

Determinación de compuestos sensoriales en destilados obtenidos de fermentación alcohólica utilizando sistemas nanoestructurados magnéticos

Arianna Núñez-Caraballo¹, Anna Iliná¹, Rodolfo Ramos-González¹, Carolina Flores-Gallegos², Magdalena Lorenzo-Izquierdo³, Cristóbal Aguilar-González², Georgina Michelena-Álvarez², Abelardo Flores-Vela⁴ y José Luis Martínez-Hernández^{1*}

1. Grupo de Nanobiociencia, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, 25280 Saltillo, México.
*jose-martinez@uadec.edu.mx
2. Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, 25280 Saltillo, México.
3. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.
4. Instituto Politécnico Nacional – Tamaulipas, Km 14.5 Carretera Tampico, Puerto Industrial Altamira, Tamaulipas, México.

RESUMEN

En este trabajo se realizó la caracterización de una melaza de la región de Tamaulipas, en México, que fue utilizada en la fermentación alcohólica. Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el efecto de ferrita de manganeso (sistema magnético nanoestructurado) y presencia de co-cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* 150 y *Kluveromyces marxianus* sobre la producción de etanol y compuestos sensoriales. Se demostró que el proceso de inmovilización y el empleo de co-cultivo favorece la producción de etanol y de compuestos sensoriales que se encuentran dentro de los valores permisibles por la norma.

Palabras clave: fermentación alcohólica, congéneres, nanopartículas, melaza de caña.

ABSTRACT

In this work, the characterization of a molasses from the region of Tamaulipas Mexico was performed, which was used in alcoholic fermentation. Different assays were carried out to evaluate the effect of manganese ferrite (magnetic nanostructured system) in presence of co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* 150 and *Kluveromyces marxianus* to produce ethanol and favorable sensory compounds. It was possible to demonstrate the immobilization process and the use of co-culture allow the production of ethanol and sensory compounds, which are within the permissible values of Mexican norm.

Key words: alcoholic fermentation, congeners, nanoparticles, cane molasses.

INTRODUCCIÓN

La producción de bebidas alcohólicas es una de las actividades más practicadas a nivel mundial por ser uno de los productos más rentables en el mercado (1). Los procesos de producción de bebidas alcohólicas para consumo humano incluyen la destilación, para la separación de la mezcla etanol-agua que proviene del proceso de fermentación.

En general, las levaduras durante la fermentación convierten los azúcares presentes en el medio en etanol, CO_2 y en una variedad de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen a la complejidad sensorial de las bebidas que fermentan (2). Los ésteres representan el mayor grupo de compuestos aromáticos en bebidas alcohólicas fermentadas (3) y son producidos mediante reacciones enzimáticas. Los ésteres imparten el aroma frutal en las bebidas fermentadas, por esa razón su presencia determina en parte la calidad sensorial (4).

En el caso de la destilación del mosto fermentado, los compuestos volátiles son comúnmente asociados con las propiedades sensoriales y aromáticas de la bebida. Su contenido y concentración en los destilados depende, en gran medida, del microorganismo y producen un número elevado de distintos compuestos como metanol, acetaldehído, furfural, ésteres, alcoholes superiores (butanol, isobutanol, amílico e isoamílico). Si su concentración en las bebidas alcohólicas es elevada, estas pueden ser tóxicas para el organismo y son los responsables del dolor de cabeza que se manifiesta después de la embriaguez, motivo por el cual se debe cumplir con las especificaciones que establece la norma reguladora, para poder producir y comercializar la bebida alcohólica destilada (5).

En general, la biosíntesis de ésteres es afectada por diversos factores como la temperatura de la fermentación, la aireación del mosto, la cepa de levadura y la técnica de fermentación (6). El crecimiento intenso de levaduras está relacionado con una excesiva producción de alcoholes superiores (7).

Para la determinación de dichos componentes se utiliza la cromatografía de gases que facilita la separación, identificación y determinación de componentes relacionados con mezclas complejas. Es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Hay que tener en cuenta que la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportarlo a través de la columna. Es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles, lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos.

El presente estudio se enfocó en la determinación de los compuestos sensoriales en destilados bajo un sistema de fermentación con levadura inmovilizada en nanopartículas a partir de melaza de caña, proveniente de la región de Tamaulipas en México. Para esto, inicialmente se realizó su caracterización antes de ser aplicada en la fermentación alcohólica. Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el efecto de ferrita de manganeso (sistema magnético nanoestructurado) y presencia de co-cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* 150 y *Kluveromyces marxianus* sobre la producción de etanol y compuestos sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La melaza de caña fue proporcionada por una empresa azucarera del estado de Tamaulipas, México. La misma se disolvió en agua estéril, que se calentó y se agitó hasta diluir totalmente. Posteriormente se centrifugó 2 veces con el fin de retirar gran parte de las impurezas, se esterilizó por 20 min a 120 libras de presión. La caracterización se realizó de acuerdo con los métodos convencionales (8).

