

PRODUCCIÓN DE AGUARDIENTE UTILIZANDO EXTRACTO DE ALFA ÁCIDOS DEL LÚPULO EN EL CONTROL BIOCIDA DEL PROCESO FERMENTATIVO

“CLEAR BRANDY” PRODUCTION USING ALPHA ACID EXTRACT FROM HOPS IN THE BIOCIDAL CONTROL OF THE FERMENTATION PROCESS

*Tassiana Amélia de Oliveira e Silva*¹, *Fabrcio Batista Ferreira*²,
*Maria Bernadete Medeiros*² y *João Batista de Almeida e Silva*^{2*}

¹ Departamento de Biología da Universidade de Taubaté, Rua Quatro de Março, 432. CEP: 12020-270, Taubaté - São Paulo, Brasil

² Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Estrada Municipal do Campinho, s/nº, CEP: 12608-610 Lorena-São Paulo, Brasil

Recibido: Octubre 21, 2015; Revisado: Noviembre 5, 2015; Aceptado: Noviembre 20, 2015

RESUMEN

En el proceso de producción de aguardiente o “cachaça”, utilizando como substrato jugo de caña de azúcar, uno de los problemas que surgen frecuentemente durante la fermentación es la contaminación del mosto por bacterias como la *Leuconostoc mesenteroides* y especies de *Lactobacillus*. En los ensayos desarrollados en los laboratorios da la Escuela de Ingeniería de Lorena (EEL), se observó que en los mostos con una concentración de 40 ppm de alfa ácidos hubo una reducción de las células vivas de las bacterias *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* de 10^8 UFC/mL para 10^5 UFC/mL. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada, cultivada en condiciones aeróbicas, con agitación a 120 rpm y a 25 °C en medio sintético Sabourand, no presentaron inhibición en un medio con las mismas concentraciones de alfa ácidos. Se fermentaron de 200 litros de mosto con concentración de 40 ppm de alfa-ácidos, reutilizando la levadura en 14 ciclos, sin observar contaminación del medio. También se fermentaron mostos sin la presencia de alfa-ácidos para utilizar como estándar en la investigación desarrollada. Los mostos fermentados fueron destilados en un destilador de cobre de 160 L, y las bebidas obtenidas fueron separadas para su posterior análisis.

Copyright © 2016. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

* Autor para la correspondencia: João Batista de Almeida, Email: joabatista@debiq.eel.usp.br

Las “cachaças” producidas con y sin alfa ácidos fueron analizadas en el laboratorio de Alcoholes y Bebidas, así como en el laboratorio de Espectrofotometría del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA); presentaron características semejantes en la composición química y en la puntuación dada por los catadores en el análisis sensorial.

Palabras clave: alfa ácidos, biocida, aguardiente, fermentación

ABSTRACT

The major problem in the production of “clear brandy” is the contamination of the must by bacteria of the species *Lactobacillus*. To overcome this problem, this work intends to evaluate the usage of the alpha acids from hop extract (*Humulus lupulus*) as antibacterial agent during brandy production. In addition, the maximum cell recycling was evaluated during the clear brandy production. Preliminary experiments using the Sabourand synthetic medium added with 40 ppm of the alpha acids reduced the cell viability of *L. casei* and *L. plantarum* bacteria from 10^8 CFU.mL⁻¹ to 10^5 CFU.mL⁻¹ and showed no effect in the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. These experiments were conducted at 120 rpm and 25°C. The clear brandy production (200 L) using the same alpha acids concentration (40 ppm) and *Saccharomyces cerevisiae* cell recycling (14 times) showed no contamination by bacteria. Then, the clear brandy was distilled in a 160 L cooper distiller. The clear brandy produced with and without alpha acids, was analyzed in the Laboratory of Alcohol and Beverages as well as in the Laboratory of Spectroscopy of the Cuban Research Institute of the Sugarcane Derivatives (ICIDCA in Spanish) in Havana and showed similarities in their composition and sensorial chemical analysis.

