



Efecto de las microondas sobre el estrés térmico en la fermentación alcohólica.

Effects of microwaves on thermal stress in alcoholic fermentation.

Dr. Marcelo Marcet Sánchez
Universidad de Matanzas, Dpto. de Química e Ingeniería Química, Autopista a Varadero km 3½, Matanzas, Cuba.
marcelo.marcet@umcc.cu

Enrique Marcet García
Instituto Superior Politécnico José A. Echeverría (Cujae), Facultad de Ingeniería Química, Marianao, La Habana, Cuba.
marcet.enrike@gmail.com

Resumen:

En el presente trabajo se estudia, caracteriza y optimiza el efecto de las microondas sobre la actividad fermentativa de cepas de levaduras cubanas usando como sustrato mieles de caña de azúcar.

Se desarrolló un proceso para activar la fermentación de mieles con *Saccharomyces cerevisiae* a través del uso controlado de microondas. Las células de levaduras sometidas a efectos adversos relacionados con las condiciones del medio, incrementan el estímulo a su supervivencia y los mecanismos moleculares de respuesta definido esto como "respuestas de emergencia". Se observó que las levaduras sometidas a condiciones de estrés por temperatura pueden incrementar su actividad fermentativa al ser sometidas a exposiciones controladas de microondas. En este trabajo se muestra la posibilidad de incrementar los rendimientos en la producción de alcohol mediante el uso de estos tratamientos.

Palabras clave: Levaduras, microondas, fermentación, alcohol, estrés

Abstract:

The present work studied, characterized and optimized the effect of microwaves on the fermentative activity of Cuban yeasts using sugar cane molasses substrates.

A procedure to activate the fermentation of molasses with *Saccharomyces cerevisiae* was developed through the controlled use of microwaves. The yeast cells provided adverse effects in relation to the medium conditions increasing



the survival stimulus and rapid molecular response defined as “emergency responses”.

It was noted that yeasts exposed to temperature stress conditions can rise its fermentative capacity according to the controlled exposure times to microwaves. The present study shows the possibilities of increasing yields for alcohol production by treating conveniently fermentation yeasts.

Key words: Yeast, ethanol, fermentation, microwaves, stress

Introducción:

Desde el siglo XVIII los científicos se han preocupado por la interacción de los campos electromagnéticos con los seres vivos.

Las microondas son parte del espectro electromagnético y se consideran como las radiaciones que fluctúan entre los 300 millones de ciclos por segundo (300 [MHz]) y los 300 billones de ciclos por segundo (300 [GHz]) que corresponden a longitudes de onda entre 1 [m] y 1 [mm]. Estas radiaciones electromagnéticas no ionizantes son absorbidas a nivel molecular y se manifiestan como cambios en la energía vibracional de las moléculas o en forma de calor.

Existen evidencias de que las microondas pueden causar diferentes efectos biológicos dependiendo de la intensidad del campo, la frecuencia, forma de la onda, modulación y duración de la exposición. Estos efectos eran principalmente atribuidos al calentamiento por las microondas pero, recientes estudios han sugerido que existen efectos no-térmicos de las microondas produciendo distintos tipos de transformaciones moleculares u otras alteraciones.

El presente estudio analiza los efectos de las microondas generadas por un horno doméstico sobre las levaduras y el efecto de éstas ante condiciones estresantes por temperatura en la actividad fermentativa según la siguiente hipótesis:

“Ciertos agentes estresantes como las radiaciones son capaces de inducir la síntesis de las proteínas especiales “Heat shock”. Se plantea que dichas proteínas atenúan los efectos adversos a que son sometidos diferentes organismos. Es posible que estas radiaciones activen la síntesis de estas proteínas y, como consecuencia, al ser sometidas las levaduras a temperaturas superiores durante la fermentación, los factores de resistencia de éstas se incrementen y como resultado, se obtengan mayores rendimientos en la producción de etanol”.

La caña de azúcar es una planta cuyo potencial genético pudiera decirse que no está del todo aprovechado, no obstante, es un cultivo, que desde el punto



de vista energético y como fuente de obtención de muchos productos químicos, tiene condiciones excepcionales. La caña de azúcar tiene la característica bioquímica de ser capaz de sintetizar carbohidratos solubles y materiales fibrosos a un ritmo muy superior al de otros cultivos y esta propiedad abre a esta planta un espectro muy amplio para su aprovechamiento. El azúcar, es el producto, que por estar más vinculado a la alimentación humana, ha sido más conocido y universalmente utilizado desde hace cientos de años.

