



# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades  
y Facultad de Ingeniería



Optimización de procedimientos de laboratorio y económicos  
en control microbiológico en la industria azucarera.

Trabajo de investigación presentado por los siguientes estudiantes para optar  
al grado académico de Licenciado:

**Diana Paola Balsells García**

(Lda. Bioquímica y Microbiología)

**Bárbara Lizzette de la Peña Avalos**

(Lda. Bioquímica y Microbiología)

**Francisco José Rodríguez Rodas**

(Lic. Ingeniería Industrial)

Guatemala

2009



Optimización de procedimientos de laboratorio y económicos  
en control microbiológico en la industria azucarera.

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades  
y Facultad de Ingeniería

## Optimización de procedimientos de laboratorio y económicos en control microbiológico en la industria azucarera.

Trabajo de investigación presentado por los siguientes estudiantes para optar  
al grado académico de Licenciado:

**Diana Paola Balsells García**

(Lda. Bioquímica y Microbiología)

**Bárbara Lizzette de la Peña Avalos**

(Lda. Bioquímica y Microbiología)


**Francisco José Rodríguez Rodas**

(Lic. Ingeniería Industrial)


Guatemala

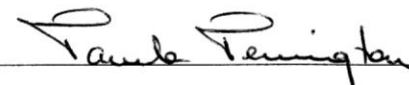
2009

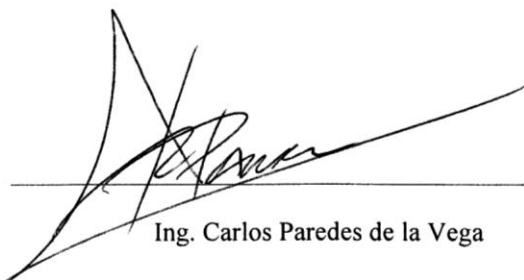
Vo. Bo. :

(f)   
Lic. Osbel Núñez  
Asesor

Tribunal examinador:

(f)   
Lic. Osbel Núñez  
Asesor

(f)   
Dra. Pamela Pennington

(f)   
Ing. Carlos Paredes de la Vega

Fecha de aprobación: Guatemala, 2010

## PREFACIO

En julio de 2007 se comenzó a trabajar un proyecto multidisciplinario para el establecimiento de un sistema de control microbiológico en la Industria Azucarera. De esta primera etapa surgió la necesidad de optimizar parte de los procedimientos y desarrollar un bactericida biológico para uso del proceso.

Este trabajo, comenzado en julio de 2008, se orienta en la porción que corresponde a los procedimientos microbiológicos y de la estandarización de procesos internos y de gestión de personal en el ingenio Pantaléon.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	36
IV. OBJETIVOS	39
V. JUSTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN	41
VI. VIABILIDAD	43
VII. MÉTODO	46
1. Variables de la investigación	46
2. Diseño, población y muestra	46
3. Metodología	47
4. Análisis estadístico	57
VIII. RESULTADOS	59
IX. DISCUSIÓN	80
X. CONCLUSIONES	92
XI. RECOMENDACIONES	96

XII.	LITERATURA CITADA	99
XIII.	OTRAS REFERENCIAS	104
XIV.	ANEXOS	107
XV.	GLOSARIO	198

## LISTA DE CUADROS

Título	Página
Cuadro 1: Distribución de la producción de azúcar 1995/96.	5
Cuadro 2: Ingenios de Guatemala participantes en zafra 2004/05.	6
Cuadro 3: Países a los que más se exportó del 1 de noviembre de 2008 a 5 de mayo de 2009 (en toneladas métricas).	7
Cuadro 4: Precio de la caña de azúcar en diferentes países de América Latina y el Caribe (1997-98).	8
Cuadro 5: Principales datos de exportadores y exportaciones en Latinoamérica y el Caribe.	9
Cuadro 6: Elementos mayores, sus fuentes y funciones en las células bacterianas.	27
Cuadro 7: Composición química del guarapo.	28
Cuadro 8: Composición química de la cachaza.	29
Cuadro 9: Composición química de la meladura y mieles.	30
Cuadro 10: Composición química de los distintos tipos de azúcar.	31
Cuadro 11: Presupuesto de trabajo general del estudio presentado.	45
Cuadro 12: Recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y microbiota total en los molinos y Primario-Alcalización y la temperatura de cada punto.	59
Cuadro 13: Diferencia de recuperación y morfología de colonias de <i>L. mesenteroides</i> en los distintos medios de cultivo sólidos experimentales.	67
Cuadro 14: Comparación en tiempo de análisis, morfología de colonias, disponibilidad de materia prima y costo de los medios MSE, AM150 y AM200S.	70
Cuadro 15: Absorbancia a 260nm de los distintos medios líquidos experimentales con diferentes componentes (para cada medio se utilizó su	

propio control).	71
Cuadro 16: Absorbancia de azúcares reductores por métodos espectrofotométricos (Resorcinol Tiourea y DNS).	73
Cuadro 17: Determinación de actividad enzimática de <i>L. mesenteroides</i> en solución de sacarosa y solución de azúcar morena, con una hora de incubación.	73
Cuadro 18: Características de la bacteria aislada en mayor proporción después de <i>L. mesenteroides</i> , que se presume identificada como <i>B. stearothermophilus</i> .	76
Cuadro 19: Características de la segunda bacteria aislada en mayor proporción después de <i>L. mesenteroides</i> y <i>B. stearothermophilus</i> , que se presume identificada como <i>L. casei</i> .	77
Cuadro 20: Cambio de turbidez por crecimiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en medios líquidos experimentales (6 horas de incubación).	166
Cuadro 21: Cambio de turbidez por crecimiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en medios líquidos experimentales, con concentraciones modificadas (6 horas de incubación).	167
Cuadro 22: Comparación del cambio de turbidez por crecimiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en medios líquidos experimentales con diferente composición (6 horas de incubación).	167

## LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1: Diseño del proceso azucarero dentro de un ingenio.	13
Figura 2: Formación del Levano por el enzima Levan-Sucrasa.	22
Figura 3: Estructura molecular del SMB.	32
Figura 4: Reacción catalizada por dextransucrasa.	34
Figura 5: Cronograma de trabajo general del estudio presentado.	44
Figura 6: Disminución del recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en distintos puntos del tándem.	60
Figura 7: Disminución del recuento de microbiota total en distintos puntos del tándem.	60
Figura 8: Relación lineal entre recuento de <i>L. mesenteroides</i> y temperatura a lo largo de los molinos del tándem.	61
Figura 9: Relación lineal entre recuento de microbiota total y temperatura a lo largo de los molinos del tándem.	61
Figura 10: Comparación de recuentos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y microbiota total a lo largo del tándem.	62
Figura 11: Comportamiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en Primario-Alcalización.	63
Figura 12: Comportamiento de microbiota total en Primario-Alcalización.	63
Figura 13: Comparación de recuentos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y microbiota total en Primario-Alcalización.	64
Figura 14: Comparación de recuentos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y microbiota total en jugo filtrado y jugo alcalizado.	65
Figura 15: Comparación de recuperación de <i>L. mesenteroides</i> en el medio de	

referencia (MSE) y los medios experimentales (AM150 y AM200) a lo largo del tándem.	66
Figura 16: Comparación de recuperación de <i>L. mesenteroides</i> en medio de referencia (MSE) y medios experimentales (AM150 y AM200) en Primario-Alcalización.	66
Figura 17: Comparación de recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a las 12 horas de incubación en medios experimentales.	68
Figura 18: Comparación de recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a las 12, 24 y 72 horas de incubación en medios experimentales.	69
Figura 19: Comparación de recuento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a las 12 y 24 horas de incubación en medios experimentales con (C) y sin (S) Citrato y Azida de Sodio.	70
Figura 20: Curva de crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> en medio líquido MP25.	72
Figura 21: Comparación de la efectividad de dos bactericidas utilizados en el ingenio Pantaleón contra <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aislado de los jugos de caña.	74
Figura 22: Proporción de cada tipo de morfología bacteriana con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem A, en dos tomas de muestra.	74
Figura 23: Proporción de cada tipo de morfología bacteriana con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem B, en una toma de muestra.	75
Figura 24: Proporción de cada tipo de morfología de colonia con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem B, en una toma de muestra.	75
Figura 25: Proporción de cada tipo de morfología de colonia con respecto a	

un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem A, en una toma de muestra.	76
Figura 26: Aumento del $\log_{10}$ UFC de <i>B. stearothermophilus/cm<sup>3</sup></i> de jugo en función del cambio de temperatura de los distintos productos del tándem B.	77
Figura 27: Inhibición del crecimiento por parte del bactericida SMB en distintas concentraciones, de distintas muestras sembradas en agar Mueller Hinton.	78
Figura 28: Inhibición del crecimiento por parte del bactericida $\beta$ -stab en distintas concentraciones, de distintas muestras sembradas en agar Mueller Hinton.	78
Figura 29: Cambio de turbidez en medios líquidos experimentales de C75, C200, MC50, MC100, ME25, ME150, MP75 y MP100.	145
Figura 30: Recuperación de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> inoculado en medios experimentales de C200, MC150, MC250, ME150, ME250, MP200, MP250 y MP300.	146
Figura 31: Resultados de la prueba piloto por medio Plate Count en el tándem B.	147
Figura 32: Resultados de las tinciones de Gram de la prueba piloto en el tándem B.	147
Figura 33: Resultados de los reaislamientos en medio Plate Count de las bacterias elegidas en el tándem B.	148
Figura 34: Resultados de la tinción de Gram para la bacteria identificada como <i>L. casei</i> , aislada del tándem B.	148
Figura 35: Resultados de la tinción de Gram para la bacteria identificada como <i>B. stearothermophilus</i> , aislada del tándem B.	149
Figura 36: Características de las colonias de <i>L. mesenteroides</i> .	164
Figura 37: Características de sobreposición de las colonias de <i>L.</i>	

<i>mesenteroides</i> .	164
Figura 38: Microscopía de <i>L. mesenteroides</i> con tinción Gram (aumento 1000X).	164
Figura 39: Comparación de recuperación en MSE, AM150 y AM200.	165
Figura 40: Producción de dextrana por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	166
Figura 41: Recuperación de <i>L.mesenteroides</i> en medio MP200.	168
Figura 42: Comparación de la recuperación de <i>L. mesenteroides</i> en medio MP200 con inhibidores y sin inhibidores.	168
Figura 43: Prueba de desinfectante $\beta$ -Stab en medio Mueller Hinton.	169
Figura 44: Prueba de desinfectante SMB en medio Muellet Hinton.	169
Figura 45: Cotización de baño de María.	174
Figura 46: Cotización de cámara frigorífica.	175

## RESUMEN

Como parte y continuación del trabajo de Establecimiento de un Sistema de Control Microbiológico en la Industria Azucarera, en éste se muestran los resultados de los estudios microbiológicos comparativos de la microbiota general y microorganismos específicos en los jugos de caña circulantes en el área de molida, así como la estandarización de procesos y la gestión de personal para la implementación del sistema.

En particular, se obtuvo la proporción en que *Leuconostoc mesenteroides* y otras dos bacterias seleccionadas como las de mayor presencia se encuentran entre los jugos circulantes y en el caso de *L. mesenteroides* se hace el primer intento de evaluar su agresividad mediante efectividad enzimática de dextransucarasa. Tanto para la microbiota total, como para cada una de las cepas aisladas como más abundantes, se estudió con métodos microbiológicos clásicos la acción de los bactericidas a diferentes concentraciones y especialmente las usadas en el ingenio de referencia, concluyéndose que en general, la forma actual no parece ser la más indicada. El método utilizado puede ser útil a la industria para diseñar sus procedimientos de aplicación de bactericidas.

Considerando que uno de los objetivos finales del trabajo es el desarrollo de un bactericida biológico, se estudiaron diversos medios de cultivos costo-efectivos a partir de los productos azucareros para el monitoreo y el cultivo de cepas puras de *L. mesenteroides*, concluyéndose que los que usan la miel primaria como principal componente, son los mejores, entre otros superiores a los reportados.

Como parte del proceso de establecimiento del sistema propuesto, se estudian las diferentes variables para optimizar los procedimientos operativos y de gestión de personal.

## I. INTRODUCCIÓN

La industria azucarera es una de los principales rubros de la economía de Guatemala por lo que debe mejorar continuamente su eficiencia. El efecto de la actividad microbiológica es un factor que afecta con gran impacto negativo a la industria azucarera, ya que los productos que se manejan, en especial los jugos de caña y el propio tallo de ésta, tienen condiciones ideales para la instalación, crecimiento y desarrollo de una variada microbiota. Aunque también son de importancia en la fase de producto final donde constituyen un problema de calidad, aquí se prioriza la fase inicial del proceso industrial que es donde los microorganismos degradan sacarosa perdiéndose cantidad considerable del producto a obtener y que ellos consumen como parte de su nutrición; pero de igual manera es muy negativo para la industria, la cantidad de sustancias que ellos vierten al medio, algunas muy perjudiciales, como parte de su metabolismo. Estas sustancias se mantienen en los productos cuando prácticamente toda la microbiota es eliminada en las fases calientes del proceso, comenzando por la clarificación.

Las sustancias indeseables vertidas pertenecen fundamentalmente al grupo de los ácidos orgánicos y las gomas (oligo y polisacáridos). Numerosos microorganismos han sido reportadas como productores especiales de estas sustancias, aunque hay una coincidencia casi total en considerar a la especie *Leuconostoc mesenteroides* productora de dextrana a partir de la sacarosa, como la más perjudicial. En experimentos preliminares con jugos de caña de la industria guatemalteca se encontró la presencia predominante de dicha especie en ellos.

En general, además de los procedimientos de limpieza y desinfección con vapor, es usual que la industria azucarera utilice desinfectantes químicos para intentar frenar la actividad microbiana y sus efectos.

Los datos más importantes de la investigación antecedente y sobre el trabajo que se ha realizado en los pasados 18 meses sobre el proceso de producción del azúcar y la actividad microbiológica en él. En él se encuentran las importancias más grandes del

proceso general del ingenio Pantaleón y se presentan los resultados obtenidos acerca de la actividad y presencia de los microorganismos más importantes dentro del proceso azucarero. En este trabajo se hace mención a investigaciones anteriores hechas con bacterias importantes dentro del proceso azucarero de otro ingenio importante en Guatemala, pero éste trabajo únicamente muestra datos sobre los microorganismos y su actividad en los distintos puntos del proceso del ingenio Pantaleón. Aquí se muestran datos sobre el crecimiento de la bacteria más importante en el proceso azucarero el *Leuconostoc mesenteroides*, y dos bacterias que las pruebas han indicado que se pueden identificar como las siguientes más abundantes y son identificadas por las pruebas como *Lactobacillus casei* y *Bacillus stearothermophilus*. Estas bacterias fueron las más abundantes en crecimiento luego de *L. mesenteroides* y se les dio importancia desde comienzos del estudio para lograr su investigación e identificación.

La propuesta incluye comparar los resultados obtenidos en la etapa anterior, en otro ingenio, con la caracterización del que constituye el universo de estudio en el presente: ingenio Pantaleón. Especialmente se evaluarán diferentes medios de cultivo para el aislamiento, identificación y desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides*, se optimizará la evaluación de desinfectantes químicos y se desarrollarán procedimientos para la evaluación de la agresividad de cepas aisladas, además de la identificación de dos bacterias de importancia en el proceso y la evaluación económica que estos estudios implican.

Con este trabajo se muestra información clave sobre la microbiota total y tres de las bacterias más abundantes en el proceso azucarero del ingenio Pantaleón, Guatemala. Con pruebas microbiológicas y bioquímicas se analizó el comportamiento de crecimiento de la microbiota total y de las bacterias por separado para conocer más acerca de las interacciones microecológicas entre ellas. Se espera que se aproveche la información de este trabajo para un control más efectivo de la microbiota de los tándem y de las bacterias por separado, lo cual permitirá rendimientos más altos y una producción más eficiente dentro de los procesos clave del ingenio. Con este estudio se sientan las bases para

estudios posteriores acerca de las bacterias más abundantes y su interacción dentro de una microbiota compleja de los procesos azucareros en Guatemala.

A raíz de de estas implementaciones se han hecho reajustes en los procesos, en el establecimiento y manejo de personal dentro de las empresas para que su funcionamiento sea el más eficiente.

En la evaluación económica, se trabajó en el estudio de costo-beneficio relacionando las pérdidas estimadas a causa de la actividad microbiológica y el beneficio económico acoplado a la implantación del sistema propuesto, así como un análisis de los beneficios para un ente exterior que preste el servicio al ingenio tomando como referencia el “Análisis de sostenibilidad” elaborado para la Industria Azucarera en Guatemala por Pérez y Pratt.

Es gracias a los avances vistos en las fases anteriores que se proponen la continuación y desarrollo del proyecto con nuevos objetivos a cumplir y procesos a desarrollar siguiendo en la misma línea del mejoramiento del estudio y optimización del análisis con el fin de aumentar la productividad del ingenio reduciendo las pérdidas en azúcares.

Para este trabajo se ha buscado llevar estos ajustes, tanto en procesos como en personal, al máximo nivel de ordenamiento. El proyecto se ha venido realizando desde hace ya tres años y esto ha dado lugar a observar los diferentes cambios que sufre la industria azucarera durante la optimización de sus procesos, pero no es sino hasta la etapa en curso, del período 2008-2009 que se han podido establecer los estándares necesarios para el ordenamiento de procesos y de personal.

## II. ANTECEDENTES

### A. La industria azucarera

El azúcar se conoce desde hace más de 5,000 años, pero no fue sino hasta la Edad media que llegó a España, por lo que su expansión está ligada con la conquista. Hablar de azúcar significa hablar de remolacha azucarera y de la caña de azúcar. En el caso de la remolacha azucarera se conoce que inició su cosecha en la época de Napoleón. La ruta de la caña de azúcar es conocida por ser de Oriente a Occidente, desde el océano Índico hasta el Mediterráneo y finalmente el Atlántico (Azcoytia 2006).

En el siglo VII se marcó en la historia la difusión del consumo de azúcar. Los árabes fueron quienes iniciaron con el cultivo de la caña de azúcar y los egipcios fueron quienes perfeccionaron su proceso y refinación. Con el descubrimiento de América por los españoles, el azúcar llega a Santo Domingo donde se inicia su cultivo, seguido de Cuba y México. A finales del siglo XVII la producción y el consumo de azúcar estaban expandidos a nivel mundial (Azcoytia 2006).

De acuerdo a datos de la FAO, la producción mundial de azúcar en 2007/08 alcanzó los 168 millones de toneladas métricas (FAO 2008). Según pronósticos de Perspectiva Alimentaria FAO, en 2008/09 la producción mundial de azúcar disminuirá respecto a 2007/08. Sin embargo, se prevé que el consumo mundial aumente considerablemente, por lo que se considera que el consumo superará la producción para este ciclo de la industria azucarera (FAO 2008).

En América Latina y el Caribe el principal país productor es Brasil; su producción de 1998 fue de 15.5 millones de toneladas, seguido por México con 5.2 millones y en tercer lugar, Cuba con 3.2 millones. Todavía para el año 1996 Guatemala estaba en tercer lugar, antecedido por Brasil y Cuba, pero se en este momento las estadísticas presentan que se encuentra en un séptimo lugar de producción de azúcar (García 2000). Es importante mencionar también que la producción azucarera cubana después de la

desintegración de la Unión Soviética, en la década de 1990 se vio reducida debido al rompimiento de los acuerdos preferenciales que Cuba tenía con los países socialistas para entregar azúcar a cambio de combustible y otros productos. Guatemala podría aprovechar este hecho ya que la producción azucarera cubana en la década de los 90 no ha podido alzarse de nuevo ya que no cuenta con suficientes insumos para la producción, además de factores climáticos adversos que han ocurrido desde la recaída. Ésta fue una de las ventajas que tuvo México para colocarse en el segundo lugar de producción ya que también tuvo una aguda crisis que se dio inmediatamente después de la reprivatización, pero han logrado levantar la producción e incluso han superado las expectativas de producción planteadas para la industria azucarera del país, y lograron así superar en tan solo cuatro años (1995-98) la producción cubana (García 2000). Guatemala cuenta con una industria azucarera histórica y bien industrializada lo que le otorga competitividad a nivel latinoamericano, por lo que es importante evaluar los aspectos que puedan hacer el eleve sus niveles de producción y se disminuyan los factores que de alguna manera afectan la eficiencia del proceso (García 2000).

Guatemala cuenta con, por lo menos, 13 tipos distintos de suelos, de los cuales 26% son para producción agrícola intensiva, incluyendo la producción de caña de azúcar; los mejores suelos son usados para la producción de monocultivos de agroexportación. La producción de caña de azúcar es intensiva en varios aspectos, el más importante de ellos es la utilización de agua, ya sea a través del riego por aspersión, por canales o por inundación. En Guatemala, el cultivo de caña ha venido desplazando otros cultivos y concentrando la producción en manos de los grandes ingenios (Pérez y Pratt 1997).

Cuadro 1: Distribución de la producción de azúcar 1995/96.

<b>Destino</b>	<b>Quintales</b>	<b>Porcentaje</b>
Azúcar de consumo interno	9 071 998	31,83%
Azúcar para exportación al mercado E.U.	1 434 357	5,03%
Azúcar para el mercado mundial	17 993	63,14%
	644	
Producción 1995-1996	28 499	100,00%
	999	

(Pérez y Pratt 1997)

En Guatemala, para la zafra 2004/05 operaron 15 ingenios, ubicados en 5 departamentos de la costa del Pacífico. Estos ingenios sembraron aproximadamente 200 mil hectáreas generando con ello un aproximado de 45 millones de quintales de azúcar (ASAZGUA 2006).

Cuadro 2: Ingenios de Guatemala participantes en zafra 2004/05.

<b>Listado de ingenios</b>	
Ingenio Concepción	Ingenio La Sonrisa
Ingenio Pantaleón	Ingenio La Unión
Ingenio Palo Gordo	Ingenio Santa Ana
Ingenio los Tarros	Ingenio Guadalupe
Ingenio Madre Tierra	Ingenio Magdalena
Ingenio San Diego	Ingenio El Pilar
Ingenio Santa Teresa	Ingenio Trinidad

(ASAZGUA 2006)

De acuerdo a una noticia publicada en Prensa Libre el 12 de mayo de 2009, el sector azucarero guatemalteco produjo 47.8 millones de quintales de azúcar, aumentando en 3.6% con respecto a 2008, según datos de la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA 2006). Para la zafra 2008/09 se cosechó 220 mil hectáreas y se molió 435.8 millones de quintales de caña (Díaz 2009).

En la zafra que terminó el 3 de mayo de 2009 se produjo 18.98 millones de quintales de azúcar crudo y 26.22 millones de quintales de azúcar refinada. Durante dicha zafra, los ingenios exportaron 689 mil toneladas métricas, siendo Corea el país que ocupa el primer puesto en importación de azúcar guatemalteca (Díaz 2009).

El azúcar que llega a Expogranel es analizada 12 veces antes de autorizar su exportación. Expogranel, la terminal de exportación de azúcar, se encuentra entre las tres más eficientes a nivel mundial, siendo comparada con terminales especializadas de Brasil y Australia (Díaz 2009a).

Cuadro 3: Países a los que más se exportó del 1 de noviembre de 2008 a 5 de mayo de 2009 (en toneladas métricas).

País	A granel (cruda)	Refinada	Total	%
1.Corea	153,822	--	153,822	22.32
2.Chile	--	138,496	138,496	20.10
3.Indonesia	85,730	--	85,730	12.44
4.Estados Unidos	48,610	26,671	75,281	10.92
5.Canadá	49,000	1,799	50,799	7.37
6.China	50,000	--	50,000	7.26
7.Malasia	42,370	--	42,370	6.15
8.Jamaica	14,817	12,560	27,377	3.97
9.Taiwán	22,675	3,325	26,000	3.77
10.Haití	4,408	2,000	6,408	0.93
<b>TOTAL</b>	<b>477,874</b>	<b>211,235</b>	<b>689,109</b>	<b>100</b>

(Díaz 2009)

La agroindustria azucarera representa aproximadamente el 24% del valor total de la producción agrícola guatemalteca y el 14% de las exportaciones totales del país. Además, de acuerdo a datos del 2005, representa alrededor del 3% del PIB, generando empleo a más de 300,000 personas. De acuerdo a datos recolectado por ASAZGUA en 2005 Guatemala se encuentra en el 5to exportador de azúcar a nivel mundial y 2do a nivel latinoamericano (ASAZGUA 2006).

Las estadísticas han mostrado que la industria azucarera de Guatemala continúa creciendo y mejorando su producción, su rendimiento, capacidad, exportaciones y tecnología. De acuerdo con la ASAZGUA, la industria azucarera espera incrementar su capacidad de producción un 505% para el año 2010. En Guatemala la caña de azúcar es el cultivo más rentable entre los cultivos tradicionales, entre los cuales se acompaña del café, el banano y la palma. El problema se ha presentado por los precios bajos del azúcar de los últimos años que ha cambiado esta relación, debido a que esta industria depende en gran medida de las exportaciones al mercado internacional. En el Cuadro 3, se observa la

diferencia de precio entre el azúcar que vende el país y el precio al que se vende el azúcar de otros países competidores de América Latina y el Caribe al final de la década de 1990. A finales de la década de 1990 la producción de azúcar de caña contribuyó con el 20 por ciento del total de la producción agrícola del país y se estima que el área plantada al iniciar la década de 2000 era de 190 000 hectáreas, esto es 15 por ciento mayor que los años agrícolas anteriores. De acuerdo con CENGICAÑA, el potencial para plantar caña puede ser de 350 mil hectáreas.

Cuadro 4: Precio de la caña de azúcar en diferentes países de América Latina y el Caribe (1997-98).

<b>País</b>	<b>Precio US\$/T</b>
México	23.22
Costa Rica	15.00
El Salvador	16.48
Guatemala	13.75
Honduras	14.50
Nicaragua	15.00
Panamá	16.50
Brasil	12.50

(García 2000)

Según ASAZGUA, siete de los ingenios, mencionados en el Cuadro 2, generaron aproximadamente 9% de la energía eléctrica del país, ingenio Pantaleón es uno de ellos (ASAZGUA 2006). El ingenio Pantaleón es una organización agroindustrial dedicada al procesamiento de caña de azúcar para la producción de azúcar, mieles, alcoholes y energía eléctrica. Tuvo sus inicios el 20 de agosto de 1849, cuando don Manuel María Herrera adquirió la finca Pantaleón. Empezó como una hacienda ganadera y finalmente se convirtió en un ingenio azucarero. El ingenio Pantaleón alcanzó el liderazgo de la industria de Guatemala en 1976, siendo el ingenio de mayor volumen de producción en Centro América (Pantaleón 2009).

El grupo Pantaleón es el principal productor en la región centroamericana y se encuentra dentro de los diez productores más importantes de Latinoamérica. Como se expresa dentro de la visión de la empresa en su página de Internet, los ingenios han sido auditados por diversos clientes que buscan productos que se adhieran a los más altos estándares de calidad, lo cual ha permitido a la organización acreditarse como proveedor Premium Mundial, lo cual les permite un nivel alto en el mercado global. La organización Pantaleón adquirió en 1984 la administración y la dirección de las operaciones del ingenio Concepción, aumentando su volumen de producción y elevando los niveles totales de producción de Guatemala. Luego del año 1998, en el que por estrategia de crecimiento y diversificación geográfica, la organización también obtiene la administración del ingenio Monte Rosa, localizado en la zona occidental de la República de Nicaragua, con esto la organización integra a finales del año 2000, los tres ingenios y deciden participar como subsidiarias de la organización conocida como “Pantaleón”. Actualmente los ingenios trabajan juntos en producción y tecnología para elevar los niveles de producción del país y ubicarlo en los niveles más altos de competencia latinoamericana y mundial.

Cuadro 5: Principales datos de exportadores y exportaciones en Latinoamérica y el Caribe.

<b>País</b>	<b>Exportaciones de azúcar al mercado mundial</b>	<b>Porcentaje del coeficiente de dependencia de la exportación/producción</b>	<b>Costo de producción azúcar crudo centavos US\$/lb</b>
Brasil	4 514 256	35	8.85
Cuba	3 824 997	82	13.60
Guatemala	841 195	66	9.98
Colombia	745 442	37	9.07
México	292 476	7	14.23
República Dominicana	331 030	54	Dd.12.50
Costa Rica	130 136	40	Dd. 17.25

(García 2000)

Según ASAZGUA (2006), la agroindustria azucarera es una organización que se ha convertido en una de las principales fuentes de divisas y generadora de empleos en la economía guatemalteca. Los trece ingenios y cuatro organizaciones (ASAZGUA, CENGICAÑA, FUNDAZÚCAR y EXPOGRANEL) que la integran, contribuyen decisivamente al desarrollo de algunos municipios del país y de más de un millón de personas, con lo que se constituye en un factor determinante para el progreso de Guatemala. La Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA) fue aprobada el 17 de septiembre de 1957 en la ciudad de Guatemala. El desarrollo de la agroindustria azucarera guatemalteca, ha tenido como base fundamental la unidad de sus integrantes, para desarrollar políticas, programas y proyectos en forma conjunta. En Guatemala, la producción azucarera siempre ha tenido carácter privado y no ha contado con apoyos externos, ni del Estado, contrario a lo que ha sucedido en la mayoría de los países productores de azúcar. Como otros objetivos de las organizaciones azucareras está el desarrollo tecnológico en los ingenios y en el país. Siete de estos ingenios generaron, durante el año 2006, aproximadamente 586.9 MW de energía eléctrica, lo que representa un aporte del 9.00 % de la generación nacional (ASAZAGUA 2006) Estas organizaciones están constantemente a la búsqueda de cualquier tipo de investigación o beneficio tecnológico que brinde a la Industria Azucarera Guatemalteca y al país un nivel más alto de competitividad y producción en una escala global.

#### B. Proceso industrial de la fabricación del azúcar crudo a partir de caña de azúcar

La siembra de la caña de azúcar comienza desde la selección de una buena semilla, la selección se da en un semillero, bien cultivado y que se confirme que esté libre de plagas y enfermedades. Cuando la planta llega a los 7- 9 meses de edad, se cortan los tallos de caña de azúcar en trozos de unos 45 cm, con 3-5 yemas, que son las que van a dar origen a las nuevas plantas. Es importante que la calidad de la semilla garantice un alto porcentaje de germinación de las yemas para tener un buen comienzo para la plantación (Flores 1976).

El proceso de la industria azucarera requiere de la preparación del suelo y la siembra de la caña de azúcar, requiriendo mano de obra calificada y supervisión durante el crecimiento del cultivo (Zucarmex 2003).

La semilla se coloca en el fondo de un surco de siembra y es cubierta con tierra para proceder a dar el primer riego. La planta puede comenzar a cortarse más o menos a los 70 días de crecimiento, en este momento se coloca la planta en una elevación para que se pueda fertilizar con nitrógeno hasta el momento de cosechar la planta, que es un proceso que dura hasta 12 meses luego del momento de la plantación de la semilla (Flores 1976). Una vez sembrada la caña de azúcar tarda aproximadamente 7 meses en alcanzar su madurez y poder someterla a un proceso conocido como zafra. Para ello se lleva a cabo previamente la quema de las áreas sembradas, listas para la cosecha, para facilitar el proceso de corte de la caña. El corte de la caña puede realizarse a mano o bien por métodos mecanizados. Una vez cortada la caña se pasa al proceso de alce y transporte al ingenio (Pérez y Pratt 1997). Durante todo el proceso de siembra y corte es necesario mantener un control de malezas para evitar que desnitrifiquen el suelo o priven de nutrientes a la caña. Durante la preparación de la caña antes del corte se puede usar también productos naturales o químicos que ayuden a incrementar el contenido de sacarosa en la caña y pueden agregarse unas semanas antes de la fecha de corte (Flores 1976).

Al ingresar al ingenio, los camiones transportadores de caña son pesados y se toma una muestra de la caña para que sea analizada en el Laboratorio de caña del ingenio. La caña pasa por un proceso de lavado intensivo con agua caliente para eliminar tierra y otros contaminantes adicionales que resten pureza o disminuyan el rendimiento de azúcar (Pérez y Pratt 1997).

Una vez lavada la caña pasa a una banda conductora que alimenta a las picadoras. Las picadoras con ejes provistos de cuchillas giratorias cortan la caña dándole un tamaño uniforme para facilitar la extracción de los jugos en los molinos (Zucarmex 2003).

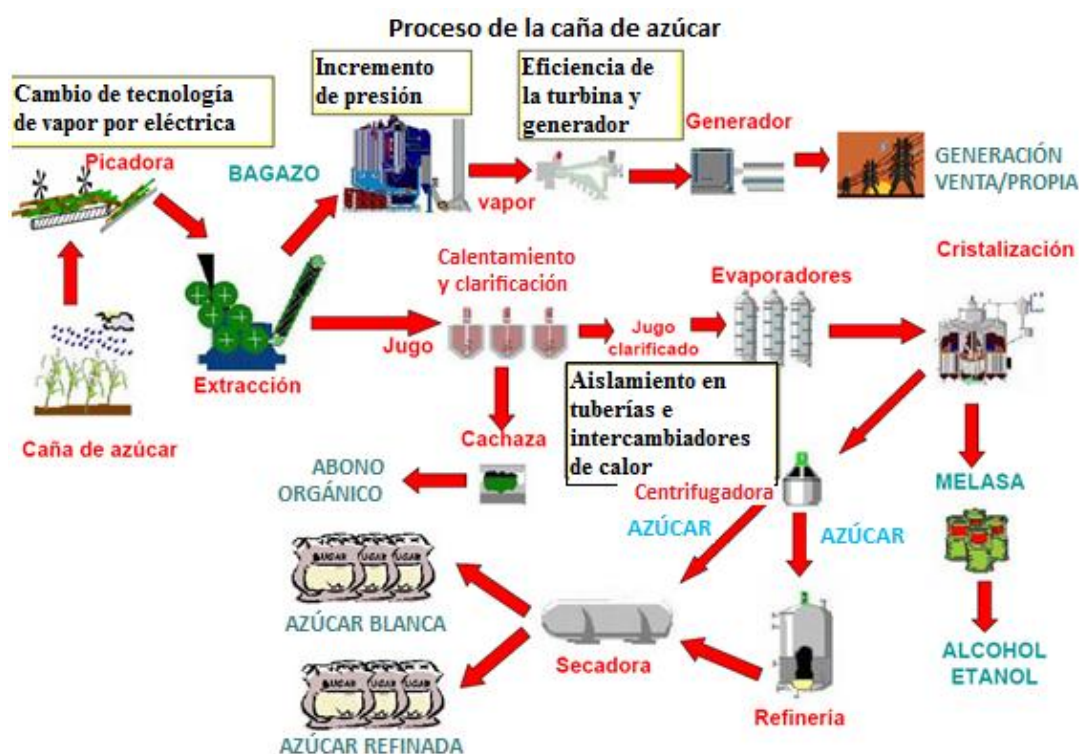
La caña preparada llega al tándem, el cual consiste de 6 molinos. En el caso del ingenio Pantaleón, hay dos líneas de producción, es decir, se cuenta con dos tándem, llamados A y B. Los molinos consisten en mazos metálicos rotatorios, que por medio de presión extraen el jugo de la caña de azúcar, también conocido como guarapo. En el recorrido del tándem se agrega agua caliente en algunos molinos para extraer el máximo de sacarosa posible de la caña, proceso conocido como lixiviación. La combinación de los jugos de los diferentes molinos es conocido como jugo diluido, debido a la adición de agua. Como producto secundario del proceso de molinos se obtiene el bagazo, el cual es utilizado como fuente de energía para las calderas (Pérez y Pratt 1997, Zucarmex 2003).

El jugo diluido pasa por un proceso de sulfitación por eyectores seguido del proceso de alcalización y clarificación. El jugo diluido tiene un pH ácido (aproximado pH 5,2), debido a los ácidos orgánicos débiles y posiblemente a la actividad de microorganismos que se encuentran en la caña de azúcar. Por lo anterior, es necesario un proceso de alcalización en el cual se agrega cal, con el objetivo de elevar el pH del jugo y minimizar las posibles pérdidas de sacarosa por hidrólisis. Este proceso a la vez ayuda a eliminar impurezas que quedaron en el jugo. El jugo alcalizado se transporta a los calentadores en los cuales se eleva la temperatura hasta un nivel cercano al punto de ebullición para luego pasar al proceso de clarificación. Esta fase es un proceso de sedimentación, los sólidos precipitan formando un producto secundario llamado cachaza y el jugo “claro” queda en la parte superior del tanque y es extraído. Los sólidos decantados pasar por filtros rotatorios y al vacío, que permiten el paso del jugo pero retienen la cachaza. El jugo obtenido luego del procedimiento descrito se conoce como jugo filtrado (Asociación Azucarera de El Salvador 2009, Zucarmex 2003).

El jugo claro extraído pasa a los evaporadores al cual se le extrae entre 70-75% del contenido de agua para obtener la meladura o jarabe. Este jarabe pasa a un proceso de cristalización, que se lleva a cabo en tachos al vacío. El material resultante de la clarificación contiene miel (producto líquido) y azúcar (cristales), y al conjunto se le conoce como masa cocida (Asociación Azucarera de El Salvador 2009, Zucarmex 2003).

Los cristales de azúcar se separan de la miel mediante centrifugación. Las centrífugas son cilindros con mallas muy finas que giran a gran velocidad, permitiendo que el líquido pase a través de la malla y los cristales se queden en el cilindro. Una vez eliminada la miel, los cristales se lavan con agua caliente para pasar al proceso de refinación. Luego de 3 cristalizaciones sucesivas se obtiene la miel final, utilizada generalmente para la industria de producción de etanol (Asociación Azucarera de El Salvador 2009, Zucarmex 2003).

Figura 1: Diseño del proceso azucarero dentro de un ingenio.



(ACI 2007)

### C. Microorganismos en la Industria Azucarera

La microbiota de la caña de azúcar sin cortar es variable, estando influenciada principalmente por la temperatura, la humedad y la estación del año. Los microorganismos pueden ser adventicios, epífitos y parásitos, pudiendo desarrollarse en la superficie o en las uniones de las hojas con el tallo, invadir erosiones de la epidermis, o

invadir los tejidos sanos y originar enfermedades. Las hojas y los troncos de la planta contienen bacterias (Mayeux *et. al.* 1962) y levaduras y mohos (103-104/g). Las poblaciones bacterianas de las hojas de caña infectadas por bacterias, hongos y virus es mayor que las de caña sana. Las especies bacterianas que con mayor frecuencia se encuentran en las hojas y tallos normales son *Flavobacterium*, *LactoBacillus*, *Xanthomonas*, *Enterobacter* (probablemente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Corynebacterium*. Algunas de estas especies son potencialmente patógenas para las plantas. También están presentes las levaduras y los mohos (Daeschel *et. al.* 1981).

Son varios los intereses en la investigación de la microbiota y las interacciones ecológicas que ocurren en un sustrato tan rico para la vida como la caña de azúcar. La microbiota de la caña de azúcar es muy amplia y a pesar que de los intentos por disminuirla en varios puntos del proceso, los microorganismos presentes al inicio del proceso o en algunos puntos después pueden llegar a afectar el rendimiento y pureza del azúcar que se produce en el ingenio. Uno de los mayores retos a los que las personas tienen que hacer frente hoy día es proteger al medio ambiente y a las relaciones ecológicas en él, satisfaciendo al mismo tiempo las necesidades básicas de alimentación de la población. Las bacterias en la caña de azúcar tienen un ambiente propenso para crecer y son de beneficio cuando ayudan a la planta en el proceso de fijación de nitrógeno y en la absorción de nutrientes que la ayudan a crecer. El problema está cuando la actividad de estos microorganismos no se reduce y persiste luego de la quema y corte y pueda llegar a afectar el proceso azucarera, causando pérdidas de azúcar y pérdidas monetarias para el país.

La industria de la caña de azúcar procesa el jugo de caña, material de cualidades idóneas para el desarrollo de la actividad microbiana. En su composición se encuentran sustancias que pueden ser utilizadas por los microorganismos como nutrientes, fundamentalmente azúcares y compuestos nitrogenados, a los que se unen vitaminas y otras sustancias indispensables para la actividad de los seres vivos. Cuando la caña llega al central, viene con una microbiota variada, cuyo origen se ha discutido durante años

(Mayeux *et. al.* 1962, Hernández y Sainz 1987). Se plantea que hay una microbiota epifita que vive sobre el tallo de la planta y es propia de ella. El calentamiento de los jugos, durante la alcalinización y su evaporización posterior y concentración, minimizan las acciones microbianas y por lo tanto, las concentraciones microbianas iniciales en las etapas intermedias del proceso de producción de azúcar. Sin embargo, los primeros estudios para determinar las poblaciones de los microorganismos que se mantienen en el bagazo de caña después de este proceso, fueron realizados por la Dra. Carone en los años sesenta, utilizó para esto las pilas destinadas a la obtención de papel. En estos trabajos, se identificaron varias especies de hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium citrinum*), también se aislaron bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y algunas Nocardias. Las inoculaciones de hongos con potencialidades celulolíticas en estos sustratos lignocelulósicos en los que hay una microbiota específica, podrían tener éxito, siempre que la dirección y proporción de su crecimiento y excreción de enzimas inducidas tengan accesibilidad a los nutrientes, sin una competencia fuerte de otros microorganismos de más rápido crecimiento (Valiño *et. al.* 2003). El objetivo de este estudio fue determinar la carga microbiana en el bagazo de caña de azúcar para mejorarlo y utilizarlo como sustrato en la alimentación animal, a través de fermentaciones en estado sólido (Valiño *et. al.* 2003). En esta sección del trabajo se hará énfasis en los intereses primarios del estudio de los microorganismos en el proceso azucarero, los cuales incluyen: Presencia, actividad y perjuicios de los microorganismos en la agroindustria azucarera, bacterias presentes en la caña de azúcar, jugos y producto final. La microflora de la caña de azúcar sin cortar es variable, y se ve afectada por condiciones climáticas como la temperatura y la humedad. Estos microorganismos se encuentran en distintas proporciones según la parte de la planta. Las hojas de caña sana, tienen un contenido de bacterias que varía entre  $10^4$ - $10^8$  UFC/g, y un contenido de mohos y levaduras de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g. (Hernández y Sainz 1987).

La actividad de los microorganismos perdura desde el corte de la caña hasta la clarificación de los jugos, donde al elevar la temperatura se matan bacterias (células vegetativas) y levaduras. Las esporas de ciertas especies de bacterias (particularmente termófilas) persisten hasta el producto final (Frazier y Weshoff. 1978). Mientras más

puro es el producto, es decir mientras más elevada es la concentración de sacarosa, el medio se vuelve pobre para los microorganismos, por lo que mientras mayor sea su concentración, menor variedad de microorganismos pueden crecer en él (Frazier y Weshoff 1978), como sucede en las etapas intermedias donde se procesa la meladura y las mieles.

La biota del azúcar crudo puede estar integrada por hongos, especies del género *Penicillium*, levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula* y *Monilia*, bacterias como *Bacillus leviformis*, *B. mesentericus*, *B. vulgatus*, *Clostridium* y *Staphilococcus* y en general favorece el deterioro del azúcar (Hernández y Sainz 1987).

Se han estudiado los vectores de contaminación del *L. mesenteroides*, ya que es el principal agente causal de la alteración de la caña de azúcar una vez recolectada. Las avispas que se alimentan con el exudado azucarado de la caña después de quemada pueden contener de 102 a 103 células por insecto. Los machetes utilizados para cortar la caña pueden estar libres de *L. mesenteroides* en tiempo seco, pero en el húmedo contienen de 103 a 104 células por machete (Mayeux *et. al.* 1962). En las picadoras, tanto las cuchillas como la caña picada y remojada en el jugo exprimido contienen siempre *L. mesenteroides*. Los errores y defectos en el ajuste de las cuchillas en las picadoras producen trozos agrietados y magullados por los extremos y fracturas a lo largo del eje longitudinal. Estas circunstancias facilitan la entrada de *Leuconostoc* y otros agentes, o bacterias formadoras de ácido, que aceleran la alteración. Dentro de los 10 minutos siguientes al picado, el *L. mesenteroides* puede avanzar 7,5 cm hacia el interior de la caña, posiblemente mediante transporte pasivo a través de los haces vasculares, y desde allí parar al parénquima (tejido de almacenamiento) en donde se multiplica (Daeschel *et. al.* 1981).

Cuando el *Leuconostoc* y otras bacterias formadoras de ácido se desarrollan en la caña de azúcar recolectada, ésta se vuelve ácida y se producen azúcares reductores (glucosa y fructosa fundamentalmente), ácidos láctico y acético y, con frecuencia, dextrano. Con este crecimiento microbiano puede producirse un olor "agrio". En climas

húmedos y calurosos, puede perderse cada día, entre la zafra y el triturado, 1-5 % del azúcar total (Mayeux *et. al.* 1962), mientras que en climas secos y fríos las pérdidas normalmente son menores del 0,5 %. De ahí que a menos que el tiempo transcurrido entre ambas operaciones sea mínimo, las pérdidas de sacarosa pueden ser importantes (Crutz *et. al.* 1989).

1. *Leuconostoc mesenteroides*. Las bacterias lácticas son Gram positivas, ácido tolerantes, desde pH 4.8 hasta 9.6, lo cual les permite sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían el aumento en la producción de ácidos orgánicos. Las bacterias del ácido láctico (LAB, por sus siglas en inglés) son organismos que no forman esporas, son inmóviles, pueden ser considerados como cocos o bacilos, con la característica génica de tener un bajo contenido de guanina y citocina (Salminen 2004).

Estos organismos son heterotróficos y generalmente tienen requerimientos nutricionales complejos debido a que no tienen muchas capacidades biosintéticas. La mayoría de las especies tienen múltiples requerimientos para aminoácidos y vitaminas. Por ello, las bacterias del ácido láctico son generalmente abundantes en medios en donde estos requerimientos son proveídos. Estas son bacterias que generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos (Salminen 2004).

