

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Biblioteca Central

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

"Estudio y Determinación de Levaduras en Mermeladas"

T E S I S

P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

Juana María Díaz Valtierra

∴ ---H53582---

TS

(1: 664.68---

D.542E

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS.

" ESTUDIO Y DETERMINACION DE LEVADURAS
EN MERMELADAS . "

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO.

PRESENTA .

JUANA MARIA DIAZ VALTIERRA.

QUERETARO QRO.

JUNIO DE 1975.

La palabra levadura evoca a todos los agentes causales de la fermentación alcohólica. Pero hay que hacer resaltar la circunstancia de que en la naturaleza existen numerosos microorganismos morfológicamente semejantes a las levaduras y que no tienen ninguna facultad de tipo fermentativo. Muchos microorganismos que antes se contaban entre los hongos filamentosos, han sido trasladados ahora al grupo de "LEVEDURAS" debido a que su morfología o sus propiedades fisiológicas le proporcionan, una mayor similitud con la levadura que con los hongos filamentosos. Al comenzar la edad media, no se sabe con exactitud cuando, se aprendió que la substancia que origina la fermentación debe buscarse en el sedimento que se reúne hacia el final del proceso en la cuba de fermentaciones e instintivamente se transmitieron desde la antigüedad las denominaciones utilizadas para esta substancia.

GENERALIDADES.

Fueron T.H. Schawaun y C. Cagnard-Lateur quienes demostraron en 1839, que el sedimento de la levadura está formado por vegetales unicelulares. J.F.V. Meyer denominó a éstos vegetales "Hongos Azucarados". En latín Saccharomyces, denominación que durante mucho tiempo perduró como nombre genérico de todos los microorganismos unicelulares que se reproducen por gemación, y que eran capaces en mayor ó menor grado de producir la fermentación alcohólica. Mas tarde se subdividió este nombre genérico en varios. Las levaduras se pueden encuadrar en parte entre los Ascomycetes (proteascomycetes), en parte entre los fungi imperfecti y esto significa por otra parte, que hay levaduras que pueden formar ascosporas y levaduras que no tienen esta facultad. En la práctica, esta diferenciación se aplica en general siendo esporeógenas las importantes especies de levaduras que producen alcohol imperfectas desde el punto de vista de la esporogénesis, las especies de levaduras que mas se desvían del tipo clásico.

Para ambas especies es válido el que con excepción de algunas especies llamadas levaduras "Cultivadas", se encuentran en la naturaleza, donde se pueden generalizar las relativamente escasas investigaciones realizadas en este campo; se reproducen por lo normal en frutos dulces y jugosos ó en excreciones vegetales que contienen azúcar. De aquí pasan, con el agua de la lluvia y las hojas y frutos que caen al suelo, en cuyas capas superficiales invernan. En los períodos estiales secos, sobre todo en junio y julio, las células supervivientes pasan de nuevo con ayuda del viento, de los insectos y similares a las plantas y árboles y el ciclo evolutivo comienza de nuevo.

Fué Louis Pasteur quién demostró que las especies de levaduras, al igual que una larga serie de microorganismos, viven libres e independientes en la naturaleza. En 1878, Emil CHR Hansen sometió este problema a un estudio detenido y probó que en el aire, en las cercanías de Carlsberg Copenhague, durante el verano se hallaban nubes de microorganismos, entre ellos también levaduras. Estas últimas desaparecían poco a poco del aire cuando se iniciaba el otoño y durante los rigores del invierno, habían desaparecido por completo las levaduras así como los microorganismos portados por el aire. Desde entonces se han realizado estudios aislados sobre la presencia de especies de levaduras en las excreciones de flores, sobre frutos en el suelo y otros sitios más.

En 1955 Lund publicó sus investigaciones, que perduraron varios años sobre la presencia de especies de levaduras en los alrededores de Copenhague, sobre flores, frutos, partes vegetales putrefactas, hongos, árboles, insectos y en el suelo se han hallado 56 especies de levaduras, 13 de las cuales son esporógenas y 43 no esporógenas.

El papel de las levaduras en la naturaleza según H. Lund consiste en degradar material sacarífero.

La importancia de las levaduras para el hombre consiste en su aplicación industrial.

Las levaduras se dividen también en levaduras cultivadas y levaduras salvajes. Las levaduras cultivadas son especies de levaduras que procediendo de la naturaleza, mediante generaciones innumerables han adquirido propiedades especiales, las levaduras salvajes son especies de levaduras que viven libremente en la naturaleza.

Otra división de las levaduras puramente práctica que en especial juega cierto papel dentro de las levaduras cultivadas, las segrega en levaduras altas y levaduras bajas. Las citadas en primer lugar se entienden levaduras que durante la fermentación tienden hacia la superficie, las citadas en segundo lugar, se depositan sobre el fondo final de la fermentación principal.

CLASIFICACION.

Lodder y Kreker Van Reij han establecido, en 1952, una clasificación de los hongos levuriformes, que ha sido universalmente adoptada. Según éstos autores se encuentran hongos levuriformes en tres de las familias que forman el grupo de las talofitas.

1).-En la familia *Encomycetaceae* que forma parte de la clase de los *Ascomycetos*.

2).-En la familia *Sporobolomycetaceae* que forma parte de la clase de los *Basidomicetos*, aún cuando otros autores los sitúan entre los hongos imperfectos.

3).-En la familia *Cryptococcaceae*, que forma parte del orden *Cryptococcales*, en la clase de los hongos imperfectos ó *Deuteromicetos*.

Los *Endomycetaceae*, al igual que todos los *Ascomycetos* se hallan caracterizados por la facultad de originar, esporas endógenas, llamadas ascosporas. La célula portadora de las mismas recibe el nombre de asca.

Los *Sporobolomycetaceae* pueden igualmente formar esporas. Estas son externas colocadas en los extremos de unos pedúnculos llamados esterigmas, siendo proyectadas a larga distancia en el momento en que alcanzan su

madurez.

Los Cryptococcaceae nunca originan esporas.

Las tablas siguientes indican la posición de los diferentes géneros en el seno de las tres familias indicadas.

CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS.

Familia Sporobolomycetaceae.

Géneros.

1).-Sporobolomyces.

2).-Bullera

3).-Tilletiopsis Estos géneros no comprenden levaduras en el sentido propio de la palabra.

4).-Itersonilia

Clasificación de las levaduras esporógenas.

Familia Cryptococcaceae.

Subfamilia

Subfamilia

Subfamilia.

Cryptococcoideae

Trichosporoideae

Rhodotoruloideae

Género

Género

Género

1).-Cryptococcus

1).-Trichosporon

1).-Rhodotorula

2).-Turolopsis

3).-Pytisporum

4).-Brettanomyces

5).-Candida

6).-Kloeckera

7).-Trijoecopsis

Descripción general de las levaduras.

Al observar una preparación a través del microscopio se ve, según el tipo de levadura, un sinfín de células esféricas, oviformes, elípticas, cónicas ó en forma de salchicha, que se encuentran aisladas ó también unidas entre sí en cadenas cortas. Cada una de éstas células representa a una unidad de levadura siendo cada célula capaz de vivir y formar

nuevas células y colonias de forma independiente de las demás células .
Por lo general no se ve micelio, tal y como es formado por los hongos filamentosos. Solo en el género *Endomycopsis* y en la especie *Saccharomycodes ludwigii* se encuentran formaciones que poseen el carácter de un micelio.

En ocasiones sobre todo en la formación de películas, las células pueden estar alargadas y acopladas en cadenas tan largas que hacen recordar un micelio, entonces se habla de un pseudomicelio. La forma de las células es muy variable y ello no solo es valioso de especie a especie, sino también dentro de la misma especie.