Es de todos conocido que, como producto de comercialización internacional, el azúcar ha enfrentado una situación relativamente crítica en los últimos años y por ello en muchos países, se desarrolla una estrategia para incrementar su competitividad que ha incluido como una acción fundamental: la diversificación de la industria, mediante el uso integral de la caña de azúcar como materia prima para un elevado número de derivados y subproductos.

La mayoría de los subproductos de la producción de azúcar durante varias décadas fueron sobrantes, de escasa utilización e indeseables por sus efectos contaminantes al medio. En la actualidad, aprovechando las ventajas comparativas que ofrece la caña como fuente renovable de recursos materiales y energéticos, se ha dado paso a criterios más extendidos entre los productores, de que el azúcar tendrá una economía estable y ventajosa en la medida en que se integre la producción de derivados.

En particular, el etanol, en las últimas décadas se ha convertido en un producto muy codiciado en el mercado como componente principal del ron y de otras bebidas alcohólicas.

El uso actual del etanol en la sociedad moderna no se limita a la industria de fabricación de bebidas alcohólicas, a sus usos tradicionales como disolvente, o como producto o materia prima en síntesis orgánicas; sino que también se emplea como combustible o aditivo de estos, dada la incertidumbre que se presenta con los proveedores y costo futuro del petróleo. El estudio del empleo del etanol como combustible automotor, ha cobrado fuerza en la actualidad, lo que representa un gran impacto económico y ecológico para los países que lo empleen con ese propósito. El etanol, como carburante en los motores de combustión interna pueden utilizarse en forma anhidra, mezclado con gasolina en una proporción máxima del 20%, o en forma de etanol hidratado en un 94% sin mezclarlo con gasolina. El etanol tiene una vasta aplicación en la industria en la producción de tintes, fármacos, lubricantes, plaguicidas, detergentes, adhesivos, plastificantes, explosivos, resinas para la fabricación de fibras sintéticas, como anticongelante y como materia prima para la síntesis de otros disolventes. Se emplea, además, como cosurfactante en las microemulsiones

petróleo-agua, desinfectante y como combustible de uso doméstico (D' Amore, 1990).

La industria de los derivados de la caña de azúcar como todas las de procesos químicos, requiere de un esfuerzo innovador constante para su desarrollo competitivo que sólo podrá materializarse si se aplican los adelantos de la ciencia y la técnica, en el caso específico de Cuba es de vital importancia lograr este desarrollo competitivo en la industria azucarera por lo que se dedican grandes esfuerzos para lograrlo en este sector como caso específico y trascendental para la intensificación de la industria química cubana (Estévez, 1996).

Investigaciones encaminadas en este sentido han revelado que las levaduras industriales empleadas en la producción de etanol, durante los procesos de fermentación y crecimiento están sometidas a procesos físicos y químicos referidos colectivamente como “estrés”. Este estrés incluye: estrés por temperatura, estrés por etanol, estrés oxidativo, pH y osmo-estrés. Las células de levadura responden a estos efectos adversos de las condiciones del medio con un instinto de supervivencia y con una rápida respuesta molecular referido como “respuestas de emergencias” (Thomas, 1978).

Las respuestas al estrés en las levaduras se caracterizan por la presencia de un grupo de proteínas conocidas como proteínas estrés (hsp's) ó también llamadas “Heat shock proteins”. Estas proteínas no solo se producen en respuestas a elevadas temperaturas sino también están relacionadas a diferentes estrés del medio como por ejemplo los incrementos en niveles de Trehalosa y glicerol (osmo-estrés), alteraciones en la composición lipídica de las membranas (etanol-estrés), modulación de los procesos de intercambio iónico (estrés por pH), producción de radicales libres y enzima superóxidos dismutasa (estrés oxidativo) (Uden, 1985) y (Stier, 1953).