Las bacterias del ácido láctico se emplean en la industria alimenticia por varias razones. Su crecimiento disminuye el contenido de carbohidratos de los alimentos por lo que se fermentan y también disminuyen su pH debido a la producción de ácido láctico. Debido a que el pH puede disminuir hasta un pH menor a 4, se observa la inhibición de muchos otros microorganismos incluyendo los patógenos más comunes, por lo cual se prolonga la vida de anaquel de los alimentos. (Dugas 2006) Más aún, algunas LAB son productoras de bacterocinas tóxicas, proveyendo un obstáculo adicional para los microorganismos patogénicos. De hecho, el ácido láctico y otros productos metabólicos de las LAB contribuyen a las propiedades organolépticas y el perfil de textura de un alimento específico (Nes *et. al.* 1996).

La importancia industrial de las LAB se evidencia también porque, por lo general son consideradas no peligrosas, debido a que están en variados alimentos y por su contribución como flora saprófita de las superficies mucosas humanas. Los géneros principales que comprenden las LAB son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus* así como los Lactobacillares *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella* (Walter *et. al.* 2001).

Cuatro especies de bacterias ácido lácticas han sido identificadas como las especies principales implicadas en la fermentación industrial de alimentos: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, y *Lactobacillus plantarum*. Muchos investigadores están interesados en la ecología microbiana de este tipo de procesos industriales, ya que la industria alimentaria, así como la industria azucarera tienen un gran interés en métodos que reduzcan la utilización de cloro y la producción de desechos clorados. Procedimientos alternos como usar fermentación con concentraciones bajas de sal han sido desarrollados, pero este tipo de métodos requieren de colonias de bacterias desarrolladas con métodos especiales y cultivadas bajo condiciones estrictas para que la fermentación sea de la misma calidad que con altas concentraciones salinas. Bacteriófagos activos en contra de las cuatro especies de LAB mencionadas anteriormente han sido aisladas y caracterizadas, incluyendo fagos que actúan en contra de bacterias como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Fagos que son eficientes en el ataque de *Leuconostoc* no han sido muy estudiados, pero hasta el momento se sabe que pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Fagos activos contra *Oenococcus oeni* (anteriormente clasificados como *Leuconostocoenos*) aislados de fermentaciones de vino también han sido clasificados dentro de esta familia (Barrangou *et.al.* 2002).

El género *Leuconostoc* es un grupo relacionado con las bacterias Gram positivo, no esporuladas de la familia Leuconostocaceae. Las especies de *Leuconostoc* tienen generalmente forma de cocoide ovoide y a menudo forman cadenas. Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina y catalasa-negativos, lo cual ayuda a distinguirlos de *Staphylococcus*. Dentro de sus especies principales se encuentran: *L. carnosum*, *L.*

*citreum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. garlicum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. pseudoficulneum* y *L. pseudomesenteroides* (Dicks *et. al.* 1990).

Como las bacterias del ácido láctico, *Leuconostoc* necesita de un medio complejo debido a la múltiple demanda para aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas y iones metálicos. Representan un 12% de las bacterias del ácido láctico aislados de varios ecosistemas, principalmente de los materiales vegetales (Björkroth y Holzapfel 2006).

*Leuconostoc*, junto con otras LAB tales como *Pediococcus* y *Lactobacillus*, se utiliza para la fermentación del repollo en la elaboración de chucrut. Durante este proceso, los azúcares de las coles frescas son transformados en ácidos lácticos que le dan un sabor agrio y permiten que se conserven en buenas condiciones. La fermentación del repollo ocurre naturalmente por medio de la bacteria *Leuconostoc* spp. presente sobre las hojas frescas de repollo (Björkroth y Holzapfel 2006).

*Leuconostoc mesenteroides* es anaerobia facultativa que requiere un complejo de factores de crecimiento y aminoácidos. Muchas cepas en cultivo líquido parecen cocos, se observan solos o en pares y pequeñas cadenas, sin embargo, morfológicamente pueden variar con condiciones de crecimiento; las células crecen en presencia de glucosa. Las cepas en medio sólido tienen una morfología alargada o en forma de vara (JGI Microbes 1999).

Un medio utilizado para el cultivo selectivo y diferencial de organismos del género *Leuconostoc* es el medio MSE (medio Mayeux, Sandine y Elliker), en el que las colonias de *Leuconostoc mesenteroides* (un *Leuconostoc* dextrana positivo) se observa como una gota de agua, por la producción de dextrana (Callon *et. al.* 2005). La acidez de este medio proporciona una selectividad frente a otras bacterias lácticas (Mayeux *et. al.* 1962).

Bajo condiciones microaerofilicas se lleva a cabo una fermentación heteroláctica. La glucosa y otros azúcares hexosas son convertidos a D-lactato, etanol y CO<sub>2</sub> por la combinación de las vías de la hexosa monofosfato y rutas de la pentosa fosfato. Otras

rutas metabólicas incluyen la conversión de citrato a diacetil y acetoina y la producción de dextranas y levanos a partir de sucrosa. *Leuconostoc mesenteroides* produce enzimas de uso biotecnológico, como las dextransacarasas (DS), que catalizan la formación de biopolímeros de dextrana y la síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular (JGI Microbes 1999).

Los polisacáridos viscosos producidos por *L. mesenteroides* son ampliamente reconocidos como los causantes de pérdida de producto y problemas en el procesamiento en la producción de sucrosa a partir de la caña de azúcar y la remolacha azucarera. La primera observación de la producción de polisacáridos viscosos a partir de la azúcar data de los primeros días de la microbiología. Pasteur atribuye esta actividad a pequeños cocos, probablemente especies de *Leuconostoc*. La producción comercial de dextranas y levanos a partir de *L. mesenteroides* para uso en la industria bioquímica y farmacéutica, se ha llevado a cabo por más de 50 años (JGI Microbes 1999).

Las dextranas son utilizadas en la manufactura de extensores de plasma sanguíneo, sustitutos de heparina anticoagulante, cosméticos y otros productos. Otro uso de las dextranas es la manufactura de geles o gránulos Sephadex, los cuales son ampliamente utilizados en la separación industrial de proteínas (JGI Microbes 1999).

El dextrano es un polímero de glucosa que posee una elevada proporción de uniones  $\alpha$ -1-6. Se obtiene cuando unas enzimas actúan sobre la sacarosa. Dichas enzimas están presentes en ciertas bacterias, como el *Leuconostoc mesenteroides*. El *Leuconostoc* posee la enzima dextransucrasa, que transforma la sacarosa en dextrana y fructosa. El peso molecular del producto obtenido es muy elevado, aproximadamente de unos cuarenta millones, y está constituido por unas 200.000 moléculas de glucosa, se le somete a una hidrólisis parcial con ácido sulfúrico diluido, hasta transformarlo en polímeros de pesos moleculares comprendidos entre 75.000 y 40.000 (Bravo 2003).

Las dextranas fueron descubiertas por Pasteur en 1861 al estudiar la fermentación de la sacarosa y observar que se producían unos posos que resultaron ser polímeros de

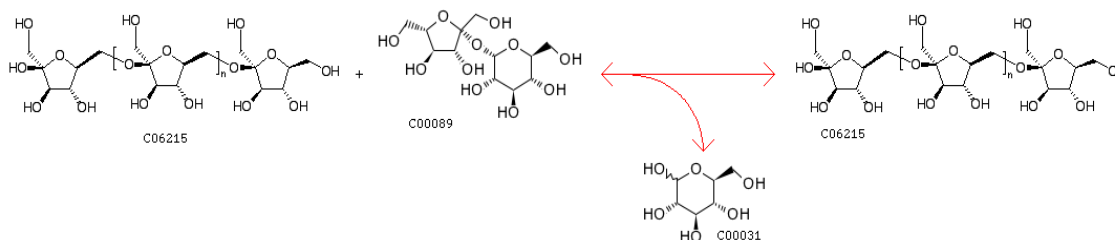
dextrano y que obstruían las conducciones de la industria azucarera. Se utilizaron en la Segunda Guerra Mundial para suplir la falta de sangre necesaria para transfusiones (Bravo 2003).

La literatura muestra que de los microorganismos presentes en los jugos de caña, dos géneros son los más perjudiciales, *Leuconostoc* y *Bacillus*. En este trabajo se muestran los resultados de dos bacterias nuevas que se aislaron del proceso azucarera por ser las dos bacterias de más presencia, luego de *Leuconostoc mesenteroides*.

- Género *Bacillus*: es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positivas. El género *Bacillus* pertenece a la División Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes, características que las hacen prevalecer durante los procesos de extracción de sacarosa. La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos. Existen especies tanto mesófilas como termófilas. Las esporas de los mesófilos como las de *B. subtilis* son menos resistentes que las esporas de los termófilos. La mayoría de los mesófilos forman ácido de la glucosa u otros azúcares. (Frazier y Weshoff 1978) Se ha encontrado en los jugos de caña dos principales cepas de *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* var. *aterrimus* y *B. cereus*. Estas dos especies pueden degradar la sacarosa por dos vías. La primera es por un endoenzima, una sacarasa y la segunda es una exoenzima, la levansucrasa, que cataliza la polimerización de fructosa en un polímero de alta masa molecular llamado levano (Ayres *et. al.*1980, Shimotsu *et. al.* 1986). Debido a que las especies de *Bacillus* no tienen una membrana externa, esta última enzima es liberada directamente en el medio (Simonen y Palva 1993). Si en el medio se tiene exclusivamente sacarosa, la actividad enzimática tiene como productos

fructosa, oligosacáridos y levanos, pero mientras más elevada sea la cantidad de levanos se promueve la elongación de estos, más que la liberación de fructosa (Chambert *et. al.* 1973).

Figura 2: Formación del Levano por el enzima Levan-Sucrasa.



(Genome Net 2007)

También existe otra cepa termofílica de este género en el jugo de caña, *Bacillus stearothermophilus*. Es una bacteria extensamente distribuida en el suelo, manantiales calientes y sedimentos oceánicos y es causa de descomposición de los productos alimenticios, como la sacarosa. Se usa comúnmente como organismo de validación en los estudios de esterilización. En los autoclaves de vapor se utiliza una ampollita con esta bacteria para hacer una prueba obligatoria requerida semanalmente. La ampollita se pone en el centro de la autoclave sin ningún tipo de carga. Se la da el ciclo normal de 30 a 45 minutos incluyendo el secado y cuando termine se saca de la autoclave y se envía al laboratorio. El resultado tarda dos días. En estos dos días la autoclave no se puede utilizar. Al salir la prueba si sale positiva se debe llamar el biomédico para que revise el autoclave y le de la limpieza necesaria, o pudiera ser que el autoclave este averiado y por esto no paso la prueba de la espora. Esta bacteria es altamente fermentativa en condiciones anaerobias, produciendo un 75% de ácido láctico, ácido fórmico, ácido láctico y etanol en relación 2:1:1. La bacteria es inmóvil e inicia su crecimiento a un pH de 5.0, y es altamente proteolítica en medios que contienen caseína. A pH 6.1 las esporas mueren solamente luego de un calentamiento a 100°C durante 17horas, pero a 120°C mueren en 11 minutos. El medio estándar para la enumeración de esta bacteria contiene dextrosa, triptosa y púrpura de bromocresol y se incuba a 55°C en busca de colonias rodeadas por una zona amarilla que indica la formación de ácido (Ayres *et. al.* 1980).

Esta bacteria tiene pruebas de haber sido identificada en este trabajo, por medio de pruebas bioquímicas, morfología de las colonias y análisis microscópicos de la bacteria. Recientemente una ADN polimerasa, la Bst polimerasa ha sido aislada de esta bacteria y ha tenido importantes aplicaciones en biología molecular. La ADN polimerasa Bst tiene una actividad similar a las enzimas helicasa, lo cual le da una habilidad para separar las hebras de ADN. Su temperatura ideal de funcionamiento es entre 60-65°C y su temperatura de desnaturalización es sobre los 70°C, estas características la hacen útil en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, la cual es similar a una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) pero no requiere temperaturas tan altas como ésta última.

Las bacterias del género *Lactobacillus* se han reportado en la literatura como organismos abundantes en productos intermediarios del proceso azucarero *Lactobacillus* (Carr *et. al.* 1975). *Lactobacillus casei* es una bacteria probiótica, anaeróbico facultativo del género *Lactobacillus* que se encuentra en el intestino y en la boca. Se trata de una bacteria productora del ácido láctico, que suele emplearse en la industria láctea en la elaboración de alimentos lácteos probióticos (contienen microorganismos vivos que ejercen importantes efectos fisiológicos si se ingieren en cantidades adecuadas). Esta especie particular de lactobacilo se ha comprobado que es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura, siendo además un complemento al crecimiento de la *L. acidophilus*, un productor de la enzima amilasa (una enzima digestiva de carbohidratos en la saliva y en el jugo pancreático de mamíferos). Se sabe que mejora la digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea. Por esta razón se emplea en la elaboración de diversos alimentos funcionales (Yuki *et. al.* 1999).

Las bacterias tienen las características necesarias para resistir la acción de los jugos gástricos, biliares y duodenales y llegar intactas al tracto intestinal donde desarrollan acciones inmunomoduladoras. Se han realizado experimentos para detectar la supervivencia de estas bacterias al paso por el tracto intestinal y se ha visto que hay un porcentaje alto de supervivencia. Otros estudios han mostrado que el consumo de lácteos con esta bacteria no altera el sistema inmunoprotector de los consumidores (Spanhaak 1998). Estas características le proporcionan a la bacteria las propiedades necesarias para

la supervivencia en el ambiente de la extracción de la sacarosa, debido a que tiene que soportar cambios de pH y temperatura entre cada molino y en los procesos subsiguientes de purificación. En este trabajo se realizaron pruebas bioquímicas, aislamiento en medios de cultivo, observación de características de las colonias y técnicas de microscopía en la identificación de este microorganismo, y se observó que coinciden las características con las mencionadas en la literatura, éste género se caracteriza por bacilos largos y delgados, que se organizan en cadenas cortas o en forma aislada. Estos bacilos no forman esporas y pueden ser anaerobios facultativos o estrictos. Son catalasa negativo y no son encapsulados. La cepa aislada es inmóvil y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30-40°C. En los jugos de caña también se han reportado otras cepas del género como *Lactobacillus vermiforme*, *Lactobacillus viridescens* y todas estas tienen la característica de producir dextrana a partir de la sacarosa (Sharpe *et. al.* 1972, Carr *et. al.* 1975).

Entre los principales efectos que tienen las bacterias sobre los jugos de caña se puede mencionar una pérdida de sacarosa, ésta es el producto final del proceso y al estar en altas concentraciones en la caña de azúcar, las bacterias y otros microorganismos pueden usarla como fuente de energía para sus procesos metabólicos. La caña cosechada y el área de molinos, son los puntos en los cuales los microorganismos tienen acceso a los jugos y consumen cantidades apreciables de sacarosa (Chen *et. al.* 1975). Estas bacterias tienen otra actividad durante el proceso azucarero y ésta es la incorporación al jugo de sustancias metabólicas ajenas a su composición. Si estas bacterias integran sustancias metabólicas propias al jugo de caña, cambian sus propiedades y dificultan el proceso de extracción. Algunas de estas sustancias pueden ser polisacáridos y ácidos orgánicos que producen como resultado del metabolismo de la sacarosa para obtener energía. (Chen *et. al.* 1975). Todas las bacterias presentes en el jugo de caña son degradadoras de la lactosa y dan como resultado la producción de ácidos orgánicos. La presencia de estos ácidos provoca un aumento en el consumo de cal necesaria para elevar el pH del jugo en el paso de alcalinización. Provoca también un aumento de las incrustaciones en los equipos de calentamiento, lo que disminuye su capacidad efectiva, además de un aumento en el contenido de calcio en el azúcar producido, el cual se

distribuye desigualmente entre el azúcar y la miel, con mayor presencia en el azúcar y un aumento de la capacidad amortiguadora del azúcar, indicador de la presencia de sustancias extrañas en ésta (Hernández y Sainz 1987).

Las bacterias ácido lácticas, que fueron identificadas durante este trabajo en varias muestras del jugo de caña se caracterizan por una producción de ácido láctico a partir de azúcares y otros. Este producto tiene usos comerciales y beneficiosos para las personas ya que puede usarse para producir alimentos como el yogurt y los pepinillos. Pero al momento de estar presentes en procesos de industria y de extracción de compuestos alimenticios como la sacarosa el ácido láctico es un compuesto altamente esterilizante que suprime microorganismos nocivos y mejora la descomposición de la materia orgánica. También se incide en un proceso de fermentación y descomposición del azúcar y producción de compuestos indeseables en el proceso azucarero. Las bacterias ácido lácticas se ha demostrado que tienen ventajas de ecología microbiana como la habilidad de combatir el desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades como *Fusarium*, los cuales aparecen en sistemas de producción continua. Bajo circunstancias normales, las especies como *Fusarium* debilitan las plantas cultivadas, exponiéndolas a enfermedades y a poblaciones crecientes de plagas como los nemátodos. El uso de bacterias ácido lácticas reduce las poblaciones de nemátodos y controla la propagación y diseminación de *Fusarium*, mejorando así el medio ambiente para el crecimiento de cultivos (Chen *et. al.* 1975).

#### D. Factores necesarios para el desarrollo de microorganismos

Es de gran importancia tomar en cuenta todos los factores físicos de los cuales depende un crecimiento óptimo de organismos procarióticos. Los factores físicos principales incluyen:

**Temperatura:** La temperatura es uno de los factores más importantes de los cuales depende el crecimiento. Cada organismo procariótico tiene su propia temperatura óptima de crecimiento con un rango aproximado de 30°, bajo la cual pueden crecer las células.

En general los procarióticos pueden agruparse en cuatro grupos principales basado en su temperatura óptima de crecimiento. Estos grupos son: psicrófilos (0-20°C), termófilos (40-70°C), hipertermófilos (arriba de 80°C) y mesófilos (10-45°C), dentro del cual se encuentran la mayoría de patógenos humanos (Pommerville 2004).

**Oxígeno:** El crecimiento de muchos procariotas depende del suministro de oxígeno. Algunos organismos son aerobios obligados, es decir, requieren del oxígeno como aceptor final de electrones. Otras especies son microaerofilos debido a que sobreviven en ambientes donde la concentración de oxígeno es relativamente baja. Por el contrario, los anaerobios son procariotas que no requieren de oxígeno. Algunos son considerados aerotolerantes, es decir, que son insensibles ante la presencia de oxígeno, pero hay otros que son anaerobios obligados, debido a que son inhibidos o se mueren en presencia de oxígeno. Algunos procariotas no son ni aeróbicos ni anaeróbicos, por lo que se les considera facultativos, es decir, pueden crecer en presencia o concentraciones reducidas de oxígeno. Por último, se encuentran las bacterias conocida como capnofílicas, las cuales requieren de de atmósferas bajas en oxígeno pero rica en dióxido de carbono (Pommerville 2004).

**pH:** El citoplasma de los organismos procarióticos tienen un pH cercano a 7.0, por lo que se considera que la mayoría de especies crecen óptimamente a pH neutro. La mayoría de especies de bacterias tienen un rango de pH bajo el cual crecen más lento y su rango usualmente cubren tres unidades de pH. Algunas bacterias son llamadas acidófilas, debido a que son ácido tolerantes y se pueden estar presentes en industrias de alimentos y productos lácteos (Pommerville 2004).

**Presión osmótica e hidrostática:** Algunos procariotas, llamados barófilos, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de presión hidrostática alta, ambiente con presiones mayores a los 16,000 psi, por lo que no podrían sobrevivir en presiones atmosféricas normales. En cuanto a presión osmótica, hay algunos procaritas amantes de la sal y son llamado halófilos, debido a que requieren grandes cantidades de sal para sobrevivir (Pommerville 2004).

Además de los factores físicos anteriormente mencionados, los microorganismos requieren de factores nutricionales específicos. Los requerimientos nutricionales de las bacterias están revelados por la composición elemental de la célula, la cual consiste en C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn y trazas de Zn, Co, Cu y Mo. Estos elementos en forma de agua, iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas que sirve ya sea como roles estructurales o funcionales en las células (Todar 2008).

Cuadro 6: Elementos mayores, sus fuentes y funciones en las células bacterianas.

<b>Elemento</b>	<b>% en peso seco</b>	<b>Fuente</b>	<b>Función</b>
Carbón	50	Compuestos orgánicos o CO <sub>2</sub>	Constituyente principal de material celular
Oxígeno	20	H <sub>2</sub> O, compuestos orgánicos, CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	Constituyente de material celular y agua celular, O <sub>2</sub> aceptor de electrones en respiración aeróbica
Nitrógeno	14	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , compuestos orgánicos y N <sub>2</sub>	Constituyente de aminoácidos, ácidos nucleicos y coenzimas
Hidrógeno	8	H <sub>2</sub> O, compuestos orgánicos y H <sub>2</sub>	Constituyente principal de compuestos orgánicos y agua
Fósforo	3	Fosfatos inorgánicos (PO <sub>4</sub> )	Constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, LPS y ácido teicoico.
Azufre	1	Compuestos orgánicos sulfurados	Constituyente de cisteína, metionina, glutathione y algunas coenzimas
Potasio	1	Sales de potasio	Principal catión inorgánico celular y cofactor de enzimas
Magnesio	0.5	Sales de magnesio	Catión inorgánico celular y cofactor de enzimas
Calcio	0.5	Sales de calcio	Catión inorgánico celular, cofactor de enzimas y componente de endosporas
Hierro	0.2	Sales de hierro	Componente de citocromos y cofactor de enzimas

(Todar 2008)

### E. Composición química de los productos de la industria azucarera

Dentro del proceso de la industria azucarera se puede obtener diversos productos, desde la molienda hasta la centrifugación. Al inicio del proceso se obtiene el jugo de caña o guarapo como resultado de la molienda de la caña de azúcar (Lou 2008).

Cuadro 7: Composición química del guarapo.

<b>Constituyente</b>	<b>Sólidos solubles (%)</b>
Azúcares totales	75-92%
Sacarosa	70-88%
Glucosa	2-4%
Fructosa	2-4%
Sales totales	3.0-4.5%
Ácidos inorgánicos	1.5-4.5%
Ácidos orgánicos	1-3%
Ácidos orgánicos totales	1.5-5.5%
Ácidos carboxílicos	1.1-3.0%
Aminoácidos	0.5-2.5%
<b>Otros compuestos orgánicos</b>	
Proteínas	0.5-0.6%
Almidón	0.001-0.050%
Gomas	0.3-0.6%
Ceras, grasas, fosfolípidos	0.05-0.15%
Otros	3-5%

(Lou 2008)

La cachaza es un sedimento amorfo de color oscuro, producto de la clarificación de los jugos de caña. La cachaza está formada por una fracción orgánica (tejido fibroso, sacarosa, ceras, aminoácidos y proteínas) y una fracción mineral (fosfatos, sulfatos, óxidos de Ca y Mg y otros micronutrientes) (Subirós 1995).

Cuadro 8: Composición química de la cachaza.

<b>Características fisicoquímicas</b>	
Humedad	51.7%
°Brix	41.0%
Polarimetría	34.6°
Ceniza	2.5%
pH	6.3
<b>Composición biomolecular</b>	
Azúcares reductores	6.8%
Sacarosa	30%
Proteínas	3.5%
Grasa	3.1%
<b>Composición mineral</b>	
Nitrógeno	0.2%
Fósforo	0.31%
Potasio	0.32%
Calcio	0.49%
Magnesio	0.14%
Manganeso	65 ppm
Zinc	48.8 ppm
Hierro	92.5 ppm
Cobre	10.1 ppm

(Lou 2008)

Otros productos que se obtienen en el proceso de clarificación, evaporación, cristalización y centrifugación son las meladuras y las mieles.

Cuadro 9: Composición química de la meladura y mieles.

	<b>Meladura hidrolizada</b>	<b>Meladura</b>	<b>Miel Primaria</b>	<b>Miel Final</b>
Materia seca	85.0%	82.5%	78.1%	83.5%
Nitrógeno	0.26%	0.29%	0.38%	0.44%
Cenizas	2.8%	4.5%	7.2%	9.8%
Extracto libre de nitrógeno	95.6%	93.0%	90.4%	87.4%
Azúcares totales	86.1%	75.9%	69.5%	58.3%
Sustancias orgánicas no identificadas	9.5%	17.1%	20.9%	29.1%

(Figuerola 1989)

Los productos finales del proceso son las azúcares. Tres son las azúcares finales que se pueden obtener:

- Azúcar panela o rapadura: Es un producto obtenido de la evaporación de los jugos clarificados. Este azúcar no pasa por ningún proceso de refinación y tiene un contenido de sacarosa de 75-85% (Lou 2008).
- Azúcar morena o cruda: Pasa por los procesos de cristalización y centrifugación, al contrario de la rapadura, pero sigue conservando la mayor parte de los nutrientes provenientes de la caña de azúcar. Los cristales de azúcar morena tienen la característica de estar recubiertos por una película de licor madre, que no ha sido sometida a un proceso de purificación y refinamiento completo (Lou 2008).
- Azúcar blanca o refinada: Es producida a partir del azúcar morena. Se diluye y pasa de nuevo por un proceso de clarificación, filtración, cristalización y secado, lo cual puede disminuir la cantidad de nutrientes en el azúcar (Lou 2008).

Cuadro 10: Composición química de los distintos tipos de azúcar.

	<b>Azúcar rapadura</b>	<b>Azúcar morena</b>	<b>Azúcar blanca</b>
Sacarosa	85-93%	90-96%	99.9%
Ceniza	1-2.5%	0.3-1%	0.015%
Materia orgánica	2-4.5%	1-3%	
Humedad	2-3.5%	1-2.5%	0.04%
Vitamina B1	245mg/100g	0.10mg/100g	
Vitamina B2	240mg/100g	0.20mg/100g	0.019mg/100g
Vitamina B3	4mg/100g	0.11mg/100g	
Vitamina B5	260mg/100g	0.132mg/100g	
Vitamina B6	270mg/100g	0.041mg/100g	
Calcio	258mg/100g	240mg/100g	1mg/100g
Fósforo	30mg/100g		Trazas
Hierro	8mg/100g	6mg/100g	0.04mg/100g
Cobre	2mg/100g		0.02mg/100g
Magnesio	0.04mg/100g		
Cloruros	317mg/100g		Trazas
Sodio	90mg/100g	28mg/100g	0.03mg/100g
Potasio	1500mg/100g	240mg/100g	0.5mg/100g

(Lou 2008)

#### F. Bactericidas en la industria azucarera

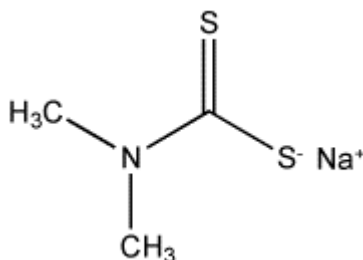
Para el control de microorganismos que afectan a la industria azucarera se utilizan desinfectantes químicos comúnmente. Al tomar la decisión de que desinfectante se va a emplear se debe tomar en cuenta la microbiota presente en el lugar de aplicación, la naturaleza y concentración del desinfectante y la duración del tratamiento a seguir. Un desinfectante ideal debe contar con las siguientes características: eficacia contra amplio espectro de microorganismos (bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, parásitos, etc) con concentraciones bajas y en presencia de materia orgánica, no debe ser

tóxico por aplicarse a un producto de consumo humano, ni debe ser corrosivo para la maquinaria (Lou 2008).

En el ingenio Pantaleón se utilizan principalmente dos bactericidas, por lo que se hará énfasis en ellos.

- Di-Metil Ditiocarbamato de Sodio (SMB, por sus siglas en inglés): EL SMB es un desinfectante con fórmula  $(\text{CH}_3)_2\text{NCSSNa}$ . Es utilizado como fungicida y pertenece a la clase de químicos de los ditiocarbamatos. Es altamente tóxico para los humanos, incluyendo carcinogénesis, toxicidad reproductiva y para el desarrollo, neurotóxico y de toxicidad aguda (Kegley *et. al.* 2000).

Figura 3: Estructura molecular del SMB.



(Kegley, *et. al.* 2000)

- Beta-Stab ®: Es una solución alcalina de los Beta-ácidos del lúpulo empleada en industria azucarera. Beta-Stab ® es eficiente contra la formación de  $\text{NO}_2$  e infecciones anaerobias (Pollach, *et. al.* 2002).

#### G. Actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de una reacción química, permitiendo que la reacción se lleve a cabo en un menor tiempo, siempre que sea termodinámicamente estable. Las enzimas son protagonistas de procesos fundamentales del metabolismo celular, son muy selectivas y en muchas ocasiones requieren de otras moléculas más pequeñas no polipeptídicas conocidas como coenzimas o iones metálicos llamados cofactores (Lehninger 2004).

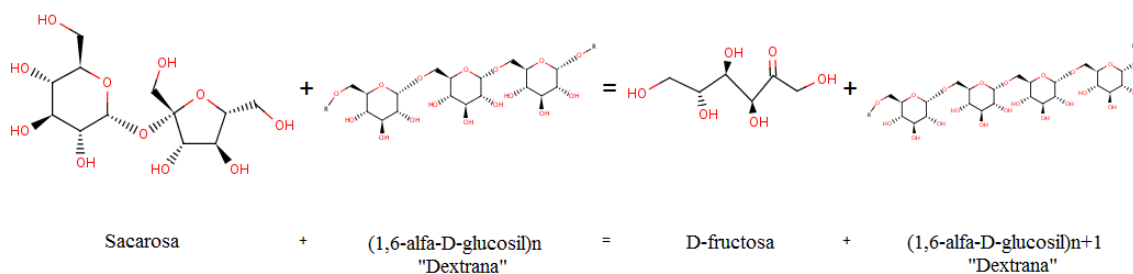
La regulación del metabolismo celular se lleva a cabo regulando la actividad enzimática del organismo. Se puede regular la concentración, modificar la conformación y localización celular o introducir modificaciones covalentes con metilación o fosforilación, que pueden afectar la enzima de forma irreversible (Lehninger 2004).

Un ensayo enzimático es un procedimiento de laboratorio por medio del cual se puede medir la velocidad de la reacción enzimática. Debido a que las enzimas no se consumen en la reacción, los ensayos enzimáticos suelen medir los cambios experimentales en la concentración del sustrato (concentración en descenso) o de los productos (concentración en ascenso). Existen diversos métodos para realizar estas medidas dentro de las que sobresale la espectrofotometría. Por medio de la espectrofotometría se pueden determinar cambios de absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto, permitiendo medir la velocidad de la reacción de forma continua (Lehninger 2004).

Algunos de los factores que pueden afectar la actividad enzimática son la temperatura, el pH y la concentración salina, por lo que para algunos ensayos enzimáticos se suelen modificar dichos factores para observar y determinar los cambios en la velocidad de reacción (Lehninger 2004).

En el caso específico de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la enzima con actividad enzimática perjudicial para la industria azucarera es la dextransucrasa. Esta enzima también es conocida como sacasora-6-glucosil transferasa, debido a que rompe el enlace entre la glucosa y la fructosa en una molécula de sacarosa. La glucosa obtenida por la ruptura de la glucosa se une con una molécula de dextrana, formando polisacáridos de alta densidad (BRENDA 2009). La reacción por la cual se forma la dextrana se observa en la siguiente reacción:

Figura 4: Reacción catalizada por dextransucrasa.



(BRENDA 2009)

Debido a que uno de los productos de reacción es la fructosa, se suelen utilizar métodos espectrofotométricos específicos para la fructosa para determinar la actividad enzimática de la dextransucrasa de *Leuconostoc mesenteroides*.

La formación de dextranas constituye un problema para la industria azucarera debido a que causa daños a distintos niveles de la producción de azúcar. Algunos de estos problemas pueden ser:

- Aumento del punto de ebullición del jugo de caña, aumentando el nivel de calentamiento necesario (Lou 2008).
- Aumento en la viscosidad del jugo de caña, dificultando la clarificación.
- Aumento en la viscosidad de las masas cocidas (miel + cristales de azúcar), disminuyendo la deposición de sacarosa en los cristales formados (Lou 2008).
- Disminución en la capacidad de los evaporadores, lo que aumenta el tiempo de evaporación y puede aumentar el deterioro de la sacarosa por hidrólisis (Lou 2008).
- Disminución en la velocidad de cristalización debido a que la dextrana no permite que se formen cristales octaedros y favorece la formación de cristales en forma de aguja por lo que la pérdida de azúcar aumenta en la etapa de centrifugación (Lou 2008).
- Presencia de dextrana en películas de miel que rodean el cristal de azúcar, por lo que se afecta el proceso de refinación (Lou 2008).

- Disminución del rendimiento del proceso debido al consumo de sacarosa por parte de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* aumentando la producción de dextrana a través del enzima dextransucrasa (Lou 2008).

### III. PROBLEMAS DE LA INVESTIGACIÓN

Son varios los factores que afectan la industria azucarera. Entre los más importantes se encuentra las consecuencias de la contaminación microbiana, que incluye la disminución del rendimiento y eficiencia de los procesos y la reducción de la calidad del producto. El daño ocasionado por los microorganismos, principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, se puede observar en diferentes etapas de la producción:

- En el transporte de la caña y extracción del jugo los microorganismos consumen parte de la sacarosa presente en el tallo.
- Al mismo tiempo la numerosa y variada microbiota vierte a los jugos una serie de sustancias indeseables, sobre todo las que se pueden dividir en dos grandes grupos: los ácidos orgánicos y las gomas (oligo y polisacáridos).
- Los ácidos orgánicos bajan el pH e incrementan la capacidad amortiguadora (buffer) de los jugos, que en su conjunto provocan consumos exagerados de cal, aumentando la concentración de iones Calcio, el nivel de incrustaciones, el consumo de vapor y la frecuencia de limpieza de los evaporadores; además se producen problemas en la cristalización por incremento de la relación Ca/Mg y también se incrementa la proporción de sales en el grano de azúcar lo que se refleja en los resultados del análisis de las llamadas cenizas.
- Las sustancias gomosas, en especial la dextrana que solo se produce por vía microbiológica, incrementan la viscosidad frenando todos los movimientos de los productos o de los sólidos que contiene, y por esa vía también se pierde sacarosa que no puede recuperarse. También causado por las gomas, disminuye la velocidad de flujo de las mieles y de todos los productos intermedios y un crecimiento deforme del grano de azúcar que entonces puede atravesar la tela de la centrífuga, haciendo que se pierda el producto principal, con aumento de la pureza de la miel final
- En el caso particular de la dextrana, por su alto poder rotatorio dextrógiro provoca resultados engañosos en la determinación polarimétrica de sacarosa, por la coincidencia de rotación de ambas.

Estos problemas conllevan a una búsqueda para el control de la actividad de *L. mesenteroides*, y de otras bacterias de importancia, tanto en la caña como en los molinos de extracción. En la actualidad no se cuenta con un método integral y efectivo para controlar esa actividad en la caña, entre el proceso de corte y la salida de los jugos de la planta de extracción, aunque hay precedentes en otros países y un trabajo preliminar en Guatemala.

Para la implementación del mencionado control integral es necesario contar con información confiable de las características de la microbiota en diferentes unidades de producción.

Otra carencia que es necesario suplir es la de métodos que permitan evaluar de forma operativa la agresividad de cepas aisladas en los productos circulantes.

También, en la industria se utilizan de forma general diversos biocidas, generalmente obtenidos por síntesis química, con el objetivo de suprimir la actividad microbiana, pero no se cuenta con métodos confiables de evaluación en fábrica, ni se aplican siguiendo procedimientos integrales que consideren la actividad microbiana presente en el momento de la aplicación.

Otro inconveniente, es que la incorporación de estos productos es un obstáculo al desarrollo de procesos de obtención de azúcar orgánica, además de que su manipulación puede ser fuente de contaminación al ambiente y perjudicial a la salud humana.

El uso intensivo de desinfectantes en poblaciones microbianas activas permite el surgimiento de cepas resistentes a dichos desinfectantes, las cuales reemplazan a la cepa susceptible, que fue eliminada por el método de control. Esta resistencia que se produce en la población microbiana, hace necesaria la rotación de desinfectantes para evitar su inutilización. La rotación de desinfectantes es costosa, debido a que se compran lotes menores y, muchas veces, de distintos proveedores. Al continuar utilizando el método actual de control microbiológico, se pueden establecer cepas resistentes a muchos de los agentes desinfectantes disponibles, imposibilitando la utilización misma del método.

Analizando el problema anterior, se puede formular las siguientes preguntas:

- ¿Es útil implantar un sistema de control integral que permita la utilización de métodos de supresión con soporte técnico acoplado las actividades de monitoreo, acciones operativas, dirección administrativa y planificación en función del mismo objetivo?
- La densidad y actividad microbiológica en diferentes fases de la producción ¿se comporta de igual o diferente manera entre diferentes ingenios?
- ¿Son efectivos los desinfectantes que actualmente usa el ingenio estudiado? Y ¿Es posible determinarlo con las técnicas tradicionales microbiológicas?
- ¿Se puede obtener un medio de cultivo costo-efectivo con productos azucareros para el desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides* que sustituya los medios comerciales?
- ¿Puede evaluarse de forma sistemática la incidencia de organismos perjudiciales, mediante la actividad enzimática, para dirigir la operación de suprimirlos?

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivos generales:

Optimizar métodos microbiológicos que contribuyan al sistema integral de control, priorizando la evaluación de cepas y desinfectantes, obtención de medios de cultivo costo-efectivo y caracterización de presencia y actividad de *Leuconostoc mesenteroides*.

Evaluar y comparar la presencia de bacterias importantes en el proceso azucarero en distintos puntos de éste, priorizando en la identificación de dos bacterias desconocidas encontradas en abundancia y la evaluación del uso de bactericidas dentro del ingenio Pantaleón, Guatemala.

Desarrollar de forma optimizada los procedimientos generales y de organización de personal para el establecimiento del sistema control de microbiológico en la industria azucarera.

### B. Objetivos específicos:

- Caracterizar los jugos circulantes en cuanto a densidad y actividad de *Leuconostoc mesenteroides* en el ingenio Pantaleón y comparar los resultados con los obtenidos en la unidad estudiada anteriormente.
- Aislar y caracterizar las cepas de *L. mesenteroides* presentes en los jugos de extracción de azúcar en el ingenio Pantaleón.
- Optimizar medios costo-efectivos para el desarrollo de *L. mesenteroides*.
- Desarrollar un procedimiento de evaluación para la actividad perjudicial de *Leuconostoc mesenteroides*, enfatizando en actividad enzimática.
- Comparar el crecimiento a lo largo del tándem A del proceso de extracción del azúcar dentro del ingenio Pantaleón de la microbiota total y las dos bacterias desconocidas aisladas.
- Realizar análisis de curvas de presencia y crecimiento de la microbiota total aislada, mientras varían temperaturas del ingenio.

- Aislar en medios de cultivo adecuados dos especies desconocidas de bacterias y realizar pruebas de laboratorio que permitan la identificación de éstas especies.
- Utilizar métodos microbiológicos para evaluar los bactericidas químicos utilizados en el ingenio Pantaleón, para *Leuconostoc mesenteroides* y las dos cepas aisladas.
- Desarrollar un procedimiento técnico-general para el sistema del control microbiológico en el ingenio Pantaleón y optimizar cada fase.
- Elaborar propuesta fundamentada con la opciones de organización institucional y personal para el desarrollo del sistema.
- Organizar inicialmente y poner a punto las encuestas de percepción de eficiencia y calidad en la industria.
- Hacer un balance de los costos del megaproyecto durante el primer ciclo del año 2009.

## V. JUSTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN

La relevancia de este estudio es evidente debido al estado actual del control microbiológico en los procesos de extracción de sacarosa en la industria azucarera guatemalteca. La incapacidad de controlar de una manera efectiva la actividad microbiológica presenta problemas a la industria azucarera y un método de control más eficaz que el usado actualmente brindaría a esta industria una capacidad de desarrollarse a un nivel mayor. La optimización de estos procedimientos requiere el establecimiento de sistemas de monitoreo adecuados, que permitan estimar con la mayor exactitud posible la actividad microbiana, y evaluar la eficacia de los métodos utilizados actualmente. Para que esto se pueda realizar se necesita una investigación teórica y práctica exhaustiva de los factores aislados que causan disminuciones productivas o de calidad en los procesos para poder elaborar métodos y procedimientos que las reduzcan y sean beneficiosos al proceso y al producto final.

*Leuconostoc mesenteroides* es uno de los principales microorganismos que afectan los procesos de la industria azucarera. Este trabajo propone el desarrollo de una técnica nueva en Guatemala y nueva para la industria del azúcar que puede utilizarse para disminuir la propagación y desarrollo de este microorganismo. Los resultados de este trabajo servirán como base para otros estudios, y por medio de los resultados obtenidos se podrá continuar con caracterizaciones de otros microorganismos en la industria azucarera o incluso en otras industrias y aplicar este método para combatirlos. Con el fin de encontrar métodos de combatirlo, se ha trabajado en proyectos anteriores con *L. mesenteroides*, conociendo la densidad microbiana a lo largo de los molinos y determinando los factores que afectan su desarrollo. También fue necesario evaluar los desinfectantes utilizados actualmente en la industria azucarera, para saber si la bacteria susceptible a ellos y esto sienta las bases para este proyecto que se basa en desarrollar estrategias para combatirlo por medio de un método nuevo, sujeto a experimentación.

Con este trabajo se pretende dar a conocer dos especies de las más abundantes, luego de *L. mesenteroides*, en el proceso azucarero del ingenio Pantaleón. Esto se realiza con el

fin de brindar la información necesaria para que el proyecto se retome para brindar una propuesta de un método que permita el control adecuado de la presencia de los microorganismos más importantes y más perjudiciales en el proceso.

Además, a raíz de la investigación elaborada en el ingenio anterior y observaciones hechas durante las visitas al ingenio Pantaleón se vio en la necesidad de implementar sistemas de estandarización de recorridos y procedimientos de sistema de muestreo en las líneas producción de la planta. Así mismo se pretende dejar como marco de referencia, para futuras investigaciones, el estudio de evaluaciones de factibilidad de alternativas para trabajar los análisis de muestreo en ingenio Pantaleón y la implementación de un nuevo sistema de gestión de personal

Esta investigación se enfocará en la optimización de los métodos microbiológicos para el monitoreo y control de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, principal microorganismo que afecta la producción de azúcar en Guatemala, y otros microorganismos de importancia. El estudio se llevará a cabo en el ingenio Pantaleón, con base a estudios realizados previamente en la Universidad del Valle de Guatemala sobre la actividad de *L. mesenteroides* (Lou 2008 y Noack 2008).

## VI. VIABILIDAD

Dado los daños que produce los microorganismos en la industria azucarera y la información precedente sobre el protagónico papel de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la optimización de los métodos de monitoreo y control son prometedores para mejorar la eficiencia en la industria azucarera.

Por otra parte, procedimientos para evaluar la agresividad de las cepas preponderantes y su sensibilidad a los bactericidas tiene mucha importancia práctica y económica, ya que actualmente se aplican bactericidas indiscriminadamente sin evaluar su efectividad real.

Debido a que en el presente y en el futuro se necesitará monitorear, aislar, identificar y desarrollar cultivos de *Leuconostoc mesenteroides*, y otras cepas abundantes del proceso, obtener medios de cultivo más efectivos y al mismo tiempo más baratos que los comerciales inobjetablemente tienen una repercusión económica favorable.



Cuadro 11: Presupuesto de trabajo general del estudio presentado.

<b>Rubro</b>	<b>Fuente</b>		<b>Total (Quetzales)</b>
	<b>Proyecto (Quetzales)</b>	<b>UVG * (Quetzales)</b>	
Mantenimiento de equipos	-----	5 000.00	5 000.00
Materiales	5 000.00	2 000.00	7 000.00
Bibliografía	2 400.00	-----	2 400.00
Viáticos (Visitas al ingenio)	2 000.00	-----	2 000.00
Publicaciones (Impresión de tesis y publicación en revista UVG)	6 000.00	-----	6 000.00
Otros	3 000.00	3 000.00	6 000.00
<b>Total por fuente (Quetzales)</b>	<b>18 400.00</b>	<b>10 000.00</b>	<b>28 400.00</b>

\* Universidad del Valle de Guatemala. Costos con base a colaboración de la Universidad con el proyecto.

## VII. MÉTODO

### A. Variables de la investigación

*Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria que se encuentra normalmente asociada con la fermentación. Por ser el principal microorganismo causante de la contaminación microbiana en la industria azucarera, una variable es su distribución y densidad en los diferentes productos circulantes. Asimismo, se considera una variable la agresividad de cepas aisladas.

Otras variables de la investigación son la sensibilidad de *Leuconostoc mesenteroides* a los bactericidas químicos empleados y los productos del proceso considerados como sustratos para medios de cultivo costo-efectivo.

### B. Diseño, población y muestra

El proyecto se divide en tres secciones principales, cada una con su propio diseño, tipo y enfoque de investigación:

1. Optimización de métodos y materiales para la evaluación y control de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.
  - Aislamiento y caracterización de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* presentes en jugos de extracción de sacarosa, del ingenio Pantaleón (Fase 1): Esta fase es una investigación descriptiva, con diseño experimental y un enfoque cuantitativo. La población de cada molino es todo el jugo de extracción de sacarosa de ese molino. Las muestras son las porciones de jugo recolectadas en cada molino, que serán analizadas en busca de cepas de *L. mesenteroides*. El tratamiento aplicado a esta fase hace los resultados generalizables solamente para los molinos analizados en este ingenio.

- Optimizar los procedimientos desarrollo y control de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* encontradas en la primera fase (Fase 2): Esta fase es de investigación descriptiva, con diseño experimental y un enfoque cualitativo. La población de estudio incluye las porciones de jugo recolectadas en cada molino, los productos de la industria azucarera y bactericidas. Las muestras son las porciones de estos jugos y productos, empleadas para el desarrollo de medios de cultivo costo-efectivos, y los bactericidas empleados actualmente en el ingenio para la determinación de su efectividad.
2. Identificación de dos bacterias aisladas de un caldo de extracción de sacarosa de la caña de azúcar y estudio de su proporción y sensibilidad a los desinfectante usados en comparación con la microbiota total.
- Esta fase es una investigación descriptiva, con diseño experimental y un enfoque cuantitativo. Se hicieron métodos optimizados de crecimiento y selección de cepas que estaban presentes en distintos puntos del proceso para su identificación. Los métodos de crecimiento fueron los mismos que para *L. mesenteroides* y las pruebas de identificación se realizaron a dos cepas bacterianas con altos índices de aparición y crecimiento a lo largo del tándem B, luego del análisis de presencia de la microbiota total y de las cepas más importantes dentro de la ecología. Así mismo se hizo un estudio de evaluación de los dos desinfectantes usados en el ingenio Pantaleón, SBM y  $\beta$ -stab para concluir sobre su efecto sobre la microbiota total y sobre las cepas aisladas e identificadas.