Key words: alpha acid, biocide, “clear brandy”, fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

El sector alcoholero es la principal rama de actividades de la agroindustria, con una gran diversidad de productos a partir de la caña de azúcar; entre ellos el azúcar “mascavo”, melado y aguardiente, que en los últimos años, su producción se estableció como un importante producto del agronegocio brasileño (Melo et al., 2012). Esta bebida, que también puede ser llamada como “cachaça”, puede presentar problemas en su proceso productivo por la contaminación, en la etapa de fermentación, con bacterias de las especies *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, que pueden estar presentes en el mosto al inicio del proceso (Narendranat et al., 1997). Esto causa una reducción del rendimiento del proceso, debido a la competencia de los contaminantes con la levadura por el consumo de azúcar. También es importante destacar que las bacterias sintetizan productos secundarios, durante la fermentación, que ocasionan un detrimento de la calidad sensorial de la cachaça (Narendranat et al., 1997, González et al., 2005). La legislación brasileña presenta leyes que rigen los procedimientos de producción y de la composición química de la cachaça, más la contaminación por bacterias acontece frecuentemente, principalmente en destilerías pequeñas, por lo tanto, la caracterización

de la cachaça no puede, a pesar de su relevancia, limitarse apenas a su composición química ya que los atributos sensoriales de la bebida también son muy importantes. (Seixas et al., 2009). Por lo antes expuesto, en este trabajo se evalúa el uso de alfa ácidos como biocida para el control de la contaminación bacteriana y además se realizan análisis de la composición química y análisis sensorial de las cachaças obtenidas con y sin alfa ácidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El extracto de alfa ácido clasificado como GRAS, es donado por la Empresa Wallerstein Industrial y Comercial y el mosto de caña de azúcar (jugo de caña) es cedido por la empresa Bebidas Itagaçaba de Silveiras en el estado de San Pablo. El extracto de alfa ácido es utilizado en las concentraciones entre 10 y 100 ppm en medio de cultivo Man, Rogosa, Sharpe-MRS a 25°C con pH del medio ajustado para $6,2 \pm 0,2$.

Para el cultivo de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* fue utilizado un volumen de 20 mililitros de medio. Después de inocular, el cultivo se mantuvo sin agitación a 37 °C por 48 horas. El número de células fue cuantificado utilizando el método de conteo del número de células viables en placas. Las células de levadura fueron cultivadas en medio Sabourand con agitación de 110 rpm y con la adición de alfa-ácidos en las diferentes concentraciones estudiadas. El número de células fue determinado con el conteo en la cámara de Neubauer y los cálculos correspondientes.

El jugo de caña después de filtrado fue diluido para 17 °Brix y suplementado con sulfato de amonio y superfosfato simple pulverizado, con concentraciones de 20 y 2 g/L, respectivamente.

Fue utilizada la Levadura *Sacharomyces cerevisiae* CA-11, cultivadas en jugo de caña diluido, manteniendo el medio en agitación por 24 horas. Las células cultivadas fueron separadas y determinada su concentración.

Los experimentos en escala piloto fueron realizados en la destilería de la empresa Bebidas Itagaçaba. Fueron fermentados, en cada prueba, 200 litros de guarapo en reactores de acero inoxidable con capacidad de 500 litros, con el pH ajustado a 5,0; además de la adición de sales y alfa ácidos (40 ppm).

Después de fermentadas, las bebidas obtenidas, fueron destiladas en un destilador de cobre con capacidad de 160 litros, con calentamiento indirecto y la utilización de madera como fuente de energía. Se realizó conteo de las células de levadura. El grado Brix fue determinado en refractómetro.

Para medir pH se utiliza el equipo “PH Meter Model – PHS 3B”, marca PHTEK. La determinación de la concentración alcohólica de la cachaça producida fue realizada primeramente, en el proceso de destilación, con un densímetro-alcoholímetro para ajustar la concentración alcohólica en la bebida alrededor de 40 °GL.

Las “cachaças” fueron producidas en sucesivos ciclos y 40 litros de mosto fermentado fueron utilizados como pre fermento para el inicio de una nueva fermentación. Estos ensayos se repitieron desde el inicio de noviembre hasta final de febrero utilizando el mismo pre fermento inicial hasta completar 14 ciclos.

