Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"
Decanato de Agronomía
Programa de Ingeniería Agroindustrial
Revista Científica Agroindustria, Sociedad y Ambiente (A.S.A.)
ISSN: 2343-6115 Deposito Legal No ppl201302LA4406

Evaluación del proceso de propagación y fermentación de dos cepas de levadura *Saccharromyces cerevisiae* y su influencia en el perfil sensorial del alcohol obtenido en la primera destilación, en DUSA

Gómez Hernández, Franklin Rafael

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Agronomía. Programa de Ingeniería Agroindustrial. Barquisimeto, Venezuela

https://orcid.org/0000-0001-5306-2641 frgh29@gmail.com

ASA/Artículo
doi: http://doi.org/10.5281/zenodo.10389947
Recibido: 24-04-2023
Aceptado: 09-11-2023

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el proceso de propagación y fermentación de dos cepas de levadura Saccharromyces cerevisiae. Se utilizó las cepas Y193 y Super Yeast Alcotec Turbo 24 a partir de células nuevas cultivadas en laboratorio, de la cepa Y193 se utilizaron dos muestras: una del proceso industrial reforzada y la otra partía de células nuevas cultivadas en laboratorio. El proceso de propagación y fermentación se llevó a cabo a nivel de laboratorio e industrial. La eficiencia fermentativa se encuentra por encima de 85% y la edad fermentativa fue de 19 - 20 horas. Las tres levaduras evidencian la producción de olores similares en el primer alcohol destilado. De todas las levaduras Y193 del proceso industrial tiene olores mucho más suaves con respecto a las muestras de fermentaciones con levadura nueva. Entre las dos levaduras con células nuevas cultivadas en laboratorios la cepa Y193 presenta olores más pesados (cabezas, colas, aceitosos) y en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 predominan olores más dulces-frutales. Se obtuvo que en las tres muestras de alcohol a partir de las fermentaciones usando tres cepas los congéneres presentes fueron: acetaldehído, acetato de etilo, i-butanol, N-propanol, I-amílico y furfural. Para el acetaldehído y el furfural, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un nivel del 95% de confianza. En cuanto al acetato de etilo, N-propanol, i-butanol e I-amílico existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. En conclusión, los dos procesos biológicos propagación (para el crecimiento celular y obtener biomasa) y fermentación (con la finalidad de producir alcohol) influyen en el perfil sensorial del alcohol obtenido en la primera destilación.

Palabras claves: propagación, fermentación, Saccharromyces cerevisiae, alcohol, congéneres

Evaluation of the propagation and fermentation process of two Saccharromyces cerevisiae yeast strains and their influence on the sensory profile of the alcohol obtained in the first distillation, at Destilerías Unidas S.A.

ABSTRACT

In the present work, the propagation and fermentation process of two Saccharromyces cerevisiae yeast strains was evaluated. The Y193 and Super Yeast Alcotec Turbo 24 strains were used from new cells grown in the laboratory. Two samples of the Y193 strain were used: one was from the reinforced industrial process and the other was from new cells grown in the laboratory. The propagation and fermentation process was carried out at laboratory and industrial level. The fermentation efficiency is above 85% and the fermentation age was 19 - 20 hours. All three yeasts evidenced the production of similar odors in the first distilled alcohol. Of all the yeasts Y193 from the industrial process has much milder odors compared to the samples of fermentations with new yeast. Among the two yeasts with new cells grown in laboratories, the Y193 strain has heavier odors (heads, tails, oily) and the Super Yeast Alcotec Turbo 24 strain has a predominance of sweeter-fruitier odors. It was obtained that in the three alcohol samples from the fermentations using three strains the congeners present were: acetaldehyde, ethyl acetate, i-butanol, N-propanol, I-amyl and furfural. For acetaldehyde and furfural, there is no statistically significant difference between the means at the 95% confidence level. For ethyl acetate, N-propanol, i-butanol and I-amyl there is a statistically significant difference at the 95% confidence level. In conclusion, the two biological processes propagation (for cell growth and to obtain biomass) and fermentation (to produce alcohol) influence the sensory profile of the alcohol obtained in the first distillation.

Keywords: propagation, fermentation, Saccharromyces cerevisiae, alcohol, congeners.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos procesados a nivel industrial pueden ser obtenidos por diferentes mecanismos biológicos y químicos. En los biológicos uno de los utilizados es el proceso de fermentación que consiste en la transformación de biomoléculas complejas en moléculas sencillas, ocurriendo una oxidación incompleta, en ausencia de oxígeno, donde el producto final es un compuesto orgánico. Existen diversos tipos de fermentaciones como son: acética, alcohólica, butírica y láctica (Owen, 1989).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia de (oxígeno O2), originado por la actividad de microorganismos que procesan los carbohidratos principalmente azúcares como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, para obtener como productos finales: alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO2) en forma de gas y moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el ron, whiskies, vino, la cerveza y otras (Jorgensen, 1959).

