

EVALUACIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURAS DEL GÉNERO SACCHAROMYCES EN LA DESTILERIA GEORGE WASHINGTON

Dra. Josefina Jover-de la Prida, jjover@uclv.edu.cu, Ing. Mabel Cuevas-Hernández,
Lic. Cholver Quintana-Jover

Departamento de Ingeniería Química, Facultad Química-Farmacía, Universidad Central de Las Villas, Cuba

*En el presente trabajo se presenta la evaluación industrial de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* HB, *Saccharomyces cerevisiae* C3 y *S. cerevisiae* Santa Cruz en la destilería George Washington. Se reportan los valores promedios de por ciento alcohólico en batición fermentada, eficiencia de la fermentación y por ciento de rendimiento alcohol-sustrato. Los mejores resultados se logran con el uso de la *S. cerevisiae* C3 obteniéndose 5,6 % alcohólico, 55,50 % rendimiento alcohol sustrato y una eficiencia de la fermentación de 86,14 %. Se realiza el análisis del efecto económico beneficioso que provoca el empleo de la *S. cerevisiae* C3 sobre las otras levaduras evaluadas, obteniéndose un ahorro de miel final de 3441t/año y un incremento en la producción de alcohol etílico de 15711 HL/ año en relación a la *S. cerevisiae* Santa Cruz que actualmente utiliza la fábrica. Se muestran los resultados del análisis por cromatografía gaseosa de la batición fermentada y del aguardiente obtenido para las tres levaduras antes referidas. Se obtiene un aguardiente de buena calidad en cuanto a los compuestos orgánicos analizados con el empleo tanto de la *S. cerevisiae* C3 como con la *S. cerevisiae* Santa Cruz.*

Palabras clave: fermentación alcohólica, compuestos orgánicos, levaduras.

*In this paper it is showed the industrial evaluation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* HB, *S. cerevisiae* C3 and *S. cerevisiae* Santa Cruz in the George Washington distillery. It is reported the average values of the alcoholic percentage in fermented liquor, efficiency of the fermentation and yield alcohol-substrate. The best results are achieved with the use of the *Saccharomyces cerevisiae* C3. It is also obtained 5,6 % of the alcoholic percentage, 55,50 % yield alcohol-substrate and 86,14 % in the efficiency of the fermentation with the use of this yeast. It is analyzed the economic effect obtained through the use of the yeast *S. cerevisiae* C3 in relation with others. The yeast *S. cerevisiae* saves molasses in 3441 t/year and improves the production of ethylic alcohol in 15711 HL/ year in relation with *S. cerevisiae* Santa Cruz yeast which at present is used in the G. Washington distillery. There are showed in this paper the results of the gas-chromatography for fermented liquor and aguardiente in its organic components analyzed not only with the use of *S. cerevisiae* C3 but also with the use of *S. cerevisiae* Santa Cruz.*

Key words: alcoholic fermentation, organic components, yeasts.

Introducción

Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos.^{1,2,3/}

Las levaduras utilizadas para la fabricación del ron deben tener características especiales, debiendo producir además de alcohol etílico, ácidos orgánicos, aldehídos, ésteres, alcoholes superiores y en general todos los congéneres que le dan el sabor característico y el aroma al destilado.

Diferentes investigadores han realizado evaluaciones de cepas alcoholeras atendiendo a varios aspectos tales como: tolerancia al etanol, tolerancia a la temperatura, tolerancia a altas concentraciones de azúcar, rendimiento alcohólico, eficiencia en la fermentación y productividad, entre los indicadores fundamentales.^{4-6/}

Actualmente la demanda de alcohol es superior a las posibilidades de suministro por lo que resulta de gran interés elevar la producción de alcohol para satisfacer dicha demanda. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo analizar varias levaduras del género *Saccharomyces* a nivel industrial y seleccionar aquella que sea

capaz de experimentar mayor rendimiento alcohólico y eficiencia fermentativa, a la vez que produzca una composición de congéneres apropiados para ser utilizada en la producción de aguardientes y en la elaboración de ron.

