

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Estimación de la actividad microbiológica en diferentes
jugos de caña por reducción de resazurina

Trabajo de investigación presentado

por Max Alexander Noack Meza

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

Estimación de la actividad microbológica en diferentes
jugos de caña por reducción de resazurina

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Estimación de la actividad microbiológica en diferentes
jugos de caña por reducción de resazurina

Trabajo de investigación presentado
por Max Alexander Noack Meza
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

Vo. Bo.

(F) _____

Lic. Osbel Nuñez

Tribunal

(F) _____

Dra. Pamela Pennington

(F) _____

Lic. Osbel Nuñez

(F) _____

Lic. Marco Urizar

Fecha de aprobación: 10 de junio del 2008

PREFACIO

Con este tema de investigación se buscó exponer la importancia de la microbiología, en un proceso industrial económicamente importante para Guatemala. En la industria azucarera, se tiene una amplia variedad microbiológica que resulta relevante por los daños que esta pueda ocasionar, especialmente en la fase inicial de producción. Este estudio sugiere un método sencillo para ayudar a contrarrestar el efecto de los microorganismos en la fase mencionada.

Se espera que el método que este trabajo plantea pueda ser de utilidad como un complemento a análisis ya establecidos en la agroindustria azucarera.

Agradezco al Ingenio Santa Ana, al Licenciado Osbel Nuñez y al Departamento de Bioquímica y Microbiología por el apoyo brindado.

En memoria de:

Dr. Héctor Aguilar y Víctor Lau.

CONTENIDO

Página

PREFACIO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. HIPÓTESIS.....	15
VI. MÉTODOS.....	16
VII. RESULTADOS.....	23
VIII. DISCUSIÓN.....	26
IX. CONCLUSIONES.....	29
X. RECOMENDACIONES.....	30

XI.	LITERATURA CITADA.....	31
XII.	OTRAS REFERENCIAS.....	35
XIII.	ANEXOS.....	37
XIV.	GLOSARIO.....	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Contenido bacteriano de los jugos de caña de azúcar procesados.....	7
2. Composición de medio Mayeux para 1 litro de medio.....	18
3. Rangos de concentración en jugo de caña en distintos puntos a lo largo del tándem.....	23
4. Relación entre la densidad microbiológica promedio y el jugo de caña en distintos puntos del tándem.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la forma oxidada y reducida de la resazurina.....	11
2. Número de muestras tomadas en cada punto del Ingenio (Molinos 1-6, jugo diluido)....	16
3. Relación entre la densidad microbiológica y el jugo de caña en distintos puntos del tándem.....	24
4. Relación entre la densidad microbiológica y el tiempo de reducción de la resazurina en distintos jugos del tándem	25

RESUMEN

En la industria azucarera, específicamente en la fase de molienda, son necesarios métodos para la detección rápida de la actividad microbiológica. En este estudio se plantea el uso de la prueba de resazurina, un método basado en la reducción de este compuesto, por acción de las deshidrogenasas producidas por los microorganismos y el consumo de oxígeno.

Inicialmente se realizó una caracterización de la densidad microbiológica en distintos puntos del tándem, donde se determinaron concentraciones que van desde $7.70E+06$ hasta $7.50E+03$ UFC/mL. La prueba planteada fue optimizada para reducir el tiempo de análisis, y posteriormente, a través de medidas simultáneas de recuento total de mesófilos aerobios y reducción de resazurina, se generó un modelo matemático dado por $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL} = 67.352t^{-0.448}$ con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9662, para la estimación de la densidad microbiológica. El modelo tuvo una relación significativa con un nivel de confianza del 95%.

Se demostró que es posible la estimación de la actividad microbiológica en distintos tipos de jugo de caña, no solamente en jugo primario y diluido, por medio de reducción de resazurina. Se recomienda la aplicación y la verificación de la posibilidad de incluir el método como rutina en el monitoreo de la producción de azúcar de caña, así como el seguimiento de la investigación en esta área.

I. INTRODUCCIÓN

El trabajo que se propone incluye un estudio de la densidad microbológica a través del área de extracción de jugo en un ingenio azucarero (Corporación Santa Ana); así como la posibilidad de su estimación rápida y barata con fines operativos, y de optimización de la desinfección; utilizando pruebas sencillas que miden el efecto de la microbiota en su entorno, fundamentalmente con un indicador de oxidación-reducción, la resazurina.

II. ANTECEDENTES

A. Los microorganismos en el proceso agroindustrial azucarero

La diversidad de los microorganismos en un medio, a través de su metabolismo, interrelaciones o mecanismos de adaptación, modifican el entorno para obtener las condiciones necesarias en su crecimiento y desarrollo, lo que ha garantizado su presencia en los hábitats más diversos a través del tiempo. Con el desarrollo de los diferentes procesos tecnológicos se han creado nuevos hábitats para los microorganismos, lo cual puede ser beneficioso o perjudicial. Cuando se alteran las condiciones de un producto o un proceso por causa de ellos se le designa “biodeterioro”. Un ejemplo ilustrativo del mismo es el impacto de la microbiota presente en la agroindustria azucarera.

La industria azucarera procesa un material de cualidades idóneas para el desarrollo de la actividad microbiana, que es el jugo de caña. 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. El jugo está compuesto por agua, entre un 70 y un 80%, y sólidos; de éstos entre el 12 y el 20% aproximadamente son solubles e incluyen en una proporción muy alta los azúcares, fundamentalmente la sacarosa, que puede constituir más del 90% de los sólidos solubles del jugo si la caña está madura, y además, glucosa y fructosa en bajas proporciones (de 2 a 4%). A estos componentes se añaden otros no azúcares, generalmente en suspensión, como las materias ceras, no-azúcares proteínicos, pentosanas de naturaleza orgánica y distintos componentes inorgánicos como MgO, Fe₂O₃, Al₂O₃, P₂O₅, SiO₂, cenizas insolubles en HCl y fibra (Aiba *et al.*, 1970).

Por tanto, la composición del jugo lo hace apto para la actividad microbiana. Su pH, que oscila entre 5.0 y 5.2, es apropiado para la actividad de su biota característica, y la temperatura, tanto en el campo de caña como en la fábrica, es la adecuada para el desarrollo de microorganismos mesófilos. Solo en algunos estadios del proceso la temperatura puede inhibir la actividad microbiana. En un medio con tan buenas condiciones, los microorganismos que

integran la biota de los jugos crecen rápidamente en éstos. Para ello utilizan la sacarosa contenida en el jugo para obtener energía para sus procesos vitales y excretan a éste productos metabólicos por ellos elaborados.

La actividad microbiana en los jugos se traduce en dos tipos de acciones:

- Pérdida de sacarosa, que es la sustancia a recuperar en la fábrica.
- Incorporación al jugo de sustancias metabólicas, ajenas a su composición, que alteran sus cualidades para el procesamiento. Entre estas sustancias se encuentran fundamentalmente los polisacáridos, conocidos como gomas, y los ácidos orgánicos.

(Hernández *et al.*, 1987)

Los organismos presentes en la caña de azúcar proceden del suelo y de las estructuras vegetales en putrefacción. Con tiempo húmedo y caluroso el jugo que exuda la caña de azúcar al ser cortada puede contener un elevado número de microorganismos, aproximadamente 10^9 bacterias y 10^6 levaduras y mohos por gramo (Mayeux, 1960).

La microbiota de la caña de azúcar sin cortar es variable, estando influenciada principalmente por la temperatura, la humedad y la estación del año (Duncan *et al.*, 1964). 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 (10^4 - 10^8 /g) y levaduras y mohos (10^3 - 10^4 /g) (Mayeux, 1960). Las poblaciones bacterianas de las hojas de caña infectadas por bacterias, hongos y virus son mayores 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*) (Duncan *et al.*, 1964), *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Corynebacterium*; algunas de estas especies son potencialmente patógenas para las plantas (Tilbury, 1970).

También se han estudiado algunos ecosistemas específicos de la caña de azúcar. El agua de la vaina de las hojas contiene 0.01-0.06% de azúcar y un valor pH de 5.7-7.7. En esta agua, las

poblaciones bacterianas son directamente proporcionales al contenido en azúcar, oscilando de 10^5 a 10^7 UFC/ml y en ocasiones mucho más alto (Mayeux, 1960; Duncan *et al.*, 1964). En las vainas de las hojas pueden encontrarse levaduras de diferentes géneros (Bevan *et al.*, 1971). La corteza de la caña puede encontrarse lesionada por la acción de los insectos o por otras causas. A través de estas erosiones, la penetración en la caña del perforador de caña *Diatraea saccharalis* da lugar a la producción de detrito ("frass") y a la invasión de bacterias, levaduras y mohos. Se ha encontrado que el detrito contiene por gramo 10^8 - 10^{10} bacterias, principalmente *Enterobacter aerogenes*, 10^3 - 10^6 levaduras y 10^3 - 10^5 mohos (Mayeux, 1960). Además de las lesiones originadas por los insectos, la corteza de la caña puede agrietarse debido al crecimiento, congelación o quemadura de las hojas (Tilbury, 1969). Los exudados que aparecen en la superficie, o los tejidos que son invadidos a través de esas erosiones, ofrecen ecosistemas idóneos para el crecimiento de diferentes bacterias, levaduras y mohos (Bevan *et al.*, 1971). Sin embargo, para que estos microorganismos verdaderamente se desarrollen han de concurrir otros factores tales como la amplitud del daño físico, la temperatura existente y el tiempo que media entre la lesión y la recolección de la caña; tanto la velocidad como la cantidad de la alteración microbiana pueden incrementarse en humedades elevadas o con regímenes de lluvia abundantes.

1. Efectos del procesado sobre los microorganismos

a. Recolección. Existen numerosos métodos de zafra de la caña de azúcar y cada uno de ellos tienen sus ventajas e inconvenientes desde el punto de vista de la destrucción microbiana del azúcar en la caña ya recolectada. También influyen grandemente en la contaminación, crecimiento y alteración microbiana, la temperatura, la humedad y el tiempo transcurrido entre la recolección y el triturado.

