

Efecto de las concentraciones salinas en la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* en un ingenio azucarero del Valle del Cauca*

Effect of salt concentration on the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* in a sugar mill in Valle del Cauca

Johany Ángel, Raúl Cuervo Mulet, Heiber Cárdenas, Jorge Antonio Durán, Luis Fernando Mejía, Gloria Rodríguez de la Pava

Resumen

La industria azucarera basa gran parte de sus ingresos económicos en la cristalización de la sacarosa proveniente de la molienda de la caña de azúcar (*Saccharum officinalis*) para obtener el azúcar comercial que habitualmente se encuentra en el comercio. Por esto, cuanto mayor concentración de sacarosa

se encuentre en el jugo después de pasar por el molino, mayor será la rentabilidad en el producto final (azúcar comercial).

El proceso anteriormente mencionado es afectado por diversos microorganismos; la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* es una de las principales fuentes de pérdidas debido a la fermentación que realiza en la sacarosa, disminuyendo con ello

• Fecha de recepción del artículo: 8 de agosto de 2008 • Fecha de aceptación: 5 de marzo de 2009

JOHANY ÁNGEL. Biólogo de la Universidad del Valle, Cali - Colombia. Integrante del Grupo Biotecnología de la USB Cali - Colombia. Correo electrónico: jjangel@hotmail.com. **RAÚL CUERVO MULET.** Docente-investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial, de la USB Cali - Colombia. Biólogo genético y Magíster en Ciencias Biológicas. Doctorado en Ciencias Biológicas (c) de la Universidad del Valle, Cali - Colombia. Director del Grupo de Investigación Biotecnología. Correo electrónico: racuervo@usbcali.edu.co. **HEIBER CÁRDENAS.** Docente-investigador de la Universidad del Valle, Cali - Colombia. Biólogo de la Universidad del Valle. Magíster en Biología de la Universidad de los Andes. Integrante del Grupo Manglares de la Universidad del Valle. Correo electrónico: hecarden@univalle.edu.co. **JORGE ANTONIO DURÁN.** Docente-investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la USB Cali - Colombia. Químico de la Universidad de Antioquia - Colombia y Magíster en Educación y Desarrollo Humano de la USB Cali. Integrante del Grupo de Investigación Biotecnología. Correo electrónico: jaduran@usbcali.edu.co. **LUIS FERNANDO MEJÍA.** Docente-investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la USB Cali - Colombia. Ingeniero Agroindustrial de la Universidad Grancolombia. Doctorado en Ciencias de la Universidad de Valencia, España (c). Integrante del Grupo de Investigación Biotecnología. Correo electrónico: ifmejia@usbcali.edu.co. **GLORIA RODRÍGUEZ DE LA PAVA.** Docente-investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la USB Cali - Colombia. Ingeniera química y Magíster en Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle, Cali - Colombia (c). Integrante del Grupo de Investigación Biotecnología. Correo electrónico: gcrodrig@usbcali.edu.co.

* Este artículo es un producto del proyecto de investigación *Aislamiento y control microbiológico de Leuconostoc mesenteroides, en un ingenio azucarero del Valle del Cauca, para el incremento de la producción de azúcar y etanol.*

la concentración de azúcar en el proceso de cristalización y en los rendimientos finales.

En este trabajo de investigación se pretende mostrar algunas formas de inhibir o controlar de la bacteria *L. mesenteroides* mediante el suministro de diferentes concentraciones de algunas sales químicas, entre las cuales se encuentran CaCl_2 , NaClO , EDTA, NaNO_2 , Na_2SO_3 y $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ en el sustrato de crecimiento bacteriano; a su vez este trabajo permitirá identificar diferentes formas de inhibición de la bacteria que pueden ser implementadas en la industria. Una de las más relevantes por su bajo costo y simplicidad es la adición de sales químicas.

Palabras Clave: caña de azúcar, fermentación.

Abstract

The sugar industry supports much of its income in the crystallization of sucrose that comes from the milling of sugar cane. However, this process is affected by various microorganisms, being *Leuconostoc mesenteroides* a major source of loss resulting from the fermentation performed on sucrose. This study aims at the inhibition of the bacterium *L. mesenteroides* with different concentrations of chemical salts such as CaCl_2 , NaClO , EDTA, NaNO_2 , Na_2SO_3 and $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ in bacterial growth substrate, a work that is part of a broader research that will allow us to identify different forms of bacterial inhibition, which can be implemented in the industry.

