporular se pierde en gran parte con el cultivo repetido. Se hicieron reislamientos a partir de vinos artificialmente infectados y, en esa forma, se mantuvo la capacidad de esporular.

Los esporos son redondos, a veces algo angulares, ligeramente rugosos, con algunas puntuaciones. Se observaron 2 ó 4 esporas en el interior del asco. La conjugación puede o no preceder la formación del mismo.

Las fotografías se obtuvieron después de colorear según el método de WIRTZ modificado por CONKLIN.

6. Fermentación.

Las pruebas se efectuaron en tubos con campanita con el medio básico de DURHAM. Los azúcares estériles se agregaron para dar una concentración del 2 %. Las observaciones se hicieron entre 24 horas y una semana.

Resultados:

Glucosa.....	+
Galactosa.....	-
Sacarosa.....	+
Maltosa.....	+
Rafinosa.....	+
Melibiosa.....	-
Lactosa.....	-

7. Asimilación de azúcares.

Se usaron los siguientes medios:

- a) "test" auxonográfico clásico.
- b) medio líquido según J. LODDER.

En el primer caso, es decir, en medio sólido según la técnica clásica de los "test" auxonográficos, no se obtuvo resultado satisfactorio.

Pero si se obtuvieron diferencias netas entre testigo y fuentes de carbono ensayadas mediante el uso de medios líquidos.

La determinación arrojó los siguientes resultados:

Glucosa.....	+
Galactosa.....	+
Sacarosa.....	+
Maltosa.....	+
Rafinosa.....	+
Melibiosa.....	-
Lactosa.....	-

En consecuencia la diferencia con la fermentación reside en la oxidación de la Galactosa que no es fermentada.

8. Asimilación de nitratos.

Negativo.

II. COMPORTAMIENTO EN MOSTO Y DISTINTOS TIPOS DE VINO

El mosto de uva es fermentado a las pocas horas de inoculado. La fermentación principal dura aproximadamente 3 días. A los 5 días forma anillo. Desde los 8 días, anillo e isletas. A los 30 días sedimento abundante y anillo reducido.

El vino original poseía los siguientes caracteres:

Alcohol.....	13.40 G. L.
Acidez total.....	6.10 gr p/l en ácido tartárico

de acuerdo a lo suministrado por la firma de esta plaza que proporcionó el vino enfermo, siendo éstos los únicos datos analíticos disponibles.

Después del ataque los análisis arrojaron los siguientes datos:

Acidez total.....	1.91 gr p/l en ácido tartárico
Acidez volátil.....	0.66 gr p/l en ácido acético
Azúcares.....	vestigios
Anhidrido sulfuroso...	16.64 mgr p/l
Extracto seco.....	21.42 gr p/l
Alcohol a 15°C.....	13.40 G. L.
Acido tartárico.....	0.3 gr p/l

Hay que hacer notar el cambio total que experimenta el vino desde el punto de vista organoléptico: después del ataque un gusto extraño e indefinible que lo transforma en completamente inepto como bebida. Después que la película cae el vino presenta sedimento, partículas en suspensión y adheridas a las paredes del recipiente.

Vinos infectados artificialmente:

Se infectaron artificialmente partiendo de un cultivo puro, siete tipos de vinos: cuatro tintos de los siguientes tenores de alcohol:

Nº 1	de	11°	alcohol
Nº 4	„	12.3°	„
Nº 5	„	12.5°	„
Nº 6	„	13.6°	„

Dos vinos rosados:

Nº 2	de	11.5°	alcohol
Nº 3	„	12.0°	„

Un vino blanco:

Nº 7	de	13.2°	alcohol.
------	----	-------	----------

En tres casos: Nos. 1-2 y 4 hubo formación de anillo a las 48 horas. En los restantes entre los 2 y 6 días de inoculados.

En todos los casos se forma película.

La más rápida corresponde al de menos graduación alcohólica: a los 3 días.

Los restantes, excepto el nº 6, presentan película a los 5-6 días de inoculados. El nº 6 en ese tiempo presenta numerosas isletas que llegan a casi confluir a los 15 días de inoculado.

