

TRATAMIENTO MAGNÉTICO ALTERNATIVO PARA LA FERMENTACIÓN INDUSTRIAL DE MELAZA

Autores:

Matilde Anaya Villalpanda¹
Tania Guzmán Armenteros²
Carlos Acea Fiallo³
Hilda Cobo Almaguer⁴
Alexander Vivar Pérez⁵

¹ Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA), km 3 ½ Carretera al Guatao, Lisa, La Habana, Cuba. (IIIA)
Email: matildea@quimica.cuaje.edu.cu / mavillal@iiaa.edu.cu
Teléf.: (537) 202-0919, 202-0588, 202-0631, Fax: 537 24-6553

² Universidad Tecnológica Equinoccial, Km 4 ½ vía Chone y Ave. Italia, Santo Domingo-Ecuador
Email: gatm7012935@ute.edu.ec / Teléf.: 0992219091

³ Grupo Ecosol Hidráulico, Calle 3ra esq. 12 s/n, Miramar, Playa, Cuba
Email: acea@hidraulico.copextel.com.cu
Teléf.: (537)830-1454, Ext. 05, 07

⁴ Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA), km 3 ½ Carretera al Guatao, Lisa, La Habana, Cuba
Email: hilda@iiaa.edu.cu
Teléf.: (537) 202-0919, 202-0588, 202-0631, Fax: 537 24-6553

⁵ Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA), km 3 ½ Carretera al Guatao, Lisa, La Habana, Cuba
Email: alexvivar@iiaa.edu.cu
Teléf.: (537) 202-0919, 202-0588, 202-0631, Fax: 537 24-6553

Recepción/Received: 2013-07-01
Aceptación/Accepted: 2013-09-10
Publicado/published: 2013-12-18

**REVISTA DE
INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA**

Resumen

Se conoce que el campo magnético oscilante tiene efecto inhibitorio y estimulante sobre los sistemas biológicos. El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto dual del tratamiento magnético (TM) como una alternativa para la fermentación industrial de melaza. Se aplicó tratamiento térmico (121°C y 15 min), magnético (6.5 mT/60 Hz) y su combinación sobre 50 mL de melaza a 18°Bx para valorar su efecto en la fermentación. Se inoculó la cepa de levadura destilera *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz-17 que se utiliza en la industria cubana. Este inóculo sirvió para fermentar 250 mL de melaza a 18°Bx. Como variables respuesta se midieron la concentración del sustrato (°Bx) por refractometría, la producción de alcohol (% v/v) por la técnica del poder fermentativo y el grado alcohólico final por densimetría digital. Se concluye que el tratamiento magnético aplicado solo o combinado con la esterilización, resulta beneficioso debido al incremento de la biomasa en la fase inicial de la fermentación. El tratamiento magnético tuvo efecto estimulante, obteniéndose valores de alcohol en las fases intermedias del proceso de 0.47 a 0.52%, aunque no se logró mayor grado alcohólico final por este método (tratamientos térmico y magnético: 6.9%, combinado 6.6%).

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae*, biomasa, producción de alcohol, poder fermentativo.

Abstract

It is known that the oscillating magnetic field has inhibitory and stimulatory effect on the biological systems. The aim of this study was to assess the effect of the magnetic dual treatment as an alternative to the industrial fermentation of molasses. Magnetic (mT/60 6.5 Hz) heat treatment (121°C and 15 min) and their combination on 50 mL of molasses, it was applied at 18°Bx to estimate its effect on fermentation. Distillery yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz-17 used in Cuban inoculated industry. This inoculum was used to ferment molasses 250 mL at 18°Bx. As response variable were measured the concentration of substrate (°Bx) by refractometry, the production of alcohol (% v/v) by the technique of fermentative power and final alcoholic fermentation by digital densimetry. It is concluded that the magnetic treatment applied alone or combined with sterilization, was beneficial due to increased biomass in this step and in the initial phase of fermentation. The magnetic treatment was stimulating, producing values of alcohol in the intermediate stages of process from 0.47 to 0.52%, but did not achieve higher final alcoholic content by this method (thermal and magnetic treatments: 6.9%, combined 6.6%).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, biomass, alcohol production, fermentative power.

