

Instituto de Fermentaciones Industriales
Patronato «Juan de la Cierva» del C. S. I. C.
Madrid

Resistencia a los antisépticos de las levaduras vínicas de Aragón *

por

F. G. Hegardt, M. Tomeo-Lacrué y B. Iñigo Leal

(Recibido para publicar el 26 de julio de 1968)

En un trabajo previo (6) se han aislado 190 cepas de levaduras correspondientes a dieciséis especies blastomicéticas de mostos de uva producidos en la zona de Aragón. El quimismo fermentativo de estas cepas, que hace que fermenten los mostos hasta valores muy elevados de grado alcohólico, y el interés industrial que tiene la posibilidad de obtener los mejores vinos a partir de mostos muy azucarados, como los que se originan en esta tierra, indujo a estudiar la resistencia de cada una de las especies halladas frente a dosis crecientes de algunos antisépticos.

El objeto de este trabajo es determinar los antisépticos más idóneos y las dosis convenientes para inhibir la fermentación de los mostos de uva durante un corto período de tiempo, posibilitando la práctica de un desfangado, y posterior fermentación de un modo controlado. Igualmente, se estudia la dosis letal para cada especie de los conservadores químicos considerados.

Material y métodos

Se ha utilizado en estos ensayos un antiséptico comúnmente empleado desde

tiempo: el metabisulfito potásico y otro recientemente recomendado por la bibliografía, el ácido sórbico.

El SO₂ ha sido estudiado ampliamente. CHALENKO y KORSKOVA (2) estudiaron el efecto inhibitor que sobre el metabolismo de ácidos tiene el *Saccharomyces acidodevoratus*. MARKH y SCHERBAKOVA (7) comprobaron el papel del SO₂ como inhibidor enzimático de la catabolización de los aminoácidos por diversos microorganismos del mosto de uva. IÑIGO y VÁZQUEZ (4) estudiaron la resistencia frente al metabisulfito potásico de levaduras aisladas en mostos de manzana de Asturias.

El ácido sórbico ejerce una acción inhibitora y letal sobre ciertas especies microbianas. La acción, estudiada por GOODING y col. (3), se basa en la inhibición de las deshidrogenasas de los procesos de oxidación de los ácidos grasos, si bien PELLARONI y col. (9) sugieren que la acción inhibitora se debe a la formación de sorbil-CoA que interfiere la síntesis de

* Trabajo realizado con la ayuda de una Beca de la Fundación Juan March, año 1962, concedida al primero de los firmantes.

ácido cítrico en las células. Otros autores estudian su acción fisiológica, resultando de perfecta inocuidad para ratas y mamíferos superiores (1). OSMAN y EL-MARIAH (8) estudian la concentración de ácido sórbico necesario para inhibir el *Saccharomyces ellipsoideus*. IÑIGO y VÁZQUEZ (4) investigaron la acción de este ácido frente a especies de levaduras que fermentan los mostos de manzana de Asturias. Los mismos autores con ARROYO (5) estudiaron el efecto inhibitorio sobre el agente específico de alteración de pulpa de membrillo y fijaron las proporciones útiles de inhibitorio.

En cuanto al empleo del ácido sórbico en enología, todos los ensayos se han dirigido a prevenir refermentaciones en vinos dulces embotellados. En este sentido son notables los trabajos de SUDARIO (11) y de SALLER (10). Posteriormente, TARANTOLA (12) investiga la influencia del ácido sórbico sobre diferentes especies de levaduras vínicas, cuando se emplea en proporciones menores a la fungistática, determinando también las proporciones fungistáticas y fungicidas frente al *Saccharomyces ellipsoideus* y ensayando la influencia que la densidad blastomictética y el grado alcohólico tienen sobre la eficacia inhibitoria del ácido sórbico en la fermentación alcohólica.

Para llevar a cabo estos ensayos, se dispusieron varias series de tubos con el dispositivo Durham, con un contenido de 8 ml de mosto, en los que se disolvió el antiséptico a ensayar en proporciones crecientes. Después se sembró con cultivo joven de levadura de 24 horas, en mosto de uva, 0,25 ml en total y se mantuvo a temperatura de 28° C. La prueba de fermentación se observa por la elevación de la campanita Durham. El mosto empleado fue obtenido de mosto concentrado, diluyendo con agua hasta una densidad de 14,2 Beaumé. Se añadió peptona Witte y fosfato amónico, ambos en proporción de 1 g/litro.