Después de embotelladas las “cachaças” fueron analizadas en cuanto a la concentración de congéneres por cromatografía gaseosa de alta resolución, porcentaje alcohólico y los

análisis sensoriales en el Laboratorio de Alcoholes y Bebidas del ICIDCA, según normas cubanas (NC 290: 2007, NC 508: 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la evaluación del efecto de los alfa ácidos en las células de la bacteria *L. casei*, se observa, el comportamiento en cuanto a aumento y a estabilidad del número de células en los ensayos con alfa ácidos en las concentraciones de 10, 20 y 30 ppm, respectivamente. Los datos indicaron que en la concentración de 10 ppm, todavía hubo un aumento en el número de células. Sin embargo los alfa ácidos en las concentraciones de 20 y 30 ppm, inhibieron el crecimiento celular, demostrando el efecto biocida que ejercen estos compuestos en las células bacterianas (Figura 1 y Figura 2).

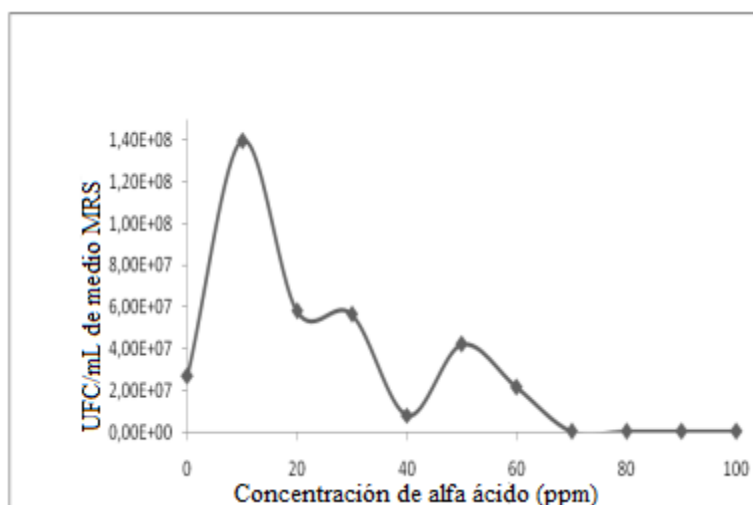


Figura 1. Número de células viables de *Lactobacillus Casei*

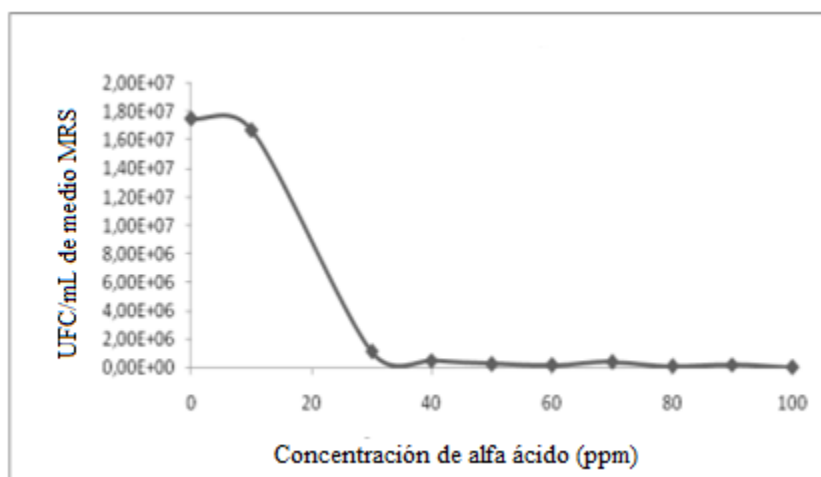


Figura 2. Número de células viables de *Lactobacillus plantarum*

En la figura 3 se puede observar que en todos los tiempos de cultivo, independiente de las concentraciones de alfa ácidos utilizada, se mantuvo el mismo número de células viables de levadura, con índice máximo 10^8 células por mililitro de medio, indicando que los alfa ácidos no presentaron una actividad fungicida de acción inhibitoria para las células de levadura.