Introducción

Se plantea que el tratamiento magnético (TM) tiene efectos inhibitorios y estimulantes sobre los sistemas biológicos (Barbosa, 2003). Dichos efectos, por lo general, se han estudiado por separado sobre un solo microorganismo en determinado sustrato aplicando valores de TM muy variados. En estudio preliminar se demostró el efecto dual (inhibitorio-estimulante) del TM, con un mismo valor de campo magnético oscilante a partir de corriente de frecuencia extremadamente baja (CMO-FEB) de 6.5 mT y 60 Hz, antes o después de la inoculación de una cepa de levadura seleccionada (Anaya, 2012).

El efecto dual consistió en lograr una disminución ($\leq 0.5\%$) de la microbiota típica de la melaza sin esterilizar a concentraciones de 12, 18 y 24°Bx, y una estimulación de la producción de alcohol en melaza estéril (121°C/15 min), de 6.43 a 9.79% más de alcohol respecto al control hasta las 15 a 17 h de iniciada la fermentación.

Esa alta concentración de alcohol lograda en poco tiempo, al parecer resultó tóxica para la levadura y provocó un retraso en las muestras tratadas de hasta 1.94% menos al final de la fermentación (Abreu, 2003).

En la industria destilera cubana la melaza a 12°Bx se esteriliza para realizar la propagación de la levadura de interés. Luego este fermento se inocula en otra cantidad mayor de melaza sin esterilizar a 18°Bx y se incrementa parcialmente el volumen con melaza a 20°Bx en la medida que la levadura consume el sustrato (fermentación incrementada). Para ello se requiere alto consumo de energía (vapor en la propagación y de tiempo de enfriamiento hasta temperatura óptima de inoculación).

Teniendo esta problemática industrial, el siguiente trabajo tuvo como objetivo evaluar la aplicación del efecto dual del TM como una alternativa para la fermentación industrial de melaza.

Materiales y Métodos

La levadura destilera *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz 17 que se utiliza en la industria cubana, posee una alta resistencia al alcohol (Abad, 2006). Se activó dicha cepa, en 15 mL de medio estéril compuesto por caldo extracto de malta enriquecido con extracto de levadura, incubada a 30°C por 24 h. Posteriormente se propagó a 100 mL de melaza a 12°Bx y se incubó en las mismas condiciones. Se ajustó la concentración celular a 20×10^6 cél/mL en cámara de Neubauer efectuando la lectura a 400x, en microscopio óptico (Carls Zeiss mod. 164-2, Alemania).

Se inoculó cantidades iguales en varios erlenmeyers con 50 mL de melaza a 18°Bx a las que se aplicó previamente tres variantes de tratamiento (Tabla I).

Tabla I. Variantes de los tratamientos aplicados en la propagación.

Variantes	Tratamiento	Condiciones
1	Térmico	T = 121 °C y t = 15 min
2	Magnético	1 h de TM de 6,5 mT /60 Hz
3	Térmico y magnético	Combinación de 1 y 2

La biomasa lograda en esta etapa se inoculó sin ajustar en 250 mL de melaza a 18°Bx sin esterilizar (simulando la industria), para no obstaculizar el efecto logrado por el TM. Se añadió 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ a la melaza y se ajustó el pH= 5.8. La composición de la melaza utilizada es la siguiente:

Azúcares totales	53.03 %	Reductores libres	22.78 %
Azúcares fermentables	46.53 %	Cenizas	9.30 %
Azúcares no fermentables	6.48 %	pH	5.10

Los tratamientos de CMO se realizaron con un equipo experimental diseñado y confeccionado por Tecnologías Electrónicas (TECE) y caracterizado por Centro Nacional Electromagnetismo Aplicado (CNEA). El equipo consta de un generador de señal y una bobina con núcleo de aire.