Transcurridos treinta días, se comprue-

ba la viabilidad de las células, añadiendo la misma cantidad de gelatina-agua al 20 por ciento que mosto había en el tubo de ensayo, poniendo la mezcla resultante en cápsulas Petri. Al cabo de seis días de observa el desarrollo de las colonias.

Las cepas ensayadas fueron las correspondientes a las especies siguientes: *Kloeckera apiculata* (Cepas 1 y 61); *K. lafaritii* (C. 91); *Torulopsis bacillaris* (C. 2); *Saccharomyces ellipsoideus* (C. 5, 11, 15 y 188); *S. mangini* (C. 9, 10, 59); *S. heterogenicus* (C. 29); *S. veronae* (C. 34 y 40); *S. pastorianus* (C. 69); *S. delbrueckii* (C. 81); *S. willianus* (C. 120); *S. chevalieri* (C. 184); *Candida pulcherrima* (C. 78); *Torulaspora rosei* (C. 94).

Resultados y discusión

En la tabla I se expresan las proporciones de metabisulfito potásico (mg/l) necesarias para inhibir el proceso fermentativo de las distintas especies de levaduras.

Todas las cepas ensayadas (salvo las números 9, 34 y 81) en proporción límite de fermentación dieron la prueba de viabilidad negativa, por lo que hay que suponer que la proporción ensayada fue letal.

En la tabla II se consignan las proporciones de ácido sórbico que inhiben el proceso fermentativo celular. Como el ácido sórbico es principalmente un inhibidor enzimático, no suele tener una acción letal sobre las células sino a concentraciones elevadas.

De los ensayos efectuados con metabisulfito potásico, cabe señalar que la especie *Saccharomyces veronae* tiene escasa resistencia a la acción de este producto, y a muy pequeña concentración se inhibe la fermentación por completo. Le siguen en resistencia al producto las especies *Kloeckera apiculata* y *K. lafaritii*. La especie *Torulopsis rosei*, con ser de segunda fermentación, necesita cantidades relativamente grandes para que se inhiba su acción fermentativa. Igual sucede con las

TABLA I
Concentraciones de metabisulfito potásico necesarias para inhibir el proceso fermentativo de distintas cepas de levaduras vínicas de Aragón

Cepa núm.	Metabisulfito potásico (mg/l)																							
	500	600	700	800	900	1000	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	2100	2200	2300	2400	2500	2600	2700	2800	2900
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
184	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Las concentraciones se expresan en mg/l. Los signos — indican que fue negativa la fermentación a esa proporción.

* No fermenta. La prueba de viabilidad fue positiva, aunque no a concentraciones superiores.

TABLA II

Concentraciones de ácido sórbico que inhiben el proceso fermentativo de diversas cepas de levaduras vínicas de Aragón. Las proporciones vienen expresadas en mgr/l. Los signos — indican que fue negativa la fermentación a esa proporción

Cepa	200	250	300	350	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200	1300
1	+	+	+	— ¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	+	+	+	+	+	+	— ²	—	—	—	—	—	—
5	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
9	+	+	+	+	+	— ¹	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	— ³	—	—	—	—
11	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	+	+	+	+	+	+	+	— ⁴	—	—	—	—	—
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
59	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
61	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
69	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
78	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
81	+	+	+	+	+	+	+	— ¹	—	—	—	—	—	—
91	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
94	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	— ¹	—
184	+	+	+	+	+	+	+	+	— ⁵	—	—	—	—	—
188	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	— ⁶	—

¹ No fermenta; prueba de viabilidad positiva. ² No fermenta a 700 pero vive a 900. ³ No fermenta a 900 pero vive a 1400. ⁴ No fermenta a 800 pero vive a 1200. ⁵ No fermenta a 800 pero vive a 1100. ⁶ No fermenta a 1200 pero vive a 1400.

especies *Candida pulcherrima* y *Torulopsis bacillaris*. Hay que hacer observar igualmente que las especies del género *Saccharomyces* resisten proporciones elevadas, por este orden: *S. mangini*, *S. willianus*, *S. pastorianus*, *S. delbrueckii*, *S. heterogenicus* y *S. chevalieri*.