Las levaduras y bacterias que realizan el proceso de fermentación son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales, contribuyendo en gran medida al sabor de los productos fermentados los cuales son analizados mediantes cromatografía y evaluación sensorial (Garissini, 1964). En la fermentación alcohólica se utiliza levaduras, existen diversas especies, la más usado es Saccharromyces cerevisiae (S. cerevisiae).

Para llevar a cabo el proceso de fermentación industrial es necesario cultivar levaduras, el proceso se hace siguiendo una secuencia donde se multiplican los cultivos de laboratorio hasta un volumen tal que la masa de levadura obtenga una relación adecuada con la cantidad de mosto a fermentar a nivel industrial, a este proceso se le conoce como propagación (Jorgensen, 1959).

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general: evaluar el proceso de propagación y fermentación de dos cepas de levadura Saccharromyces cerevisiae y su influencia en el perfil sensorial del alcohol obtenido en la primera destilación en la empresa Destilerías Unidas S.A. (DUSA), ubicada en La Miel estado Lara. Además, comprende los objetivos específicos: 1. Analizar a nivel industrial el proceso de propagación y

fermentación de la levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso industrial). 2. Estudiar a escala de laboratorio la fermentación de cuatro cepas de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepas PE-2, CAF1, Angel Thermalresistance y Super Yeast Alcotec Turbo 24). 3. Comparar a nivel industrial la propagación y fermentación de células nuevas cultivas en laboratorio de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa con mejores resultados a nivel de laboratorio y cepa Y193). 4. Caracterizar sensorial y químicamente el alcohol obtenido en la primera destilación (Low wine) de mostos fermentados obtenidos a partir de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso industrial, cepa Y193 células nuevas cultivas en laboratorio y cepa con mejores resultados a nivel de laboratorio).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó el proceso industrial y se evaluaron cuatro cepas de (S. cerevisiae) a nivel de laboratorio, mediante cuatro procedimientos a continuación:

1. Analizar a nivel industrial el proceso de propagación y fermentación de la levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso).

1.1 Se comienza con la propagación de la levadura en el laboratorio de microbiología, utilizando melaza diluida a una concentración entre 11 – 14 °Brix.

1.2 Agregar en 16 tubos de 50 mL de capacidad 20 mL de melaza diluida, en 8 fiolas de 250 mL de capacidad 200 mL de melaza diluida y en 4 fiolas de 5 L de capacidad 4 L de melaza diluida, tapar con algodón y papel aluminio, esterilizar a 121 °C / 15 minutos.

1.3 Se inocula el cultivo de Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193) en los tubos con melaza y fermento durante 24 horas a 25 – 30 °C.

1.4 Luego se agregan dos tubos fermentados en cada fiola de 250 mL y al mismo tiempo se adiciona 0,15 g de nutriente (Fosfato diamónico), agitar vigorosamente y tapar con algodón, incubar en la estufa a 25 – 30 °C / 24 horas.

1.5 Realizar contaje celular de cada fiola de 250 mL, mediante la siguiente formula señalada por GAB Sistemática Analítica S.L.:

$$\frac{levaduras\ contadas}{16\ x\ 5} x \frac{400}{0{,}1\ mm^3} x \frac{1000\ mm^3}{1\ mL} x \frac{100}{volumen\ de\ muestra} = \frac{cel}{mL}$$

1.6 Agregar dos fiolas de 250 mL en cada fiola de 5 L y 6 g de nutriente (Fosfato diamónico), incubar a 25 – 30 °C / 24 horas. Repetir punto número 1.5

1.7 Propagación de semilleros y pie de cubas a nivel industrial. Antes de inocular los cultivos preparados en laboratorio se limpia con agua y vapor los semilleros, pie de cubas y esterilizadores a utilizar. Pesar 700 Kg de melaza y agregar en el esterilizador de 5.000 L de capacidad con agua para ajustar un °Brix entre 11 – 14. Inyectar vapor directo hasta alcanzar 60 °C / 30 minutos. Enfriar a 28 - 30 °C.

1.8 Agregar melaza esterilizada en los semilleros de 2.000 L de capacidad y dos fiolas de 5 L en cada uno. Inyectar aire para favorecer la reproducción celular. Medir °Brix, pH y temperatura durante cada dos horas y dejar fermentar hasta que el °Brix permanezca constante durante dos repeticiones. Si la temperatura aumenta a 33°C se debe aplicar enfriamiento con agua.

1.9 Realizar contaje celular como se indica en el punto 1.5 y viabilidad celular a cada semillero según la siguiente formula señalada por GAB Sistemática Analítica S.L.:

$$\frac{células\ totales\ contadas - células\ muertas}{células\ totales\ contadas} x\ 100 = \%\ viabilidad\ celular$$

1.10 Al finalizar el proceso se adiciona cada semillero en un pie de cuba de 9.000L de capacidad y completar con melaza esterilizada. Inyectar aire para favorecer la reproducción celular. Medir °Brix, pH y temperatura durante cada dos horas y dejar fermentar hasta que el °Brix permanezca constante durante dos repeticiones. Si la temperatura aumenta a 33°C se debe aplicar enfriamiento con recirculación de agua.