Fundamentación teórica

El trabajo desarrollado se basa en el estudio de la fermentación alcohólica en función de los componentes volátiles no etanol y etanol a escala industrial. La caracterización de la fermentación se hace tomando en consideración la influencia que pueden tener el tipo de microorganismo y de cultivo utilizado, en la producción de los componentes volátiles no etanol y etanol. Tomando en consideración que el tipo de microorganismo juega un papel clave en el desarrollo del aroma y que la selección de cepas bastante buenas productoras de etanol y responsables de un aroma particular es de gran interés, se procede a estudiar la fermentación alcohólica en relación a los principales metabolitos secundarios y etanol producidos, por diferentes levaduras utilizando cultivo puro en la destilería de la región central del país George Washington

Materiales y métodos

Para llevar a cabo la evaluación industrial de las levaduras *S. cerevisiae* HB, *S. cerevisiae* C3 y *S. cerevisiae* Santa Cruz fue necesario realizar la propagación de éstas a nivel de laboratorio por los métodos establecidos /7/, antes de ser trasladado a la fábrica, y el proceso de fermentación alcohólica se efectúa por el procedimiento tradicional de ésta. Las fichas técnicas de las levaduras empleadas se ofrecen a continuación:

S. cerevisiae HB: Cepa aislada de un tanque de miel en la Destilería Habana, tiene una temperatura óptima de 36 °C y temperatura máxima de 38-43 °C. Se halla en el cepario del ICIDCA.

S. cerevisiae C3: Pertenece al cepario del ICIDCA, tiene características termotolerante siendo su temperatura óptima de 36 °C y temperatura máxima de 39-42 °C.

S. cerevisiae Santa Cruz: Células elipsoidales de 3-6 x 7-15 μ. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa. No fermenta la lactosa. Es sensible a la actidiona.

Se trabaja bajo las mismas condiciones fabriles tanto de materia prima (miel final) como tecnológicas. Para seguir el curso del proceso fermentativo se realizan determinaciones en los fermentadores de Brix de alimentación, Brix final (0Bxf), pH, temperatura, por ciento alcohólico, azúcares reductores residuales (ARR), conteo celular (c.celular) y viabilidad según /7/.

Los resultados obtenidos con el empleo de diferentes cepas de levaduras a escala industrial se procesaron estadísticamente, según métodos de aplicación general /8/. Se determinó la media (X), la desviación estándar (S), la varianza (S²) y el coeficiente de variabilidad (CV).

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de cada cepa se calcularon los valores de eficiencia de la fermentación (EF) y rendimiento alcohol-sustrato (Yp/s). Para esto fue necesario realizar balances de masa.

Concluida la fermentación se procede a destilar la batición fermentada en la columna de aguardiente. Tanto a la batición fermentada como al aguardiente obtenido se le realizan determinaciones de acetaldehído, ácido acético, metanol, acetato de etilo, n-propanol, isobutanol, y alcohol isoamílico por cromatografía gaseosa, usando una columna con fase estacionaria Carbowax 1500. Las condiciones de operación del equipo son las siguientes:

Columna: SP 1000

Gas portador: Argón

Flujo (mL/min): 30

Detector: FID

Temperatura: columna	inyección	detector
70 °C	150 °C	150 °C

Volumen inyectado: 1 mL

Se realiza un análisis del efecto económico que tienen las levaduras *S. cerevisiae* HB y C3 con

respecto a la *S. cerevisiae* Santa Cruz que es la que actualmente utiliza la destilería G. Washington, en relación al incremento de la producción de alcohol etílico y al ahorro de miel, para ello se toma en consideración los valores medios obtenidos de por ciento alcohólico y el por ciento rendimiento alcohol-sustrato para cada levadura analizada y el por ciento de azúcares fermentables de la miel final.

Análisis de los resultados

Los resultados que muestran las características de la batición fermentada utilizando *S. cerevisiae* HB, *S. cerevisiae* C3 y *S. cerevisiae* Santa Cruz, que es la que actualmente usa la fábrica son reportados en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente. En las tablas 1 y 2 se presentan los valores obtenidos con las levaduras *S. cerevisiae* HB y C3 respectivamente. Observándose que los valores de 0Brix inicial y final, pH, contenido celular y por ciento de azúcares reductores residuales están dentro de los parámetros establecidos. El por ciento alcohólico es superior en general cuando se usa la *S. cerevisiae* C3, en

comparación con las otras dos levaduras estudiadas, siendo el valor de por ciento alcohólico en batición promedio de 5,6 por ciento. Debe tenerse en cuenta que estas dos levaduras tienen características termo tolerantes.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con la levadura *S. cerevisiae* Santa Cruz. Los valores de pH, grado Brix inicial, grado Brix final, reductores residuales y contenido celular están en los rangos establecidos, no así la temperatura, la cual oscila entre 34 y 37 °C, siendo los valores más adecuados para esta levadura de 30-32 °C, ello se debe a que no existe algún sistema de enfriamiento, aunque para amortiguar este efecto alimentan los fermentadores por el sistema de “refrescos”. Este efecto de la temperatura influye negativamente en la actividad de las levaduras, lo cual se refleja en los por ciento alcohólico obtenidos, siendo el valor medio de 5,16 % en los experimentos realizados.