La morfología celular depende en alto grado de las condiciones bajo las cuales crecen y se conservan las levaduras; así se ve influenciada por ejemplo, por la temperatura, acceso de oxígeno, y substrato nutritivo. También es importante la edad del cultivo de la levadura. Las células jóvenes suelen tener una forma muy diferente de las células de -- cultivos viejos, en los cuales se pueden encontrar formaciones anormales. Por esto muchas veces resulta difícil determinar especie de levadura con arreglo a los caracteres morfológicos nada más.

Tamaño de las células de levadura.

El tamaño de las células de levadura varía mucho, midiendo 5 por 10 micras aproximadamente, pero las condiciones vitales de las levaduras y la edad de los cultivos son de suma importancia para las desviaciones de este tamaño promedio.

Al igual que otras células vegetales, la célula de levadura está formada por citoplasma, núcleo y pared celular.

CITOPLASMA.

El citoplasma presenta una estructura granulosa compacta y por lo general es incoloro. Contiene vacuolas que aparecen como manchas blancas nítidas ligeramente refringentes. Las células jóvenes no contienen vacuolas tan grandes como las células viejas. La célula en fermentación contiene vacuolas en gran cantidad.

El plasma que rodea a la vacuola contiene un sinnúmero de gránulos que se reúnen bajo el nombre de granulaciones, llamados también condriosomas. Los condriosomas se encuentran en todas las células vivas y en la célula de levadura pueden encontrarse hasta 50 distribuidos por el citoplasma. Se tiñen con colorantes básicos razón por la cual antes se llamaban gránulos basófilos.

Su función en la célula se efectúa en formas diversas; se conceptúan en parte como alimento de reserva, en parte como órganos que tienen importancia en la mitosis ó en la producción enzimática.

Las gotas de aceite y grasa se encuentran con frecuencia en células viejas y mal nutridas que han sido demasiado expuestas al aire.

EL NUCLEO CELULAR.

En toda célula de levadura se encuentra un núcleo celular que se puede hacer visible por medio de métodos de tinción especiales. En una preparación coloreada, por lo general se ve el núcleo como una formación redondeada que mide unas 0.5 micras de diámetro.

Del núcleo de las levaduras se puede decir, respecto a la estructura, que ocupa un puesto intermedio entre el núcleo fácilmente reconocido de los hongos filamentosos y del núcleo rudimentario escindido de las bacterias. La pared celular es incolora y delgada en las células jóvenes, pero con la edad se hace más espesa.

Esta formada por un 6% de proteínas, un 68% de polisacáridos, una pequeña cantidad de quitina y algo de hemicelulosa.

El sistema reticular gelatinoso se puede considerar como un desarrollo especial de la pared celular. Esta formación se origina, por ejemplo, cuando una pequeña cantidad de levadura viscosa se deja abandonada en un recipiente de cristal tapado, de madera que se deseca con lentitud.

Distribuyendo un gránulo de levadura en una gota de agua, se podrá ver a través del microscopio el sistema reticular gelatinoso como cordones

o placa.

También en los cultivos de esporas sobre bloques de escayola en colonias sobre gelatina meste y en anillos de levadura se pueden observar a veces el sistema reticular.

MULTIPLICACION Y GERMINACION.

En las levaduras esporógenas hay dos formas reproductoras, la asexual y la sexual.

Las levaduras tanto esporógenas se reproducen mediante la formación de blastosporos (gemación) ó por medio de la formación de oidios (mitosis celular).

La reproducción sexual se lleva a cabo mediante ascospora; pero, éstas se forman directamente en la célula de levadura y no como en los Eucomicetos en órganos especiales de fructificación.

REPRODUCCION ASEXTUAL.

La mayor parte de las levaduras se reproducen por gemación. La cual se realiza por medio de una pequeña evaginación que se aumenta gradualmente y se estructura paulatinamente como una célula de levadura. La célula sobre la cual se forma la evaginación se llama célula materna y la célula nueva recibe el nombre de célula hija. Cuando esta última ha alcanzado un cierto tamaño y cierta edad, se separa la célula materna mediante estrangulación pero, por regla general, ella misma ha formado antes una célula hija, y esta a su vez ha producido una célula hija etc. hasta que ha formado gradualmente una cadena celular.

En la levadura que se designa con el nombre de levadura alta, las cadenas celulares se hacen, por lo general, relativamente largas y ramificadas. Por esta razón se supone que la levadura es sostenida por el líquido en el cual fermenta y crece. Por el contrario las cadenas celulares de las levaduras bajas son breves, encontrándose incluso en las células aisladas, por lo cual las levaduras de este tipo descienden al fondo con rapidez.

La velocidad con que se produce la gemación depende de varios factores. Así la cantidad de oxígeno juega un papel, pues con la llegada suficiente de oxígeno se favorece la gemación, también es de suma importancia la temperatura a la cual se cultivan las células. La temperatura mínima a la cual se ha observado una gemación es de entre 0.5°C . y 3°C , la máxima a unos 4°C . Además tiene gran importancia la composición del sustrato nutritivo, cuyo contenido en probióticos, etc, debe ser exacto. Hay una especie de levaduras *Schizosaccharomyces*, en el cual la reproducción vegetativa no se realiza por medio de gemación, sino mediante división celular. Esta se inicia formándose en la célula un tabique transversal, el cual se engrosa y divide a la célula en dos células. Mediante escisión del tabique transversal las dos células se pueden separar enseguida ó después de transcurrir algún tiempo. En el último caso se puede sobrevenir una segunda división, de manera que se forman cadenas celulares cortas. En la mitosis de *Schizosaccharomyces* se puede hablar de una formación de oidios.

REPRODUCCION POLAR.

La gemación polar es una forma de reproducción intermedia entre la gemación en varias direcciones y la mitosis. La gemación polar solo se produce en los puntos extremos de una célula oval de modo que la célula hija y la célula materna justo antes de la separación no están unidas en un solo punto, sino en una pieza ancha es decir la célula hija se aparta de la célula materna en vez de ser estrangulada. Esto se llama estrangulación sobre amplia base ó estrangulación completa. Esta forma de reproducción vegetativa se origina por ejemplo, en *Saccharomyces Ludwigii* y en el género *Madsonia*.

REPRODUCCION SEXUAL.

La formación de ascósporas en las levaduras fué observada y se vió que las células de levaduras cultivadas en vino podían ser liberadas por reventazón de la pared de las células maternas.

posteriormente se facilitó una descripción más detallada de estas esporas y se demostró que las mismas aparecen en las diversas formas de levadura y que la germinación de esporas se realiza por gemación. Posteriormente se designó a éstas levaduras asporógenas, y se formó un grupo especial al que se le dio el nombre de *Saccharomyces*.

La esporogénesis comienza con la formación de algunas concreciones - protoplasmáticas redondeadas, que son los esbozos de las esporas. En el desarrollo ulterior se rodean de una pared, que en las distintas especies resalta con mayor ó menor claridad.

La forma de las esporas varía en las diversas especies. El tamaño de las esporas varía en las diversas especies de 2 a 6 micras. Por lo general se forman cuatro ascosporas en una asca. Pero debido a fenómenos degenerativos se pueden formar en menor cantidad. En la especie *Schizosaccharomyces* se forman 8 esporas en cada asca. Por lo general las esporas son esferoidales u ovales, con paredes lisas como por ejemplo en la mayoría de los tipos de levaduras cultivadas. En algunas levaduras se encuentran otras formas de esporas que con frecuencia son características de estas levaduras, así las esporas de *Hansenula* están provistas de un filete prominente con el cual presentan la forma de sombrero ó de la del planeta saturno. El *saccharomyces fragilis* tiene esporas arriñonadas. En el género *Hemiaspora* se encuentran especies aciculares, y en otros géneros las esporas están provistas de verrugas, evaginaciones, etc.

Por lo tanto la formación de esporas en muchas ocasiones es una buena característica de género y especie.