1.11 Terminado el proceso de propagación en el pie de cubas, donde se busca reproducir levaduras y no fermentar (producir alcohol) se inoculan dos pie de cubas por cada fermentador a sembrar de 100.000 L de capacidad además de agregar la crema (levadura concentrada), en este caso se busca reforzar la levadura existente en planta con células nuevas.

1.12 Realizar contaje celular como se indica en el punto 1.5 y viabilidad celular según punto 1.9 a cada pie de cuba. En cada fermentador se mide °Brix, pH y temperatura durante cada dos horas y hasta que el °Brix permanezca constante durante dos repeticiones. Si la temperatura aumenta a 35°C mediante un sistema automatizado se aplica enfriamiento con

1.13 Al finalizar la fermentación, se procede a centrifugar para concentrar la levadura (crema) a la cual se le realiza contaje celular como se indica en el punto 1.5 y viabilidad celular según punto 1.9 para evaluar las condiciones de la levadura.

1.14 El mosto centrifugado es enviado a la destilación con el propósito de obtener alcohol etílico. Se toma una muestra de cada tanque para ser evaluada. La muestra es tomada en las probetas de las columnas v- 500 y v-600 que realizan la primera destilación o también llamada columnas de vinaza (v-), destilación Low wine (bajo alcohol).

2. Estudiar a escala de laboratorio la fermentación de cuatro cepas de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepas PE-2, CAF1, Angel Thermalresistance y Super Yeast Alcotec Turbo 24).

Se realizó el siguiente procedimiento en el laboratorio de microbiología:

2.1 Esterilizar 200 mL de agua en tres fiolas de 250 mL y 50 mL de agua en una fiola de 250 mL, todas las fiolas se esterilizan tapadas con algodón y papel aluminio. Pesar 12,5 g de cada levadura y se agregan en las fiolas con 200 mL de agua esterilizada, se agitan vigorosamente y tapan con algodón durante 30 minutos para activar la levadura. Para el caso de la fiola con 50 mL de agua esterilizada en esta se agrega 0,5 g de levadura Super Yeast Alcotec Turbo 24, se agita vigorosamente y tapa con algodón durante 15 minutos.

2.2 Esterilizar cuatro fiolas de 1 L de capacidad con 800 mL de melaza y una fiola con 500 mL de melaza entre 11 – 13 °Brix. La fiola de 500 mL de melaza es para la levadura Super Yeast Alcotec Turbo 24. Se agrega las levaduras activadas en agua en las fiolas con melaza esterilizada, agitar vigorosamente y tapar con algodón, incubar en la estufa a 25 – 30 °C / 24 horas.

2.3 Esterilizar 2 L de melaza entre 11 – 13 °Brix, tapando con algodón. Transcurrido el tiempo de fermentación se extrae el mosto fermentado y se deja el precipitado en la fiola, agregando 500 mL de melaza esterilizada en cada una de las cuatro fiolas con levadura precipitada, agitar vigorosamente y tapar con algodón, incubar en la estufa a 25 – 30 °C / 24 horas.

2.4 El mosto fermentado de cada muestra es analizado haciendo determinación de °Brix y grado alcohólico de la primera fermentación.

2.5 Al finalizar el proceso de la segunda fermentación se retira el mosto fermentado y retiene la levadura precipitada, al mosto obtenido se repite el procedimiento 2.4

2.6 La levadura precipitada de cada muestra es sembrada en placas por el método de estrías en agar extracto de malta y se deja incubar durante 4 – 5 días. Si el cultivo en placas no está contaminado por hongos filamentosos se

almacena en refrigeración o resiembra en agar extracto de malta inclinado por estrías para obtener cuñas entre 4 – 5 días, se utilizan como cultivos preparados para realizar la propagación.

2.7 La levadura que obtiene mejor rendimiento de alcohol es seleccionada para el estudio a nivel industrial.

3. Comparar a nivel industrial la propagación y fermentación de células nuevas cultivas en laboratorio de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa con mejores resultados a nivel de laboratorio y cepa Y193).

3.1 Se comienza con la propagación de cada una de las cepas como se describe en los puntos 1.1 a 1.10. Posteriormente la fermentación de ambas cepas como se explica en los puntos 1.11 a 1.13, cabe destacar que en este caso no se busca reforzar levadura con cremas centrifugadas varias veces, en este estudio se busca obtener fermentaciones y alcohol etílico a partir de células nuevas, poco desgastadas, para observar el comportamiento de la levadura en función de su edad con respecto al tiempo de fermentación, rendimiento de alcohol y congéneres (productos secundarios) producidos.