Si observamos el cuadro correspondiente a la acción del ácido sórbico (tabla II) se ve que son necesarias menores dosis que de SO₂ para inhibir la fermentación normal de los mostos. La menos resistente a la acción del sórbico es la especie *Saccharomyces veronae* (C. 34 y 40). Le siguen en orden creciente de resistencia, *Candida pulcherrima*, *Torulopsis rosei*, *Kloeckera apiculata* (C. 1 y 61) y *K. lafarii*. Todas las demás especies muestran

una resistencia apreciable, pues la menos resistente de las del género *Saccharomyces*, el *S. mangini* (C. 9), fermenta a 400 mg/l, teniendo viabilidad a esta proporción. Le siguen en orden creciente de resistencia *Torulopsis bacillaris*, *Saccharomyces pastorianus*, *S. ellipsoideus* y *S. chevalieri*, siendo muy resistente a la acción del conservador ácido ascórbico, la especie *S. heterogenicus*, con comportamiento análogo al metabisulfito, así como también *S. willianus* y *S. ellipsoideus* (C. 188).

De estos resultados se puede inferir que las cepas de levaduras aisladas en Aragón presentan una resistencia a los conservadores químicos usuales, superior a la de otras regiones de España y del extranjero, sin duda por una aclimatación progresiva

a condiciones más desfavorables que en otras regiones, frente al alcohol, por la elevada densidad de los mostos que fermentan, y a los distintos antisépticos, por una progresiva adaptación enzimática al ser desarrollado el proceso fermentativo en condiciones más adversas.

Resumen

Se ha ensayado la resistencia de trece especies de levaduras vínicas aisladas en Aragón, frente a la acción fungicida y fungistática de dos conservadores químicos: metabisulfito potásico y ácido sórbico, fijándose las proporciones de agente inhibidor para cada cepa de levadura con respecto a los niveles de acción letal y levulostática. De los resultados se desprende que las levaduras del género *Saccharomyces* son las más resistentes de entre todas las ensayadas. También se hace notar que las levaduras vínicas de Aragón presentan una mayor resistencia a la inhibición que las de las otras cepas aisladas en España, fuera de esta región, y también que las del extranjero.

Summary

Aragon Wine Yeasts Resistance to Antiseptics

The resistance of thirteen species of wine yeasts isolated in Aragon against the fungicide and fungostatic actions of two chemical antiseptics: potassium pyrosulfite and sorbic acid has been tested, and the proportion between each inhibitory agent in every strain of yeasts and the lethal and levulostatic action, was laid

down. It emerges from the results that yeasts of the *Saccharomyces* group are most resistant among all tested. It is pointed out as well how wine yeasts isolated in Aragon present an inhibitory resistance greater than other strains isolated in the rest of Spain and abroad.

Bibliografía

1. CREMER, H. D., TOLCKMITT, W. y WENDERHOLD, J.: Justus Liebig Univ. Griessen. *Klin Wochschr.*, 37, 304, 1959.
2. CHALENKO, D. K. y KORSAKOVA, T. F.: *Trudy Tsentral Nauch. Issledovatel Sab. Vinodel. Prom.*, 1, 5, 1958.
3. GOODING, C., MELNICK, D. y LUCKMANN, G.: *Food Res.*, 19, 1954.
4. IÑIGO, B. y VÁZQUEZ, D.: *Rev. Cienc. Aplic.*, 68, 222, 1959.
5. IÑIGO, B., VÁZQUEZ, D. y ARROYO, V.: *Rev. Cienc. Aplic.*, 65, 516, 1958.
6. IÑIGO, B., TOMEO, M. y HEGARDT, F. G.: En prensa en *Rev. Agroq. y Technol. de Alimentos*.
7. MARKH, A. T. y SHCHERBAKOVA, E. V.: *Trudy Odessk. Technol. Inst. Pishchevoi i Kholodil. Prom.* IX, 2, 27, 1959.
8. OSMAN, H. G. y EL-MARIAH, A. J.: *Ann. Pharm. Assoc. Pract. Pharm. Ed.*, 49, 231, 1960.
9. PELLARONI, N. J., RIGONE DE PRITZ, J.: *Nature*, 185, 688, 1960.
10. SALLER, W. y KOLEWA, S.: *Rebe u wein*, 1, 21, 1957.
11. SUDARIO, E.: *Chim. Indust.*, 39, 811, 1957.
12. TARANTOLA, C.: *Atti Acc. Ital. della Vite e del Vino*, 9, 1, 1958.