Microorganismos y preparación de inóculo

Se utilizaron 2 cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* 150 y *Kluveromyces marxianus*, pertenecientes a la colección de cultivos del Grupo de Nanobiociencia de la UadeC. Las cepas se conservaron en agar en tubo inclinado de YPG (glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L y agar 15 g/L) a 4 °C.

Para obtener el inóculo, una asada de cada cepa fue transferida a 50 mL de medio sintético (glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L). La fermentación se llevó a cabo durante 18 h, a 150 rpm y 32 °C, hasta obtener una concentración de 10^7 células/mL.

Fermentación alcohólica

La fermentación anaeróbica se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL y se utilizaron 300 mL de melaza de caña ajustada a 20° Brix. Los reactores fueron equipados con tapas de goma, capilares de cristal y una trampa de CO₂. El 10 % del inóculo se adicionó a la melaza suplementado con 1 g/L de KH₂PO₄, 1.59 g/L de NH₄SO₄ y 0.5 g/L de MgSO₄·7H₂O. Se ensayaron diferentes variantes compuestas por:

- *Kluveromyces marxianus* libre, *Saccharomyces cerevisiae* 150 libre.
- *Kluveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* 150 libre.
- *Kluveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* 150 en presencia de 460 mg/mL de nanopartículas magnéticas de ferrita de manganeso recubiertas con quitosán (NPMQ).
- *Saccharomyces cerevisiae* 150 con NPMQ.

El procedimiento de la síntesis y caracterización de las nanopartículas magnéticas, así como la inmovilización de levaduras mediante la adsorción en NPMQ, se describen en el trabajo previo (9) desarrollado por grupo de Nanobiociencia de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Destilación y cuantificación de compuestos

El fermento una vez obtenido fue destilado. Para ello, se vierte el vino en un balón de 500 mL y se calienta utilizando una hornilla o manta. La temperatura de 80 °C de los vapores se chequea continuamente con un termómetro acoplado a la boca del botellón. Los vapores que se forman pasan a través de un condensador, donde se enfrían y se colecta el condensado en una probeta hasta alcanzar un volumen de 50 mL de destilado que será analizado posteriormente. El intercambio de calor dentro del condensador se realiza entre los vapores que desprende el vino y agua helada. Cuando concluye la destilación se descarga el vino pobre en etanol (vinaza).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la caracterización de la melaza se muestran en la tabla 1, comparándose estos valores con los reportados para la melaza utilizada en la industria azucarera cubana para la producción de etanol (8). Se observa que la melaza de Tamaulipas presenta 82.16 °Brix y la melaza de Cuba tiene un valor de 86 °Brix, siendo menor la de Tamaulipas pero aceptable para su utilización como materia prima pues con 80 °Brix ya se considera apta para la fermentación. Además se obtuvo que el por ciento de azúcares fermentables es mayor en la melaza de Tamaulipas que la melaza de Cuba, un factor importante para su posterior fermentación pues son mayores los azúcares disponibles, en cuanto a las cenizas y contenido de nitrógeno las melazas de Tamaulipas presentan menor

Tabla 1. Caracterización de la melaza

Determinaciones	Unidad	Melaza Tamaulipas	Melaza cubana
Sólidos solubles	°Brix	82.16 ± 1.16	86 ± 1.2
pH		5.23 ± 0.01	5.6 ± 0.08
Azúcares fermentables	(%)	66.34 ± 1.14	57 ± 1.17
Cenizas	(%)	9.17 ± 0.09	9.3 ± 0.12
Nitrógeno	(%)	0.21 ± 0.06	0.51 ± 0.13

número, debido a que la composición varía dependiendo de la variedad, la edad, la fitosanidad, el suelo, las condiciones meteorológicas y el manejo agronómico, que se emplean en cada país.

En la tabla 2, se presentan los resultados de la cuantificación de los principales compuestos sensoriales detectados en el destilado obtenido como producto de la fermentación de melaza caracterizada en diferentes ensayos efectuados.