La caña de azúcar madurada puede recolectarse en verde (es decir, incluyendo las hojas) o puede quemarse previamente para quitarle las hojas. Estas hojas se cortan con la mano, con machetes o mediante máquinas; las máquinas para cortar caña pueden picar a su vez, durante la recolección, trozos de aproximadamente 30cm de longitud con lo que se incrementan considerablemente las zonas de contaminación.

La operación de quemado para eliminar las hojas puede aumentar la temperatura del tallo hasta 55-85°C. Estas temperaturas no destruyen, aparentemente, muchas bacterias sensibles al calor a juzgar por la cantidad de microorganismos esporógenos que pueden encontrarse tras la operación de quemado (Bevan *et al.*, 1971). El *Leuconostoc mesenteroides* ha sido detectado en las cañas aproximadamente con la misma frecuencia antes que después del quemado y además, este microorganismo aumenta considerablemente a medida que pasa el tiempo tras la operación de quemado (Bevan *et al.*, 1971). Alrededor del 25% de los trozos de muestras de caña contienen *L. mesenteroides* en cantidades de 5-50,000 UFC/g; pero usualmente su contenido es inferior a 1,000 UFC/g (Tilbury, 1970).

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 10^2 a 10^3 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 10^3 a 10^4 células por machete (Tilbury, 1969). 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 (Bevan *et al.*, 1971). Estas circunstancias facilitan la entrada de *Leuconostoc* y otros agentes, o bacterias formadoras de ácido, que aceleran la alteración (Egan, 1971). 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.

Cuando el *Leuconostoc* y otras bacterias formadoras de ácido se desarrollan en la caña de azúcar recolectada, ésta se vuelve ácida (Tilbury, 1968). Se produce azúcar invertido, ácidos láctico y acético y, con frecuencia, dextrana. 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 (Tilbury, 1975), 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.

2. Extracción y procesado. El procesado de la caña hasta obtener azúcar bruto tiene lugar en una serie de operaciones, la mayoría de las cuales afectan a la microbiota del producto o, viceversa, son afectadas por la microbiota. Estas operaciones son (a) cortado, (b) triturado y extracción de jugos, (c) clarificación, (d) evaporación (e) cristalización, (f) centrifugación y (g) azúcar crudo.

Numerosos estudios se han realizado sobre la microbiología del jugo de caña y también algunas revisiones. Las especies bacterianas que se han encontrado con mayor frecuencia son *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Thermoactinomyces*; las levaduras más comunes son *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y *Pichia spp*; y los hongos más frecuentes son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Citromyces*, *Cladosporium* y *Monilia* (Mayeux, 1960; Shehata, 1960; Tilbury, 1970).

Durante el triturado y la extracción, se fragmenta la caña de azúcar y se pasa consecutivamente a través de una serie de molinos donde tiene lugar la inbibición (fase de extracción) de agua que circula en dirección opuesta. El jugo exprimido del primer molino (primario) puede contener más del 19% de azúcar y el del último molino menos del 5%. El total del jugo combinado se denomina jugo diluido. Los trituradores y molinos, y todos los sistemas asociados para el transporte de los fluidos, constituyen una inmensa maquinaria de cultivo continuo que trabaja durante meses y con frecuencia durante varios días seguidos entre las paradas programadas.

El jugo diluido es un medio ideal para el crecimiento de muchos microorganismos, si bien sólo unos cuantos lo logran con éxito. El jugo tiene un grado Brix (porcentaje en peso de sólidos solubles) de 10-18, un pH de 5.0-5.6 y una temperatura media entre 25 y 30°C. El recuento bacteriano del jugo procedente del primer molino es de 10^5 a 10^7 UFC/mL para la caña normal y aproximadamente de 10^8 UFC/ml para la caña deteriorada. A los microorganismos contaminantes de la caña hay que sumar los desarrollados en los trituradores, molinos, canalizaciones y filtros. En este medio ambiente, el *Leuconostoc mesenteroides*, formador de dextrana, está especialmente adaptado para competir, si bien otros microorganismos

microaerófilos catalasa-negativo crecen igualmente produciendo ácido, invertasa y dextrana. En algunos molinos predominan los *Enterobacter spp.*; en otros son buenos competidores las levaduras productoras de alcohol. Afortunadamente la destrucción del azúcar por los microorganismos se reduce durante la fase de clarificación, que normalmente se lleva a cabo con rapidez, si bien, en ocasiones, se ve retrasada por paradas programadas o sin programar.

En la fase de clarificación se alcanzan temperaturas de, por lo menos, 80°C y a veces por encima de 100°C. El calentamiento destruye las levaduras y las formas vegetativas de las bacterias; y la sedimentación y filtración elimina las espumas, los precipitados y los sólidos suspendidos. Con la fase de clarificación disminuye el recuento microbiano en un 99.99% (Cuadro 1), si bien permanece el contenido en dextrana y muchos esporos bacterianos (Hernández, 1987). Los productos eliminados, en lo que se denomina cachaza, contiene azúcar y otros materiales orgánicos, la cual constituye un excelente medio de cultivo para las bacterias y contiene 10^5 - 10^6 UFC de *L. mesenteroides*/gramo. La cachaza se utiliza como fertilizante, devolviéndolos por tanto a los campos de cultivo.

Cuadro 1. Contenido bacteriano de los jugos de caña de azúcar procesados

Producto	Mesófilos/ml (margen)	Termófilos/ml (margen)
Jugo bruto (al principio) ^b	8×10^6 - 16×10^6	1×10^1 - 1×10^2
Jugo bruto (al final) ^b	6×10^8 - 8×10^8	—
Efluente clarificado	0 -11	0 -8
Jugo de prensa	0 - 5×10^4	3×10^3 - 2×10^5
Evaporador	2×10^2 - 3×10^4	2×10^2 - 2×10^3
Tanque de almacenamiento	1×10^3 - 7×10^3	2×10^4 - 4×10^4
Cristalizador	2×10^3 - 4×10^4	3×10^2 - 2×10^4
"Massecuite" ^c	1×10^3 - 1×10^4 ^d	2×10^3 - 2×10^4
Azúcar bruto o crudo	3×10^2 - 5×10^3 ^d	2×10^2 - 2×10^3
Melazas	3×10^3 - 3×10^5	1×10^3 - 2×10^4

^a Adaptado de Owen (1977).

^b Al principio de la estación y al final de la misma.

^c Mezcla de cristales de azúcar y melazas.

^d Por gramo.

(Hernández *et al.*, 1987)

En la caña atacada por bacterias formadoras de ácido, en el jugo molido de las canalizaciones y tubos y en la cachaza, la dextrana se forma a partir de la sacarosa por acción primordial de

Leuconostoc. La formación de dextrana en el jugo algunas veces se asemeja a las huevas de rana; esta última semejanza, aparentemente está producida por el *L. mesenteroides* en simbiosis con una levadura y una bacteria no identificada (Bevan *et al.*, 1971). La dextrana puede llegar a espesar tanto el jugo que ocasiona el atasco de las tuberías. También la presencia de dextrana puede interferir en otros momentos del procesado, ya que lentifica la fase de clarificación con la consiguiente disminución de su efectividad sobre los microorganismos. La dextrana, al aumentar la viscosidad de la mezcla de cristales de azúcar y melazas, interfiere también en las fases de evaporación y cristalización. La velocidad de esta última fase disminuye con lo que aumenta el porcentaje de cristales malformados (Tilbury, 1972; Tilbury *et al.*, 1974).

3. Microbiología del azúcar de caña bruto. El azúcar de caña bruto es el producto final del triturado de la caña y a su vez el material de partida para la refinería. Este producto contiene aproximadamente 98-99.3% de sacarosa en forma cristalina y alrededor de 0.5-2% de melazas que se encuentran circundando a los cristales. Las melazas constan de sacarosa, agua, azúcar invertido, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, minerales, almidón y dextrana y otros polisacáridos. La a_w debe estar en 0.65 ó inferior, si bien en ocasiones es superior y el pH oscila de 5.0 a 6.0 (Tilbury, 1967).

El azúcar bruto se obtiene mediante evaporación a partir del jugo clarificado. Así el jugo que contiene aproximadamente 12-15% de sacarosa se hierve bajo presiones, consecutivamente reducidas, a temperaturas superiores a 110 °C. Estas condiciones de tratamiento imposibilitan el crecimiento microbiano y destruyen todos los microorganismos a excepción de algunos esporos bacterianos. Cuando la concentración de sólidos solubles (principalmente sacarosa) es de aproximadamente 60 Brix, la cristalización tiene lugar mediante ebullición a unos 60°C, bajo vacío, hasta que la solución se encuentra supersaturada y comienza a cristalizar. La mezcla de cristales y de melazas se conoce como "massecuite". El azúcar bruto se obtiene en centrífuga mediante la eliminación de la mayor parte de las melazas de los cristales de azúcar (*idem*).

Esporos bacterianos, levaduras y mohos constituyen el contenido microbiológico del azúcar bruto. Algunos esporos bacterianos se encuentran presentes debido a que resisten el proceso térmico y no son eliminados durante la fase de clarificación. En algunos ingenios, se encuentran grandes poblaciones de levaduras osmófilas y hongos en los tanques de almacenamiento de los

jarabes y melazas, las cuales a menudo no se destruyen en la cámara de vacío durante la cristalización. Durante la cristalización, centrifugación y desecado, los productos pueden contaminarse con una pequeña proporción de mohos y levaduras transportados por el aire. Sin embargo, pueden introducirse gran número de levaduras osmófilas en el azúcar húmedo y a su vez desarrollarse a través del contacto con determinadas superficies, por ej., tolva, cintas transportadoras, básculas y cubas de almacenamiento. En algunos países, en donde el trabajo de los trituradores se realiza en operaciones continuas durante una semana o más, la limpieza del equipo poco accesible se realiza con dificultad por lo que el producto azucarado sin desecar puede contener 10^4 - 10^6 levaduras osmófilas por gramo (*idem*).

Los microorganismos del azúcar pueden variar con el país de origen, si bien los más frecuentes son generalmente aquellos que resisten bajas a_w del producto. Entre las bacterias las más comunes son los *Bacillus spp.*, que no crecen en el producto final pero pueden crecer en soluciones diluidas de azúcar durante el proceso de refinado. También pueden estar presentes las bacterias *Clostridium nigrificans*, *Clostridium butyricum* y *Bacillus spp.*, y tienen interés si resisten el proceso de refinado y se encuentran presentes en el azúcar refinado utilizado en los alimentos enlatados. Las especies de mohos más frecuentes son *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Monilia spp.*, mientras que otros géneros se encuentran con menor frecuencia (*idem*).