En la literatura consultada se presentan resultados científicos que estudian el uso de microondas en microorganismos y aunque la información es limitada, no se hace en ningún caso referencias a posibles utilidades de esta radiación con fines industriales. Dutta y colaboradores en 1980 estudiaron los efectos celulares de las microondas y las altas temperaturas sobre distintas cepas de microorganismos (Dutta y colaboradores, 1980). Posteriormente, en 1981, Dardalhon había profundizado en los efectos genéticos de las microondas en células eucarióticas y procarióticas (Dardalhon, Averbeck & Berteaud, 1981). El mismo autor con anterioridad (Dardalhon, Averbeck & Berteaud, 1979) había calculado los equivalentes térmicos de las microondas en células vivas. En 1982 Grundler y colaboradores demuestran la existencia de una relación entre la frecuencia de las microondas y el crecimiento de





levaduras (Grundler y colaboradores, 1982). Por otra parte Dergacheva en 1998, estudió el efecto del calentamiento producido por microondas en su relación con las concentraciones celulares (Dergacheva, Morozov & Petin, 1998). En 1999, Velizarov demostró que no era térmico el efecto de los campos de radiofrecuencias en la proliferación celular (Velizarov, Raskmark & Kwee, 1999).

El objetivo del siguiente trabajo es establecer y optimizar un procedimiento de trabajo que permita, mediante el uso controlado de microondas lograr un efecto activante de la fermentación alcohólica en condiciones de estrés térmico.

Materiales y métodos:

Se utilizan frascos de 500 [mL] de capacidad lavados convenientemente con detergente y secados a 120 °C en estufa (MLW, WSU-100, RDA). Se prepara el medio de cultivo, para lo cual se disuelve miel final, obtenida de la industria de producción de azúcar y destinada a la elaboración de alcohol, en agua hasta ajustar el porcentaje de sólidos solubles expresados en grados Brix (°Bx) a un valor entre 17-18 [°Bx], determinado aerométricamente y refractométricamente (refractómetro de Abbe, Jena, RDA). Se vierte 250 [mL] de la solución en cada frasco y posteriormente se esteriliza a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos en una autoclave portable (SMIC, W52-84-64, R.P.China). Para la preparación del inóculo se disuelven, en 10 [mL] de agua, previamente esterilizada, 1,5 [g] de levadura liofilizada (Nevada) en frascos transparentes de 25 [mL] de capacidad. Estos frascos son sometidos a irradiación en un horno de microondas (Citizen, JM5536 de Japón) con control digital por espacio de tiempo entre 0 y 13 segundos. Posteriormente la suspensión es transferida cuantitativamente a los frascos con el medio de cultivo, especificando la dosis de irradiación. De forma general el experimento queda conformado por un frasco sin levadura (blanco), uno con levadura sin irradiar (control) y frascos con levadura irradiada a 2, 4, 5, 6, 8, 10 y 13 segundos, todos con tres réplicas.

Una vez culminada la inoculación, las soluciones fueron sometidas a fermentación en una incubadora (LMIM, Hungría) a la temperatura de trabajo previamente establecida. El estudio experimental se desarrolló a cinco temperaturas de fermentación: 38, 42, 44, 46, y 48 °C. Se determinó el peso de los frascos al inicio de la fermentación y a las 24, 48 y 72 horas. La pérdida de peso debido a la evolución del CO₂ se utilizó como criterio para el estudio cinético durante la fermentación. Se realizaron tres réplicas de cada corrida experimental.





Determinaciones:

Medición de la variación del peso del frasco + medio de cultivo.

Se pesa al inicio y cada 24 horas cada uno de los frascos del experimento en una balanza técnica (Owa Labor, 34.004, RDA) y se realizan los cálculos pertinentes para determinar el contenido de CO₂ desprendido durante la fermentación.

(1) Medición de pH.

Las mediciones de pH se realizan utilizando un pHmetro (Pracitronic, MV 88 RDA).

(2) Medición del contenido de sólidos solubles.

Se determinan mediante el refractómetro de Abbe (Jena, RDA) y las lecturas final e inicial se miden además usando el método aerométrico, empleando para ello un alcoholímetro GAY-LUSSAC de 0,0 a 10,0 °GL en 0,1°.

(3) Determinación del porcentaje de alcohol por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

La concentración de etanol se determinó por HPLC tanto a las muestras como a los patrones, siendo útil estos últimos para la construcción de la curva de calibración.

El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido de alta presión (Laboratori Pstroje Praha, HPP 4001 (High Pressure Pump) República Checa), con refractómetro diferencial (LPP, RIDK 101, República Checa). Este equipo consta de una columna intercambiadora catiónica con una resina marca "OSTION" de procedencia checa, en la cual se inyectan los patrones y las muestras a analizar previamente preparadas. Para el registro se utilizó un integrador computacional (Spectra-Physics, SP 4200, EE.UU).