Key words: Sugar cane, fermentation, bacteria, *L. mesenteroides*.

Introducción

En el contexto azucarero nacional toma cada día mayor importancia la calidad de la materia prima (la caña de azúcar) transportada, luego de múltiples operaciones en el campo, hasta las instalaciones del ingenio para convertir su contenido en azúcar y etanol (Ochoa, 2003). Desde 1985 en el Valle del Cauca se han observado y estudiado las diferencias en la sacarosa obtenida después de la molienda y la cantidad de azúcar co-

mercial producida por la cristalización de esta sacarosa, y se ha notado una pérdida considerable, lo cual representa graves afectaciones económicas a este importante renglón de la economía regional (Larrañondo *et al*, 1989; Larrañondo *et al*, 2003). Una causa importante en la destrucción de sacarosa es la fabricación del azúcar, que transcurre desde la molienda de la caña hasta la clarificación del jugo, es la acción de microorganismos que acompañan la caña y que producen la pérdida de sacarosa por medio de la fermentación y la formación de dextrana, lo cual se asocia con el deterioro de la caña de azúcar.

Según Mora (1995), en el estudio de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar no se presentaron diferencias significativas con respecto al número de microorganismos en los jugos de primera extracción y diluido, éstos se encuentran en un período fisiológicamente activo, en el cual se requieren carbohidratos (azúcar) para realizar sus funciones metabólicas vitales. El nivel promedio de contaminación hallado fue de 10^6 bacterias/ml de jugo de caña, siendo el género *Leuconostoc sp* el predominante en la identificación; éste presenta la característica de producir goma, efecto muy importante en la fabricación del azúcar. Además, es una de las principales cepas en la producción de ácido láctico, ácido acético y etanol a partir de la fermentación, e induce al mismo tiempo mayores pérdidas de sacarosa.

La industria ha desarrollado numerosas investigaciones para el control de este microorganismo (Ochoa 2003), las cuales han determinado que cada subespecie de *Leuconostoc mesenteroides* responde diferente según el tipo de control o tratamiento utilizado. Sin embargo, todas las subespecies son potencialmente perjudiciales para la industria al provocar la disminución de la concentración de sacarosa en el jugo mediante la fermentación de este azúcar en ácido láctico.

Varias investigaciones han reportado diversos mecanismos para la inhibición de la cepa microbiana, entre los cuales se encuentran la ramificación, la isomeriza-

ción cis-trans, la elongación de la cadena de ácidos grasos, la formación de cíclicos, entre otros (Russell & Sandercock, 1980). En un ambiente hostil, como el estudiado en este trabajo, en el que se agregaron concentraciones altas de sales específicas, las bacterias se adaptan al medio o perecen. En el primer caso se producen una serie de transformaciones, por las cuales se modifican enzimas que pueden permitir la adaptación de las bacterias al estrés salino. Si bien esto es una posibilidad, no todas las bacterias ácido lácticas son capaces de adaptarse a este estrés salino, por lo tanto, es una forma disponible muy eficiente y económica para la inhibición de la cepa bacteriana, y puede ser implementada y desarrollada por la industria luego de la investigación que permita identificar la eficiencia de esta metodología para el control bacteriano, más específicamente de *L. mesenteroides*.

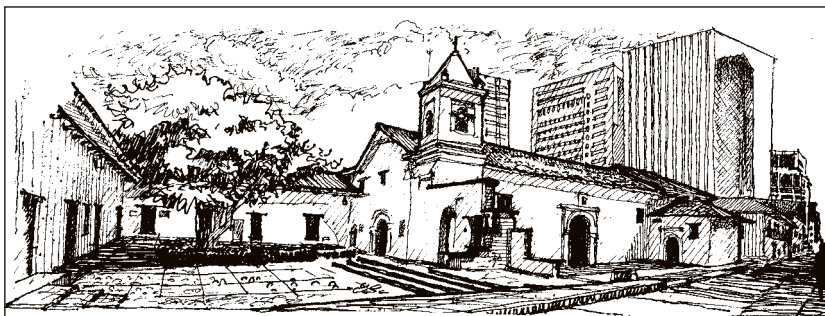
En el caso de las bacterias lácticas que pueden adaptarse al estrés salino mediante la modificación enzimática se espera un cambio en una proteasa, enzima asociada con la envoltura de la bacteria *L. mesenteroides*, lo cual le permitiría alcanzar mayor velocidad de reacción para procesar proteínas del medio, que le sirven a la bacteria para enfrentar la situación y seguir viviendo (Piuri, 2003).