La producción de alcohol se determinó por la técnica del poder fermentativo. Para ello se añadió ácido sulfúrico concentrado en las válvulas Mülher que tapan los erlenmeyers, para retener los compuestos volátiles (reacción química) y permitir el paso del dióxido de carbono a la vez que impide la contaminación microbiológica.

Se obtuvo la diferencia del peso inicial del sistema y los que se obtienen al tiempo determinado, en horas. Para la transformación del CO₂ desprendido a alcohol producido (v/v) se utilizó la fórmula siguiente (Abreu, 2003; Abad, 2006):

$$\% \text{ alc (v/v)} = (1.3 \times P \times 100) / V$$

Dónde: 1.3 = Factor (1.3 mL alcohol/g CO₂); P = Pi – Pf (peso inicial - peso final) (g CO₂); V= 50 mL

Se da por terminada la fermentación cuando el peso es constante, pero en este estudio se tuvo en cuenta 24 h con concentración final igual a la mitad de la inicial más una unidad (similar al procedimiento industrial). Dicho parámetro se monitoreó con refractómetro manual graduado de 0 a 40 °Bx. Se determinó el contenido final de alcohol mediante la destilación de 250 mL de melaza fermentada, según la norma cubana (ONNC, 2007) y por medición directa con el densímetro digital marca Kyoto Electronics modelo DA-130 N, Japón.

Se realizaron dos corridas experimentales y los resultados se analizaron mediante ANOVA con el programa estadístico Statgraphics Centurion.

Resultados y Discusión

En las Figuras 1 y 2 se puede observar el efecto inhibitorio del TM con CMO-FEB (6.5 mT/60 Hz) aplicado durante 1 h sobre 50 mL de melaza a 18 °Bx.

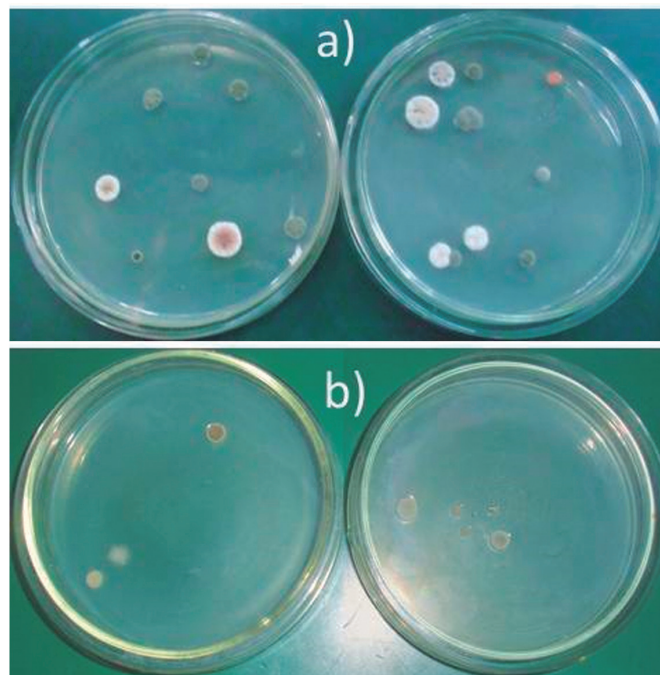


Figura 1. Hongos y levaduras en 50 mL de melaza a 18 °Bx con siembra por dilución 10-7: a) control y b) tratada con CMO 6.5 mT/60 Hz durante 1 h.

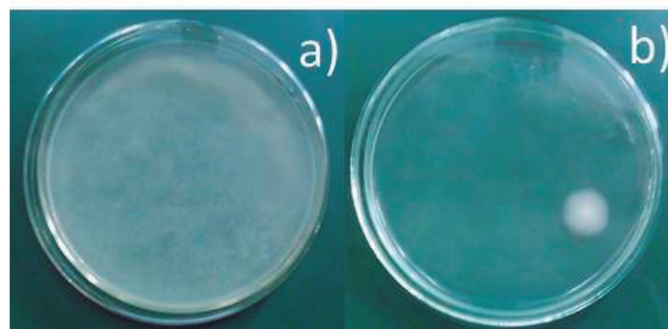


Figura 2. Mesófilos aerobios totales en 50 mL de melaza a 18 °Bx con siembra por dilución 10-7: a) control y b) tratada con CMO 6.5 mT/60 Hz durante 1 h.