Resultados y discusión:

Procesamiento estadístico de los datos experimentales obtenidos:

Para el análisis de los resultados se hizo uso del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0 para WINDOWS, el cual contiene los siguientes módulos para el Análisis de Regresión:

1. Relate. *Simple Regression, Polynomial Regression, Multiple Regression.*
2. Special. *Advanced Regression.*

Para comprobar la validez de los modelos, se realizan las siguientes pruebas:

1. Cálculo del coeficiente de correlación múltiple (R²).
2. Prueba de calidad del modelo (falta de ajuste).





3. Prueba de calidad de los coeficientes.
4. Análisis de los residuos.

Se realizaron un total de 372 experimentos, donde se relacionan los siguientes factores:

1. [DP]: Pérdida de peso de las muestras.
2. [tp]: Tipo de levadura. ((1)-Sin levadura (blanco); (2)-Levadura sin irradiar; (3)-Levadura irradiada).
3. [ti]: Tiempo de irradiación [s].
4. [tf]: Tiempo de fermentación [días].
5. [T]: Temperatura de fermentación. [°C]
6. [Brix_i]: Porcentaje de sólidos solubles en las muestras.
7. [pHi]: pH de las muestras.

Modelo lineal:

Se obtiene un modelo de regresión lineal múltiple, que describe la relación entre la variable dependiente DP y seis factores experimentales, con el propósito de determinar si estas variables ejercen una influencia significativa sobre la respuesta, lo cual es un paso previo a la optimización.

$$DP = 77,9515 + 4,79172 [tp] - 4,96105 [pHi] - 2,79284 [Brix_i] - 0,471273 [ti] + 1,17972 [tf] - 0,236349 [T]$$

Este modelo se ajusta correctamente a los datos experimentales ya que en la tabla ANOVA obtenida, el valor de probabilidad p-value es menor que 0,05 por lo que el modelo se acepta como válido con un 95% de confianza.

Modelo lineal considerando además los cuadrados de las variables:

Se enriquece la data de valores con los cuadrados de los factores analizados para determinar la posible influencia no lineal de los mismos. De manera similar la prueba de calidad del modelo expresa que éste describe correctamente los datos experimentales, ahora con un coeficiente de correlación de 90,1605 %, lo cual demuestra que ciertamente las variables pHi y Brix_i no ejercen una influencia significativa sobre DP. El tiempo de fermentación incide linealmente sobre la respuesta, lo cuál se deriva de la prueba de calidad de los coeficientes.

Se eliminan las variables no significativas y se obtiene el siguiente modelo con un coeficiente de correlación múltiple similar, pero con un ajuste más preciso:



$$DP = -133,517 + 23,5465 [tp] + 0,662429 [ti] + 1,17972 [tf] + 5,91613 [T] - 4,99116 [tp]^2 - 0,0684068 [ti]^2 - 0,0750776 [T]^2$$

El gráfico de valores de DP observados (experimentales) contra predichos por el modelo (Fig. 1) y el diagrama de dispersión de los residuos (Fig. 2) demuestran la validez del modelo, ya que este describe con precisión los resultados experimentales obtenidos con un error mínimo que se distribuye alrededor del valor cero con una dispersión muy pequeña.

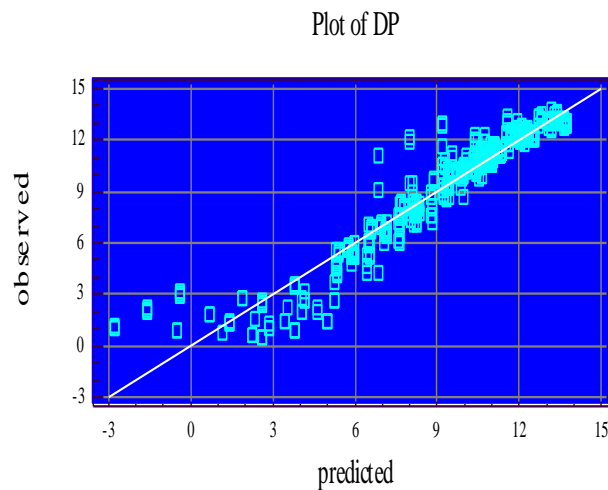


Figura 1. Valores observados contra valores predichos por el modelo para la respuesta DP.