La formación de esporas se efectúa a una temperatura de 0.5 a 3 °C. como mínimo, como máximo a los 37.5 °C.

ESPOROGENESIS.

Nombre de los microorganismos	35 °C.	30 °C.	25 °C.	20 °C.	15 °C.	10 °C. de	4 °C.
acch.Cerevisiae	25 h.	2Ch.	20 h.	30h.	3d.I/2	10d.	-
acch.Pastorianus	-	30h.	25 h.	3Ch.	3d.	3d.I/2	14d.
acch.Intermedius	-	-	25 h.	30h.	2d.	4d.	17d.
acch.Pastorianus II)	-	-	-	-	-	-	-
acch.Validus	-	-	26h.	32h.	3d.	8d.	-
acch.Pastorianus III)	-	-	-	-	-	-	-
acch.Ellipsoideus	-	26h.	21h.	28h.	45h.	4d.I/2	-
acch.Turbidans	-	25h.	27h.	35h.	3d.	6d.I/2	-

La formación de esporas como característica de especie ha alcanzado cierta importancia, sobre todo para identificar la levadura salvaje de la levadura cultivada. Tratándose de la identificación de la levadura salvaje en levadura baja cultivada se aprovecha la circunstancia de que la levadura salvaje forma esporas con una velocidad bastante mayor que la levadura cultivada.

FORMACION DE PELICULA.

Es un fenómeno conocido por todos que los líquidos en fermentación ó fermentados se cubren con una película.

Una de éstas películas puede proceder en parte de bacterias, en parte de levaduras y microorganismos similares. Las especies del género esporógeno de levadura Mycoderma con frecuencia se encuentran en tales membranas.

Las especies de éste género forman una película de aire agrisada, seca, y rugosa, que se llama película de la flor, sobre la superficie del líquido nutritivo.

Ciertas especies esporógenas de levadura, como por ejemplo Hansenula Anomala y Pichia Membraneifaciens, forman membranas parecidas.

Las levaduras (asporógenas y esporógenas) que son capaces de formar una película de la flor, se llaman "Levaduras de la Flor, ó levaduras peligrógenas.

Biblioteca Central

Sus representantes mas importantes son los tres microorganismos citados Hansenula Anomala y Pichia Membranaefaciens, pero también otras levaduras asporógenas, como por ejemplo, ciertas especies del género Turulopsis deben contarse entre las levaduras peliculógenas.

Al mismo tiempo que la formación de esporas suele producirse la decoloración del mosto, esta reacción resulta con mayor claridad en las especies que presentan la formación mas poderosa de películas. Esta decoloración se basa con toda probabilidad en una alteración del potencial de óxido-reducción.

Cuando se agita el matríz se desprenden algunas trozcos de la película y descienden al fondo; pero la película se renueva y adquiere un aspecto marmóreo, pues las partes jóvenes son delgadas y oscuras, mientras que las mas viejas son gruesas y claras. El límite térmico para la formación de las películas : para S. Cerevisiae y Allipsoideus, los límites se encuentran entre 5 y 30 °C. y para Turbidans a 3 y 40 °C: aproximadamente.

COLONIAS DE LEVADURAS.

El aspecto macroscópico de las colonias de levaduras varía algo en las diversas especies y por ello en determinados casos ha servido de característica de especie.

Cuando las colonias de levaduras se forman espontáneamente sobre substratos de agar ó gelatina son mas pequeñas que las colonias filamentosas y tienen un aspecto céreo o, a veces mucoso, por lo general son blanquecinas ó amarillentas.

Las formas características es decir, bordes dentados, estructura reticular escutiforme, arrugada, sulciforme, etc. que pueden tener las colonias de algunas especies de levaduras, resulta mejor sobre gelatina mosto y sobre agar-mosto.

La mayoría de las especies asporógenas, de levadura no solo se desarrollan sobre la superficie de la gelatina, sino también crecen por dentro de la misma.

Frente a esto, el crecimiento de la levadura peliculógena por lo general, se realiza sobre la superficie de la gelatina.

Algunas especies licúan la gelatina por ejemplo el *S. Cerevisiae*.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LEVADURA.

La levadura contiene un 75% de agua y un 25% de sustancia seca aproximadamente.

La sustancia seca de levadura tiene la siguiente composición aproximada.

Ceniza	-----	sobre 8%
Carbohidratos	-----	" 43%
Proteína	-----	" 48%
Grasa	-----	" 2%

Las sustancias minerales de la levadura representan por lo general un 5-9% del peso seco. Los componentes principales son: ácido fosfórico (alrededor del 50%) y potasio un 50%.

Los hidratos de carbono se hallan presentes en la levadura, en parte como hemicelulosa y goma de levadura en la pared celular, en parte como glucógeno y, como muy pequeñas cantidades de diversos glúcidos en el citoplasma. El glucógeno se encuentra en cantidad muy diversa, según los estudios vitales de la levadura.

Al principio de un período de fermentación, cuando el líquido fermentativo contiene suficiente azúcar, aumenta el contenido glucogénico de la célula de levadura y alcanza su máximo cuando casi ha finalizado la primera fermentación tumultuosa. En este estadio comienza a disminuir el contenido en glucógeno, aunque el azúcar siga presente en el líquido en fermentación.

A las sustancias nitrogenadas de la levadura corresponden unas dos terceras partes de su peso seco (50 a 75 contiene un 5 a 12% de nitrógeno).

La cantidad depende de la alimentación de la levadura de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc.

El contenido normal de grasa de la levadura es relativamente escaso (1 a 7% de la substancia seca). Es mínimo en las células en crecimiento y máximo en las células viejas. La formación de grasa en las células se ve favorecida por los vapores del alcohol. La síntesis de grasa en las células de levadura es una condensación de moléculas de acetaldehído. Digno de mención es el que la grasa de la célula de levadura se deja extraer con dificultad por el éter. Parece estar ligada a la estructura celular.

VITAMINAS EN LA LEVADURA.

Estas pertenecen de preferencia al complejo vitamínico B. Las vitaminas de éste complejo son idénticas a varias enzimas fermentativas ó de otra forma juegan un papel en los procesos catabólicos de la levadura.

Como ejemplo de esto se tiene que la levadura baja contiene las siguientes cantidades calculadas sobre la substancia seca de la levadura:

Tiamina (Vit. B)	-----	150 /G.
Ac. Pantoténico	-----	120 /G.
Riboflavina (Vit. B)	-----	50 /G.
Niacina (amida del ácido nicotínico)	-----	500 /G.
Biridoxina	-----	30 /G.
Biotina	-----	1.1 /G.
Ac. Fólico	-----	45 /G.

La levadura roba la vitamina B al mosto, pero le aporta ácido nicotínico y ácido pantoténico, sintetizando ella misma esta substancia.

Debido al contenido vitamínico y a la presencia de substancias nitrogenadas, fácilmente digeribles, las levaduras y las preparaciones que contienen levadura se utilizan como medicamento.

ENZIMAS.

De la más importantes mencionaremos las siguientes:

Invertasa (sacarasa h-fructosidasa), que escinde la sacarosa en fructosa más glucosa, se encuentra en la mayoría de las especies de levaduras es-

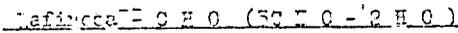
porógenas. La temperatura óptima de esta enzima se encuentra alrededor de los 55 °C. y su pH. óptimo es de 4.5. La invertasa además es capaz de desdoblar la rafinosa en fructuosa y melibiosa. La invertasa es una enzima.

Maltasa (glucosidasa), que degrada la molécula de maltosa en dos moléculas de glucosa, se encuentra en muchas especies de levadura pero falta en algunas como por ejemplo, en *Saccharomyces Ludwigii*. La temperatura óptima se encuentra alrededor de los 40 °C. y su pH. óptimo es de 7 aproximadamente. La maltasa es una endoenzima. Se opina que a pequeñas cantidades puede atravesar la pared celular, pero solo para ser destruída en los ácidos formados durante la fermentación.

