CONTAMINACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR *DEKKERA*

[1,2]Gusils C.; [1]Aráoz Martínez J. L.; [3]Guzmán P.; [3]Gonzalez G.; [3]Pereira J.; [3]Sustaita G. y [1]Ruíz, M.
[1]Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. Av. Williams Cross 3150, Las Talitas, Tucumán (CP 4101), R. Argentina; [2]CONICET; [3]Cía. Azucarera Los Balcanes - Ingenio y Destilería La Florida. microbiologia@eeaoc.org.ar

Abstract
In the ethanol industry and research community, *Saccharomyces cerevisiae* is regarded as the most competitive fermentation yeast, so industrial yeast populations are rarely studied. The *Dekkera* species has been considered as the main contaminant yeast in bioethanol production, showing a surprising growth capacity and better adaptation than *S. cerevisiae.* The aim of this study was to analyze the various measures that can be taken to eradicate this yeast contaminant in distilleries. Modifications were introduced to the fermentation process: yeasts were treated at pH 2, fermentation time was shortened, air was not fed into the prefermenter, and the power system was replaced. It was possible to control *Dekkera* presence and improve the fermentation process. It also became evident that factory staff needs to be appropriately trained to detect contamination early.

Introducción

La vía fermentativa de producción de etanol es hoy competitiva porque es sostenible y porque en esta industria, se busca fundamentalmente trabajar con materias primas baratas y una mayor eficiencia en los procesos de fermentación. La fermentación alcohólica consiste en la transformación de azúcares en etanol, gas carbónico y energía, por acción catalítica de microorganismos, especialmente levaduras (García Camus *et al.*, 2006).

Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por vía fermentativa, ya que presentan una alta productividad en la conversión de azúcares a bioetanol y se separan mejor después de la fermentación. Entre las especies más utilizadas, se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *Candida seudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida bytyrii*, *Pichia stipatis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *P. membranaefaciens.*

Las condiciones de acidez, temperatura, concentración de sustratos y higiene, así como los procedimientos industriales (preparación de pie de cuba y de mosto, limpieza, etc.), pueden permitir el desarrollo de otros tipos de microorganismos que compiten por los azúcares, produciendo compuestos orgánicos indeseables para la calidad final del alcohol, que a su vez resultan ser tóxicas para las levaduras (Camargo *et al.*, 1990).

La contaminación microbiana en el proceso de fermentación de debe a la presencia de bacterias lácticas y bacterias productoras de polisacáridos. Muy poco se conoce sobre levaduras contaminantes. La levadura *Dekkera bruxellensis* es considerada como una de las principales contaminantes de diferentes procesos fermentativos, entre ellos, el de la producción de etanol combustible.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue analizar las diferentes medidas que se pueden llevar a cabo en una destilería para lograr la erradicación de la levadura contaminante *Dekkera bruxellensis*.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en una destilería de la provincia de Tucumán, cuya producción anual de alcohol hidratado (96ºGL) es de 63 millones de litros y 60 millones de litros de alcohol anhidro. Se realizó un relevamiento y control del proceso de fermentación alcohólica que se lleva a cabo allí, tomándose diferentes muestras (levadura recuperada, crema de levaduras, mosto inicio y final, vino) y analizando los siguientes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos:

- Recuento en cámara de Neubauer: se utilizó la técnica detallada por Copersucar (1987) para cuantificar y distinguir las levaduras viables (vivas) de las inviables (muertas).
- Porcentaje de sólidos solubles (ºBrix): se usó un refractómetro automático Leica AR 600.
- Porcentaje de levadura: por centrifugación (3000 rpm, 10 minutos), se obtiene la sedimentación de las levaduras presentes en la muestra (da Silva *et al*., 2003).
- Azúcares reductores totales (% ART): se utilizó el Método de Eynon-Lane (da Silva *et al.*, 2003).
- Tenor alcohólico: se realizaron destilaciones en un equipo de Kjeldahl y se determinó el tenor alcohólico, expresado en grados Gay-Lussac (ºGL), mediante la utilización de un densímetro digital (Planalsucar, 1980). El valor determinado representó la cantidad de alcohol (litros) existente en 100 l de una mezcla hidroalcohólica a 20ºC (da Silva *et al*., 2003).

