

EMPLEO DE ERITROSINA PARA EL ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LEVADURAS EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

¹Araoz Martinez J. L.; ¹Cárdenas G.; ¹Ruiz M. y ^{1,2}Gusils C.

¹Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. Av. William Cross 3150, Las Talitas, Tucumán (CP 4101), R. Argentina. ²CONICET. microbiologia@eeaoc.org.ar

Abstract

Alcoholic fermentation is a process that involves the use of yeasts to obtain alcohol from sugar. Controlling yeast viability is highly important for this process to succeed. Erythrosine is a dye that can be used in the counting chamber, instead of methylene blue, which is conventionally utilized.. The present work aimed to compare the performance of erythrosine and methylene blue in determining cell viability. Both dyes were used in parallel to analyze 100 samples from different fermentation process stages. Results were analyzed by regression and it was observed that they differed slightly, so there were no significant differences between using either dye. Apart from that, erythrosine presents additional advantages, such as the fact that it is prepared more easily and quickly, it does not stain microscopy equipment and it reveals better contrasts between live and dead cells. These assets make erythrosine a more attractive alternative.

Introducción

El cultivo de la caña de azúcar en Tucumán es la principal actividad agroindustrial, la cual tiene como finalidad la producción de azúcar y alcohol.

El proceso de fermentación industrial para producir biocombustibles consiste en la transformación bioquímica de los azúcares de diversas materias primas en alcohol y CO₂, buscando los máximos rendimientos y el menor grado de pérdidas posibles (Lopes, 2002).

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura empleada por excelencia en la fermentación, por su capacidad fermentadora (rendimiento y velocidad), tolerancia osmótica al etanol, resistencia a medios ácidos y a temperaturas, alta viabilidad celular para reciclajes y estabilidad genética (Ferrari *et al.*, 1980). Sus células elípticas miden alrededor de 6-8 µm de longitud por 5 µm de ancho y su reproducción asexual se realiza por brotación (Pelczar Jr. e Reid, 1981).

En la búsqueda de optimizar el estudio del comportamiento de las levaduras en los procesos de fermentación, es importante emplear técnicas confiables y de mejor resolución.

La viabilidad celular es, sin duda, un aspecto importante en el control de la fermentación alcohólica. Cuanto mayor es el número de células vivas, mejor será el rendimiento neto del proceso. La presencia de alcoholes superiores (n-butanol, alcohol isoamílico), ácidos grasos y ésteres, incluso a bajas concentraciones, hace que estos actúen de una manera sinérgica como intoxicantes de las células de levadura, dando lugar a la muerte y, en consecuencia, a una disminución de la viabilidad celular (Ceccato-Antonini, 2010).

Existen numerosas pruebas para determinar la viabilidad celular, entre las que se pueden mencionar la coloración de células por microscopía directa y el cultivo en medios agarizados.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el uso del colorante eritrosina para determinar la viabilidad de células de levadura, como una alternativa al azul de metileno, el cual se emplea convencionalmente.

Materiales y métodos

Para estudiar la viabilidad, se realizó el conteo de células con cámara de Neubaüer (Copersucar, 1987), en crema de levadura, pre-fermentador, mostos en las diferentes etapas de fermentación y vino.

Soluciones para recuentos de células

Eritrosina

Se disolvió 1 g de eritrosina en 100 ml de agua destilada; luego se agregó 1 ml de esta solución en 50 ml de solución tampón, partes iguales de Na₂HPO₄ 0,2 M y NaH₂PO₄ 0,2 M, obteniendo una solución del colorante de 1:5000 (Oliveira *et al.*, 1996).

Azul de metileno

Se pesaron 0,025g de azul de metileno; 0,9g de NaCl; 0,042g de KCl; 0,048g de CaCl₂.6H₂O; 0,02g de NaHCO₃ y 1g de glucosa. Se disolvieron en 100 ml de agua destilada con agitación constante durante seis horas. Posteriormente, la solución se filtró y se almacenó en un recipiente oscuro, para preservarla de la luz.