Durante la ejecución de este proyecto se estudió el efecto de diversas concentraciones salinas, antagonismos microbiológicos y diferentes efectos físicos sobre la inhibición o crecimiento de *L. mesenteroides*, lo cual podrá ser implementado como control de esta bacteria en los ingenios azucareros.

Este reporte preliminar está basado en los datos obtenidos del comportamiento de *L. mesenteroides* en diferentes concentraciones salinas.

Materiales y métodos

Microorganismo: La cepa *Leuconostoc mesenteroides* MFM 1 utilizada procedió del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Buenaventura, aislada del Molino Fulton Masa 1, ubicado en el Ingenio del Cauca.



Iglesia y convento La Merced (1541-1678).

Medio de cultivo Mayeux: Peptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; sacarosa, 100 g; citrato de sodio, 1 g; glucosa, 5 g; gelatina 2.5 g; agar, 15 g en un litro de agua destilada. Posteriormente se somete a calentamiento hasta hervir durante aproximadamente 2 minutos y se procede a esterilizar por autoclave a 120 °C durante 30 minutos a una presión de 15 libras. Luego, el agar nutritivo se sirvió en cajas de petri, solidificado a temperatura ambiente.

Concentraciones salinas en la inhibición del crecimiento de *L. mesenteroides*

En esta prueba se empleó el medio Mayeux, el cual es rico en sacarosa. A este medio le fueron agregadas las sales NaCl (cloruro de sodio), KCl (cloruro de potasio), NH_4SO_4 (sulfato de amonio), Na_2SO_4 (sulfato de sodio), Na_2SO_3 (sulfito de sodio), NaNO_2 (nitrito de sodio), NaClO_4 (clorato de potasio), NaH_2PO_4 (fosfato de sodio), MgSO_4 (sulfato de magnesio), EDTA (Ethylenedinitrilo-Tetraacetic Acid, disodium Salt), CaCl_2 (cloruro de potasio), K_2SO_4 (sulfato de potasio), $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (fosfato de amonio), NaClO (hipoclorito de sodio) al 3%, 6.5% y 10%, respectivamente. Los aislados se sembraron en tubos inclinados, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Se observó si los tubos presentaron o no crecimiento microbiano (*L. mesenteroides*).

Los procedimientos utilizados para evaluar los resultados consistieron en observar si la bacteria *L. mesenteroides* en presencia de las sales mostraba variaciones como la presencia o ausencia de crecimiento o la formación de dextrana.

Resultados y discusión

El crecimiento en medio salino se realizó en Mayeux, el cual contenía tres concentraciones salinas de 3%, 6.5% y 10 % para diferentes sales, incubadas a 37 °C durante 48 horas. Los tubos que mostraron crecimiento bacteriano se consideraron positivos. Para algunas de las sales, el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento del *L. mesenteroides* disminuyó significativamente a medida que se incrementaron los niveles de salinidad (Tabla 1).

En la Tabla 1 se demuestra que el crecimiento de *L. mesenteroides* no sólo está influenciado por el tipo de sal suministrada al medio de crecimiento, sino además por la concentración de la sal. Se observaron diferencias notables entre las sales estudiadas. Las concentraciones salinas de $MgSO_4$ y de K_2SO_4 no inhibieron el crecimiento de la bacteria estudiada; sólo $NaClO_4$ a una alta concentración del 10% pudo hacerlo; mientras que las sales $NaCl$, KCl , NH_4SO_4 , Na_2SO_4 , NaH_2PO_4 la inhiben al 6.5%. A estas concentraciones de sal no ocurre ningún deterioro fisiológico en los microorganismos, ni tampoco fermentación láctica, debido a que la preservación se debe fundamentalmente al alto contenido de sal. Sin embargo, cuando el medio tenía $CaCl_2$, $NaClO$, $EDTA$, $NaNO_2$, Na_2SO_3 y $(NH_4)_3PO_4$, el crecimiento fue negativo, mostrando así la eficiencia de estas sales en la inhibición del crecimiento del *L. mesenteroides*.

