

# ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES DE ESTRÉS EN LEVADURAS INDUSTRIALES Y LEVADURAS DE PANIFICACIÓN

Bernardo Sigifredo<sup>1</sup>; M. Celeste Stroppiano<sup>1</sup>

Tutores: Ing. Romina A. Beltrán<sup>2</sup>; Tca. Nadia Z. Comba<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450. Villa María. Córdoba. Argentina

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química-GISIQ-F. R. Villa María de la UTN Av. Universidad 450, X5900HLR, Villa María, Córdoba, Argentina.

E-mail: bernisigi@hotmail.com

## RESUMEN

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno - O<sub>2</sub>), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los azúcares para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. Durante la experimentación se evaluó el comportamiento de las levaduras sometidas a intoxicación alcohólica, aumento de pH e infección con bacterias productoras de ácido láctico, en mostos de maíz, midiendo el rendimiento indirectamente por la pérdida de peso de la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación se pudo observar que tiene mayor resistencia a los cambios del medio las levaduras de uso industrial frente a las de uso en panificación.

También podemos decir que las levaduras de uso en panificación y las levaduras industriales presentan su mayor producción de alcohol durante el tiempo medio de incubación, siendo mayor el descenso de peso en la levadura utilizada industrialmente.

**PALABRAS CLAVES:** Fermentación alcohólica, levaduras industriales, levaduras de panificación, intoxicación alcohólica, aumento del pH, ácido láctico.

## 1. Introducción

Las levaduras son hongos unicelulares capaces de transformar los hidratos de carbono en alcohol y dióxido de carbono, proceso conocido como fermentación alcohólica. La especie más utilizada en dicho proceso es la *Saccharomyces Cerevisiae*. Para las fermentaciones a gran escala existen cepas modificadas genéticamente, como es el caso de levaduras industriales, con el fin de aumentar su capacidad de producción y resistencia a factores no óptimos, tales como altas temperaturas, elevadas concentraciones de etanol, entre otros. La diferencia existente entre las levaduras de uso industrial y las de uso cotidiano, o de panificación, se basan en que las últimas no poseen resistencia a altas concentraciones de etanol y a variaciones ocasionadas en el medio donde se encuentran, es decir, una pequeña modificación en las condiciones óptimas de trabajo repercute directamente en el rendimiento.

En un medio apto los microorganismos crecen favorablemente, un cambio en las condiciones de crecimiento como temperatura, presión osmótica, intoxicación alcohólica, infección bacteriana, alcalinización del medio afectará la propagación de los mismos, a éste estado de alteración se lo denomina normalmente estrés (Jacques, Lyons, & Kelsall, 2003).

En el presente trabajo se analizaron los efectos que producen los diferentes factores de estrés en la producción de alcohol de dos levaduras que tienen diferentes usos comerciales.

## 1.2. Intoxicación alcohólica

Cuando la levadura se encuentra en la etapa de reproducción produce una cantidad de alcohol 30 veces mayor que en su fase estacionaria. La primera fase es de latencia, durante la cual la levadura debe adaptarse al ambiente. En este periodo, es poco o nulo el crecimiento de la levadura y por consiguiente no se producirá alcohol (esta etapa tiene una duración de 4 a 12 horas). La segunda fase, llamada de crecimiento exponencial, es la más importante, en la que se produce casi la totalidad del alcohol. El tiempo que la levadura puede permanecer en esta fase es función de los nutrientes disponibles y los productos generados, factores que limitan la cantidad de alcohol producido. En mostos que contengan desde un 13% de alcohol la fermentación se verá afectada notablemente (Dacosta, 2007).

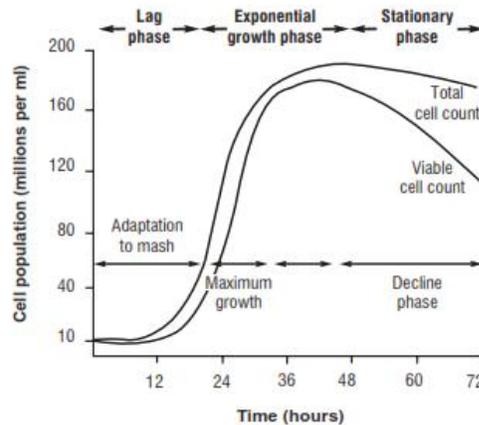


Figura 1: Curva de crecimiento microbiano (Jacques, Lyons, & Kelsall, 2003)

Se realizaron dos ensayos, con diferentes concentraciones de etanol, para comparar cómo el desarrollo de las levaduras se ve afectado, efecto que se reflejó en la merma de producción de dióxido de carbono.