3.2 Se realizan dieciséis ciclos de fermentación por cada cepa, una vez terminado el proceso se envía a la destilación, al trascurrir una hora se toma una muestra de cada tanque para ser evaluada. La muestra es tomada en las probetas de las columnas v-500 y v-600 que realizan la primera destilación o también llamada columnas de vinaza (v-), destilación Low wine (bajo alcohol).

4. Caracterizar sensorial y químicamente el alcohol obtenido en la primera destilación (Low wine) de mostos fermentados obtenidos a partir de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso industrial, cepa Y193 células nuevas cultivadas en laboratorio y cepa con mejores resultados a nivel de laboratorio).

4.1 Medir el grado alcohólico de todas las muestras tomadas y proceder a la caracterización sensorial y química. La caracterización sensorial se realiza en el laboratorio de cata de la empresa, los tres tipos de muestras tomadas en las probetas de las columnas v- 500 y v-600 se diluyen en 50 mL de agua destilada para obtener un grado alcohólico aproximadamente de 20 y se agregan en copas de vidrios tapándose con vidrios de reloj. Dejar reposar durante 20 minutos y proceder a la cata, evaluando olor y color.

4.2 La caracterización química se lleva a los tres tipos de muestras tomadas en las probetas de las columnas v-500 y v-600 se diluyen en 10 mL según el grado alcohólico, dividiendo 400 / grado alcohólico, porque este último es mayor a 30° GL en la salida de las columnas Low wine.

4.3 Aforar el balón de 10 mL con agua destilada se agrega 100 µL de 2-pentanol, diluir e inyectar 1 µL en el cromatógrafo con la jeringa utilizada. Esperar 20 minutos que termine el análisis cromatográfico y se obtiene el resultado de congéneres más utilizados y analizados en la empresa presentes en la muestra de alcohol.

Técnicas de procesamiento estadístico para el análisis de datos

Los resultados fueron analizados usando el software Statgraphics Centuriom y aplicando Análisis de la Varianza (ANOVA). Posteriormente en los congéneres donde se encuentran diferencia estadísticamente significativa se aplica Pruebas de Múltiples Rangos para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar a nivel industrial el proceso de propagación de la levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso) se encontró que a las 24 horas la propagación en el laboratorio la fiola de 250 mL el contaje celular esta entre 35-50x10^6 cel/mL y en fiola de 5 L es de 54-57x10^6 cel/mL. Posteriormente la propagación a nivel industrial se detalla en la Cuadro 1.

De acuerdo al Cuadro 1 entre 19 - 24 horas de incubación el contaje celular en 2 (dos) semilleros fue de 66-84x10^6 cel/mL, viabilidad 100%, los °Brix de la melaza disminuyeron de 12,3 a 5,7 en promedio, el pH permanece estable en 4,6 y la temperatura promedio fue de 34,9. En los 34 (treinta y cuatro) pie de cubas al trascurrir entre 16 - 24 horas el contaje celular fue de 77-153x10^6 cel/mL, viabilidad 96,8%, los °Brix de la melaza disminuyeron de 11,7 a 5,0 en promedio, el pH descendió de 5,1 a 4,85 y la temperatura promedio fue de 32,3.

Durante el proceso de propagación aumenta el contaje celular y disminuye la viabilidad debido a la muerte celular. El pH en los semilleros permanece constante indicativo de inconstante medición. Durante el proceso de propagación o fermentación el pH disminuye, por lo tanto, se produce una cantidad considerable de hidrogeniones (Jorgensen, 1959). En cuanto a la temperatura del medio en semilleros y pie de cubas fue de 34,9 y 32,3 respectivamente, ambos se encuentran por encima de 25 - 30 °C rango establecido por Jorgensen (1959); Garissini (1964); Frazier (1976); y Owen (1989) para el crecimiento celular que es el objetivo en la propagación.

En el proceso de fermentación se estudiaron 29 tanques, reforzando con: levadura reutilizada y células nuevas; los resultados obtenidos se detallan en la Cuadro 2. El contaje celular y viabilidad de la crema a utilizar en promedio fue 213x10^6 cel/mL y 81,5% respectivamente, los °Brix de la melaza disminuyeron de 11,3 a 5,3; el pH se mantiene en 4,8; la temperatura promedio fue de 30,4 al inicio y 33,6 al finalizar, la edad fermentativa es de 20,3 horas, el grado alcohólico 7,32 con una eficiencia fermentativa de 88,08%.

Durante el proceso de fermentación ciclo a clico aumenta el contaje celular hasta estabilizarse en 213x10^6 cel/mL aproximadamente y la viabilidad disminuye indicando que también aumenta la muerte celular mientras se producen nuevas células (comportamiento normal de la curva de crecimiento microbiano). El pH se mantuvo constante mientras el °Brix disminuyó, nuevamente es contradictorio como en el caso de los semilleros y se infiere que existe inconstante medición. La eficiencia fermentativa es alta por encima de 85% y la edad de fermentación promedio en 29 ciclos es de 20,3 horas. La temperatura promedio fue de 30,4 °C al inicio y 33,6 al finalizar, de acuerdo a Jorgensen (1959); Garissini (1964); Frazier (1976); y Owen (1989) el rango máximo de producción fermentativa aumenta entre 30 y 36 °C.