Resultados

Durante el muestreo, realizado con la intención de hacer un relevamiento de datos y muestras para poder realizar la determinación de rendimiento alcohólico en la destilería bajo estudio, observamos levaduras de morfología diferente a la de las que se emplean en el ingenio para la fermentación de melaza y jugo de caña de azúcar en las cubas y prefermentador. Por las

características morfológicas, la levadura que contaminaría el proceso sería una *Dekkera* sp. Las levaduras del género *Brettanomyces*, o *Dekkera*, su forma teleomórfica (nombre que reciben las especies que presentan reproducción sexual y, en consecuencia, formación de esporas por meiosis), fueron descritas por primera vez por Claussen en 1903 en la producción de cerveza (Clausen, 1903). Este género se conoce, desde hace tiempo, como agente contaminante en la industria cervecera, de la sidra y de bebidas carbonatadas. En la industria enológica, su descripción como alterante es más reciente. Aunque al género lo constituyen cinco especies diferentes, en vinos aparece únicamente *Dekkera bruxelliensis*. La morfología celular es ojival o cilíndrica, con gemación multipolar en reproducción vegetativa, y tiene un tamaño celular variable (Figura 1).

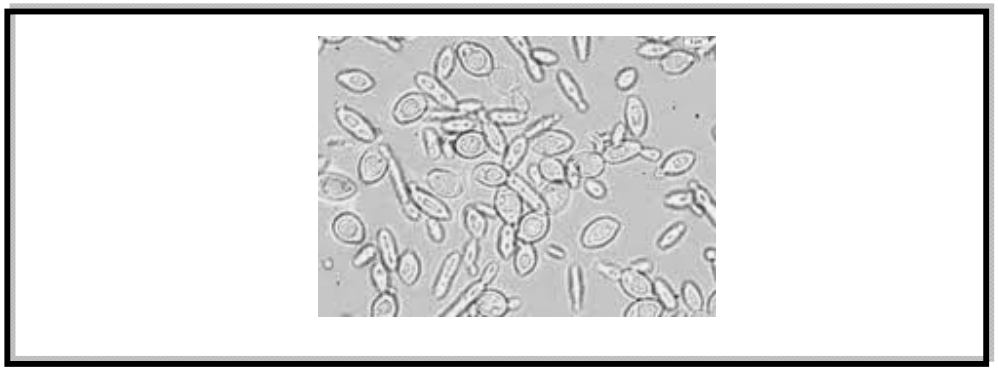

Figura 1. Fotografía donde se observa la morfología de *Dekkera* (x1000). Fuente: Microvitis (http://www.microvitis.com/Microscopie.php).

Algunas características importantes de estas levaduras son las siguientes:
a) Nutrientes. Como fuente de carbono, *Dekkera* emplea azúcares residuales presentes en el mosto después de la fermentación alcohólica. En cuanto a los compuestos nitrogenados, presenta requerimientos escasos, aunque la presencia de aminoácidos y sales amoniacales estimula la proliferación celular. Se aconseja una nutrición adecuada en fermentación alcohólica, pero nunca en exceso, sobre todo en sales de amonio.
b) Tiempo. *Dekkera* posee un metabolismo lento, por lo que el factor tiempo es requisito fundamental para el desarrollo de poblaciones alterantes.
c) Temperatura. La temperatura activa el metabolismo celular, pero temperaturas bajas (< 8ºC) y altas (> 42ºC) pueden inhibir su crecimiento.
d) Oxígeno. Es una levadura capaz de desarrollar en anaerobiosis, aunque la presencia de oxígeno favorece su desarrollo y estimula la síntesis de ácidos volátiles.

Teniendo en cuenta el metabolismo de estas levaduras y los procedimientos que se llevan a cabo en la fermentación, se realizaron las siguientes modificaciones al sistema:
1) Disminución del pH de tratamiento de levaduras en el prefermentador.
2) Disminución del tiempo de fermentación.
3) Eliminación del agregado de aire en el prefermentador.
4) Modificaciones en el sistema de alimentación.

En las siguientes figuras, se puede observar la evolución del proceso de fermentación con las diferentes modificaciones realizadas.

En la Figura 2A observamos el tipo de alimentación que se suministró diariamente al proceso fermentativo: mielaza, mosto y/ o jugo de segunda presión clarificado. Es importante destacar que a partir del día 21 de octubre, no se alimentó con jugo de caña de azúcar. Esto es

importante ya que, al no suministrar jugo, se disminuye el aporte de nitratos a la alimentación, sustancias que estimulan el desarrollo de la levadura contaminante.
En la Figura 2B, podemos observar la incorporación de azúcares reductores al sistema, así como también los valores obtenidos en el vino centrifugado, posterior al proceso de fermentación.