Las principales levaduras que se encuentran en el azúcar bruto son las osmófilas. Sus reservorios naturales parecen ser la misma caña de azúcar, los lodos de los filtros y los materiales azucarados húmedos de los trituradores. *Saccharomyces rouxii* y *S. mellis* son las levaduras más frecuentes, si bien se han encontrado otras especies de *Saccharomyces* y especies de *Pichia*, *Torulapsis*, *Candida*, *Dekkeromyces* y *Endomycopsis* (*idem*).

B. Control del biodeterioro en la industria azucarera

Los dos puntos principales para el control de la alteración son el campo y la fábrica. En el primer caso, toda reducción de tiempo entre la recolección de la caña y su tratamiento hace disminuir las posibilidades del crecimiento microbiano. Este intervalo no debiera ser superior a 24-36 horas para la caña entera y de 8-12 horas para la caña troceada en climas húmedos y calurosos o de 18 horas con tiempo seco y frío. La recolección con machetes afilados reduce los

cortes desiguales y por tanto minimiza la entrada de bacterias a través de las superficies de corte. Cuando se utilizan cosechadoras es deseable la limpieza y la higiene de la zona de picado (Egan, 1971). En la fábrica, las prácticas higiénicas varían enormemente de unas compañías a otras. Un programa eficaz incluye una limpieza, cada 8 horas, con cepillado y pulverización de agua caliente a presión para disolver el azúcar y desalojar otros materiales contaminantes. Aunque no de forma general, se utilizan para desinfección compuestos de amonio cuaternario, compuestos organosulfurados y de cloro. Cuando se utilizan desinfectantes, se pueden pulverizar directamente sobre la caña en el triturador o bien añadirlo al agua de absorción. Algunos operarios no tratan de controlar el desarrollo microbiano con lo que las fábricas aparecen increíblemente sucias, con bolsas de jugo fermentado, lodo y olores fétidos (Tilbury, 1978).

Los métodos para evaluar la eficacia de los procedimientos de control durante el procesado de la caña hasta el producto final se basan (a) en la pérdida de sacarosa y (b) en la determinación de recuentos microbianos, tiempo de reducción de colorantes, acidez titulable, pH y dextrana y otros polisacáridos. No está indicado un método simple para cubrir todos los objetivos (Klaushofer, 1971; Najodkina, 1968).

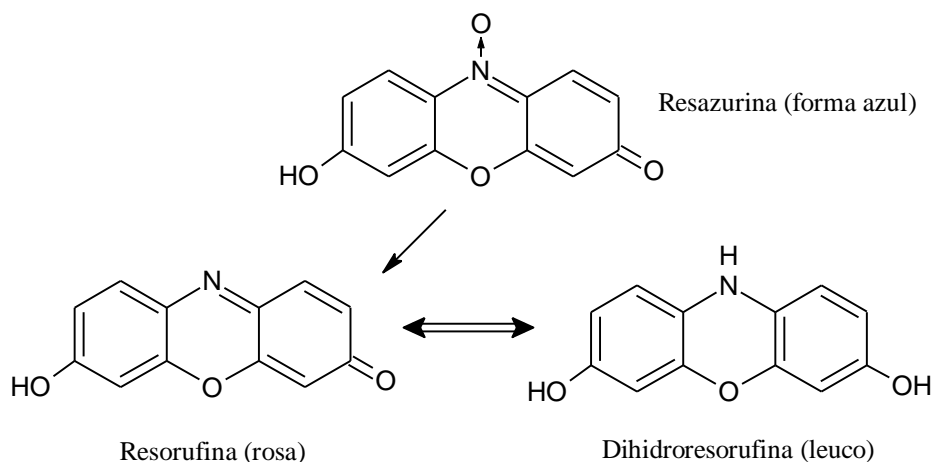
C. Métodos de estimación de la densidad microbiológica en otras industrias alimenticias y antecedentes en la industria azucarera

Un grupo de pruebas que han sido utilizadas en la industria, principalmente láctea, dependen de respuestas de varios colorantes redox ante la presencia de microorganismos activos desde el punto de vista metabólico. Se trata de pruebas relativamente sencillas y rápidas de llevar a cabo a bajo costo. Los colorantes redox son capaces de captar los electrones de un sistema biológico activo y esta captación ocasiona un cambio de color. Habitualmente, la forma oxidada es de algún color y la forma reducida es incolora (Adams, 1997). Entre los más usados están el azul de metileno y la resazurina; el tiempo necesario para el cambio de color es proporcional al número de microorganismos presentes o su actividad (Hernández, 1987).

La resazurina es una oxazona que en solución tiene coloración azul. Por pérdida de oxígeno se reduce en dos etapas: en la primera pasa por diversas tonalidades de violeta hasta rojo, éste color se atribuye a la formación de un compuesto denominado resorufina; a diferencia del azul

de metileno esta etapa de reducción es irreversible, es decir, en contacto con el oxígeno del aire el color azul original no se restituye. Si la pérdida de oxígeno continúa, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resorufina se reduce a dihidro-resorufina, compuesto incoloro que por oxidación puede pasar de nuevo a resorufina (rojo-rosa) (Universidad de Zulia, 2003).

Figura 1 - Estructura de la forma oxidada y reducida de la resazurina.



(Adams, 1997; CambridgeSoft Corporation, 2008)

En la industria lechera se han usado tanto la resazurina como el azul de metileno, para estimar la calidad microbiológica de la leche fresca en la granja o a su arribo a la procesadora (Adams, 1997).

Varios autores introdujeron la prueba de la resazurina en la industria azucarera de remolacha concluyendo que era posible su utilización como medio para estimar la actividad microbiológica en sus productos intermedios (Anderson, 1956; Bidan, 1966; Najopkina, 1968).

Más recientemente la prueba fue adaptada a jugo de caña en ingenios azucareros de la República de Cuba. Para ello se utilizó 9mL de una solución $1/10^5$ de resazurina a la que se le adicionó 1mL de jugo colado, y la medición del tiempo total de decoloración (Hernández, 1987). Posteriormente, la relación de inoculación fue modificada para la proporción 7mL de solución y 3mL de jugo, con lo que se redujo el tiempo total del análisis a la mitad aproximadamente, se

ganó precisión en el punto final y se ahorra reactivo (Nuñez, 1987). Los autores citados trabajaron casi exclusivamente con jugos primario y diluido.

D. La industria azucarera en Guatemala. Corporación Santa Ana

En los años actuales, la producción de azúcar de Guatemala ha tomado más importancia, debido a que en las cosechas recientes ha alcanzado los niveles de producción récord, y ha ocupado el tercer lugar como exportador más grande de América Latina y el sexto en importancia a nivel mundial. Este hecho representa beneficios económicos significativos para el país, especialmente, por la generación de divisas y por la cantidad de empleos que ésta industria provee. La Agroindustria de Azúcar de Guatemala está constituida por 17 ingenios activos, ubicados en la costa del Océano Pacífico, al sur del país. Año con año, el desarrollo de la Agroindustria de Azúcar de Guatemala ha seguido creciendo y en la cosecha del período 2000-2001 se procesaron 15,139,723 toneladas métricas de caña de azúcar con una producción de 1,718,440 toneladas métricas de azúcar.

La corporación Santa Ana se dedica a la producción de caña de azúcar, elaboración de azúcar y generación de energía eléctrica. También comercializa subproductos como la melaza, bagazo y cachaza y diversos servicios conexos. Contribuye con el desarrollo de Guatemala, produciendo en promedio 4.9 millones de quintales de azúcar (225,879 toneladas métricas de azúcar) por año y generando 45 MW en los meses de diciembre a marzo y 25 MW en los meses de abril a noviembre. Del total de la generación de energía eléctrica se vende al Sistema Nacional Interconectado (S.N.I.) (Corporación Santa Ana, 2007) (ver anexo A)

III. JUSTIFICACIÓN

La industria azucarera es uno de los principales sectores de exportación en Guatemala, y la actividad microbiológica es un factor negativo en las utilidades de dicha industria, por lo que se han implementado procedimientos que disminuyen su impacto en el proceso tecnológico. La optimización de estos procedimientos requiere el establecimiento de sistemas de monitoreo adecuados, que permitan estimar con la mayor exactitud posible la magnitud de la actividad microbiana, y evaluar la eficacia de los métodos utilizados.

Por las características de la industria de ser un proceso continuo y dinámico, la realización de un recuento total microbiológico estándar no es posible, tomando en cuenta que los resultados pueden ser obtenidos hasta luego de 48 horas. Por lo tanto, son necesarios métodos rápidos, de fácil aplicación y de bajo costo, para la detección y cuantificación de la microbiota en el jugo de caña en las primeras fases de la producción de azúcar, como los que se han referido anteriormente, en particular el de la reducción de la resazurina.

En la industria azucarera guatemalteca no hay referencias de estudios de pruebas de estimación rápida como la planteada, y en general solo se ha establecido la correlación entre los resultados de estas pruebas y el jugo primario y diluido, no así con otros jugos de circulación en el tándem, los cuales también son susceptibles a la actividad microbiana.

IV. OBJETIVOS

A. El objetivo general de este estudio es:

1. Estimar la densidad microbiológica en los distintos tipos de jugo de caña en la fase de molienda del proceso de producción de azúcar, por medio del tiempo de reducción de resazurina.

B. Específicos:

1. Caracterizar la microbiota en distintos puntos del tándem, en términos de concentración y cualidades fisicoquímicas del jugo.
2. Establecer los parámetros de un método indirecto de estimación de la actividad microbiológica, aplicado en jugo de caña, utilizando como base el tiempo de reducción de resazurina.
3. Determinar la correlación entre la concentración microbiana medida por el recuento total estándar y el tiempo de reducción de resazurina, en jugo de caña de distintos puntos de la fase de extracción de jugo.
4. Generar un modelo que relacione el tiempo de reducción de resazurina con la densidad microbiológica en el jugo a lo largo del tándem.
5. Implementar las bases técnicas para la aplicación futura de este método como rutina en el ingenio Santa Ana o en la industria azucarera en general.