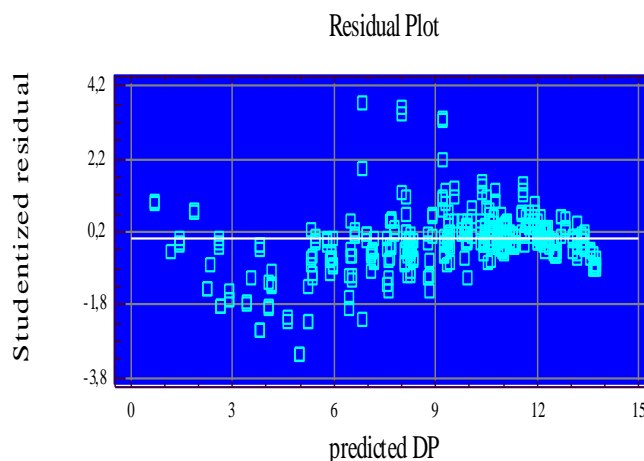


Figura 2. Residuos del modelo.

Como este modelo da la dependencia lineal entre las variables, aunque haya variables cuadráticas que han sido codificadas a partir de las variables lineales,



no se observa claramente el efecto real de las mismas sobre la respuesta. Por ello se utilizan además las posibilidades de realizar análisis de regresión no lineal mediante este programa.

El modelo final obtenido se optimiza mediante la macro SOLVER de Microsoft EXCEL para obtener los valores de las variables independientes que maximizan la pérdida de peso DP:

$$\begin{aligned} T_p^* &= 3 \text{ (levadura irradiada).} \\ t_f^* &= 3 \text{ días.} \\ t_i^* &= 4,841773 \text{ [s]} \\ T &= 39,399 \text{ °C} \\ DP^* &= 13,8929 \text{ [mg]} \end{aligned}$$

Influencia del tiempo de irradiación, tiempo de fermentación y temperatura sobre DP.

Este análisis se realiza mediante la evaluación del modelo en el rango correspondiente para cada variable, manteniendo constantes las demás e iguales a los valores óptimos calculados anteriormente. (Figuras 3 – 5).

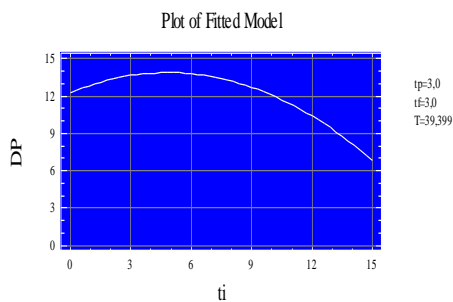


Figura 3. Influencia de t_i (tiempo de irradiación) sobre DP.

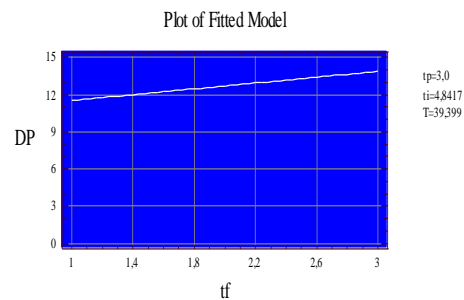


Figura 4. Influencia de t_f (tiempo de fermentación) sobre DP.



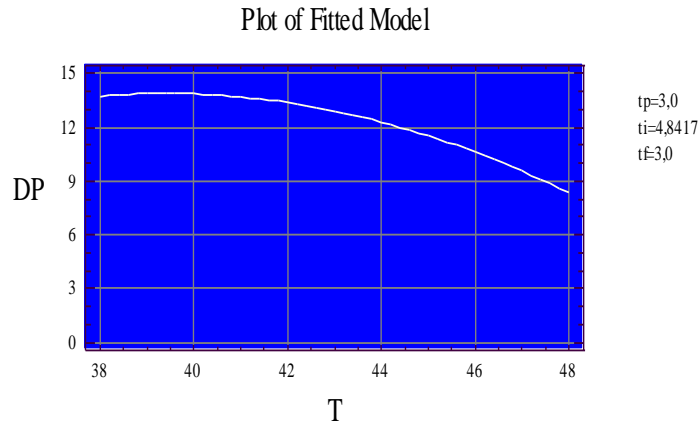


Figura 5. Influencia de T (temperatura) sobre DP.