## 1.3. Alcalinización del medio

El pH es un factor importante en la fermentación, debido al control que ejerce frente a la contaminación bacteriana como así también en el efecto del crecimiento de las levaduras, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol. Durante la fermentación la levadura toma el nitrógeno de los aminoácidos orgánicos, perdiendo su carácter anfótero y pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH del medio. Según estudios se halló que el pH más favorable para el crecimiento de la *Saccharomyces Cerevisiae* se encuentra entre 4.4 - 5.0, con un pH de 4.5 para su crecimiento óptimo. Un entorno neutro o moderadamente alcalino es poco favorable para el crecimiento de la levadura y la alcalinización súbita del medio, le supone una importante situación de estrés que afecta negativamente su crecimiento y productividad. Se evaluó el rendimiento de las levaduras frente al agregado de 6% de hidróxido de sodio, cantidad suficiente para llegar a un pH de 9 (Vargas, 2010).

## 1.4. Infección por bacterias productoras de ácido láctico

Los lactobacillus crecen en superficie sobre medio sólido, favoreciéndose su crecimiento en anaerobiosis al 5-10% de dióxido de carbono. El intervalo de temperatura y de pH óptimo de crecimiento se sitúa entre 35-38°C y 5,5-5,8 respectivamente. Los lactobacillus transforman la glucosa y las hexosaldehídicas similares. Los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico lo hacen por homofermentación o bien, producen ácido láctico y otros productos adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y

ácido succínico. Además producen peróxido de hidrogeno, radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas.

A pesar de que las levaduras producen algunos ácidos orgánicos durante la fermentación, las concentraciones son relativamente bajas en comparación con las producidas por los lactobacilos y otras bacterias contaminantes, afectando así el rendimiento de alcohol. (Hernandez Gil, 2001)

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos y Equipamiento**

Muestras de maíz procedentes de la zona centro-sur de la provincia de Córdoba, levadura activa seca Industrial Bayanus, Laffort, levadura activa seca comercial Levox, enzimas  $\alpha$ -amilasa Spexyme® Alphasylgluco-amilasa Distillase® SSF, ácido sulfúrico Pro-análisis Cicarelli, frascos erlenmeyer de 500 ml, tapones de silicona con airlocks, balanzas Scout Pro, Ohaus® y Scale Systems, Ecopower, agitador Crismet Modelo: DALV-50, agitador orbital TS 2000A, estufa Reciterm®, molino, embudo de Buchner, bomba de vacío, refractómetro óptico Arcano Modelo: Ref 107 y digital Modelo Arbo-95, micropipetas Boeco de 1-10 ml, de 10-100 $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l, cintas indicadoras de pH Merc, hidróxido de sodio Pro-análisis Cicarelli, etanol Porta Hermanos, yogurt de reconocida marca.

### **2.2. Preparación del mosto**

Para la preparación del mosto se mezclaron 500 g de maíz previamente molido con 1400 ml de agua de red de cloro residual en un vaso de precipitado. Luego se agregó 0.033 ml de enzima alfa-amilasa, se agitó 5 minutos y se calentó en un recipiente presurizado durante 30 minutos, donde luego de alcanzar este tiempo se despresurizó para evaporar agua a presión atmosférica durante 2 minutos. A continuación se enfrió a 60°C aproximadamente. Se agregaron 0,067 ml de alfa-amilasa y se agitó durante 30 minutos. A continuación se corrigió el pH del mosto a 5 con ácido sulfúrico, se agregó 0,31 ml de gluco-amilasa, se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se dividió el mosto en dos partes iguales, agregando 0,5 g de levadura industrial a la primera, y 0,5 g de levadura de panificación a la restante, ambas hidratadas previamente en agua destilada.

A cada mitad de mosto se lo dividió en 3 partes iguales, tomando una como blanco e infectando las dos restantes con el factor de estrés a evaluar, graduación de alcohol, alcalinización del medio o inhibición por bacterias productoras de ácido láctico.

La producción y liberación de dióxido de carbono durante el proceso de fermentación se vio reflejado en el descenso de peso. Se pesó cada Erlenmeyer vacío con su respectivo airlock y se registró el peso total. Se incubó durante 96 h en estufa a una temperatura de 32°C con agitación intermitente y cada 24 h se pesó.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

Al intoxicar el mosto con alcohol, obteniendo una concentración final del 14%, no se observó descenso de peso hasta las 48 h, entendiéndose que esto puede ocurrir por el proceso de adaptación de la levadura, prolongado por estrés provocado. Cerca del periodo final de incubación el porcentaje de descenso es invariable ya que las levaduras fueron afectadas por el alcohol adicionado y el producido.