Todos estos resultados anteriores fueron procesados estadísticamente, cuyos resultados se muestran también en dichas tablas (1-3).

Tabla 1
Resultados obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* HB

Fermentador N°	°Brix	°Bxf	T _{max} (°C)	pHf	% alcohólico	c.cel. (10 ⁶ /mL)	A.R.R. (g/100 mL)	Yp/s (%)
12	18,0	5,9	36	3,99	5,7	29	0,58	60,17
1	17,1	4,6	37	4,19	5,4	29	0,56	59,34
2	17,3	7,2	36	4,16	5,2	26	0,69	58,02
3	17,5	5,4	34	4,12	4,8	29	0,56	46,26
4	17,0	6,3	35	3,98	5,4	28	0,60	49,58
5	16,8	6,7	37	4,08	4,8	25	0,72	54,94
6	16,8	5,9	37	4,01	4,8	27	0,58	45,89
7	17,1	4,8	37	3,98	5,8	25	0,51	51,85
8	17,3	5,5	36	4,05	4,8	29	0,49	55,65
9	17,3	5,9	37	4,01	5,7	29	0,58	51,30
S	0,355	0,798	1,032	0,077	0,436	1,712	0,071	0,815
S ²	0,126	0,637	1,066	5,9.10 ³	0,190	2,933	0,005	0,382
Xm	17,2	5,8	36,2	4,05	5,3	27,6	0,58	49,96
C.V	0,020	0,137	0,028	0,019	0,088	0,062	0,120	1,780

Tabla 2
Resultados obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C3

Fermentador N°	^o Brix	^o Bx _f	T _{max} (°C)	pH _f	% alcohólico.	c.cel. (10 ⁶ /mL)	A.R.R. (g/100mL)	Y _{p/s} (%)
8	16,8	5,2	37	4,04	4,8	25	0,55	49,20
9	16,8	4,5	37	4,06	6,2	22	0,56	63,59
10	16,8	4,2	36	4,03	4,8	24	0,55	50,21
11	16,0	4,9	35	4,30	5,3	29	0,55	57,07
12	16,,8	4,5	36	4,20	5,8	28	0,55	54,33
1	17,0	4,8	35	4,22	5,0	25	0,55	50,60
2	16,2	4,6	36	4,26	5,5	27	0,49	58,22
3	15,4	5,2	37	4,21	5,3	27	0,58	59,80
4	16,7	4,7	35	4,06	5,3	29	0,54	54,60
5	16,2	5,5	35	4,23	5,0	28	0,59	53,47
S ²	0,253	0,156	0,765	0,010	0,157	5,377	0,0006	0,860
S	0,503	0,395	0,875	0,101	0,397	2,319	0,026	0,910
CV	0,030	0,082	0,024	0,024	0,075	0,087	0,048	1,051
X _m	16,47	4,81	35,9	4,16	5,6	26,4	0,55	55,60

Tabla 3
Resultados obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz

Fermentador N°	°Brix	°Bxf	T _{max} (°C)	pHf	% alcohólico	c.cel. (10 ⁶ /mL)	A.R.R. (g/100mL)	Yp/s (%)
7	16,6	4,6	36	4,27	4,7	32	0,56	50,31
8	16,4	5,5	37	4,28	4,8	25	0,59	52,25
9	17,1	5,2	34	4,20	4,2	28	0,55	41,42
10	18,0	5,5	36	4,22	5,5	25	0,66	54,61
11	15,5	5,5	36	4,42	5,7	22	0,74	66,10
12	16,5	5,5	37	4,14	5,7	24	0,69	61,89
1	18,0	7,1	36	4,23	5,3	29	0,72	49,67
2	17,9	6,5	36	4,16	5,0	28	0,70	47,08
3	17,5	7,2	34	4,21	5,7	27	0,69	54,91
4	18,0	7,5	35	4,30	5,0	29	0,71	46,77
S	1,798	0,985	1,059	0,080	0,508	2,923	0,069	0,954
S ²	3,232	0,972	1,122	6,423.10 ⁻³	0,258	8,544	4,78.10 ⁻³	1,120
Xm	16,72	6,01	35,7	4,24	5,1	26,9	0,66	52,43
CV.	0,107	0,164	0,029	0,018	0,098	0,108	0,103	0,134

Como se observa, los coeficientes de variabilidad son pequeños. Los valores de desviación estándar y de varianza muestran que los datos en todos los casos, presentan poca dispersión y variabilidad.

Además se muestran los resultados de los balances realizados para el cálculo del rendimiento y eficiencia de la fermentación cuando se emplean *S. cerevisiae* Santa Cruz, HB y C3 respectivamente.