La cantidad de sal añadida puede ser alta o baja, según su tipo. Sin embargo, la mayoría de las sales utilizadas se encuentran a una concentración del 6.5 % y del 10 %, en las cuales la inhibición del microorganismo se hace evidente y no ocurre ningún deterioro del sustrato por acción microbiológica o fermentación láctica, debido fundamentalmente al alto contenido de sal.

La aplicación de sal en el proceso de cristalización de azúcar y de fermentación del jugo de caña inhibe no sólo el crecimiento de *L. mesenteroides* sino además disminuye la proliferación de microorganismos putrefactivos, y al mismo tiempo afecta el desarrollo de especies patogénicas y toxigénicas. El

Tabla 1.
Efecto de las concentraciones salinas en el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en medio Mayeux.

Medio salino	Crecimiento en		
	3%	6.5%	10%
NaCl	+	-	-
KCl	+	-	-
NH_4SO_4	+	-	-
Na_2SO_4	+	-	-
Na_2SO_3	-	-	-
$NaNO_2$	-	-	-
$NaClO_4$	+	+	-
NaH_2PO_4	+	-	-
$MgSO_4$	+	+	+
EDTA	-	-	-
$CaCl_2$	-	-	-
K_2SO_4	+	+	+
$(NH_4)_3PO_4$	-	-	-
$NaClO$	-	-	-

Símbolos:

Inhibición del crecimiento (-)

Presencia de crecimiento (+)

manejo inadecuado de las concentraciones de las sales como $NaCl$, KCl , NH_4SO_4 , Na_2SO_4 , NaH_2PO_4 posibilita el crecimiento bacteriano, entre ellos *L. mesenteroides*, por lo cual es de vital importancia suministrar las sales en una concentración igual o mayor a 6.5%. Por arriba del 10% de concentración de estas sales no hay inhibición microbiana debido fundamentalmente a la capacidad de adaptación de estas bacterias; además, por encima de este rango las propiedades físico-químicas del jugo de caña cambian, aumentando con ello el costo en la producción del azúcar comercial.

La sal recomendada por este trabajo de investigación es $NaCl$ (sal de cocina) a una concentración mayor o igual del 6.5%, comunmente usada y no tiene efectos nocivos ni contraindicaciones para el consumo humano; además no altera aparentemente las propiedades físico-químicas del jugo de caña utilizado en la elaboración del azúcar

comercial en las concentraciones anteriormente mencionadas.

Las otras sales utilizadas en este experimento pueden ser tóxicas, amargas y comunicarle condiciones peligrosas e indeseables al producto; pero aunque las sales utilizadas no causan algún daño al hombre se sugiere realizar pruebas adicionales para determinar la incidencia de ellas en las propiedades organolépticas del producto final (azúcar comercial) y saber si influyen en el sabor del azúcar.

Girard (1991) pudo observar que un aumento en la concentración de sal produce una disminución en la velocidad de crecimiento y un aumento en la fase de latencia, esto es, un retardo en el crecimiento. Este retardo puede ser explicado por la influencia de la concentración de sal en fase acuosa sobre la presión osmótica del medio y por consiguiente, sobre la actividad de agua del mismo.

La adición de productos químicos bactericidas como el cloro, el formaldehído, el bióxido de azufre, las sales cuaternarias de amonio y los organosulfurados en las fábricas de azúcar está justificada desde hace tiempo, ya que se ha probado que emplearlos es económicamente más eficaz que el no hacerlo (Kooper, 1982).