### C. Metodología

1. Optimización de métodos y materiales para la evaluación y control de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.
- Caracterización de jugos circulantes en el ingenio Pantaleón y comparación con resultados obtenidos en la unidad estudiada anteriormente:

Esta fase del trabajo se basa en la evaluación de los trabajos realizados en segunda fase del trabajo de Megaproyecto. Para ello se recolectan muestras de jugo de caña de los distintos molinos del ingenio Pantaleón, del tándem A y B, durante abril y mayo 2009. Las muestras se transportan en hielera a la Universidad del Valle de Guatemala y se conservan a  $-15^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Microbiología (C1-105). Para estudiar la microbiota total y *Leuconostoc mesenteroides* se preparan diluciones en agua de peptona de las muestras recolectadas. Para determinar la microbiota total presente en los jugos de caña se utiliza la siembra por superficie en medio de cultivo Plate Count (PC) y para determinar la concentración de *L. mesenteroides* se utiliza la siembra por superficie en los medios MSE, AM150 (medio azúcar morena, concentración 150g/L), y AM200 (medio de azúcar morena, concentración 200g/L). Además, se estudia la microbiota total y *Leuconostoc mesenteroides* en los jugos circulantes en el proceso previo al calentamiento (jugo primario, jugo diluido, jugo sulfitado, jugo alcalizado y jugo filtrado). El procedimiento detallado se muestra en la sección de Anexos (Anexo A1).

- Optimización de medios costo-efectivos para el desarrollo de *L. mesenteroides*:
  - Preparación y evaluación de medios costo-efectivos a partir de productos de la industria azucarera: Para esta sección se utilizan los productos de la industria azucarera: cachaza (C), jugo filtrado (JF), meladura clarificada (MC), meladura evaporada (ME) y miel primaria (MP). Se realizan distintos medios con concentraciones diferentes de los productos de la industria azucarera. El trabajo se elabora en triplicado. A partir de los recuentos obtenidos de *Leuconostoc mesenteroides* en los distintos medios se tienen conclusiones parciales, por lo que se evalúan posteriormente otras concentraciones o las mismas. El procedimiento detallado se muestra en la sección de Anexos (Anexo A2).

- Evaluación de bactericidas por métodos microbiológicos:

Las muestras de bactericidas empleadas en esta fase se tomaron directamente de los toneles de bactericida SMB y Beta-Stab en el ingenio Pantaleón. Se evalúa también la

acción de formaldehído sobre la cepa de *Leuconostoc mesenteroides*. El procedimiento a seguir se detalla en Anexos (Anexo A3).

- Evaluación de actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*:

Esta fase del proyecto se basa en la búsqueda y montaje de distintas técnicas para la determinación de la actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*, enfatizando en la enzima dextransucrasa (Anexo A4).

2. Identificación de dos bacterias aisladas de un caldo de extracción de sacarosa de la caña de azúcar y estudio de su proporción y sensibilidad a los desinfectante usados en comparación con la microbiota total.

- Pruebas piloto:

Para la determinación de las concentraciones de azúcar a utilizar en los medios de cultivo se realizó una prueba piloto en la que se usarán las siguientes concentraciones de azúcar 150g/L y 250g/L. Además de azúcar los medios contenían peptona (10g/L) y agar (15g/L). La metodología para la preparación de los medios y la siembra de estos se describe en Anexos (Anexo A5-A8).

- Preparación de muestras de trabajo en laboratorio:

Se recolectarán muestras de guarapo de distintos molinos y pasos del proceso de producción de sacarosa en el ingenio Pantaleón, las cuales deberán ser transportadas en una hielera a la Universidad del Valle de Guatemala durante los meses de enero a mayo 2008. Las muestras de jugo de caña se almacenarán en el congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$  del laboratorio de Operaciones Unitarias del departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala. Para trabajar, se descongelarán las muestras 24h antes de empezar a trabajar a un refrigerador a  $6^{\circ}\text{C}$ ; 2h antes de empezar a trabajar, se colocará la muestra fuera del refrigerador, hasta que llegue a temperatura ambiente.

- Determinación de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total en los molinos:

Se tomarán las muestras y se diluirán de acuerdo con la muestra utilizada (Wistereich 1997). Para determinar la concentración de *L. mesenteroides* en los jugos de caña se utilizará el medio MSE, con una siembra por superficie, utilizando un inóculo de 100µL. Para determinar la microbiota total se realizará una siembra por vertido utilizando agar plate count y un inóculo de 1 mL (Noack 2008). Con el uso de agar Plate Count se aislarán las dos bacterias adicionales que se identificarán en el proceso, ya que se ha observado el que permite un mayor crecimiento de las bacterias elegidas.

- Preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de la caña de azúcar:

Se verificará periódicamente la identidad de las bacterias que crecen en los medios de cultivo experimentales. Esto se realizará mediante pruebas bioquímicas de azúcares en medio CTA, bilis, SIM, y por la tinción de Gram (Anexo A6). Para el análisis de cepas, se tomó al azar colonias formadoras de polímeros de alta masa molecular, con morfología presuntiva de *L. mesenteroides*, así como colonias de morfología distinta pero cuya presencia era abundante en los medios de cultivo. Se eligieron dos bacterias de las más abundantes en cuanto a crecimiento y en cuanto a su morfología bajo el microscopio con una tinción de Gram. Se hicieron pruebas de identificación para caracterizarlas e identificarlas.

### 3. Implementación de sistema de estandarización de procesos internos y de gestión de personal.

- División de componentes del trabajo de investigación e implementación:
  - Observación y análisis:
    - Reconocimiento de los procesos internos del ingenio y análisis de sus variables solo seleccionar las óptimas y puntuales para hacer estudios de tiempos y movimientos.

- Preparación y evaluación:
  - Establecimiento del sistema de estudio de tiempos y movimientos para realizar manuales de procesos y coordinación del personal involucrado.
  - Evaluación de las alternativas propuestas con las variables de estudio.
- Corrección y proyecciones:
  - Corrección de procesos y reestablecimiento de los mismos para proponer mejoras a mandos del ingenio Pantaleón.
  - Proyección de reducción de tiempo y optimización de movimientos y uso de recursos.

- Organización de procesos y personal:

Durante la fase de observación y análisis del proceso se pudo detectar varias oportunidades de mejor dentro de las cuales se han escogido la organización de procesos y de personal. Las actividades antes mencionadas se estudiaron por medio de tiempo y movimiento, por medio de la elaboración de diagramas de operaciones y de recorridos para determina las rutas óptimas en cuanto a la utilización de personal y recursos del ingenio.

- Preparación y evaluación:

Para esta etapa del proceso básicamente se visitó el ingenio y sus operaciones, en total se hicieron 14 visitas a las instalaciones durante las cuales se tomó video de la operación de muestreo, se trazaron los recorridos hechos para el muestreo desde los laboratorios de caña y planta para sus respectivas operaciones y se cronometraron las actividades desde la salida del operario del laboratorio hasta la preparación de los instrumentos necesarios para la próxima obtención de muestras.

- Correcciones y proyecciones:

Con el conocimiento básico de las operaciones y sus recorridos se hicieron cuatro propuestas, las cual se evaluaron y compararon para obtener una alternativa la cual será

puesta al mismo tiempo en evaluación por los directivos del ingenio para su puesta en práctica. Los puntos clave que se observaron y con los cuales nos basamos para obtener la mejor propuesta fueron:

- Costos de la operación:
  - Se planteó la adquisición de nuevo equipo de laboratorio.
  - Se planteó la propuesta de contratación de un operario extra.
- Tiempos y movimientos realizados en las operaciones:
  - Con diagramas de operaciones y recorridos se comparan las propuestas para selecciones la que tenga un menor tiempo de operaciones y rutas óptimas de recorrido por la operación.

Los resultados obtenidos se basarán en la operación que incluya menos gastos y cambios a la operación actual, que es considerada como la óptima actual o en el mejor de los casos, que reduzca los gastos costos y tiempo de operación actual.

Las proyecciones del trabajo se realizarán a partir de los siguientes módulos de evaluación del mismo. Para la etapa en curso se pretende plantear un marco de investigación que permita la evaluación de otras opciones de operación basándose en “Encuestas de Percepción del lugar de trabajo y procesos internos” (ver aplicadas a los empleados de todos los niveles organizacionales del ingenio Pantaleón y mediante los resultados se crearán las bases para plantear los posibles escenarios de evaluación de alternativas propuestas y las posibles mejoras propuestas para el proceso en las etapas siguiente).

- Evaluación de factibilidad de alternativas para trabajar los análisis de muestreo en ingenio Pantaleón:
  - Alternativa 1: “Realización del proceso con procedimiento totalmente internos”.
    - Consideraciones a tomar:
      - Se realizarán evaluaciones de jugos de diluido y primario en laboratorio de materia prima.

- La evaluación de jugos de extracción de caña se realizará en el laboratorio de cañas.
- Cada laboratorio sufragará sus propios gastos de toma de muestra y análisis.
- No se requiere personal extra en ningún proceso, los mismos operarios o analistas de laboratorios harán el muestre y análisis.
- El laboratorio de materia prima deberá implementar equipo requerido para el análisis a llevarse a cabo.
- Se harán gastos en nuevo equipo y probablemente un aumento en el tiempo y movimientos que requerirán los operarios de los laboratorios para realizar sus muestreos y análisis.

- Evaluación de alternativa:

Económicamente hablando, se tendrá que contemplar la compra de equipo de laboratorio complementario para ambos laboratorios.

- En el laboratorio de planta se debería de comprar un baño de María con un costo aproximado a partir de \$180 (Anexo D14).
- En el laboratorio de cañas se debería de comprar una cámara de refrigeración con un costo aproximado a partir de \$1200 (Anexo D15).

De igual forma, de no decidir adquirir nuevo equipo, se debe elaborar un nuevo recorrido para el cual se deberá contar con la interacción constante de ambos laboratorios y la cooperación y coordinación de los operarios de los mismos. Este nuevo recorrido deberá incluir el paso de los operarios por la planta y los laboratorios para tener resultado en conjunto y al mismo tiempo tanto de las muestras tomadas en la planta y de los frentes de corte (Anexo 18 y 19 para evaluación de tiempos y movimientos dentro de la planta

basándose en el proceso de “Estandarización de proceso de investigación y muestreo en laboratorios de caña en ingenio Pantaleón” en Anexo 13).

- Alternativa 2: “Proceso totalmente interno con contratación de operario extra que realice muestreo y análisis de las muestras.”
  - Consideraciones a tomar:
    - Se deberá contratar 1 operario más:
      - Un operario extra trabajará con el laboratorio de materia prima y se hará cargo de los muestreos de jugo primario y diluido y hará los análisis de las respectivas muestras
    - El laboratorio pagará por los gastos del nuevo operario
    - El laboratorio de materia prima deberá implementar equipo requerido para el análisis a llevarse a cabo.

Se reducirá el tiempo de trabajo y se creará una plaza especializada para muestreo y análisis de muestra.

- Evaluación de alternativa:

La oportunidad vista en esta alternativa es la de reducción de tiempo de operación y congestión entre operarios de los laboratorios de la industria. El operario extra contratado será hecho mediando un servicio tercerizado.

Las características que deberá presentar el nuevo operario son según CENGICAÑA:

- Grado escolar mínimo alcanzado: Sexto primaria.
- Saber leer y escribir.
- Dispuesto a trabajar turnos de 12x12 o incluso 24x24 en la temporada de arranque y finalización de la zafra.

Además de las observaciones hechas con respecto a la contratación del nuevo operario, este último deberá cumplir con el recorrido del DOP propuesto (Anexo 19), con

el cual tendrá un total de 16 minutos aproximadamente por labor de muestreo y 14 de descanso y análisis de muestras tomadas con anterioridad. A diferencia de un proceso normal que requería de más de una persona para el desempeño del proceso completo.

○ Alternativa 3: “Proceso tercerizado con pago compartido.”

- Consideraciones a tomar:

- Se contratará el servicio de un operario extra que trabajará como un “outsourcing” para el ingenio, trabajando en la función de muestre y análisis.
- Sólo se dará una capacitación de procesos los cuales serán cubiertos por ambos laboratorios.
- Los dos laboratorios compartirán el pago de este servicio ya que el muestreo y el análisis será de beneficio para ambos.

- Evaluación de alternativa:

Gracias a haber analizado la alternativa 2, se puede deducir a grandes rasgos que el pago de este operario nuevo, que será contratado se hará por una empresa de outsourcing, lo cual facilitará la forma de pago ya que se hará compartido con los dos laboratorios. Se ha estimado por el DOP Propuesto (Anexo 19), que el operario únicamente implementará 16 minutos, aproximadamente, de su tiempo de operación en el muestreo y transporte de las muestras hacia el laboratorio de cañas, dejando así 14 minutos restantes que puede implementar en el mismo proceso pero para el laboratorio de planta.

De esta forma el ahorro es compartido ya que se tendrá un operario con un costo de día/hombre de Q52.00, inversión que se verá ahorrada en el tiempo que los demás operarios de laboratorio implementarán para realizar más análisis y proveer de pronósticos a la directiva sobre frentes de corte más contaminados, mejor determinación de niveles de eficiencia en extracción de jugos y azúcares finales, entre otros.

- Alternativa 4: “Realización de muestreo y análisis en planta.”
  - Consideraciones a tomar:
    - Se manejará el mismo nivel de personal lo cual implica no contrataciones extras.
    - Se deberá implementar el equipo necesario en la planta (se recomienda trasladar el equipo del laboratorio de caña al lugar dispuesto para realizar los análisis en la planta).
    - El operario del desinfectante hará el muestreo y el análisis de las muestras.
    - Con base a los resultados obtenidos se tomará la decisión del volumen de desinfectante que se aplicará en los tándem.

- Evaluación de alternativa:

Tomando como base los Anexos 18 y 19 se podrá observar que el colocar un laboratorio en el área de planta ahorra un total de 2 minutos con 20 segundos, reduciendo el tiempo de trabajo a un total de 14 minutos de trabajo para el laboratorio de caña y el mismo tiempo para el laboratorio de planta dejando así un margen de aproximadamente 2 minutos para toma de decisiones *in situ* de aplicación de desinfectante el instante de determinar una variación en los análisis. Para mejorar el proceso inclusive se plantea la implementación de un nuevo instrumento de muestreo que facilite el trabajo realizado (Anexo 18).

- Generalidad a tomar en cuenta:

- En todas las alternativas antes mencionadas, se deberá cumplir con:
  - Realizar muestreos y análisis cada hora.
  - Realizar muestreo sin falta de jugos primarios y diluidos de los ambos tándem.
  - Realizar muestreo y análisis de los jugos de caña de los frentes de corte.

- Este será con forme los camiones vayan llegando al laboratorio.
- Realizar corrida de ambos tándem una vez al día.
- Unificar información, independientemente si se han los análisis en el mismo laboratorio o por separado, cada 1 hora, luego de los análisis y antes del próximo muestreo.

Llevar historial de muestras, análisis y desinfectante aplicado a los tándem luego de obtenidos los resultados de los análisis.

#### D. Análisis Estadístico

1. Optimización de métodos y materiales para la evaluación y control de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Se utilizó muestras de los seis molinos para determinar la densidad microbiana total y de *L. mesenteroides* a lo largo de los molinos y su comparación con la temperatura. Las muestras de jugo primario, jugo diluido, jugo sulfitado y jugo alcalizado se utilizaron para determinar la densidad microbiana total y de *L. mesenteroides* previo al calentamiento. Los resultados de los recuentos se expresan como  $\log(\text{UFC/mL}) \pm \text{desviación estándar}$ . Se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas con el objetivo de determinar si la diferencia entre los recuentos es o no significativa con un nivel de confianza del 95%. Para poder determinar la relación lineal entre los recuentos y la temperatura se utilizó la prueba de varianzas F de Fisher con un nivel del confianza del 95%.

Para determinar si existe o no una diferencia significativa entre los recuentos en los dos medios propuestos por la etapa anterior del Megaproyecto (AM150 y AM200) y el medio de referencia (MSE), se empleó una prueba t de Student para muestras pareadas, con un nivel de confianza del 95%.

Para determinar las diferencias entre los recuentos, en los medios de cultivo sólidos basados en productos del ingenio, se utilizó una prueba t de Student para muestras pareadas con un nivel de confianza del 95%. Para evaluar los medios líquidos se realizaron análisis cualitativos del crecimiento microbiano.

Para comprobar la eficiencia del desinfectante por el método de MIC cada dilución de desinfectante y se comparó con la obtenida con el formaldehído en la dilución  $10^{-1}$ . Se calculó un coeficiente (halo de inhibición de desinfectante/ halo de inhibición de formaldehído), para cada una de las diluciones y se definió un valor a partir del cual un desinfectante era considerado efectivo (umbral de efectividad). Se empleó un gráfico de barras para representar la relación entre (halo de inhibición de desinfectante/halo de inhibición de formaldehído) y la dilución utilizada.

2. Identificación de dos bacterias aisladas de un caldo de extracción de sacarosa de la caña de azúcar y estudio de su proporción y sensibilidad a los desinfectante usados en comparación con la microbiota total. Los métodos de análisis estadístico que se usaron fueron de varios tipos, según los resultados que necesitaran ser procesados. Para comprobar la relación entre los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* y la temperatura en los molinos se podría usar una regresión lineal con un nivel de confianza del 90-95% utilizando la función de Analysis Toolpack del programa Microsoft Excel, 2002, Microsoft Corporation.

Para las determinaciones de diferencias entre los recuentos en los medios de cultivo se usaron análisis de gráficas y diagramas comparativos de porcentajes ya que se compararon los recuentos totales con la presencia de las bacterias nuevas identificadas para observar relaciones entre ellos y relaciones con los puntos distintos del proceso azucarero y temperaturas en ellos.

## VIII. RESULTADOS

### A. Optimización de métodos y materiales para la evaluación y control de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

1. Caracterización de jugos circulantes en el ingenio Pantaleón: Los promedios de la densidad de *L. mesenteroides* y microbiota total obtenida para los diversos jugos del tándem y del proceso se muestran en el Cuadro 12. Con las muestras obtenidas se estimó la densidad microbiológica de cada uno molinos y el los pasos siguientes, anteriores al calentamiento (Primario-Alcalización). La densidad de *Leuconostoc mesenteroides* y de la microbiota total disminuye de manera polinomial desde el primer molino (jugo primario) hasta el sexto molino (Figura 6 y 7).

Cuadro 12: Recuento de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total en los molinos y Primario-Alcalización y la temperatura de cada punto (n = 9).

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura</b>	<b>log<sub>10</sub>UFC de <i>L. mesenteroides</i> /cm<sup>3</sup> de jugo</b>	<b>log<sub>10</sub>UFC de microbiota total /cm<sup>3</sup> de jugo</b>
Jugo Primario	28.75	5.02±0.30	5.71±0.35
Molino 2	37.5	4.64±0.22	5.55±0.78
Molino 3	38.25	4.07±0.09	4.70±0.19
Molino 4	41.5	3.33±1.17	4.53±0.20
Molino 5	45	2.96±0.94	3.66±0.53
Molino 6	49.5	2.06±0.88	2.78±0.27
Jugo Diluido	32.5	5.16±0.20	5.68±0.40
Jugo Sulfitado	33.5	4.43±0.26	5.11±0.27
Jugo Alcalizado	38	4.45±0.35	5.66±0.82
Jugo Filtrado	60.25	1*	1*

\*En el jugo filtrado los resultados obtenidos para *L. mesenteroides* y microbiota total son menores a 1.

Figura 6: Disminución del recuento de *Leuconostoc mesenteroides* en distintos puntos del tándem (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente).

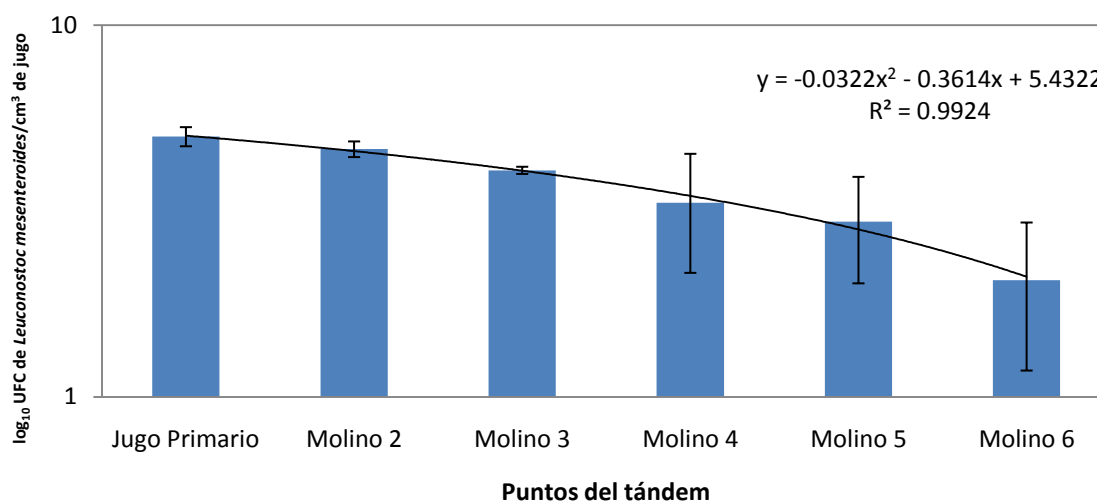
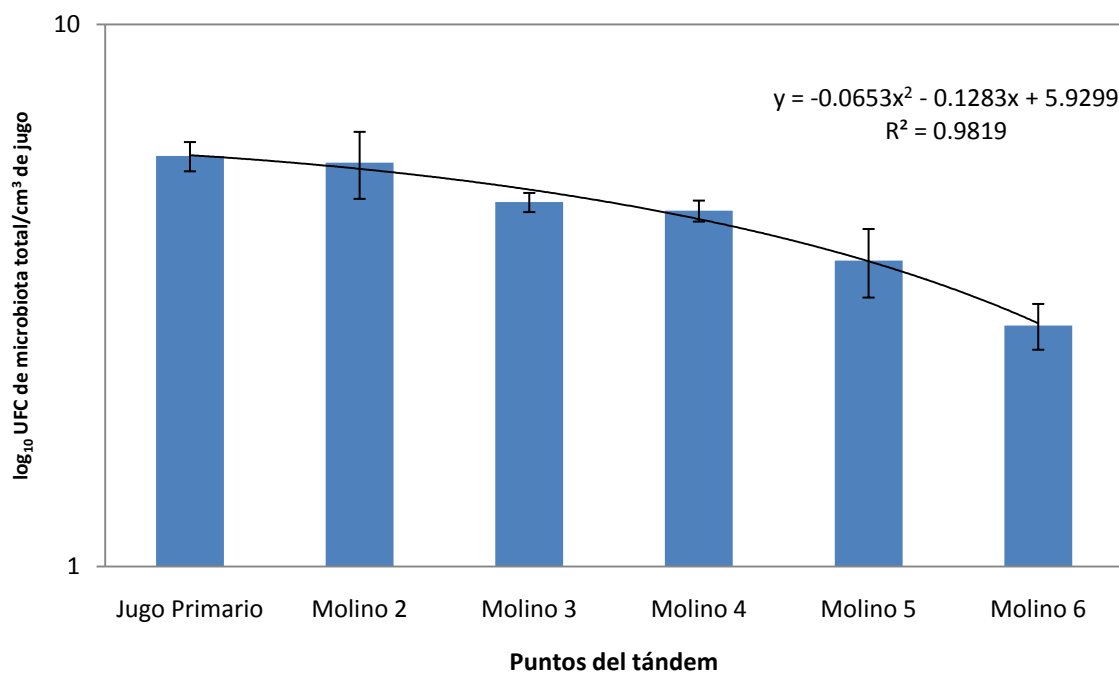


Figura 7: Disminución del recuento de microbiota total en distintos puntos del tándem (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente).



De acuerdo con los resultados se logró establecer una relación lineal con  $\alpha=0.05$  entre el recuento de *L. mesenteroides* y de microbiota total y la temperatura a lo largo de los molinos (Figura 8 y 9, Anexo C1 y C2).

Figura 8: Relación lineal entre recuento de *L. mesenteroides* y temperatura a lo largo de los molinos del tándem (n = 9, por medio de un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad se determinó que existe una relación lineal entre el recuento de *L. mesenteroides* y la temperatura a lo largo de los molinos del tándem).

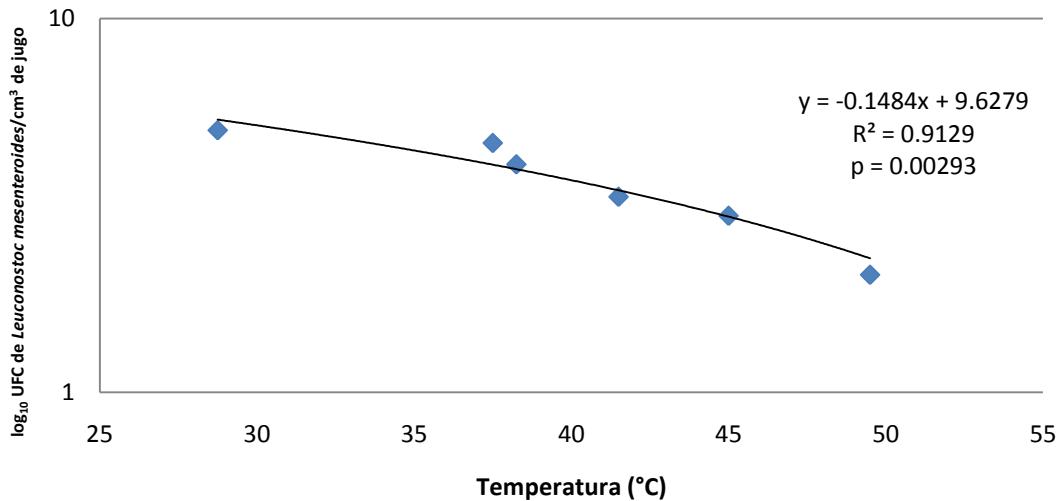
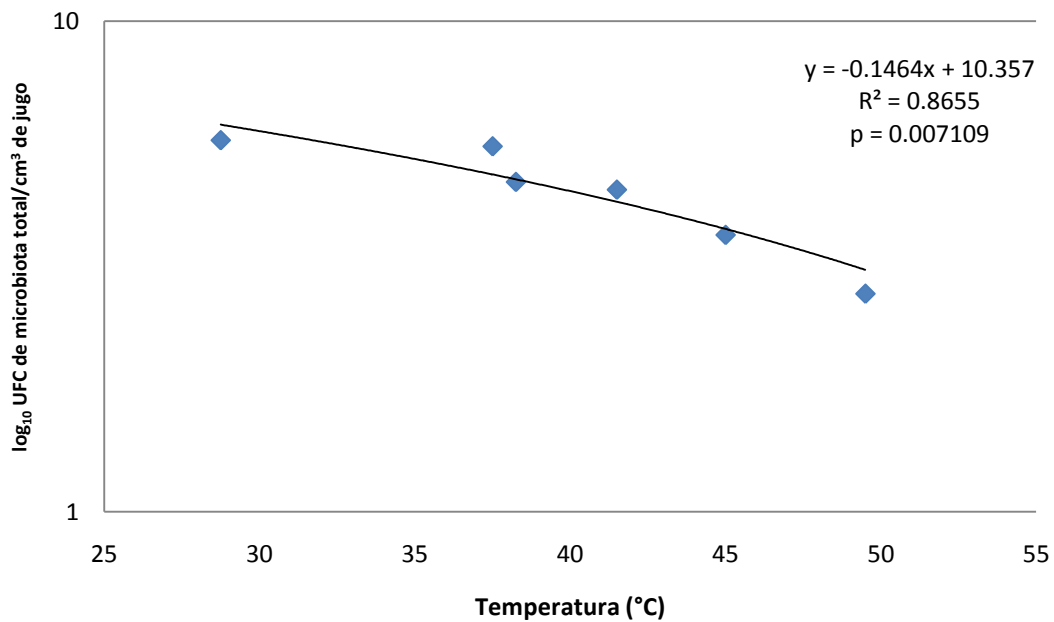
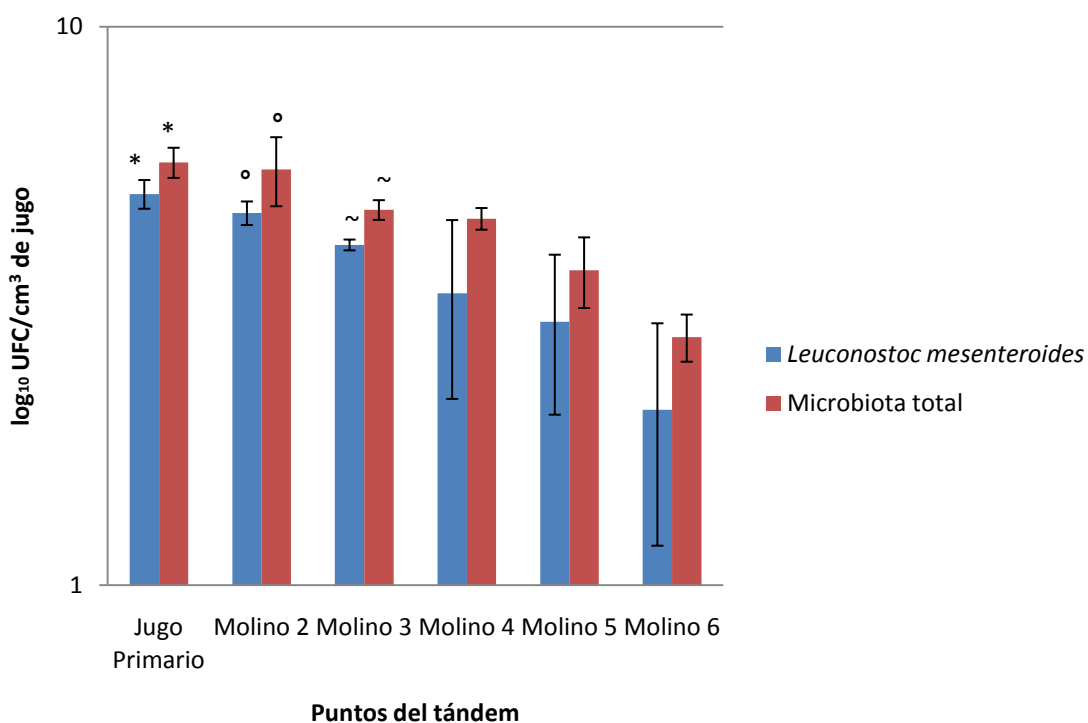


Figura 9: Relación lineal entre recuento de microbiota total y temperatura a lo largo de los molinos del tándem (n = 9, por medio de un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad se determinó que existe una relación lineal entre el recuento de microbiota total y la temperatura a lo largo de los molinos del tándem).



Se comparó la densidad de *Leuconostoc mesenteroides* con respecto a la microbiota total en cada molino. Se determinó que la densidad de *L. mesenteroides* es significativamente menor que la densidad de microbiota total en los primeros molinos (Figura 10, Anexo C3).

Figura 10: Comparación de recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total a lo largo del tándem (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* y microbiota total en el jugo primario (\*), en el molino 2 (°) y en el molino 3 (~)).



La densidad de *Leuconostoc mesenteroides* y de la microbiota disminuye significativamente del jugo diluido al jugo sulfitado, utilizando un nivel de confianza del 95% (Figura 11 y 12, Anexo C4 y C5).

Figura 11: Comportamiento de *Leuconostoc mesenteroides* en Primario-Alcalización (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* en el jugo diluido y el jugo sulfitado (\*)).

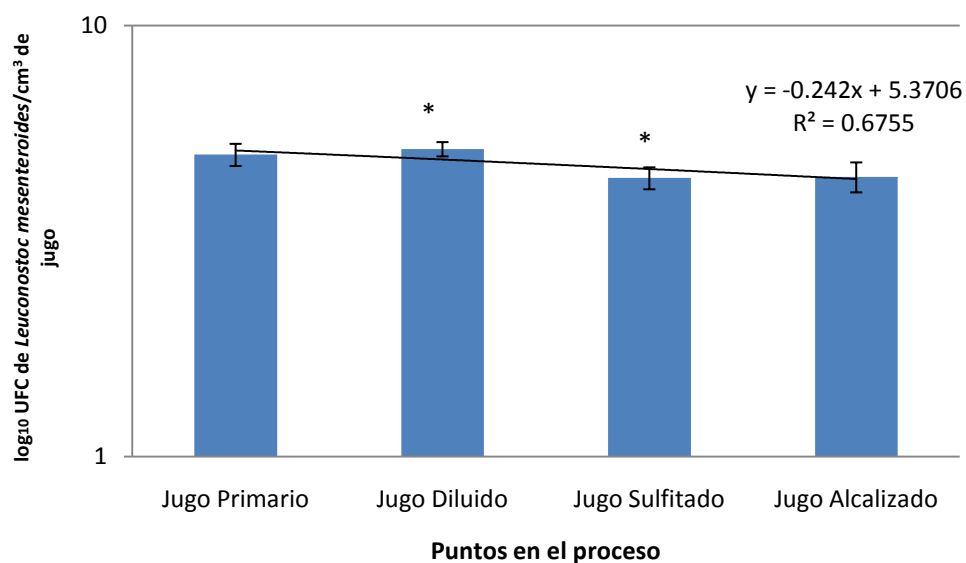
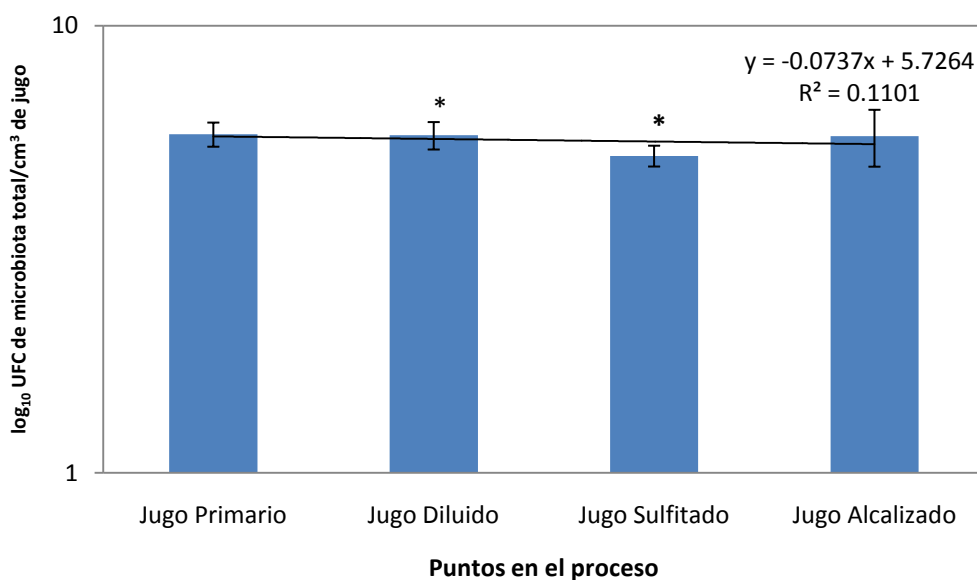
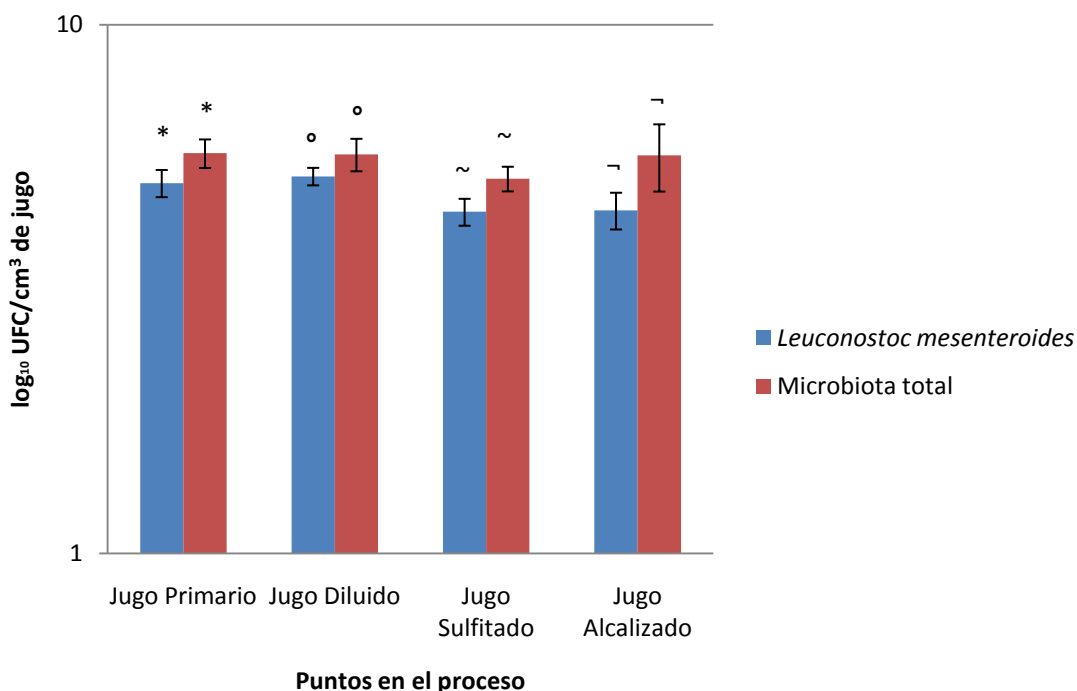


Figura 12: Comportamiento de microbiota total en Primario-Alcalización (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos de microbiota total en el jugo diluido y el jugo sulfitado (\*)).



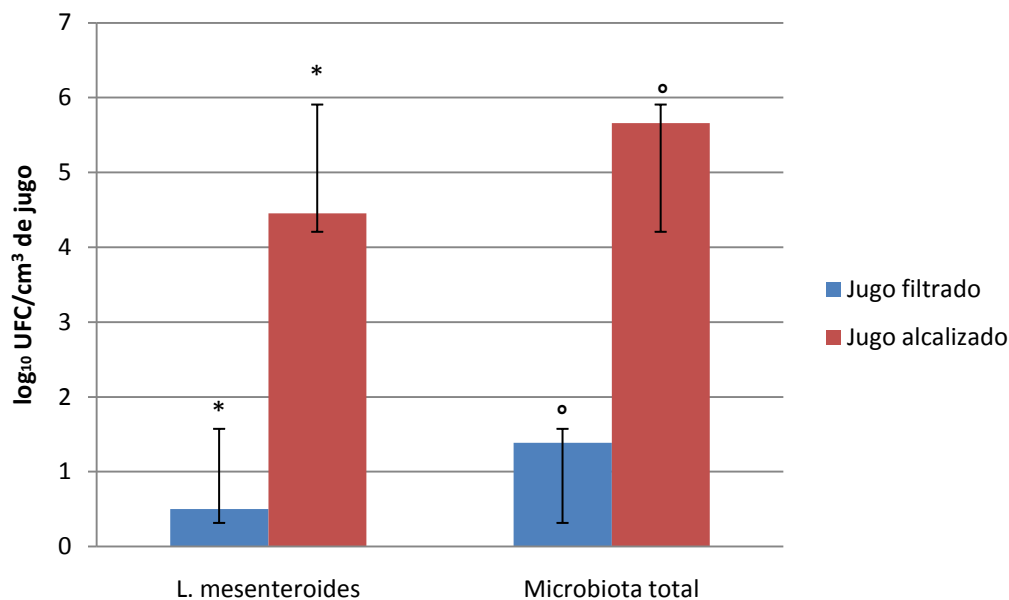
Se comparó la densidad de *Leuconostoc mesenteroides* con respecto a la microbiota total en cada jugo a lo largo del proceso. Se determinó que la densidad de *L. mesenteroides* es significativamente menor que la densidad de microbiota total (Figura 13, Anexo C8).

Figura 13: Comparación de recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total en Primario-Alcalización (n = 9, barra de error de desviación estándar correspondiente. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* y microbiota total en el jugo primario (\*), en el jugo diluido (°), en el jugo sulfitado (~) y en el jugo alcalizado (¬).



Se comparó los resultados de jugo filtrado con los obtenidos para el jugo alcalizado. Se determinó que la densidad de *L. mesenteroides* son significativamente menores en el jugo filtrado que en el jugo alcalizado, de igual manera al comparar la densidad de microbiota total, con un nivel de confianza del 95% (Figura 14, Anexo C10).

Figura 14: Comparación de recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total en jugo filtrado y jugo alcalizado (n = 9, barra de error con una desviación estándar de 1. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* en el jugo filtrado y jugo alcalizado (\*) y entre los recuentos de microbiota total en el jugo filtrado y jugo alcalizado (°)).



## 2. Optimización medios costo-efectivos para el desarrollo de *L. mesenteroides*:

a. Evaluación de medios sólidos propuestos por etapa anterior de Megaproyecto: Se comprobó que no existe una diferencia significativa en el crecimiento de *L. mesenteroides*, a lo largo del tándem y en Primario-Alcalización, en los distintos medios experimentales propuestos por la fase anterior del Megaproyecto (AM150 y AM200) y el medio de referencia (MSE) con un prueba t de Student para dos muestras,  $\alpha$  de 0.05 (Figura 15 y 16, pruebas t de Student no mostradas).

Figura 15: Comparación de recuperación de *L. mesenteroides* en el medio de referencia (MSE) y los medios experimentales (AM150 y AM200) a lo largo del tándem (n = 4, barra de error con un valor corregido de 1. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que no existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* obtenidos en los diferentes medios).

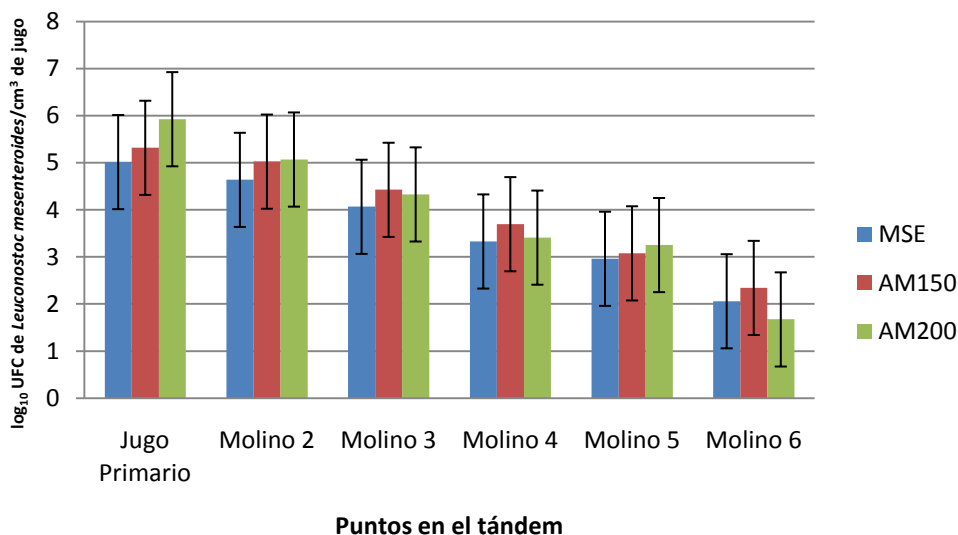
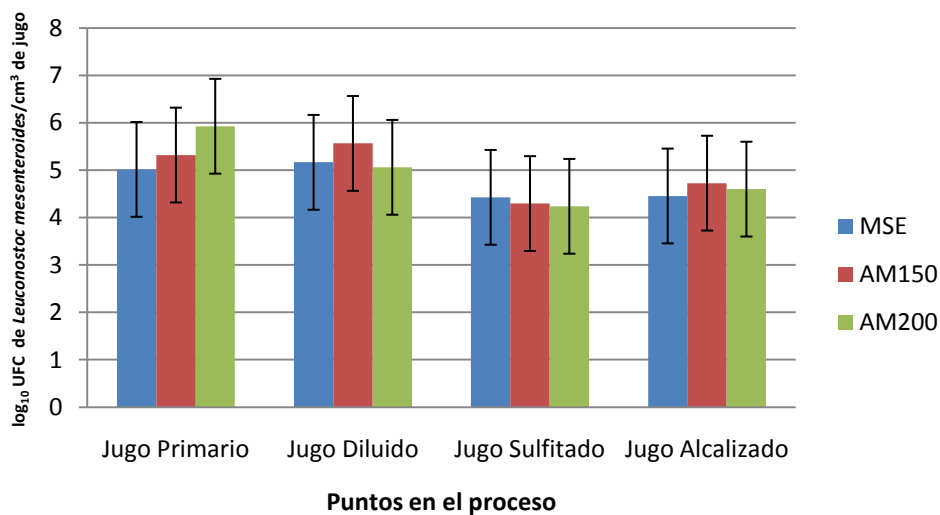


Figura 16: Comparación de recuperación de *L. mesenteroides* en medio de referencia (MSE) y medios experimentales (AM150 y AM200) en Primario-Alcalización (n = 4, barra de error con un valor corregido de 1. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que no existe una diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* obtenidos en los diferentes medios).



