

Comparación del efecto inhibitorio del tratamiento magnético sobre la microbiota de mosto de azúcar crudo

Comparison of the inhibitory effect of the magnetic treatment on the microbiota of raw sugar wort

MSc. Matilde Anaya-Villalpanda^I, taniamariaguzman@gmail.com, MSc. Tania María Guzmán-Armenteros^{II}, MSc. Yarindra Mesa-Mariño^{III}, MSc. Hilda Caridad Cobo-Almaguer^I, MSc. Carlos Manuel Acea-Fiallo^{IV}

^IBanco de cepas puras de levadura del Departamento de Microbiología de Vicedirección de Ciencias, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Lisa, Cuba

^{II}Universidad Tecnológica Equinoccial. Santo Domingo. Ecuador

^{III}Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Santiago de Cuba, Cuba

^{IV}Grupo ECOSOL Hidráulico, Miramar, Playa, Cuba

Resumen

El objetivo de este trabajo es comparar el efecto inhibitorio de los campos magnéticos oscilantes (CMO) y estático (CME) sobre la microbiota típica de un mosto de azúcar crudo. Se realizó un diseño experimental D-óptimo de tres factores (tiempo, densidad del campo magnético y concentración del mosto) con 50 mL para evaluar el recuento de mesófilos aerobios totales (conteo total) y hongos y levaduras dado en log ufc/ mL. La inhibición no excedió la unidad logarítmica con CMO (entre 0,48 y 0,47 log ufc/mL) para los mesófilos y 4 unidades logarítmicas (100 % inhibición) con CME para hongos y levaduras. Por tanto, se concluye que el CME tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la microbiota típica el mosto de azúcar crudo que el CMO; este último depende del tiempo de exposición y no de su densidad. La reducción de los microorganismos en este medio se manifestó en el orden descendente: levaduras, hongos y bacterias, destacándose la magnetorresistencia de un bacilo que no se identificó taxonómicamente.

Palabras clave: campo magnético oscilante, campo magnético estático, magnetorresistencia, vino.

Abstract

The aim of this work was to compare the inhibitory effect of the oscillate magnetic fields (OMF) and static (SMF) on the typical microbiota of a raw sugar wort. D D-optimal experimental design of three factors (time, density of the magnetic field and concentration of the

wort) was carried out with 50 mL to evaluate the recount of total aerobic mesophilic (total count) and fungi and yeasts given in log cfu/mL. The inhibition didn't exceed the logarithmic unit with OMF (between 0.48 and 0.47 log cfu/mL) for the mesophilic and 4 logarithmic units (100% inhibition) with SMF for fungi and yeasts. Therefore, was conclude that the SMF had higher inhibitory effect that the CMO on the typical microbiota of raw sugar wort; this last one depends of the exposure time and not of their density. The reduction of the microorganisms in this medium showed in the descending order: yeasts, fungi and bacteria, highlight the magnetic resistance of a bacillus that was not identified.

Keywords: *oscillate magnetic fields, static magnetic fields, magnetic resistance, and wine.*

Introducción

El azúcar crudo se utiliza como sustrato para la fermentación, con levaduras seleccionadas para la elaboración del vino base, al que luego se adiciona un macerado de frutas y otras esencias para incorporar aroma y sabor [1]. Dicha azúcar en ocasiones proviene del jugo de caña en el cual se encuentran microorganismos de los géneros bacterianos *Leuconostoc*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Corynebacterium*. Entre las levaduras halladas en el azúcar crudo se encuentran los géneros *Pichia*, *Torulopsis* y *Candida* destacándose la especie osmófila *Zygosaccharomyces rouxii*. El refinado del azúcar destruye los microorganismos patógenos, si estuvieran presentes pero sobreviven los endosporas de bacilos aerobios o anaerobios, tales como *Bacillus coagulans*, *B. stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum* y *C. nigrificans* [2].

