

COMPARACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE DOS CEPAS DESTILERAS DEL GÉNERO SACCHAROMYCES, EN MELAZA TRATADA MAGNÉTICAMENTE

Autores:

*Matilde Anaya Villalpanda¹
Tania Guzmán Armenteros²
Alexander Vivar Pérez³
Hilda Cobo Almaguer⁴
Carlos Acea Fiallo⁵*

¹Instituto 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

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

³Instituto 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, 202-0614, Fax: 537 24-6553

⁴Instituto 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, 202-0614, Fax: 537 24-6553

⁵Grupo Ecosol Hidráulico, Calle 3ra esq. 12 s/n, Miramar, Playa, Cuba
Email: acea@hidraulico.copextel.com.cu
Teléf.:(537)830-1454, Ext. 05, 07

Recepción/Received: 2013-08-10
Aceptación/Accepted: 2013-10-04
Publicado/Published: 2013-12-18

REVISTA DE
INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA

Resumen

En la actualidad se emplean numerosas técnicas para aumentar la eficiencia en la producción de alcohol, como el campo magnético oscilante (CMO). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto estimulante del CMO de frecuencia baja sobre la fermentación con dos cepas destileras en la melaza a diferentes concentraciones. Se aplicó CMO de 60 Hz y 6,5 mT de densidad sobre melaza diluida a 12, 18 y 24 °Bx. La melaza se esterilizó (121 °C/15 min) y se trató con dicho CMO, antes o después de inocular las cepas de levaduras destileras *S. cerevisiae* Santa Cruz 17 y *S. sake* 21-452. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en la producción de alcohol entre las dos cepas, por lo que el CMO no tiene el mismo efecto sobre microorganismos de la misma especie. Hasta las 15 a 17 horas de iniciada la fermentación se logró una estimulación de la producción de alcohol de 6.43 a 9.79 % más respecto al control; y, al final de la fermentación en las muestras tratadas se observó un retraso de hasta 2.43 % menos. Se demostró que el efecto estimulante del CMO es menor cuando se aplica sobre la melaza con el microorganismo de interés inoculado y a menor concentración. Las cepas de levaduras utilizadas fueron del género *Saccharomyces*, pero la especie *cerevisiae* se adaptó mejor a la melaza tratada con CMO que la especie *sake*.

Palabras clave: campo magnético oscilante, genotoxicidad, eficiencia fermentativa, *S. cerevisiae*, *S. sake*.

Abstract

In present numerous techniques were employed for increasing the efficiency in alcohol production, as well as oscillating magnetic field (OMF). The objective of this research was evaluating the stimulating effect of low frequency OMF on fermentation with two distillery yeast strain in molasses to different concentrations. It was applied OMF of 60 Hz and 6.5 mT of density on molasses diluted to 12, 18 and 24°Bx. Molasses was sterilized (121°C/15 min) and treated with the OMF before or after inoculating the distillery yeast strains *S. cerevisiae* Santa Cruz 17 and *S. sake* 21-452. There was statistically significant difference ($p \leq 0.05$) in alcohol production between two strains, therefore the OMF has not same effect on microorganisms of same species. Until 15 to 17 hours after the start of fermentation was achieved stimulating the production of alcohol from 6.43 to 9.79% compared to the control; and, the end of the fermentation in the samples treated was observed a delay of up to 2.43% less. It was shown that the stimulatory effect of the OMF is least when applied on the molasses, with the inoculated microorganism of interest and to less concentration. The employed yeast strains were of the genus *Saccharomyces* but *cerevisiae* species showed greater adaptation to OMF-treated molasses than the sake species.

Keywords: oscillating magnetic field, genotoxicity, fermentative efficiency, *S. cerevisiae*, *S. sake*.

Introducción

En la actualidad se emplean numerosas técnicas para aumentar la eficiencia en la producción de alcohol, desde la selección de cepas de microorganismos hasta la manipulación de sus genes, con vistas a obtener cepas más termotolerantes y resistentes a altas concentraciones de alcohol. Las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz 17 y *Saccharomyces sake* 21-452 del banco de cepas del IIIA se caracterizan por su alta resistencia y elevada productividad y se emplean en la Industria cubana en la elaboración de ron (Abreu, Rodríguez y Jaqueman, 2003), (Kurita, Nakabayashi y Saitho, 2003).