En el grupo hongos y levaduras (Figura 1a), fue menor el recuento (una colonia cremosa de color anaranjado brillante) respecto a los primeros, teniendo en cuenta que los hongos son más resistentes a otros tratamientos. Sin embargo, nótese que el crecimiento de colonias de hongos en la muestra control no está completamente desarrollado, probablemente debido al estrés por las altas concentraciones de la melaza (78 a 80 °Bx) ya que se trata de microorganismos contaminantes que permanecen en dicho sustrato

durante largos periodos de tiempo. Se logró una disminución de 0.6 % (de 10×10^{-7} a 4×10^{-7}), con reducción del tamaño micelial, lo cual evidencia el poder inhibitorio del TM. En la Figura 1b se puede apreciar que algunas especies de hongos filamentosos fueron más resistentes (sobrevivieron principalmente los de pigmentación verde, y una colonia blanca), consecuente con lo observado en estudios similares en cerveza de alta gravedad (Anaya, 2012).

Para el caso del grupo de mesófilos aerobios, se observó el crecimiento abundante de bacteria contaminante que cubrió toda la placa, (Figura 2a) e impidió totalmente el desarrollo de hongos y levaduras. Esta inhibición pudiera explicarse por la formación de toxinas bacterianas (bacteriocinas) que inhiben el desarrollo de otros microorganismos (hongos y levaduras). En tal sentido, se plantea que el TM de CMO-FEB de 5 mT por 4 h sobre *Lactococcus lactis subsp. lactis* estimuló la producción de nisina, con valores cinco veces mayor que el control (Chacón, 2006). Posterior al TM (Figura 2b), se observó solo el crecimiento de una sola colonia de hongo de pigmentación blanca, igual al de Figura 1b aunque de mayor tamaño micelial.

Esta concordancia entre los resultados observados en las Figuras 1b y 2b, evidencian que el TM aplicado es efectivo para disminuir el recuento de microorganismos. La coincidencia del hongo de pigmentación blanca indica que esta especie pudiera tomarse como patrón para estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos ante el TM y determinar el mecanismo por el cual son “magnetorresistentes”.

Con el conteo celular en cámara de Neubauer se obtuvieron recuentos que resultaron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$). En la Tabla II se puede observar que en la variante 2 se logró mayor concentración celular de la levadura inoculada. Esto indica que el TM aplicado al sustrato provocó un aumento de la biomasa. Este resultado es consecuente al observado en melaza a 20 °Bx aplicando CMO de alta frecuencia (100 kHz y 25 mT), obteniéndose 14.4 % de crecimiento mayor al control con menor consumo de sustrato (Zapata, 2005).

Tabla II. Conteo celular a las 24 h de inoculada la cepa *S. cerevisiae* Santa Cruz 17 en 50 mL de melaza tratada

Variantes	Tratamiento	Conteo celular
1	Térmico	1.41×10^9
2	Magnético	1.54×10^9
3	Térmico y magnético	5.14×10^8

Con este resultado se demuestra que el TM también estimula ciertos microorganismos, lo cual pudiera explicarse en este caso por el posible acondicionamiento de las biomoléculas del sustrato para una mejor asimilación por las levaduras. Este efecto estimulante constituye una ventaja para la etapa de fermentación ya que mientras mayor sea la biomasa obtenida en las primeras horas, se requerirá menor tiempo para iniciar la fase fermentativa.

Debe tenerse en cuenta que el tratamiento térmico destruye parte de dichas moléculas como proteínas y vitaminas, lo que no sucede con otros métodos físicos. Tal es el caso al comparar los resultados del efecto del campo eléctrico (35 kV/cm por 1h) con el tratamiento térmico (96.4 °C por 30 s) en la composición del jugo de naranja (Won, 2001). Por tanto, al comparar el tratamiento térmico con el TM este resulta más ventajoso pudiendo inferirse que solo reordena la configuración estructural de las biomoléculas. En consecuencia con esto, en este estudio el menor recuento celular se obtuvo en la variante 3, evidenciando que el efecto combinado de ambos tratamientos resulta perjudicial para la composición del sustrato. Es posible que las células de las generaciones sucesivas requirieran mayor tiempo de adaptación para asimilar el sustrato tratado con ambos métodos físicos, lo que repercute en la biomasa formada en esta etapa inicial de la fermentación.