En la industria de las fermentaciones alcohólicas primero debe esterilizarse el medio de cultivo antes de propagación y el resto del proceso se realiza sin aplicar tratamiento térmico, ya que el cultivo iniciador inoculado está en mayor proporción que el resto de los microorganismos y logra colonizar el medio. Cuando la fermentación es espontánea prevalecen unos géneros de levadura sobre otros por interacciones antagónicas levadura-levadura debido a que excretan toxinas (efecto killer) que inhiben su crecimiento [3].

Se plantea que el tratamiento magnético (TM) con campos magnéticos oscilantes (CMO) y campos magnéticos estáticos (CME) tiene efectos inhibitorios o estimulantes sobre los diferentes sistemas biológicos cuyos resultados en ocasiones son comparables a los tratamientos térmicos [4, 5]. Se plantea que dicha inhibición se observa sólo en células que ocupan tal posición

que el campo magnético es perpendicular al “paso del metabolismo”. Debido a que las células están dispersas al azar en el campo magnético, la gemación de las levaduras se inhibe sólo en 20 a 30 % [6]. Para el caso de las bacterias, se informó que se estimuló entre 3 y 5 veces la producción de nisina del *Lactococcus lactis* inoculado después que se aplicó CMO de 5 mT a suero de leche fluyendo a 1,5 m/s en tuberías de acero inoxidable [7]. Esto puede explicar cómo se logró mejorar la calidad microbiológica en el queso cuando se aplicó CMO de 4, 6 y 8 mT sobre la leche contenida en un recipiente [8].

Al tratar medios líquidos en los que se encuentran varios géneros de microorganismos formando su microbiota típica, se observó resultados similares [9-13] lo cual conllevaría al ahorro de energía sin afectaciones tecnológicas. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es comparar el efecto inhibitorio del TM sobre la microbiota típica de un mosto de azúcar crudo.

Materiales y métodos

En el experimento se utilizó azúcar crudo de calidad microbiológica aceptable, aplicando las normas cubanas [14, 15]. Se realizó un diseño experimental obtenido por el programa estadístico Design Expert ver. 6.0.1.0 (Stat- Ease, Minneapolis) para un análisis multifactorial D-óptimo de tres factores (Tablas 1 y 2) con 18 corridas experimentales cada uno que se realizaron de forma aleatoria.

Tabla 1
Niveles de los factores del diseño experimental para CMO

Niveles	Factores		
	Tiempo (min)	Densidad del CMO (mT)	Concentración del mosto (°Bx)
1 (bajo)	0	0	12
2 (alto)	60	12	18

Tabla 2
Niveles de los factores del diseño experimental para CME

Niveles	Factores		
	Tiempo de residencia(s)	Densidad del CME (mT)	Concentración del mosto (°Bx)
1 (nivel bajo)	8	0	12
2 (nivel alto)	12	120	18

Se aplicaron dichos factores a 50 mL de volumen del mosto. Las muestras controles se esterilizaron y no recibieron TM. Las variables de respuesta a evaluar fueron el recuento de mesófilos aerobios totales (conteo total) y hongos y levaduras dado en log ufc/ mL [14, 15]. Las muestras se trabajaron por triplicado y los resultados se analizaron con el programa estadístico *Statgraphics* mediante ANOVA simple con el método de las mínimas diferencias cuadradas (LSD) de Fisher.

Los tratamientos de CMO se realizaron con equipos experimentales caracterizados por Centro Nacional Electromagnetismo Aplicado (CNEA). El equipo de CMO consta de un generador de señal y una bobina con núcleo de aire formada por un cartón de 30 cm de diámetro y 29 cm de altura con alambre de cobre de 2 mm de diámetro enrollado que ofrece una resistencia de 6,1 Ω al paso de una corriente de 60 Hz/220 V generando campo magnético homogéneo entre 1 y 20 mT. El de CME cuenta con sistema hidráulico con tubería de acero galvanizado de 13 mm de diámetro interno con acondicionador magnético de 2 pares de electroimanes tipo solenoide con núcleo de hierro, común dos a dos, formando dos zapatas polares que constituyen la región de interacción o tratamiento. Se alimenta con corriente alterna (220 V, 1 F, 60 Hz) a través de banco de capacitores para lograr el CME por ajuste de la intensidad de corriente a través de un amperímetro con escala de 0,1 a 2,5 A de precisión 0,1 A y densidad de campo de 5 a 200 mT.