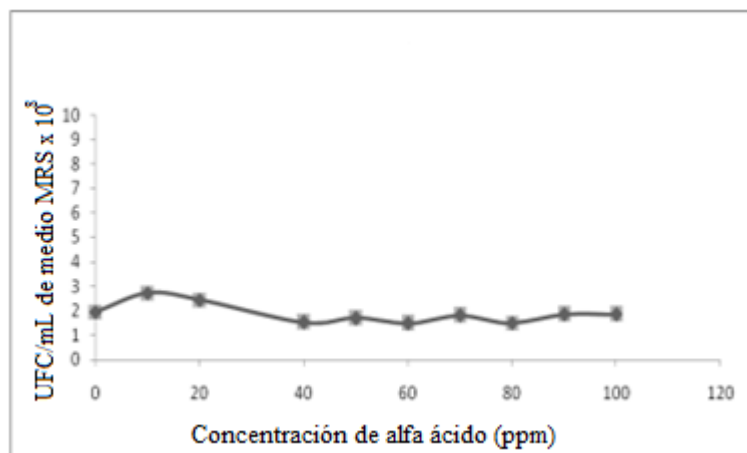


Figura 3. Número de células viables de *Saccharomyces Cerevisiae*

Los resultados de las fermentaciones del proceso en escala piloto, con concentraciones de 40 ppm de alfa ácidos, son mostrados en la Figura 4, que representa la concentración de azúcares (°Brix) y la concentración alcohólica en porcentaje v/v.

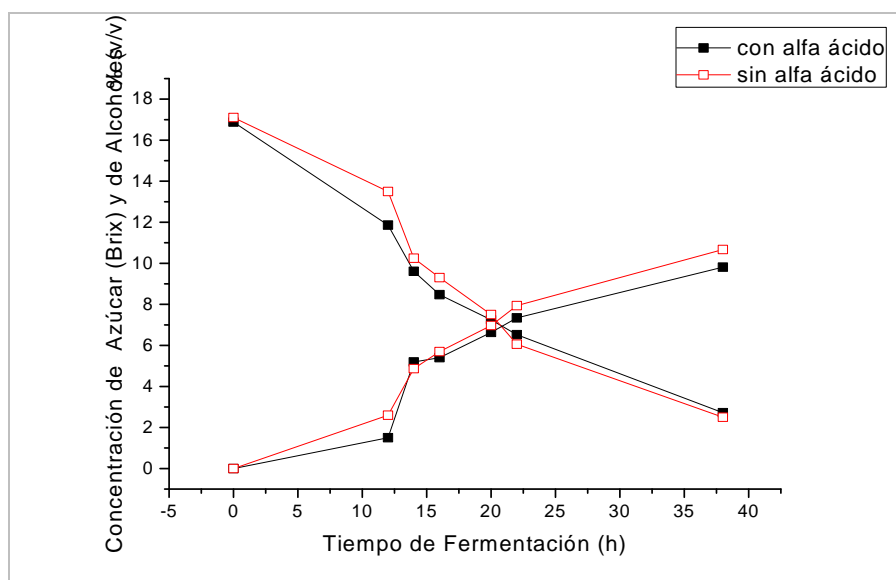


Figura 4. Consumo de azúcar y formación de alcohol en el mosto de jugo de caña

Se percibe el consumo relativamente rápido de los azúcares en las primeras 20 horas de fermentación, pero aunque el proceso fue dejado por casi el doble del tiempo, alrededor de 38 horas, todavía quedaba extracto siendo medido por el equipo y la concentración alcohólica ya había alcanzado los 9,3% (v/v). Convirtiendo esta concentración en gramos de etanol, se obtiene 7,4 g por cada 100 mL de la bebida, lo que al comparar con la concentración de azúcares consumidos, corresponde a un factor de conversión ($Y_{p/s}$) igual a 0,4933 g/g. Este valor representa una eficiencia en relación al valor teórico de 96,54%.

Los análisis físico-químicos de las “cachaças” obtenidas en escala piloto, son mostrados en la Tabla 1. Las muestras con y sin alfa ácidos, tienen composiciones muy similares, pero en la muestra obtenida en el ciclo número catorce, la concentración de acetato de etilo aumentó considerablemente.

Tabla 1. Composición de las “cachaças” obtenidas con y sin alfa ácidos, y en 14^o ciclo de la fermentación, con la misma levadura

<i>Compuestos</i>	<i>Concentración g/100L de AA</i>		
	<i>Con alfa ácidos</i>	<i>Sin alfa ácidos</i>	<i>14^o Ciclo</i>
Acetaldehído	6,1	5,6	5,6
Acetato de Etilo	67,6	81,6	256,2
Acetato	4,9	4,8	nd
Metanol	0,5	1,2	4,6
2-butanol	7,5	5,2	3,7
Propanol	46,2	49,2	23,8
Isobutanol	59,3	63,3	32,9
1-butanol	1,5	1,5	nd
2-metil, 1-butanol	35,1	37,3	20,3
Alcohol Isoamílico	136,7	141,3	91,7
Etanol %(v/v)	39,0	40,4	39,5