La producción de alcohol y la variación de la concentración del sustrato de las tres variantes analizadas presentaron diferencias significativas entre ellas y respecto al control. En las Figuras 3a a 3c se aprecia que el perfil de las variables fue similar, lo que permite inferir que el TM no provocó alteraciones en el metabolismo celular.

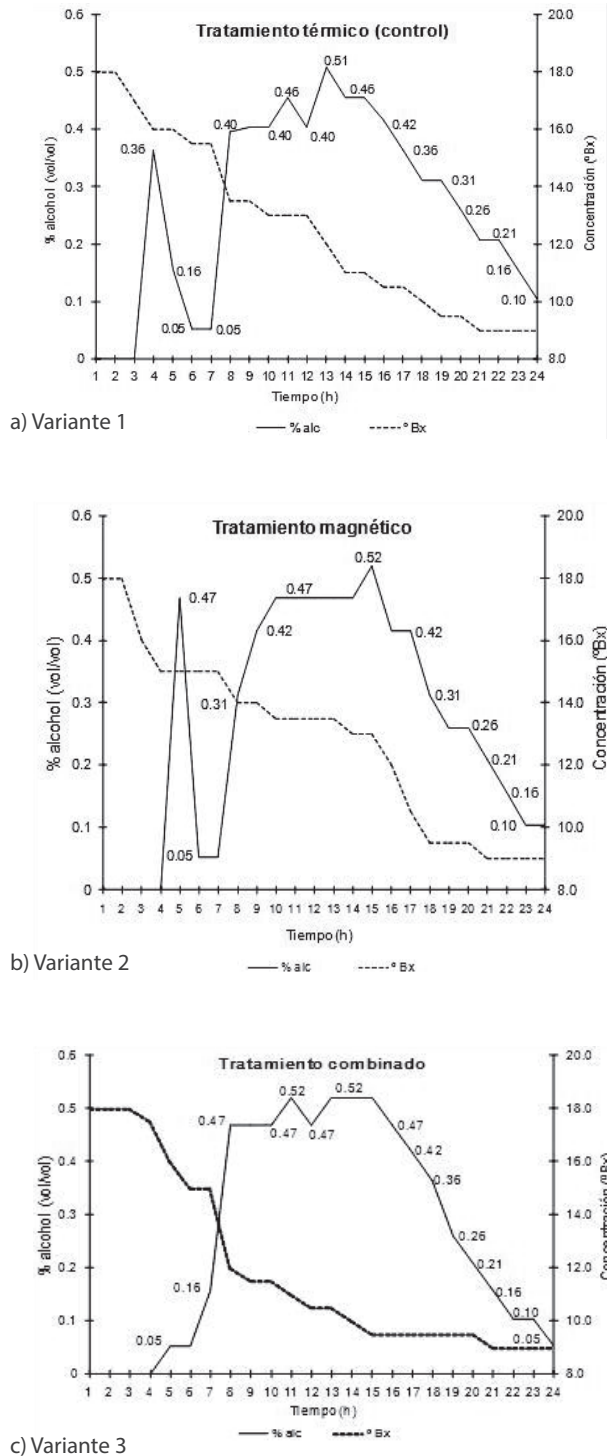


Figura 3. Comportamiento de la cepa *S. cerevisiae* Santa Cruz-17 durante la fermentación: a) variante 1; b) variante 2 y c) variante 3.