Resultados y discusión

El análisis estadístico de todos los resultados de las corridas experimentales determinó que las mismas presentaron una distribución normal para $p \leq 0,05$,

permitiendo realizar una discusión a partir del promedio de todos los valores obtenidos.

En sentido general, para hongos y levaduras (HL) y mesófilos aerobios totales (MAT) se observó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para el efecto de la concentración del mosto (entre 12 y 18 °Bx). En cuanto a la aplicación del TM, se evidenció que para CMO el efecto inhibitorio sobre la microbiota típica del azúcar no depende de la densidad del campo sino del tiempo de exposición. Sin embargo, para CME el efecto solo fue significativo con 120 mT para HL mientras que para MAT fueron 60, 90 y 120 mT. La inhibición no excedió la unidad logarítmica con CMO (entre 0,48 y 0,47 log ufc/mL) para MAT y 4 unidades logarítmicas (100 % inhibición) con CME para HL debido a la alta incidencia sobre las levaduras.

El procesamiento estadístico de todos los resultados de las variables de respuesta de cada diseño se ajustaron a ecuaciones matemáticas que fueron significativas ($p \leq 0,05$) pero cada factor tuvo significación diferente. Por tanto, la selección de los niveles más adecuados de los mismos se comentó a partir del análisis del diseño experimental (tablas 3 y 4).

Tabla 3
Valores del estadígrafo p de los resultados del diseño experimental

Factor	Valores de p			
	CMO		CME	
	MAT	HL	MAT	HL
A: Tiempo de TM	0,0235	0,0577	0,4043	0,4248
B: Densidad del TM (mT)	0,2264	0,1175	0,0232	< 0,0001
C: Concentración del mosto (°Bx)	< 0,0001	0,0963	0,0507	< 0,0001

Nota: Tiempo de TM para CMO en segundos y para CME en minutos

Tabla 4
Modelos experimentales ajustados de los obtenidos a partir del diseño

	Mesófilos Aerobios Totales (MAT)	Hongos y levaduras (HL)
CMO	5,62 – 0,068 (A) – 0,034 (B) + 0,72 (C) [R ² = 0,9083]	3,18 – 1,00 (A) – 0,73 (B) + 0,76 (C) [R ² = 0,7931]
CME	3,43 – 0,15 (A) – 0,92 (B) + 0,16 (C) [R ² = 0,7146]	2,18 – 0,084 (A) – 1,21 (B) + 0,18 (C) [R ² = 0,8696]
Ecuación lineal para ambos TM [MAT y HL = X ₀ – X ₁ . A – X ₂ .B + X ₃ .C] MAT y HL: recuento de microorganismos en ufc/mL; X ₀ : constante del modelo; X ₁ , X ₂ y X ₃ : coeficientes de regresión.		

En la tabla 3 se aprecia que la variación del recuento con CMO fue significativa ($p \leq 0,05$) sólo para MAT en relación con los factores tiempo de TM (A) y concentración del mosto (C). Este resultado puede deberse a la poca presencia de hongos y levaduras en los controles (CMO: 3,18 ufc/mL y CME: 2,18 ufc/mL), en los que se observó mayor crecimiento de bacterias (por diferencia entre MAT y HL, CMO: 2,44 ufc/mL y CME: 1,25 ufc/mL) respecto al grupo de los hongos. En ese sentido, puede decirse que las bacterias sobrevivieron al tratamiento aplicado contrario a estudios similares con melaza y cerveza [9; 13] a diferentes concentraciones en los que se observó que los hongos fueron más resistentes.