La Lactasa (galactosidasa) que desdobla la lactosa en glucosa y galactosa solo se encuentra en pocas especies de levaduras, por ejemplo *Saccharomyces Fragilis*. El pH. óptimo se encuentra hacia el 7.

La Trehalasa degrada la Trehalosa en moléculas de glucosa y se encuentra en muchas levaduras.

La Melibiosa (galactosidasa) escinde la melibiosa en glucosa y galactosa y, por lo general se encuentra en la levadura baja.



Fructuosa - glucosa - Galactosa
Sacarosa Melibiosa

Enzima: invertasa Enzima: melibiosa.

La Glucogenasa, que degrada el glucogéno a glucosa, es una enzima característica.

Además de las carbohidrasas ya mencionadas, las levaduras contienen numerosas proteínas que, entre otras funciones, intervienen en el proceso fermentativo, pero participando, ante todo, en la asimilación.

SUSTANCIAS MINERALES.

Las sustancias minerales requeridas para el crecimiento de las levaduras son las siguientes:

Potasio resulta indispensable para el crecimiento de las levaduras.

El calcio no es necesario para el crecimiento, pero parece ejercer una acción favorable sobre el de la levadura, la fermentación y la floculación.

El magnesio es imprescindible para el crecimiento de las levaduras y su desarrollo, y también necesario para la fermentación pues esta substancia es uno de los activadores del proceso fermentativo alcohólico.

Hierro, Zinc, y Cobre; estudios coincidentes han demostrado que la levadura precisa para su desarrollo normal 0.075 mg. de hierro, 0.02 mg. de Zinc y 0.015 mg. de cobre por cada litro de líquido nutritivo.

ALIMENTACION CARBOHIDRATA.

De las combinaciones carbonadas, los glucidos juegan el papel principal en la alimentación de las levaduras. En investigaciones con sacarosa se encontro que las levaduras absorben un 15% aproximado del azúcar en el líquido fermentativo para la plasticidad de las células, es decir, que no todo el azúcar en el líquido fermentativo se transforma en CO_2 y en alcohol.

ASIMILACION NITROGENADA.

Las sales amónicas son suficientes fuentes nitrogenadas para la levadura, presuponiéndose que el substrato nutritivo sea satisfactorio.

Las levaduras crecen normalmente sobre substratos con nitrógeno ligado orgánicamente. Por lo general se trata de substratos que contienen proteínas o sus productos de degradación tales como, peptonas, péptidos, aminoácidos ó sales de aminoácidos.

DESASIMILACION.

La desasimilación de las levaduras puede ser tanto oxidativa (respiración) como anoxidativa (fermentación). En ambos procesos se forma CO_2 .

Así las levaduras no solo tienen la habilidad de producir fermentación sino que también son capaces de transformar azúcar en CO_2 y H_2O en pro-

sencia de oxígeno. Pero en la mayoría de las levaduras esporógenas, sobre todo en las especies *Saccharomyces* es la fermentación la forma catabólica que predomina.

En las levaduras pelliculógenas por ejemplo las especies *Hansenula* y *Pichia* y similares, el catabolismo oxidativo siempre es mejor que el anoxi-dativo.

Cuando una especie de levadura sea capaz de fermentar azúcar a alcohol y CO_2 siempre podrá fermentar la glucosa, fructuosa y manosa. Sin embargo, la galactosa no es fermentada por todas las especies de levadura que son capaces de producir fermentación de las tres substancias citadas en primer término.

El que los di, tri, y polisacáridos sean fermentados ó no, depende de las carbohidrasas contenidas en la levadura. La habilidad de fermentar di, tri y polisacáridos, en la mayoría de los casos, la característica que se emplea es la diferenciación sistemática.

Un caso especial es la fermentación de la rafinosa. Mientras que una serie de levaduras puede fermentar éste hidrato de carbono en su totalidad, hay especies de levaduras que solo pueden fermentar una tercera parte de la molécula de rafinosa, porque no poseen mas que la carbohidrasa que desdobla la fructuosa, pero no aquella que resulta necesaria para hidrolizar la melibiosa en galactosa y glucosa.

Se dice que la levadura baja cultivada puede fermentar la rafinosa en su totalidad, mientras que la levadura alta solo puede desdoblar y fermentar la fructuosa, es decir, fermenta la rafinosa en una tercera parte.

ACIDIFICATION.

Por medio de ensayos realizados tanto en levaduras cultivadas como en levaduras salvajes, se ha comprobado que en el mosto lupulado durante la fermentación se forma una cantidad de ácido que corresponde a 4.7-10cc. de hidróxido de sodio N/10 por 100cc. de mosto fermentado.

Las levaduras cultivadas forman sobre todo ácidos fijos, mientras que el *Pastorianus* y las cepas de *S. Cerevisiae* v. r. *Ellipsoideus* forman de preferencia ácidos volátiles.

En mezclas se ha observado que en medio ácido los gérmenes parecen a una temperatura más baja que en medio ácido.

Se ha comprobado que es el pH, más que la acidez total, el que ejerce esa acción sobre los microorganismos.

FORMACION DE SUSTANCIAS AROMÁTICAS Y OTRAS SUSTANCIAS GUSTATIVAS.

Con referencia a las sustancias aromáticas se distinguen aquellas que se forman sobre todo en la uva los llamados bouqués uveros y aquellos que se producen por medio de la fermentación (almacenaje) bouqués fermentativos.

Por ejemplo se ha visto que el bouqué resalta con tanta fuerza que el producido por la actividad de la levadura no llega a notarse sólo en escaso grado. En este caso la acción de la levadura es indirecta sobre el sabor, reprimiendo microorganismos extraños que mediante la formación de sustancias aromáticas puede enmascarar el bouqué. Sin embargo, en otros casos deben utilizarse aquellas razas de levaduras que pueden ejercer la influencia deseada sobre el sabor. Los múltiples ensayos han demostrado que no existe relación alguna entre la fuerza fermentativa y el bouqué fermentativo; éste último parece ser una propiedad ligada a determinadas razas de levaduras, independientemente de su habilidad para formar alcohol, fermentar azúcares, etc.

AUTOLISIS.

Cuando muere una célula de levadura, cesan las transformaciones químicas normales precisas para la conservación de la vida, pero con la muerte no se apaga la actividad de las enzimas de las células y por ello en la célula muerta tienen lugar transformaciones químicas que con una consecuencia del juego arbitrario de las enzimas. Estos procesos se llaman autólisis, autodigestión.

El cuadro enzimológico tiene el siguiente aspecto: una vez muerta la célula y borrada la estructura celular, unas enzimas son debilitadas, mientras que otras aumentan su capacidad reactiva. Como consecuencia al primer plano salta la degradación de ciertas sustancias mientras que casi terminan otros procesos degradativos. Se destruyen las enzimas respiratorias y fermentativas, activándose las enzimas hidrolizantes.

Los hidratos de carbono y las grasas de la levadura solo juegan un papel subordinado en la autólisis. Sin embargo debemos observar que la levadura contiene glucógeno, puede producir una fermentación pasajera. Si se autolisa la levadura fresca que procede directamente de la fermentación se percibirá una formación de espuma de breve duración, ahora bien éste fenómeno termina enseguida, en parte porque se destruye la coenzima, en parte porque la cantidad de glucógeno se consume con rapidez.

En la autólisis de la levadura son activadas sobre todo las enzimas proteolíticas, desdoblándose las proteínas polimoleculares del plasma en peptonas y aminoácidos.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES EXTERNOS.

Como en otros microorganismos, la actividad vital de la levadura se ve influida por factores externos. Los más importantes son los siguientes: AGUA.- Para la vida de las levaduras se precisa una determinada cantidad de agua, aunque algún tiempo puede tolerar cierta desecación.