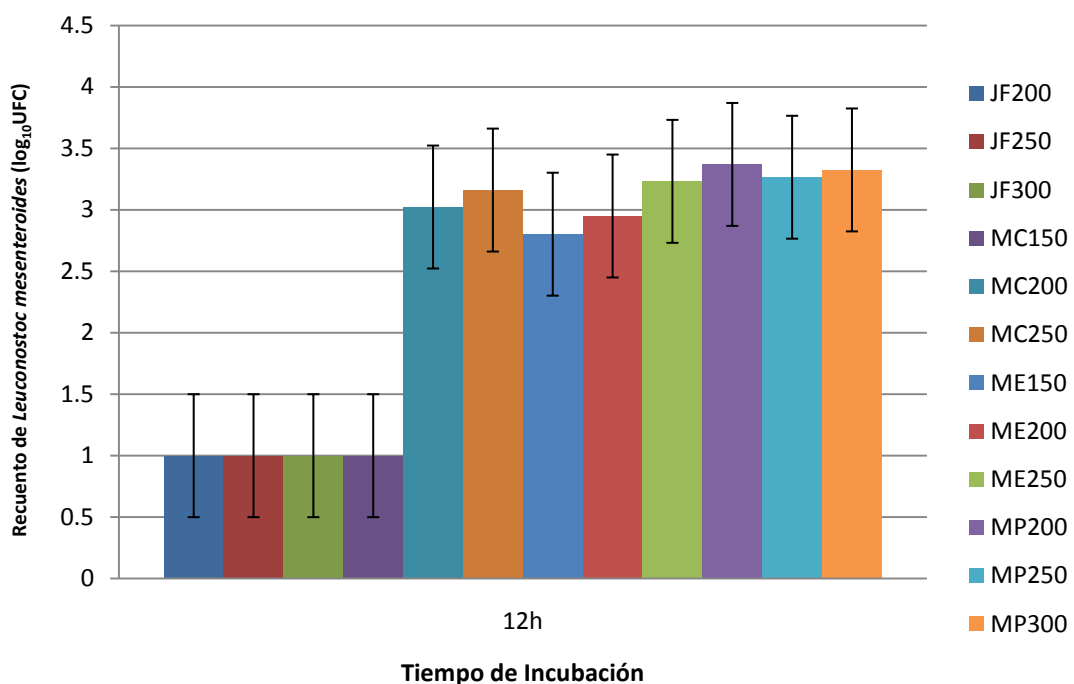
## b. Medios de cultivo sólidos a partir de productos del ingenio:

Cuadro 13: Diferencias de recuperación y morfología de colonias de *L. mesenteroides* en los distintos medios de cultivo sólidos experimentales.

Medio	12 horas de incubación		24 horas de incubación		72 horas de incubación	
	Recuperación	Morfología	Recuperación	Morfología	Recuperación	Morfología
JF200	-	-	-	-	-	-
JF250	-	-	-	-	-	-
JF300	-	-	-	-	-	-
MC150	-	-	+	Pequeñas	+	Pequeñas
MC200	+	Pequeñas	+	Pequeñas	+	Medianas
MC250	+	Medianas	+	Grandes	+	Grandes
ME150	+	Pequeñas	+	Pequeñas	+	Pequeñas
ME200	+	Medianas	+	Grandes	+	Grandes
ME250	+	Pequeñas	+	Grandes	+	Grandes
MP200	+	Medianas	+	Grandes	+	Dextrana
MP250	+	Medianas	+	Grandes	+	Dextrana
MP300	+	Medianas	+	Grandes	+	Dextrana

Se determinó que los medios sólidos de JF no son eficientes para el crecimiento de *L. mesenteroides* (Figura 17). Posiblemente se debe a que la concentración no es lo suficiente para el desarrollo de la bacteria o la composición del JF no contiene los componentes esenciales.

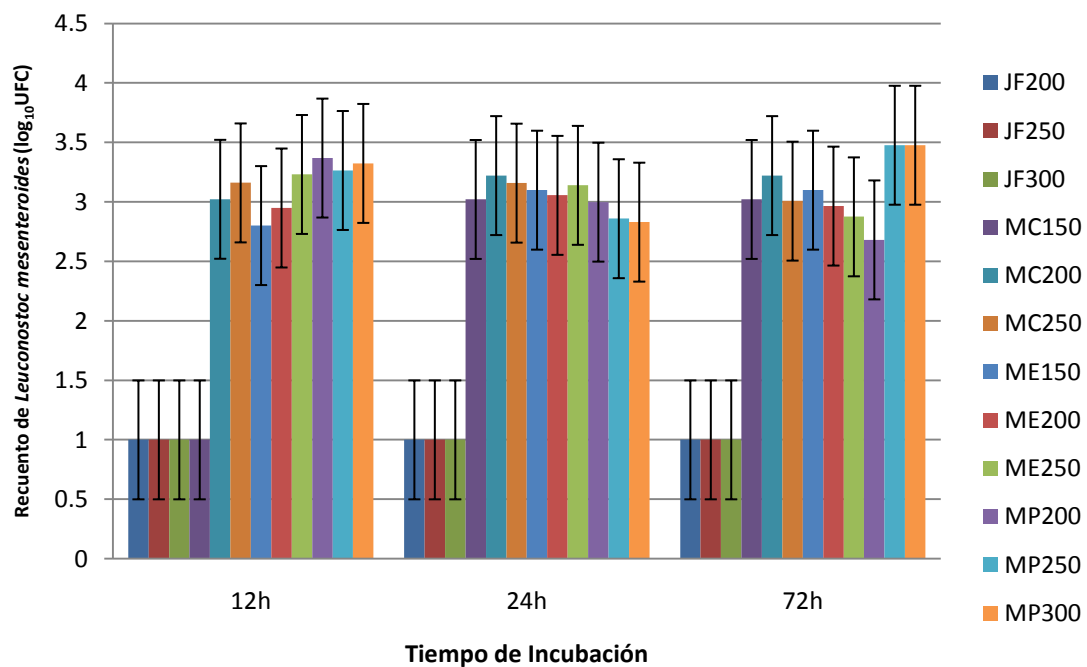
Figura 17: Comparación de recuento de *Leuconostoc mesenteroides* a las 12 horas de incubación en medios experimentales (n = 3, barra de error con un valor corregido de 0.5. Se utilizó un factor de corrección de 1).



Los medios experimentales que mostraron mayor recuperación son los medios de MP, mostrando los mayores recuentos en la concentración más baja (MP 200), pero la mayor recuperación en las concentraciones más altas (MP300).

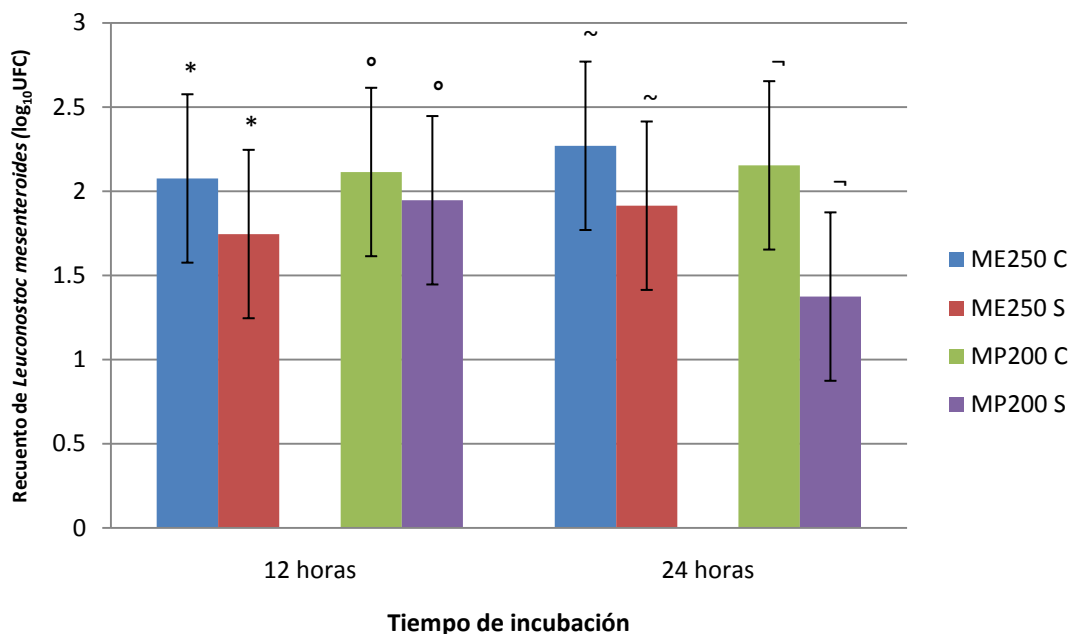
Además de comparar la recuperación en los diferentes medios experimentales, se comparó el tiempo de incubación para el crecimiento de *L. mesenteroides*. Los recuentos de *L. mesenteroides* fueron mayores a las 12 horas de incubación, al compararlos con los recuentos a las 24 y 72 horas (Figura 18).

Figura 18: Comparación de recuento de *Leuconostoc mesenteroides* a las 12, 24 y 72 horas de incubación en medios experimentales (n = 3, barra de error con un valor corregido de 0.5. Se utilizó un factor de corrección de 1. Debido a que no era posible el conteo de las placas MP250 y MP300 a las 72h se utilizó 300 UFC para representarlo).



Debido a que se busca disminuir los costos de los medios experimentales propuestos, se evaluó los medios sólidos (con mayor recuperación) con Citrato de Sodio y Azida de Sodio (inhibidores de crecimiento microbiano) y sin inhibidores. Se determinó que existe una diferencia significativa entre los recuentos en los medios con y sin inhibidores, con un  $\alpha$  de 0.05 (Figura 19, Anexo C12).

Figura 19: Comparación de recuento de *Leuconostoc mesenteroides* a las 12 y 24 horas de incubación en medios experimentales con (C) y sin (S) Citrato y Azida de Sodio ( $n = 3$ , barra de error con un valor corregido de 0.5. Con una prueba t de Student con 95% de confiabilidad se determinó que existe diferencia significativa entre los recuentos de *L. mesenteroides* obtenidos en ME250C y ME250S a las 12h ( $^{\circ}$ ), en MP200C y MP200S a las 12h ( $\sim$ ), en ME250C y ME250S a las 24h ( $\sim$ ) y en MP200C y MP200S a las 24h ( $\neg$ ).



Se determinó que el medio de cultivo de elección es el MP200S. Para ello se consideró el tiempo de recuperación y morfología de las colonias de *L. mesenteroides*, así como la disponibilidad y costo de la materia prima (Cuadro 14).

Cuadro 14: Comparación en tiempo de análisis, morfología de colonias, disponibilidad de materia prima y costo de los medios MSE, AM150 y AM200S.

Medio	Obtención de Resultados	Costo por litro	Disponibilidad Materia Prima
MSE	96 h	167.23	Por pedido a proveedor
AM150	24 h	71.89	Normalmente en mercado
MP200S	12 h	70.86	Siempre en ingenio

c. Medios de cultivo líquidos a partir de productos del ingenio: Los medios líquidos experimentales de JF no mostraron recuperación de *L. mesenteroides* a las 6 horas de incubación, como se observó en los otros medios líquidos experimentales. Además, se pudo observar que las concentraciones iniciales de los medios experimentales MC, ME y MP eran altas, por lo que no se observó crecimiento microbiano y se prepararon medios con soluciones más bajas. Los medios experimentales C mostraron crecimiento microbiano en todas las concentraciones, por lo que se continuó trabajando con concentraciones menores, buscando disminuir los costos del medio (Anexo D6).

En todos los medios líquidos experimentales, con menores concentraciones, hubo crecimiento de *L. mesenteroides* a las 6 horas de incubación con excepción del medio de C25 y MP75 (Anexo D7), por lo que se continuó trabajando con las concentraciones más bajas en las que hubo recuperación.

En busca de disminuir los costos de los medios experimentales propuestos, se evaluó los medios líquidos con Citrato de Sodio y Azida de Sodio (inhibidores de crecimiento microbiano) y sin inhibidores. Se determinó que no existe diferencia entre los medios con Citrato y Azida de Sodio y los medios que no tiene dichos componentes (Anexo D8).

Debido a que por la turbidez no se puede determinar cuantitativamente si existe una diferencia, se realizaron lecturas de la absorbancia a cada uno de los medios experimentales inoculados con *L. mesenteroides* (Cuadro 15).

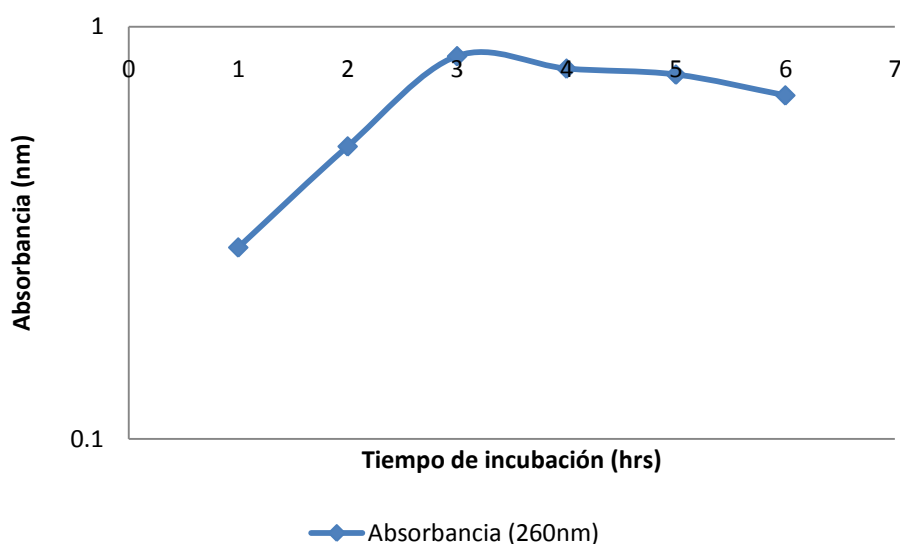
Cuadro 15: Absorbancia a 260nm de los distintos medios líquidos experimentales con diferentes componentes (para cada medio se utilizó su propio control).

	<b>Código Medio Experimental</b>	<b>Absorbancia (260nm)</b>
<b>Con citrato y azida de Na</b>	C50	1.5712
	MC25	1.8035
	ME25	1.8928
	MP25	1.8668
<b>Sin citrato y azida de Na</b>	C50	1.7082
	MC25	1.8983
	ME25	1.6714
	MP25	2.3275

Se pudo observar crecimiento bacteriológico en todos los medios de cultivo experimentales, con y sin Citrato y Azida de Sodio. Debido a que se busca un medio costo-efectivo se continuó trabajando con los medios sin Citrato y Azida de Sodio.

3. Evaluación de actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*: Para determinar la fase estacionaria de la curva de crecimiento de *L. mesenteroides* se realizaron lecturas de absorbancia cada hora durante 6 horas de incubación, utilizando el medio líquido MP25S (Figura 20).

Figura 20: Curva de crecimiento de *L. mesenteroides* en medio líquido MP25.



Se determinó la actividad enzimática de la cepa aislada de *L. mesenteroides* utilizando una muestra con 6 horas de incubación por medio del método de DNS. Se determinó que el método de DNS es efectivo para la determinación de la producción de azúcares reductores (Cuadro 16). Además, se observó que no hay diferencia entre la absorbancia de azúcares reductores obtenida en la solución con sacarosa y la solución con azúcar morena utilizando el método DNS (Cuadro 17).

Cuadro 16: Absorbancia de azúcares reductores por métodos espectrofotométricos (Resorcinol Tiourea y DNS).

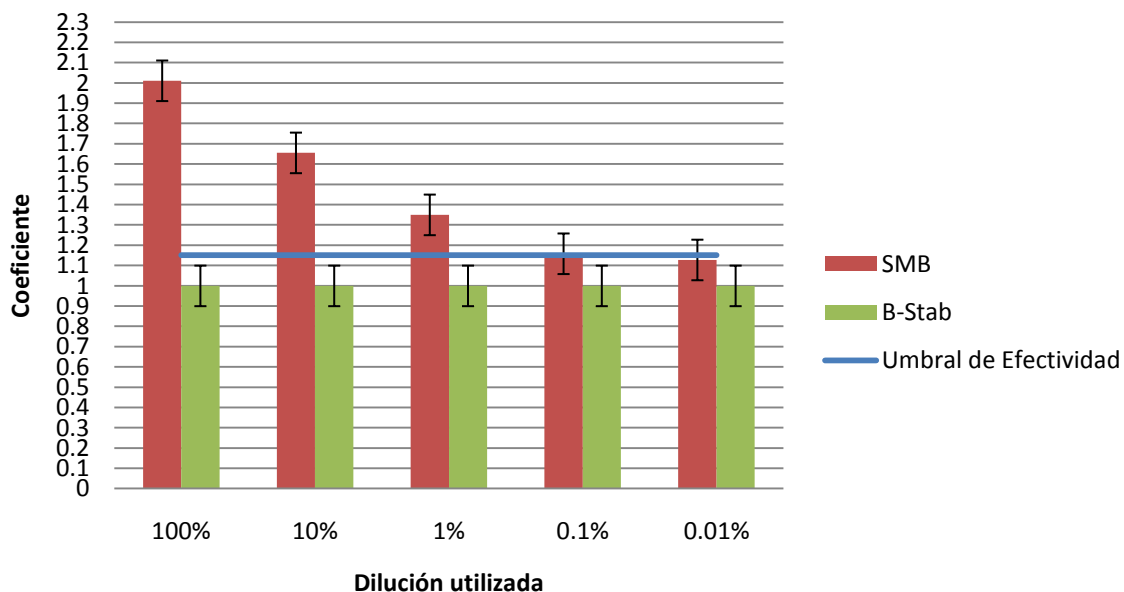
Muestra	Absorbancia (520nm)	Absorbancia (575nm)
	Resorcinol-Tiourea	Dinitrosalicílico
Sacarosa	1.600	-0.008
Sacarosa-Glucosa	1.464	0.579
Sacarosa-Fructosa	0.749	1.420
Sacarosa-Glucosa-Fructosa	0.164	1.997
Fructosa	1.256	>3.170
Glucosa	0.047	2.064
Fructosa-Glucosa	0.262	>2.740

Cuadro 17: Determinación de actividad enzimática de *L. mesenteroides* en solución de sacarosa y solución de azúcar morena, con una hora de incubación (método DNS).

Solución	Sacarosa	Azúcar morena
Absorbancia (575nm)	0.111	0.113

4. Evaluación de bactericidas por métodos microbiológicos: Se evaluó los bactericidas SMB y Beta-Stab, utilizando actualmente en el ingenio Pantaleón. Se utilizó como coeficiente mínimo para considerar un desinfectante efectivo el establecido por la fase anterior del Megaproyecto (umbral de efectividad = 0.15, determinado a partir de los resultados obtenidos de MIC por Lou 2008. Este valor corresponde al halo mínimo de inhibición (0.5cm, punteo 1, comparado con el halo del formaldehído  $3.27 \pm 0.48$ cm, punteo 6)). De los dos bactericidas, el SMB es el más eficiente para la inhibición del crecimiento de la cepa aislada de *L. mesenteroides* (Figura 21).

Figura 21: Comparación de la efectividad de dos bactericidas utilizados en el ingenio Pantaleón contra *Leuconostoc mesenteroides* aislado de los jugos de caña. (n = 6, barra de error con un valor corregido de 0.1. Se utilizó un factor de corrección de 1).



B. Identificación de dos bacterias aisladas de un caldo de extracción de sacarosa de la caña de azúcar y estudio de su proporción y sensibilidad a los desinfectante usados en comparación con la microbiota total.

Figura 22: Proporción de cada tipo de morfología bacteriana con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem A, en dos tomas de muestra.

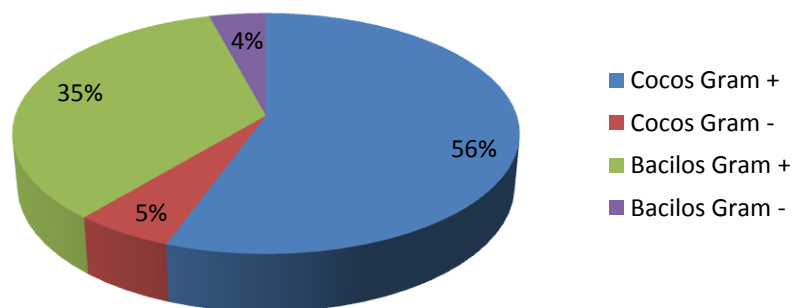


Figura 23: Proporción de cada tipo de morfología bacteriana con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem B, en una toma de muestra.

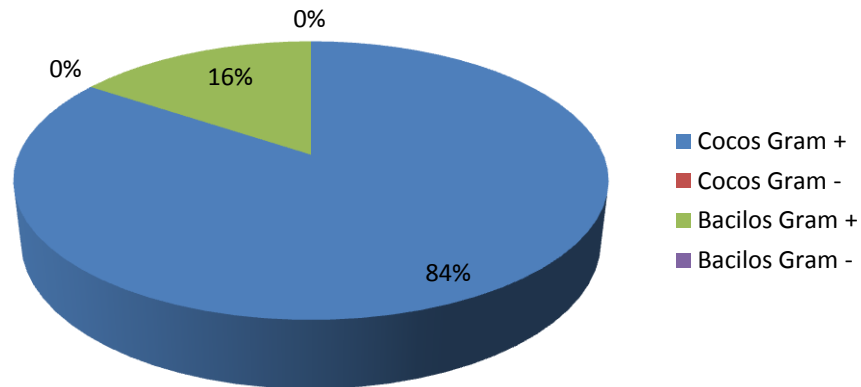


Figura 24: Proporción de cada tipo de morfología de colonia con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem B, en una toma de muestra.

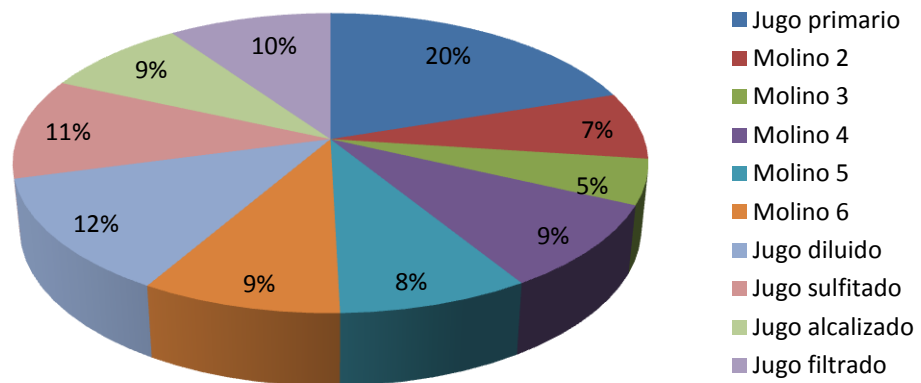
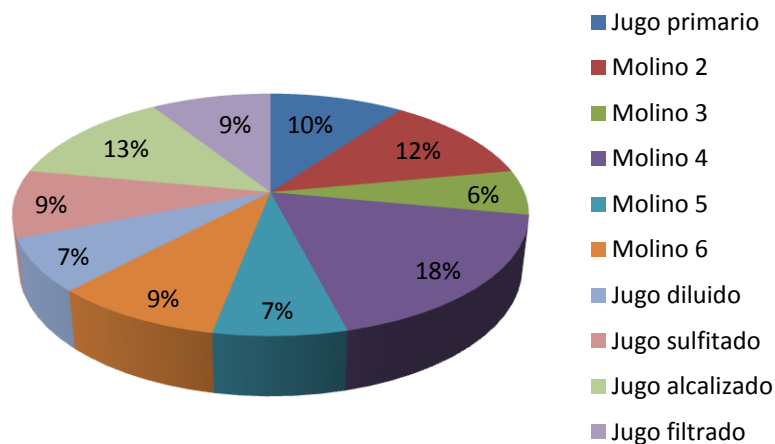


Figura 25: Proporción de cada tipo de morfología de colonia con respecto a un total, dentro del total de muestras tomadas en el tándem A, en una toma de muestra.



Cuadro 18: Características de la bacteria aislada en mayor proporción después de *L. mesenteroides*, que se presume identificada como *B. stearotermophilus*.

Prueba	Resultado 24h	Presunción de identificación
SIM (movilidad)	-	<b><i>Bacillus Stearotermophilus</i></b>
Indol	-	
Urea	+/-	
LIA	-	
Citrato	-	
TSI	Ácido	
NaCl 3%	-	
Nacl 6%	-	
Catalasa	+	
OF	F/O	
Arabinosa	-	
Fructosa	-	
Lactosa	-	
Maltosa	-	
Manosa	-	
Rojo de Metilo	-	
Voges Proskauer	-	

Cuadro 19: Características de la segunda bacteria aislada en mayor proporción después de *L. mesenteroides* y *B. stearothermophilus*, que se presume identificada como *L. casei*.

Prueba	Resultado 24H	Presunción de Identificación
SIM (movilidad)	-	<i>Lactobacillus casei</i>
Indol	-	
Urea	+	
LIA	-	
Citrato	-	
TSI	Ácido	
NaCl 3%	-	
Nacl 6%	-	
Catalasa	-	
OF	F	
Arabinosa	-	
Fructosa	+	
Lactosa	+	
Maltosa	+	
Manosa	+	
Rojo de Metilo	-	
Voges Proskauer	-	

Figura 26: Aumento del  $\log_{10}$  UFC de *B. stearothermophilus/cm^3* de jugo en función del cambio de temperatura de los distintos productos del tándem B. No se observa una relación lineal ya que las temperaturas altas favorecen el crecimiento de esta bacteria.

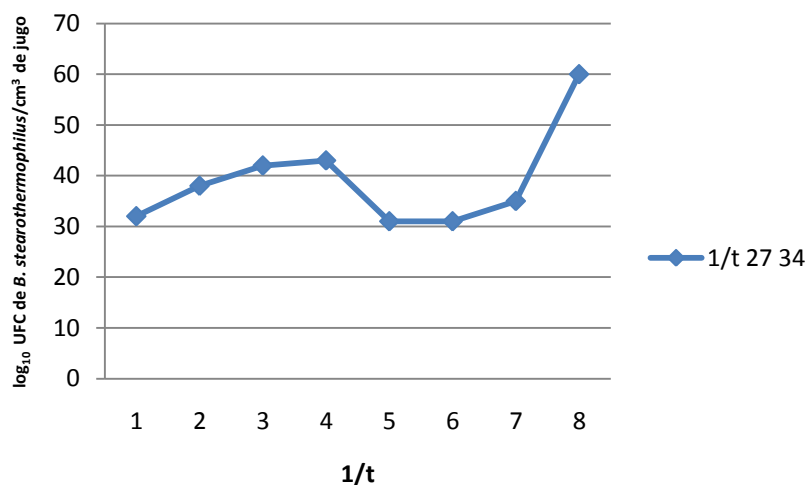


Figura 27: Inhibición del crecimiento por parte del bactericida SMB en distintas concentraciones, de distintas muestras sembradas en agar Mueller Hinton

(n = 1, barra de error con un valor corregido de 0.1.

Se utilizó un factor de corrección de 1).

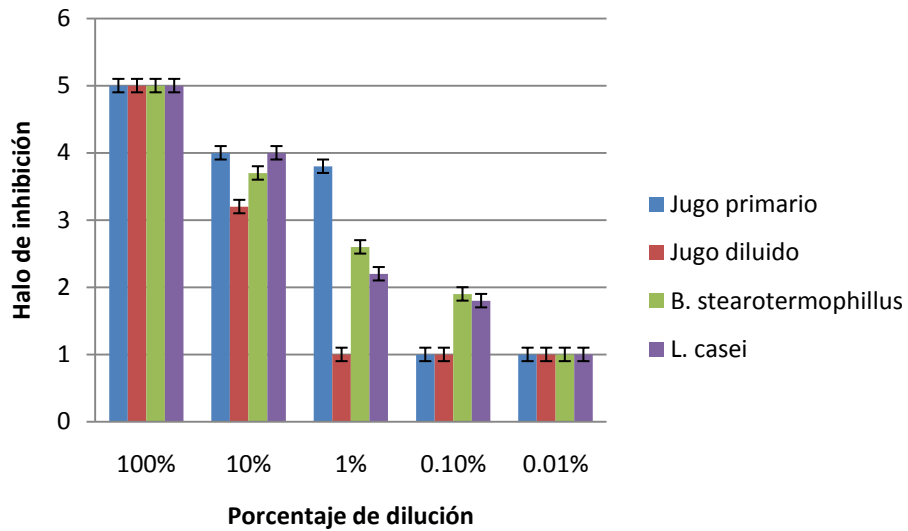
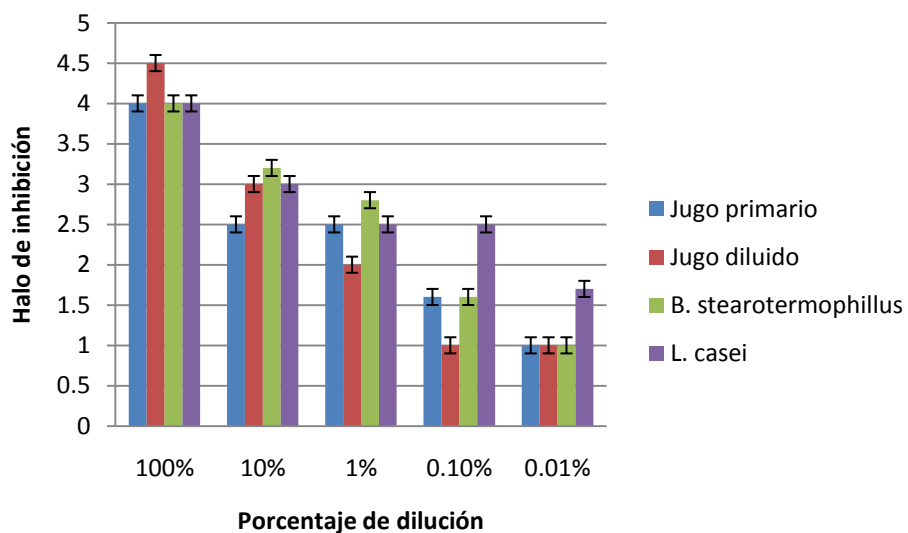


Figura 28: Inhibición del crecimiento por parte del bactericida  $\beta$ -stab en distintas concentraciones, de distintas muestras sembradas en agar Mueller Hinton

(n = 1, barra de error con un valor corregido de 0.1.

Se utilizó un factor de corrección de 1).



Con el estudio de las alternativas propuestas, se ha llegado a una decisión de sugerir al ingenio la implementación de la alternativa 4 “Realización de muestreo y análisis en planta” ya que en cuestión de tiempos y movimientos, realiza únicamente 53 movimientos y 12 traslados para cada operación (muestreo para laboratorio de cañas y muestreo para laboratorio de planta) en un tiempo total de 28 minutos con 25 segundos, dejando el tiempo restante para la toma de decisión de aplicación de desinfectante y el volumen y momento más adecuado acorde a los resultados del muestreo. El costo de esta alternativa será nulo, ya que se implementará un baño de María y se adquirirán tubos de ensayo y gradillas de laboratorios de cañas y de planta al no ser utilizados y ya el operario de planta es la misma persona que muestrea en los tándem y aplica el desinfectante, la diferencia vista en tiempo es que hará el proceso de una forma estándar, con un menor tiempo ya que pasaría de realizar los procesos cada hora en un total de 29 minutos y 33 segundos para un solo laboratorio a realizar los dos muestreos y análisis en un total de 28 minutos y 25 segundos cada, para ambos laboratorios en una hora.

## IX. DISCUSIÓN

La industria azucarera a nivel mundial, en particular la industria guatemalteca, se ve afectada por la contaminación microbiana, debido a que los jugos de caña brindan los nutrientes y el ambiente necesarios para el desarrollo de los mismos. Como consecuencia del daño causado por los microorganismos, principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, existe una disminución del rendimiento y eficacia en los procesos, reduciendo la calidad del producto y causando pérdidas económicas.

El ingenio Pantaleón cuenta con un sistema de monitoreo diario del proceso. A pesar de ello, no disponen de métodos microbiológicos adecuados y sencillos para la evaluación de la densidad de *L. mesenteroides* u otros microorganismos, ni para la evaluación de la efectividad de los bactericidas sobre los mismos.

Los resultados obtenidos en el trabajo son parte del esfuerzo que se está realizando para proveer a la industria de métodos microbiológicos que contribuyan al sistema integral de control de *Leuconostoc mesenteroides*.

### A. Caracterización de jugos circulantes en el ingenio Pantaleón:

Los coeficientes de correlación obtenidos para la disminución de manera polinomial son aceptables debido a que son cercanos a uno. El patrón de disminución puede deberse al agotamiento de sustrato, disminución de nutrientes y aumento de la temperatura a lo largo del tándem. Al comparar los resultados con los obtenidos en la unidad estudiada anteriormente, se observó que en ambos ingenios la densidad microbiana sigue una misma tendencia a lo largo del tándem.

En la información del Cuadro 12, se relaciona el incremento de la temperatura con la disminución de la densidad microbiana. El aumento de la temperatura a lo largo del tándem se produce para obtener la lixiviación de la sacarosa con la adición de agua

caliente (60-80°C) en el último de los molinos. Se estableció una relación lineal entre la densidad de *L. mesenteroides* y la temperatura del tándem, con un coeficiente de correlación de 0.9129. El ajuste de los datos al modelo es significativo de acuerdo al análisis de varianza con F calculada (41.93613256) mayor que el F crítico (0.002930255), con un 95% de confianza. De igual manera, se estableció una relación con un coeficiente de correlación de 0.8655 entre la microbiota total y la temperatura a lo largo tándem. El ajuste de los datos al modelo es significativo de acuerdo al análisis de varianza con F calculada (25.74753285) mayor que el F crítico (0.007109484) con un 95% de confianza. En la unidad estudiada anteriormente también se pudo establecer una relación lineal entre la densidad microbiana y la temperatura de los molinos, por lo que se puede utilizar el aumento de la temperatura para predecir de alguna manera la densidad microbiana.

Se determinó que la densidad de *L. mesenteroides* es significativamente menor que la densidad de la microbiota total en los molinos 1, 2 y 3, de acuerdo a la prueba t de student con P calculada para una cola menor que  $\alpha$ . La mayor diferencia de densidades se observó en el molino 3, para el cual se tuvo una P (una cola) de 0.001775408, para un  $\alpha$  de 0.05. Con estos resultados se puede observar que el tándem hace una selección con respecto a la eliminación de *Leuconostoc mesenteroides* frente a la microbiota total, principalmente por el aumento de temperatura. Esta selección es un aspecto a tomar en cuenta para el futuro desarrollo de tratamientos específicos contra *L. mesenteroides*, ya que por la tendencia observada los tratamientos deben enfocarse en los primeros molinos del tándem y no en los últimos.

Se estableció que la densidad de *L. mesenteroides* y de microbiota total disminuyen significativamente del jugo diluido al jugo sulfitado, la cual se demostró con una prueba t de Student. Esta disminución de la densidad microbiana puede deberse a que el anhídrido sulfuroso tiene la capacidad de inhibir la actividad de bacterias lácticas, grupo al que pertenece *L. mesenteroides*. La temperatura no se considera un factor influyente en la disminución de la densidad debido a que no existe diferencia entre la temperatura del jugo diluido y el jugo sulfitado. Debido a que el jugo primario y el jugo diluido están

muy relacionados entre sí, se comparó la densidad microbiana entre ellos, para lo que se estableció que no existe una diferencia significativa entre la densidad de *L. mesenteroides* y la de microbiota total, con un nivel de confianza del 95%. Además, se puede observar en la Figura 13 que no hay diferencia entre la densidad microbiana de jugo diluido y la del jugo alcalizado. El descenso observado en el jugo sulfitado debe continuar siendo estudiado, así como también el aumento de la densidad microbiana del jugo sulfitado al jugo alcalizado.

De acuerdo a observaciones realizadas por trabajadores del ingenio el jugo filtrado podía ser una de las principales fuentes de aumento microbiano. Por ello se realizaron los análisis pertinentes y se determinó que la densidad de *L. mesenteroides* y la de microbiota total son significativamente menores en el jugo filtrado al compararlo con las densidades observadas en el jugo alcalizado, jugo al cual se une el jugo filtrado. Por lo anterior, se pudo probar que el jugo filtrado no tiene influencia alguna sobre el aumento de la densidad microbiana por lo que puede no considerarse para estudios futuros.

Por los resultados obtenidos se evidencia la importancia de realizar más estudios de los jugos circulantes, debido a que no existe literatura disponible al respecto. Además, se pudo observar la importancia microbiológica de dichos estudios ya que se determinó que la microbiota continua estando presente hasta el proceso de calentamiento, incluyendo la etapa de sulfitación y alcalización que no había sido considerada hasta el momento, lo cual puede representar pérdidas de sacarosa y económicas para la industria.

## B. Optimización medios costo-efectivos para el desarrollo de *L. mesenteroides*

La búsqueda de medios de cultivo costo-efectivos se realizó con el objetivo de producir grandes cantidades de *Leuconostoc mesenteroides* para el futuro desarrollo de tratamientos biológicos.

1. Evaluación de medios sólidos propuestos por etapa anterior de Megaproyecto: No se determinó una diferencia significativa entre MSE y los medios AM150 y AM200. Por

medio de las observaciones realizadas durante el estudio se pudo determinar que en los medios AM150 se favorece el crecimiento de *L. mesenteroides* y de otras bacterias, debido a que se observó colonias de color blanco y amarillo, las cuales no son características de *L. mesenteroides*. A pesar de lo anterior, se observó producción de dextrana en grandes cantidades, lo que indica una recuperación alta de *L. mesenteroides*. Por ello se recomienda realizar más estudios utilizando los medios AM150 con el objetivo de mejorar el medio y que el mismo sea específico para *L. mesenteroides*.

Por las observaciones del crecimiento microbiano en los medios AM200, se pudo determinar que es más específico para *L. mesenteroides*, pero el crecimiento del mismo es más lento. Además, se pudo observar que la recuperación en los medios AM200 es menor que en AM150.

2. Medios de cultivo sólidos a partir de productos del ingenio: Para continuar con la búsqueda de medios de cultivo costo-efectivos, que muestren una recuperación de *L. mesenteroides* eficiente en un período de tiempo corto, se evaluó productos del proceso azucarero como componentes de medios de cultivo sólidos. Los productos intermediarios del proceso tienen la ventaja de ser más baratos que los productos terminados, además de que conservan más nutrientes (coenzimas, factores de crecimiento, proteínas, vitaminas, entre otros), por lo que cuentan con las condiciones necesarias para el desarrollo microbiano.

Los medios de cultivo sólidos pueden ser empleados para dos diferentes procesos, recuento de *L. mesenteroides* en jugos y producción de *L. mesenteroides* en gran escala. En términos generales, los medios de cultivo de meladura evaporada y miel primera muestran una recuperación considerable de *L. mesenteroides* al compararlo con los otros medios.

Los medios de cultivo para recuento deben mostrar una mayor recuperación, menor cantidad de contaminantes y un tiempo corto de incubación. De acuerdo a las observaciones y conteos realizados, el medio MP200 es el más adecuado para realizar

conteos microbianos a los jugos circulantes en el ingenio. Los medios MP200 mostraron una recuperación alta luego de 12 horas de incubación y a las 24 horas se podía observar producción de dextrana en el medio.

Para los medios de cultivo de producción a gran escala el factor más importante a considerar es el crecimiento rápido de *L. mesenteroides*. En el caso del medio MP300 se observó producción de dextrana a las 12 horas, por lo que se puede considerar un crecimiento acelerado de *L. mesenteroides* al compararlo con el medio MSE, en el cual requiere un tiempo de incubación de 72 horas para su crecimiento. Para poder determinar si el medio MP300 es adecuado para recuento microbiano se deben realizar estudios de crecimiento de *L. mesenteroides* en tiempos menores a 12 horas.

Por la importancia que tienen los recuentos de *L. mesenteroides* en la industria azucarera, se continuó con estudios del medio MP200, buscando un medio costo-efectivo. Se comprobó que en los medios MP200 con inhibidores el crecimiento de *L. mesenteroides* era menor que en los medios sin inhibidores, posiblemente porque el citrato y azida de sodio no solo inhiben el crecimiento de otras bacterias sino que también retrasan el desarrollo de *L. mesenteroides*. Sin embargo, pueden ser utilizados como medios para realizar recuentos microbianos. Al contrario a lo observado en los medios con inhibidores, en los medios MP200 S el crecimiento de *L. mesenteroides* fue acelerado. Esto se determinó por la producción de dextrana a las 12 horas y por la sobreposición de las colonias, lo cual dificultaba el recuento de las mismas. Al igual que para los medios MP300, se deben realizar estudios de recuento antes de 12 horas de incubación.

3. Medios de cultivo líquidos a partir de productos del ingenio: Como método alternativo a los medios sólidos se evaluó medios de cultivo líquidos para el desarrollo de microorganismos y para poder determinar la actividad enzimática de *L. mesenteroides*. Por medio de pruebas iniciales se observó que a las 6 horas de incubación ya existe crecimiento microbiano en los medios líquidos, lo que muestra un crecimiento más rápido en los medios líquidos al compararlo con los medios sólidos. Además, se pudo

determinar que el JF no es un componente ideal de medios para el desarrollo de *L. mesenteroides*.

Los medios líquidos con cachaza fueron eliminados debido a que la cachaza precipitaba en el medio, lo cual dificultaba la observación del crecimiento bacteriano por medio de turbidez. Los medios de MC, ME y MP mostraron turbidez en los medios con una concentración al 2.5% (25mL/L). Los resultados obtenidos para la evaluación de medios líquidos con y sin inhibidores no mostraron diferencia. En ambos medios se observó turbidez, por lo que se consideró que hubo crecimiento microbiano.

Por medio de los resultados obtenidos por la absorbancia se determinó que los medios MP25 tienen una mejor recuperación de *L. mesenteroides*. Al comparar los medios MP25 con y sin inhibidores, la absorbancia obtenida para el medio sin inhibidor fue mayor (2.3275) con respecto al medio con inhibidores (1.8668).

Similar al caso de los medios sólidos, en los medios líquidos se observó una mejor recuperación de *L. mesenteroides* en los medios con miel primera, posiblemente se debe a que la miel contiene una alta cantidad de nutrientes, con respecto a los otros productos intermedios analizados. Además, se pudo observar que, tanto para los medios sólidos como líquidos, los medios sin inhibidores mostraron un crecimiento microbiano más acelerado que los medios con inhibidores.

#### C. Evaluación de actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*:

Se estableció que el método de DNS es más efectivo para la detección de azúcares reductores, principalmente fructosa. El método de Resorcinol-Tiourea no diferencia entre azúcares reductores y sacarosa, lo cual se observa con la absorbancia de sacarosa (1.600), valor más alto obtenido. Por el contrario, con el método de DNS la absorbancia obtenida para la solución de sacarosa fue negativa, y las absorbancias de las soluciones con fructosa (distintos porcentajes) muestran las lecturas más altas como se puede observar en

el Cuadro 14, a pesar de que por el DNS se pierde una parte del azúcar reductor a analizar.

Una vez determinado el método de detección de fructosa, se montó la técnica para la evaluación de la actividad enzimática de *L. mesenteroides*. Se determinaron las condiciones bajo las cuales se debe realizar el método. *L. mesenteroides* debe inocularse en un medio de MP25S (pH 6.8-7.2) e incubar por 6 horas. Este tiempo de incubación se estableció por la curva de crecimiento obtenida, en la cual se puede observar que entre las 4 y 6 horas *L. mesenteroides* se encuentra en la fase estacionaria, fase en la cual inicia la producción del enzima dextranasa. Para que la actividad de la enzima sea eficiente se requiere de soluciones con concentraciones altas de azúcar a un pH entre 5.5-5.8. El tiempo de incubación que se requiere para poder determinar la actividad enzimática a través del aumento de uno de los productos de la reacción (fructosa) es de 1 hora.

Se realizó una prueba inicial utilizando soluciones de sacarosa pura y de azúcar morena (concentración 1%), para lo cual no se observó diferencia entre los resultados obtenidos con 1 hora de incubación (Cuadro 17). Por lo anterior, se recomienda continuar con los análisis pertinentes y comparar la técnica propuesta con métodos más sencillos para la determinación de actividad enzimática.

#### D. Evaluación de bactericidas por métodos microbiológicos:

Se utilizó como estándar formaldehído, debido a era el bactericida empleado en la industria azucarera, discontinuado por su toxicidad. Con el formaldehído se observó que con una concentración al 10% es efectivo, con concentraciones menores ya no se observó halo de inhibición (resultados no mostrados).

El bactericida SMB es eficiente en cuanto a la inhibición de *L. mesenteroides*. En la Figura 25 se puede observar que conforme mayor es la dilución del desinfectante menor es la inhibición del mismo sobre la bacteria aislada. Con una concentración del 1% todavía existe inhibición, pero con una concentración menor la inhibición ya no es

suficientemente eficiente, de acuerdo al umbral de efectividad establecido. Por el contrario,  $\beta$ -Stab no mostró inhibición para *L. mesenteroides* a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Al utilizar esta metodología se pudo determinar que la concentración utilizada actualmente por el ingenio Pantaleón no es efectiva en ambos casos. La concentración utilizada para SMB es de 0.002% y para  $\beta$ -Stab de 0.005%. El resultados obtenido para SMB concuerda con los obtenidos por Lou 2008. Debido a que la concentración mínima para una inhibición efectiva de estos desinfectantes es superior a la utilizada en el ingenio, el uso de los bactericidas está generando pérdidas económicas y ningún beneficio para la industria.

El resultado de inhibición de los bactericidas para *L. mesenteroides* concuerda con la inhibición de microbiota total en el caso del SMB, para el cual la concentración mínima es de 1%. El  $\beta$ -Stab si mostró inhibición de la microbiota total con una concentración mínima de 1% (Balsells 2009). Debido a que para *L. mesenteroides* el bactericida  $\beta$ -Stab no mostró inhibición, se recomienda probar otros desinfectantes, además de siempre realizar estudios de bactericidas tanto para microbiota total como para cepas aisladas.

Con este estudio se consiguió optimizar métodos de monitoreo, evaluación y control de cepas de *L. mesenteroides* en los distintos jugos circulantes en la industria azucarera. Las metodologías propuestas son complementarias con las propuestas por Lou 2008 y servirán de base para la continuación de los estudios a realizar en la fase siguiente de Megaproyecto.

E. Cepas desconocidas identificadas y la aplicación de una técnica de evaluación de los bactericidas usados en el ingenio.