Tabla 2. Comparación de la producción de componentes volátiles mayoritarios (g/100L)

Variantes	Acetaldehído	Acetato de etilo	Acetal	Metanol	1-butanol	Alcoholes superiores	Etanol (g/L)
<i>K. marxianus</i>	1.02 ± 1.13	3.54 ± 1.01	2.21 ± 3.43	1.3 ± 1.02	0	150	29.1 ± 1.2
<i>S. cerevisiae</i> 150	0	0.82 ± 0.15	0	0.15 ± 1.08	0	78.05	50.7 ± 3.1
<i>S. cerevisiae</i> 150 NPMQ	0	0.86 ± 1.55	0	0.11 ± 0.11	0	83.02	56.1 ± 4.0
<i>K. marxianus</i> y <i>S. cerevisiae</i> 150	15.37 ± 0.48	1.36 ± 1.05	6.31 ± 1.98	1.53 ± 1.02	1.09 ± 0.37	180	63.1 ± 2.5
<i>K. marxianus</i> y <i>S. cerevisiae</i> 150 NPMQ	3.66 ± 4.11	4.77 ± 0.18	2.25 ± 1.56	1.61 ± 0.42	0.98 ± 0.09	185.4	70.0 ± 3.7

Se demuestra (tabla 2) que el proceso de inmovilización y la presencia de *Kluveromyces marxianus* favorecen la producción de compuestos sensoriales. Los mayores valores de todos los compuestos se observaron en el caso de cultivo mixto inmovilizado. En ningún sistema se produjo 2-butanol. Todos los alcoholes superiores que se determinaron se encuentran dentro de los rangos permitidos por la norma (10). El comportamiento observado en el sistema *S. cerevisiae* y *K. marxianus* difiere de lo reportado anteriormente por Escalante *et al.* (11), quienes no demostraron las diferencias en alcoholes superiores entre el cultivo mixto y libre y utilizaron *Brettanomyces intermedius* y *S. cerevisiae* en la fermentación de sidra. En la actualidad los estudios muestran que todavía no se comprende bien cómo los organismos responden a la inmovilización, pues depende de la cepa y el soporte utilizado y si esto favorece la sobreexpresión de genes que actúan en el metabolismo de dichos organismos, favoreciendo la producción de metabolitos secundarios (12).

En ensayos de fermentación realizados en el presente estudio se observó que la producción de etanol se incrementó en presencia de NPMQ, tanto para levadura individual como para el co-cultivo. Cabe mencionar que en el estudio previo (9) se demostró que el uso de NPMQ conduce a la disminución de tiempo de fermentación y posibilidad de reuso de biomasa en varios ciclos de fermentación mediada por su separación magnética.

CONCLUSIONES

La melaza de caña de la región de Tamaulipas se caracteriza por varias similitudes al compararla con la de Cuba destacando, sin embargo, mayor nivel de azúcares reductores y menor contenido de nitrógeno. El uso de co-cultivo y NPMQ conduce a obtención de mayores niveles de etanol en tiempos de fermentación más cortos. Los niveles de compuestos volátiles detectados en destilados se encuentran dentro del rango permitido por la norma mexicana. Sin embargo, los mejores resultados se observaron en caso de cultivo mixto inmovilizado en NPMQ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carretero, F. (2010). Procesos de fabricación de bebidas alcohólicas. *Innovación Tecnológica en la Industria de Bebidas* Vol.22, 73-79.
2. Swiegers, J.; Pretorius, I.(2005) Yeast modulation of wine flavour. *Advances in Applied Microbiology* Vol.57, 131–175.
3. Suomalainen, H. (1981) Yeast esterase and aroma esters in alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing* Vol. 87, 296–300.
4. Pérez, E.; González-Hernández, J.C.; Chávez-Parga, M.C (2013) Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de Mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 12, No. 3 451-461.
5. Vásquez, I. (2013) Determinación de acetato de etilo en bebidas alcohólicas destiladas con añejamiento (ron) por el método de cromatografía de gases. Tesis de Grado para optar por el Título de: Química de alimentos.
6. Rojas, V.; Gil, J.; Pinaga, F.; Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283–289.
7. Fredlund, E.; Blank, L.; Sauer, U.; Passoth, V. (2004). Oxygen and glucose dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5905–5911.
8. Otero, M.A. (1990) Las Mieles de Caña en: II Seminario Internacional de Azúcar y Derivados de la Caña, La Habana, abril 10-13.
9. Núñez, A.; Martínez, J.; Aguilar, N.; Ramos, R.; Segura, E. ; Ríos, L.; Morales, T.; Michelena, G.; Flores, C.; Ilyina, A. (2019) Ethanolic fermentation of sugarcane molasses with *S.cerevisiae* immobilized in a nanostructured magnetic support." *Refining of petroleum and petrochemical products: problems and perspectives* UFA, Rusia, 5-6 Diciembre.
10. Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015, Bebidas alcohólicas Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
11. Escalante, W.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Ibáñez, F.; Cotos, R.; Bravo, N.; Memenza, M.; Chávez, Y. (2014) Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 5-14.
12. Djordjevic, V.; Willaert, R.; Gibson, B.; Nedović, V. (2016) Immobilized Yeast Cells and Secondary Metabolites. *Fungal metabolites*, 2-22.