De acuerdo al Cuadro 3, las cepas de levaduras CAT-1 y PE-2 disminuyen el °Brix hasta valores mínimos entre 3,5 y 4,3 produciendo un grado alcohólico máximo de 3,7 y 4,0. En el caso de la cepa Angel Thermalresistance se observa mayor consumo de azúcar debido a que el °Brix desciende a 3,2 mínimo y el grado alcohólico en la segunda fermentación es de 4,4 °GL, posee mejores resultados que las dos cepas mencionadas anteriormente, la levadura Super Yeast Alcotec Turbo 24 logra disminuir más el °Brix hasta valores de 2,3 en mayor tiempo, obteniendo mejor estabilidad fermentativa, hasta alcanzar un grado alcohólico de 4,5 °GL. Se decide utilizar la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 para compararla a nivel industrial.

Al realizar la propagación industrial en semilleros a partir de células nuevas de la cepa Y193, en el Cuadro 4 se evidencia que en 28 horas el contaje celular fue de 254x10^6 cel/mL, la viabilidad 99%, el °Brix disminuyó de 14,9 a 5,7; el pH descendió de 5,6 a 5,1 y la temperatura promedio fue 32,4 °C. La cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 obtuvo lo siguiente (Cuadro 4): el contaje celular fue de 170x10^6 cel/mL, la viabilidad 96%, el °Brix disminuyó de 14,9 a

6,5; el pH descendió de 5,6 a 5,2 y la temperatura promedio fue 32,2 °C. Se observa que el contaje celular, viabilidad, disminución de °Brix y pH es mayor en la cepa Y193. La temperatura promedio en ambas se encuentra por encima de 25 - 30°C rango establecido por Jorgensen (1959); Garissini (1964); Frazier (1976); y Owen (1989) para crecimiento celular.

Luego de hacer la propagación en pie de cubas a partir de células nuevas de la cepa Y193, en el Cuadro 5 se observa que en 28 horas el contaje celular fue de 95x10^6 cel/mL, la viabilidad 96%, el °Brix disminuyó de 8,8 a 2,3; el pH permaneció constante en 5,0 y la temperatura promedio fue 32,9 °C. La cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 obtuvo lo siguiente (Cuadro 5): el contaje celular fue de 230x10^6 cel/mL, la viabilidad 94,2%, el °Brix disminuyo de 8,6 a 2,1; el pH descendió de 4,8 a 4,7 y la temperatura promedio fue 33.0 °C.

Se observa que el contaje celular es mayor en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24. La viabilidad, disminución del °Brix y pH. La temperatura promedio en ambas se encuentra por encima de 25 - 30°C rango establecido por Jorgensen (1959); Garissini (1964); Frazier (1976); y Owen (1989) para crecimiento celular.

Existe un cambio significativo en la disminución del contaje celular para la cepa Y193 con respecto al aumento en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24, en la propagación de semilleros y pie de cubas, debido a que la levadura sedimenta y la toma de muestra es en la parte superior.

El primer ciclo de fermentación para la levadura Y193 sembrando solamente células nuevas fue de 52 horas con una eficiencia fermentativa de 64,3% y 4,5ºGL. Desde el segundo ciclo fermentativo hasta el ciclo dieciséis se muestran en el Cuadro 6: se observa que el contaje celular y viabilidad de la crema a utilizar en promedio fue 271x10^6 cel/mL y 85,7% respectivamente, los °Brix de la melaza disminuyeron de 12,4 a 6,1; el pH se mantiene en 4,8; la temperatura promedio fue de 31,0°C al inicio y 34,1°C al finalizar, la edad fermentativa es de 19,3 horas, el grado alcohólico 8,4 con una eficiencia fermentativa de 88,7%.

El primer ciclo de fermentación para la levadura Super Yeast Alcotec Turbo 24 (Super Y) sembrando con células nuevas duro 56 horas y tuvo una eficiencia fermentativa de 62,4% y 4,3 ºGL. Desde el segundo ciclo fermentativo hasta el ciclo dieciséis se muestran en el Cuadro 7: se detalla el contaje celular y viabilidad de la

crema a utilizar en promedio fue 240x10^6 cel/mL y 86,8% respectivamente, los °Brix de la melaza disminuyeron de 12,1 a 5,5; el pH se mantiene en 4,7 la temperatura promedio fue de 30,9 al inicio y 33,9 al finalizar, la edad fermentativa es de 19,6 horas, el grado alcohólico 8,5 con una eficiencia fermentativa de 91,0%.