En este trabajo también se presentan los resultados de un análisis del comportamiento microbiológico en los tándem A y B del ingenio Pantaleón para proponer en un futuro un método de control de los organismos presentes en la caña de azúcar, los cuales se

encuentran presentes en el suelo y en las estructuras vegetales en putrefacción. La microbiota de la caña de azúcar sin cortar es variable, estando influenciada principalmente por la temperatura, la humedad y la estación del año. Los microorganismos pueden ser oportunistas, epífitos y parásitos, y se pueden desarrollar en distintas partes de la planta y aumentar su presencia mientras aumenta el tiempo de transporte de la caña desde el corte hasta la llegada al ingenio. Por esto es importante conocer el desarrollo de la microbiota desde el momento de quema y corte de la caña hasta la producción final de sacarosa dentro del ingenio. En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en un estudio microbiológico dentro de los seis pasos que tiene una extracción de jugo de caña dentro de los tándem del ingenio Pantaleón, con el fin de conocer más sobre su comportamiento y su crecimiento de manera conjunta y aislada dentro de los molinos de extracción de jugo.

Esta investigación fue realizada durante un año con muestras de la zafra 2008-2009 en el ingenio Pantaleón, en Escuintla, Guatemala. Las muestras del tándem A se tomaron en dos semanas seguidas y las muestras del tándem B fue posible recolectarlas únicamente una vez, debido a que el día de muestreo el tándem estuvo sin funcionar varias horas. Las muestras fueron tomadas y transportadas a la Universidad del Valle en hielo para ser sembradas y cultivadas. Inicialmente las muestras se sembraron en medios de cultivo usados en el trabajo de Lou 2008 para el conteo total de colonias y UFC/ml presente en cada paso de los tándem. También se realizaron Grams y algunas pruebas bioquímicas a algunas de las muestras sembradas pero se decidió usar los datos obtenidos para hacer comparaciones de la microbiota total en los distintos puntos de los tándem y para la elección de las dos bacterias más abundantes, luego de *L. mesenteroides*, para su identificación y evaluación de presencia en los distintos pasos del proceso azucarero. En las Figuras 5 y 6 en la sección de resultados se observan las gráficas de porcentajes de la presencia de Cocos y Bacilos, gram positivos y negativos en cada tándem respectivamente. Se seleccionaron la misma cantidad de colonias para cada muestra de cada punto del tándem, se hicieron conteos de UFC/ml y selección de las más representativas para pruebas de Gram. Se puede observar en las Figuras que los cocos gram positivos son en ambos tándem los que se encuentran presentes en mayor

porcentaje dentro de la microbiota total de los tándem, seguidos en ambos casos por los Bacilos gram positivos, con un porcentaje alto también y luego los cocos gram negativos y los bacilos gram negativos. Los cocos gram negativos fueron vistos en el microscopio con tinción de gram y todos eran muy similares entre sí y coincidían con la información bibliográfica sobre las colonias y morfología en gram de *L. mesenteroides*. Con base en el cultivo en diferentes medios, se seleccionaron colonias que eran las más abundantes y cuyos grams eran los más comunes en aparecer, luego de los de *L. mesenteroides*. Las bacterias más abundantes en crecimiento se eligieron del tándem B ya que tenían una alta presencia e crecimiento en medio de cultivo Plate Count Agar y en los grams se observaba una gran cantidad que presentaban morfología de Bacilos gram positivos.

Estas dos bacterias fueron reaisladas y cuantificadas nuevamente en agar Plate Count para conocer su comportamiento de crecimiento aislado en los distintos molinos dentro del tándem. Cada bacteria fue observada al microscopio luego de cada reaislamiento y se observó que la morfología característica de bacilos se mantuvo siempre. Con esto se prosiguió a realizar la batería de 17 pruebas bioquímicas a cada una de las dos bacterias de interés. Los resultados de las pruebas fueron comparados con la tabla de características bioquímicas de microbiota de los jugos de caña, de Gini 1995, Bourgeois y Larpent 1995, Carr *et. al.* 1975, MacFaddin 2000, se puede ver la tabla en los anexos. Los resultados de las pruebas indican que las bacterias elegidas se pueden identificar como *Lactobacillus casei* y *Bacillus stearothermophilus*. Para confirmar definitivamente la identidad y caracterizar las dos especies es necesario realizar más estudios para comprobar que exactamente se trata de cada una de las dos especies identificadas con las pruebas. En Guatemala no se había identificado otra bacteria, a parte de *L. mesenteroides*, por lo que era importante describir algunas de las bacterias más importantes en el proceso. Es importante conocer algunas características de ellas en base a la literatura y a estudios realizados con las bacterias aisladas e identificadas.

Sobre la bacteria *Bacillus stearothermophilus* se encontró en la literatura que sobrevive a temperaturas altas y que su conteo baja en temperaturas menores a 40°C, con los aislamientos de esta bacteria en cada uno de los productos del tándem B, se observó

que mientras más elevada era la temperatura del tándem la bacteria mostraba un mayor crecimiento, mientras que la microbiota general y el resto de bacterias muestran un comportamiento contrario a manera que fluctúan las temperaturas del tándem. Mientras menor es la temperatura en el tándem, mayor crecimiento muestra la microbiota total. La prueba de bactericidas también se realizó para la microbiota total y para las dos bacterias aisladas, con dos bactericidas usados en el ingenio, el SMB y el  $\beta$ -stab; los resultados que se observan son muy diferentes. Para la microbiota total las únicas diluciones que logran tener una inhibición sobre el crecimiento de las bacterias es el bactericida puro,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de ambos desinfectantes, sembradas en agar Mueller-Hinton. Las diluciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  no fueron efectivas para la microbiota total, ya que no se observó ningún halo de inhibición al sembrar muestras puras de jugo primario y jugo diluido en presencia de estos bactericidas. Para las bacterias aisladas el caso fue el mismo solo que para la bacteria *L. casei* todavía hubo inhibición del crecimiento con el bactericida  $\beta$ -stab y el SMB en una dilución de  $10^{-4}$ , ninguno de los dos desinfectantes logró inhibir el crecimiento en una dilución de  $10^{-5}$ . para la bacteria *B. stearotermophilus*, la inhibición fue efectiva también en diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , pero no se observó ninguna inhibición en una dilución de  $10^{-5}$ . La dilución de ambos bactericidas que se utiliza en el ingenio Pantaleón actualmente es de  $10^{-5}$ , por lo que se sabe con este estudio que la concentración usada de bactericida no es efectiva para inhibir el crecimiento de la microbiota total ni de las bacterias descritas, en puntos críticos del proceso.

#### F. Análisis de optimización de procesos y de personal

Como se ha observado a través de este documento el tema que se aborda es de una complejidad tal que requiere varias fases para su culminación final. La fase actual se puede considerar como intermedia para seguir desarrollando y optimizando lo logrado en la primera y al mismo tiempo sirva de fundamento para la nueva etapa.

Se ha constatado el interés del ingenio Pantaleón y que tomando como base este proyecto se amplíe la colaboración académico-productiva y los objetivos a todos los

aspectos relacionados con eficiencia y calidad en la producción azucarera por lo que se adicionó como un objetivo específico en esta fase.

## X. CONCLUSIONES

- A. La densidad de microbiota total y de *L. mesenteroides* disminuyen del molino 1 al molino 6, conforme la temperatura aumenta.
- B. *Leuconostoc mesenteroides* es la especie encontrada en mayor proporción formando parte de la microbiota total en los molinos 1 a 3, pero su proporción relativa disminuye en los molinos 4 a 6, siendo un factor a tomar en cuenta para el diseño de tratamientos específicos.
- C. La microbiota se encuentra activa hasta el proceso de calentamiento, incluyendo la etapa de sulfitación y alcalización que no había sido considerada hasta el momento, por lo que se debe buscar un método de control en el futuro.
- D. Contrariamente a la opinión prevaleciente, la densidad microbiológica encontrada en el jugo filtrado no es significativa como para ser considerada un factor de incremento microbiano en el proceso azucarero.
- E. La miel primera es el producto intermediario de elección para el desarrollo de nuevos medios de cultivo costo efectivos, tanto sólidos como líquidos, debido a la disponibilidad de la materia prima dentro del ingenio y a que el costo insignificante.
- F. El medio MP200 (miel primera 20%) con inhibidores es un medio costo-efectivo para métodos de recuento de *L. mesenteroides* en los jugos circulantes en 12 horas.
- G. Los medios sólidos MP200 (miel primera 20%) sin inhibidores y MP300 (miel primera 30%) con inhibidores son efectivos, al igual que los medios líquidos ensayados (especialmente el MP25S), para el desarrollo y crecimiento acelerado

de *L. mesenteroides*; no se obtuvo efectividad alguna con medios basados en el jugo filtrado.

- H. Se encontró una técnica de referencia efectiva para la determinación de la actividad enzimática de la dextranucrasa y se estableció las condiciones bajo las cuales debe realizarse la metodología.
- I. Se determinó que el desinfectante más efectivo *in vitro* para *L. mesenteroides* es SMB, con una concentración de hasta 1% y que  $\beta$ -Stab no es eficiente, mostrando que las concentraciones utilizadas en el ingenio (0.002% y 0.005%, respectivamente) no están generando desinfección alguna, por lo que se duda que las concentraciones y procedimientos actuales de aplicación en el ingenio sean efectivos.
- J. Los cocos gram positivos son en ambos tándem los que se encuentran presentes en mayor porcentaje dentro de la microbiota total, seguidos en ambos casos por los Bacilos gram positivos, con un porcentaje alto también y luego los cocos gram negativos y los bacilos gram negativos.
- K. La bacteria de crecimiento de colonia blanca, grande y de bordes no uniformes, con una morfología de bacilos gram positivos en tinción de Gram y características bioquímicas definidas, se presume ser identificada como *Lactobacillus casei*.
- L. La bacteria de crecimiento de colonia blanca, pequeña y circular, con una morfología de bacilos gram positivos en cadenas cortas, teñidos con tinción de Gram y características bioquímicas definidas, se presume ser identificada como *Bacillus stearothermophilus*.
- M. El desinfectante  $\beta$ -stab fue probado en distintas concentraciones para la microbiota total y para las dos bacterias de manera aislada y se comprobó que la

concentración que usan dentro del ingenio Pantaleón ( $10^{-5}$ ) no es efectiva ya que no inhibe el crecimiento de las bacterias en medio de cultivo Mueller-Hinton.

- N. El desinfectante SMB fue probado en distintas concentraciones para la microbiota total y para las dos bacterias de manera aislada y se comprobó que la concentración que usan dentro del ingenio Pantaleón ( $10^{-5}$ ) no es efectiva ya que no inhibe el crecimiento de las bacterias en medio de cultivo Mueller-Hinton.
- O. De esta manera concluimos que al tener los análisis hechos, el ingenio Pantaleón logrará aumentar la efectividad del muestreo en planta realizado 1 muestre por laboratorio cada 30 minutos o en el mejor de los casos realizar el muestreo de ambos laboratorios cada hora y teniendo 30 minutos para toma de decisiones y realización de otras actividades que provean de crecimiento para el negocio de la industria azucarera.
- P. El tiempo total del proceso de muestreo fue de 16 minutos y 51 segundos con el método de recorrido, estandarizado, propuestos; comparado con un recorrido actual hecho en 29 minutos y 33 segundos. Se tienen una mejora de 13 minutos y un total de 20 movimientos hechos menos que optimizan el proceso.
- Q. La alternativa a implementar será la de “Realización de muestreo y análisis en planta” teniendo un ahorro de 31 minutos y 35 segundos que traducidos a costo de mano de obra es de Q26.87 diarios por el operario de muestreo. A pesar que el nuevo proceso sugerido representa un ahorro, este mismo deberá ser trasladado a una nueva operación realizada por el mismo operario para no tener el tiempo ocioso.
- R. Con la elaboración de una encuesta de percepción del lugar de trabajo se pretende evaluar a los trabajadores en cuanto a sus labores realizadas y la perspectiva que tienen sobre el proceso actual en la industria y estimar posibles proyectos a implementar en los próximos módulos del megaproyecto por lo que por el

momento está únicamente elaborada la encuesta pero se sugiere aplicarla al personal del ingenio en todos los niveles del organigrama.

## XI. RECOMENDACIONES

- A. Realizar pruebas moleculares para identificar con mayor exactitud la cepa de *L. mesenteroides* aislada de los jugos circulantes.
- B. Evaluar a qué se debe el aumento de la densidad microbiana del jugo sulfitado al jugo alcalizado con el objetivo de tomar medidas de control específicas en esos puntos del proceso.
- C. En el control de fábrica, ampliar los análisis de los jugos circulantes debido a que se determinó que la microbiota continúa presente hasta el calentamiento.
- D. Estudiar los medios de cultivo propuestos en rangos menores de tiempo de incubación.
- E. Validar, con procedimientos normados internacionalmente, los medios de cultivo sólidos, AM150, AM200, MP200 y MP300, comparados con MSE, para determinar cuál es el medio más efectivo para recuento y para producción de *L. mesenteroides*.
- F. Determinar la actividad enzimática de la cepa aislada de *L. mesenteroides* utilizando la técnica de referencia y las condiciones establecidas.
- G. Comparar el método propuesto para determinación de actividad enzimática con otros métodos más sencillos que se desarrollen en el futuro como extensión del presente trabajo, además de realizar análisis con métodos en los cuales se elimine la bacteria de la solución a analizar.
- H. Validar el método establecido para actividad enzimática utilizando prueba moleculares.

- I. Evaluar los desinfectantes estudiados y otros, a escala de laboratorio e industrial, para determinar su actividad inhibitoria para *L. mesenteroides*.
- J. Establecer la concentración adecuada a la cual utilizar el SMB mediante un método de shock y no continuo, para evitar que se desarrolle resistencia por parte de *L. mesenteroides*.
- K. No utilizar el bactericida  $\beta$ -Stab para la eliminación de *L. mesenteroides* en la industria azucarera, debido a que no tiene actividad inhibitoria y únicamente representa una pérdida económica.
- L. Se sugiere tomar como nuevo parámetro de procesos, el DOP Recorrido Propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón del Anexo 19. De la misma manera como se implementará un nuevo sistema de proceso, se sugiere hacer un ajuste en el organigrama actual, pasando a dejar como encargados de análisis y notificación a los mismos encargados de laboratorio, ya que estos no tendrán la tarea de realizar muestreos en la planta.
- M. Se recomienda que se implemente un sistema de comunicación más efectivo para la aplicación de las mejoras necesarias obtenidas por los análisis de los jugos en los tándem, realizados por los muestreos.
- N. Para un análisis de la microbiota total es conveniente usar medio Plate Count Agar y que permite el crecimiento incluso de hongos presentes y se pueden realizar conteos efectivos totales del total de microorganismos presentes.
- O. Para un análisis del comportamiento total de la microbiota y de bacterias aisladas es necesario aplicar pruebas microbiológicas y pruebas bioquímicas y químicas como la del tiempo de reducción de la rezasurina para un análisis más completo.

- P. Es necesario realizar un análisis molecular para la identificación de las dos cepas de bacterias para comprobar genéticamente que se trata de *L. casei* y *B. stearothermophilu* y verificar los resultados obtenidos con la batería de pruebas bioquímicas.
- Q. Continuar los estudios con los bactericidas del ingenio para evaluar si es posible aplicarlos a una concentración más alta o si es necesario aplicarlos por shock, en una sola aplicación para aumentar su efectividad.
- R. Es necesario realizar más experimentos en escala industrial para comprobar la eficiencia real de desinfectantes dentro de los tándem para evaluar esta diferencia.
- S. Se recomienda hacer más pruebas bioquímicas con las cepas asiladas para evaluar sus características de producción de gomas y actividad enzimática para conocer más de ellas y poder realizar un mejor control microbiológico.

## XII. LITERATURA CITADA

1. Asociación Azucarera de El Salvador. 2009. *Proceso de obtención de la caña de azúcar*. Obtenido de: [http://www.asociacionazucarera.com/nav10\\_produccion.html](http://www.asociacionazucarera.com/nav10_produccion.html) Fecha de acceso: septiembre 2009
2. ACI, 2007. *El proceso azucarero*. Obtenido de: [http://www.eep-ca.org/guatemala/documents/presentaciones/co-generacion\\_guatemala.pdf](http://www.eep-ca.org/guatemala/documents/presentaciones/co-generacion_guatemala.pdf) Fecha de acceso: septiembre 2008
3. ASAZGUA. 2006. *Los ingenios Guatemaltecos*. Obtenido de: <http://www.azucar.com.gt/02ingenios.htm> Fecha de acceso: agosto 2009
4. Ayres, J.; J. Mundt y W. Sandine. 1980. *Microbiology of foods*. W. H. Freeman. San Francisco. 708pp
5. Azcoytia, C. 2006. *Una dulce historia, La del azúcar*. Obtenido de: <http://www.historiacocina.com/historia/articulos/azucar.html> Fecha de acceso: agosto 2009
6. Barrangou, R.; Y. Sung-Sik, F. Jr. Breidt. H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer. 2002. *Characterization Of Six Leuconostoc fallax Bacteriophages Isolated From An Industrial Sauerkraut Fermentation*. Applied and Environmental Microbiology 68(11): 5452–5458
7. Björkroth J. y W. Holzapfel. 2006. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, vol. 4 Capítulo Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella*. 3rd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 267 -319pp
8. Bourgeois, C. y J. Larpent. 1995. *Microbiología alimentaria: Fermentaciones alimentarias*. Vol. 2. Editorial Acribia. Clermont. 388pp
9. Bravo Díaz, L. 2003. *Farmacognosia especial*. Elsevier España. 49-50pp
10. BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System. 2009. *EC 2.4.1.5 – dextranase*. Obtenido de: [http://www.brenda-enzymes.info/php/result\\_flat.php4?ecno=2.4.1.5](http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.4.1.5) Fecha de acceso: julio 2009

11. Callon, C.; J. L. Berdagué, E. Dufour y M. C. Montel. 2005. *The Effect of Raw Milk Microbial Flora on the Sensory Characteristics of Salers-Type Cheeses*. Journal of Dairy Science 88:3840–3850
12. Carr, J.; C. Cutting y G. Whiting. 1975. *Occurrence and effects of Lactic Acid Bacteria in sugar industry*. Lactica Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press London. 415pp
13. Chambert, R.; G. Treboul y R. Dedonder. 1973. *Kinetic studies of levansucrase of Bacillus subtilis*. European Journal of Biochemistry. 41, 285-300
14. Chen, Y.; M.M. Abraham, L. C. Templeton y W. P. Unruh. 1975. *Role of hydrogen and deuterium on the V--center formation in MgO*. American Physical Society. Volume 11. Issue 2
15. Crutz, A. M.; M. Steinmetz, S. Aymerich, R. Richter, y D. Le Coq. 1989. *Induction of Levansucrase in Bacillus subtilis: an Antitermination Mechanism Negatively Controlled by the Phosphotransferase System*. Laboratoire de Genetique des Microorganismes, Institut National Agronomique Paris-Grignon. Vol. 172, No. 2
16. Daeschel, M.; J. Mundt y I. Mccartyv. 1981. *Microbial Changes in Sweet Sorghum (Sorghum bicolor) Juices*. Applied and environmental microbiology, Vol. 42, No. 2. 381-382pp
17. Díaz, L. 2009. *País produjo 47.8 millones de quintales de azúcar*. Prensa Libre [Guatemala].
18. \_\_\_\_\_; 2009a. *Exportación de dulzura*. Prensa Libre [Guatemala].
19. Dicks, L. M. T.; H. J. Van Vuuren, y F. Dellaglio. 1990. *Taxonomy of Leuconostoc Species, Particularly Leuconostoc oenm, as Revealed by Numerical Analysis of Total Soluble Cell Protein Patterns, DNA Base Compositions, and DNA-DNA Hybridizations*. International Journal of Systematic Bacteriology 40(1) 83-91
20. Dugas, J. 2006. *Lactid Acid Bacteria*. Obtenido de: <http://www.waksmanfoundation.org/labs/mbl/lactic.html> Fecha de acceso: septiembre 2008
21. FAO. 2008. *Azúcar*. Obtenido de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ai474s/ai474s00.pdf> Fecha de acceso: agosto 2009

22. Figueroa, V. 1989. *Experiencias cubanas en el uso de las mieles de caña para la alimentación porcina*. Livestock Research for Rural Development 1(1)
23. Flores, S. 1976. *Manual de caña de azúcar*. Editorial INTECAP instituto técnico de capacitación y productividad. Guatemala C.A. 171pp
24. Frazier, W. C. y D. C. Weshoff. 1978. *Food Microbiology*. 3a. edición. McGraw Hill. New York. 549pp
25. García Chávez, L. R. 2000. *Comercialización y seguridad alimentaria en relación al azúcar en América Latina y el Caribe*. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Universidad Autónoma Chapingo, México. Obtenido de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/x4988e/x4988e03.pdf> Fecha de acceso: agosto 2009
26. Genome Net. 2007. *Reaction: R02120*. Obtenido de: [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?rn+R02120](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn+R02120) Fecha de acceso: septiembre 2009
27. Gini, G. 1995. *Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica*. 2ª ed. Universidad de San Carlos de Guatemala. Laboratorio de Microbiológico de Referencia (LAMIR).141pp
28. Hernández, M. T. y T. Sainz. 1987. *Microbiología de la industria azucarera*. Ed. Universidad Central de las Villas. 270pp
29. Joint Genome Institute (JGI) Microbes. 1999. *Leuconostoc mesenteroides ATCC 8293*. Obtenido de: [http://genome.jgi-psf.org/finished\\_microbes/leume/leume.home.html](http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/leume/leume.home.html) Fecha de acceso: septiembre 2008
30. Kegley, S. E.; B. R. Hill; S. Orme y A. H. Choi. 2000. *Sodium dimethyl dithiocarbamate*. Obtenido de: [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC35139](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35139) Fecha de acceso: agosto 2009
31. Lehninger, A. 2004. *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. W. H. Freeman. 1119pp
32. Lou, M. J. 2008. *Desarrollo de un medio de cultivo costo-efectivo para el recuento y la propagación de Leuconostoc mesenteroides en distintos jugos de caña*. Universidad del Valle de Guatemala, Tesis no publicada

33. MacFaddin, J. 2000. *Esquemas de identificación en: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3a. Edición. Editorial MÉDICA Panamericana, Argentina. 845pp
34. Mayeux, J. V.; W. E. Sandine y P. R. Elliker. 1962. *A selective medium for detecting Leuconostoc organisms in mixed-strain starter cultures*. Journal of Dairy Science 45:655–656
35. Nes, I. F.; D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo. 1996. *Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek 70(2-4) 113-128
36. Noack, M. 2008. *Estimación de la actividad microbiológica en diferentes jugos de caña por reducción de resazurina*. Universidad del Valle de Guatemala, Tesis no publicada
37. Pantaleón. 2009. *Historia*. Obtenido de : [http://www.pantaleon.com/index.php?id\\_category=30&id\\_subcat=36&parent\\_id=30](http://www.pantaleon.com/index.php?id_category=30&id_subcat=36&parent_id=30)  
Fecha de acceso: agosto 09
38. Pérez, J. M. y L. Pratt. 1997. *Industria Azucarera en Guatemala: Análisis de Sostenibilidad*. 2-10pp
39. Pollach, G.; W. Hein y D. Beddie. 2002. *Application of hop Beta-acids and rosin acids in the sugar industry*. Zuckerindustries Journal 127(12) 921-930
40. Pommerville, J. 2004. *Alcama's Fundamentals of Microbiology*. Seventh Edition. Jones & Barlett. 999pp
41. Salminen, S.; A. von Wright y A. Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3ra edición. CRC Press. 633pp
42. Sharpe, E.; E. Garvie, y R. Tilbury. 1972. *Some slime-forming heterofermentative species of the genus LactoBacillus*. Journal of Applied Microbiology. 23(2) 389-397
43. Shimotsu, H. y D. Henner. 1986. *Modulation of Bacillus subtilis levansucrase gene expresión by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by sacU and sacQ genes*. Journal of Bacteriology. 168 (1) 380-388
44. Simonen, M. e I. Palva. 1993. *Protein secretion in Bacillus species*. Microbiological Reviews. 57 (1) 109-137

45. Spanhaak, S.; Havenaar R. y G. Schaafsma.1998. *The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans*. European Journal of Clinical Nutrition 52(12):899-907
46. Subirós, F. 1995. *El cultivo de la caña de azúcar*. EUNED. 441pp
47. Tober, K. 2008. *Nutrition and Growth of Bacteria*. Obtenido de: <http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro.html> Fecha de acceso: agosto 2009
48. Valiño, E.; A. Elías, T. Carrasco y N. Albelo. 2003. *Efecto de inoculación de la cepa Trichoderma viride 137 en el bagazo de caña de azúcar autofermentado*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 37, No. 1
49. Walter, J.; C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro, y W. P. Hammes. 2001. *Detection of LactoBacillus, Pediococcus, Leuconostoc, and Weissella Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. Applied and Environmental Microbiology 67(6) 2578-2585
50. Yuki, N.; K. Watanabe, A. Mike, Y. Tagami, R. Tanaka, M. Ohwaki y M. Morotomi. 1999. *Survival of a probiotic, Lactobacillus casei strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies*. International Journal of Food Microbiology 1;48(1):51-7
51. Zucarmex. 2003. *Proceso de producción del azúcar*. Obtenido de: <http://www.zucarmex.com/Proceso.htm> Fecha de acceso: agosto 2009

### XIII. OTRAS REFERENCIAS

- Barrangou, R.; Y. Sung-Sik, F. Jr. Breidt. H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer. 2002. *Isolation and Characterization Of Bacteriophages From Fermenting Sauerkraut*. Applied and Environmental Microbiology 68(2):973–976
- CENGICAÑA. 2007. *Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar*. Obtenido de: <http://www.cengicana.org/Portal/Home.aspx> Fecha de acceso: junio 2009
- CENGICAÑA. 2007. *Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2006-2007*. Guatemala. 232pp
- Chow, J. J.; C. A. Batt y A. J. Sinskey. 1988. *Characterization of LactoBacillus bulgaricus bacteriophage ch2*. Applied and Environmental Microbiology 54:1138-1142
- Chumbagua. 2007. *Proceso de Fabricación de Azúcar en CIA: Azucarera Chumbagua*. Obtenido de: <http://www.chumbagua.com/procesos.html> Fecha de acceso: julio 2009
- Dirección General de Normas, 1991. *Normativa de Agroindustria Azucarera. Jugos de caña de Azúcar, equipo muestreador y método de muestreo*. Obtenido de: <http://www.caneros.org.mx/decretos/normas/nmxf4651991.pdf> Fecha de acceso: agosto 2009
- Erazo, J. P. 2009. *Aplicación de microorganismos promotores de la descomposición de los residuos de cosecha y promotores del crecimiento vegetal en caña de azúcar*. Palmira, Colombia C.U.M.
- Galeado, A. y Osmin. 1997. *Elaboración de un programa de mantenimiento preventivo de la sección de molinos de un ingenio azucarero*. Tesis USAC. 44pp
- Hernández, R.; C. Fernández y P. Baptista. 2003. *Metodología de la investigación*. 3ª Edición. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana. 705pp
- Joerger, R. D. 2003. *Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages*. Poultry Science 82:640–647

Kasman, L. M.; A. Kasman, C. Westwater, J. Dolan, M. G. Schmidt, y J. S. Norris. 2002. *Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy*. Journal of Virology 76(11): 5557-5574

Kyoung-Jin, K.; y Song, J. 2006. *Isolation and Characterization of The Smallest Bacteriophage P4 Derivatives Packaged Into P4-Size Head In Bacteriophage P2-P4 System*. The Journal Of Microbiology 44(5): 530-536

Kutter, E. y A. Sulakvelidze. 2005. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Apéndice: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. CRC Press. 439-455pp

MAGA Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador La Agroindustria Azucarera en America Latina y El Caribe. *Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador*. Obtenido de: [http://www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/agroindustria\\_azucarera.htm](http://www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/agroindustria_azucarera.htm) Fecha de acceso: julio 2009

Morataya, F. 2009. *Comunicación Personal*. Ingenio Pantaleón

Mudgal, P.; Jr. F. Breidt, S. R. Lubkin y K. P. Sandeep. 2006. *Quantifying The Significance Of Phage Attack On Starter Cultures: A Mechanistic Model For Population Dynamics Of Phage And Their Hosts Isolated From Fermenting Sauerkraut*. Applied and Environmental Microbiology 72(6): 3908–3915

Núñez, O. 2009. *Comunicación Personal*, Universidad del Valle de Guatemala

Porta, A. 1955. *Fabricación del azúcar*. Salvat Editores, S.A, Barcelona. 809pp

Sociedad Agrícola E Industrial San Carlos S.A. 2008. *Proceso de elaboración del azúcar*. Obtenido de: [http://www.sancarlos.com.ec/pdf/proceso\\_azucar.pdf](http://www.sancarlos.com.ec/pdf/proceso_azucar.pdf) Fecha de acceso: julio 2009

Sozzi, T.; J. M. Poulin, R. Maret y R. Pous. 1978. *Isolation Of A Bacteriophage Of Leuconostoc mesenteroides From Dairy Products*. Journal of Applied Bacteriology 44: 159-161

Summers, W. C. 1999. *Félix D'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press. 1999pp

Watanabe, R.; Tetsuya Matsumoto, Go Sano, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda, Yoshinobu Sumiyama, Jumpei Uchiyama, Shingo Sakurai, Shigenobu Matsuzaki, Shosuke Imai, and Keizo Yamaguchi. 2007. *Efficacy Of Bacteriophage Therapy Against Gut-Derived Sepsis Caused By Pseudomonas aeruginosa In Mice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(2): 446–452


Wiggins, B.A. y M. Alexander. 1985. *Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems*. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1):19-23

Yoon, S. S., R. Barrangou-Pouey, F. Breidt, Jr., T. R. Klaenhammer, y H. P. Fleming. 2002. *Isolation and Characterization Of Bacteriophages From Fermenting Sauerkraut*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2):973–976

## XIV. ANEXOS

### A. Procedimiento

Anexo 1: Procedimiento para caracterización de jugos circulantes en el ingenio Pantaleón y comparación con resultados obtenidos en la unidad estudiada anteriormente.

<p>Megaproyecto Bioquímica y Microbiología Universidad del Valle de Guatemala</p> 	<p>Procedimiento normado de operación</p>	<p>No. Documento: 1 Versión: 2 Fecha: 15/04/2009 Páginas Totales: 9</p>
	<p><b>Procedimiento de evaluación de trabajo anteriores en el ingenio Pantaleón</b></p>	<p>Autor: Bárbara de la Peña</p>

#### 1. Propósito:

1.1. Evaluar los procedimientos y medios experimentales para el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, establecidos en trabajos anteriores, a partir de productos a lo largo del proceso de la industria azucarera.

#### 2. Aplicación:

Este procedimiento se utilizará para evaluar los procedimientos establecidos en trabajos anteriores y validar medios experimentales, utilizando productos de la industria azucarera, para el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*. El procedimiento será utilizado en el Megaproyecto de la Facultad de Ingeniería y el Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.

#### 3. Terminología y abreviaciones:

3.1. pH: potencial hidrógeno o nivel de ácidos o bases en una sustancia.

3.2. mL: mililitro ( $1 \times 10^{-3}$  litros)

- 3.3.  $\mu\text{L}$ : microlitro ( $1 \times 10^{-6}$  litros)
- 3.4. %: por ciento
- 3.5.  $^{\circ}\text{C}$ : grados centígrados
- 3.6. g: gramos
- 3.7. cm: centímetros
- 3.8. UFC: Unidad formadora de colonia
- 3.9. MSE: agar Mayeux, Sandine y Elliker (por sus elaboradores)
- 3.10. BHI: Infusión Cerebro Corazón (por sus siglas en inglés)
- 3.11. CTA: Agar Cistina Tripticasa (por sus siglas en inglés)
- 3.12. SIM: sulfuro indol motilidad
- 3.13. MR-VP: Rojo de Metilo-Voges Proskauer (por sus siglas en inglés)

#### **4. Principio:**

La evaluación de trabajos anteriores es de gran importancia debido a que por tratarse de organismos vivos, las condiciones de trabajo pueden causar un gran efecto en los resultados que se desean obtener. Debido a que los procedimientos se evaluarán en un ingenio diferente al que se trabajó en anteriormente, se espera que haya variaciones en los resultados. Sin embargo, debido a que son procedimientos estándar, las variaciones no deben ser significativas.

#### **5. Seguridad:**

- 5.1. Realizar el procedimiento en el laboratorio, en condiciones estériles.
- 5.2. Utilizar guantes desechables para evitar la contaminación.
- 5.3. Utilizar bata larga y cerrada en todo momento.
- 5.4. Tomar las precauciones necesarias para el manejo de materiales biopeligrosos.
- 5.5. Descontaminar cualquier derrame con solución de etanol al 70% o cloro al 10%.
- 5.6. Documentar detalladamente cualquier eventualidad.

#### **6. Equipos, materiales y reactivos:**

- 6.1. Solución amortiguadora a pH 4, 7 y 9 (adquiridas comercialmente)
- 6.2. Agua destilada

- 6.3. Potenciómetro manual.
- 6.4. Pizeta
- 6.5. Erlenmeyer de tamaño adecuado
- 6.6. Balanza analítica
- 6.7. Pipeta de 10mL
- 6.8. Beaker de 20 mL
- 6.9. Agitador magnético
- 6.10. Estufa/agitador
- 6.11. Autoclave
- 6.12. Probeta de 15 mL
- 6.13. Cajas petri
- 6.14. Bolsa de plástico
- 6.15. Parafilm
- 6.16. Muestra de jugo
- 6.17. Tubos de ensayo
- 6.18. Pipeta de 5mL despuntada
- 6.19. Agua de peptona estéril al 10%
- 6.20. Cabina de flujo laminar
- 6.21. Etanol al 70%
- 6.22. Micropipetas de 100 o 200  $\mu$ L (P-100 o P-200)
- 6.23. Puntas estériles para micropipetas
- 6.24. Cajas Petri con medio de cultivo sólido de interés (a temperatura ambiente)
- 6.25. Esparcidores estériles
- 6.26. Incubadora
- 6.27. Pipeta de 5mL
- 6.28. Medio BHI
- 6.29. Portaobjetos
- 6.30. Cristal violeta
- 6.31. Lugol
- 6.32. Alcohol-acetona
- 6.33. Safranina

- 6.34. Microscopio
- 6.35. Aceite de inmersión
- 6.36. Glucosa
- 6.37. Maltosa
- 6.38. Arabinosa
- 6.39. Fructosa
- 6.40. Sacarosa
- 6.41. Agua desmineralizada
- 6.42. Asa de punta
- 6.43. Medio SIM
- 6.44. Reactivo de Kovacs
- 6.45. Medio Bilis-Esculina
- 6.46. Medio MR-VP
- 6.47. Rojo de metilo
- 6.48.  $\alpha$ -naftol al 5% en etanol absoluto
- 6.49. Hidróxido de potasio

## **7. Procedimiento:**

### **- Preparación y uso de medios de cultivo**

- 7.1. Previo a la preparación del medio, medir el pH del agua destilada a utilizar, empleando un potenciómetro manual calibrado.
  - 7.1.1. Encender el potenciómetro manual, moviendo el seguro de Off a On.
  - 7.1.2. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 7.
  - 7.1.3. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
  - 7.1.4. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 9.
  - 7.1.5. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
  - 7.1.6. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 4.

- 7.1.7. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
- 7.1.8. Medir el pH del agua destilada.
- 7.1.9. Apagar el potenciómetro moviendo el seguro de On a Off.
- 7.2. Preparar el medio de cultivo a partir de sus componentes en un erlenmeyer de tamaño adecuado (Medio de referencia “MSE” y medios experimentales a partir de productos de la industria azucarera) ver diagrama 9.1. Una vez determinada la cantidad de medio necesario, calcular la cantidad de los distintos componentes basándose en la teoría.
  - 7.2.1. Identificar el medio de cultivo.
    - A. Código del medio
    - B. Fecha de preparación
    - C. Encargado
  - 7.2.2. Pesar con una balanza analítica calibrada cada uno de los componentes por separado, buscando la menor incertidumbre posible.
  - 7.2.3. Agregar los componentes uno a uno, en el orden que dice la receta (NO AGREGAR EL AGAR).
  - 7.2.4. Disolver con la cantidad de agua necesaria.
    - A. Tomar 10mL del medio líquido y colocarlo en un beaker limpio.
    - B. Medir le pH del medio utilizando un potenciómetro de acuerdo al procedimiento indicado en el punto 7.1.
  - 7.2.5. Agregar el agar.
  - 7.2.6. Agitar (con agitador magnético) y calentar (a ebullición) en una estufa/agitador hasta que el medio quede cristalino.
  - 7.2.7. Autoclavear por 15 minutos a 120°C.
- 7.3. Verter el medio de cultivo en las cajas petri.
  - 7.3.1. Esperar a que baje la presión de la autoclave y sacar el medio.
  - 7.3.2. Esperar a que la temperatura del medio llegue a  $55\pm^{\circ}\text{C}$ .
  - 7.3.3. Colocar el medio en la cabina de flujo laminar esterilizada con etanol al 70%.
  - 7.3.4. Medir con una probeta estéril 15 mL del medio.

- 7.3.5. Llenar la caja petri estéril con la cantidad de medio medido.
- 7.3.6. Si las cajas van a ser utilizadas inmediatamente, identificar cada una de ellas en la tapadera.
  - A. Código del medio
  - B. Fecha
  - C. Muestra
  - D. Dilución (si es necesario)
  - E. Encargado
- 7.3.7. Si las cajas no se van a utilizar inmediatamente, almacenar en el refrigerador entre 4-6°C en una bolsa de plástico o con Parafilm e identificarlo con el código del medio y encargado.

- **Preparación de diluciones de muestra**

- 7.4. Realizar diluciones seriadas de los jugos (primario, de los molinos 2-5, diluido, sulfitado, alcalizado y filtrado).
  - 7.4.1. Tomar 1mL del jugo descongelado con una pipeta de 5mL despuntada y colocar en un tubo de con 9mL de agua de peptona estéril al 10% y agitar.
  - 7.4.2. Para la siguiente dilución, tomar 1mL de la dilución anterior y colocar en 9mL de agua de peptona estéril al 10% y agitar
  - 7.4.3. Repetir el paso 7.4.2 hasta obtener la dilución deseada (para los jugos a temperaturas altas se utilizarán las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ; mientras que para los jugos a temperaturas relativamente bajas s utilizarán las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ).

- **Siembra por superficie**

- 7.5. Esterilizar la cabina de flujo laminar utilizo etanol al 70%.
- 7.6. Realizar las diluciones seriadas necesarias de acuerdo con la muestra que esté utilizando.
- 7.7. Si el medio de cultivo en el que se sembrarán los microorganismos se encuentra en refrigeración, asegurarse que llegue a temperatura ambiente (incubadora).

- 7.8. Colocar las cajas Petri (atemperadas) con medio de interés sobre superficies previamente desinfectadas con la tapadera hacia arriba.
  - 7.9. Numerar e identificar adecuadamente las cajas de acuerdo a lo descrito en el punto 7.3.6.
  - 7.10. Tomar la micropipeta P-100 o P-200 y una caja de puntas estériles adecuadas para esta.
  - 7.11. Ajustar el volumen de la pipeta al volumen del inóculo microbiano que sembrará por superficie en el medio sólido (100  $\mu$ L).
  - 7.12. Llevar los tubos que contienen las diluciones a sembrar dentro de la campana de flujo laminar.
  - 7.13. Partiendo de la dilución más baja (menos concentrada), tomar 100  $\mu$ L de la muestra a sembrar con la P-100 o P-200.
  - 7.14. Verter el volumen del inóculo tomado con la micropipeta en el centro de la caja con medio de cultivo.
  - 7.15. Distribuir uniformemente el inóculo con esparcidor sobre toda la superficie del medio de cultivo (ver diagrama 9.2).
  - 7.16. Tapar las cajas y dejarlas reposar por aproximadamente 5 minutos o hasta que el inóculo sea absorbido por el medio de cultivo.
  - 7.17. Dejar una caja con medio sin sembrar, como control de ambiente.
  - 7.18. Colocar las cajas con la tapa hacia abajo e incubar según requerimientos de microorganismos específico.
    - 7.18.1. Incubar a 32°C por 120 horas (5 días).
- **Conteo de *Leuconostoc mesenteroides* en medio de referencia y experimentales**
- 7.19. Las cajas deben contarse luego de 72 horas de incubación (de ser necesario realizar lecturas a las 96 y 120 horas).
  - 7.20. Se deben contar las colonias que tengan una apariencia mucosa/gelatinosa (en caso de observar otras colonias anotar su morfología).

7.21. Las colonias regularmente son redondas, pero a veces el crecimiento es muy rápido y algunos halos de dextrana se unen, por lo que deben contarse como una sola colonia (ver diagrama 9.3).

7.22. El conteo que se reporta es donde se tiene el mayor conteo en los 3 días y utilizando únicamente las cajas donde se tengan entre 25-300 colonias.

7.23. Los resultados se reportan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1: } N = \frac{n}{V} * d$$

Donde:

N: Conteo en UFC/mL

n: Número de colonias contadas en la caja en UFC

V: Volumen de inóculo sembrado en la caja en mL

d: Recíproco de la dilución contada

7.24. Si hay más de una caja de la misma dilución, con conteos entre 25-300 colonias, se reporta un promedio de los resultados en UFC/mL.

7.25. Si se tienen cajas de distintas diluciones con conteos entre 25-300 colonias, con una diferencia de alrededor de 125-200 colonias, se reportan de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2: } N = \frac{\Sigma d}{(1*n1)+(0.1*n2)}$$

Donde:

N: Conteo en UFC/mL

$\Sigma$ : Suma de todas las colonias de todas las cajas contadas

n1: Cantidad de cajas contadas de la dilución más baja

n2: Cantidad de cajas contadas de la dilución más alta

d: Recíproco de la dilución contada

## 8. Reporte de datos y documentos utilizados:

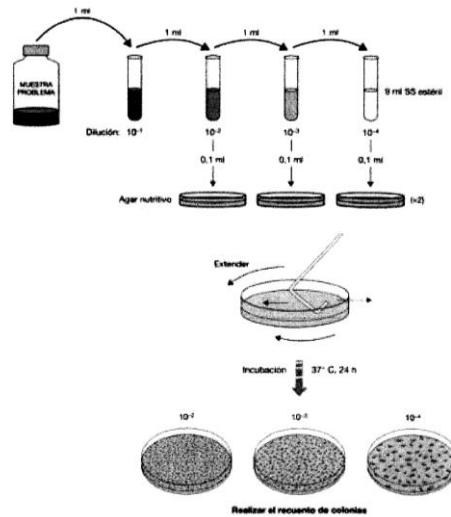
Se debe anotar y notificar acerca de cualquier anomalía que encuentre durante el procedimiento.

## 9. Diagrama:

### 9.1. Preparación de medios a partir de sus componentes:

Componentes	MSE	AB			AM			R		
		100	150	200	100	150	200	100	150	200
Peptona (g)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gelatina (g)	2.5									
Extracto de levadura (g)	5.0									
Sacarosa (g)	100									
Azúcar blanca (g)		100	150	200						
Azúcar morena (g)					100	150	200			
Rapadura (g)								100	150	200
Glucosa (g)	5.0									
Citrato de sodio (g)	1.0									
Azida de sodio (g)	0.075									
Agar Agar (g)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15


### 9.2. Siembra microbiológica por superficie



### 9.3. Ejemplos de colonias de *Leuconostoc mesenteroides* que se cuentan como una



Anexo 2: Procedimiento para la preparación y evaluación de medios de cultivo costo-efectivos a partir de productos de la industria azucarera.

<p>Megaproyecto Bioquímica y Microbiología Universidad del Valle de Guatemala</p> 	<p>Procedimiento normado de operación</p>	<p>No. Documento: 2 Versión: 2 Fecha: 01/07/2009 Páginas Totales: 11</p>
	<p><b>Procedimiento de preparación y evaluación de medios de cultivo costo/efectivos para <i>L. mesenteroides</i></b></p>	<p>Autor: Bárbara de la Peña</p>

### 1. Propósito:

- 1.1. Preparar medios de cultivo, sólidos y líquidos, a partir de los subproductos de la industria azucarera.
- 1.2. Evaluar la efectividad y especificidad de los medios de cultivo para *Leuconostoc mesenteroides*.
- 1.3. Establecer las condiciones y cuidados bajo las cuales se debe realizar la preparación de los medios de cultivo experimentales para *Leuconostoc mesenteroides*.
- 1.4. Estandarizar el procedimiento de preparación de medios de cultivo y siembra de *Leuconostoc mesenteroides*.
- 1.5. Determinar los medios de cultivo costo/efectivos a utilizar en el ingenio Pantaleón.

### 2. Aplicación:

Este procedimiento se utilizará para preparar y evaluar medios de cultivo experimentales, utilizando productos de la industria azucarera, para el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, buscando con ello la fabricación de medios de cultivo costo-efectivos. El procedimiento será utilizado en el Megaproyecto de la Facultad de Ingeniería y el Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.

### **3. Terminología y abreviaciones:**

- 3.1. pH: potencial hidrógeno o nivel de ácidos o bases en una sustancia.
- 3.2. mL: mililitro ( $1 \times 10^{-3}$  litros)
- 3.3.  $\mu$ L: microlitro ( $1 \times 10^{-6}$  litros)
- 3.4. %: por ciento
- 3.5. °C: grados centígrados
- 3.6. g: gramos
- 3.7. cm: centímetros
- 3.8. UFC: Unidad formadora de colonia
- 3.9. MSE: agar Mayeux, Sandine y Elliker (por sus elaboradores)
- 3.10. BHI: Infusión Cerebro Corazón (por sus siglas en inglés)

### **4. Principio:**

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. Además, se debe buscar medios de cultivo que sean costo efectivos, es decir, que los componentes del medio de cultivo no sean de un valor elevado y que el medio sea selectivo y diferencial.

### **5. Seguridad:**

- 5.1. Realizar el procedimiento en el laboratorio, en condiciones estériles.
- 5.2. Utilizar guantes desechables para evitar la contaminación.
- 5.3. Utilizar bata larga y cerrada en todo momento.
- 5.4. Tomar las precauciones necesarias para el manejo de materiales biopeligrosos.
- 5.5. Descontaminar cualquier derrame con solución de etanol al 70% o cloro al 10%.
- 5.6. Documentar detalladamente cualquier eventualidad.