V. HIPÓTESIS

A. La hipótesis que se plantea es:

1. La densidad microbiológica de los distintos tipos de jugo de caña en la etapa inicial del proceso de producción de azúcar, puede ser estimada por el tiempo de reducción de resazurina.

VI. MÉTODOS

A. Muestreo:

Las muestras de jugo de caña fueron tomadas en el ingenio Santa Ana, ubicado en el kilómetro 64.5 carretera a Santa Lucía Cotzumalguapa, Finca Interior Cerritos, en el departamento de Escuintla, durante las zafras 2006-2007 y 2007-2008, específicamente en los meses de mayo-junio del 2007 y enero-abril del 2008.

Las muestras se tomaron en diferentes puntos del proceso de molienda de la caña en el ingenio, en ambos tándem (A y B), lo que consistió en la recolección de jugo primario, jugo diluido, y jugo de cada uno de los 6 molinos que comprenden el tándem (ver anexo A). Durante la zafra 2006-2007 se analizaron 40 muestras, únicamente jugo primario y jugo diluido. En la zafra 2007-2008 se analizaron 35 muestras, repartidas entre los 6 molinos y el jugo diluido del tándem A. De estas muestras, 21 también fueron utilizadas para el recuento de *L. mesenteroides*. El jugo se recogió en frascos plásticos de 500mL, y fueron transportados de forma inmediata desde los molinos hacia el laboratorio de caña donde se realizó la mayoría de análisis. Para estudios posteriores en el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala, se transportaron muestras y se almacenaron en congelación (-7°C).

Figura 2. Número de muestras tomadas en cada punto (Molinos 1-6, jugo diluido).



B. Análisis microbiológicos:

1. Preparación de medios de cultivo:

a. Plate Count Agar:

- 1) Pesar en una balanza, utilizando papel parafinado, 22.5g de Medio Plate Count (Oxoid) por cada litro a preparar.
- 2) Transferir el medio a un erlenmeyer con capacidad para el doble del volumen de medio que se desea preparar.
- 3) Medir en una probeta el volumen necesario de agua destilada y agregar la mitad al erlenmeyer con el medio.
- 4) Tapar el erlenmeyer con un tapón de gaza y algodón, disolver el medio con la ayuda de un agitador magnético en un agitador/estufa y calentar hasta ebullición.
- 5) Pegar un pedazo pequeño de cinta testigo y esterilizar el medio en autoclave por 15 minutos a 120°C y 15psi.
- 6) Retirar el medio cuando la presión y temperatura hayan disminuido en su totalidad.
- 7) Para utilizar el medio esperar a que la temperatura de este descienda a alrededor de $45 \pm 5^\circ\text{C}$.
- 8) Si es necesario mantener la temperatura introducir el erlenmeyer en baño de maría a $55^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$.

(Manual Merck, 2006)

b. Agua Peptona

- 1) En una balanza, pesar 2.55g de agua peptona (Merck) por cada litro.
- 2) Mezclar con el volumen de agua destilada, previamente medido, en un erlenmeyer que pueda contener el doble del volumen a preparar.
- 3) Dispensar en frascos plásticos de 1 litro y pegarle cinta testigo.
- 4) Introducir en autoclave y esterilizar por 15 minutos a 120°C y 15psi.
- 5) Esperar que la presión y temperatura de la autoclave bajen para retirar los frascos.

- 6) Si no se va a utilizar directamente, almacenar en refrigeración para su posterior uso.

(Manual Merck, 2006)

c. Agar Mayeux, Sandine, Elliker Modificado

Cuadro 2. Composición de medio Mayeux (1 litro)

Triptona	10.0g
Gelatina	2.5g
Extracto de levadura	5.0g
Sacarosa	100.0g
Glucosa	5.0g
Citrato de sodio	1.0g
Azida de sodio	0.075g
Agar agar	15.0g

- 1) Pesar cada ingrediente en una balanza, en el caso de la azida de sodio pesar en balanza analítica.
- 2) En un erlenmeyer de tamaño acorde a la cantidad de medio que se desea preparar, mezclar los ingredientes.
- 3) Medir en una probeta la cantidad necesaria de agua destilada y agregar la mitad al erlenmeyer. Tapar el erlenmeyer con un tapón de gaza y algodón.
- 4) Sobre una estufa/agitador, disolver el medio con la ayuda de un agitador magnético y calentar a ebullición.
- 5) Introducir en autoclave y esterilizar por 15 minutos a 120°C y 15psi.
- 6) Esperar a que disminuya la presión y temperatura antes de retirar el medio de la autoclave.
- 7) Verter el medio sobre placas petri rotuladas con el nombre del medio y la fecha de preparación.
- 8) Si no se van a utilizar directamente, almacenar en refrigeración, dentro una bolsa plástica sellada y rotulada.

(Mayeux, 1961)

2. Recuento total de mesófilos aerobios

a. Preparación de las muestras de jugo de caña para siembra microbiológica

- 1) Las cajas Petri a utilizar deben estar previamente rotuladas, con el número de muestra, la dilución y replica.
- 2) Limpiar la mesa de trabajo con cloro al 10% y alcohol al 70%.
- 3) Al lado de un mechero, tomar un alícuota de 3mL de la muestra con una pipeta graduada estéril de 5mL con punta recortada.
- 4) Colocar 1mL, de los 3mL medidos, en un tubo de ensayo con tapón de rosca y mezclar con 9mL de agua peptona.
- 5) Realizar diluciones seriadas en tubos de ensayo agregando 1mL de la dilución anterior en 9mL de agua peptona, y mezclar bien. Diluir hasta obtener una relación de $1:10^7$.

(Harrigan, W. F. 1998)

b. Siembra por vertido

- 1) El Medio Plate Count, preparado con anterioridad, no debe utilizarse hasta que su temperatura se encuentre en aproximadamente $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- 2) Iniciando con la dilución más baja, colocar 1mL de inóculo en el centro de cada caja, utilizando una pipeta estéril de 1mL.
- 3) Añadir Medio Plate Count (directamente del erlenmeyer) sobre el inóculo hasta cubrir la caja para que este se esparza, y agitar haciendo movimientos circulares. Tapar la caja, verificar que el medio solidifique.
- 4) Introducir las cajas en forma invertida en una incubadora.
- 5) Incubar por 48 horas a $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 6) Repetir el proceso con las diluciones más altas y trabajar en duplicado.

(Harrigan, W. F. 1998)

c. Recuento

- 1) Contar el número de colonias en cada placa de petri.
- 2) Escoger la dilución que genere placas con un número de colonias entre 25-300.
- 3) La media aritmética del conteo de colonias en la dilución escogida, es utilizada para calcular la concentración microbiana en la muestra original.
- 4) El recuento, N , de UFC/mL de muestra está determinado por:

$$N = \frac{(n\bar{x})}{n \cdot d}$$

Donde $(n\bar{x})$ es el total del número de colonias contadas en todas las placas de la dilución escogida, n es el número de placas contadas en esa dilución y d es la dilución utilizada (e.g. 10^{-3}).

- 5) Reportar los resultados como UFC/mL.

(Harrigan, W. F. 1998)

3. Recuento de *Leuconostoc spp.* La preparación de la muestra es igual al caso de un recuento total (procedimiento 2.a.) con la excepción que se diluye hasta tener una relación $1:10^4$.

a. Siembra microbiológica por superficie

- 1) Iniciando con la dilución más baja. Agregar 0.5mL sobre el medio con una pipeta del mismo volumen.
- 2) Usar un esparcidor estéril para difundir el volumen hacia toda la superficie caja.
- 3) Tapar la caja e incubar el medio en posición invertida a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, verificar el crecimiento luego de 24 horas.
- 4) Repetir el proceso con las diluciones más altas y trabajar en duplicado.

(Harrigan, W. F. 1998)

b. Recuento

- 1) Contar el número de colonias en cada placa de petri.
- 2) Escoger la dilución que genere placas con un número de colonias entre 25-300.

- 3) La media aritmética del conteo de colonias en la dilución escogida, es utilizada para calcular la concentración microbiana en la muestra original.
- 4) El recuento, N , de UFC/mL de muestra está determinado por:

$$N = \frac{(n\bar{x})}{n \cdot d}$$

Donde $(n\bar{x})$ es el total del número de colonias contadas en todas las placas de la dilución escogida, n es el número de placas contadas en esa dilución y d es la dilución utilizada (e.g. 10^{-3}).

- 5) Reportar los resultados como UFC/mL.

(Harrigan, W. F. 1998)

C. Análisis de tiempos de reducción de resazurina:

1. Preparación de solución de resazurina

- a. En una balanza pesar 9g de NaCl (Merck) y 0.01g de resazurina (Aldrich 07101LE).
- b. Disolver en agua destilada en beakers de 10mL.
- c. Mezclar en un balón de 1L y aforar con agua destilada.
- d. Esterilizar en autoclave a vapor fluente o en baño de maría a 100°C durante 1 hora.
- e. Refrigerar la solución.

(Hernández, 1987)

2. Medición de tiempos de reducción de resazurina

- a. Agregar 16.5mL de solución de resazurina en tubos de ensayo (con capacidad para 22mL) con tapón de rosca.
- b. Mezclar 5.5mL de muestra de jugo de caña en cada tubo de ensayo hasta llenarlo en su totalidad y tapanlo. Agitar para formar una mezcla uniforme.
- c. Incubar los tubos de ensayo a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Apuntar la hora de inicio de incubación.
- d. El color inicial de la mezcla es violeta, se debe verificar el cambio de coloración de la mezcla, luego de 1 hora, cada 10 minutos. Utilizar como control una mezcla totalmente decolorada.

- e. La decoloración de la mezcla provocada por la reducción de la resazurina marca el punto final. Verificar, con un cronómetro, el tiempo transcurrido desde el inicio de incubación. (ver anexo B)

D. Pruebas de correlación entre densidad microbiológica y reducción de resazurina en jugo de los distintos puntos del proceso de molienda de la caña.