Por su parte (Soares et al., 2011), cuando utilizaron esta misma levadura en un mosto con concentración inicial de 16 °Brix, no encontraron acetaldehído y propanol en el medio, más la fermentación del presente trabajo, que duró 38 horas con 17 °Brix de concentración inicial, presentó bajísimas concentraciones de estos productos metabólicos, lo que es normal que acontezca con el aumento del tiempo de fermentación. Los análisis sensoriales, mostraron que las muestras 1 y 2 presentaron marcada nota de miel y muy ligero picor. En ambas muestras se aprecia diferencias con la muestra del ciclo 14, la cual presenta muy marcado picor y sensación áspera al tragar. Las concentraciones de acetaldehídos, alcoholes superiores y el coeficientes de congéneres, encontrados en las cachaças obtenidas en el presente trabajo, están dentro de los límites establecidos por la legislación brasileña (Brasil, 2005) que son de 30, 360 y 650 g/100L, respectivamente. Hubo una excepción en la concentración de acetato de etilo, de 256,2 g/100L de alcohol, encontrado en la cachaça obtenida en el ciclo 14 y que sobrepasó el límite de la legislación que es de 200 g/100L de alcohol.

4. CONCLUSIONES

1. En las “cachaças” producidas con alfa ácidos no se comprobó la presencia de contaminación por bacterias hasta el ciclo 14 de fermentación.
2. Las concentraciones de congéneres, alcoholes superiores y acetaldehídos se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación brasileña.
3. El análisis sensorial de las “cachaças” producidas con concentraciones de alfa ácidos de 40ppm, mostró que en estos niveles no hay percepción de ninguna diferencia sensorial cuando fueron comparados con la “cachaça” producida sin alfa ácidos.

5. RECOMENDACIONES

El uso de 40 ppm de alfa ácido demostró ser eficaz en el control biocida de la fermentación da la “cachaça”; pero, es necesario la aplicación de un diseño

experimental para determinar la cantidad exacta que se necesita del inhibidor del crecimiento bacteriano a través de la metodología de superficie de respuesta. El mismo podría ser realizado para la evaluación eficaz de la inhibición de los extractos de beta ácido, así como de la mezcla de ambos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al FAPESP, Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar-ICIDCA y PNUD por el apoyo financiero para el proyecto y la participación en DIVERSIFICACIÓN 2015.

REFERENCIAS

- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento., Instrução Normativa No. 13, de 29/06/2005; Diário Oficial da União 30/06/2005.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic bacteria population during wine production., International Journal Food Microbiology, Vol. 102, No.3, 2005, pp. 295-304.
- Melo, W.F., Pereira, R.A., Schimidt, R., Almeida, J.S., Nascimento, K.N.F., Cadeia produtiva da cachaça triunfo: um estudo de caso., Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento sustentável, Vol.7, No.3, 2012, pp. 41-45.
- Narendranat, N.V., Hynes, S.H., Thomas, K.C., Ingledew, W.M., Effects of *lacobacilli* on yeast catalyzed ethanol fermentations., Applied. Environmental Microbiology, Vol. 63, No.11, 1997, pp.4158-4163.
- NC 290: 2007: Norma Cubana Bebidas alcohólicas- Determinación del grado alcohólico en alcoholes, bebidas alcohólicas destiladas, vinos, licores, bebidas alcohólicas preparadas, cocteles y extractos hidroalcohólicos., 2007.
- NC 508: 2011: Norma Cubana Bebidas alcohólicas- Determinación de componentes volátiles mayoritarios en bebidas alcohólicas destiladas, aguardientes y alcohol etílico por cromatografía gas líquido., 2011.
- Seixas, F.R.F., Santi, I.A.A., Franco, D.W., Cachaça de qualidade. Engarrafador Moderno., Vol. 1, 2009, pp. 56-59.
- Soares, T. L., Silva, C.F., Schwan, R.F., Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *saccharomyces cerevisiae*., Ciência e Tecnologia de Alimentos, Vol. 31, No.1, 2011, pp. 184-187.