Para el caso de la concentración del sustrato se observó una disminución brusca hasta 15 y 16 °Bx en las primeras 3 a 4 h, en las muestras controles (Figura 3a, variante 1) y las de TM (Figura 3b, variante 2). Este efecto fue más pronunciado en la variante 2, al comparar las pendientes de las curvas en esa zona. Sin embargo, en las muestras en que se aplicó tratamiento combinado (Figura 3c, variante 3) el consumo fue 17 y 17.5 °Bx para igual tiempo. Este comportamiento pudiera relacionarse con la biomasa obtenida en la etapa de propagación: a mayor conteo celular, mayor consumo de sustrato en ese tiempo inicial. Para las tres variantes en las horas siguientes la disminución de la concentración del sustrato fue menos vigorosa, correspondiéndose con el inicio de la producción de alcohol. Sin embargo, este periodo inició con 16.5 °Bx para las variantes 1 y 2, y con 17.5 °Bx para la variante 3, lo cual evidencia que la menor biomasa formada en la etapa de propagación (ver Tabla II) asimiló mejor el sustrato en la etapa de la fermentación.

Este fenómeno se puede evidenciar en la Figura 3 al analizar el comportamiento de la producción de alcohol. En la variante 1 la fermentación comenzó primero (a las 3 h), mientras que la variante 2 tuvo un consumo de sustrato similar pero comenzó a fermentar 1 hora después (a las 4 h). Sin embargo, con este método la producción de alcohol inicial fue mayor (0.47%) que en la muestra control (0.36%), lo que indica una mejor conversión del sustrato en alcohol. Este resultado concuerda con lo observado en otros estudios similares en que el TM aplicado estimuló la producción de metabolitos de interés (Deutmeyer, 2011).

Los altos valores de alcohol producido en las variantes 1 y 2 pudieron inducir el comportamiento posterior, al observarse una disminución en la lectura en la hora siguiente (5 horas): de 0.36 hasta 0.16% y de 0.47 hasta 0.05% de alcohol, respectivamente. Es decir, que los incrementos bruscos de producción de alcohol provocan inmediatamente su disminución posterior (picos en las curvas), ya que este metabolito es tóxico para la levadura (Abreu, 2003). Este fenómeno se repite a lo largo del proceso fermentativo, aunque menos marcado, provocado tal vez por la adaptación de la célula a las nuevas condiciones, planteándose que a pesar de esto el TM induce tolerancia al alcohol en las levaduras (Deutmeyer, 2011).

En tal sentido, en la variante 3 se observó que el inicio de la fermentación se incrementó paulatinamente hasta 0.47% y luego hasta el mayor nivel de producción de alcohol en todo el estudio (0.52%) a las 11 h. En la etapa de mayor producción de alcohol (entre 8 y 16 h) tuvo valores alternos de 0.47 a 0.52% lo que contrasta con la variante 1 control (0.40 a 0.51%). Solo en la variante 2 se mantiene constante la producción de alcohol en 0.47% hasta 0.52% a las 16 h que provoca nuevamente otra disminución hasta 0.42%. Este comportamiento sería ventajoso para el método industrial de fermentación incrementada, aprovechando dichas fluctuaciones para agregar melaza tratada magnéticamente a 18 ó 20°Bx hasta completar el volumen del fermentador.

En la Figura 4 se puede apreciar el comportamiento de la producción de alcohol acumulado por horas. En las muestras tratadas la fermentación comenzó retrasada como se explicó anteriormente. Sin embargo, el comportamiento de este parámetro fue similar entre las 12 y 13 horas consecuente con el máximo nivel de la variante 3 a las 11 h (Figura 3c), presentando dos puntos de inflexión: uno a las 14 horas en que en las melazas tratadas fue mayor respecto al control y otro a las 22 horas cuando ocurre lo contrario.