**6. Equipos, materiales y reactivos:**

- 6.1. Solución amortiguadora a pH 4, 7 y 9 (adquiridas comercialmente)
- 6.2. Agua destilada
- 6.3. Potenciómetro manual.
- 6.4. Pizeta
- 6.5. Erlenmeyer de tamaño adecuado
- 6.6. Balanza analítica
- 6.7. Pipeta de 10mL
- 6.8. Beaker de 20 mL
- 6.9. Agitador magnético
- 6.10. Estufa/agitador
- 6.11. Autoclave
- 6.12. Probeta de 15 mL
- 6.13. Cajas petri
- 6.14. Bolsa de plástico
- 6.15. Parafilm
- 6.16. Muestra de jugo
- 6.17. Tubos de ensayo
- 6.18. Pipeta de 5mL despuntada
- 6.19. Agua de peptona estéril al 10%
- 6.20. Cabina de flujo laminar
- 6.21. Etanol al 70%
- 6.22. Micropipetas de 100 o 200  $\mu$ L (P-100 o P-200)
- 6.23. Puntas estériles para micropipetas
- 6.24. Cajas Petri con medio de cultivo sólido de interés (a temperatura ambiente)
- 6.25. Esparcidores estériles
- 6.26. Incubadora
- 6.27. Pipeta de 5mL
- 6.28. Medio BHI

## 7. Procedimiento:

### - Preparación y uso de medios de cultivo

- 7.1. Previo a la preparación del medio, medir el pH del agua destilada a utilizar, empleando un potenciómetro calibrado.
  - 7.1.1. Encender el potenciómetro manual, moviendo el seguro de Off a On.
  - 7.1.2. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 7.
  - 7.1.3. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
  - 7.1.4. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 9.
  - 7.1.5. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
  - 7.1.6. Determinar el pH de una solución amortiguadora de pH 4.
  - 7.1.7. Extraer el potenciómetro de la solución y lavar con agua destilada mediante el uso de una pizeta. Secar con papel Kimwipe.
  - 7.1.8. Medir el pH del agua destilada.
  - 7.1.9. Apagar el potenciómetro moviendo el seguro de On a Off.
- 7.2. Preparar el medio de cultivo a partir de sus componentes en un erlenmeyer de tamaño adecuado (medios experimentales a partir de productos de la industria azucarera) ver diagrama 9.3-9.10. Una vez determinada la cantidad de medio necesario, calcular la cantidad de los distintos componentes basándose en la teoría.
  - 7.2.1. Identificar el medio de cultivo.
    - A. Código del medio
    - B. Fecha de preparación
    - C. Encargado
  - 7.2.2. Pesar con una balanza analítica calibrada cada uno de los componentes por separado, buscando la menor incertidumbre posible.
  - 7.2.3. Agregar los componentes uno a uno, en el orden que dice la receta (NO AGREGAR EL AGAR).
  - 7.2.4. Disolver con la cantidad de agua necesaria.
    - A. Tomar 10mL del medio líquido y colocarlo en un beaker limpio.

- B. Medir le pH del medio utilizando un potenciómetro de acuerdo al procedimiento indicado en el punto 7.1.
- 7.2.5. Agregar el agar (medio sólido).
- 7.2.6. Agitar (con agitador magnético) y calentar (a ebullición) en una estufa/agitador hasta que el medio quede cristalino.
- 7.2.7. Autoclavear por 15 minutos a 120°C.
- 7.3. Verter el medio de cultivo en las cajas petri o en los tubos de ensayo con tapadera.
  - 7.3.1. Esperar a que baje la presión de la autoclave y sacar el medio.
  - 7.3.2. Esperar a que la temperatura del medio llegue a 55±°C.
  - 7.3.3. Colocar el medio en la cabina de flujo laminar esterilizada con etanol al 70%.
  - 7.3.4. Medir con una probeta estéril 15 mL del medio (medio sólido o medio líquido).
  - 7.3.5. Llenar la caja petri estéril o el tubo con la cantidad de medio medido.
  - 7.3.6. Si las cajas o tubos van a ser utilizadas inmediatamente, identificar cada una de ellas en la tapadera.
    - A. Código del medio
    - B. Fecha
    - C. Muestra
    - D. Dilución (si es necesario)
    - E. Encargado
  - 7.3.7. Si no se van a utilizar inmediatamente, almacenar en el refrigerador entre 4-6°C en una bolsa de plástico o con Parafilm e identificarlo con el código del medio y encargado.

- **Preenriquecimiento de *Leuconostoc mesenteroides***

7.4. Preenriquecimiento:

- 7.4.1. Calcular la cantidad de medio BHI de acuerdo al volumen necesario y 30% de sacarosa (respecto al BHI calculado).
- 7.4.2. Pesar el medio BHI en una balanza analítica, al igual que la sacarosa.

- 7.4.3. En un erlenmeyer de tamaño adecuado disolver el medio BHI y sacarosa, en el volumen deseado.
- 7.4.4. Verter el medio en tubos de ensayo con tapadera, 10mL de BHI.
- 7.4.5. Identificar los tubos de ensayo:
  - A. Código del medio
  - B. Fecha de preparación
  - C. Encargado
- 7.4.6. Autoclavear por 15 minutos a 121°C.
- 7.4.7. Esperar a que baje la presión de la autoclave y sacar la gradilla con los tubos de ensayo.
- 7.4.8. Colocar la gradilla en la cabina de flujo laminar esterilizada con etanol al 70% hasta que los tubos lleguen a temperatura ambiente.
- 7.4.9. Cerrar los tubos.
- 7.4.10. Si los tubos van a ser utilizados inmediatamente, identificar cada una de ellos.
  - A. Código del medio
  - B. Fecha
  - C. Muestra
  - D. Dilución (si es necesario)
  - E. Encargado
- 7.4.11. Si los tubos no van a ser utilizados inmediatamente, almacenarlos en refrigeración entre 4-6°C.
- 7.4.12. Con un asa de argolla estéril, tomar una azada de una colonia del medio de conservación de cepas. Flamear la boca de un tubo con mL de medio BHI (enriquecido con azúcar) e inocularla en el caldo, flamear la boca del tubo y cerrarlo.
- 7.4.13. Incubar a 32°C por 2 horas y media.

– **Siembra por superficie**

- 7.5. Esterilizar la cabina de flujo laminar utilizando etanol al 70%.

- 7.6. Si el medio de cultivo en el que se sembrarán los microorganismos se encuentra en refrigeración, asegurarse que llegue a temperatura ambiente (incubadora).
- 7.7. Colocar las cajas Petri (atemperadas) con medio de interés sobre superficies previamente desinfectadas con la tapadera hacia arriba.
- 7.8. Numerar e identificar adecuadamente las cajas.
- 7.9. Tomar la micropipeta P-100 o P-200 y una caja de puntas estériles adecuadas para esta.
- 7.10. Ajustar el volumen de la pipeta al volumen del inóculo microbiano que sembrará por superficie en el medio sólido (100  $\mu$ L).
- 7.11. Llevar los tubos que contienen las muestras a sembrar dentro de la campana de flujo laminar.
- 7.12. Tomar 100  $\mu$ L de la muestra a sembrar con la P-100 o P-200.
- 7.13. Verter el volumen del inóculo tomado con la micropipeta en el centro de la caja con medio de cultivo.
- 7.14. Distribuir uniformemente el inóculo con esparcidor sobre toda la superficie del medio de cultivo (ver diagrama 9.1).
- 7.15. Tapar las cajas y dejarlas reposar por aproximadamente 5 minutos o hasta que el inóculo sea absorbido por el medio de cultivo.
- 7.16. Dejar una caja con medio sin sembrar, como control de ambiente.
- 7.17. Colocar las cajas con la tapa hacia abajo e incubar según requerimientos de microorganismos específico.
  - 7.17.1. Incubar a 32°C por 6, 12 y 24 horas.
- 7.18. Observar el crecimiento de las colonias específicas para *Leuconostoc mesenteroides* (ver diagrama 9.2) y realizar un conteo del número de colonias.

- **Siembra en medio líquido:**

- 7.19. Esterilizar la cabina de flujo laminar con etanol al 70%.
- 7.20. Si el medio de cultivo en el que se sembrarán los microorganismos se encuentra en refrigeración, asegurarse que llegue a temperatura ambiente (incubadora).
- 7.21. Colocar los tubos (atemperados) con medio de interés sobre superficies previamente desinfectadas.

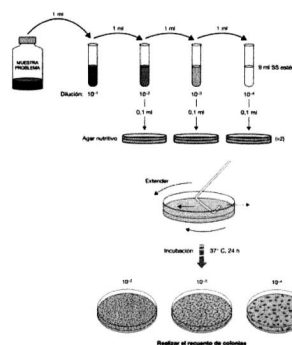
- 7.22. Numerar e identificar adecuadamente los tubos.
- 7.23. Tomar la micropipeta P-100 o P-200 y una caja de puntas estériles adecuadas para esta.
- 7.24. Ajustar el volumen de la pipeta al volumen del inóculo microbiano que sembrará por superficie en el medio sólido (100  $\mu$ L).
- 7.25. Llevar los tubos que contienen las muestras sembrar dentro de la campana de flujo laminar.
- 7.26. Tomar 100  $\mu$ L de la muestra a sembrar con la P-100 o P-200.
- 7.27. Verter el volumen del inóculo tomado con la micropipeta en el tubo, sin tocar las paredes.
- 7.28. Distribuir uniformemente el inóculo con agitación suave.
- 7.29. Dejar un tubo con medio sin sembrar, como control de ambiente.
- 7.29.1. Incubar a 32°C por 6, 12 y 24 horas.
- 7.30. Observar el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* por medio de la observación de turbidez en el medio.

## 8. Reporte de datos y documentos utilizados:

Se debe anotar y notificar acerca de cualquier anomalía que encuentre durante el procedimiento.

## 9. Diagrama:

### 9.1. Siembra microbiológica por superficie



### 9.2. Ejemplos de colonias de *Leuconostoc mesenteroides* que se cuentan como una



## 9.3. Preparación de medios a partir de sus componentes para medios sólidos (Prueba 1):

Componente	C			JF			ME			MC			MP		
	100	150	200	50	100	250	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Peptona (g)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gelatina (g)				2.5	2.5	2.5									
Cachaza (g)	100	150	200												
Jugo filtrado (mL)				50	100	150									
Meladura evaporada (mL)							50	100	150						
Meladura clarificada (mL)										50	100	150			
Miel primaria (mL)													50	100	150
Citrato de sodio (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Azida de sodio (g)	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
Agar Agar (g)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

## 9.4. Preparación de medios a partir de sus componentes para medios sólidos (Prueba 2):

Componente	C			JF			ME			MC			MP		
	200	250	300	200	250	300	150	200	250	150	200	250	200	250	300
Peptona (g)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gelatina (g)				2.5	2.5	2.5									
Cachaza (g)	200	250	300												
Jugo filtrado (mL)				200	250	300									
Meladura evaporada (mL)							150	200	250						
Meladura clarificada (mL)										150	200	250			
Miel primaria (mL)													200	250	300
Citrato de sodio (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Azida de sodio (g)	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
Agar Agar (g)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

## 9.5. Preparación de medios a partir de sus componentes para medios sólidos (Prueba 3 con Citrato y Azida de Na):

Componente	ME		MC	MP
	200	250	250	200
Peptona (g)	10	10	10	10
Meladura evaporada (mL)	200	250		
Meladura clarificada (mL)			250	
Miel primaria (mL)				200
Citrato de sodio (g)	1.0	1.0	1.0	1.0
Azida de sodio (g)	0.075	0.075	0.075	0.075
Agar Agar (g)	15	15	15	15




9.9. Preparación de medios a partir de sus componentes para medios líquidos (Prueba 3 con citrato y azida de Na):

Componente	C	ME	MC	MP
		50	25	25
Peptona (g)	10	10	10	10
Cachaza	50			
Meladura evaporada (mL)		25		
Meladura clarificada (mL)			25	
Miel primaria (mL)				25
Citrato de sodio (g)	1.0	1.0	1.0	1.0
Azida de sodio (g)	0.075	0.075	0.075	0.075

9.10. Preparación de medios a partir de sus componentes para medios líquidos (Prueba 3 sin citrato y azida de Na):

Componente	C	ME	MC	MP
		50	25	25
Peptona (g)	10	10	10	10
Cachaza	50			
Meladura evaporada (mL)		25		
Meladura clarificada (mL)			25	
Miel primaria (mL)				25

Anexo 3: Procedimiento de evaluación de bactericidas empleados en el ingenio Pantaleón.

<p>Megaproyecto Bioquímica y Microbiología Universidad del Valle de Guatemala</p> 	<p>Procedimiento normado de operación</p>	<p>No. Documento: 3 Versión: 2 Fecha: 11/07/2009 Páginas Totales: 3</p>
	<p><b>Procedimiento de evaluación de bactericidas para <i>Leuconostoc mesenteroides</i></b></p>	<p>Autor: Bárbara de la Peña</p>

### 1. Propósito:

1.1. Determinar la eficiencia de los bactericidas, empleados durante el proceso del ingenio, en la eliminación de *Leuconostoc mesenteroides*.

### 2. Aplicación:

Este procedimiento se utilizará para determinar la eficiencia de los bactericidas en la eliminación de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. El procedimiento será utilizado en el Megaproyecto de la Facultad de Ingeniería y el Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.

### 3. Principio:

Los bactericidas son sustancias secretadas por organismos como defensa contra bacterias. Estos tienen un efecto lítico sobre la bacteria, provocando la reducción de la población. Estos desinfectantes, como también pueden llamarse, causan un efecto de lisis al romper los enlaces peptidoglicanos de la pared celular de la bacteria, permitiendo el ingreso de grandes cantidades de agua a la célula, lo que provoca la ruptura celular. Los bactericidas pueden ser naturales o químicos.

#### 4. Referencias:

- 4.1. Bauer, A. W.; W. M. Kirby; J. C. Sherris and M. Turck. 1996. *Antibiotic susceptibility testing standardized single disk method*. American Journal of Clinical Pathology. 42: 493

#### 5. Seguridad:

- 5.1. Realizar el procedimiento en el laboratorio, en condiciones estériles.
- 5.2. Utilizar guantes desechables para evitar la contaminación.
- 5.3. Utilizar bata larga y cerrada en todo momento.
- 5.4. Tomar las precauciones necesarias para el manejo de materiales biopeligrosos.
- 5.5. Descontaminar cualquier derrame con solución de etanol al 70% o cloro al 10%.
- 5.6. Documentar detalladamente cualquier eventualidad.

#### 6. Equipos, materiales y reactivos:

- 6.1. Cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*
- 6.2. Tubos estériles
- 6.3. Caldo tripticasa soya
- 6.4. Bactericida SMB
- 6.5. Bactericida Beta-Stab
- 6.6. Hisopos estériles
- 6.7. Agar Mueller Hinton
- 6.8. Micropipeta de 10 $\mu$ L
- 6.9. Discos de papel filtro estériles


#### 7. Procedimiento:

##### - Susceptibilidad a bactericidas por el método de Bauer-Kirby:

- 7.1. Preparar una suspensión de *Leuconostoc mesenteroides* en 4mL de caldo tripticasa soya enriquecido con 30% de sacarosa (turbidez equivalente a estándar 0.5 de MacFarland).
- 7.2. Preparar diluciones en agua de peptona de los bactericidas a evaluar (SMB y Beta-Stab). Para ambos bactericidas evaluar puro, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>.

- 7.3. Extraer el inóculo con un hisopo y remover el exceso presionando sobre las paredes del tubo.
- 7.4. Inocular la superficie de una caja con agar Mueller Hinton (vertical y horizontalmente).
- 7.5. Dejar que el medio absorba el inóculo por 5 minutos.
- 7.6. Dividir la caja en 6 secciones y colocar en cada una de ellas un disco con 10 $\mu$ L de la dilución del bactericida correspondiente y en una sección un disco con agua destilada estéril, como control negativo.
- 7.7. Dejar secar el medio por 10 minutos.
- 7.8. Incubar las cajas por 24 horas a 32°C.
- 7.9. Medir los halos de inhibición en cm.

Anexo 4: Evaluación de actividad enzimática de *Leuconostoc mesenteroides*.

<p>Megaproyecto Bioquímica y Microbiología Universidad del Valle de Guatemala</p> 	<p>Procedimiento normado de operación</p>	<p>No. Documento: 4 Versión: 2 Fecha: 01/09/2009 Páginas Totales: 4</p>
	<p><b>Procedimiento de evaluación de actividad enzimática de <i>Leuconostoc mesenteroides</i></b></p>	<p>Autor: Bárbara de la Peña</p>

**1. Propósito:**

- 1.1. Determinar la agresividad de la cepa aislada de *Leuconostoc mesenteroides* por medio de la evaluación de la producción de fructosa como producto de la actividad enzimática.

**2. Aplicación:**

Este procedimiento se utilizará para determinar la agresividad de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* aislada de jugo de caña por medio de la evaluación de la producción de fructosa como producto de la actividad enzimática. El procedimiento será utilizado en el Megaproyecto de la Facultad de Ingeniería y el Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.

**3. Principio:**

Debido a que uno de los productos de la reacción es fructosa, métodos espectrofotométricos específicos para fructosa puede utilizarse para determinar la actividad enzimática de la dextranasa de *L. mesenteroides*. Un ensayo enzimático es un procedimiento de laboratorio por el cual se puede medir la velocidad de una reacción enzimática. Debido a que las enzimas no se consumen en la reacción, los ensayos enzimáticos se basan en las mediciones de cambios experimentales en la concentración del sustrato (concentración en descenso) o productos. Algunos de los factores que pueden afectar la actividad enzimática son la temperatura, pH y concentraciones de sales.

Consecuentemente, para algunos ensayos enzimáticos estos factores son modificados para observar y medir cambios en el rango de reacción.

#### **4. Referencias:**

- 4.1. Lehninger, A. 2004. *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. W. H. Freeman. 1119pp

#### **5. Seguridad:**

- 5.1. Realizar el procedimiento en el laboratorio, en condiciones estériles.
- 5.2. Utilizar guantes desechables para evitar la contaminación.
- 5.3. Utilizar bata larga y cerrada en todo momento.
- 5.4. Tomar las precauciones necesarias para el manejo de materiales biopeligrosos.
- 5.5. Descontaminar cualquier derrame con solución de etanol al 70% o cloro al 10%.
- 5.6. Documentar detalladamente cualquier eventualidad.

#### **6. Equipos, materiales y reactivos:**

- 6.1. Espectrofotómetro UV-VIS
- 6.2. Miel Primera
- 6.3. Peptona
- 6.4. Medio BHI
- 6.5. Cepa aislada de *Leuconostoc mesenteroides*
- 6.6. Sacarosa
- 6.7. Glucosa
- 6.8. Fructosa
- 6.9. Solución de Resorcinol-Tiourea (para 1L: 0.1g resorcinol, 0.25g tiourea, 100mL ácido acético)
- 6.10. HCl 30%
- 6.11. Reactivo de Somogyi (Solución I:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10%, Solución II: 0.5 N NaOH)
- 6.12. Solución 1% de Ácido Dinitrosalicílico (para 1L: 10 g ácido dinitrosalicílico, 2g fenol, 0.5g sulfito de sodio, 10g hidróxido de sodio)

- 6.13. Solución 40% de Tartrato de Sodio y Potasio
- 6.14. Azúcar Morena
- 6.15. Tubos de ensayo
- 6.16. Tubos Eppendorf ®
- 6.17. Microcentrifuga
- 6.18. Papel de aluminio
- 6.19. Parafilm
- 6.20. Papel filtro

## 7. Procedimiento:

- **Determinación de la longitud de onda para la determinación de *L. mesenteroides*:**
  - 7.1. Analizar diferentes medios de cultivo inoculados con *L. mesenteroides* con un espectrofotómetro UV-Vis.
    - 7.1.1. Evaluar en un rango de 190-320nm, para determinar el punto máximo al cual puede ser medida la absorbancia.
- **Determinación de la curva de crecimiento de *L. mesenteroides*:**
  - 7.2. Preparación del medio líquido:
    - 7.2.1. Medir con una probeta 25mL de Miel Primera (MP) y pesar 10g de Peptona.
    - 7.2.2. Disolver en 1L de agua destilada.
    - 7.2.3. Agregar a cada tubo 15mL del medio preparado.
    - 7.2.4. Autoclavear por 15 minutos a 121°C.
  - 7.3. Inoculación de *L. mesenteroides*:
    - 7.3.1. Agregar 100µL de medio BHI inoculado con *L. mesenteroides* a cada uno de los tubos preparados con medio MP.
    - 7.3.2. Mezclar por inversión.
    - 7.3.3. Incubar a 32°C por 6 horas.
  - 7.4. Determinación de la curva de crecimiento de *L. mesenteroides*:
    - 7.4.1. Medir la absorbancia a 260nm cada hora, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (longitud de onda determinada por el inciso anterior).

A. Blanco: agua destilada

- **Prueba piloto para determinar el método espectrofotométrico a utilizar:**

7.5. Preparar soluciones 1% de sacarosa, sacarosa-glucosa-fructosa, sacarosa-fructosa, sacarosa-glucosa, glucosa-fructosa, glucosa y fructosa.

7.6. Determinar la absorbancia de azúcares reductores por 2 métodos:

7.6.1. Método de Resorcinol-Tiourea:

- A. Agregar 1 parte de solución de azúcar, 15 partes de agua destilada, 2 partes de Solución I de Somogyi y 2 partes de Solución II de Somogyi.
- B. Filtrar la solución utilizando papel filtro.
- C. Agregar 2mL de la solución filtrada en un tubo de ensayo.
- D. A cada tubo agregar 2mL de solución de Resorcinol-Tiourea y 7mL de HCl 30%. Mezclar por inversión.
- E. Calentar a 80°C por 10 minutos (tubos cubiertos con papel de aluminio).
- F. Enfriar a Temperatura Ambiente utilizando un baño de agua fría.
- G. Medir la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 520nm.
  - a. Blanco: 2mL de agua destilada y 1mL de solución de Resorcinol-Tiourea.

7.6.2. Método colorimétrico de Dinitrosalicílico (DNS):

- A. Agregar 3mL de solución DNS y 3mL de solución de azúcar a un tubo de ensayo (cubrir con parafilm). Mezclar por inversión.
- B. Calentar a 90°C por 5-15 minutos (hasta un cambio de color de naranja a rojo/café).
- C. Agregar 1mL de solución al 40% de Tartrato de Sodio y Potasio (para estabilizar el color).
- D. Enfriar a Temperatura Ambiente utilizando un baño de agua fría.
- E. Medir la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 575nm.
  - a. Blanco: 1mL de agua destilada y 3mL de solución de DNS.

- **Determinación de la actividad enzimática de *L. mesenteroides*:**

7.7. Preparación de medio líquido enriquecido (2 métodos):

7.7.1. Medio enriquecido de sacarosa

- A. Disolver 1g de sacarosa en 100mL de agua destilada (solución 1%).
- B. A cada tubo de ensayo agregar 15 mL de la solución.
- C. Autoclavear por 15 minutos a 121°C.

7.7.2. Medio enriquecido de azúcar morena

- A. Disolver 1g de azúcar morena en 100mL de agua destilada (solución 1%).
- B. A cada tubo de ensayo agregar 15 mL de la solución.
- C. Autoclavear por 15 minutos a 121°C.

7.8. Inoculación de *L. mesenteroides*

- 7.8.1. Agregar 1mL de medio MP inoculado con *L. mesenteroides* a cada uno de los tubos con soluciones de sacarosa y azúcar morena.

- 7.8.2. Incubar a 32°C.

7.9. Medición de absorbancia de azúcares reductores:

- 7.9.1. Tomar muestras de las soluciones incubadas a la 1, 3 y 20 horas (1mL en un Eppendorf ®).

- 7.9.2. Centrifugar a 6000g por 15 minutos.

- 7.9.3. Transferir la fase acuosa a otro Eppendorf ®.

- 7.9.4. Medir la absorbancia utilizando el método de DNS (determinado por la prueba piloto).

- A. Trabajar en triplicado.

- a. Blanco: Solución de agua con *L. mesenteroides* (sin sacarosa o azúcar morena).

- b. Control negativo:

- 7.9.4.A.b.1. Solución de sacarosa sin inculo

- 7.9.4.A.b.2. Solución de azúcar morena sin inculo

## Anexo 5: Pruebas piloto.

Para la determinación de las concentraciones de azúcar a utilizar en los medios de cultivo se realizó una prueba piloto se usarán las siguientes concentraciones de azúcar 150g/L y 250g/L. Además de azúcar los medios contenían peptona (10g/L) y agar (15g/L). La metodología para la preparación de los medios y la siembra de estos se describe en las sección de anexo (Anexo A5-A8).

- Preparación de muestras de trabajo en laboratorio:
  1. Se recolectarán muestras de guarapo de distintos molinos y pasos del proceso de producción de sacarosa en el ingenio Pantaleóna, las cuales deberán ser transportadas en una hielera a la Universidad del Valle de Guatemala durante los meses de enero a mayo 2008.
  2. Las muestras de jugo de caña se almacenarán en el congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$  del laboratorio de Operaciones Unitarias del departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala.
  3. Para trabajar, se sacará las muestra congeladas 24h antes de empezar a trabajar a un refrigerador a  $6^{\circ}\text{C}$ ; 2h antes de empezar a trabajar, se colocará la muestra fuera del refrigerador, hasta que llegue a temperatura ambiente.
  
- Determinación de *Leuconostoc mesenteroides* y microbiota total en los molinos
  1. Se tomará las muestras y se diluirá de acuerdo con la muestra utilizada (Wistereich 1997).
  2. Para determinar la concentración de *L. mesenteroides* en los jugos de caña se utilizará el medio MSE, con una siembra por superficie, utilizando un inóculo de 100 $\mu\text{L}$ .
  3. Para determinar la microbiota total se realizará una siembra por vertido utilizando agar plate count y un inóculo de 1 mL (Noack 2008).

4. Con el uso de agar Plate Count se aislarán las dos bacterias adicionales que se identificarán en el proceso.
  5. Preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de la caña de azúcar:
    - a. Se verificará periódicamente la identidad de las bacterias que crecen en los medios de cultivo experimentales. Esto se realizará mediante pruebas bioquímica de azúcares en medio CTA, bilis, SIM, y por la tinción de Gram (Anexo A6). Para el análisis de cepas, se tomó al azar tanto colonias formadoras de polímeros de alta masa molecular como colonias no formadoras de estos polímeros, logrando un total de 48 colonias, que fueron analizadas por pruebas bioquímicas.
- Preparación y siembra de medios Plate Count
    1. Pesar 22.5g de agar Plate Count y agregarle 1L de agua destilada.
    2. Disolver los componentes en un erlenmeyer de tamaño suficiente.
    3. Esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C.
    4. Tomar la muestra y hacer diluciones seriadas según sea necesario para la proveniencia de la muestra.
    5. Verter el medio en cajas petri, 15 ml por caja, y esperar a que se solidifique.
    6. Inocular, esparcir por toda la caja y dejar absorber el inóculo por 10 minutos.
    7. Incubar las cajas a 32°C con la tapadera hacia abajo por 24h.
    8. Contar las colonias y reportar los resultados como UFC/ml.
  - Preparación y siembra de medios de azúcar morena/rapadura
    1. Pesar 2.5g de peptona, 3.8g de Agar Agar y 37.5g de azúcar morena o rapadura.
    2. Disolver los componentes en un erlenmeyer de tamaño suficiente con 250ml de agua destilada.
    3. Esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C.

4. Tomar la muestra y hacer diluciones seriadas según sea necesario para la proveniencia de la muestra.
5. Verter el medio en cajas petri, 15 ml por caja, y esperar a que se solidifique.
6. Inocular, esparcir por toda la caja y dejar absorber el inóculo por 10 minutos.
7. Incubar las cajas a 32°C con la tapadera hacia abajo por 24h.
8. Contar las colonias y reportar los resultados como UFC/ml.

- Preparación de diluciones de jugo de caña

1. Para la preparación de las muestras de jugo de caña, se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras de jugos de los diferentes procesos del ingenio.
2. Tomar 1mL de guarapo descongelado con una micropipeta Eppendorf® de 1000µL despuntada y colocarlo en un tubo con 9mL de agua de peptona estéril y agitar.
3. Para la siguiente dilución, tomar 1mL de la anterior y colocarla en 9mL de peptona estéril y agitar.
4. Repetir el paso 2 hasta obtener la dilución deseada.

- Siembra por superficie

1. Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70% y dejar limpiando por lo menos 15 minutos.
2. Realizar las diluciones según se requiera para cada muestra.
3. Colocar las cajas con medio con la tapadera hacia arriba, éstas deben encontrarse a temperatura ambiente.
4. Numerar las cajas según el siguiente código: Muestra-Medio-Dilución.
5. Tomar una pipeta automática P-100 o P-200 y una caja de puntas adecuadas para ésta.
6. Partiendo de la dilución menos concentrada, tomar 100µL de muestra con la micro pipeta e inocular.

7. Distribuir el inóculo en el medio usando un esparcidor limpio y preferiblemente desinfectado con Etanol 70%.
8. Tapar la caja y dejarla 5 minutos con la tapadera hacia arriba para que el inóculo sea absorbido por el medio.
9. Incubar las cajas a 32°C con la tapadera hacia abajo durante 24-48h.

Anexo 6: Preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias desconocidas.

- Coloración de Gram

1. Esterilizar con llama un asa de argolla.
2. Cuando el asa se enfríe, abrir el tubo con el medio BHI, flamear la boca del tubo, introducir el asa, sacarla, flamear la boca del tubo y cerrarlo.
3. Frotar el asa en el portaobjetos y flamearla. Esperar a que el frote se seque y flamear 3 veces el portaobjetos con el cultivo de frente a la llama.
4. Cubrir el frote con cristal violeta, dejar actuar 1 minuto y lavar con agua destilada.
5. Cubrir el frote con lugol, dejar actuar 1 minuto y lavar con agua destilada.
6. Colocar el frote verticalmente y decolorar con 2 gotas de alcohol acetona, lavar inmediatamente con agua destilada.
7. Cubrir el frote con safranina, dejar actuar 1 minuto y lavar con agua destilada.
8. Dejar secar el frote y observarlo en el microscopio con el lente de inmersión (100X).

- Medio SIM

1. En un erlenmeyer disolver medio SIM de acuerdo con la cantidad requerida.
2. En una estufa/agitador calentar el medio con agitación constante hasta que ebulle y quede cristalino.
3. Verter el medio en tubos de ensayo con tapadera de rosca hasta la mitad de su capacidad con una pipeta de 10mL.
4. Esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C.
5. Sacar la gradilla con tubos cerrarlos cuando ya estén a temperatura ambiente. Si los tubos no van a ser usados inmediatamente, colocarlos en refrigeración entre 4-6°C.
6. Tomar un tubo de medio SIM.
7. Tomar una asada del cultivo de la bacteria esterilizado con llama un asa de punta.

8. Tomar el tubo con medio SIM, abrir el tubo, flamear la boca, introducir el asa verticalmente en el centro del tubo de tal forma que la punta del asa quede a 1cm del fondo del tubo, sacar el asa flamear la boca del tubo y cerrarlo.
9. Incubar a 32°C por 24h. con las tapaderas no completamente cerradas.
10. Para la prueba de movilidad si el crecimiento se encuentra en el área de inoculación exclusivamente quiere decir que la bacteria es inmóvil, mientras que si el tubo se pone turbio quiere decir que la bacteria es móvil.
11. Para la prueba del Indol, añadir unas gotas de reactivo de Kovax, si el reactivo toma una coloración rojiza indica una prueba positiva, mientras que si se queda amarillo es negativo.

- Medio Bilis-Esculina

1. Preparación del medio.
2. En un erlenmeyer de tamaño adecuado disolver una cantidad adecuada de medio Bilis esculina en de agua desmineralizada.
3. En una estufa/agitador calentar el medio con agitación constante hasta quede cristalino.
4. Verter el medio en tubos de ensayo con tapadera de rosca hasta la mitad de su capacidad con una pipeta de 10mL.
5. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
6. Cerrar los tubos y dejar que se solidifiquen con una inclinación de aproximadamente 45°.
7. Si los tubos no van a ser usados inmediatamente, colocarlos en refrigeración entre 4-6°C.
8. Para la siembra tomar un tubo de medio y un cultivo de la bacteria, esterilizar con llama un asa de punta.
9. Cuando el asa se enfríe, abrir el tubo con la bacteria, flamear la boca del tubo, introducir el asa, sacarla, flamear la boca del tubo y cerrarlo.

10. Tomar el tubo con medio Bilis, abrir el tubo, flamear la boca, introducir el asa y rayar el área inclinada del medio en tubo, sacar el asa flamear la boca del tubo y cerrarlo.
11. Incubar a 32°C por 24h.
12. La prueba se considera positiva si después de la incubación el medio se torna negro.

- Medio rojo de metilo-Voges Proskauer

1. En un erlenmeyer de tamaño adecuado disolver la cantidad necesaria de medio, para preparar dos tubos por batería.
2. En una estufa/agitador calentar el medio con agitación constante hasta que se torne cristalino.
3. Verter el medio en tubos de ensayo con tapadera de rosca hasta la mitad de su capacidad con una pipeta de 10mL.
4. Esterilizar con autoclave durante 15 minutos a 121°C.
5. Cerrar los tubos.
6. Si los tubos no van a ser usados inmediatamente, colocarlos en refrigeración entre 4-6°C.
7. Para la siembra, tomar los dos tubos de medio y un cultivo de bacteria.
8. Esterilizar con llama un asa de argolla.
9. Cuando el asa se enfríe, abrir el tubo con la bacteria, flamear la boca del tubo, introducir el asa, sacarla, flamear la boca del tubo y cerrarlo.
10. Tomar el tubo con medio RM/VP, abrir el tubo, flamear la boca, introducir el asa y agitarla dentro del medio en tubo, sacar el asa flamear la boca del tubo y cerrarlo.
11. Incubar a 32°C por 24h.
12. A un tubo añadir 5 gotas de rojo de metilo, se considera positiva una coloración roja.

13. Al otro tubo añadir 6 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5% en etanol absoluto y 2 gotas de hidróxido de potasio al 40%, agitar y dejar reposar 15 minutos con agitación eventual. Una coloración rosada se considera una prueba positiva.

- Prueba de Citrato de Simmons

1. Suspender 24.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos.
2. Distribuir en tubos (9ml por tubo) y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. Enfriar en posición inclinada.
4. A partir de un cultivo puro de la bacteria con 18-24 horas de incubación, sembrar en superficie un inóculo ligero , usando una asa sin arrastrar el agar.
5. Incubar a 32 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.
6. La prueba es positiva si se observa crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad. Es negativo si el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.

- Prueba de la Ureasa

1. Preparar la cantidad de medio que sea necesario para el número de tubos que se va a trabajar.
2. A partir de un cultivo puro de la bacteria con 18-24 horas de incubación, sembrar picando el medio un inóculo ligero , usando una asa sin arrastrar el agar.
3. Incubar a 32 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.
4. La prueba es positiva si se observa crecimiento y color rosado intenso, alcalinidad. Es negativo si el medio permanece de color amarillo debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.

## Anexo 7: Preparación de la prueba de inhibición de desinfectantes.

- Prueba de inhibición de desinfectantes
  1. En cajas de medio PC o Mueller Hinton y dividir las en 6 segmentos del mismo tamaño.
  2. Tomar una muestra de la bacteria de interés y sembrarla con un hisopo estéril en toda la superficie del medio.
  3. Dejar absorber el inóculo por 10 minutos.
  4. Realizar diluciones del desinfectante.
  5. En cada segmento de la caja colocar 10µl de desinfectante de la dilución deseada.
  6. En uno de los segmentos colocar 10µl de formaldehído diluido 1:10.
  7. Dejar absorber el inóculo por 10 minutos.
  8. Incubar las cajas a 32°C con la tapadera hacia abajo por 24h.
  9. Medir los halos de inhibición en cada segmento, asignar una medición de referencia a cada dilución y compararla con la del formaldehído.

Anexo 8: Conteos de colonias totales en medio Plate Count Agar y medios experimentales.

- Conteo de colonias
  1. El conteo se realiza de 24h de incubación y un recuento luego de 48h de incubación.
  2. Se realiza un conteo del total de colonias que se observan en la caja Petri.
  3. El resultado que se reporta es donde se tiene el mayor conteo en los 2 días, y utilizando únicamente las cajas donde se tengan entre 5-250 colonias, las que tengan más se reportan como Muy numerosas para ser contadas.
  4. Los resultados se reportan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).
  
- Identificación de Cepas desconocidas

Cuadro 1: Características bioquímicas de la microbiota de los jugos de caña.

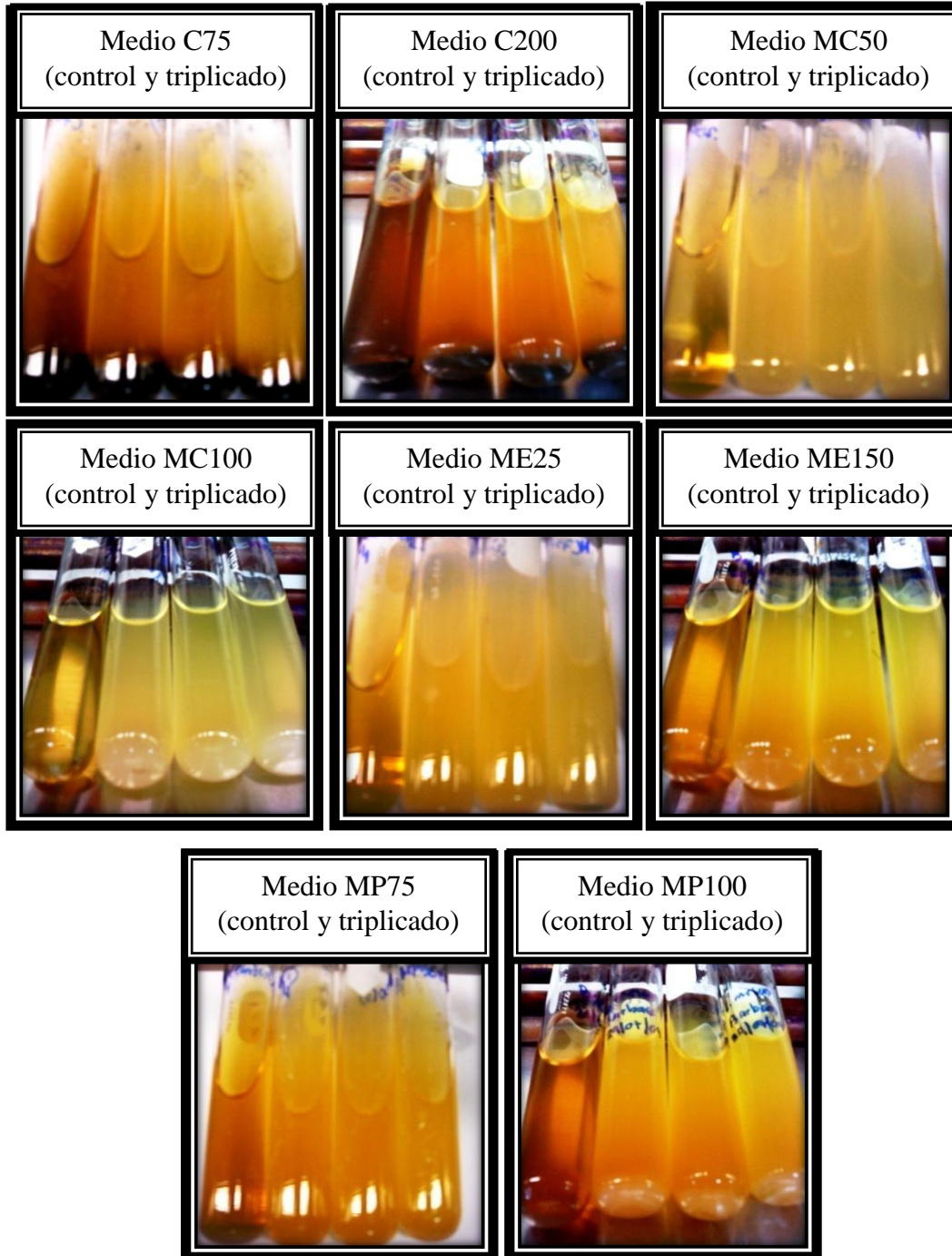
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus casei v. casei</i>	<i>Lactobacillus casei v. alactosus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Coloración de Gram	+	+	+	+	+	+	+	V
Catalasa	-	-	-	-	-	-	+	+
Dextrano	+	+	±	±	±	-	-	-
Levano	-	-	-	-	-	+	+	-
OF Glucosa	F	F	±	±	F	O	F	F/O
Arabinosa	+	-	±	-	-	+	-	V
Fructosa	+	+	±	±	±	-	-	-
Lactosa	±	±	±	±	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	±	±	-	-	-	-
Maltosa	+	+	±	±	±	-	-	-
Manosa	+	±	±	±	±	-	-	-
Sacarosa	+	+	±	±	±	-	-	-
Trealosa	+	±	±	±	±	-	-	-
Xilosa	±	±	±	±	-	-	+	V
Hidrólisis de la esculina	±	±	±	±	-	-	-	-
Hidrólisis de la salicina	±	±	±	±	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	±	-
Crecimiento NaCl 3%	±	±	-	-	-	-	±	-
Crecimiento NaCl 6%	±	-	-	-	-	-	±	-
Crecimiento a 37°C	±	±	±	±	±	±	±	±
Urea	-	-	-	-	-	V	V	V
Rojo de Metilo	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	+	-
Movilidad	-	-	-	-	-	-	+	V
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporas	-	-	-	-	-	-	+	±
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	-	+	V

(Gini 1995, Bourgeois y Larpent 1995, Carr *et al.* 1975, MacFaddin 2000)

## B. Resultados preliminares

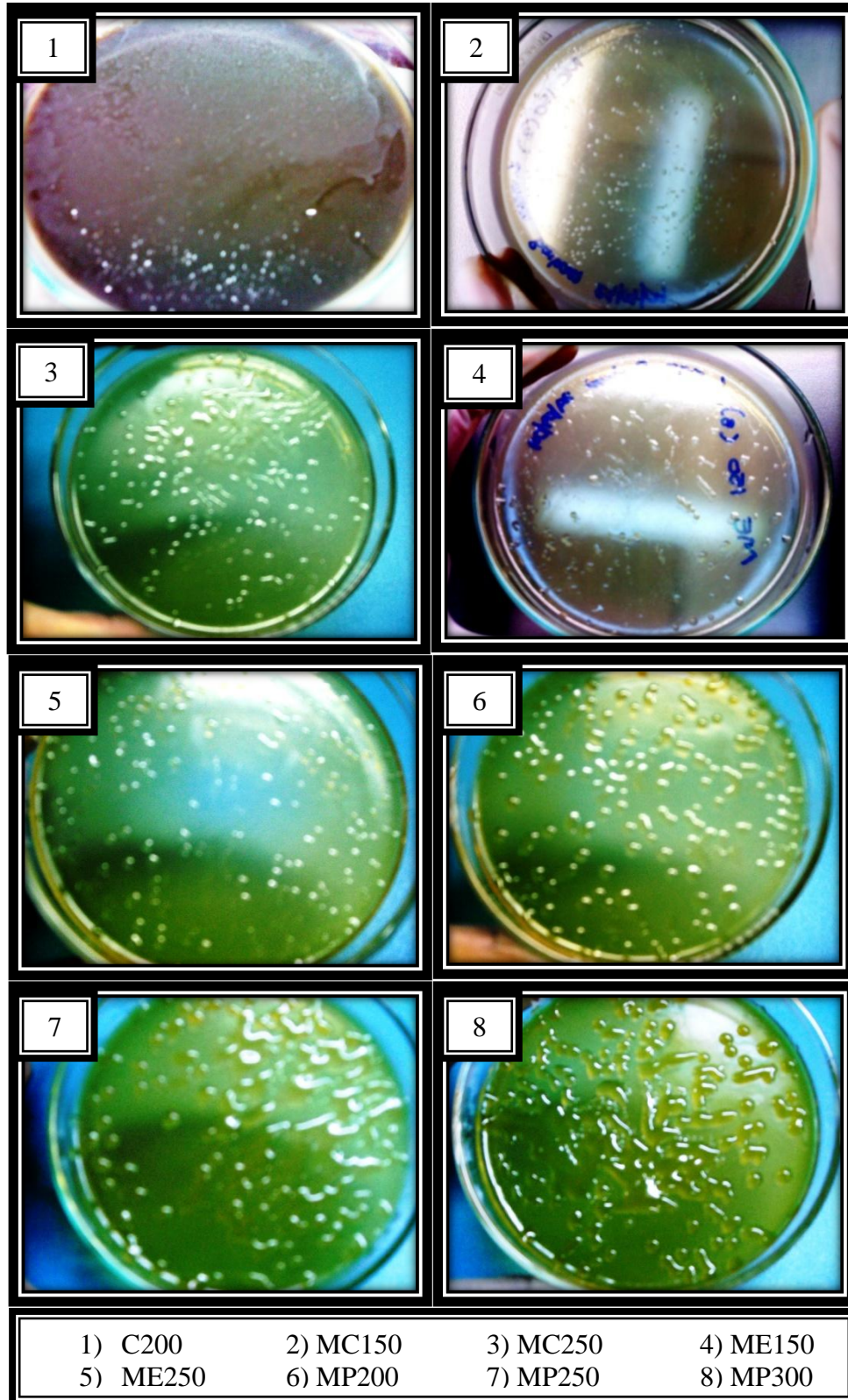
Anexo 1:

Figura 29: Cambio de turbidez en medios líquidos experimentales de C75, C200, MC50, MC100, ME25, ME150, MP75 y MP100.



## Anexo 2:

Figura 30: Recuperación de *Leuconostoc mesenteroides* inoculado en medios experimentales de C200, MC150, MC250, ME150, ME250, MP200, MP250 y MP300.