En la figura 2 se pueden observar de forma comparativa el análisis del promedio de las dos muestras inhibidas junto con los blancos de cada levadura. El mayor descenso, consecuencia de la mayor producción de alcohol fue en los blancos, como era esperado. En ésta grafica se puede ver como el blanco de la levadura industrial produce mayor alcohol que el blanco de la levadura de

panificación, esto se debe a que las levaduras de uso industrial están diseñadas para ser más resistentes debido a la modificación genética que presentan.

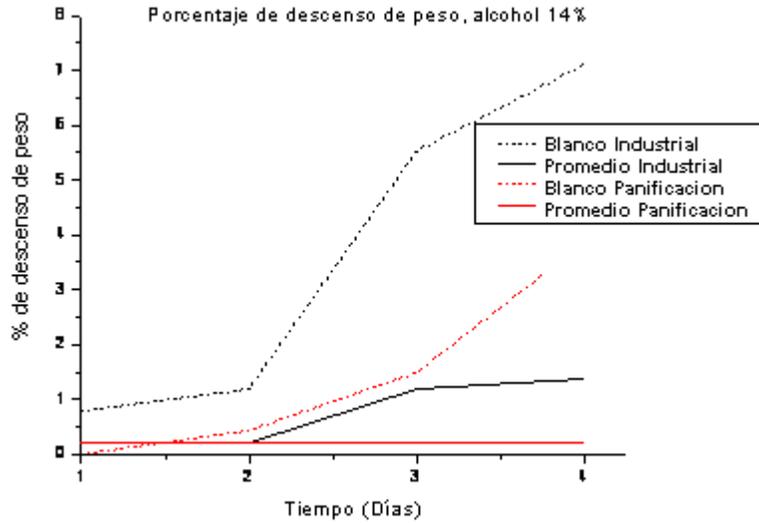


Figura 2: Curvas de descenso de peso con 14% de etanol

En la figura 3 se pueden observar un análisis comparativo del promedio de las dos muestras intoxicadas con alcohol hasta la concentración final del 6%, junto con los blancos las levaduras analizadas. En el mismo puede observarse descenso de peso, con diferentes velocidades, para la levadura industrial, mientras que la de panificación tuvo un período de adaptación mayor, y el descenso total de peso fue menor. Respecto a las muestras no infectadas, la levadura industrial tuvo un tiempo de adaptación, pero luego de este el descenso de peso fue mayor a la levadura de panificación.

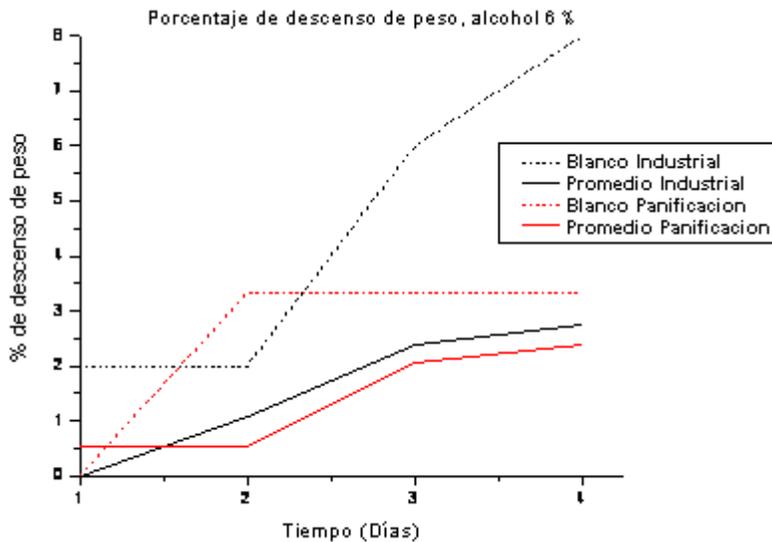


Figura 3: Curvas de descenso de peso con 6% de etanol

Otro factor de estrés ensayado fue el aumento de pH, logrado con el agregado de NaOH. En la figura 4 se graficaron los promedios de las muestras infectadas y el blanco para la levadura industrial, versus el tiempo de incubación, faltando el de levadura de panificación ya que se rompió el Erlenmeyer en el cual se ensayaba, y por inconvenientes de tiempo no se pudo repetir. En este caso

puede observarse que ambas levaduras presentaron un promedio de descenso de peso similar, pero inferior al blanco de la levadura industrial.