El tratamiento magnético (TM), con campo magnético estático (CME) y oscilante (CMO) provoca efecto estimulante sobre algunos sistemas biológicos (Barbosa, 2003). No existe consenso si el TM provoca o no genotoxicidad, aunque dichos cambios genéticos están más influenciados por los valores de frecuencia del CMO que por los de densidad del CME. (Nakasono, Laramée, Saiki y McLeod, 2003). Algunos autores plantean que la acción repetida del TM puede acelerar los procesos metabólicos en los hongos (Gonzalez, 1999); sin embargo, se informó sobre la no significación de estas interacciones en levaduras (Chacón, Haber, Rodríguez y Monte 2006).

Respecto a la forma de aplicación, usualmente el TM se aplica a las suspensiones microbianas en la fase inicial (Zapata, Hoyos y Moreno, 2005) aunque se realizaron estudios en *Saccharomyces fragilis*, tratando el medio antes de la inoculación, lo que influyó sobre la velocidad de biosíntesis de los cultivos (Gómez, Prieto, Ristori y Martínez, 2004).

Siendo que la eficiencia fermentativa es crucial en la productividad de las cepas destileras el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el efecto estimulante del CMO-FEB sobre la fermentación con dos cepas destileras (*Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz 17 y *Saccharomyces sake* 21-452) en melaza a diferentes concentraciones.

Materiales y Métodos

Las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz 17 y *Saccharomyces sake* 21-452 del cepario del IIIA, poseen alta resistencia al alcohol. Se activaron dichas cepas en 15 mL de medio estéril (121°C/15 min) compuesto por caldo extracto de malta y extracto de levadura, incubada a 30 °C por 24 h. Posteriormente se ajustó la concentración celular a 20 x 10⁶ células/mL en cámara de Neubauer y se inoculó igual cantidad en varios erlenmeyers con 50 mL de melaza estéril (121 °C/15 min) a 12, 18 y 24 °Bx. La melaza recibió tratamiento magnético con CMO-FEB (6,5 mT/60 Hz) antes o después de ser inoculadas las cepas y se incubó en las mismas condiciones (Abreu, Rodríguez y Jaqueman, 2003).

La producción de alcohol se determinó por la técnica del poder fermentativo. Se monitoreó la diferencia de la pesada inicial del sistema y las que se obtuvieron al tiempo determinado, en horas. Para la transformación del CO₂ desprendido a alcohol producido (v/v) se utilizó la fórmula siguiente:

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

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

Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA con el programa estadístico *Statgraphics Centurion*.

Resultados y Discusión

Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en la producción de alcohol entre las dos cepas. Esto evidencia que el TM no tiene el mismo efecto sobre microorganismos del mismo género, consecuente con lo informado en la literatura (Yoshimura, 1989).

Al analizar el efecto de la concentración de la melaza se observó que los niveles de este factor influyen en el comportamiento de la variable analizada. En ese sentido, las Figuras 1 y 2 muestran

que el porcentaje de producción de alcohol respecto al control fue mayor en las soluciones tratadas de 18 y 24 °Bx, para las dos formas de aplicar el TM (sustrato inoculado y sin inocular).

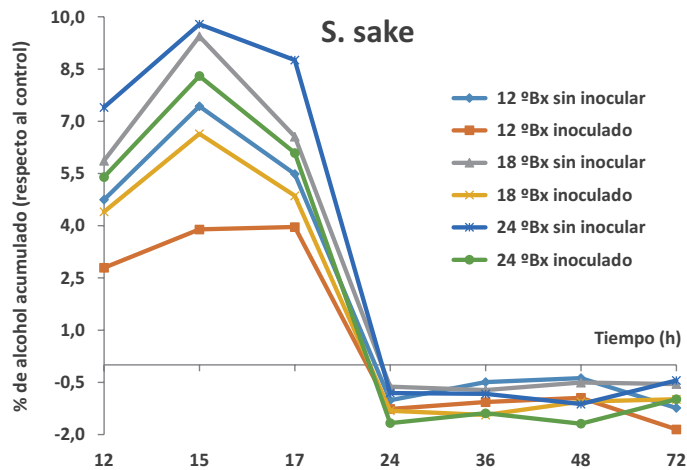


Figura 1. Producción de alcohol de la cepa *Saccharomyces sake* 21-452 respecto al control, en melaza a diferentes concentraciones y tratada magnéticamente.