Recuento en cámara de Neubaüer

100 µl de cada uno de los colorantes se mezclaron con igual volumen de diluciones de las muestras, colocando posteriormente un volumen de las mezclas en la cámara de recuento. Se observó al microscopio, empleando un aumento de 400x.

Resultados

Para evaluar la eficacia del empleo del colorante eritrosina, se analizaron, por triplicado y en paralelo con la tinción con azul de metileno, un total de 100 muestras de diferentes etapas

del proceso. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de regresión para comparar ambas técnicas.

El análisis de regresión realizado mostró una linealidad entre los valores de recuentos obtenidos con ambos colorantes, presentando un $R^2=0,9626$ (Figura 1).

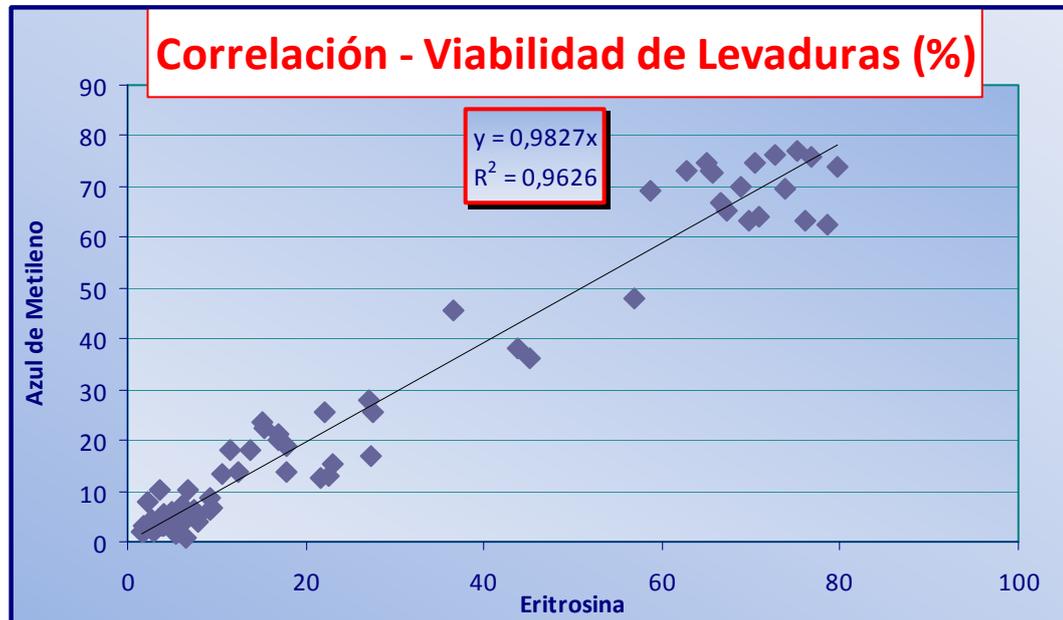


Figura 1. Estudio de correlación entre análisis de viabilidad de levaduras empleando eritrosina y azul de metileno.

Pudimos observar que el empleo del colorante eritrosina para el recuento de levaduras presenta ventajas sobre la utilización del azul de metileno:

- 1) Su preparación es más simple, presentando un menor requerimiento de sales y tiempo.
- 2) Sus residuos son fácilmente removibles de superficies y materiales de uso.
- 3) El colorante acentúa las diferencias entre las células viables e inviables, permitiendo un mejor contraste en la visualización microscópica, tal como se observa en la Figura 2.
- 4) La solución del colorante se almacena en heladera por periodos de hasta ocho meses y, en solución, es más estable a la luz que la de azul de metileno.
- 5) En muestras de mostos con alta concentración de melaza, el azul de metileno se torna de un color verdoso que dificulta la visualización de las levaduras muertas.

Como se mencionó anteriormente, es importante controlar la viabilidad celular, ya que existen diferentes factores que pueden causar estrés en las células de levadura durante el proceso de fermentación industrial.