1. Utilizar muestras de jugo primario, diluido y de cada uno de los 6 molinos en el tándem A.
2. Realizar pruebas paralelas de reducción de resazurina (procedimiento C.2.a.) y recuento total (procedimiento B.2).
3. A través de la repetición de las pruebas en diferentes días de muestreo, analizar las variaciones y relación del tiempo de reducción de resazurina y el recuento total en los distintos puntos del tándem.

E. Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó con el software Analysis Toolpak de Microsoft Excel. Para los datos obtenidos se calculó la desviación estándar y límites de confianza al 95%.

La correlación entre las variables, densidad microbiológica y tiempo de reducción de resazurina, se determinó con un análisis de regresión. Se calculó el \log_{10} de los datos para obtener una ecuación líneal y verificar la validez del modelo de regresión por medio de un análisis de varianza (ANOVA). (Anderson *et al.*, 2004)

VII. RESULTADOS

Durante la zafra 2006-2007 se determinaron los rangos de crecimiento microbiano exclusivamente en jugo primario y diluido, lo que sirvió para obtener información preliminar sobre las características microbiológicas en el jugo de caña (Ver cuadro 3).

Durante la zafra 2007-2008, además de analizar muestras de jugo primario y jugo diluido, se analizaron muestras de distintos puntos del tándem (Ver cuadro 3).

Cuadro 3. Rangos de concentración microbiana en jugo de caña de distintos puntos a lo largo del tándem ($n = 75$)

Tipo de Jugo	n	Rango de concentración UFC/mL	
		Zafra 2006-2007	Zafra 2007-2008
1° Molino	25	1.10E+06 — 9.00E+06	2.37E+06 — 7.70E+06
Diluido	25	1.30E+06 — 7.00E+06	1.40E+06 — 5.70E+06
2° Molino	5		3.59E+05 — 1.21E+06
3° Molino	5		2.72E+05 — 7.30E+05
4° Molino	5		4.27E+04 — 1.51E+05
5° Molino	5		2.50E+04 — 7.60E+04
6° Molino	5		7.50E+03 — 2.92E+04

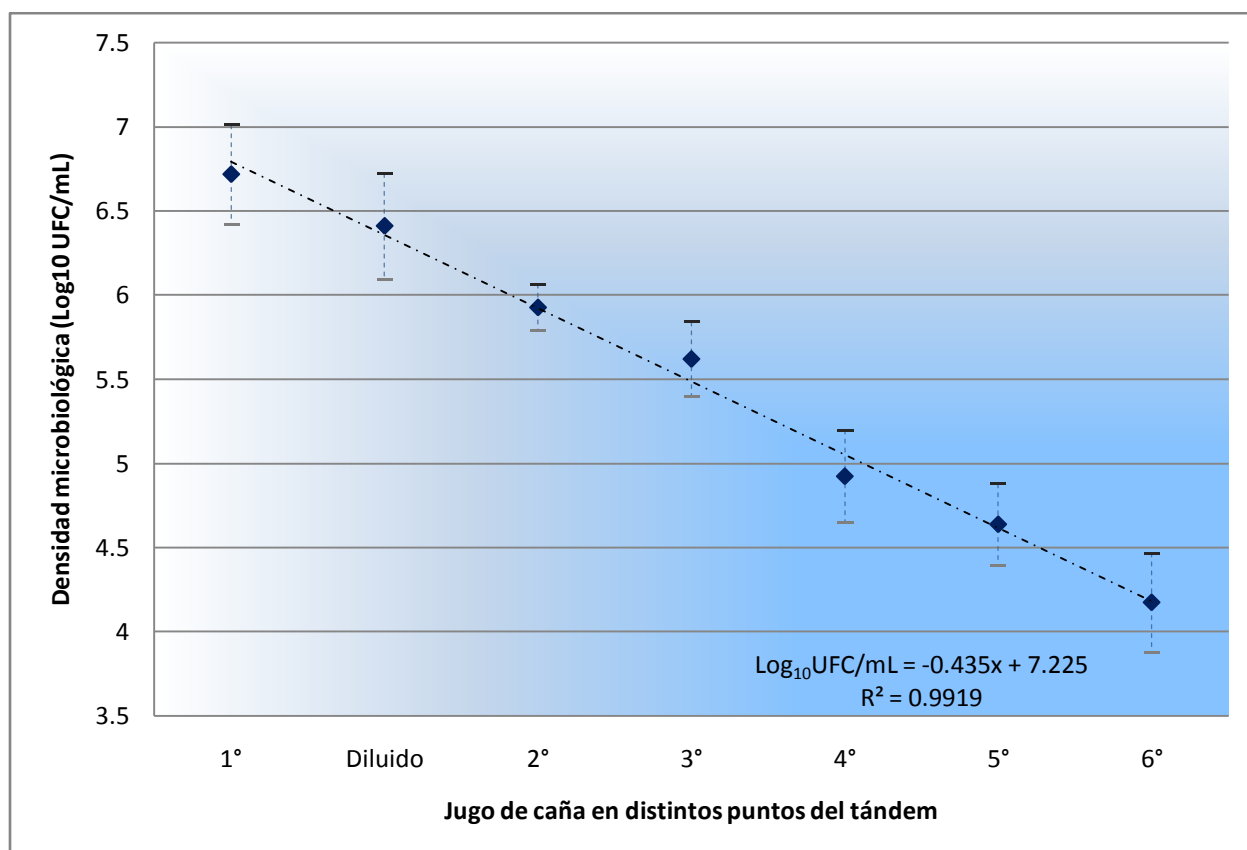
Cuadro 4. Rangos de concentración de *L. mesenteroides* en jugo de caña de distintos puntos a lo largo del tándem ($n = 21$)

Tipo de Jugo	n	Rango de concentración UFC/mL
		Zafra 2007-2008
1° Molino	3	2.50E+05 — 5.80E+05
Diluido	3	6.45E+04 — 6.89E+04
2° Molino	3	1.39E+04 — 2.47E+04
3° Molino	3	1.24E+03 — 5.12E+02
4° Molino	3	7.60E+02 — 9.30E+02
5° Molino	3	Sin crecimiento
6° Molino	3	Sin crecimiento

El recuento de *L. mesenteroides* mostrado en el cuadro 4 se realizó la finalidad de comparar la tendencia de crecimiento, ya que no es proporcional a un recuento total debido a una falta de estandarización.

La densidad microbiológica disminuye con una tendencia exponencial desde el primer molino hacia el sexto, esto causado por reducción de nutrientes y cambios en las características fisicoquímicas del jugo (Ver figura 3, anexo C.1).

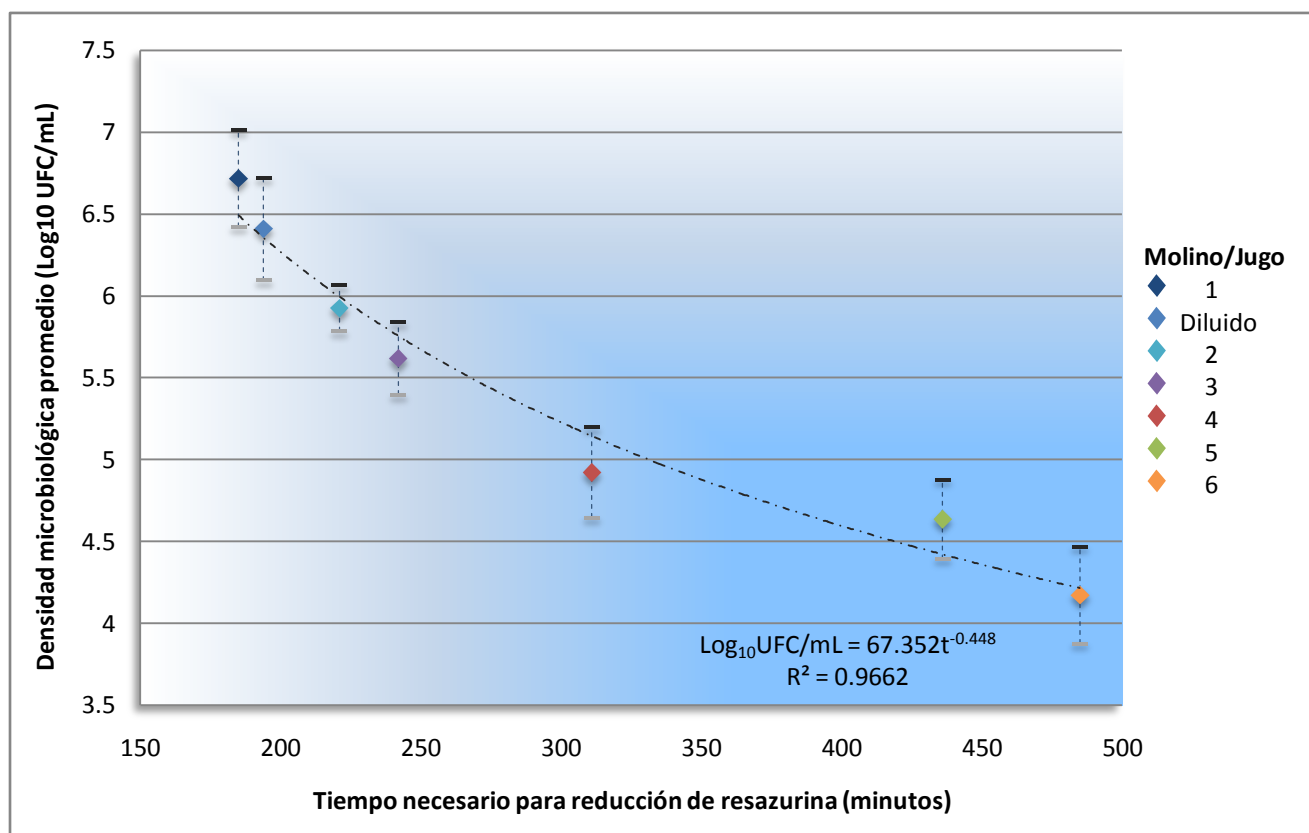
Figura 3. Relación entre la densidad microbiológica promedio y el jugo de caña en distintos puntos del tándem



Para definir una relación entre la reducción de resazurina (ver anexo B.1) y densidades microbiológicas en los puntos del tándem mencionados previamente, se calculó un modelo matemático. Éste presentó como mejor ajuste una tendencia potencial (Ver figura 4).