Tabla 4
Valores de eficiencia de fermentación y rendimiento obtenidos
para cada cepa de levadura a partir de los valores medios reportados

Levadura	C3	HB	Sta. Cruz
$^{\circ}\text{Bx}$ alimentación	16,4	17,2	16,7
$^{\circ}\text{Bx}$ f	4,8	5,8	6,0
T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)	35,9	36,2	35,7
% alcohólico	5,6	5,3	5,1
C. cel ($10^4/\text{mL}$)	26,4	27,6	26,9
pHfinal	4,16	4,05	4,24
$^{\circ}\text{Bx}_{\text{mál}}$	87,7	88,8	85,0
ART _{mál} (%)	57,0	54,0	55,0
ARF _{mál} (%)	53,8	50,0	50,7
ARI _{mál} (%)	3,2	4,0	4,05
ARF _b (%)	10,10	9,69	10,50
ART final (%)	0,54	0,58	0,66
ART _b (%)	10,65	10,47	10,81
ARR (%)	0,55	0,58	0,66
ARI _{batición} (%)	0,59	0,77	0,84
Y p/s (%)	55,50	54,30	52,43
E.F (%)	86,14	75,09	74,09

La tabla 4 resume los valores representados en las tablas anteriores, reportándose los valores promedios de los mismos. Puede observarse que los valores mayores de rendimiento alcohol-
substrato (%) y de eficiencia (%) se logran con el empleo de la levadura *S. cerevisiae* C3, siendo

estos de 55,50 % y 86,14 respectivamente y los resultados más desfavorables corresponden a la levadura *S. cerevisiae* Santa Cruz, para la cual se obtuvieron valores de 52,43 % de rendimiento y 74,09 % de eficiencia; que es la levadura que actualmente utiliza la fábrica.

Tabla 5
Resultados del análisis cromatográfico en batición y
aguardiente de compuestos volátiles no etanol

Compuestos (g/100 L.a.a)	Levadura <i>S. cerevisiae</i> S. Cruz		Levadura <i>S. cerevisiae</i> HB		Levadura <i>S. cerevisiae</i> C3	
	Batición Aguardiente		Batición Aguardiente		Batición Aguardiente	
Acetaldehído	26,56	1,50	12,84	1,10	13,21	1,20
Acetato de etilo	219,40	41,51	148,40	30,30	148,00	31,00
Acido Acético	126,00	25,00	110,20	20,30	125,80	21,00
Metanol	8,53	2,78	6,69	1,19	7,24	1,24
N-propanol	82,24	43,00	67,95	35,10	66,80	30,00
Isobutanol	74,41	34,00	112,68	60,70	98,16	59,10
Ac. Isoamílico	160,86	130,5	289,03	180,0	170,21	120,0

En la tabla 5 se ofrecen los resultados de los análisis cromatográficos realizados a las muestras de batición fermentadas y al aguardiente destilado. Cuando se utilizan las levaduras *S. cerevisiae* HB y *S. cerevisiae* C3 la formación de acetaldehído y acetato de etilo es bastante similar, tanto en la batición fermentada como en el aguardiente, mientras que cuando se usa la levadura Santa Cruz se tiene aproximadamente el doble de estos dos compuestos en la batición fermentada. No ocurriendo así para el contenido de ácido acético, bastante similar cuando son usadas las levaduras mencionadas. Los alcoholes superiores, se formaron en mayor cantidad en la batición fermentada cuando se emplea la *S. cerevisiae* HB, alcanzándose el valor de 469,06 g/100 L de alcohol absoluto, mientras que con las dos levaduras restantes se obtienen alrededor de 100 g/100 L alcohol absoluto menos.

La producción de metanol es ligeramente superior en batición fermentada y en aguardiente cuando se utiliza la levadura *S. cerevisiae* Santa Cruz. Los valores obtenidos en todos los casos para el aguardiente en cuanto a aldehídos, esterés, ácidos y alcoholes superiores están dentro de la norma establecida en el país. No obstante, se observa de modo general que a valores mayores de estos componentes en la batición fermentada

se corresponden con contenidos superiores de los mismos en el aguardiente producido.

Como se observa cada cepa estudiada puede ser distinguida de las otras por un incremento o reducción en la formación de uno o varios compuestos orgánicos. Los resultados obtenidos coinciden con lo planteado por otros investigadores /9/ en cuanto a que el tipo de levadura influye en la formación de estos componentes no-etanol que le dan determinadas características organolépticas a los aguardientes y rones. Es decir, que la levadura empleada juega un papel clave en el desarrollo del aroma.