De acuerdo a los resultados durante el proceso de fermentación ciclo a clico en las dos cepas aumenta el contaje celular hasta estabilizarse y la viabilidad disminuye indicando que también aumenta la muerte celular; la levadura Y193 obtiene 31x10^6 cel/mL más de contaje que la cepa Super Y y la viabilidad se aproxima en ambas, es ligeramente superior en la Y193 indicando mayor crecimiento celular. El pH se mantuvo constante en las dos cepas mientras que el °Brix disminuyó, nuevamente es contradictorio como en el caso de fermentación de levadura Y193 del proceso analizada al inicio de la sección; se infiere que existe inconstante medición del pH.

La eficiencia fermentativa en las cepas es alta por encima de 85% encontrándose mayor eficiencia con Super Y la cual logra 91,0% en promedio y la edad de fermentación en 15 ciclos es de 19 horas aproximadamente para las dos levaduras. La temperatura promedio para ambas cepas se ubica en el rango máximo de producción fermentativa que es de 30 - 36°C (Jorgensen, 1959; Garissini, 1964; Frazier, 1976 y Owen, 1989).

Por otro lado, la caracterización sensorial y química realizada en las tres muestras de alcohol obtenidas a partir de seis fermentaciones, tomadas en dos columnas de destilación, para obtener doce muestras de alcohol de cada tipo de levadura, analizando las cepas Y193 del proceso industrial, cepa Y193 células nuevas cultivadas en el laboratorio y cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 células nuevas cultivadas en laboratorio. Se encontró que para la cepa Y193 del proceso industrial predominan los olores aceitosos, pesado (cabezas y colas), goma quemada, acético, olor frutal-dulce, mohoso-olor a humedad.

En el caso de la levadura Y193 células nuevas cultivadas en laboratorio los olores son aceitosos, cabezas y colas, goma quemada, ácido, suave olor a café tostado y olor frutal-dulce. Para la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 células nuevas cultivadas en laboratorio los olores presentes son aceitosos, cabezas y colas, goma quemada, agrio suave, olor frutal-Pera dulce. En cuanto al color en la mayoría de las

muestras es incoloro característico del alcohol destilado. Solo en dos muestras de la cepa Y193 del proceso se encuentra ligeramente amarillo, se infiere es debido al arrastre de sustancias oscuras del mosto que fueron arrastradas en la primera destilación.

Las tres levaduras evidencian la producción de olores similares en el primer alcohol destilado. De todas las levaduras Y193 del proceso industrial tiene olores mucho más suaves con respecto a las muestras obtenidas en las fermentaciones con levaduras nuevas. Entre las dos levaduras con células nuevas cultivadas en laboratorios la cepa Y193 presenta olores más pesados (cabezas, colas, aceitosos) y los olores dulces-frutales son más suaves y en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 predominan olores más dulces-frutales que los pesados. Las primeras fermentaciones en ambas cepas con células nuevas desarrollan olores ácidos, agrios, acéticos, tostados o de goma quemada.

Al realizar la caracterización química mediante el análisis cromatográfico calibrado para diez congéneres los cuales son: acetaldehído, acetato de metilo, acetato de etilo, metanol, 2-butanol, i-butanol, N-propanol, I-amílico, amílico y furfural. Se obtuvo que en las tres muestras de alcohol a partir de las fermentaciones usando tres cepas de levaduras los congéneres presentes fueron: acetaldehído, acetato de etilo, i-butanol, N-propanol, I-amílico y furfural. En el Cuadro 8 se evidencia los mg/100 mLAA (mL de alcohol) de los compuestos para cada una de las muestras.

Al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) y la Pruebas de Rangos Múltiples a cada uno de los resultados se obtuvo lo siguiente:

Para el acetaldehído y el furfural el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95% de confianza.

En cuanto al acetato de etilo el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel de confianza de 95%. Aplicando la prueba de múltiples rangos existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95% de confianza entre Super Y células nuevas - Y193 células nuevas.

Por último en el caso de N-propanol, i-butanol e I-amílico el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95% de confianza. Aplicando

la Prueba de Múltiples Rangos, existe diferencia significativa con un nivel de confianza de 95% entre Super Y células nuevas, Y193 células reforzadas y Super Y células nuevas (Y193).

Según Fenaroli (1971), es propio encontrar en el ron acetaldehído, acetato de etilo y furfural. El autor explica que el acetaldehído se encuentra en los aromas frutales de pera, manzana, frambuesa, fresa y piña; el acetato de etilo se ha reportado que está presente en algunos aromas frutales naturales y el furfural se encuentra en el olor de café tostado.

De acuerdo a lo expuesto por el autor se infiere que el olor frutal-dulce y de pera encontrado en las tres muestras mediante análisis sensorial puede deberse a la presencia de acetaldehído y acetato de etilo, los cuales predominaron en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 según el análisis cromatográfico y a su vez los olores frutales-dulces y de peras también se encontraron más acentuados.

