

**DETERMINACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE SACAROSA POR ACCIÓN DE
Leuconostoc spp PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE CONTROLES QUE
FAVOREZCAN SU DISMINUCIÓN EN UN INGENIO AZUCARERO**

LEIDY JOHANNA SANCHEZ TIJO



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2019**

**DETERMINACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE SACAROSA POR ACCIÓN DE
Leuconostoc spp PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE CONTROLES QUE
FAVOREZCAN SU DISMINUCIÓN EN UN INGENIO AZUCARERO**

LEIDY JOHANNA SANCHEZ TIJO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial**

Director:

EDUARDO JAVID CORPAS IGUARAN Ph.D.

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES**

2019

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 22 Abril de 2019

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, a mis padres que fueron parte fundamental en mi formación como persona, a mi madre por todo el amor y apoyo brindado, a mi padre que está en el cielo y que desde allí sentí su protección y su acompañamiento, a mi hermana que siempre estuvo apoyándome desde la distancia, a mi esposo y mi hija por tener tanta comprensión y por brindarme siempre su amor incondicional y paciencia.

Leidy Johanna Sánchez Tijo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía en cada etapa de mi vida, a mi familia por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A los profesores que colaboraron en mi proceso de formación. Gracias por su dedicación y conocimientos.

A la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES por permitirme escalar un peldaño más en mi vida y complementarme como profesional.

A ingenio SanCarlos, por el patrocinio y permitir utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

A Paula Andrea Tascón por su motivación, confianza y conocimientos aplicados para el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCION	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENTE TEÓRICO.....	13
3.1 ANTECEDENTES.....	13
3.2 MARCO CONCEPTUAL.....	16
3.3 MARCO TEÓRICO	18
3.3.1 Caña de azúcar	18
3.3.2 Impurezas	20
3.3.3 Efecto de la tardanza entre cosecha y molienda	21
3.3.4 Evaluación de calidad de caña	24
3.3.5 Efecto en azúcar recuperable	24
3.3.6 Suelo del campo y suciedad	25
3.3.7 Dextranas	25
3.3.8 Efecto en costos de fabricación	26
3.3.9 Pérdidas de sacarosa a lo largo del molino	27
4 MATERIALES Y METODOS	32
4.1 TIPO DE ESTUDIO	32
4.2 UBICACIÓN	33
4.3 REACTIVOS UTILIZADOS.....	33
4.4 POBLACIÓN	34
4.4.1 Análisis en la etapa de molienda	37
4.4.2 Toma de muestra en el jugo de primera extracción	37
4.4.3 Toma de muestra del jugo diluido	38
4.4.4 Toma de muestra del jugo clarificado.....	39
4.4.5 Toma de muestra de jugo filtrado	40
4.4.6 Meladuras	42
4.4.7 Miel primera.....	43
4.5 UNIDAD DE MUESTRA	46

4.6	PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA	46
4.6.1	Variables del estudio.....	46
4.7	TÉCNICA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	47
4.7.1	Recuento de <i>Leuconostoc spp</i>	47
4.8	TÉCNICAS DE ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS	48
4.8.1	Determinación de ácido láctico por Reflectometría	48
4.8.2	pH	48
4.8.3	Porcentaje de Pureza.....	49
4.8.4	Determinación de azúcares reductores mediante el método de Eynon y Lane. 50	
4.8.5	Determinación de dextranas.....	50
4.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	51
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	52
5.2	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO.	56
5.2.1	Temperatura y pH	56
5.2.2	Recuento de <i>Leuconostoc spp</i> y su correlación con las características fisicoquímicas de los jugos en las etapas de muestreo	57
5.3	CONTROLES PARA DISMINUIR LAS PÉRDIDAS DE SACAROSA DURANTE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCAR DE CAÑA EN EL INGENIO.....	67
6	CONCLUSIONES	70
7	RECOMENDACIONES	72
8	BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Productos de la degradación de Sacarosa en caña de azúcar, determinados al investigar la tardanza entre quema ó corte y molienda.....	23
Tabla 2. Reactivos utilizados en el proceso de investigación.....	33
Tabla 3. Materiales a evaluar en la investigación.	36
Tabla 4. Variables fisicoquímicas del estudio.	47
Tabla 5. Promedios de pH en cada etapa de muestreo.	57
Tabla 6. Correlaciones entre los análisis microbiológicos y las características fisicoquímicas de los jugos en cada etapa de muestreo.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de sacarosa a partir de glucosa y fructosa.....	19
Figura 2. Tallo de caña de azúcar.	21
Figura 3. Metabolismo de <i>Leuconostoc</i>	30
Figura 4. Proceso productivo de obtención de azúcar.....	35
Figura 5. Etapa de molienda producción de azúcar.....	37
Figura 6. Muestras, etapa de molienda (Jugo de primera extracción, Jugo diluido).	38
Figura 7. Etapa de clarificación proceso de producción de azúcar.	39
Figura 8. Muestra etapa de clarificación (Jugo clarificado).	40
Figura 9. Etapa de filtración producción de azúcar.	41
Figura 10. Muestra etapa de filtración (Jugo filtrado).....	41
Figura 11. Etapa de evaporación, producción de azúcar.	42
Figura 12. Muestra etapa de evaporación (Meladura clarificada).	43
Figura 13. Etapa de cristalización y centrifugación.	44
Figura 14. Muestra etapa de cristalización y centrifugación (Miel primera).	45
Figura 15. Método de recuento en placa, <i>Leuconostoc spp</i>	48
Figura 16. Promedio de recuento <i>Leuconostoc spp</i> por etapa de producción de azúcar en el ingenio azucarero.	53
Figura 17. Promedio de ácido láctico por etapa de producción de azúcar en el ingenio azucarero.	54
Figura 18. Promedio de ácido láctico ppm/bx y pureza por etapa de producción. .	60
Figura 19. Promedio de ácido láctico ppm/bx y pH por etapa de producción.....	61
Figura 20. Promedio de Recuento de <i>Leuconostoc spp</i> y °brix por etapa de producción.	63
Figura 21. Promedio de azúcares reductores por etapa de producción.	64
Figura 22. Promedio de recuento de <i>Leuconostoc spp</i> y pH por etapa de producción.	65
Figura 23. Promedio de recuento de <i>Leuconostoc spp</i> y dextranas por etapa de producción.	66