Efecto económico

Para analizar el efecto económico que tiene el uso de las levaduras utilizadas durante el proceso de fermentación alcohólica en esta fábrica los cálculos se efectúan a partir del ahorro de miel y el aumento de la producción de alcohol con respecto a la levadura que tradicionalmente usa esta destilería (*S. cerevisiae* Sta Cruz). Se observa en la tabla 6 que cuando se usa la levadura *S. cerevisiae* C3 se obtienen los menores insumos de miel y una mayor producción de alcohol, obteniéndose un efecto económico considerable con el empleo de esta levadura.

Tabla 6
Efecto económico de las levaduras empleadas
en la destilería George Washington

Levadura	Consumo de miel (t/d)	Ahorro de miel (t/año)	Ganancia anual por concepto de miel (pesos)	Producción alcohol A (HL/d)	Incremento alcohol (HL/d)	Ganancia por concepto de alcohol producido (pesos MN/año)	Efecto económico total (pesos MN/año)
S.cerevisiae HB	110,49	708	142 629,00	242,33	40,16	602 400,00	631 746,00
S.cerevisiae C3	101,38	3441	293 46,00	254,54	52,37	785 550,00	928 179,00
S.cerevisiae Santa Cruz	112,85	---	---	202,17	---	---	---

Conclusiones

1. El uso de la levadura *S.cerevisiae* C3 propicia los mejores resultados en cuanto a por ciento alcohólico, eficiencia y rendimiento alcohol-sustrato, obteniéndose los valores promedios de 5,6 %, 84,16 % y 55,50 % respectivamente así como un buen comportamiento en cuanto a los congéneres analizados en la destilería George Washington.
2. Las levaduras *S. cerevisiae* C3 y *S. cerevisiae* Santa Cruz muestran un comportamiento adecuado en cuanto a los congéneres analizados por cromatografía gaseosa, tanto para la batición fermentada como para el aguardiente producido.
3. La levadura *S. cerevisiae* C3 presenta un ahorro de miel final de 3441 t/año y un incremento en la producción de alcohol A de 15711 HL/año con respecto a la levadura *S.cerevisiae* Santa Cruz, que actualmente utiliza la fábrica.

Nomenclatura

$^{\circ}\text{Bxf}$: grados Brix final

T_{max} : temperatura máxima en grados Celsius

pHf: pH final

c.cel.: concentración celular en 10⁶/mL

A.R.R.: concentración de azúcares reductores residuales en la fermentación, en g/100 mL

Yp/s: rendimiento alcohol-sustrato durante la fermentación, en %

ART_{miel}: azúcares reductores totales en la miel, en %

ARI_{miel}: azúcares reductores infermentables en la miel, en %

ARF_{miel}: azúcares reductores finales en la miel, en %

ART_{ib}: azúcares reductores totales en la batición, en %

ARF_{ib}: azúcares reductores finales en la batición, en %

ARI_{batición}: Azúcares reductores infermentables en batición, en %

E.F: Eficiencia de la fermentación, en % Compuestos (g/100 L a.a): Compuestos volátiles no etanol, en g/100 L de alcohol absoluto

Bibliografía

1. PANCHAL, C. "Caracterización de levaduras" en Rev. Afinidad, España, Ediciones IQS vol. 457, núm. 52, 1995 págs. 50-55.
2. REED, GERALD; PEPPLER, Henry, Yeast Technology The AVI Publishing Company Inc. USA, 1995, págs. 54-56.
3. MURRAY Paul; BARON Emil; Jorgensen James; LANDRY Lois, Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C., Pfaller MA, editors. ASM press, 2007, págs. 2057.
4. DOMENECH, F. y otros. "Selección de cepas de levaduras para procesos continuos de fermentación alcohólica" en Rev. ICIDCA, La Habana, vol.26, núm.3, 1992 págs.13-16.
5. VALDÉS, Irma. "Evaluación de cepas productoras de alcohol. Memorias. II Seminario Nacional de productores de alcohol". MINAZ, Villaclara, 1996.
6. SÁNCHEZ, O. "Estudios de promotores en la fermentación alcohólica" en Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería, México, núm.2, 1996, págs.15-18.
7. Manual analítico de control unificado para la producción de alcohol y levadura. MINAZ, La Habana, 1996.
8. LÓPEZ PLANES, Reinaldo. "Diseño estadístico de experimento". La Habana. Editorial Científico-Técnica, 1998. Págs. 156-159.
9. FAHRASMANE, Luis. "Determinación de microcomponentes orgánicos por cromatografía gaseosa". Memorias. TIPAL'97, Matanzas, Cuba. 1997.