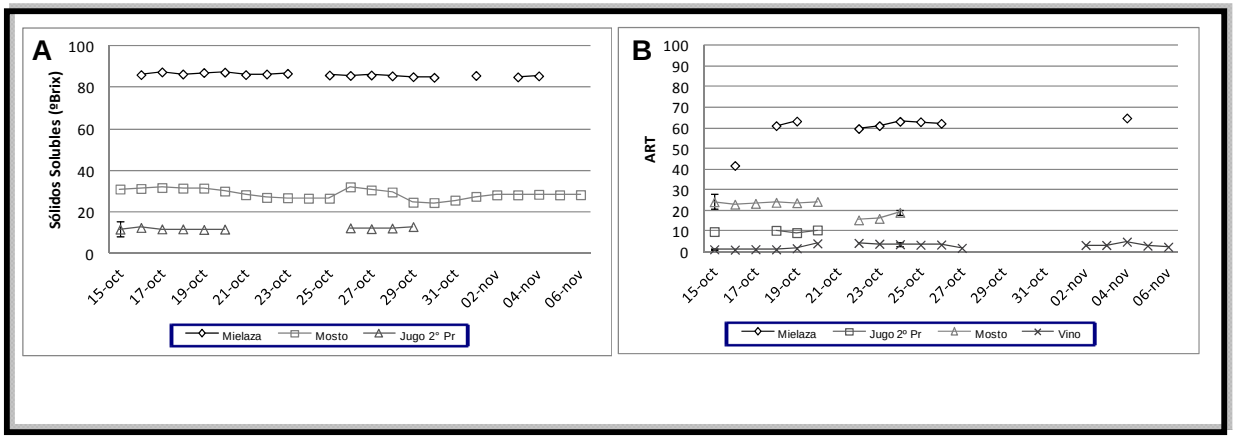

Figura 2. Alimentación del proceso de fermentación; A) sólidos solubles y B) azúcares reductores totales.

En la Figura 3, se observa el proceso de acidificación con ácido sulfúrico en el prefermentador. A partir del día 18 de octubre, se decidió disminuir el pH entre valores de 1,8 y 2,0 para poder controlar esta levadura contaminante, ya que tiene poca resistencia a las condiciones ácidas, a valores de pH menores a 2,2. No se pudo reducir más el pH (hasta 1,5) por la baja viabilidad de *Saccharomyces* (20%), ya que el proceso podría verse afectado por completo. El día 3 de noviembre, se normalizó el tratamiento ácido, ya que se logró controlar la contaminación.

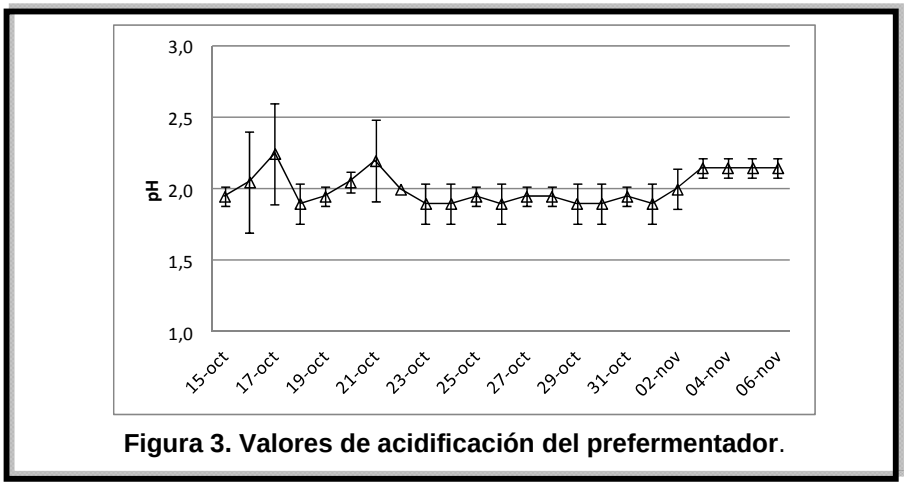

Figura 3. Valores de acidificación del prefermentador.