Hernández *et al.* (1976) realizaron ensayos para evaluar la acción germicida de tres agentes químicos –Formalina, Antiformin y Biocidas– sobre la microflora del jugo de la caña. La investigación realizada por Acosta *et al.* (1998) evaluó tanto a escala industrial como de laboratorio la acción bactericida del Vantocil CS sobre el *Leuconostoc sp* presente en jugos de caña y diluciones puras. Además, se reportó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para cinco bactericidas como Lipesa 108, Tensobact 500, Proquat BC 50, Halamid (Chloramine T) e hipoclorito de calcio. Los tres primeros se usaron al 10%; los dos restantes, al 1% y al 0.75% respectivamente. Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que el bactericida más eficiente fue el Proquat BC 50 al 1%, que para los microorganismos ensayados presentó concentraciones entre 7,8 - 1,9 ppm; le si-

guieron en eficiencia el hipoclorito de calcio, el Tensobact 500 y el Lipesa 108; por último estuvo el Halamid (Mora, 1995).

Los estudios sobre la aplicación de químicos bactericidas como las sales implementadas en esta investigación deben seguir siendo desarrollados, puesto que si bien se probó que algunas sales pueden inhibir el crecimiento de *L. mesenteroides*, es necesario realizar investigaciones suplementarias sobre el costo de emplear estas sales en la industria comparado con los métodos de control aplicados hoy en día.

Los resultados de esta investigación muestran la importancia de la aplicación de estos agentes químicos en la molienda para minimizar las pérdidas de sacarosa; sin embargo, en un futuro próximo se reportarán los resultados de inhibición de *L. mesenteroides* consignados en este trabajo comparados con los resultados de inhibición a partir de antagonistas microbiológicos y sonicación, los cuales forman parte del proyecto.

Conclusiones

Se estableció que las sales CaCl_2 , NaClO , EDTA, NaNO_2 , Na_2SO_3 y $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ son un buen agente de control en las fermentaciones por *L. mesenteroides*, y mostraron su eficiencia en su inhibición.

Bibliografía

- ACOSTA, S. *et al.* (1998). *Evaluación del Vantocil CS como desinfectante en la industria azucarera cubana*. Cuba – Azúcar. Enero-marzo, 31-35 p.
- GIRARD, J, P. (1991). *Tecnología de la carne y los productos cárnicos*. Zaragoza, España: Ed. Acribia S.A.
- HERNÁNDEZ, M.; SHEVCHENKO, A.; QUINTERO, N. (1976). *La acción de los germicidas sobre los microorganismos del jugo de la caña*. *Atac*, 35 (3): 42-57.
- KOOPER, O. (1982). *Pérdidas de sacarosa. Seminario de tecnología moderna de la caña de azúcar. Memorias 2*: 55-68.
- LARRAHONDO, J.; VICTORIA, J.; & BRICEÑO, C. (2003). *Caracterización de variedades de caña de azúcar para producción*

- de azúcar y alcohol*. En: *Tecnicaza (Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar) (eds)*. VI Congreso Colombiano de la Asociación de Técnicos de la Caña de Azúcar. Memorias. Septiembre 24 a 26. Cali, Colombia. Documento de trabajo volumen 2. Procesos Industriales -Administración y Gerencia; p. 42.
- LARRAHONDO, J.; YANG, S.; & VILLEGAS, F. (1989). *Chemical and ripening characteristics of sugarcane in Colombia*. En: *Congress of the International Society of Sugar-cane Technologist (ISSCT)*, 20th, Sao Paulo, Brazil; pp.591-598.
 - MORA, Z. (1995). *Estudio de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar*. Tesis, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Programa Académico de Biología.
 - OCHOA, J. (2003). *Correlación vagón-uñada en la determinación de las impurezas en caña*. En: *Tecnicaza (Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar)*. (Eds). VI Congreso colombiano de la asociación de técnicos de la caña de azúcar. Memorias. Septiembre 24 a 26. Cali, Colombia. Documento de trabajo vol. 2. Procesos Industriales -Administración y Gerencia; p. 260.
 - PIURI, M.; SÁNCHEZ-RIVAS, C.; & RUZAL, S.M. (2003). *Adaptation to high salt in Lactobacillus: role of peptides and proteolytic enzymes*. *Journal of Applied Microbiology*. 95 (2): 372–379.
 - RUSSELL, N. J.; & SANDEROCK, S. P., (1980). *In membrane fluidity biophysical techniques an cellular regulation*; pp. 181-190.