El furfural hace referencia a olores de café tostado que se encontraron por análisis sensorial en la cepa Y193 células nuevas, aunque no se existe diferencia significativa, entre las tres muestras en cuanto al furfural, se asocia que este compuesto es parte de olor a goma quemada o café tostado, presente en las tres muestras como congéneres pesados (cabezas y colas), estos últimos de acuerdo al análisis sensorial predominaron en la cepa Y193 reforzada del proceso industrial y Y193 a partir de células cultivadas en el laboratorio.

Cuadro 1. Propagación a nivel industrial de la levadura *Saccharromyces cerevisiae* (cepa Y193 del proceso)

Propagación	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)
			Antes	Después	Antes	Después	
Semilleros	66-84x10^6	100	12,3	5,7	4,6	4,6	34,9
Pie de cubas	77-153x10^6	96,8	11,7	5,0	5,1	4,85	32,3

Cuadro 2. Fermentación industrial de la levadura *Saccharromyces cerevisiae* (cepa Y193 del proceso)

Edad fermentativa (horas)	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)	Grado alcohólico	Eficiencia fermentativa
			Antes	Después	Antes	Después			
20,3	213x10^6	81,5	11,3	5,3	4,8	4,8	30,4 – 33,6	7,32	88,08

Cuadro 3. Fermentaciones a nivel de laboratorio. Levadura seca S. cerevisiae a partir de células activadas y cultivadas en el laboratorio.

Cepa	Fermentación N°	Tiempo de fermentación	°Brix iniciales	°Brix finales	Grado alcohólico
CAT-1	1	24 horas	12,3	3,5	3,3
	2	24 horas	12,3	4,3	4,0
PE-2	1	24 horas	12,3	4,0	3,0
	2	24 horas	12,3	4,0	3,7
Argel Thermal Resistance	1	24 horas	12,5	3,6	4,0
	2	24 horas	12,5	3,2	4,4
Super Yeast Alcotec Turbo 24	1	24 horas	11,0	4,4	3,3
	2	48 horas	11,0	2,3	4,5

Cuadro 4. Propagación industrial en semilleros a partir de células nuevas, cultivadas en laboratorio de la levadura Saccharromyces cerevisiae

Cepa	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)
			Antes	Después	Antes	Después	
Y193	254x10^6	99	14,9	5,7	5,6	5,1	32,4
Super Yeast Alcotec Turbo 24	170x10^6	96	14,9	6,5	5,6	5,2	32,2

Cuadro 5. Propagación industrial en pie de cubas a partir de células nuevas, cultivadas en laboratorio de la levadura Saccharromyces cerevisiae

Cepa	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)
			Antes	Después	Antes	Después	
Y193	95x10^6	96	8,8	2,3	5,0	5,0	32,9
Super Yeast Alcotec Turbo 24	230x10^6	94,2	8,6	2,1	4,8	4,7	33,0

Cuadro 6. Fermentación industrial de la levadura Saccharromyces cerevisiae a partir de células nuevas cultivadas en laboratorio, Cepa Y193.

Edad fermentativa (horas)	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)	Grado alcohólico	Eficiencia fermentativa
			Antes	Después	Antes	Después			
19,3	271x10^6	85,7	12,4	6,1	4,8	4,8	31,0 – 34,1	8,4	88,7

Cuadro 7. Fermentación industrial de la levadura Saccharromyces cerevisiae a partir de células nuevas cultivadas en laboratorio, Cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24.

Edad fermentativa (horas)	Contaje celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	°Brix		pH		Temperatura Promedio (°C)	Grado alcohólico	Eficiencia fermentativa
			Antes	Después	Antes	Después			
19,6	240x10^6	86,8	12,1	5,5	4,7	4,7	30,9 – 33,9	8,5	91,0

Cuadro 8. Congéneres presentes en los tres tipos de muestras de alcohol

Congéneres	mg/100 mLAA - Cepas		
	Super Y células nuevas	Y193 células nuevas	Y193 Proceso Células reforzadas
Acetaldehído	1,121	0,355	2,029
Acetato de etilo	7,306	5,610	6,560
N-propanol	17,384	14,879	14,854
i-butanol	30,843	23,974	24,565
I-amílico	117,951	89,236	87,937
Furfural	0,488	0,358	0,311

CONCLUSIONES

Al analizar a nivel industrial el proceso de propagación de la levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso reforzada) se evidencia que durante el proceso de propagación aumenta el contaje celular y disminuye la viabilidad. El pH en los semilleros y proceso de fermentación permanece constante.

Durante el proceso de fermentación de la levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Y193 del proceso reforzada) ciclo a ciclo aumenta el contaje celular hasta estabilizarse en 213x10^6 cel/mL. La eficiencia fermentativa es de 88,08% y la edad de fermentación promedio en 29 ciclos es de 20,3 horas.

Él estudió a escala de laboratorio de la fermentación de cuatro cepas de levadura Saccharromyces cerevisiae arrojó que las cepas CAT-1 y PE-2 disminuyen el °Brix hasta valores mínimos entre 3,5 y 4,3 produciendo un grado alcohólico máximo de 3,7 y 4,0 respectivamente. En el caso de la cepa Angel Thermalresistance el °Brix desciende a 3,2 mínimo y el grado alcohólico en la segunda fermentación es de 4,4 °GL.