Lo anterior se evidencia analizando el modelo matemático (Tabla 4) donde el signo negativo de A, indica disminución del recuento a mayores valores de este factor tiene menor módulo del coeficiente para MAT (-0,068) que para HL (-1,00). Es decir, el efecto será mayor sobre este grupo de microorganismos, específicamente sobre las levaduras ya que los hongos filamentosos fueron más resistentes. Por lo tanto, la reducción de los microorganismos se manifestó de forma descendente: levaduras, hongos y bacterias.

El hecho de que el efecto de B no sea significativo para ambos grupos de microorganismos, permite inferir que el efecto del CMO en el rango estudiado en este experimento dependerá de la contaminación microbiana inicial, por lo que se selecciona el mayor valor de este factor. No obstante, se verán más

afectados los hongos y levaduras debido al mayor coeficiente (- 0,73 comparado con -0,034).

Los signos positivos de los coeficientes de C para CMO indican que se alcanzan mayores recuentos a niveles más altos de dicho factor. Este comportamiento de fue similar para CME, por tanto puede concluirse que a mayor concentración del mosto de azúcar crudo (mayor contaminación microbiológica inicial) se tendrá menor efecto del TM sobre los microorganismos en soluciones más concentradas consecuente con lo observado en melaza y cerveza a diferentes concentraciones [9; 13]. Se plantea la hipótesis de que los microorganismos queden atrapados entre los flóculos [16] debido a la alta ocurrencia de probabilidad de choques entre dichas partículas [15; 17] y precipiten después de la coagulación.

En la tabla 3 también se aprecia que la variación del recuento de MAT y HL fue significativa ($p \leq 0,05$) en relación con los factores densidad de CME (B) y concentración del mosto (C). Estos resultados son positivos desde el punto de vista del efecto deseado porque permite seleccionar los valores atendiendo a las necesidades tecnológicas: mayor concentración del mosto (que en la industria es de 17 a 18 °Bx) y el mayor valor de CME para lograr la máxima inhibición, con independencia del tiempo de residencia (cualquier flujo según los requerimientos técnicos) ya que dicho factor (A) no fue significativo ($p > 0,05$).

El signo negativo de A (tabla 4) indica disminución del recuento a mayores valores de este factor. Teniendo en cuenta el mayor modulo del coeficiente (-0,15) para MAT, el efecto será mayor sobre estos, específicamente por disminución de las levaduras ya que los hongos filamentosos fueron más resistentes. Este resultado es contrario al observado en presencia del CMO (MAT: -0,068 y HL: -1,00), por tanto puede concluirse que en este sustrato (solución de azúcar crudo) el tiempo de aplicación de ambas formas de TM tienen un efecto diferente.

Los signos negativos de los coeficientes de B indican que se alcanzan menores recuentos a niveles más altos de dicho factor. Igualmente HL se afectan más que MAT (-1,21 y -0,92 respectivamente) con un efecto significativo de este

factor. Por lo tanto, la inhibición del TM también se manifestó en el orden descendente: levaduras, hongos y bacterias. Al comparar este resultado con los del CMO puede apreciarse que el grupo de HL es menos resistente a dicho tratamiento (- 0,73 para HL respecto a - 0,034 para MAT), aunque su efecto no es significativo al aumentar los valores en el rango evaluado. Por tanto, la microbiota del azúcar crudo responde de manera diferente a los campos magnéticos aplicados. Esto permite inferir que la aplicación de un campo u otro antes de inocular la levadura dependerá del grupo de microorganismo al que se desee controlar su crecimiento en la etapa de la propagación.

La figura 1 muestra el crecimiento en placas de la dilución del mosto tratado con CME. En dicha figura puede observarse que se trata del mismo microorganismo, de forma bacilar (por observación directa al microscopio) que resultó ser la bacteria más resistente al CME.