OXÍGENO.- Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos -- aunque se ha probado que en escasa proporción son capaces de desarrollarse en condiciones anaerobias por completo. En presencia de oxígeno el crecimiento de la levadura es mucho más vigoroso que en cultivo bajo condiciones en que no es posible el acceso de oxígeno. Para las levaduras policultógenas rige el que el proceso respiratorio posterga por completo la fermentación e incluso muchas levaduras de la flor ni si-

quiera poder producir la fermentación alcohólica.

En éstos microorganismos los glúcidos son quemados y asimilados pudiendo producirse la fermentación oxidativa, tal y como se encuentra en muchos hongos filamentosos al lado de la respiración, formándose ácidos orgánicos y similares.

TEMPERATURA.-En la mayoría de las especies de levaduras, el máximo de temperatura para el crecimiento se halla entre 34 y 47 °C. y la temperatura mínima a unos 0.5 °C.

LUZ.-Se ha visto que los procesos reproductores no son influidos por la iluminación débil, pero que sufren una inhibición por medio de la luz difusa. En la luz diurna y la luz eléctrica, las células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces ludwigii* solo se multiplican a la mitad de su intensidad. Es sobre todo luz azul la que suele retardar la reproducción mientras que en la luz roja las células se multiplican a la misma ó mayor intensidad que en la obscuridad.

Parece ser que la luz ultravioleta y los rayos X pueden producir mutaciones en las células de levaduras, por ésta razón jamás se puede utilizar una lámpara esterilizante u otro aparato semejante al trabajar con células de levaduras.

LA CONCENTRACION DE IONES HIDROGENO.-El crecimiento y la fermentación de la levadura depende en alto grado de la reacción del medio nutritivo. Las levaduras pertenecen al igual que los hongos filamentosos a los microorganismos ácidosfilos. El vapor del pH del mosto lupulizado, se encuentra sobre 5.5. Durante la fermentación se produce, por tanto, una cantidad considerable de hidrogeniones. Para las especies de levadura que pueden fermentar la lactosa, la fermentación depende en alto grado del pH. Por el contrario, la fermentación de la glucosa se puede efectuar en una zona de pH muy grande.

TOXICOS.-Para las levaduras resultan muy tóxicas las substancias siguientes: arsénico, cobre, plata, cesnio, mercurio y paladio.

La resistencia de las levaduras es máxima en un pH entre 6 y 7 y esta resistencia disminuye cuando el medio es más ácido ó más alcalino.. El cobre impide por completo el crecimiento de levaduras cuando se encuentra en un sustrato nutritivo sintético en la cantidad de un miligramo por litro. Muy escasa acción tóxica poseen el hierro, zinc, aluminio plomo, nolibdeno, manganeso. Los halógenos, iodo, bromo, cloro, son poco tóxicos cuando se encuentran en forma de sales alcalinas, pero en combinaciones orgánicas pueden ser extraordinariamente tóxicos.

ACCIÓN DE LOS PRODUCTOS METABÓLICOS.-La levadura se ve influida en alto grado por los productos formados durante el metabolismo, y ante todo por el alcohol. Una concentración de alcohol al 3% influye en el crecimiento y una concentración alcohólica al 5% influye en el crecimiento y en la fermentación. La concentración al 10% produce una paralización total.

ANHIDRIDO CARBÓNICO.-Esta substancia solo ejerce una acción tóxica sobre las células en presencia de oxígeno, es decir, en la respiración, mientras que sobre las células de levadura en fase fermentativa no ejerce influencia alguna.

IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS.

La identificación de las levaduras descansa sobre los siguientes criterios.

I.-CARACTERES MORFOLÓGICOS.

- a).-Aspecto exhibido por las colonias en los medios sólidos.
- b).-Forma y tamaño de las células.
- c).-Facultad de formar esporas.
- d).-Tipo de reproducción vegetativa.
- e).-Aptitud para constituir un pseudomicelio.

2.-CARACTERES FISIOLÓGICOS.

- a).-Aspecto de los cultivos sobre un medio líquido.
- b).-Manera de realizar la asimilación de los glúcidos por vía oxidada ó vía fermentativa.
- c).-Aptitud para poder asimilar el nitrógeno de los nitratos.

). Aptitud para poder asimilar substratos diversos: etanol, arbutina, materias grasas, etc.

Estos diferentes puntos llaman consigo los siguientes comentarios.

1.-Caracteres morfológicos.

1).-Aspecto de las colonias sobre medios sólidos.

Las colonias desarrolladas en la superficie de los medios sólidos tienen, en algunas ocasiones unos aspectos que sirven para diferenciar ciertos géneros ó especies.

Las colonias del género *Rhodotorula*, están coloreadas, siendo mas frecuente el rojo o rosa salmón. Son esféricas abombadas y brillantes.

Las colonias pertenecientes a las *Sporobolomycetaceas*, son de contorno irregular de color rojo salmón. Las ballitosperas que son lanzadas una vez que se encuentran maduras, se arrojan sobre la tapadera vuelta de la caja petri una especie de reflejo de la propia colonia (fenómeno de espejo).

Las colonias pertenecientes a la especie *Candida Mycoderma* y a la levadura de velo, se presentan de contorno irregular, plegadas blanquesinas ó de color de gazuza, de aspecto seco o grasoso.

Las colonias de los *Saccharomyces*, así como de la mayor parte de las levaduras que pertenecen a los restantes géneros que no han sido mencionados anteriormente, se presentan redondas, blancas ó de un blanco gazuza, con bordes netos, son esféricas o con el centro puntiagudo. Si se las deja desarrollarse hasta que alcanzan un diámetro aproximado de un centímetro (colonia gigante) puede representar aspectos típicos para determinadas especies.

Con el fin de estandarizar los métodos de observación de las colonias, el medio universalmente adoptado es el mosto de cerveza gaseada.

2).-Forma y dimensiones de las células.

Las levaduras son siempre examinadas en estado fresco, colocada entre portaobjeto y cubreobjetos. Los procedimientos normales de fijación y coloración deformarían a las células.

Constituye una técnica muy útil realizar el examen en una gota de tinta china. El examen mediante el ultramicroscopio ó en el contraste de fases pone en valor la estructura interna siendo interesante pero no indispensable.

Se pueden examinar las levaduras después de una coloración a base de lugol, que permite detectar la presencia de glucógeno ó mediante es sudánIII que pone en evidencia a los glóbulos lípidicos. Diez numerosas levaduras pertenecientes al género *Cándida* poseen tales inclusiones lipídicas. La forma de las células puede constituir en muchos casos una ayuda sumamente útil. Los *Saccharomyces* son, en general ovoideas. El *S. Pastorianus* tiene células rectangulares. El *S. Ovisformis* exhibe unas células casi redondas. Igualmente se hallan formas diversas en los géneros *Cándida* y *Torulopsis*. Los *Kloeckera* son apiculados.

Las dimensiones se pueden apreciar mediante el micrómetro ocular contrastado. Ayudan igualmente para la fácil determinación de algunos géneros ó especies.

c).-Facultad de formar esporas.

Constituye un carácter fundamental que permite agrupar a las levaduras. Un buen medio de empleo general apropiado para esta determinación lo constituye el medio de Gorodkova. Pero no se decidirá el tipo a que corresponde, cuando se trata de casos difíciles hasta no haber realizado otras pruebas complementarias en que se hayan efectuado una prueba de la cepa sobre un bloque de yeso ó sobre un trozo de zanahoria. Como ocurre en el caso de las bacterias esporulantes, la esporulación en las levaduras se presenta cuando las condiciones del cultivo se tornen desfavorables para que se realice la reproducción vegetativa. Es un fenómeno sexual. Esta consideración conduce, en ocasiones, a poder obtener aplicaciones útiles, como son por ejemplo, la obtención de nuevas razas de levaduras.