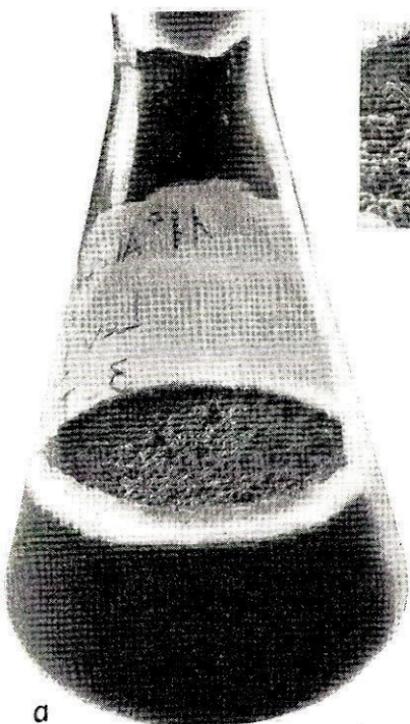
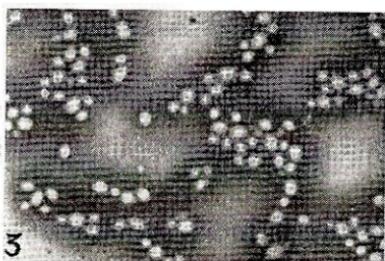
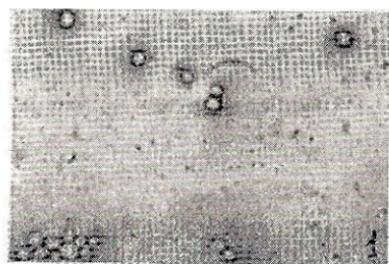
Caracteres de las películas formadas:

De todos los vinos artificialmente infectados se aisló la levadura estudiada. El examen microscópico permitió comprobar que la película se forma únicamente a expensas de dicho agente causal.

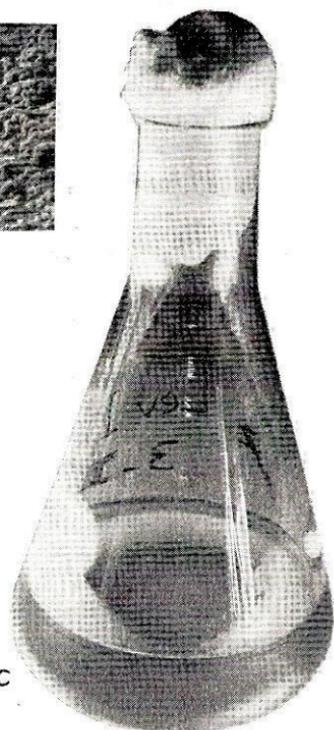
Recién después de 40 días, en dos de los vinos inoculados, el nº 1 y el nº 6, se inicia un proceso de acetificación originado por bacterias (hacemos notar que trabajamos con vinos de comercio, no pasteurizados).

Es importante destacar la enorme diferencia existente entre las películas formadas en la superficie de los distintos tipos de vino. Así es imposible describir el aspecto de la película hablando del vino "en general". Es necesario hacer referencia al tipo de vino. Así el nº 1 tinto, de baja graduación, forma una película muy gruesa y rugosa con infinitos plegamientos (lám. 1 a) de color similar al del vino, seca en superficie, mucosa al desgarrar la capa más superficial, bien adherida al recipiente que se mantiene en superficie a los 60 días. El vino turbio. Mucho sedimento (lám. 1 b).

En los vinos rosados las películas son blancas, lisas y consistentes. Empiezan a despegarse de las paredes entre los 15 y los 20 días. En un caso (nº 2) quedaron algunas isletas. El aspecto del vino es límpido. El sedimento es menor que en el nº 1.



b



c

1, células de mosto de malta de tres días montadas en nigrosina ; 2, células esporuladas coloradas según CORLIS ; 3, velo vino tinto-nigrosina ; 4, velo vino blanco-nigrosina ; a, b, c, referencias en el texto.

En los n^os 4 y 5 tintos de 12.3 y 12.5 grados la película es fina, lisa y oscura, y cae sin regenerarse hacia los 30 días. Es de hacer notar que en el n^o 4, con 4 gramos de azúcar por litro, se forma un anillo ascendente que recuerda los formados por *Acetobacter* pero sin apariencia arborescente.

En el tinto n^o 6 la película es finamente granular y persistente a los 60 días aun cuando experimenta desprendimientos desde los 30 días aproximadamente.