La levadura Super Yeast Alcotec Turbo 24 logra consumir mayor contenido de azúcar hasta disminuir el °Brix a valores de 2,3 en mayor tiempo pero obteniendo mejor estabilidad fermentativa, alcanzando un grado alcohólico de 4,5°GL. Por ello es la seleccionada para compararla a nivel industrial.

Al comparar a nivel industrial la propagación de células nuevas cultivas en laboratorio de levadura Saccharromyces cerevisiae (cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 y cepa Y193), se observa que el contaje celular es mayor en la cepa Super Y. La viabilidad, disminución del °Brix y pH se comporta igual en ambas levaduras.

De acuerdo a los resultados durante el proceso de fermentación de células nuevas cultivadas en laboratorio de levadura Saccharromyces cerevisiae, el primer ciclo de fermentación para la levadura Y193 y Super Yeast Alcotec Turbo 24 (Super Y) duró 52 horas y 56 horas respectivamente y la eficiencia fermentativa es menor a 65% en las dos cepas. Posteriormente a partir del segundo ciclo se estabiliza el proceso donde ciclo a clico en las dos aumenta el contaje celular y la viabilidad disminuye. El pH se mantuvo constante en las dos cepas mientras que el °Brix disminuyó. La eficiencia fermentativa es alta, encontrándose mayor en Super Y: obtuvo 91,0% y en la cepa Y193 fue de 88,7% similar al obtenido con la misma cepa del proceso industrial reforzada. La edad de fermentación en 15 ciclos es de 19 horas aproximadamente para las dos levaduras.

Las tres levaduras evidencian la producción de olores similares en el primer alcohol destilado. De todas las levaduras Y193 del proceso industrial tiene olores mucho más suaves con respecto a las muestras de fermentaciones con levadura nueva. Entre las dos levaduras con células nuevas cultivadas en laboratorios la cepa Y193 presenta olores más pesados (cabezas, colas, aceitosos) y los olores dulces-frutales son más suaves y en la cepa Super Yeast Alcotec Turbo 24 predominan olores más dulces-frutales que los pesados. Las primeras fermentaciones en ambas cepas con células nuevas desarrollan olores ácidos, agrios, acéticos, tostados o de goma quemada.

Se obtuvo que en las tres muestras de alcohol a partir de las fermentaciones usando tres cepas de levaduras los congéneres presentes fueron: acetaldehído, acetato de etilo, i-butanol, N-propanol, I-amílico y furfural. Para el acetaldehído y el furfural, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95% de confianza. En cuanto al acetato de etilo existe una diferencia estadísticamente significativa entre Super Y células nuevas y Y193 células nuevas con un nivel de confianza de 95%. Por último en el caso de N-propanol, i-butanol e I-amílico existe una diferencia estadísticamente significativa entre Super Y células nuevas - Y193 células reforzadas y Super Y células nuevas - Y193 células nuevas con un nivel de confianza de 95%.

Al evaluar el proceso de propagación y fermentación de las cepas de levadura Saccharomyces cerevisiae Y193 del proceso reforzada, Y193 a partir de células nuevas y Super Yeast Alcotec Turbo 24 de células nuevas en la empresa, se evidencia: los dos procesos biológicos propagación y fermentación influyen en el perfil sensorial del alcohol obtenido en la primera destilación.

AGRADECIMIENTOS

Destilerías Unidas S.A. (DUSA). Empresa donde se realizó el trabajo de investigación. Dra. María Pire (Tutora Académico), Ing. Pedro Guanipa (Tutor Industrial), Ing. Dilibia Mendoza (Cotutor Industrial) Esp. Isabel Hernández (Asesor Metodológico), Dra. Marisela Estanga y Dra. Mireya Valdez (Apoyo técnico).

REFERENCIAS

Fenaroli, G. (1971). Fenaroli´s handbook of flavor ingredients. Volumen II. 2da ed. Published by CRC Press. Milano, Italia.

Frazier, W. (1976). Microbiología de los alimentos. 2da ed. Editorial Acribia.

García, J. (2008). Maridaje, enología y cata de vinos. Málaga. [Artículo en línea]. Disponible: https://books.google.co.ve/books?id=x1pVoCIFrEYC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Jes%C3%BAs+Garc%C3%ADa+Gallego%22&hl=es-419&sa=X&ved=0CCgQ6AEwAmoVChMIuOH_m6P8xgIVR9IeCh0GcgHr

#v=onepage&q&f=false Consulta: 2023, septiembre 22.

Garissini, L. (1964). Microbiología Tecnológica. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la biblioteca. Caracas, Venezuela.

Jorgensen, A. (1959). Microbiología de las fermentaciones industriales. 7ma. ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Owen, P. (1989). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza, España.