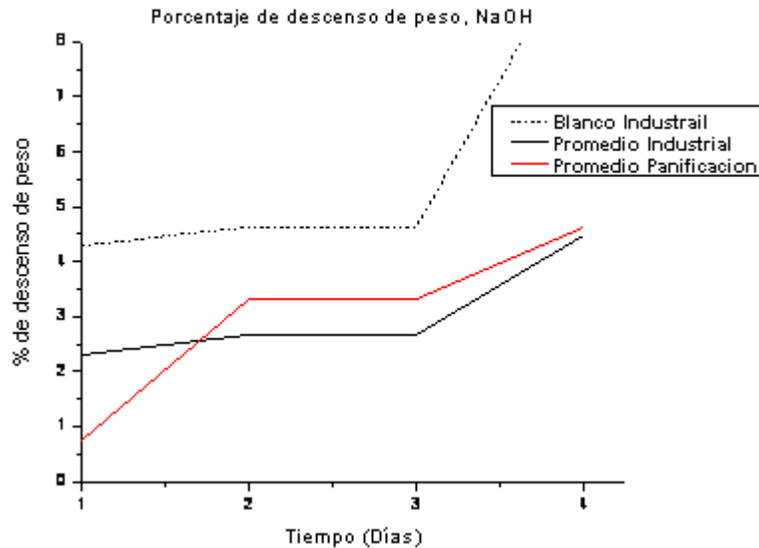


Figura 4: Curvas de descenso de peso con NaOH

También se analizó intoxicación por medio del agregado de bacterias productoras de ácido láctico, comparando la disminución de los grados Brix de las muestras patrones, observando que las levaduras industriales, a igual periodo de tiempo, consumen mayor cantidad de azúcar que las levaduras de panificación, traduciéndose esto en una mayor producción de alcohol. Cuando se comparan las muestras sin bacterias lácticas con aquellas que fueron infectadas, se verifica una disminución aún mayor de los grados Brix, debido a la mayor actividad microbiana. Estos microorganismos no son productores de etanol, por lo cual consumen sustrato que podría convertirse en alcohol, para generar ácido láctico y otros productos, siendo esto perjudicial para el rendimiento del proceso.

A continuación se ilustran las tablas con los valores de grados Brix medido con refractómetro digital, ya que presenta mejor precisión:

**Tabla 1:** Grados Brix al inicio y final de la fermentación, en Blanco e infectado

	Levaduras industriales		Levaduras de panificación	
	Blanco	Estrés	Blanco	Estrés
<sup>o</sup> Brix iniciales	16,4	16,4	16,4	16,4
<sup>o</sup> Brix finales	6,6	5,2	8,1	6

#### 4. Conclusiones

Como consecuencia de los resultados obtenidos podemos concluir que las levaduras de uso industrial presentan una resistencia mayor a la inhibición de diferentes factores de intoxicación. Este resultado es bueno, ya que, éste tipo de levaduras están más preparadas genéticamente para poder resistir las diferentes situaciones que se presentan durante un proceso productivo. En contraste con aquellas de uso en panificación que se ven más afectadas a los factores de estrés dados para la producción de alcohol.

## 5. Agradecimientos

A la SCyT de la FRVM de la UTN por el apoyo recibido para el desarrollo del presente trabajo y a la empresa PORTA Hnos S.A. por sus aportes de insumos, equipamientos y disponibilidad de información técnica específica que permitieron la realización de los ensayos experimentales. Los cuales fueron recibidos en el contexto del convenio de vinculación tecnológica existente.

## 6. Referencias

- Gil, R. H. (2001). Respiracion. Mérida - Venezuela: UVD, Unidad de Desarrollo Virtual.
- Jacques, K., Lyons, T., & Kelsall, D. (2003). The alcohol textbook. Nottingham University Press.
- Vargas, L. T., Ponce, H. R., Fernández, I. V., Guzmán, A. L., Santos, M. P., & Basurto, J. H. (2010). Complementos nutricionales para el rendimiento y nutrición del cultivo de melón con fertirriego y acolchado. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 5-15.
- Vázquez, H., & Dacosta, O. (Mayo 2007). Fermentación Alcohólica: Una Opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ing Investig Tecnol., 249-259.