Es muy útil considerar la forma de las esporas. Generalmente son redondas como pasa en los *Saccharomyces*. Pueden ser hemisféricas con borde salien-

, (con sombrero como se presenta en ciertos tipos de *Hansenula* o saturnianos es decir, a manera de planeta saturno provistas de un anillo). Pueden adoptar el aspecto reniforme, en caso de ciertas especies de *Fichia* ó de formas fusiformes como en las levaduras de los géneros *Monospora* y *Nematospora*.

Las *Hansenula* son pequeñas (de 2 a 5 micras de diámetro).

Las *Saccharomyces* pueden alcanzar de 6 a 8 micras y aún mucho más, éstas levaduras son frecuentemente más largas que anchas.

-Tipo de reproducción vegetativa.

Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* se reproducen únicamente por escisión.

Las *Saccharomyces* *Turoloopsis*, *Cándida* y la mayor parte de las restantes se reproducen únicamente por gemación.

Ciertas especies de levaduras se pueden reproducir a la vez, mediante gemación y escisión. Pertenecen a los géneros *Endorycopsis* y *Trichosporon*.

Debe ser apreciada la posición de las yemas sobre la célula madre.

Las *Saccharomyces* no proporcionan más que una sola yema en cada proceso de gemación, formada en las proximidades de uno de los polos de la célula.

Las *Cándida* pueden llegar a formar varias yemas simultáneamente sobre cualquier punto de la periferia del cuerpo celular.

Las *Kloeckera* tienen una forma de gemación polar y bipolar.

Las *Saccharomyces* *Pastorianus* se reconocen por la formación de una yema localizada en uno de los ángulos de la célula.

Se reconoce que las levaduras tienen un aspecto más homogéneo cuando se les cultiva sobre un medio líquido que sobre un medio sólido.

Capacidad para constituir un micelio ó un pseudomicelio.

La formación de un pseudomicelio ó de un micelio se presenta como en el caso de la esporulación sobre medios de cultivo pobres ó agotados.

Cuando la forma de reproducción vegetativa de la célula es la escisión puede haber en éstos casos la formación de un micelio verdadero.

Los tabiques celulares quedan unidos entre sí que a su vez, se escinden y se alargan, de esta manera se constituye un filamento tabicado.

Cuando el conjunto envejece, tiene lugar una separación en forma de células rectangulares. Estas células libres reciben el nombre de artosporas. Esto es lo que ocurre en las levaduras del género *Gochizosaccharomyces*.

Cuando la forma de reproducción vegetativa es la gemación se puede presentar el mismo fenómeno y en éste caso se conduce a la formación de un rosario de células ó pseudomicelio primitivo.

Otras forman un pseudomicelio capaz de evolucionar en un aparato esporífero. En estos casos aparecen en los extremos de las células pseudomicelianas que no se ha separado del conjunto, unos manojas de rosario ó pequeñas células llamados blastosporas.

Cuando aparecen en un punto cualquiera de la célula, llevan el nombre de blastoconidios.

La formación de un pseudomicelio es, especialmente, útil para poner en evidencia a las levaduras asprógenas.

Los *Cándida* forman siempre un pseudomicelio que evoluciona en la mayor parte de los casos, en un aparato esporífero.

Los *Turalopsis* no lo forman.

Este carácter permite diferenciar a los dos géneros.

Naturalmente las dos formas de evolución, en un micelio verdadero y en un pseudomicelio, se pueden observar conjuntamente en las levaduras que se reproducen vegetativamente a la vez por escisión y gemación.

2.-Caracteres Fisiológicos.

a).-Aspecto de los cultivos sobre un medio líquido.

a).-Es indispensable apreciar el aspecto de los cultivos de levadura sobre un medio líquido para poder establecer la determinación de los géneros ó de ciertas especies.

A éste respecto las levaduras pueden ser agrupadas en dos categorías.

1).-Las levaduras con metabolismo fermentativo dominante.

Se caracterizan por un deprendimiento gaseoso más o menos abundante

El líquido se encuentra en un principio alterado, apareciendo más tarde un depósito, mientras que el líquido se clarifica.

Se debe apreciar el aspecto de éste depósito purulento, es decir, que se torna en una suspensión homogénea mediante simple agitado, o graso cuando queda más ó menos adherido a la pared del tubo. Se apreciará igualmente el aspecto de la espuma o masa fina.

Los Saccharomyces pertenecen a esta categoría.

Se llega una vez finalizado el proceso fermentativo a que la levadura forma una especie de velo en la superficie del medio. Este velo tardío es, por regla general fino, que en ocasiones queda reducido en forma de islotes. Las levaduras que lo producen son, generalmente aquellas que son capaces de reoxidar el alcohol que han producido, como ocurre con el Saccharomyces Oviformis.

Ciertas especies del género Cándida pueden igualmente ser diferenciadas de esta manera.

3).-LAS LEVADURAS CON METABOLISMO OXIDATIVO DOMINANTE.

La mayor parte de ellas forman, sobre el medio líquido un velo inmediato, en ocasiones reducido a un simple anillo más ó menos graso.

Puede haber al mismo tiempo una débil fermentación.

El velo es, con frecuencia espeso, graso, plegado, como ocurre en las levaduras del género Pichia y en ciertas especies del género Cándida.

En la especie Cándida Mycodacta es blanquecina y harinosa.

Otras levaduras no forman velo, pero sí un depósito y no hay proceso fermentativo.

Por acuerdo y con el fin de lograr una estandarización en los métodos de observación, el examen de los cultivos en medio líquido se verifica sobre mosto de cerveza.

b).-Estudio del metabolismo de los glúcidos.

El examen de las levaduras en medio líquido no permite, más que agrupar la en dos categorías: Levaduras de metabolismo fermentativo dominante y Levaduras de metabolismo oxidativo dominante.

Se ha estudiado el metabolismo de 5 tipos de azúcares sometidos a la actividad fermentativa y a la oxidativa (asimilación) y mediante el reconocimiento de las diferentes combinaciones que pueden existir entre estas dos formas de ataque.

Los 5 tipos de azúcares que se han estudiado son: Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa y Lactosa, a las cuales es conveniente añadir en ciertos casos la Rafinosa.

La elección de ésta gama de azúcares se haya basada en las siguientes consideraciones:

- 1.-Todas las levaduras son capaces de asimilar la glucosa por vía oxidativa; asimilan igualmente todas ellas a la levulosa cuyo estudio particular no es necesario.
- 2.-Todos los azúcares fermentados por una levadura son igualmente asimilados por una oxidativa; pero la recíproca no.
- 3.-Las levaduras que hacen fermentar a la maltosa, generalmente son capaces de hacerlo con la lactosa.

El estudio del metabolismo de la rafinosa no tiene interés más que para todas aquellas levaduras que hacen fermentar a la sacarosa.

Las tablas que se disponen a continuación indican el comportamiento de las especies del género *Saccharomyces* y de algunas especies del género *Candida* frente a los glúcidos mencionados.

El estudio del metabolismo de los glúcidos por vía oxidativa se realiza mediante la técnica auxonográfica.

El estudio del metabolismo de los glúcidos por vía fermentativa se realiza en tubos de medio líquido.

La rafinosa es un trihólosido, compuesto de glucosa, levulosa y galactosa hallándose la glucosa y galactosa unidas en la forma de melibiosa.

Levulosa-Glucosa-Galactosa
M E L I B I O S A

Muchas levaduras son capaces, después de haber escindido la molécula en el puente de unirse levulosa y glucosa, de promover la fermentación de la levulosa sin atacar a la melibiosa. Se dice entonces que éstas levaduras son capaces de fermentar un tercio de la rafinosa como ocurre con el *Saccharomyces Cerevisiae*.