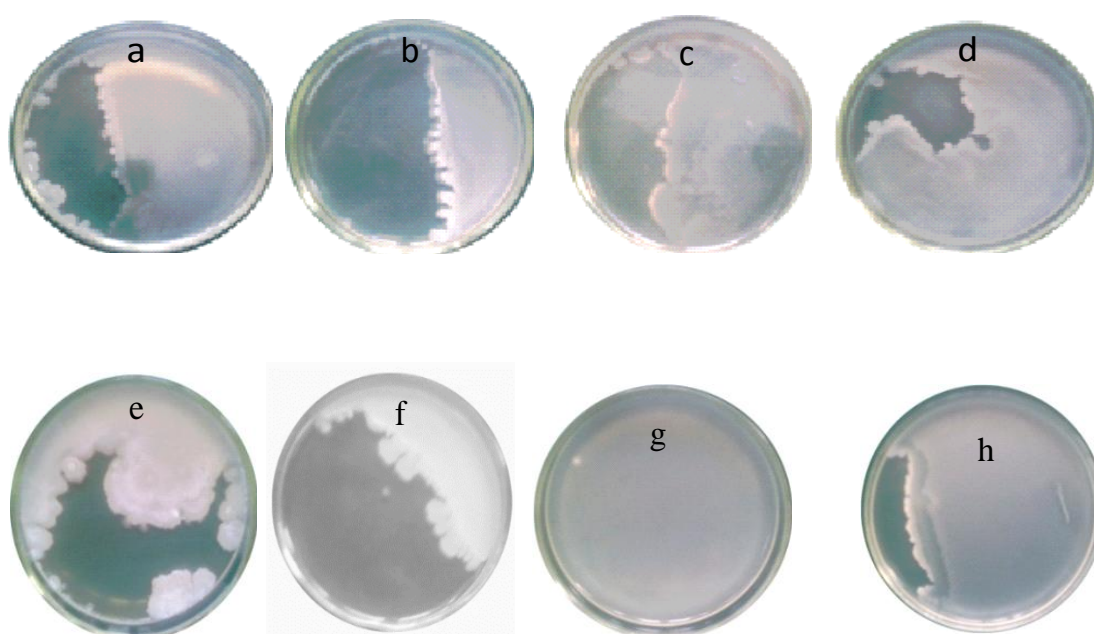


Fig. 1 Crecimiento por siembra en placas por duplicado (dilución 10^{-4}) de mesófilos aerobios totales en solución de azúcar crudo tratada con CME.

En las figuras 1a-1d puede apreciarse el aumento del crecimiento de la colonia formando un césped que recubre toda la placa, en el sentido de mayor densidad del CME (de 60 a 120 mT) y mayor tiempo de residencia o menor flujo (de 8 a 12 s). Este resultado evidencia la posibilidad de que el crecimiento

de este bacilo resulte estimulado, ya sea por no tener competencia por el sustrato con otro microorganismo que presente inhibición o por efecto directo del CME (fenómeno “ventana”: efecto contrario al observado hasta ese momento con determinado valor de densidad o frecuencia). Como se explicó anteriormente, la alta concentración del mosto impidió el mayor efecto inhibitorio del CME. Por tanto, la posible estimulación el fenómeno “ventana” se demuestran al comparar las figuras 1c y 1d con 1e-h: todos recibieron TM con CME de 120 mT por 12 s, sin embargo el crecimiento fue mayor en 18 °Bx (Figuras 1g y 1h) y en 12 °Bx (Figuras 1c y 1d) que en 15 °Bx (figuras 1e y 1f).

Por tanto, puede concluirse que el CME aplicado bajo las condiciones estudiadas tiene mayor el efecto inhibitorio que el CMO, ya que este último depende del tiempo de exposición y no de la densidad del campo mientras que el CME además presenta la ventaja tecnológica de poder aplicarse en sistemas con flujo moderado.