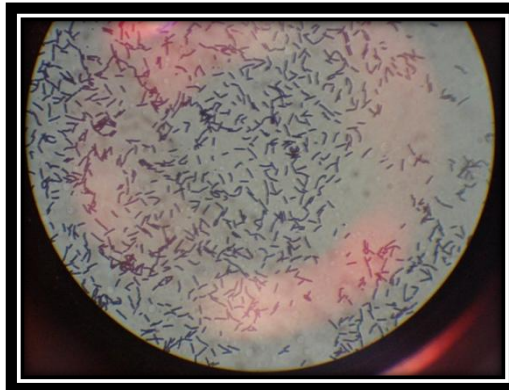
### Anexo 3: Resultados de la prueba piloto

Figura 31: Resultados de la prueba piloto para medio Plate Count en el tándem B.



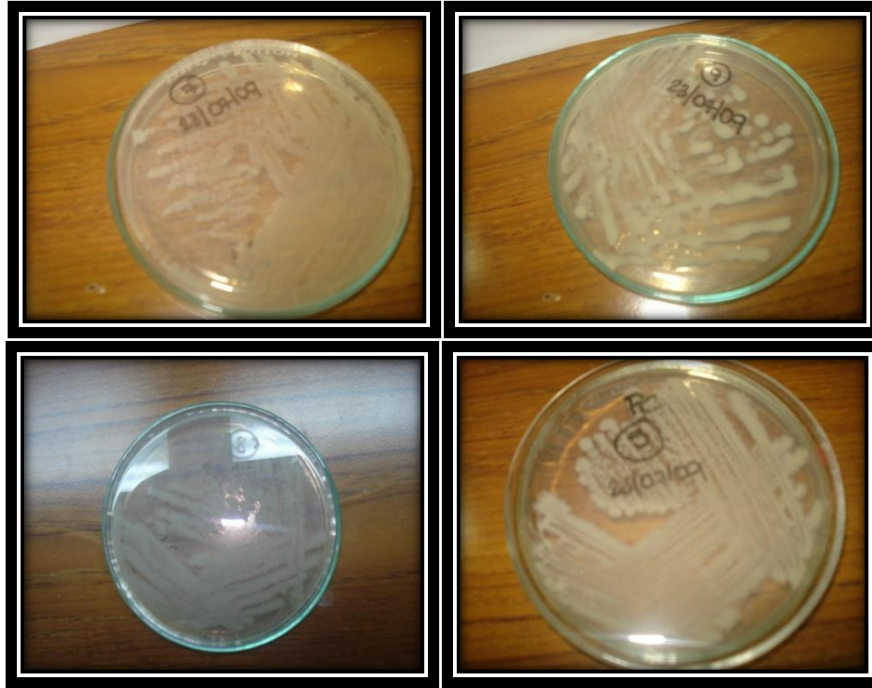
En esta Figura se observan distintos resultados del crecimiento de la microbiota en distintos puntos del proceso azucarero en el tándem B, en medio Plate Count Agar.

Figura 32: Resultados de las tinciones de Gram de la prueba piloto en el tándem B.



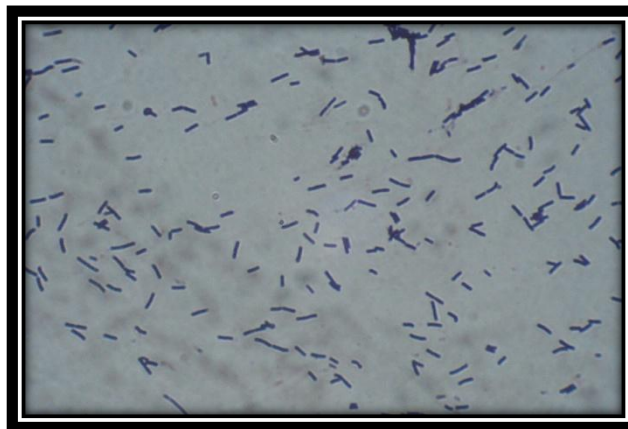
En esta Figura se observa una tinción gram positivo característica de las bacterias que se aislaron posteriormente para identificación.

Figura 33: Resultados de los reaislamientos en medio Plate Count de las bacterias elegidas en el tándem B.



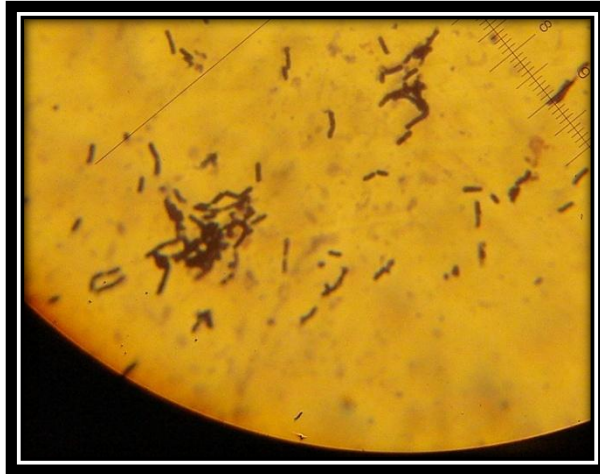
En esta Figura se observa un crecimiento aislado característica de las bacterias que se aislaron posteriormente para identificación.

Figura 34: Resultados de la tinción de Gram para la bacteria identificada como *L. casei*, aislada del tándem B.



En esta Figura se observan bacilos gram positivos pertenecientes a *L. casei*, aislada del tándem B.

Figura 35: Resultados de la tinción de Gram para la bacteria identificada como *B. stearotermophilus*, aislada del tándem B.



En esta Figura se observan bacilos en cadenas cortas, gram positivos pertenecientes a *B. stearotermophilus*, aislada del tándem B.

## C. Análisis de datos

Anexo 1: Análisis de regresión entre recuento de *L. mesenteroides* y la temperatura a lo largo de los molinos del tándem.

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.95547
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.912923
R <sup>2</sup> ajustado	0.891153
Error típico	0.364797
Observaciones	6

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5.580714	5.58071353	41.93613256	0.00293
Residuos	4	0.532306	0.133076495		
Total	5	6.11302			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	9.627898	0.930682	10.34499706	0.000492775	7.043912	12.21188	7.043912	12.21188
Variable X 1	-0.14842	0.022919	-6.475811344	0.002930255	-0.21206	-0.08479	-0.21206	-0.08479

Anexo 2: Análisis de los regresión entre el recuento de microbiota total y la temperatura a lo largo de los molinos del tándem.

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.930341
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.865535
R <sup>2</sup> ajustado	0.831919
Error típico	0.459117
Observaciones	6

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5.427271	5.427271	25.74753	0.007109
Residuos	4	0.843152	0.210788		
Total	5	6.270423			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	10.3573	1.171314	8.842458	0.000903	7.105206	13.60939	7.105206	13.60939
Variable X 1	-0.14637	0.028845	-5.0742	0.007109	-0.22646	-0.06628	-0.22646	-0.06628

Anexo 3: Prueba t de Student para muestras pareadas para la comparación de la densidad de *L. mesenteroides* y de la microbiota total a lo largo de los molinos del tándem.

### Prueba t de Student para jugo primario

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.015739459	5.713722493
Varianza	0.08785958	0.125636822
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.541584557	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-2.440074146	
P(T<=t) una cola	0.04624706	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.09249412	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para Molino 2

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4.637984424	5.552619761
Varianza	0.050600999	0.616146432
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.56033372	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-2.671481507	
P(T<=t) una cola	0.037797466	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.075594932	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para Molino 3

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4.066227112	4.6982729
Varianza	0.008211022	0.036393588
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.633642418	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-8.390534272	
P(T<=t) una cola	0.001775408	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.003550816	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para Molino 4

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	3.329488374	4.53111467
Varianza	1.3793815	0.040790019
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.894639701	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-1.769494213	
P(T<=t) una cola	0.087477767	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.174955535	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para Molino 5

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	2.962287262	3.664812617
Varianza	0.888620027	0.280544085
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.655464023	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-1.958608978	
P(T<=t) una cola	0.072524489	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.145048977	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para Molino 6

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	2.060137312	2.781853551
Varianza	0.780193107	0.072621367
Observaciones	4	4
Coeficiente de correlación de Pearson	-0.264102656	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-1.459171619	
P(T<=t) una cola	0.120307998	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.240615996	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

Anexo 4: Prueba t de Student para muestras pareadas para determinar la significancia de la disminución de la densidad de *L. mesenteroides* entre el jugo diluido y el jugo sulfitado.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.165069	4.426509
Varianza	0.038631	0.067109
Observaciones	4	4
Coeficiente de correlación de Pearson	0.050559	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	4.657302	
P(T<=t) una cola	0.009338	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363	
P(T<=t) dos colas	0.018677	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446	

Anexo 5: Prueba t de Student para muestras pareadas para determinar la significancia de la disminución de la densidad de microbiota total entre el jugo diluido y el jugo sulfitado.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.683396608	5.113715786
Varianza	0.160884073	0.075050021
Observaciones	4	4
Coeficiente de correlación de Pearson	0.890357882	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	5.678167506	
P(T<=t) una cola	0.005411669	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.010823338	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

Anexo 6: Análisis de regresión entre recuento de *L. mesenteroides* y la temperatura a lo largo del proceso.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.68778
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.473042
R <sup>2</sup> ajustado	0.209563
Error típico	0.33791
Observaciones	4

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.205	0.205	1.795367	0.31222
Residuos	2	0.228366	0.114183		
Total	3	0.433366			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	7.046002	1.710214	4.119954	0.054171	-0.31245	14.40446	-0.31245	14.40446
Variable X 1	-0.06871	0.05128	-1.33991	0.31222	-0.28935	0.151929	-0.28935	0.151929

Anexo 7: Análisis de regresión entre recuento de microbiota total y la temperatura a lo largo del proceso.

***Estadísticas de la regresión***

Coefficiente de correlación múltiple	0.132797307
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.017635125
R <sup>2</sup> ajustado	-0.473547313
Error típico	0.347880481
Observaciones	4

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.004345061	0.004345	0.035903	0.867203
Residuos	2	0.242041658	0.121021		
Total	3	0.246386719			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	5.874217143	1.760678387	3.336337	0.079299	-1.70137	13.4498	-1.70137	13.4498
Variable X 1	-0.010003308	0.052792931	-0.18948	0.867203	-0.23715	0.217146	-0.23715	0.217146

Anexo 8: Prueba t de Student para muestras pareadas para la comparación de la densidad de *L. mesenteroides* y de la microbiota total a lo largo del proceso.

### Prueba t de Student para jugo primario

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.015739459	5.713722493
Varianza	0.08785958	0.125636822
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.541584557	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-2.440074146	
P(T<=t) una cola	0.04624706	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.09249412	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para jugo diluido

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.165069	5.683397
Varianza	0.038631	0.160884
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.608618	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-3.22146	
P(T<=t) una cola	0.024265	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363	
P(T<=t) dos colas	0.04853	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446	

### Prueba t de Student para jugo sulfitado

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4.426508665	5.113715786
Varianza	0.067109171	0.075050021
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.918424772	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-12.65223047	
P(T<=t) una cola	0.000532424	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.001064849	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

### Prueba t de Student para jugo alcalizado

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4.455378	5.658095
Varianza	0.126429	0.676241
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.173786	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-2.87291	
P(T<=t) una cola	0.031949	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363	
P(T<=t) dos colas	0.063898	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446	

Anexo 9: Prueba t de Student para muestras pareadas para la comparación de la densidad de *L. mesenteroides* y microbiota total en el jugo filtrado.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	0.5	1.389076
Varianza	0.333333	2.362786
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.309461	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-1.21358	
P(T<=t) una cola	0.155869	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363	
P(T<=t) dos colas	0.311738	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446	

Anexo 10: Prueba t de Student para muestras pareadas para determinar la significancia de la disminución de la densidad de *L. mesenteroides* y la de microbiota total entre el jugo filtrado y el jugo alcalizado.

Prueba t de Student para *L. mesenteroides*

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	0.5	4.455378382
Varianza	0.333333333	0.126428561
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.030302518	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-11.82792748	
P(T<=t) una cola	0.000649607	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.001299214	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

## Prueba t de Student para microbiota total

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1.389075625	5.658095
Varianza	2.362785835	0.676241
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.090747172	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-4.722669669	
P(T<=t) una cola	0.008992315	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.017984629	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

Anexo 11: Prueba t de Student para muestras pareadas para determinar la significancia de la disminución de la densidad de *L. mesenteroides* y la de microbiota total entre el jugo primario y el jugo diluido.

## Prueba t de Student para *L. mesenteroides*

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.015739459	5.165069
Varianza	0.08785958	0.038631
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.844855829	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-0.629724642	
P(T<=t) una cola	0.286783947	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.573567894	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

## Prueba t de Student para microbiota total

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5.713722493	5.683396608
Varianza	0.125636822	0.160884073
Observaciones	4	4
Coefficiente de correlación de Pearson	0.828073662	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	0.268405836	
P(T<=t) una cola	0.402892733	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.805785466	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

Anexo 12: Prueba t de Student para muestras pareadas para determinar diferencia entre recuperación de *L. mesenteroides* en medios sólidos experimentales con y sin inhibidores.

## Prueba t de Student para ME250 a las 12 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	119	55.66666667
Varianza	4207	972.3333333
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.999493335	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	3.254168976	
P(T<=t) una cola	0.041431871	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.082863742	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

### Prueba t de Student para ME250 a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable</i>	
	<i>Variable 1</i>	<i>2</i>
Media	224	82
Varianza	4816	475
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.90579626	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	4.869605087	
P(T<=t) una cola	0.01983896	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.039677921	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

### Prueba t de Student para MP200 a las 12 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
	Media	130
Varianza	793	2041.333333
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.60598353	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	2.007530317	
P(T<=t) una cola	0.09124126	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.18248252	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

## Prueba t de Student para MP200 a las 24 horas

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	142.3333333	23.66666667
Varianza	1412.333333	72.33333333
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.063095193	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	5.408236233	
P(T<=t) una cola	0.016265054	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.032530108	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

## D. Resultados

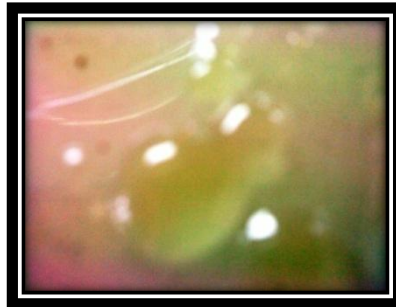
### Anexo 1:

Figura 36: Características de las colonias de *L. mesenteroides*.



### Anexo 2:

Figura 37: Características de sobreposición de las colonias de *L. mesenteroides*.



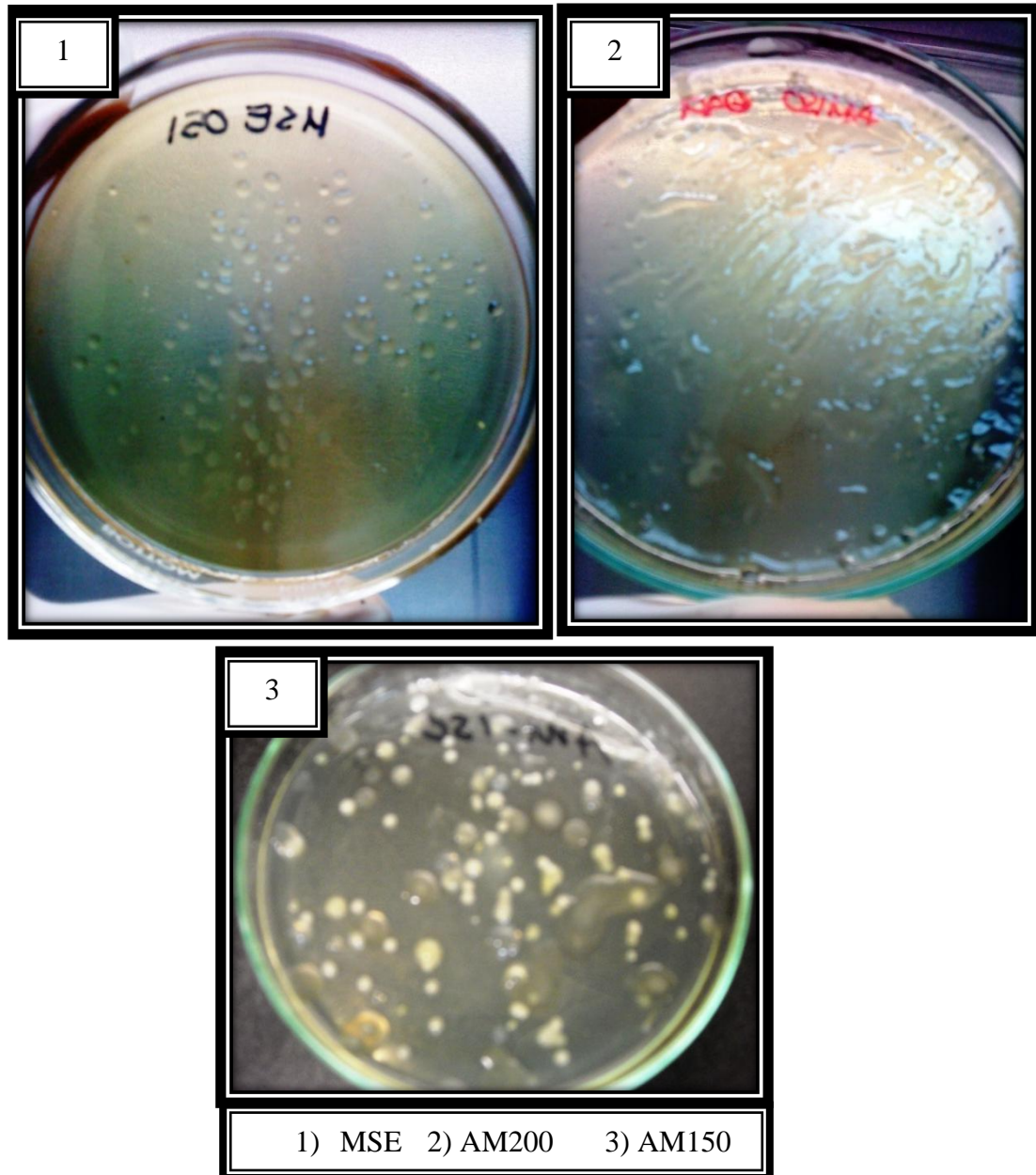
### Anexo 3:

Figura 38: Microscopía de *L. mesenteroides* con tinción Gram (aumento 1000X).



Anexo 4:

Figura 39: Comparación de recuperación en MSE, AM150 y AM200.



Anexo 5:

Figura 40: Producción de dextrana por *Leuconostoc mesenteroides*.



Anexo 6:

Cuadro 20: Cambio de turbidez por crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en medios líquidos experimentales (6 horas de incubación).

<b>Medio</b>	<b>Concentración (g/L)</b>	<b>Turbidez</b>
Cachaza	100	+
	150	+
	200	+
Jugo Filtrado	50	-
	100	-
	150	-
Meladura Clarificada	50	+
	100	-
	150	-
Meladura Evaporada	50	+
	100	+
	150	-
Miel Primera	50	+
	100	+
	150	-

Anexo 7:

Cuadro 21: Cambio de turbidez por crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en medios líquidos experimentales, con concentraciones modificadas (6 horas de incubación).

<b>Medio</b>	<b>Concentración (g/L)</b>	<b>Turbidez</b>
Cachaza	25	-
	50	+
	75	+
Jugo Filtrado	200	+
Meladura Clarificada	25	+
	50	+
	75	+
Meladura Evaporada	25	+
	50	+
	75	+
Miel Primera	25	+
	50	+
	75	-

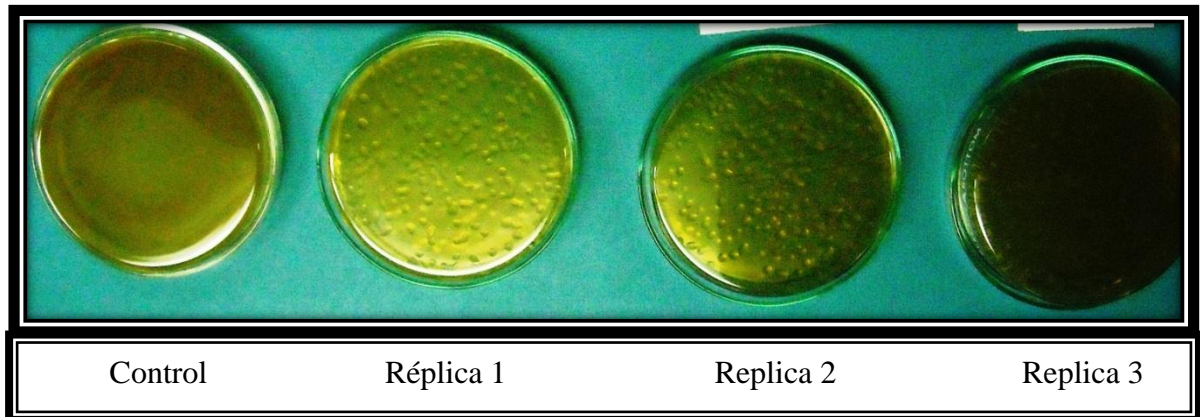
Anexo 8:

Cuadro 22: Comparación del cambio de turbidez por crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en medios líquidos experimentales con diferente composición (6 horas de incubación).

<b>Medio</b>	<b>Citrato y Azida de Sodio</b>	<b>Turbidez</b>
C50	Presente	+
	Ausente	+
MC25	Presente	+
	Ausente	+
ME25	Presente	+
	Ausente	+
MP25	Presente	+
	Ausente	+

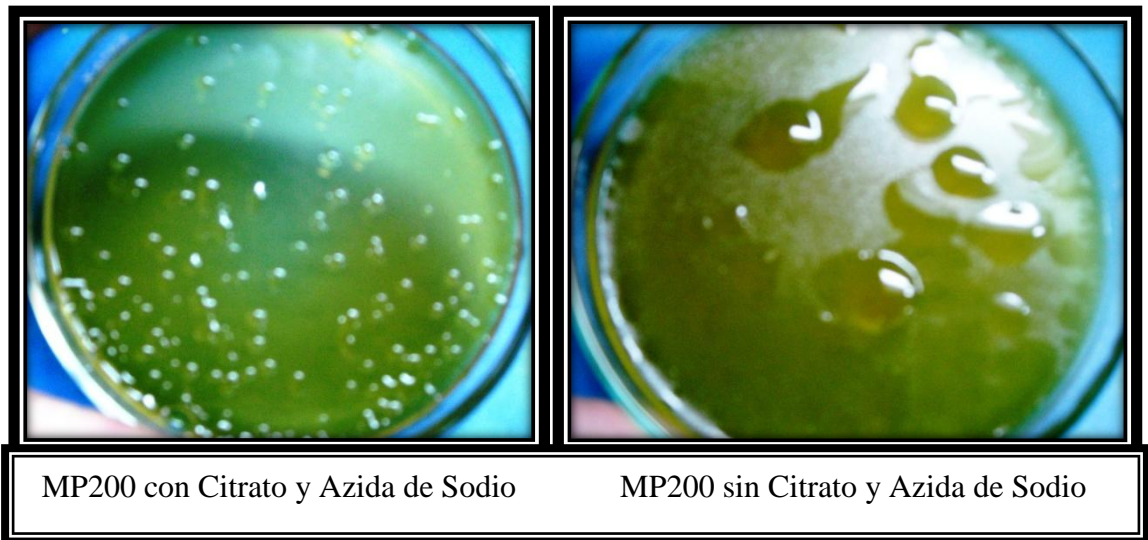
Anexo 9:

Figura 41: Recuperación de *L. mesenteroides* en medio MP200.



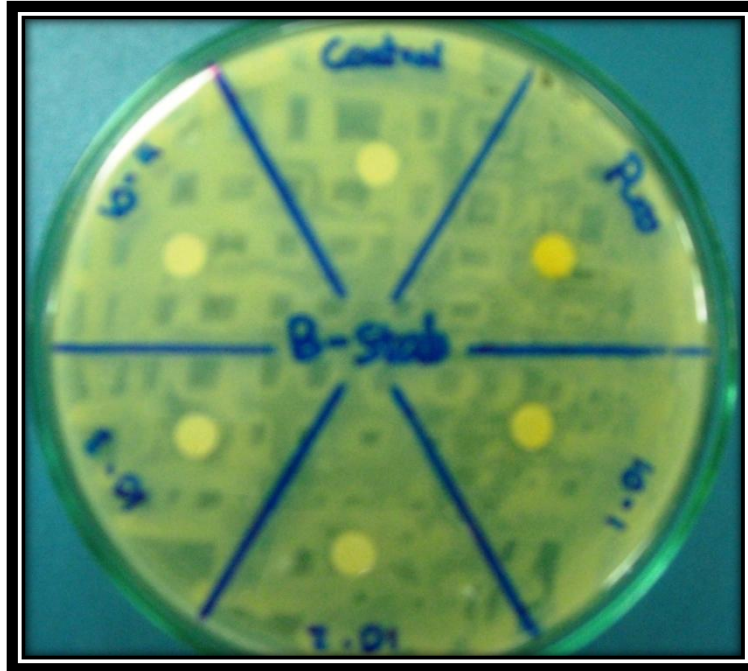
Anexo 10:

Figura 42: Comparación de la recuperación de *L. mesenteroides* en medio MP200 con inhibidores y sin inhibidores.



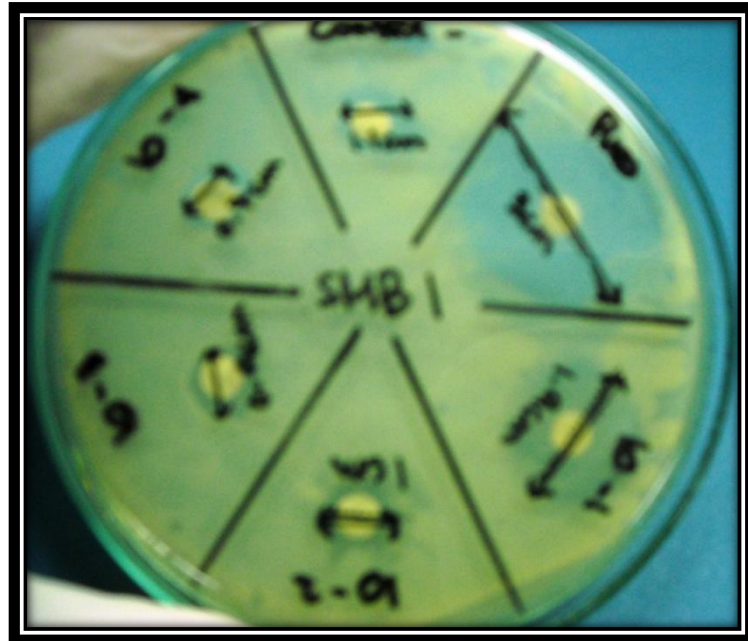
Anexo 11:

Figura 43: Prueba de desinfectante  $\beta$ -Stab en medio Mueller Hinton.



Anexo 12:

Figura 44: Prueba de desinfectante SMB en medio Mueller Hinton.



Anexo 13:

Estandarización de proceso de investigación y muestreo en laboratorio de cañas en ingenio Pantaleón.

- Proceso elaborado para personas ajenas al ingenio que lleguen al laboratorio a realizar las pruebas de investigación:
  - a) Se crearán un calendario y horario de visitas al ingenio con previa consulta con los supervisores del día de cada planta, para evitar ser inoportunos e interrumpir las operaciones y trabajo del personal del ingenio.
  - b) El primer día de visita será de reconocimiento del lugar, el entendimiento y aprendizaje del procedimiento de acceso, vías de movilización y personal con se trabajará. También se preparará el material con que se trabajará durante las visitas posteriores.
    - i) Se presentarán con los supervisores y se irá al *Laboratorio de Planta*, lugar donde se tendrá refrigerado el material a utilizar (resarzurina previamente preparada en la Universidad o centro de investigación ajeno al ingenio).
    - ii) Se llevará la resarzurina al laboratorio de caña.
    - iii) Se procederá a llenar los tubos de ensayo previamente seleccionados con resarzurina al nivel requerido (nivel marcado por los tubos destinados como patrones, los cuales están marcados con una letra P).
    - iv) Se precalienta el baño de María a utilizar a una temperatura de 37 °C.
    - v) Se colocan los tubos de ensayo en gradillas para elevación y mantenimiento de temperatura en los baños de María.

vi) Se procede con la preparación del material par muestreo de tándem y jugo de caña de cosecha.

- (1) Tomar 4 diferentes contenedores plásticos con cierre (tapa).
- (2) Enjuagarlos con agua.
- (3) Etiquetarlos con los nombre:
  - (a) Primario A
  - (b) Primario B
  - (c) Diluido A
  - (d) Diluido B

vii)Seguido de la preparación de los materiales, sigue la preparación de la seguridad industrial para visitar la planta y tomar las diferentes muestras:

- (1) Uso de casco protector.
- (2) Uso de tapones para oídos.
- (3) Uso de guantes y lentes anti impacto (opcional).
- (4) Uso de botas o zapatos de trabajo antideslizantes.

viii) Para la visita de la planta, paso seguido, es necesario conocer la ruta la cual ha sido trazada previamente.

ix) Se llega a la planta y se toman las muestras, en el siguiente orden:

- (1) Primario A
- (2) Primario B
- (3) Diluido A
- (4) Diluido B

x) Para la toma de las muestras en los jugos primarios, se siguen los siguientes pasos:

- (1) Localizar el espacio donde se va a tomar la muestra.
- (2) Abrir la compuerta que lo contiene.

- (3) Tomar el contenedor de metal (vara metálica con recipiente en un extremo).
  - (4) Se lleva el contenedor de metal, tomándolo con ambas manos, hasta la caída del jugo, se endulza (1 vez) (llenar el contenedor una vez con el jugo primario y desechar el contenido del mismo).
  - (5) Se llena el recipiente del metal y se saca la muestra de jugo
  - (6) Se endulza (1 vez) el recipiente de plástico (pachoncito).
  - (7) Se llena para contener el líquido y se cierra con la tapa.
- \*\*Los pasos del 1 al 7 se realizan de igual forma para el jugo primario de ambos tándem.\*\***

xi) Para la toma de las muestras en los jugos diluidos, se siguen los siguientes pasos:

- (1) Localizar el espacio donde se va a tomar la muestra.
  - (2) Abrir válvulas de paso para obtener el jugo.
  - (3) Tomar un contenedor de plástico (cubo) que se encuentra en el lugar de extracción del jugo.
  - (4) Se lleva el contenedor, tomándolo con una mano y la otra en la válvula de paso, y se endulza (1 vez).
  - (5) Se llena el cubo y se saca la muestra de jugo.
  - (6) Se endulza (1 vez) el recipiente de plástico (panchoncito).
  - (7) Se llena para contener el líquido y se cierra con la tapa.
- \*\*Los pasos del 1 al 7 se realizan de igual forma para el jugo diluido de ambos tándem.\*\***

xii) Se regresa, con mucha precaución, al laboratorio de cañas y se procede a realizar los diferentes procesos de análisis:

- (1) Se toman los contenedores con las muestras y se hacen pasar por un colador (tela de tamiz de hasta 3 mm x 3 mm).
- (2) Se exprimen hasta extraer la mayor cantidad de jugo.
- (3) Se depositan los jugos en un beaker.

- (4) Se depositan los sólidos (bagazos y demás residuos sólidos) en contenedor de basura.
    - (a) Se realiza el procedimiento para todas las muestras.
  - (5) Se toman 4 tubos de ensayo y se destapan.
  - (6) Se llena hasta el tope, hasta rebalsar para no tener ninguna burbuja de aire dentro del tubo.
  - (7) Se cierra el tubo lleno.
  - (8) Se agita una vez (tomar con la mano o dos dedos y poner de cabeza el tubo una sola vez).
  - (9) Se deposita el tubo, con la muestra y la resazurina mezcladas, de vuelta a la gradilla.
  - (10) Se anota el número (o código designado) del tubo en la gradilla.
  - (11) Se toma la hora de realización del proceso (para cada tubo individual).
  - (12) Se procede a observar posibles cambios, siguiendo un patrón previamente establecido.
  - (13) Se toma la hora de cambio.
- xiii) Se realizan los pasos (x) al (xii) cada 30 minutos o 1 hora (según conveniencia de investigación).
- xiv) Tras terminar la jornada del día (asumiendo hora de inicio 8:00 am y término 5:00 pm) se limpiarán todos los instrumentos utilizados.
- (1) Se pasa agua y jabón a los contenedores de plásticos.
  - (2) Se pasa agua y jabón los beaker usados.
  - (3) Se enjuagan los instrumentos y se dejan escurriendo toda la noche boca abajo.
- xv) Se dejan más tubos preparados con resazurina, para evitar realizar los pasos (ii) a (vi) el día siguiente.

- xvi) Se dejan preestablecida la temperatura del baño de María, con suficiente agua (al menos a un nivel superior al de la gradilla), a 37 °C con las muestras preparadas.
- c) Al regresar el día siguiente, se deberá llamar previamente (1 ó 2 horas antes de llegada) al supervisor II, encargado de supervisar laboratorio de cañas y solicitarle que revise el baño de María para revisar la temperatura y nivel del agua.
- i) Si le falta agua, verter en baño de María y llevar al nivel establecido.
  - ii) Si la temperatura es diferente de 37 °C, ajustarla.

Anexo 14:

Figura 45: Cotización de baño de María.

**BAÑO MARÍA Y COCINA, PRECIO INCREIBLE!**


Enviado por **Hector** 10 de Sep, 17:18 (Eliminar o Modificar)


**Precio:** \$180.000

**AVISO**

BAÑO MARIA EN BUEN ESTADO VALOR \$180.000  
COCINA INDUSTRIAL, 2 QUEMADORES EN UN PLATO VALOR \$90.000

INTERESADOS LLAMAR AL (2) 316 49 66 , LLAMAR DESPUES DE LAS 17:00 HORAS

 **Hector Encina Bobadilla**

 Publicado el Jueves 10 de Septiembre de 2009

## Anexo 15:

Figura 46: Cotización de cámara frigorífica (cámara de refrigeración para laboratorio).

Dim. interiores 1000x1000x1840 mm, aislamiento 80 mm, tamaño de puerta 710x1740 mm

1160x1160x2000



**Información del Producto**

Dimensión: 1160x1160x2000

kg: 215

Volt :

Gas :

**Precio:** EUR1661.00

EUR1328.80

▪ [Contarle a un amigo?](#)

**Código del Producto:** ISON351

En Stock



## Anexo 16:

Encuesta de Percepción de lugar de trabajo y procesos internos.

La siguiente es una encuesta cuyo fin es determinar la funcionalidad de los procesos internos en la empresa. Por favor responder de forma breve, consisa y de la manera más veraz posible la siguientes preguntas:

1. ¿En qué área de la empresa labora?
  - Planta
  - Laboratorio
  - Oficina
  
2. ¿Qué función desempeña en la empresa?

3. ¿Cuál es el turno en que trabaja?

- Mañana                      Horario:\_\_\_\_\_
- Tarde                        Horario:\_\_\_\_\_
- Noche                        Horario:\_\_\_\_\_
- Otro:\_\_\_\_\_              Horario:\_\_\_\_\_

4. ¿Cree que su tarea es indispensable para el proceso?

- Sí
- No
  - ¿Por qué?

---

---

---

5. Si respondió No a la respuesta anterior

¿Qué cambiaría en la tarea que desempeña para mejorar el proceso?

---

---

---

---

6. ¿Existe(n) alguna(s) otra(s) sección(es) del proceso con la(s) que esté en contacto? Lístelas

---

---

---

7. ¿Considera que otras áreas pueden mejorar sus procesos?

- Sí
- No

8. Si ha contestado SÍ en la respuesta anterior  
¿Qué áreas considera que se podrían mejorar?
9. ¿Cómo podría mejorar los procesos de las áreas anteriormente mencionadas?

---

---

---

---

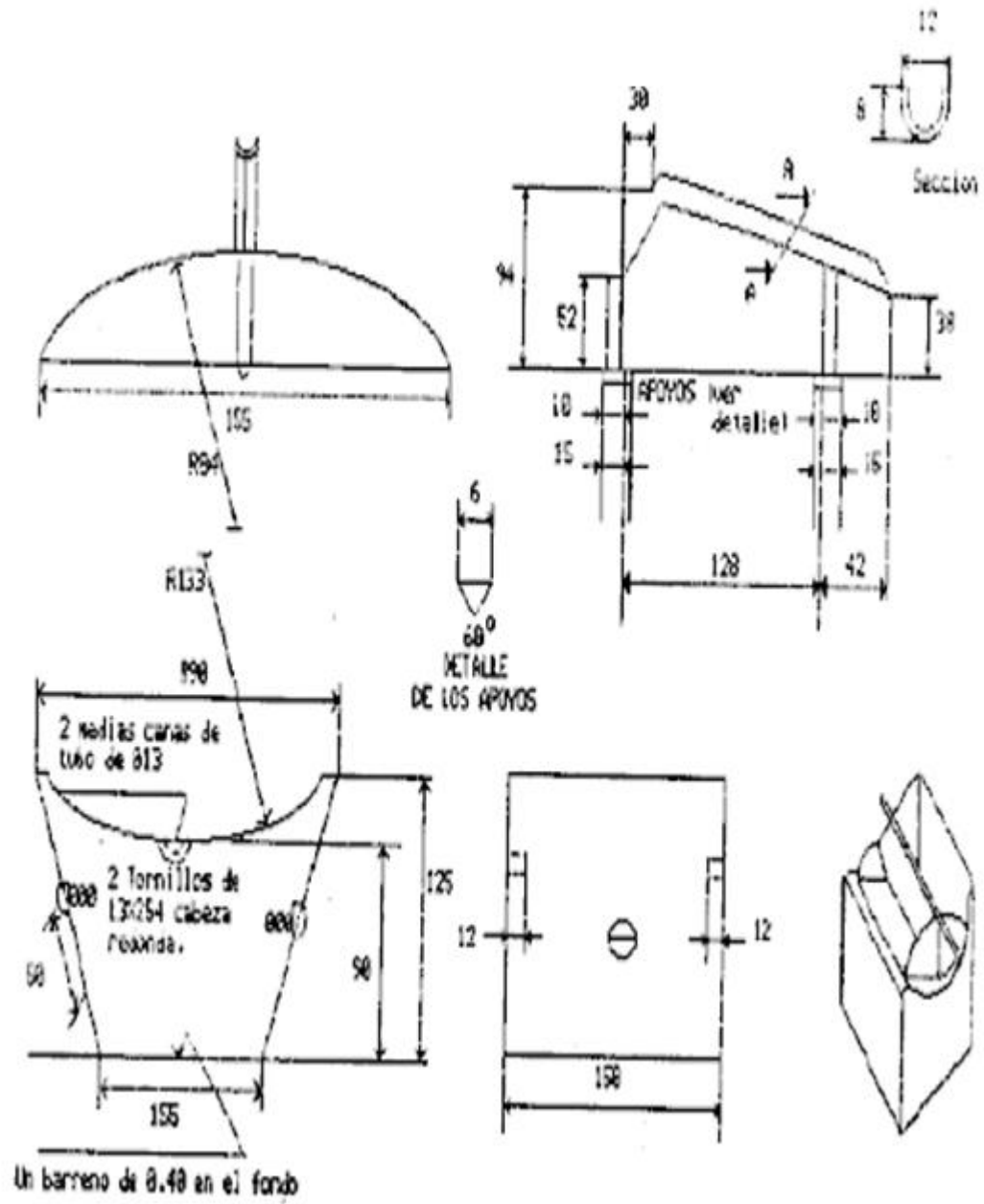
Anexo 17:

“Industria Azucarera, Jugos de caña de azúcar equipo muestreador y método de muestreo.”

Para la obtención de muestras representativas de jugos de caña de azúcar que habrán de someterse a determinaciones analíticas cuantitativas para fines de control de la producción en un ingenio azucarero, es necesario se cumplan los procedimientos normalizados de muestreo que se establecen en la presente norma.

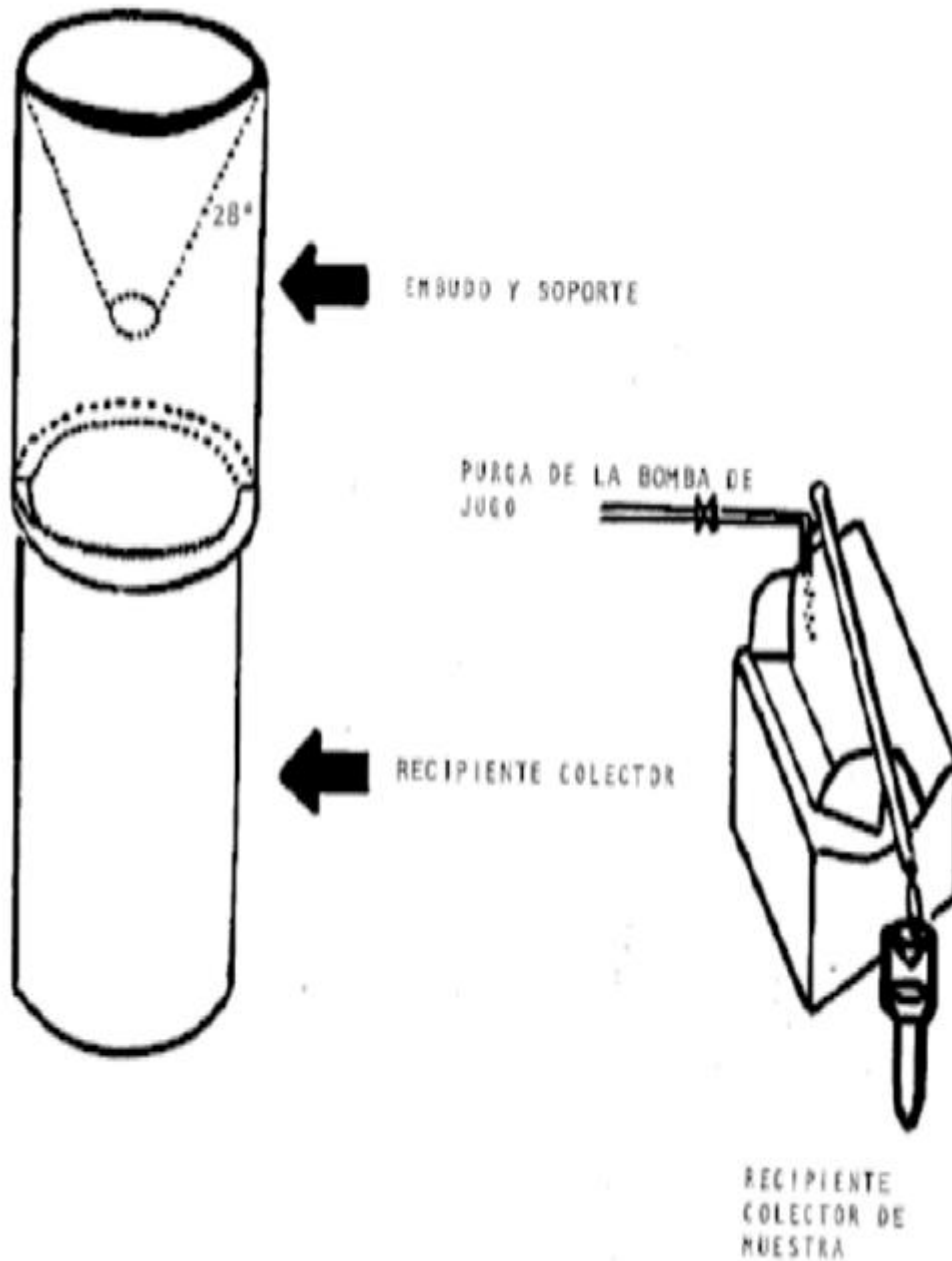
Esta Norma Mexicana establece el equipo muestreador y el método para la toma de muestras de jugo de caña de azúcar, sujetas a las preparaciones y determinaciones analíticas pertinentes. Los aparatos y recipientes deben construirse con materiales que no alteren la muestra. Se podrá observar un ejemplo del muestreador automático continuo que garantice una cantidad suficiente de muestras (ver Figura 1).

Figura 1: Muestreador de balancín.



Recipiente para colección de muestras con capacidad de dos litros (ver Figura 2).

Figura 2: Recipiente para colección de muestras.

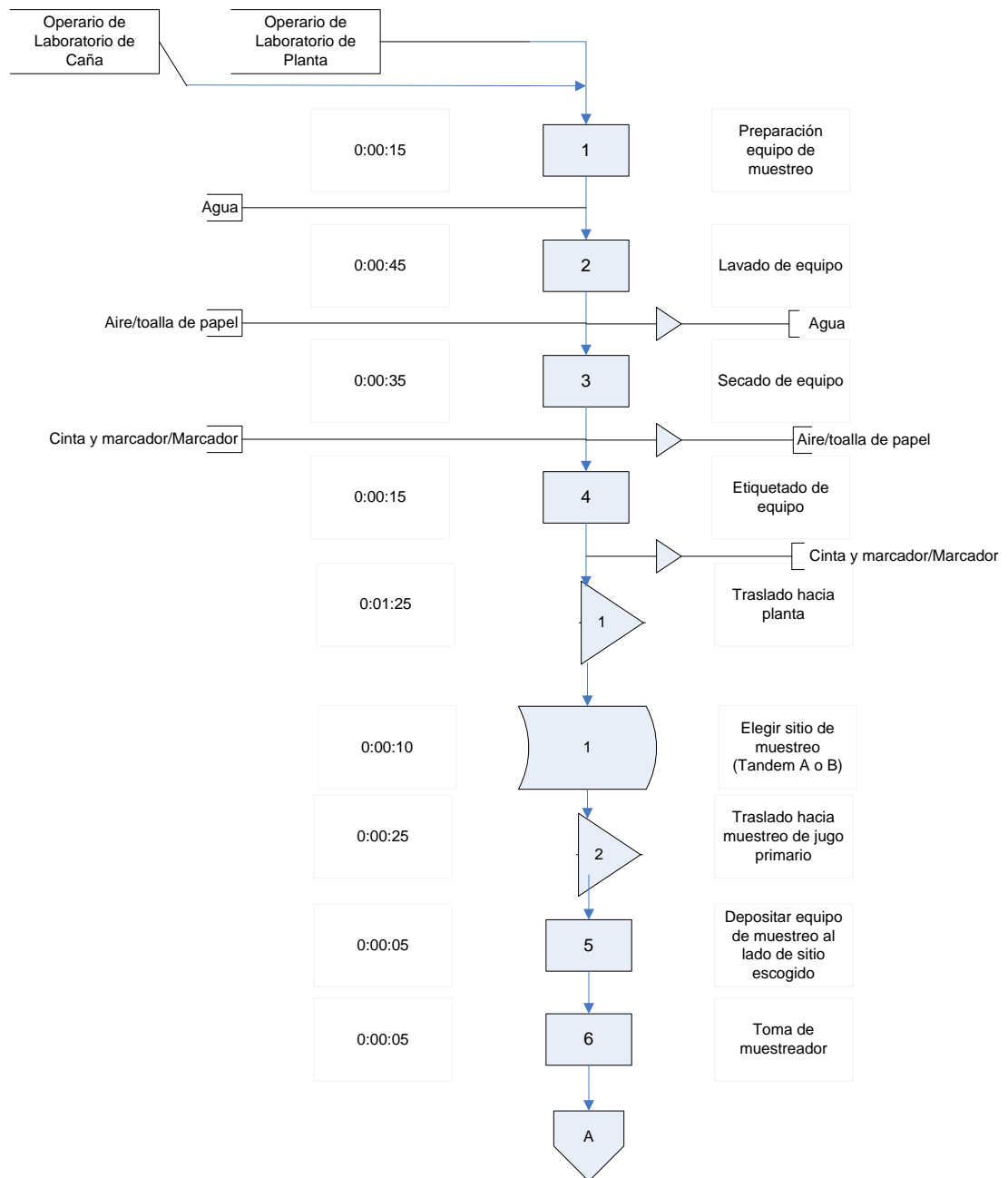


Esta propuesta de instrumentos de medición no concuerda con ningún estándar por no existir referencial sobre el tema que cubre la norma tomada como referencia.