Algunas levaduras en número muy reducido rompen el puente de unión entre la glucosa y la galactosa, utilizando la levulosa y la glucosa, y dejando intacta a la galactosa. Se dice que son levaduras capaces de fermentar dos tercios de la rafinosa, caso típico del *S. Pastorianus*. Por último, otras levaduras provocan la fermentación completa de la rafinosa, como es el caso de *S. Carlsbergensis*.

La caracterización del porcentaje fermentativo de la rafinosa puede estar basado mediante la medición del CO_2 desprendido, por lo que se precisa hacer uso de unos tubos graduados de tipo especial. (aparato Van-Iterson-Kluyver).

).-Estudio de la asimilación del nitrógeno de los nitratos.

La asimilación del nitrógeno de los nitratos constituye un carácter de género para las levaduras esporógenas y un carácter de especie para las levaduras asporógenas.

Entre los *Saccharomycetes*, únicamente las levaduras del género *Hansenula* son capaces de asimilar a los nitratos.

La técnica utilizada para la caracterización de éste fenómeno es el método

auxonográfico. El medio base es un medio muy purificado. Se utiliza una sal de amonio, como sustrato de referencia ya que todas las levaduras son capaces de asimilar el nitrógeno amoniacal.

d).-Estudio del metabolismo de otros sustratos mencionados.

El metabolismo de la arbutina, gelatina, caseína ó de las grasas, no suele ser indispensable realizar su estudio, con objeto de poder determinar la especie.

Los métodos que permiten poderlos evidenciar y que serán mencionados en las pruebas prácticas, derivan todos del método auxonográfico.

ESTUDIOS PRACTICOS.

Realizados en las mermeladas que se investigaron para determinar el tipo de levadura.

A).-Aislamiento De Las Levaduras.

El aislamiento de las levaduras se practica sobre placas petri.

Se puede hacer cuantitativo, si se resierbra en cada placa, cantidades conocidas ó diluciones de título conocido correspondientes al sustrato que se va a examinar.

Los medios normales y corrientes de cultivo son: Agua de Tiurailons glucosado-geloso, Gelosa de Sabouraud para aislamiento; El medio glucosado de patata, ó el medio glucosado en extracto de levadura reconoceno para la investigación de las levaduras u mohos que aparecen en los productos alimenticios. Estos dos últimos medios deben acidificarse en el momento de su empleo mediante ácido tartárico.

Se emplea igualmente el mosto de cerveza gelosada. Las colonias de levaduras aparecen sobre éstos medios, transcurridas por lo menos 48 hs. de incubación a una temperatura de 25 °C.

Se puede utilizar igualmente el mosto de uvas pasteurizado y gelatinado en el momento de su empleo.

B).-IDENTIFICACION EN LAS LEVADURAS.

B).-IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS.

Antes de proceder a las pruebas de identificación de las levaduras replicar todas las cepas reunidas sobre un medio rico de gelosa inclinado en tubo, tal como el agua de touraillens, glucosada gelocada.

A partir de éstos cultivos se efectúan las siguientes manipulaciones.

I.-EXAMEN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS.

I.-A partir de cada uno de los cultivos puros obtenidos precedentemente se confeccionan suspensiones en el agua destilada. A partir de éstas suspensiones se resiembrá:

a).-Dos placas de petri, ocupadas por el medio de Sabouraud, mediante la técnica de las extensiones superficiales. Se deposita en el centro de una de las placas, una gota de la suspensión de la levadura. Se extiende por toda la superficie, mediante la ayuda de un aza de platino, se procede de la misma forma sobre una segunda placa, transcurridas por lo menos 48 hs. de incubación a una temperatura de 25 °C. aparecen unas colonias bien separadas, por lo menos en una de las dos placas.

2).-A partir de cultivos iniciales sobre gelosa inclinado, se resiembrá con la ayuda de un aza de platino:

a).-Un tubo con el medio de Gorodkova mediante depósito de 3 ó 4 puntos de siembra en la superficie.

b).-Un tubo conteniendo un trozo de zanahoria en estria.

c).-Un tubo con el medio de F.C.E. en estria bajo la forma siguiente: practicando un estriado muy apretado en el fondo del tubo, terminando después en una línea recta, ligeramente húmeda en la gelosa.

Se llevan las placas y los tubos reseñados a una estufa que esté a la temperatura de 25 °C.

EXAMEN DE LOS RESULTADOS.

a).-Aspecto de las colonias sobre medio sólido.

Se aprecia con cuidado el aspecto de las colonias aisladas que se han desarrollado sobre el medio gelosado en las placas de petri.

b).-FORMA DE LAS CÉLULAS. Dimensiones y tipo de reproducción vegetativa. Se recoge una gota de cultivo obtenido sobre uno de los dos tubos que contienen el medio, y que tenga por lo menos un tiempo que oscile entre dos y tres días. Se realiza un exámen en estado fresco de la citada gota, entre porta y cubre. Apreciando la forma de las células, su reproducción vegetativa, así como sus dimensiones, mediante un micrómetro ocular contrastado.

c).-FACULTAD ESPORULANTE.

Se realiza un exámen al estado fresco, en una gota de agua, las levaduras recojidas a partir del medio de Gerodkva, transcurridos por lo menos tres días de incubación. Notar si tiene lugar la presencia de ascosporas, su forma y número de las mismas en el interior de las ascas.

Si el resultado de éste exámen es negativo, examinar de la misma forma, los cultivos obtenidos sobre el trozo de zanhería, transcurridos por lo menos 8 días de incubación.

En caso de resultado igualmente negativo, sobre este medio, se hace una prueba sobre bloque de yeso.

A este efecto se utiliza un bloque de yeso, en una de cuyas caras, se presenta una excavación. El bloque se coloca sobre un cristallizador, lleno de agua hasta media altura del citado bloque. El conjunto formado por bloque cristallizador-agua se esteriliza en autoclave.

Para provocar la esporulación, se deposita en la excavación, una gota del cultivo de levadura en plena vitalidad, cultivada durante un período de incubación de 48 hs.

Se recubre el cristallizador con su tapadera y se lleva a una estufa a una temperatura de 25 °C.

La esporulación precisa por lo menos 7 a 3 días.

Se examina cada 24 hs. al microscopio.

d).-Facultad de filamentación.

Examinar los cultivos sobre el medio F.C.B. transcurridos por lo menos de 3 a 5 días de incubación.

se retira con el aza de platino un pequeño fragmento de gelosa, de la parte superior del medio, resombreado en línea profunda. Se aplasta sobre un porta, mediante presión con el cubre y se examina con el objetivo de inmersión.

1.-EXAMEN DE LOS CARACTERES FISICOLÓGICOS.

a).-A respecto de los cultivos sobre medio líquido.

Transcurridos de dos a tres días de incubación sobre el segundo tubo, se aprecia con cuidado el aspecto de los cultivos.

Se vuelven a introducir los tubos en la estufa, a una temperatura de 25 °C. Examinarlos nuevamente, transcurridos 15 días de incubación y nuevamente al día siguiente.

Se aprecia entonces de forma eventual la aparición de un velo tardío.

b).-Fermentación de los alúcidos.

1.-TECNICA DE GUERRA:

Se distribuye el agua de levadura en tubos profundos, (tubos fermentador Durham), que tengan aproximadamente una altura de unos 5 cms.

Se añade a la superficie líquida de cada tubo algunas gotas de parafina - blanda, fundida estéril que al enfriarse constituirá un tapón.

Se evitará en lo posible la formación de burbujas de aire, localizadas por debajo de la parafina.

Se llevan los tubos a una estufa a la temperatura de 25 °C.

Transcurridas por lo menos 24 hs., se comprueban los resultados.

Si el test es positivo, el tapón de parafina queda más ó menos separado, según el poder ó grado fermentativo.

Si las siembras han estado igualadas en el número de células de la misma antigüedad, el medio de cultivo ocupa en todos los tubos el mismo volumen y en todos ellos hay un idéntico porcentaje en azúcar, y así se podrá comparar, mediante una simple apreciación, el poder fermentativo.