Superficies de respuesta:

Las figuras siguientes muestran la influencia de las variables analizadas en forma de superficies de respuesta, que permiten corroborar gráficamente la existencia real del óptimo calculado. (Figuras 6 – 8).

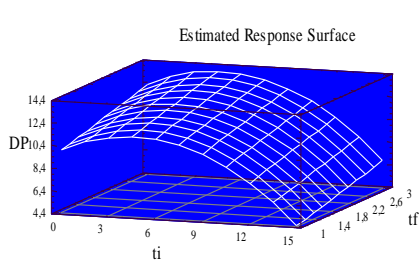


Figura 6. Influencia de ti y tf sobre DP.

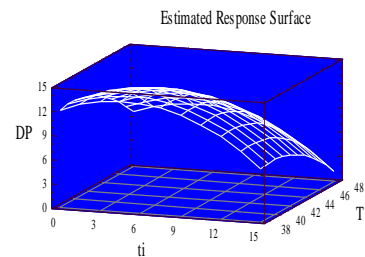


Figura 7. Influencia de ti y T sobre DP.

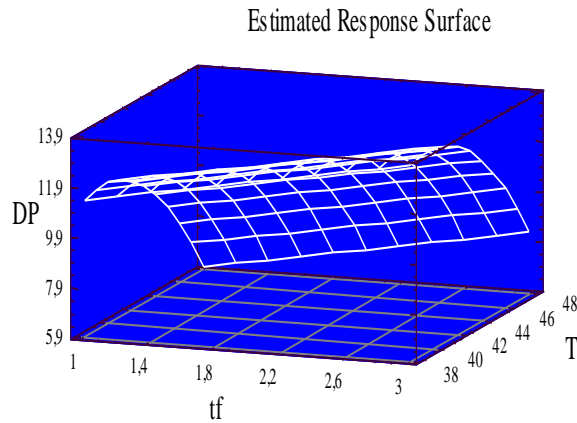


Figura 8. Influencia de tf y T sobre DP .

El análisis cromatográfico realizado (Fig. 9), además de brindarnos el porcentaje alcohólico obtenido en cada una de las muestras analizadas, nos permite conocer la composición de éstas, ilustrando la degradación de la glucosa, fructosa y otros azúcares fermentables a etanol como una disminución en las alturas de sus picos y el consiguiente incremento en el del alcohol, que es más o menos significativo, en dependencia de si la dosis de microondas empleada sobre las levaduras se encuentra en el óptimo encontrado para estos microorganismos o en sus cercanías.

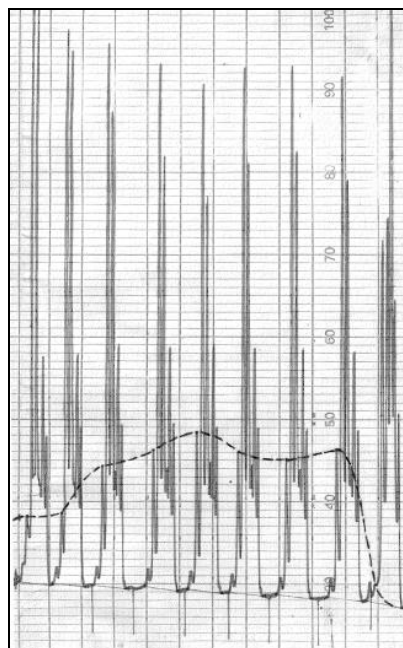




Figura 9. Información cromatográfica obtenida por HPLC.

Cuando la levadura es irradiada con la dosis adecuada de microondas, se produce una elevación apreciable del rendimiento alcohólico en la fermentación, representada como un aumento en la altura del pico del etanol. A partir de los valores óptimos obtenidos de pérdida de peso y temperatura de fermentación, se seleccionó la corrida experimental que más se ajusta a éstas condiciones, correspondiendo a la fermentación realizada a 42 °C.

Reflejando en la curva de calibración construida para las condiciones de operación del equipo en ese momento, las alturas de los picos generados en el cromatograma, se obtienen los porcentajes alcohólicos para cada tiempo de irradiación, siendo este último de 8,5% para una dosis óptima de microondas de 5 segundos. Este resultado corrobora la mayor pérdida de peso experimentada por la muestra en estas condiciones, ya que se obtiene una mayor concentración de etanol y por consiguiente una mayor evolución de dióxido de carbono (CO₂).