En la Figura 4, se muestra la cantidad de sólidos solubles presentes en todas las cubas de fermentación del sistema continuo, durante el período de control del proceso. El día 20 de octubre, se transfirió el mosto de fermentación directamente desde la cuba 3 a la cuba 5, porque se observó que la cuba Nº 4 presentaba valores de sólidos solubles (ºBrix) constantes, lo que permitió una disminución del tiempo de fermentación. Esto puede representar una

ventaja frente al desarrollo de la levadura contaminante, al presentar una velocidad de crecimiento y de fermentación mucho menor que la de *Saccharomyces*.

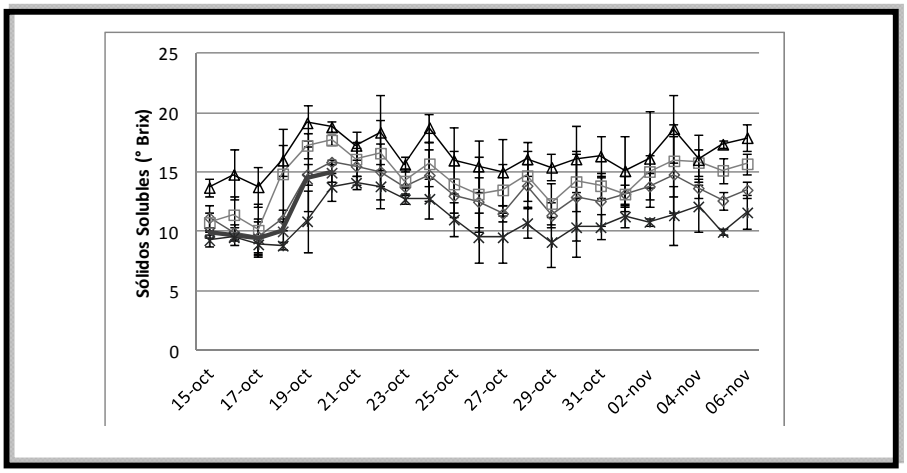

Figura 4. Sólidos solubles (ºBrix) en las diferentes cubas de fermentación.

En la Figura 5, se observa la viabilidad de las levaduras en estudio, *Saccharomyces* y la contaminante tipo *Dekkera*. En el día 17 de octubre, la viabilidad de *Saccharomyces* se encontraba muy disminuida (20%) con respecto al valor normal que se espera en la cuba de fermentación. Por el contrario, *Dekkera* presentaba un valor de viabilidad del 45%, que aumentó al 70% el día 19 de octubre. La misma tendencia se observó cuando se realizó el recuento de las levaduras, lo cual nos indicaba el grado de contaminación del sistema de fermentación. Luego de tomarse las medidas anteriormente mencionadas para tratar de mejorar el proceso, observamos que a partir del día 27 de octubre, comenzaron a disminuir los valores de viabilidad de la levadura contaminante y a acrecentarse la viabilidad de *Saccharomyces*.

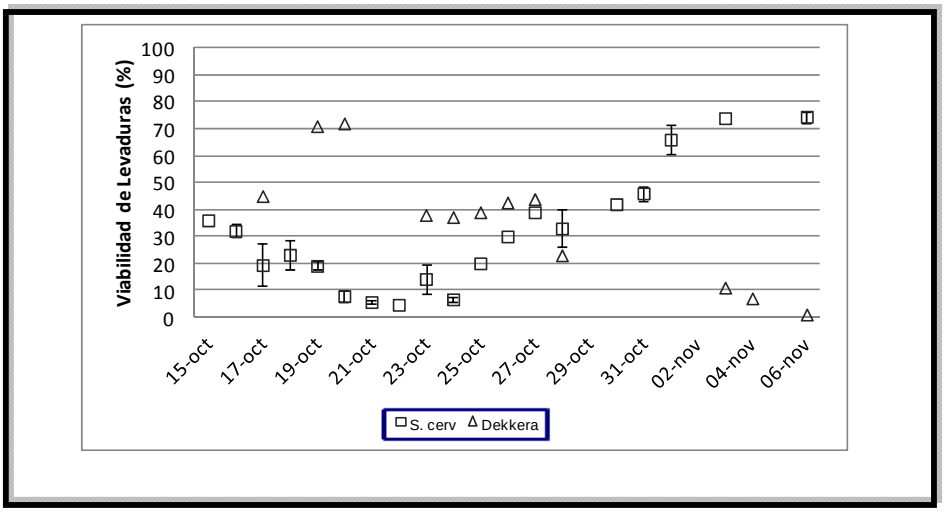

Figura 5. Viabilidad de *Saccharomyces* y *Dekkera* en la cuba de fermentación Nº 5.