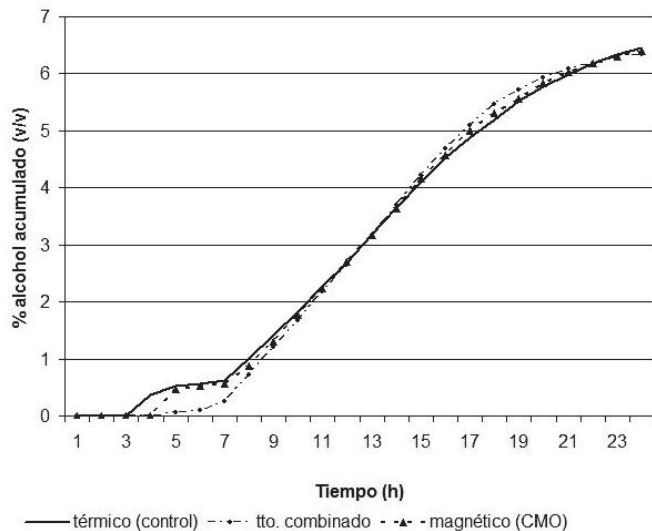


Figura 4. Producción de alcohol acumulado por horas para la cepa *S. cerevisiae* Santa Cruz 17 en 50 mL de melaza tratada.

La producción final de alcohol a las 24 horas medidas por densimetría digital no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Se obtuvieron 6.7% de alcohol con las variantes 1 y 2, y 6.6% con la variante 3. Por tanto, se seleccionó la variante 2 como la más adecuada (TM al medio sin inocular), ya que permitirá obtener resultados similares a los de la industria (variante 1 control) en la que se requiere el consumo de vapor para esterilizar y tiempo de enfriamiento hasta temperatura óptima para la inoculación de la cepa.

A partir de estos resultados con CMO-FEB se realizarán futuras investigaciones con CME, que permitirá tratar a diferentes flujos todo el volumen de melaza a emplear en el proceso (tanto en la etapa de propagación como de fermentación), aplicando la técnica de fermentación incrementada.

Conclusiones

Se logró 0.6% de inhibición en la melaza a 12°Bx, con una resistencia al tratamiento magnético aplicado sobre la microbiota típica en el orden: bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Algunos de hongos fueron más resistentes.

El tratamiento magnético solo, resultó beneficioso debido al incremento de la biomasa en dicha etapa y en la fase inicial de la fermentación.

Los mejores resultados estimulantes permitieron alcanzar valores de alcohol en las fases intermedias del proceso de 0.47 a 0.52%, aunque no se logró mayor grado alcohólico final por este método (tratamientos térmico y magnético: 6.9%; combinado: 6.6%).

Referencias

Abad E (2006). Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y Viñedos de Trujillo S.L. Tesis de Grado. Universidad Politécnica de Madrid Escuela Técnica

Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Tecnología de los Alimentos.

Abreu J, Rodríguez I, Jaqueman F (2003). Inducción de termotolerancia en levaduras destinadas a la producción de alcohol. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 13(1): 30-34. ISSN 0864-4497.

Anaya M, Acea CM, Cobo HC, Mesa Y (2012). Posibilidades del campo magnético oscilante en la biotecnología aplicada a las fermentaciones. En (CDROM) XXXIII Convención Panamericana de Ingenierías (UPADI '2012). La Habana, Cuba. ISBN: 978-959-247-094-1.

Anaya, M (2012). Tratamiento magnético como complemento tecnológico del proceso cervecero en la fábrica "Guido Pérez". Tesis presentada en opción al grado académico de Master en Ingeniería Alimentaria. Facultad de Química, ISPJAE. La Habana, Cuba.

Barbosa, GV (2003). Innovations in food processing. Technomic Publish Co. INC, Lancaster. Basel. Pennsylvania, USA. ISBN: 1-56676-782-2.

Chacón D, Haber V, Rodríguez O, Monte R (2006). Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* using cheese whey permeate. *Process Biochemistry*, 41 (9): 1967-1973.

Deutmeyer A, Raman R, Murphy P, Pandey S (2011) Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2: 207-213.

Oficina Nacional de Normalización de Cuba. Norma Cubana NC-290:2007. Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico. Ed Oficina Nacional de Normalización.

Won H, Streaker C, Zhang QH, Min D (2001). Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48 (10) 4597-4605. ISSN 0021-8561.

Zapata JE, Hoyos M, Moreno G (2005). Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. *Interciencia*, 30 (7): 409-413. ISSN: 0378-1844.