Finalmente el vino blanco presenta una película fina, lisa y traslúcida que trepa por las paredes y empieza a caer a los 9 días y cae completamente en aproximadamente 3 horas. A los 13 días de inoculado (es decir cuatro después de haber caído) se regenera y a los 15 días de inoculado vuelve a caer y ya no se regenera. El vino se presenta límpido, con sedimento. (Ver lámina 1 c).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De lo expuesto se deduce que se ha conseguido aislar una levadura a partir de película de un vino alterado. Que dicha levadura estudiada en cultivo puro es de problemática clasificación.

Partiendo de cultivos puros se consiguió reproducir la enfermedad en vinos normales del comercio cuya graduación alcohólica osciló entre 11° y 13.6°.

Como la finalidad de esta primera parte del trabajo es precisamente la reproducción de la enfermedad en las condiciones corrientes de la industria, se usaron vinos sin pasteurizar. En consecuencia el desarrollo de película después de inocularse los vinos pudo ser acompañado o seguido por desarrollo de bacterias lo cual ocurrió en dos casos al envejecer la película: después de los 40 días. El ataque no altera la graduación alcohólica en el vino original, pero sí en los ácidos totales que disminuyen de 6.10 gr p/l a 1.91 gr p/l.

Hay que hacer notar que la película de dicho vino original estaba formada exclusivamente por células de levadura, pero que en las condiciones de esta experiencia no puede afirmarse que la modificación en el tenor de ácidos sea obra exclusiva de la levadura.

En consecuencia, en la 2^a parte de este trabajo se encara el estudio del uso de los ácidos del vino: tartárico, málico, succínico, cítrico, láctico, etc. bajo la acción de la levadura en cuestión.

También dejamos para la segunda parte del trabajo determinar el rendimiento de esta levadura sola y asociada, y usando mostos pasteurizados.

Si consideramos que la levadura aislada puede formar parte de la flora zimógena natural de nuestros cepajes no hay duda que puede estar presente durante todo el proceso fermentativo en el cual puede coadyuvar, ya que posee capacidad fermentativa aunque reducida. La circunstancia de que forme película en los

vinos terminados y con alta graduación parece indicar que en este medio encuentra condiciones óptimas para su proliferación oxidativa.

Es entonces cuando el vino experimenta un cambio profundo desmejorándose en extremo sus caracteres organolépticos.

Finalmente dicha levadura puede crear en condiciones naturales, un ambiente favorable a la proliferación de bacterias, y ser así una puerta de entrada para otras alteraciones. Queda por destacar que los caracteres de la colonia en cultivo son semejantes a los caracteres de los buenos *Saccharomyces*.

RESUMEN

Se aísla una levadura esporulada que forma gruesa película en la superficie de un vino alterado.

Se hace el estudio taxonómico en cultivo puro.

Se analiza su probable ubicación sistemática. Se reproduce la formación de película en una serie de vinos del comercio. Los datos analíticos revelan que el alcohol no es oxidado, pero sí la acción zimógeno modifica la proporción de ácidos totales que se reducen apreciablemente.

Para mayores detalles sobre los métodos empleados nos remitimos a nuestros trabajos citados en la bibliografía con los n^{os} 4 y 5.

AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración prestada durante la realización del presente trabajo, se agradece a las siguientes personas: Sr. HUGO RABINO por las fotografías obtenidas, al señor HUBERTO LUCERO por las fotomicrografías y al señor MARIO VARINI por las muestras de vinos suministradas.

BIBLIOGRAFIA

1. LODDER, J. and K. VAL RUIJ, 1955. *The yeasts. A taxonomic study*. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
2. JOERGENSEN-HANSEN, 1959. *Microbiología de las fermentaciones industriales*. pp. 275-278. Ed. Aeribia, Zaragoza.
3. RIBEREAU-GAYON, J., 1954. *Enología*. Salvat Ed., S. A., Barcelona.
4. RIGONE DE PRITZ, M. J. y R. VEGA, 1958. *Contribución al estudio de las levaduras vínicas de la provincia de La Rioja*. U. N. de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza, 60 pp.
5. — 1959. *Levaduras vínicas de San Juan*. U. N. de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza.
6. CASTELLI, T., 1959. *Introduzione alla Microbiologia Enologica*. Arti Grafiche-Setti Figlio, Milano.