Por otra parte, en los diferentes días que se analizaron las muestras correspondientes a cubas de fermentación, se detectó la presencia de levaduras de morfología oval con formación de

pseudohifas, morfología correspondiente a *Candida*, otro tipo de levadura contaminante del proceso. El recuento de este tipo de levadura fue muy bajo y las medidas tomadas para el control de *Dekkera* evitaron su proliferación.
Por último, podemos observar en la Figura 6 que la producción de alcohol disminuyó entre los días 19 y 22 de octubre. A partir de esta fecha, se produjo un aumento paulatino en la producción de alcohol, debido a un mejoramiento del proceso de fermentación principalmente por el aumento de la viabilidad y recuento de *Saccharomyces*.

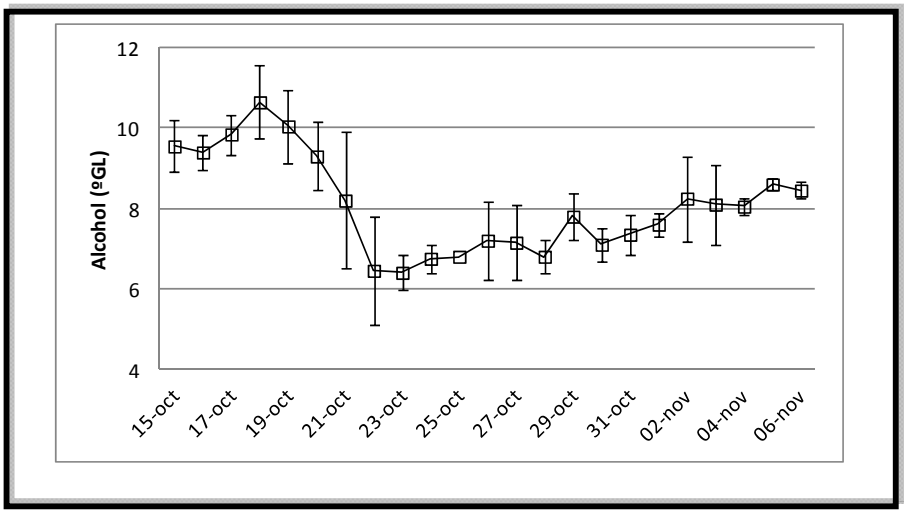

Figura 6. Determinación de alcohol en muestra de vino.

Conclusiones

Es importante destacar que, en conjunto, se logró realizar el control y manejo de la levadura contaminante, lo que nos servirá de experiencia para poder afrontar futuras contaminaciones en la fermentación alcohólica.
Es necesario capacitar al personal de las industrias para que sean capaces de detectar una contaminación en forma temprana, lo cual permitirá controlarla en forma más rápida, sin alteraciones importantes en la capacidad de producción de alcohol.

Citas bibliográficas

Camargo C. A.; Ushima A. H.; Ribeiro A. M. M.; Souza M. E. P e Santos N. F. 1990. Manual de recomendações: conservação de energia na indùstria do açúcar e do àlcool. Instituto de Pesquisas Tecnològicas, São Paulo, Brasil.
Claussen N. H. 1903. Improvements in and connected with the manufacture of English beers or malt liquors and in the production of pure yeasts cultures for use therein. Eng. Pat. 28: 184.
Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do estado de São Paulo ltda (Copersucar). Manual de Métodos Anallíticos Controle Químico Da Fermentação 1987. 1. ed. Copersucar ltda., São Paulo, Brasil.
Da Silva L. F.; Bernardino C. D.; Ré F. E.; Furtado C. H. F. e Amorim H. V. 2003. Métodos analiticos para o controle da produção da açúcar e álcool. 3. ed. Fermentec editora. Piraxicaba, Brasil
García Camus J. M. e García Laborda J. A. 2006. Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Informe de Vigilância Tecnológica.
Planalsucar. 1980. 1º Curso de Fermenteiro. Teoría e prática de fermentação. Programa Nacional de Melhoramento da cana-da-açúcar. Brasil