Conclusiones

- 1. La aplicación del campo magnético estático (CME) sobre la microbiota típica del mosto de azúcar crudo tuvo mayor efecto inhibitorio (100 % inhibición) que el campo magnético oscilante (CMO); este último depende del tiempo de exposición y no de su densidad. La reducción de los microorganismos en este sustrato se manifestó en el orden descendente: levaduras, hongos y bacterias, destacándose la magnetorresistencia de un bacilo que no se identificó taxonómicamente.***

Bibliografía

1. FERREYRA, MM. 2006. "Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas". Trabajo para optar por el título de Doctor en Ciencias. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Concordia, Valencia, España.
2. RODRÍGUEZ, ST.; HERNÁNDEZ, Q. A. 2013. "Microbiología en la industria azucarera". *Tecnologías de Alimentos*. Disponible en: www.laica.co.cr/biblioteca/servlet/DownloadServlet?c=443&s=2521&d=8999. Consultado 4 de marzo del 2013.
3. FLEE, GH. 2003. "Yeast interactions and wine flavor". *Int. J. Food Microbiol.* Vol 86, p. 11-22.
4. BOLADO, S.; GÓGORA, MM.; POTHAKAMURY, U.; BARBOSA, GV.; SWANSON, BG. 2003. Chapter 17: A Review Of Non Thermal Technologies (p. 227-256). En: *Food Preservation Technology Series. Trend In Food Engineering*. Technomic Publish Co. Inc, Lancaster. Basel. Pennsylvania. Usa. Isbn: 1-56676-782-2, 341 p.
5. WON, HYE; STREAKER, C.; ZHANG, Q.H.; 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*; Vol. 48, N°10, p. 4597-4605.
6. CHACANA, M.; CORTES, P. 2009. Campos magnéticos oscilantes en el procesado de alimentos. Universidad de la Serena. Facultad de Ingeniería, Departamento de alimentos. Disponible en: www.e-alimentos.cl.
7. CHACÓN, AD; HABER, PV; RODRÍGUEZ JO; MONTE ALEGRE, R. 2006. "Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* using cheese whey permeate". *Process Biochemistry*, ISSN 1359-5113, Vol. 41, N°9, p. 1967–1973. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.009>
8. GUZMÁN, MT.; ANAYA, VM.; ABREU, J.; DUQUESNE, F.; GUERRA, G.; VALDÉS, O. 2000. Influencia del campo magnético en la calidad microbiológica del queso fresco Telita. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Vol. 20, N° 2, p. 67-72.
9. GUZMÁN, MT.; ANAYA, VM.; MESA MY. Activación de cultivos probióticos tratados con campo magnético de frecuencia extremadamente baja. *Tecnología Química*, 2016, Vol. 36, no 1, p. 84-92.
10. ANAYA, M.; ACEA CM.; GUZMÁN, TM.; COBO, HC. 2011a. Inhibición y estimulación magnética de microorganismos en melaza. En (CDROM) IV Conferencia Internacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA '2011). Santiago de Cuba, Cuba.
11. ANAYA, M; ACEA, CM.; GUZMÁN, TM.; COBO, HC.; ALMEIDA E SILVA, JB. 2011b. Aplicación de la potencialidad dual del campo electromagnético. En (CDROM) V Simposio Internacional de Producción de Alcohol y Levaduras (SIPAL'2011). Lima, Perú.
12. 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
13. ANAYA, M.; ACEA, CM.; RIERA, G.; ALMEIDA, JB. 2013. "Inhibición de la microbiota no deseada en cerveza de alta gravedad aplicando campo magnético estático". *Asociación Española de Técnicos de Cervezas y Maltas*, ISSN 03003-4481, Vol. 197, N°1, p. 31-37.
 14. NC 4833:2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de microorganismos. Técnica de placa vertida a 30°C.
 15. NC 7954:2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C.
 16. ANAYA, M.; ACEA, CM.; COBO, HC; ALMEIDA, JB. 2011. "Influencia del campo magnético estático en la turbidez de la cerveza". *Asociación Española de Técnicos de Cervezas y Maltas*, ISSN 03003-4481, Vol.192, N° 4, p. 62-66.
 17. ACEA, CM. 2009. Visualización del proceso de floculación magnética. En (CDROM) III Conferencia Internacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA '2009).