Por un análisis de varianza se determinó una relación significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95% (Ver anexo C.2).

Figura 4. Relación entre la densidad microbiológica promedio y el tiempo de reducción de la resazurina en distintos jugos del tándem



VIII. DISCUSIÓN

Las características de la agroindustria azucarera, específicamente en la fase de molienda en la producción, dan lugar al desarrollo de una amplia gama de microorganismos. Los cuales provocan una serie de alteraciones a su ambiente, que en algunos casos pueden ser medidas y utilizadas como parámetros para inferir sobre su actividad.

Como punto de partida se buscó establecer una base teórica acerca del comportamiento de los microorganismos en el jugo. Durante la zafra 2006-2007, se caracterizó la microbiota en el jugo de caña primario y diluido, en términos de densidad microbiológica. Inicialmente se analizaron estos dos jugos tomando en cuenta que, el jugo primario representa la entrada hacia el tándem, un punto de inicio, mientras que el jugo diluido representa la salida, un punto final. Por lo tanto a partir de la comparación de estos jugos se puede inferir, aunque sin mucha precisión, acerca del estado de la carga microbiana dentro del tándem. Los recuentos totales de mesófilos aerobios se muestran en el cuadro 3.

La prueba de reducción de resazurina representa un método barato y de fácil aplicación para la estimación indirecta de la concentración microbiana. El método propuesto previamente para el análisis en jugo de caña, consistía del uso de una mezcla en proporción 9:1 de resazurina y jugo, respectivamente (Hernández, 1987). En este caso se propuso una serie de cambios en la metodología, con miras a reducir el tiempo de análisis. Tomando en cuenta las bases teóricas del método, principalmente que el colorante indica el potencial de óxido reducción y es reducido, i.e. se decolora cuando se consume el oxígeno disuelto, se plantearon modificaciones puntuales entre las que se incluyó la eliminación de espacios vacíos en los tubos de análisis, creando un ambiente con menos oxígeno y por lo tanto mayor rapidez de reducción de resazurina. Además, facilitó la visualización de los cambios de color, ya que cuando existe un espacio libre en el tubo se crea una interfase con una coloración distinta, en la parte en la cual la mezcla y el aire están en contacto. A la vez, se propuso la utilización de una proporción 3:1 de resazurina y jugo de caña, respectivamente, esto aumenta el volumen de jugo a utilizar por lo que existe una mayor concentración de microorganismos, y por ende ayuda a disminuir el tiempo de análisis. En este

caso específico se tomó en cuenta que los cambios de coloración fueran visibles fácilmente, ya que si se agrega más jugo de caña la mezcla se torna muy oscura.

Durante la zafra 2007-2008, por medio de comparaciones entre los métodos se encontró que el método modificado ayudó a reducir el tiempo de análisis en un 40.04%. Además, en algunos casos con muestras de jugo del quinto y sexto molino, el método de proporción 9:1 no presentó una decoloración total de la resazurina sino hasta pasadas más de 24 horas, lo cual ya no es aplicable. Esto se pudo deber a que la concentración de microorganismos en esas muestras estaba por debajo del límite de detección de éste método. Por el contrario, con el método propuesto si se logró obtener una decoloración en un tiempo de reducción máximo de ocho horas y media, y concentraciones tan bajas como 10^3 UFC/mL.

En este período se analizó no sólo el jugo primario y diluido, sino también el jugo extraído de cada uno de los otros cinco molinos. Los recuentos totales obtenidos en estos distintos puntos se muestran en el Cuadro 3 y se representan en la Figura 3. Se encontró que la densidad microbiológica en el jugo primario se mantiene en un rango $2.37E+06$ - $7.70E+06$ UFC/mL y en el caso del jugo diluido en un rango $1.40E+06$ - $5.70E+06$ UFC/mL, por poner ejemplos. Los datos obtenidos son concordantes con los recuentos realizados durante la zafra 2006-2007. Como se puede observar en la Figura 3, la disminución de la densidad microbiológica a lo largo del tándem se comporta con una tendencia exponencial. Esto debido a la reducción en la disponibilidad de nutrientes, específicamente sacarosa, además de un aumento en la temperatura del jugo.

Como parte de este análisis se realizaron recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* en el medio Mayeux modificado, donde se encontró una variación entre $7.60E+02$ a $5.8E+05$ UFC/mL dentro del tándem. Estos recuentos se obtuvieron solamente con la finalidad de comparar la tendencia de crecimiento, ya que no es proporcional a un recuento total debido a una falta de estandarización.

En el caso de las pruebas de reducción de resazurina en paralelo al recuento total a lo largo del tándem, se determinó que la relación con el mejor ajuste presentó una tendencia potencial,

indicando que las medidas disminuyen a una razón específica dentro del tándem, mostrado en la Figura 4. En el análisis de regresión se generó la ecuación $y = 67.352x^{-0.448}$ con un $R^2 = 0.9662$, en donde “y” representa la densidad microbiológica (\log_{10}) y “x” el tiempo de reducción de resazurina en minutos. Esto para determinar la actividad a partir del método indirecto, aplicable a todos los jugos de la fase de molienda en la producción. En el análisis de varianza se comprobó que existe una relación significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95% (Ver Anexo C.2).

Con el método propuesto y el modelo matemático generado, la prueba de reducción de resazurina puede ser aplicada para la estimación de la densidad microbiológica, no solo en jugo primario y diluido, sino también en los distintos jugos extraídos dentro del tándem.

Este tipo de análisis puede servir como un complemento al monitoreo general de la fase de molienda, como medición de acidez, porcentaje de dextrana, etc. Con una buena implementación, el método puede llegar a ser una clave para dirigir la desinfección y además, para la determinación de puntos críticos en el tándem. Todo esto representa una herramienta para la mejora del monitoreo y rendimiento en la producción de azúcar.

IX. CONCLUSIONES

- A. Es posible estimar la densidad microbiológica en los distintos tipos de jugo de caña, durante la fase de molienda en la producción de azúcar, por el método de reducción de resazurina.
- B. La densidad microbiológica a lo largo del tándem varía desde $7.70E+06$ UFC/mL en el primer molino a $7.50E+03$ UFC/mL en el sexto molino.
- C. El método establecido para la medición de la reducción de resazurina redujo el tiempo de análisis y representa en general mayor facilidad de aplicación.
- D. Se determinó el modelo matemático $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL} = 67.352t^{-0.448}$ con un $R^2 = 0.9662$ para la estimación de la densidad microbiológica (Log_{10}) por medio del tiempo de reducción de resazurina, aplicable a distintos puntos a lo largo del tándem.
- E. Es factible aplicar el método propuesto como parte del monitoreo en la fase de molienda en el ingenio Santa Ana, o en la industria azucarera en general.

X. RECOMENDACIONES

Como recomendación principal se plantea la implementación del método por las características de ser rápido, barato y fácil.

Este estudio está abierto a que se siga investigando, no solamente sobre métodos indirectos de estimación de densidad microbiológica, sino también a la microbiología de la producción de azúcar en general. El seguimiento de las investigaciones es esencial para ir mejorando las técnicas de análisis y monitoreo.

XI. LITERATURA CITADA

- Adams, M.R. 1997. *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 463pp.
- Aiba, S.; Humprey, A.E. y N.F. Millis. 1970. *Biochemical Engineering*. Edición Ciencia y Técnica. Instituto del Libro. La Habana.
- Anderson, D. R.; D. J. Sweeney y T. H. Williams. 2004. *Estadística para administración y economía*. 8a Edición. Thomson. México. 977 pp.
- Anderson, E. 1956. *Fenómeno de fermentación bacteriana en el proceso azucarero de remolacha*. Zeitz fur Zuckerind. (6): 623-630.
- Arguello, G. 2000. *Términos comunes de la industria panalera en el Estado Trujillo*. FONAIAP. Venezuela. [web en línea] en: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd67/texto/garguello.htm>
- Avirama, Zemanate, D.A y J. F. Grass Ramírez. 2005. *Relación de resultados entre pruebas de resazurina y conteo de células somáticas para la determinación de la calidad higiénica y sanitaria de la leche y los efectos de elevados número de células somáticas en la calidad de la leche procesada*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 3(1): 104-109 pp. [web en línea] en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art314.pdf>
- Bevan, D. y J. Bond. 1971. *Microorganisms in field and mill, a preliminary survey*. Memoria de la sociedad de técnicos azucareros de Queensland, Australia. (4):137-143.
- Bidan, P. 1966. *Emploi de la resazurine pour la detection des infections microbiennes en sucrerie*. Ind. Alim. Agric. (83):915-918.
- CambridgeSoft Corporation. 2008. *ChemBioOffice 2008*. [web en línea] en: <http://scistore.cambridgesoft.com/software/product.cfm?pid=5064>

- Cappuccino, J.G. y N. Sherman. 1996. *Microbiology. A Laboratory Manual*. 4a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Estados Unidos. 544 pp.
- Duncan, C. y A. Colmer. 1964. *Coliforms associated with sugar cane pant and its juices*. *Applied Microbiology*, 12 (2):173-177.
- Egan, B. 1967. *Post-harvest cane deterioration*. *International Sugar Journal*. (82):111-113.
- Egan, B. 1968. *Pérdidas por deterioro en la post escogida de caña de azúcar en general*. 13° congreso ISSCT. 1729-1734 pp.
- Microsoft Corporation. 2007. *Microsoft Office Excel. Analysis Toolpack*.
- Fauconnier, R. y D. Bassereau. 1975. *La caña de azúcar*. Barcelona Blume. España. 433 pp.
- Grupo Corporativo Santa Ana. *Azúcar de Guatemala*. [web en línea] en: <http://www.santaana.com.gt/k.htm>. Obtenido el 20 de febrero de 2008.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*. San Diego Academic Press. Estados Unidos. 532 pp.
- Hernández, M. T. y T. Sainz. 1987. *Microbiología de la industria azucarera*. Ed. Universidad Central de las Villas. 270 pp.
- Hernández, R.; Fernández, C., y P. Baptista. 2003. *Metodología de la investigación*. 3ª Edición. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana. 705 pp.
- Klaushofer, H. 1971. *Microbiology of beet sugar diffusion*. *Process Biochemistry*, Junio pp 39-41.