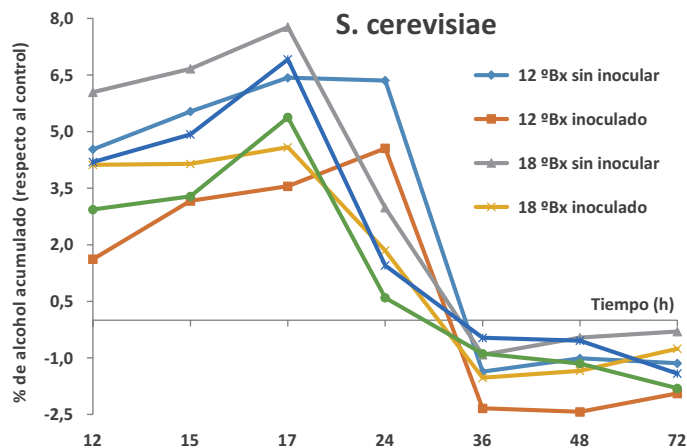


Figura 2. Producción de alcohol de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Santa Cruz 17 respecto al control, en melaza a diferentes concentraciones y tratada magnéticamente.

En dichas figuras puede observarse cierto orden en la producción de alcohol de ambas cepas según la forma de aplicar el TM, favoreciendo la melaza tratada sin inocular en todas las concentraciones. Sin embargo, debe destacarse que con la concentración de 12 °Bx el modo de aplicar TM no tuvo diferencia significativa para la cepa *S. sake*. Por tanto, el modo más adecuado de

aplicación del TM en melaza a estas concentraciones para aumentar la eficiencia fermentativa es tratar la melaza antes, para inocular posteriormente el microorganismo de interés.

En ese sentido, en las muestras con melaza tratada antes de la inoculación se observó estimulación de la cantidad de células (aumento de biomasa) respecto al control, con el mayor recuento para la cepa *S. sake* en todas las concentraciones. El mayor resultado fue para 24 °Bx, lo que concuerda con un resultado similar en que al aumentar la concentración de sales aumentó el conteo celular de *S. cerevisiae* expuesta a 460 mT, incubada por 24 a 72 h y temperatura de 28 a 38 °C (Chacana y Cortés, 2008).

No se afectó el comportamiento de ambas cepas debido al TM aplicado, con una variación notable a las 17 h de iniciada la fermentación. La cepa *S. sake* a 12 °Bx en ese periodo de tiempo aumentó considerablemente la productividad comparada con la *S. cerevisiae*. Para la concentración de 18 °Bx ambas cepas se comportaron de forma similar. Sin embargo, para 24 °Bx con melaza tratada después de inocular la *S. sake* comenzó con elevada productividad a las 15 h (8,2 % por encima del valor control) para luego disminuir (5,7 %) aproximándose a la productividad de la *S. cerevisiae* (5,4 %) (Figuras 1 y 2). Lo anterior pudiera explicarse la toxicidad de las elevadas concentraciones de alcohol que se logra con la *S. sake* a las 15 h, ya que fue similar en todas las concentraciones. Este resultado demuestra la *S. cerevisiae* tiene un comportamiento más estable ante el TM (produjo las máximas productividades entre 17 y 24 h), que le brinda ventajas tecnológicas de utilidad en las destilerías donde se emplea melaza como sustrato.

En general se logró estimular la producción de alcohol con ambas formas de aplicar TM durante todo el experimento. Los mejores resultados fueron hasta las 24 h de fermentación. La *S. sake* a 24 °Bx y 15 h produjo el máximo porcentaje de alcohol superior al control: 9,79 y 8,30 % (sustrato sin inocular e inoculado, respectivamente). Este resultado pudiera explicarse por la mayor cantidad de coloides presentes, ya que se plantea que los campos magnéticos influyen sobre este tipo de partículas 7.

Posterior a las 24 h en todas las muestras se observó un retraso de la producción de alcohol hasta el final del proceso representado por el punto de inflexión de las curvas obtenidas, el cual fue más lento en *S. cerevisiae* que duró hasta las 36 h (Figuras 1 y 2: valores negativos en el eje de ordenadas). Este comportamiento fue más notable a 12 °Bx, con disminución de 1.01 a 1.94% en la *S. sake* y hasta 2.43% en la *S. cerevisiae*.