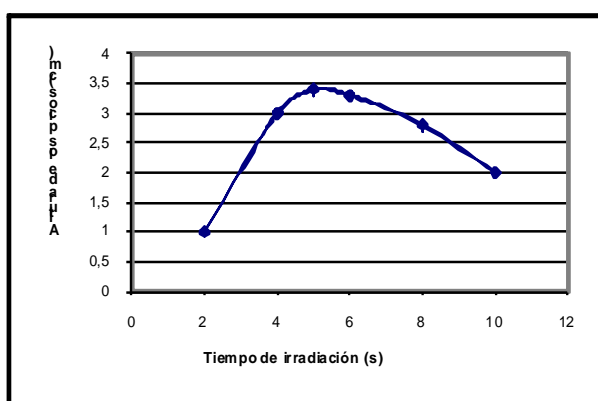


Figura 10. Influencia del tiempo de irradiación en el rendimiento alcohólico a 42 °C.

En la figura 10 se muestra el gráfico obtenido por HPLC de la corrida experimental realizada a 42 °C (en condiciones de estrés por temperatura). En este se observa para tiempos de irradiación entre 4 y 6 segundos aproximadamente, zonas de máxima altura de los picos del etanol (proporcional a la concentración de esta sustancia), alcanzándose su punto más alto (máximo) cuando se le aplica a la levadura una dosis de irradiación de cinco segundos.



Lo anteriormente presentado demuestra claramente que existe una correlación entre tiempo de irradiación, temperatura a la que están sometidos los cultivos y la capacidad fermentativa de este tipo de levaduras cuando éstas han crecidos en mieles finales de caña de azúcar bajo las condiciones señaladas en el presente estudio.

Conclusiones:

1. Se observa una pérdida gradual del poder fermentativo en la medida en que se incrementa la dosis de irradiación y las temperaturas de los cultivos.
2. Se demuestra estadísticamente que existe un rango estrecho de dosis de irradiación en el cual se observa un incremento significativo de los porcentos de etanol producidos en el medio.
3. Existe una disminución notable de los azúcares fermentables en todas las muestras analizadas, aunque en un rango estrecho de tiempo de irradiación por microondas, se obtuvieron concentraciones aun menores de los mismos.

Referencias:

- D' Amore, T. (1990). A study of Ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9 (4): 287-304.
- Estévez, R. (1996). Evaluación Preliminar Sistema Aguardiente "Melanio Hernández", Reporte MINAZ.
- Thomas, D. (1978). Plasma-membrane lipid composition and Ethanol tolerance in *S. cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117: 239-245.
- Uden, N. (1985). Effects of Ethanol on the temperature relations of viability and growth in yeast. *Critical reviews in Biotechnology*. 1(163).
- Stier, T. (1953). Anaerobic nutrition of *S. cerevisiae*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 41 (23-26).
- Dutta, S.K., Nelson, W.H., Blackman, C.F., Brusick, D.J. (1980). Cellular effects in microbial tester strains caused by exposure to microwaves or elevated temperatures. *J Environ Pathol Toxicol Jun-Jul* 3:5-6, 195-206.



Dardalhon, M., Averbeck, D., Berteaud, A.J. (1981). Studies on possible genetic effects of microwaves in procaryotic and eucaryotic cells. Radiat Environ Biophys 20:1, 37-51.

Dardalhon, M., Averbeck, D., Berteaud, A.J. (1979). Determination of a thermal equivalent of millimeter microwaves in living cells. J. Microw Power Dec 14:4 307-12.

Grundler, W., Keilmann, F., Putterlik, V., Strube, D. (1982). Resonant-like dependence of yeast growth rate on microwave frequencies. Br J Cancer Suppl Mar 45:5 206-8.

Dergacheva, I.P., Morozov, I.I., Petin, B.G. (1998). Dependence of microwave produced heating of cell suspensions on their concentration. Biofizika May-Jun 43:3 516-21.

Velizarov, S., Raskmark, P., Kwee, S. (1999). The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. Bioelectrochem Bioenerg Feb; 48(1):177-80. PMID: 10228585, UI: 99245269.

Fecha de recepción: 19/10/2015

Fecha de aprobación: 11/11/2015