CASO PARTICULAR DE LA RAFINOSA.

No se puede someter a esta prueba, más que las levaduras que se han muestra-

do como caproces de provocar la fermentación de la sacarosa.

I.-MÉTODO PASADO DE RUTINA.

Este método está basado, en la circunstancia de que la rafinosa no es un azúcar reductor, mientras que la melibiosa si lo es.

MÉTODO.

Se retira un centímetro de cultivo de la levadura sobre rafinosa, en caso de fermentación positiva, se añade un centímetro cúbico de líquido de Fehling, se pone a hervir.

La presencia de un azúcar se manifiesta por la formación de un precipitado rojo ladrillo de óxido cuproso.

Se pueden presentar dos casos:

Ausencia de azúcar reductor: la rafinosa ha sido totalmente utilizada durante la fermentación. Se dice entonces que la levadura considerada hace fermentar totalmente a la rafinosa.

Presencia de azúcar reductor: Puede ser la melibiosa ó la galactosa es decir, en el primer caso se trata de una levadura que actúa fermentando solo una tercera parte de la rafinosa; en el segundo caso se trata de una levadura que fermenta solamente las dos terceras partes de la rafinosa.

Es preciso recordar, que las levaduras que provocan la fermentación de la rafinosa en sus dos terceras partes, son sumamente raras y que sus distintos caracteres morfológicos ó fisiológicos son suficientes para poderlos diferenciar. Por el contrario las levaduras que hacen fermentar un tercio de la rafinosa son relativamente numerosas.

El *Saccharomyces Pastorianus* fermenta solamente dos tercios de la rafinosa.

c).-Asimilación de los glúcidos por vía oxidativa.

El método a utilizar es el método auxanográfico.

Se deposita en un placa petri, unas gotas correspondientes a una suspensión espesa de levadura que se va a estudiar, después de verter un medio gelosado, fundido y enfriado a unos 40 °C.

HOMOGENEIZAR.

Se deja que se solidifique y se seca, no tarde, las superficies de las placas en una estufa durante algunos minutos.

El medio gelosado puede ser un medio mineral exento de glúcidos ó bien a base de gelosa con extracto de levadura.

Cuando la superficie de las placas petri está seca, se dispone de unos discos de papel impregnados de cada uno de los azúcares que se van a ensayar: glucosa, sacarosa, maltosa, galactosa y lactosa.

Se deja secar (impregnación) a la estufa, sin la tapa antes de cerrar la placa y volverla al revés.

Transcurridas de 24 a 48 hs. de incubación a la temperatura de 25 °C. ya se pueden observar los resultados. La asimilación oxidativa de un azúcar es positiva, cuando aparece una zona opaca que traduce el crecimiento de la levadura que se desarrolla alrededor del disco que encierra el azúcar considerado. La asimilación de la glucosa es siempre positiva. La prueba concerniente a éste azúcar, sirve de testigo acerca de la vitalidad del germen sobre el medio.

d). -Asimilación del nitrógeno de los nitratos.

La técnica que se utiliza es todavía el método auxonográfico. Los discos de prueba, se impregnan de una solución de nitratos de potasio, y los discos impregnados de sulfato de amonio sirven como testigos acerca de la vitalidad del germen sobre el medio.

e). -Comprobación de otros caracteres fisiológicos.

I. -Hidrólisis de la arbutina.

La arbutina es un glúcido, que hidrolizado proporciona glucosa y la hidroquinona.

Se introducen los tubos de gelosa al extracto de levadura, fundida y enfriada a una temperatura de 40 °C., una solución estéril de arbutina, que permita obtener una concentración final de 5 g., así como una gota de solución concentrada de percloruro de hierro. Se vierte el contenido de un

de un tubo en una placa petri y se espera hasta que se solidifique, se resiembra con ayuda del aza de platino mediante puntos de superficie del medio en la cepa de levadura que se va a estudiar.

Transcurridos por lo menos 48 hs. de incubación, la hidrólisis de la arbutina es positiva, cuando las colonias de las levaduras se encuentran rodeadas de un halo negro, que traduce la liberación de la hidroquinona.

2).- HIDRÓLISIS DE LAS GRASAS

Se vierte en una placa petri, el contenido de un tubo que encierre a la vegetalina fundida.

Se espera a que se solidifique la grasa, llevar las placas al refrigerador para facilitar el endurecimiento de la grasa.

Enseguida se vierte rápidamente por encima un tubo de gelosa con extracto de levadura, que contenga 0.1% de carbonato de calcio y enfriar rápidamente introduciendo nuevamente en el refrigerador.

No deben quedar mezcladas las dos cepas.

Se realiza una resiembra con la ayuda del aza de platino por la técnica de los puntos a partir de la cepa que se va a estudiar, (cepa de levadura).

Transcurridas 48 hs. de incubación a la temperatura de 25 °C. se observa que la hidrólisis de la materia grasa es positiva, cuando por debajo de la colonia desarrollada ha tenido lugar la aparición de un precipitado blanco, que es la sal cálcica del ácido graso liberado.

3).- Investigación de la aparición de una fuerte acidez.

El medio de cultivo está constituido a base de gelosa con extracto de levadura glucosada al 5% al cual se le ha agregado antes de la esterilización, carbonato de calcio al 0.5%. El carbonato de calcio tiene que hallarse repartido uniformemente en el medio.

La resiembra se realiza mediante picadura en tubo culot con el hilo direc-

Transcurridos 15 días de incubación, los tubos en los cuales se ha disuelto la totalidad del carbonato de calcio encierran a las levaduras que son consideradas como muy acidificantes.

CONCLUSIONES.

1.- El desarrollo de las levaduras y su crecimiento es propiciado por las siguientes causas:

- 1.-Humedad excesiva en el almacén donde se guarda la mermelada. En general se debe conservar un cierto grado de humedad (del 10 al 20%) no debe jamás ser rebasado. Si la humedad es de 25% se favorece el desarrollo de mohos, levaduras y bacterias.
- 2.-Contaminación anterior al cierre de los botes ó tarros. El envase de las mermeladas es esencial para conservar el alimento de toda contaminación.
- 3.-Bajo contenido en sólidos solubles del producto (límite peligroso 65%).
- 4.-Contaminación de las películas ó membranas utilizadas como tapas de los tarros.
- 5.-Mermelada poco firme (los fermentos pueden crecer en las mermeladas poco firmes).

Para el desarrollo de los microorganismos es necesario un determinado grado de humedad. Por eso las mermeladas deben alcanzar cierta concentración para que quede detenido el desarrollo de los microorganismos. Esto se verifica por la disminución de la cantidad del agua y aumentando la concentración de los constituyentes y sobre todo ácidos y azúcares. Para conservar la mermelada es necesario oponerse a la acción de las alteraciones que es susceptible de experimentar, ó sea a la acción de los microbios y de las enzimas.

O bien detener la acción de los microbios y de las enzimas sin destruirlos, pero poniéndolos en condiciones que no puedan ejercer esta acción. En el caso de las mermeladas, si estas tienen una débil concentración de azúcar entonces constituyen un medio abonado para los microorganismos y en particular para las levaduras; por el contrario, todo desarrollo microbiano queda detenido en un medio que contenga por lo menos 65 a 66%

de azúcar.

Para evitarse el crecimiento deberá tomarse en cuenta lo siguiente:

Comprobarse la humedad y temperatura del almacén (óptima 80%).

Determinar con el refractómetro los sólidos.

Comprobar la temperatura del almacén y mantener una temperatura baja y uniforme.

INDICE.

INTRODUCCION.....

GENERALIDADES.....

IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS.....

ESTUDIOS PRACTICOS.....

RESULTADOS.....

CONCLUSIONES.....

BIBLIOGRAFIA.....