- MINAZ. 1981. *Manual para el Laboratorio Microbiológico de Azúcar Crudo*. Departamento Control de Calidad. Habana, Cuba.
- Mayeux, J. y A. Colmer. 1960. *Studies on the microflora associated with Saccharum officinarum*. Sugar Journal. Dic. 28-32 pp.
- Mayeux, J. 1961. *Selective medium for Leuconostoc detection*. Department of Botany, Bacteriology and Plant Pathology. Louisiana State University. Louisiana. 1009-1011 pp.
- Merck, 2006. *Microbiology Manual*. Alemania. [web en línea] en: <http://service.merck.de/microbiology/>
- Najodkina, V. 1968. *Dinámica de la multiplicación de microorganismos en varios estadios de la fabricación de azúcar con diferentes fuentes de suministro de agua*. Tr. VNISP. 139-152 pp.
- Núñez Jimenez, O. y M. Maldonado Dominguez. 1987. *Método de la resazurina. Aplicación en la industria azucarera*. CAI Camilo Cienfuegos. La Habana, Cuba. [web en línea] en: <http://www.uh.cu/infogral/areasuh/vri/archivos/CAR/seminario2004/PDF/CALIDAD/MACU.Crudo/Mac4-80.pdf>.
- Pommerville, J. C. 2001. *Alcamo's fundamentals of microbiology*. 7a ed. Jones and Bartlett. Estados Unidos. 1075 pp.
- Proyecto SICA. Banco Mundial. Fecha desconocida. *Proceso de producción de azúcar*. [web en línea] en: http://www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/proceso_produccion.html.
- Tilbury, R.H. y F.K. Imril. 1975. *Polisacáridos en la caña de azúcar y sus productos*. Centro de Investigación de la Tate y Lyle. Editorial Orbe. Gran Bretaña.

Tilbury, R.T. 1969. *The ecology of L. mesenteroides and control of post-harvest biodeterioration of sugar cane in Jamaica*. Procedures West Indian Sugar Tech. Congress. 126-135 pp.

Universidad de Zulia. 2003. *Introducción al control de la calidad de la leche cruda*. Guía práctica. Maracaibo. [web en línea] en:
<http://www.members.tripod.com.ve/tecnología/introducción.html>.

XII. OTRAS REFERENCIAS

- ACD/Labs. 2007. *Version 11 desktop software*. [web en línea] en:
<http://www.acdlabs.com/products/new.html>
- Ayres, J. C., et al. 1980. *Microbiology of foods*. W. H. Freeman. San Francisco. 708 pp.
- Biomass Users Network. 1997. *An overview of sugar cane cogeneration in six Central America countries*. BUB-CA. Costa Rica. 40 pp.
- Candeias, L. P., et al. 1998. *The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. (2): 2333-2334.
- Internacional Society of Sugar Cane Technologists Congress. *Asociación de Técnicos Azucareros de Guatemala*. CENGICANÑA. 2005. Proceedings of the XXV Congress. Hogarth, D. M. (ed.) Guatemala. 3 vols.
- Beerens, H. y F. M. Luquet. 1990. *Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y sus lácteos*. Acribia. Zaragoza. 151 pp.
- Guerin, T. F., et al. 2001. *Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms*. Letters in applied microbiology. (2): 240-245.
- Grupo Corporativo Santa Ana. Fecha desconocida. *Manual de Inducción*. División de recursos humanos. Departamento de capacitación y desarrollo. Guatemala.
- Hewitt, W. 1977. *Microbiological assay*. Academic Press. New York. 284 pp.
- International comission on microbiological specifications for foods. 1999. *Microorganismos de los alimentos*. 2a ed. Zaragoza. 2 vols.

Jay, J. M.; M. J. Loessner y D. A. Goleen. 2005. *Modern food microbiology*. 7a ed. New York Springer. 790 pp.

Muller, G. 1981. *Microbiología de los alimentos vegetales*. Acribia. Zaragoza. 291 pp.

Robinson, R. K. 1987. *Microbiología Lactológica*. Acribia. Zaragoza. 2 vols.

VanDemark, P. J. y B. L. Batzing. 1987. *The microbes: an introduction to their nature and importance*. Benjamin/Cummings. 491 pp.

Vanderzant, C. y D. F. Splittstoesser. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. Washington, D. C. 1219 pp.

Wiseman, A. 1983. *Principles of biotechnology*. Surrey University Press. 217 pp.

XIII. ANEXOS

A. INGENIO SANTA ANA, PRODUCCIÓN AZUCARERA

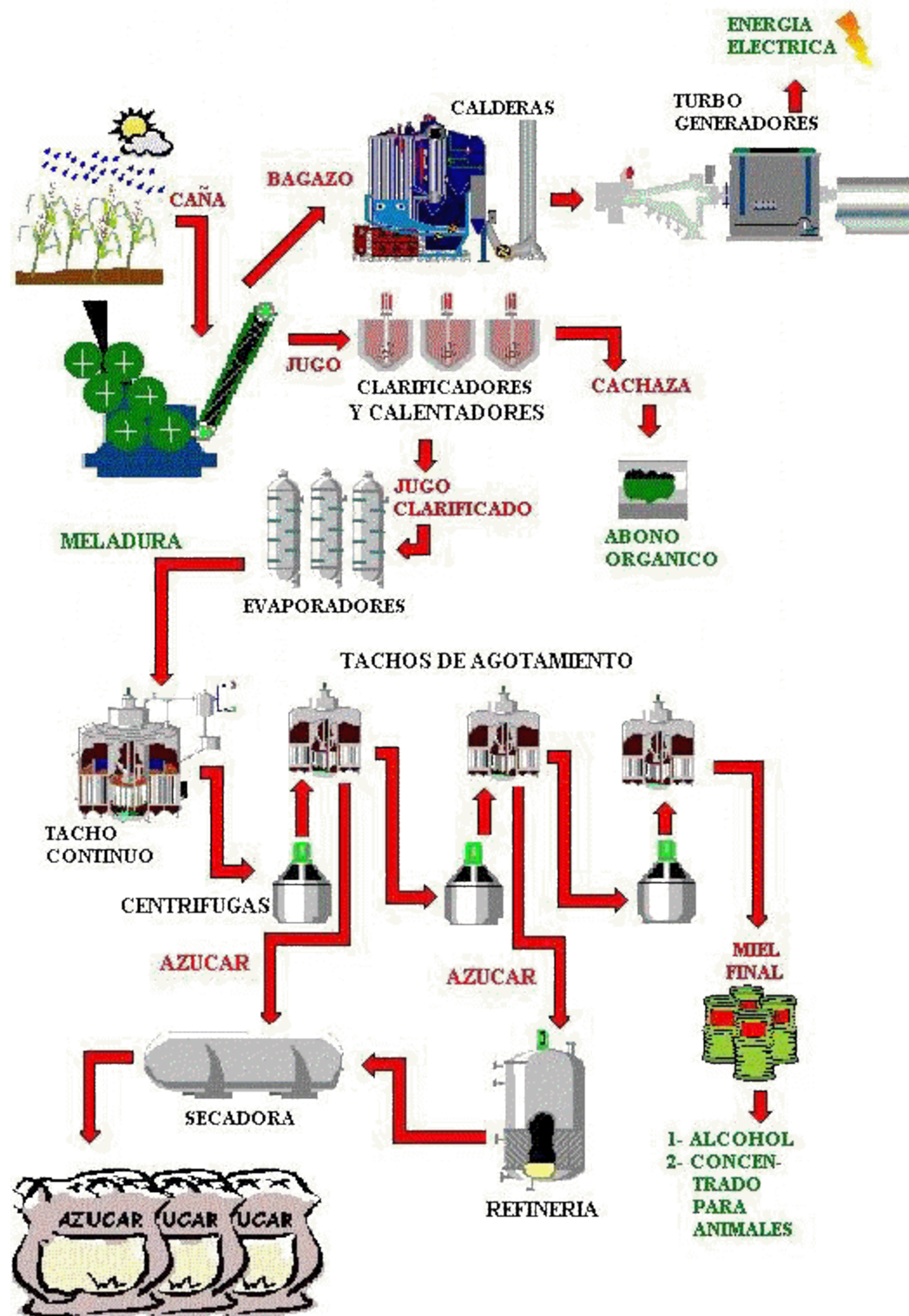
1. Ingenio Santa Ana



2. Tándem A Ingenio Santa Ana



3. Producción de azúcar y derivados



B. PRUEBA DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS

1. Prueba de reducción de resazurina utilizando como muestra jugo de caña, de izquierda a derecha se muestra el inicio hacia el final de la prueba.



2. Comparación de método en proporción 3:1 y 9:1, resazurina y jugo de caña, respectivamente.



Izquierda a derecha: método 3:1 y 9:1



Reducción de resazurina en método 9:1

C. ANÁLISIS DE DATOS

1. Análisis de regresión de concentraciones microbianas en el jugo respecto a ubicación en el tándem.

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.995954
R Square	0.991925
Adjusted R Square	0.99031
Standard Error	0.092874
Observations	7

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	5.297631	5.297631	614.1801253	1.9953E-06
Residual	5	0.043128	0.008626		
Total	6	5.340759			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	7.225005	0.078493	92.0469	2.86886E-09	7.0232330	7.426777
X Variable 1	-0.43497	0.017551	-24.7827	1.99534E-06	-0.480090	-0.38986