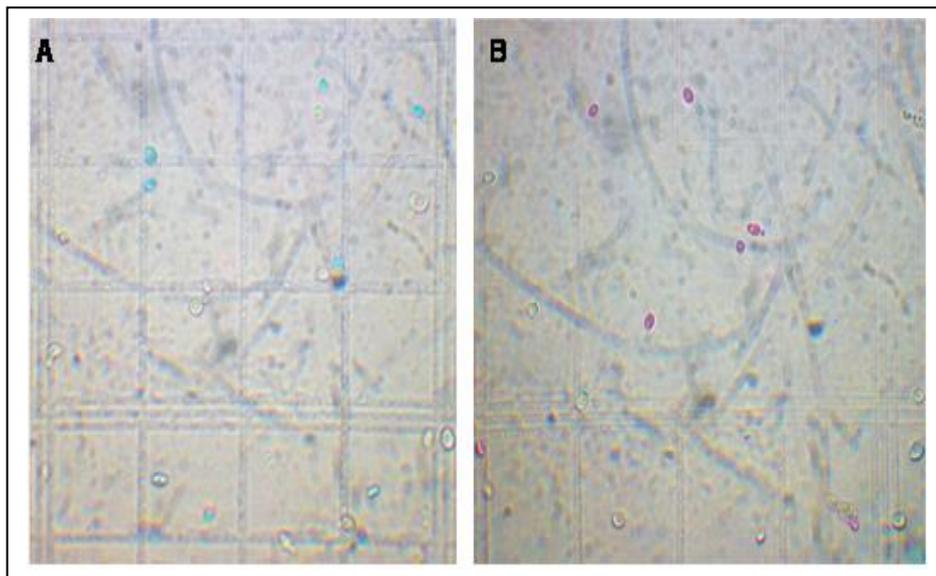


Figura 2. Microscopia óptica (400x) de levaduras teñidas con los colorantes vitales azul de metileno (A) y eritrosina (B).

Conclusión

Del presente trabajo, se puede concluir que el análisis de regresión realizado no presenta variabilidad en el empleo de la eritrosina como colorante, respecto de la metodología convencional que utiliza azul de metileno para el recuento de células en cámara de Neubaüer.

Las coloraciones de las células con azul de metileno o eritrosina han sido empleadas extensamente, por la facilidad y rapidez del análisis, en el control de la viabilidad celular en los procesos de producción de levadura (levadura prensada) y fermentación alcohólica. Actualmente, esta técnica se utiliza en Brasil y se detalla en numerosas publicaciones (Ceccato-Antonini, 2010). Sus ventajas abarcan desde una preparación rápida y sencilla de sus soluciones hasta una mejor definición y contraste, incluso en muestras con altas concentraciones de melaza. Así mismo, la solución de eritrosina puede almacenarse por largos períodos de tiempo en heladera, presenta mayor estabilidad y no mancha los elementos de microscopia.

Citas bibliográficas

- Ceccato-Antonini S. R. 2010. Microbiologia da fermentação alcoólica. A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. EduFSCar, São Carlos, Brasil.
- Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda. (Copersucar). 1987. Metodologia da análise microscópica (Viabilidade). 1. ed. Copersucar, São Paulo, Brasil.
- Ferrari S. E.; Lopes J. J. C.; Leme J. R. A. and Oliveira E. R. 1980. Industrial efficiency of alcohol fermentation: the comparative study. En: Proc. International Symposium of the Alcohol Fuels Technology, 4, pp. 139-141.
- Lopes M. L. 2002. Curso de Fermentação Alcoólica. [CD ROM]. Piracicaba, Brasil.
- Oliveira A. J. *et al.* 1996. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP. Piracicaba, Brasil.
- Pelczar Jr. M. J.; Reid R.; Cham, E.C.S. 1981. Fungos: as leveduras. En: Microbiologia, McGraw-Hill, Brasil, vol. 1, pp. 345-366.