Con lo explicado anteriormente, se puede inferir que los mejores resultados se logran con la melaza sin inocular: mayores porcentajes de alcohol hasta 24 h y menores retrasos, respecto al control (Figuras 1 y 2). No obstante, es probable que el efecto del TM sobre el sustrato inoculado estimule la producción de toxinas de las cepas (efecto killer), consecuente con lo observado al aplicar CMO de 5 mT en suero de leche que provocó un aumento de la producción de nisina de *Lactobacillus ssp* (Chacón, Haber, Rodríguez y Monte 2006).

Sin embargo, debe destacarse el mayor valor de producción de alcohol de la *S. cerevisiae* fue a 18 °Bx (7.77% superior al control), poniéndose de manifiesto el comportamiento poliextremal o múltiplo característico de este tipo de tratamiento físico (Chacana y Cortés, 2008). Este resultado con CMO es similar al obtenido en medio con 2 a 6% de dextrosa tratado con CME de 100 a 200 mT producido por imanes permanentes, en que la mayor producción de alcohol (8% superior al control) se obtuvo con 2% de dextrosa (Deutmeyer, Raman, Murphy y Pandey, 2011).

Debido a la similitud en la respuesta gráfica del porcentaje de alcohol en las tres concentraciones, puede inferirse que un mismo valor de frecuencia tiende a estimular la producción de alcohol a concentraciones diferentes, pero impide predecir si un aumento o disminución de frecuencia provoque respuestas similares debido al comportamiento no lineal (poliextremal o múltiplos). A esta conclusión puede llegarse por la concordancia con los resultados obtenidos con TM de frecuencias 120, 60 y 0 Hz hallándose que tuvieron efectos diferentes sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*, siendo estimulante, inhibitorio y nulo, respectivamente (Chacana y Cortés, 2008).

Se concluye que un valor bajo de densidad de CMO-FEB aplicado en idénticas condiciones sobre determinado sustrato puede estimular la producción de un mismo metabolito en microorganismos de un mismo género, pero en magnitud diferente según la especie. En este caso, ambas cepas de levaduras son del género *Saccharomyces*, pero la especie *cerevisiae* manifestó mayor tolerancia al TM aplicado que la especie *sake*.

Conclusiones

Se logró una estimulación máxima de la producción de alcohol de 6.43 a 9.79% más de alcohol respecto al control hasta las 15 a 17 h de iniciada la fermentación y luego se observó un retraso en las muestras tratadas de hasta 2.43% menos al final de la fermentación. Es decir, las muestras controles se mantuvieron estables, mientras las tratadas tuvieron fluctuaciones.

El efecto estimulante del campo magnético es mayor cuando se aplica primero en el sustrato, antes de inocular el microorganismo de interés.

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* manifestó mayor adaptación en la melaza tratada con TM que la especie *sake*. En futuras investigaciones se propone valorar otras cepas destileras y parámetros de CMO-FEB no incluidos en este estudio.

Referencias Bibliográficas

- Abad E (2006). Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y Viñedos de Trujillo S.L. 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.

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

Chacana M, Cortés P (2008). Campos magnéticos oscilantes en el procesado de alimentos. Universidad de la Serena. Facultad de Ingeniería, Departamento de alimentos. Disponible en: www.e-alimentos.cl

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, ISSN 1359-5113.

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.

Gómez MJ, Prieto MI, Ristori E, Martínez M (2004). *Bioelectrochemistry*, 64: 151-155. ISSN 1567-5394.

González, A (1999). Estudio de la cinética de crecimiento en fase sumergida del biocontrolador *Trichoderma viride* bajo la influencia de campos electromagnéticos. *Tecnología Química* 19 (1): 67-71.

Kurita O, Nakabayashi T, Saitho K (2003). Insolation y characteritacion of high acetate producing sake yeast *Saccaromyces cerevisiae*. *Journal Bioscience and Bioengineering*, 95 (1): 65-71. ISSN: 1347-4421 (on line); ISSN: 1389-1723 (print).

Nakasono S, Laramée C, Saiki H, McLeod KJ (2003). Effect of power frequenc magnetic fields on genome-scale gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.* 160 (2003) 25–37. ISSN 0033-7587.

Yoshimura N (1989). Application of magnetic action for sterilization of food. *Shokukin Kihatsu* 24(3):46-48.

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.