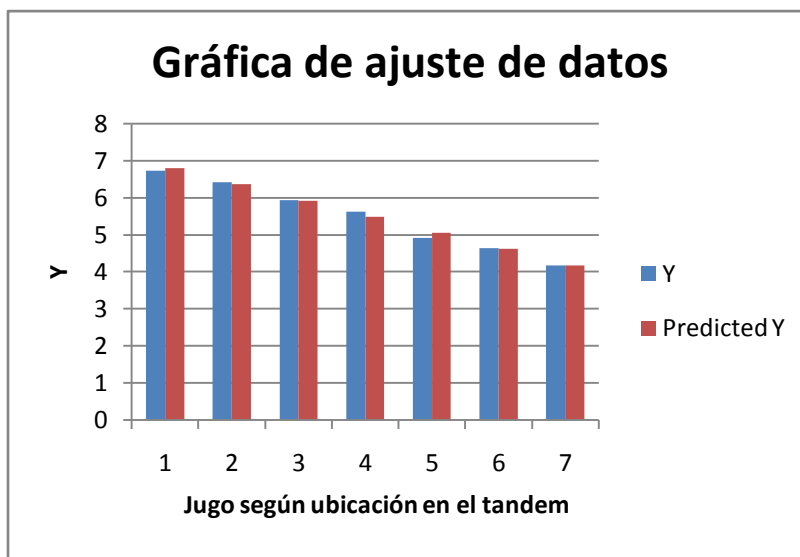
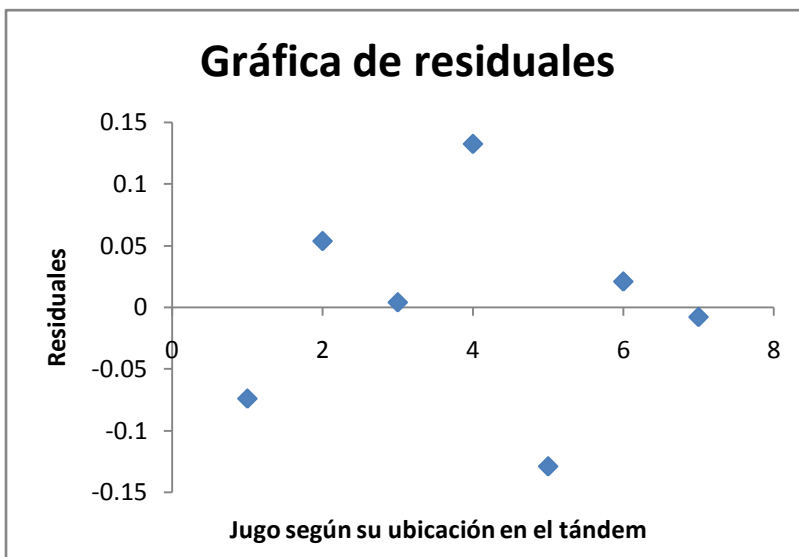
RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	6.8556	-0.08303	-1.1509
2	6.416763	0.070375	0.975444
3	5.977927	-0.03841	-0.53236
4	5.539091	0.117646	1.630648
5	5.100255	-0.0358	-0.49617
6	4.661419	0.018614	0.258006
7	4.222583	-0.0494	-0.68467

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
7.142857	4.173186
21.42857	4.680033
35.71429	5.064458
50	5.656737
64.28571	5.939519
78.57143	6.487138
92.85714	6.772566

El modelo potencial obtenido se aproximó a un modelo lineal utilizando el \log_{10} de los datos, para poder ser analizado por medio del análisis de regresión.



2. Análisis de regresión de densidad microbiológica respecto a tiempos de reducción de resazurina en distintos puntos dentro del tándem.

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.975273
R Square	0.951157
Adjusted R Square	0.941389
Standard Error	0.228411
Observations	7

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	5.079901	5.0799008	97.3691366	0.000182226
Residual	5	0.260858	0.0521716		
Total	6	5.340759			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	18.90959	1.363199	13.87148	3.49789E-05	15.40537328	22.413
X Variable 1	-5.49502	0.556876	-9.86758	0.00018222	-6.926518827	-4.0635

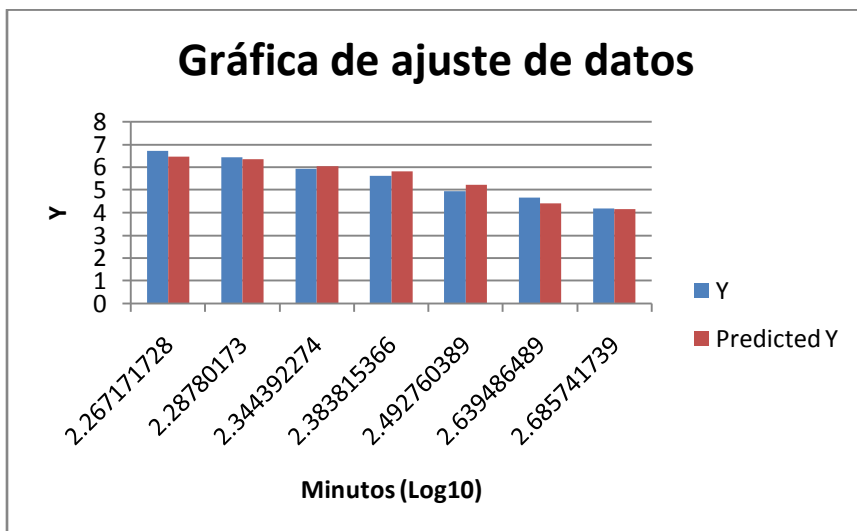
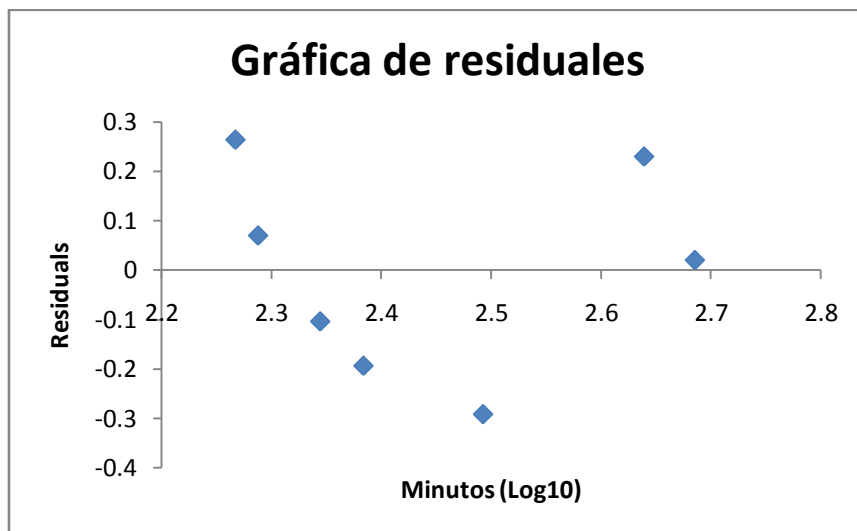
RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	6.451428	0.264482	1.2684384
2	6.338066	0.070696	0.3390533
3	6.0271	-0.10304	-0.494167
4	5.810469	-0.19281	-0.924689
5	5.211813	-0.29077	-1.394518
6	4.40555	0.230504	1.1054841
7	4.151377	0.020934	0.1003983

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
7.142857143	4.172311
21.42857143	4.636054
35.71428571	4.921043
50	5.617662
64.28571429	5.924061
78.57142857	6.408762
92.85714286	6.71591

El modelo potencial obtenido se aproximó a un modelo lineal utilizando el \log_{10} de los datos, para poder ser analizado por medio del análisis de regresión.



XIV. GLOSARIO

Actividad microbiana: Se desarrolla en función de factores intrínsecos y extrínsecos al medio. Es el reflejo de las condiciones físicas y químicas bajo las cuales se desarrollan los procesos metabólicos de los microorganismos y de su acción sobre los sustratos orgánicos.

Agua de imbibición: Es el agua que se utiliza en la operación de imbibición.

Bagazo: Es el residuo fibroso que queda después de la extracción del jugo del último molino.

Cachaza: Es el residuo (torta) que resulta de la filtración y lavado de los lados sedimentados en la clarificación.

Curva de crecimiento: Es aquella que ilustra los eventos que ocurren sobre el curso del tiempo en una población de bacterias. Se divide en las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.

Difusión: Es el procedimiento por el cual se extrae el jugo de caña por lixiviación.

Fase de molienda de la caña (fase inicial de producción de caña): Fase en la que a través de un tándem de molino se extrae el jugo de la caña. En el recorrido de la caña por el molino se agrega agua, generalmente caliente, para extraer al máximo la sacarosa que contiene el material fibroso.

Grado brix: Sistema de medición específico, en el cual el grado brix representa el porcentaje en peso de sacarosa pura, en solución. En la industria azucarera se considera el grado brix, como el porcentaje de sólidos disueltos y en suspensión, en las soluciones impuras de azúcar.

Guarapo: Es el jugo extraído de la caña de azúcar.

Imbibición: Es la operación por medio de la cual se agrega agua, generalmente caliente, al bagazo para diluir el jugo presente en el mismo. En la Imbibición compuesta se retorna el jugo de molinos posteriores a anteriores.

Jugo de última expresión: Jugo extraído por las dos últimas mazas del tándem.

Jugo diluido: Es aquel que se extrae de la molienda y se pesa en básculas con celdas de carga para saber la cantidad de jugo sacaroso que entra en la fábrica.

Jugo primario: Es el jugo extraído antes de empezar la dilución. En la mayoría de los tandems, este es el jugo de la desmenuzadora combinado con el del primer molino (En el caso en que se hace Imbibición en el primer molino, es solamente el jugo de la desmenuzadora).

Jugo residual: Es el jugo retenido en el bagazo.

Medición de densidad microbiológica: Se lleva a cabo midiendo la densidad del cultivo y se utiliza especialmente para hacer seguimiento del incremento de la masa microbiológica en el tiempo.

Método de placa vertida (pour-plate method): Método utilizado para el conteo de bacterias en el que un medio sólido fundido y enfriado a 45°C se vierte dentro de cajas petri que contienen una cantidad definida de muestra. El resultado se expresa en unidades formadoras de colonia (UFC/mL).

Microbiota: Conjunto de microorganismos que interactúan entre sí en un determinado medio.

Pol: Sacarosa aparente determinada por análisis químico a una solución de azúcar.

Pureza aparente: Contenido de pol entre el % de sólidos aparentes (brix) solubles, en peso, en una solución azucarada.

Resazurina: Indicador de óxido-reducción, utilizado para determinar el grado de contaminación, así como la actividad microbiológica en jugos de caña de azúcar.

Tándem: Conjunto de varios molinos o trapiches. La industria azucarera tiene tándem hasta de siete molinos.

Unidad formadora de colonia (UFC): Término que se emplea para expresar el contenido de bacterias viables, asumiendo que una bacteria da origen a una colonia.