Anexo 18:

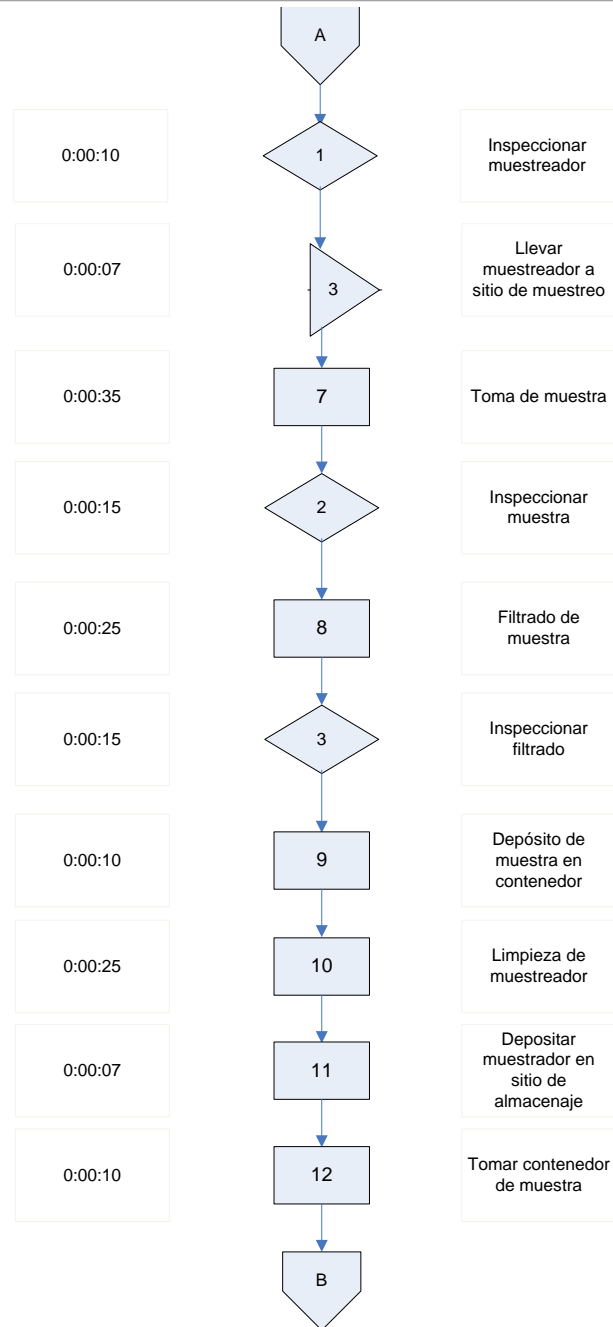
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



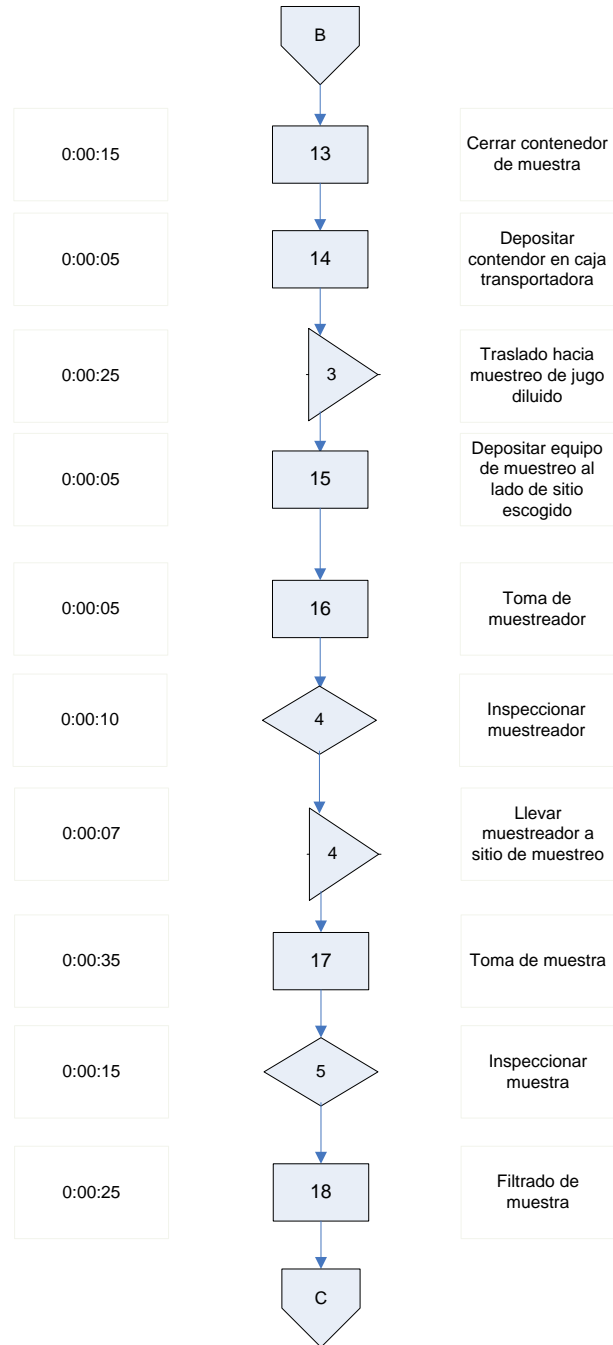
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



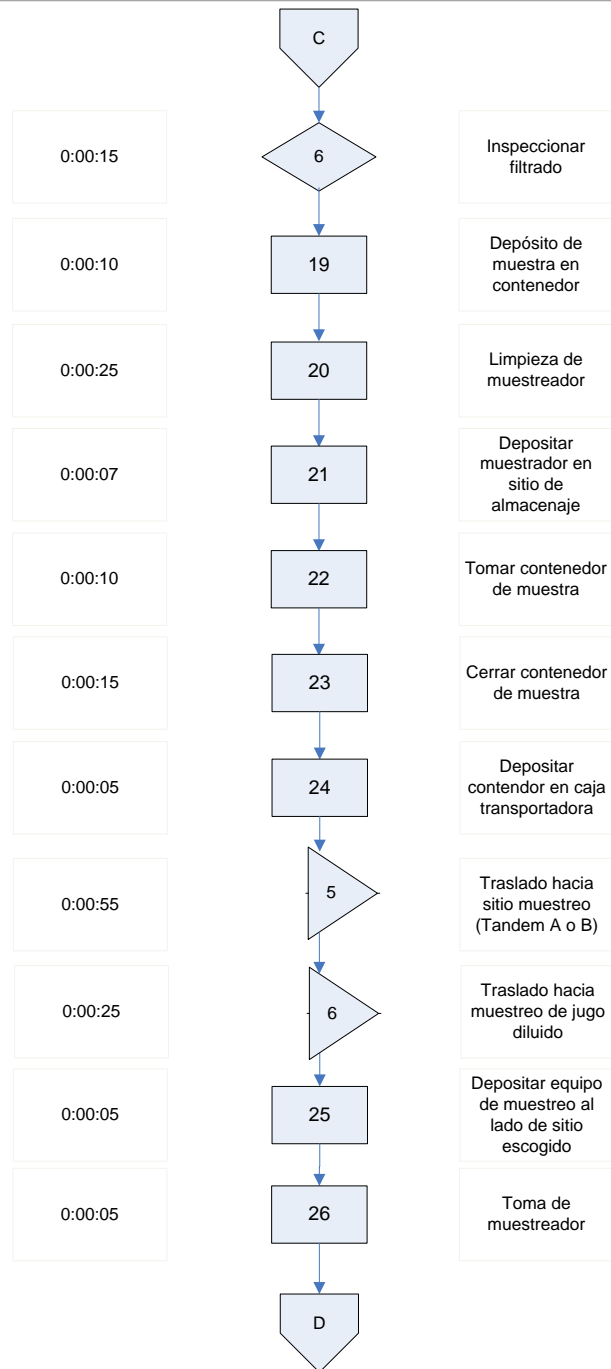
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



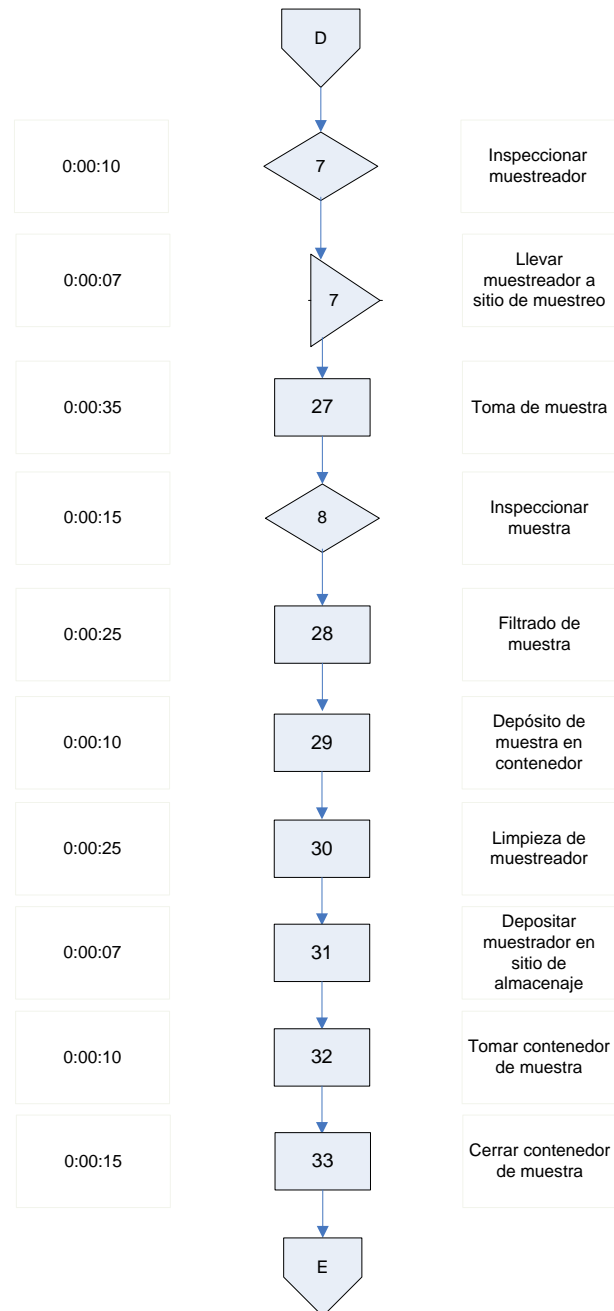
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



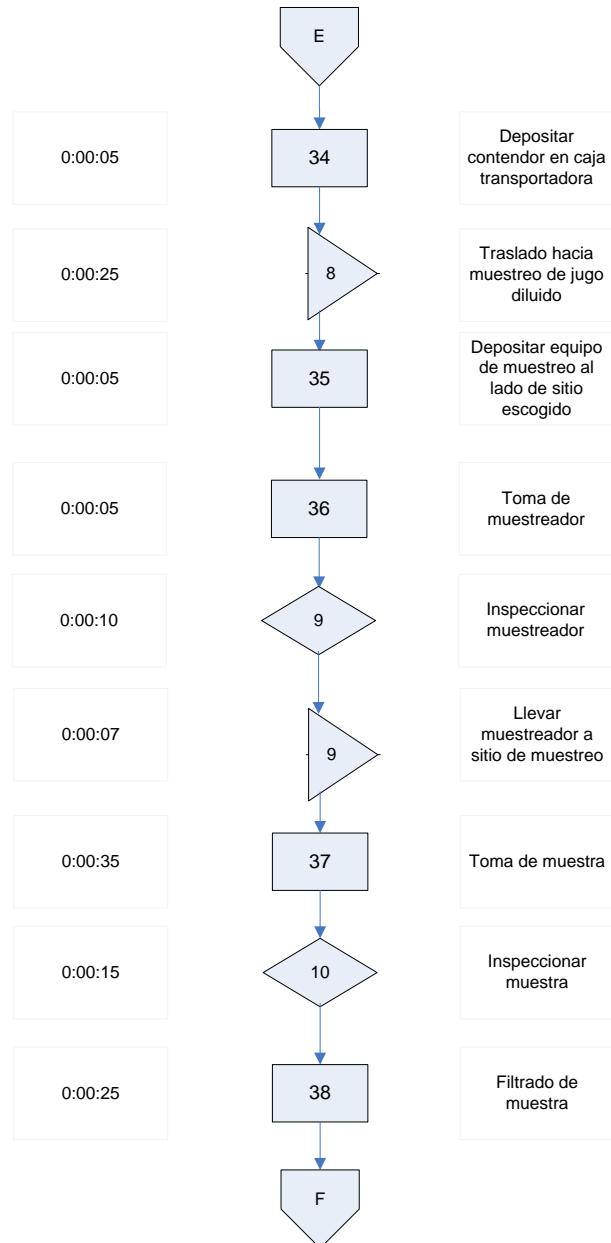
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



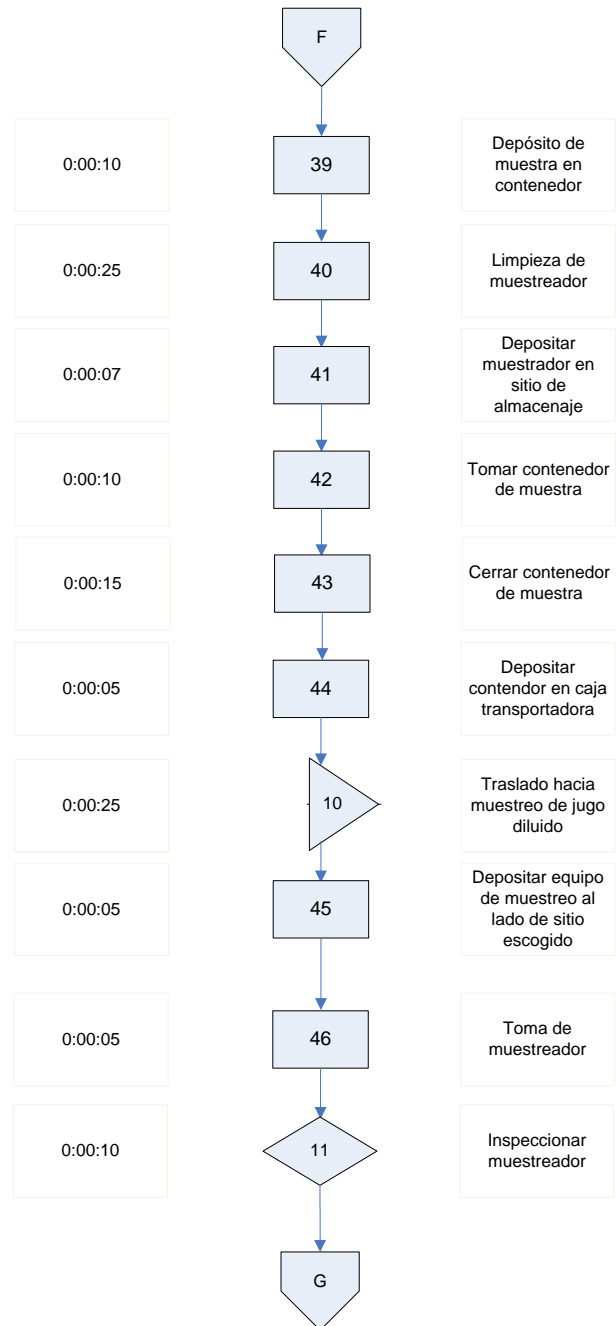
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



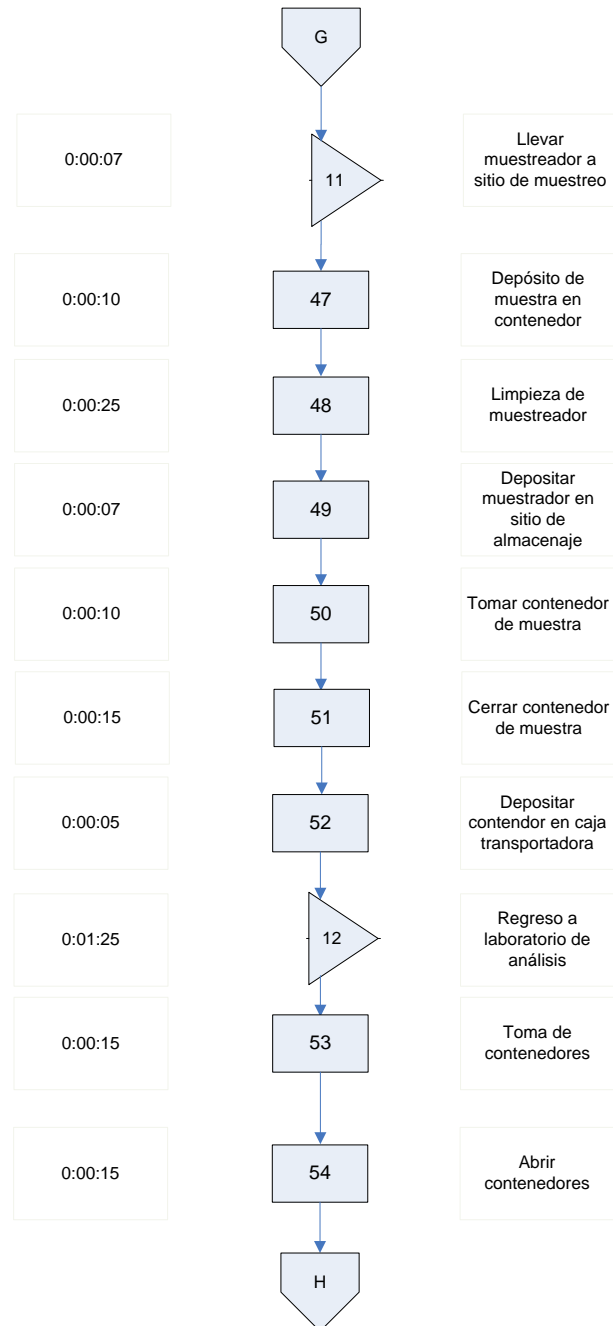
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



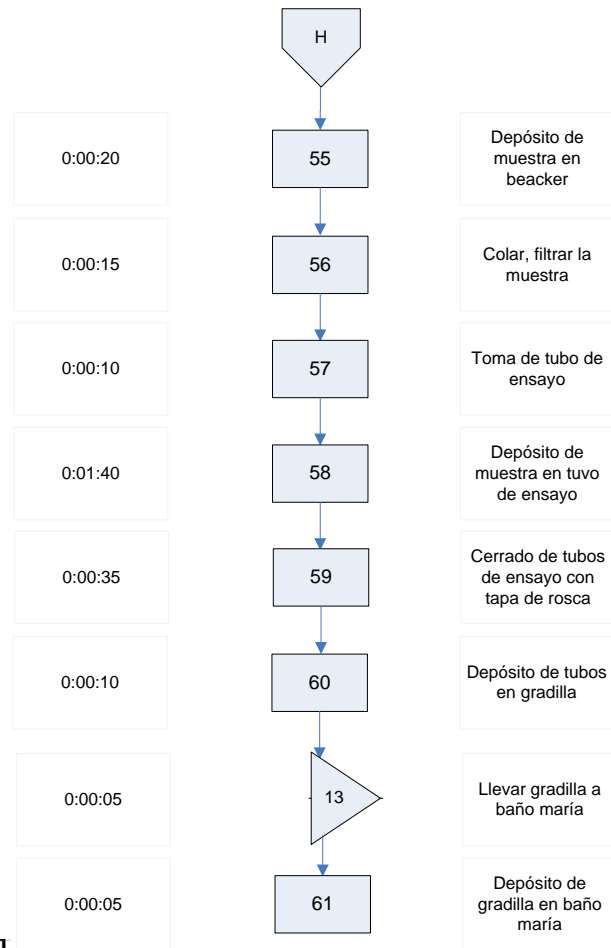
# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



# DOP Recorrido actual para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS

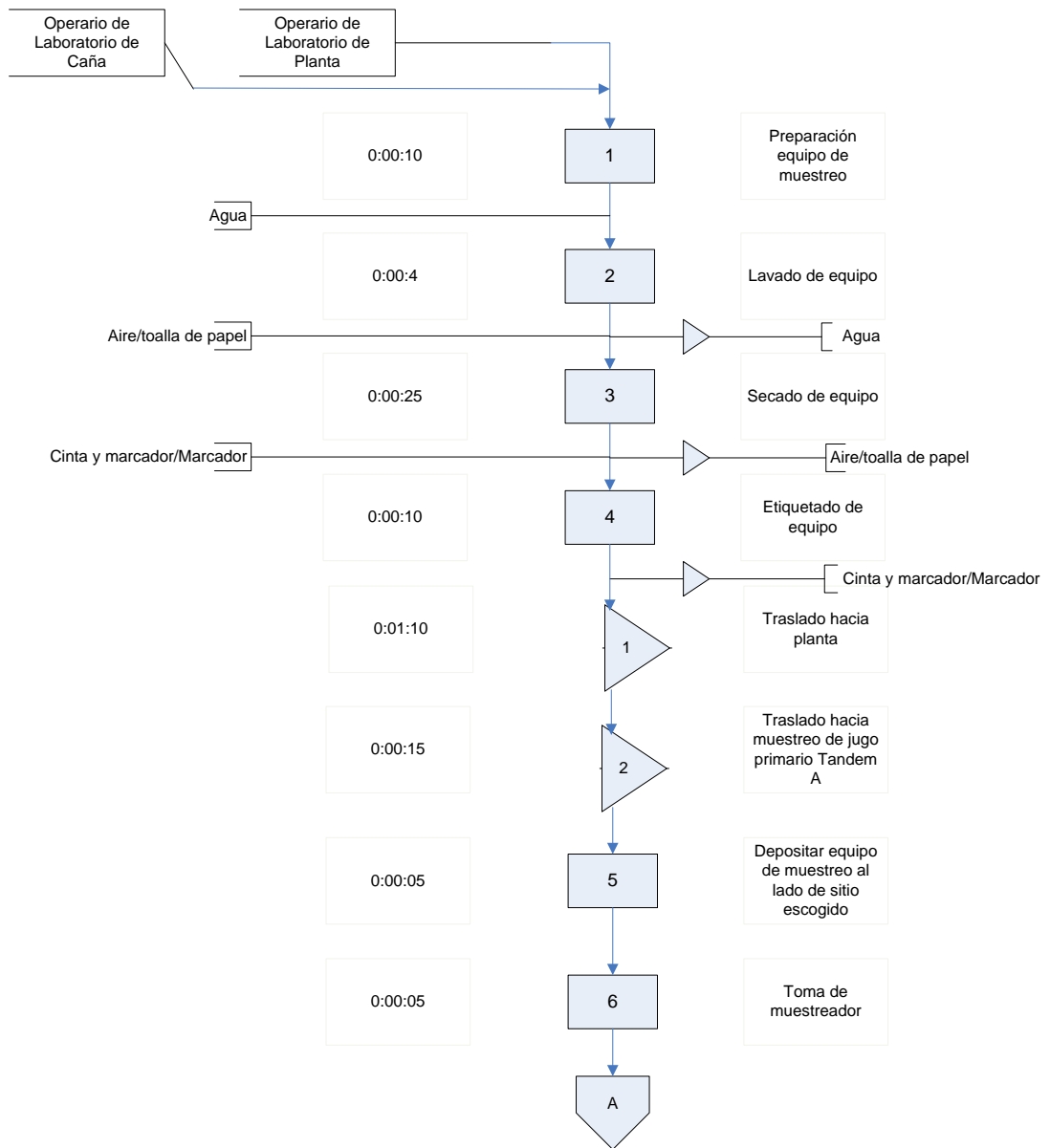


RESUMEN DE DATOS		
	Cantidad	Tiempo
Actividades	61	00:20:48
Traslados	12	00:06:55
Inspeccione	11	00:01:40
Esperas	1	00:00:10
<b>TOTAL TIEMPO</b>		<b>0:29:33</b>

Anexo 19:

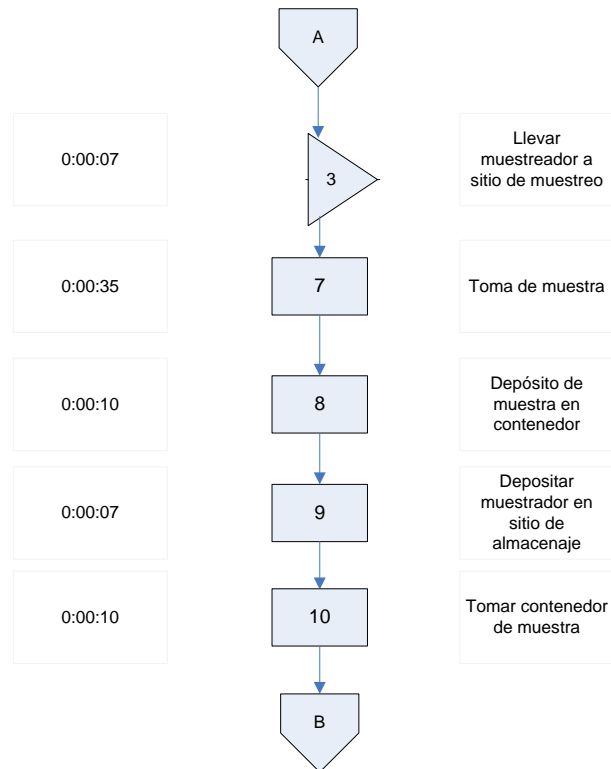
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



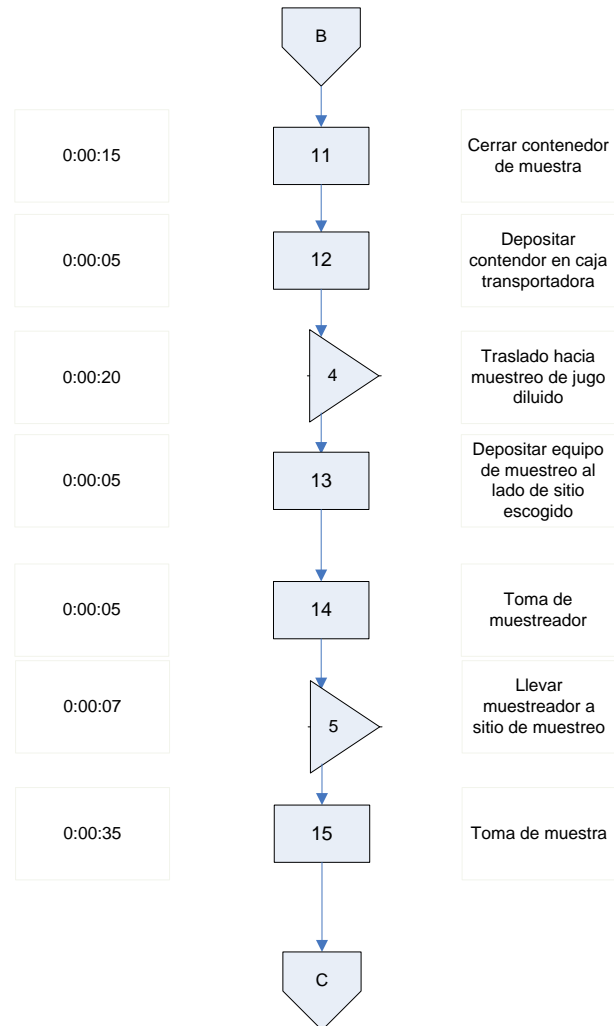
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



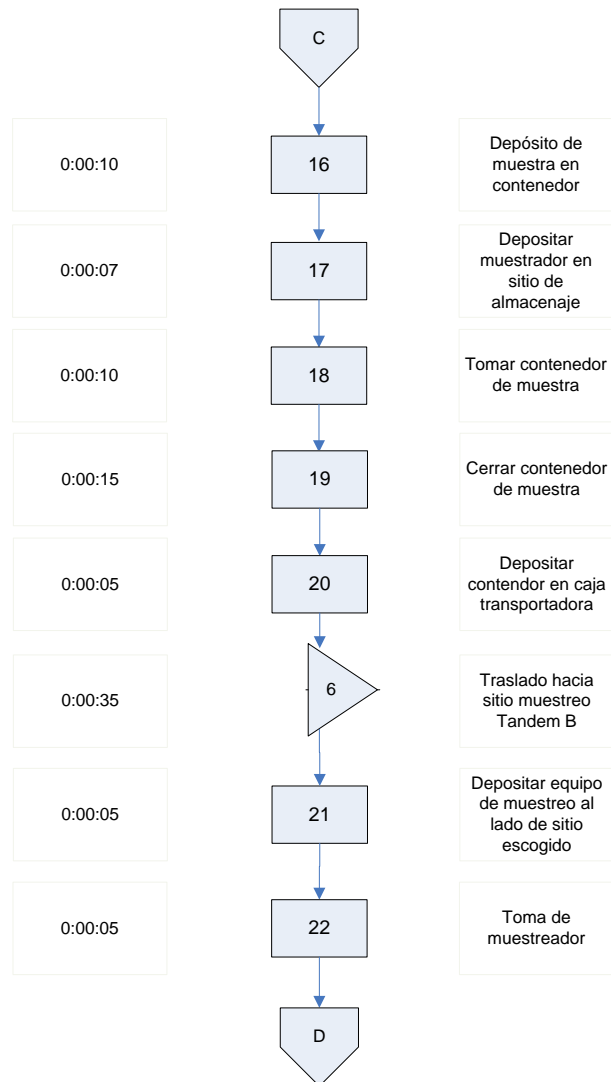
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



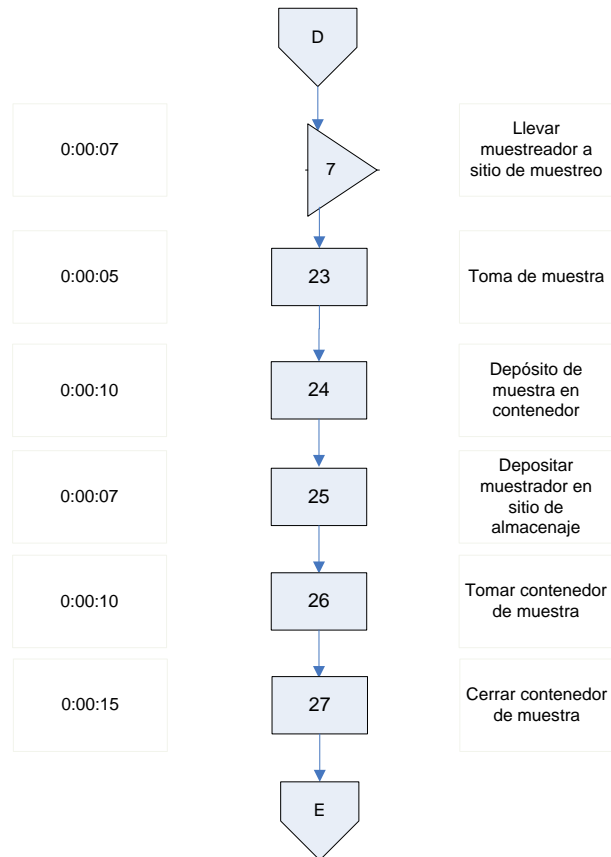
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



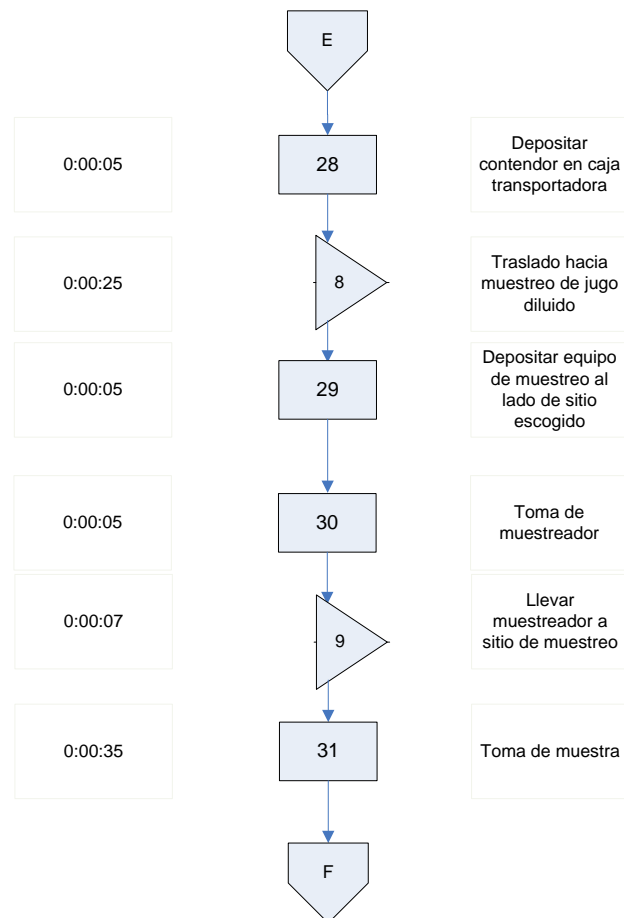
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



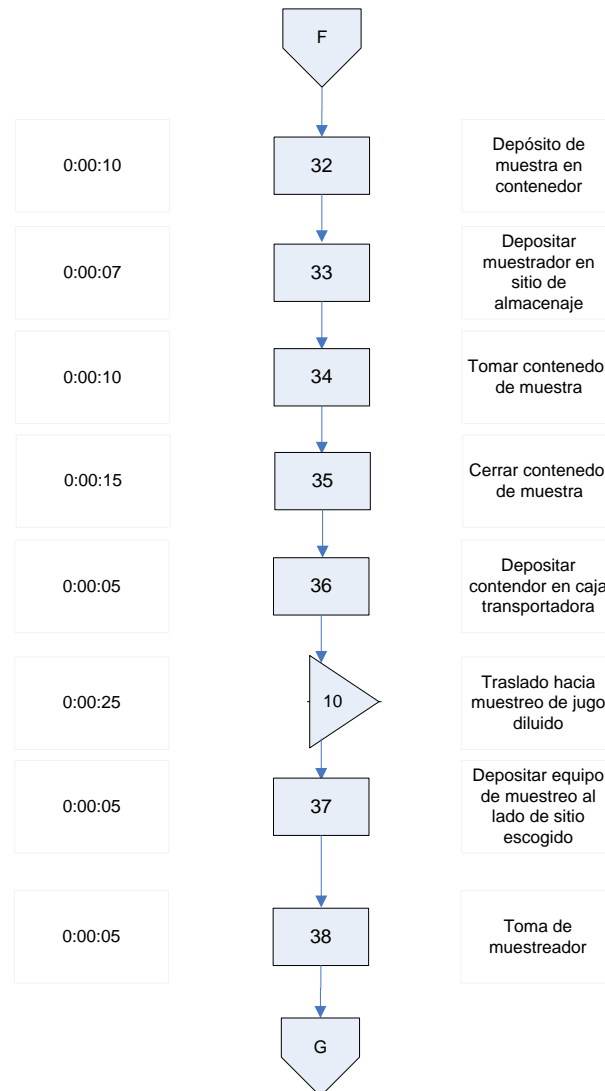
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



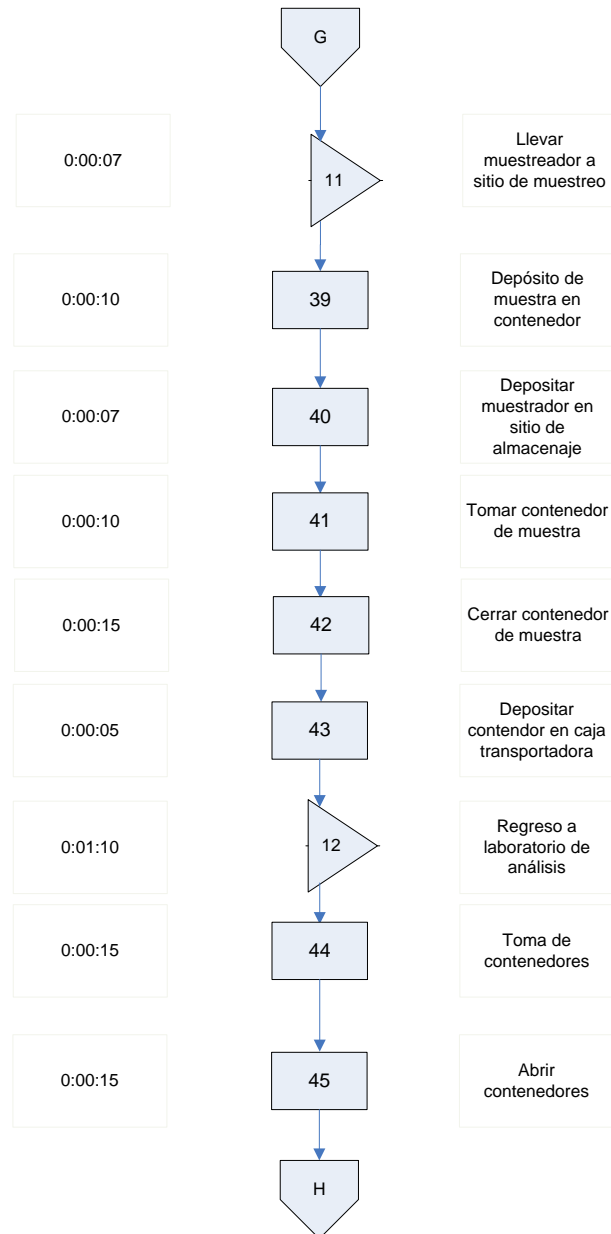
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



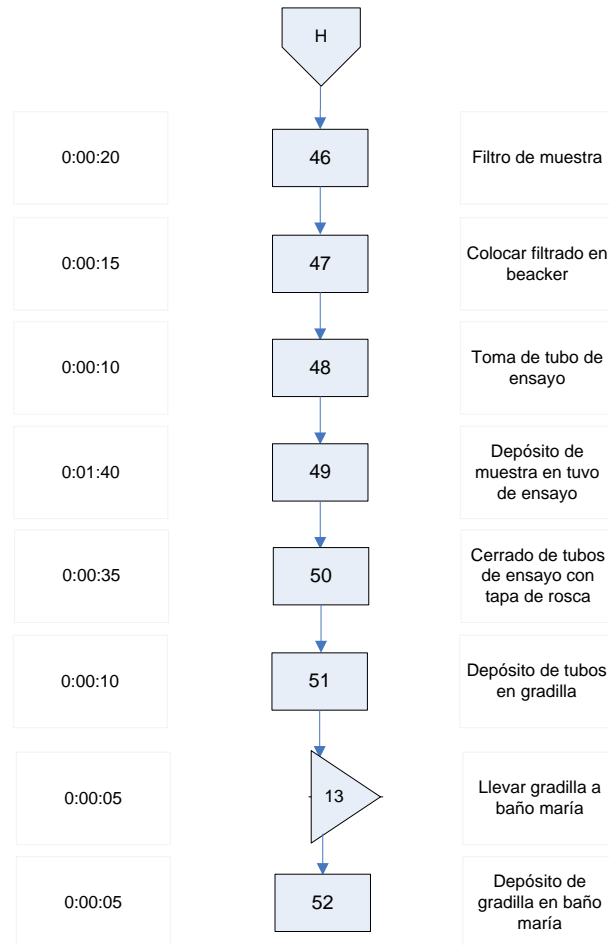
# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



# DOP Recorrido propuesto para muestreo en ingenio Pantaleón

ELABORADO POR FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ RODAS



RESUMEN DE DATOS		
	Cantidad	Tiempo
Actividades	52	00:11:51
Traslados	13	00:05:00
<b>TOTAL TIEMPO</b>		<b>0:16:51</b>

## XV. GLOSARIO

**Absorbancia:** Cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra conocida o desconocida.

**Alcalizado:** Paso de la extracción de la sacarosa en el que se agrega cal al jugo clarificado para neutralizar los ácidos presentes y comenzar con el blanqueo del azúcar.

**Azúcar a granel:** producto del proceso azucarero que comprende el azúcar en grano que se vende en sacos, por su peso.

**Azúcar reductor:** Azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa que tiene la capacidad de reducir otras sustancias, es decir, son capaces de donar sus electrones.

**Bacteria láctica:** Bacterias con la capacidad de formar ácido láctico a través de fermentar azúcares.

**Bactericida:** Desinfectante que produce la muerte a una bacteria.

**Bacteriófago:** Virus que infecta específicamente bacterias.

**Bagazo:** Residuo que queda de la caña luego de extraer el jugo en los molinos. Puede ser aprovechado para quemar en las calderas y utilizar el vapor generado como fuente de poder dentro del ingenio.

**Cachaza:** Producto sólido que queda después del proceso de clarificación del jugo de caña.

**Clarificación:** Proceso de purificación de los jugos por medio de la elevación de la temperatura para proseguir con la cristalización.

**Centrifugación:** Método por el cual se consigue separar los sólidos de los líquidos con densidades distintas a través de una fuerza centrífuga. En la Industria azucarera es el método por el cual se separan las mieles del azúcar.

**Espectrofotómetro:** Instrumento analítico utilizado para cuantificar sustancias químicas/biológicas y microorganismos.

**Evaporador:** Tanque cilíndrico con el cual se evapora el agua del jugo de caña a través del alza de la temperatura.

**Grenetina:** La grenetina es un sinónimo para gelatina, que puede producirse con residuos de los procesos de extracción de la sacarosa, es un alimento cuyas propiedades lo hacen ideal para deportistas, personas convalecientes, con sobrepeso y mujeres embarazadas.

**Guarapo:** Jugo obtenido luego de exprimir la caña de azúcar en los molinos.

**Hidrólisis:** Reacción química de agua con una sustancia, las cuales se pueden romper como consecuencia de la reacción.

**Incubación:** Tiempo que pasa entre la exposición a un organismo y la aparición del primer signo o síntoma. En el caso de incubación en medios de cultivo, se refiere al tiempo que tarda en aparecer la primera colonia microbiana.

**Inhibidor:** Moléculas o sustancias que disminuyen la actividad.

**Jugo alcalizado:** Jugo obtenido luego de la adición de cal al jugo sulfitado para aumentar el pH y evitar la hidrólisis de sacarosa en el proceso de calentamiento.

**Jugo diluido:** Es aquel que se extrae de la molienda en el tándem, es decir, es la combinación de los diferentes jugos obtenidos en los molinos del tándem, siendo la mayor proporción el jugo extraído del primer molino.

**Jugo filtrado:** Jugo extraído de la cachaza, el cual se une con el resto de los jugos en el jugo alcalizado.

**Jugo primario:** Jugo extraído en el primer molino, previo a iniciar la dilución. En la mayoría de los tandem, este es el jugo de la desmenuzadora combinado con el del primer molino.

**Jugo sulfitado:** Jugo obtenido luego de la adición de anhídrido sulfuroso a los jugos diluidos.

**Lixiviación:** Proceso de adición de agua caliente en los molinos para extraer el máximo de sacarosa posible de la caña.

**Meladura:** Miel de azúcar concentrada que se obtiene luego del proceso de evaporación.

**Mesófilo:** Microorganismo cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de temperatura de 20 a 40°C.

**Microbiota:** Organismos de dimensiones microscópicas y pertenecientes a distintos reinos que viven en una ecología organizada en un ambiente específico.

**Miel primera:** Miel obtenido directamente del proceso de cristalización. Suele contener gran cantidad de impurezas.

**Molino:** Máquina utilizada para moler la caña de azúcar y obtener el guarapo.

**Optimización:** Mejorar el rendimiento de pruebas o métodos.

**Pantaleón:** Pantaleón es una empresa agroindustrial que basa sus procesos en la extracción y purificación de la caña de azúcar para la producción de azúcar, mieles, alcoholes y energía eléctrica.

**Sulfitación:** El proceso de sulfitación es un proceso de desinfección con anhídrido sulfuroso que al entrar en contacto con el jugo destruye los agentes patógenos, bacterias y microbios que pudiesen estar presentes en el jugo luego de que la mayoría han sido acabados con las altas temperaturas de los molinos.

**Tacho:** Equipo de transferencia de calor, a base de vapor, tipo concha y tubos, orientado a la cristalización de soluciones azucaradas y al posterior desarrollo de los granos formados.

**Tándem:** Conjunto de molinos de extracción de jugo de caña situados en serie.

**Termófilo:** Microorganismo cuya temperatura óptima de crecimiento es alta y puede encontrarse en rangos de hasta más de 90°C.

**Unidad Formadora de Colonia (UFC):** Término que se utiliza para expresar el contenido de una célula viva y aislada, que se encuentra en las condiciones ambientales y de nutrientes, asumiendo que una célula da origen a una colonia visible.