1 INTRODUCCION

Los niveles de Sacarosa de la caña de azúcar dependen de diversas variables y no solamente de los procesos de extracción de la sacarosa en los ingenios. Algunas de estas variables están relacionadas con aspectos que van más allá de la fábrica e intervienen aspectos como las condiciones de cultivo y crecimiento de las plantas de caña, el clima, nutrientes del suelo, la cantidad de agua sea por riego mecánico o precipitaciones, la variedad de caña sembrada, y la presencia de plagas y enfermedades. Por tanto, ante mejor calidad y condición de la caña, mejor será el rendimiento en la producción de azúcar como producto final.

La pérdida de Sacarosa en los ingenios, se cuantifica mediante recuentos que miden la Sacarosa presente en la caña de azúcar al ingresar en la fábrica, la contenida en los jugos obtenidos en la etapa de molienda y la Sacarosa en pérdidas por las aguas de procesamiento y en el bagazo de caña. La Sacarosa no detectada mediante el recuento se registra como pérdidas no determinadas asociadas normalmente a la actividad microbiológica principalmente por los *Leuconostoc spp* y a características fisicoquímicas durante el proceso de producción del azúcar que favorecen la descomposición de la Sacarosa en sus azúcares reductores.

Por tanto, el objetivo de la investigación fue la determinación de las pérdidas de Sacarosa por acción de *Leuconostoc spp* para la implementación de controles que favorezcan su disminución en un ingenio azucarero. Identificando las etapas del proceso de producción donde mayormente surge la contaminación, a través de diferentes análisis de propiedades fisicoquímicas y su relación con variables microbiológicas como la carga de *Leuconostoc spp*, identificado mediante tinción de Gram y de ácido láctico como uno de los efectos secundarios de estos microorganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las pérdidas de Sacarosa por acción de *Leuconostoc spp*, para la implementación de controles que favorezcan su disminución en un ingenio azucarero

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la relación entre el recuento de *Leuconostoc spp*, y la concentración de ácido láctico durante el proceso de elaboración de azúcar de caña.
2. Determinar el comportamiento de las variables fisicoquímicas como °brix, sacarosa, pureza, pH, dextranas, azúcares reductores y su correlación con los resultados obtenidos de las variables microbiológicas.
3. Definir los controles requeridos en las etapas evaluadas para favorecer la disminución de las pérdidas de sacarosa durante la producción de azúcar de caña.

3 REFERENTE TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES

El proceso productivo de la caña de azúcar para la extracción de la Sacarosa o como comúnmente se conoce: “el azúcar”, no empieza desde su transformación y procesos químicos sino realmente en el campo, interviniendo diferentes variables como la variedad de la caña, las condiciones del suelo en donde se cultiva, su grado de madurez y las prácticas de manejo de la materia prima.

Los ingenios y los cultivadores del sector azucarero obtienen mayores beneficios al tratar con una caña de óptima calidad, esto proporciona mejores rendimientos productivos de obtención de Sacarosa y bajos niveles de impurezas. La calidad de la caña se reconoce en el momento de la etapa de molienda por la cantidad de Sacarosa recuperable o en su relación de ganancia por tonelada de caña molida (Larrahondo, 1995). Lo cual depende de características como:

1. Alto grado de Sacarosa recuperable
2. Bajos niveles de materiales extraños
3. Bajos niveles de sólidos solubles considerados como impurezas
4. Bajos contenidos de fibra.

Este aspecto es sumamente importante, no solamente porque al hablar de calidad se obtiene un producto con gran pureza, sino porque esto también representa una disminución de pérdidas para los ingenios azucareros. En cuanto se obtengan menos residuos y pérdidas, mayor será el aprovechamiento de los recursos de materia prima, disminuyendo los tiempos y costos de producción.

Debido a lo anterior, es importante el seguimiento constante de la materia prima y de los jugos de caña hasta la obtención de la Sacarosa, para prevenir y/o

disminuir su contaminación, de manera que no se afecte la calidad del producto final.

Las pérdidas en la producción de azúcar se ponderan mediante recuentos de Sacarosa creando una relación entre su contenido en caña como materia prima, su concentración en los jugos procesados, la que se queda en el bagazo posterior al proceso de extracción y en las aguas de procesamiento químico. Otra fuente posible de pérdida de Sacarosa, se asocia a la actividad microbiológica y a características fisicoquímicas del proceso productivo como los cambios de temperatura y pH (Serrano, 2006).

Ante esta situación, se han analizado diferentes investigaciones que abordan esta problemática, con el fin de crear un marco de antecedentes que guie esta investigación.

Uno de los trabajos a los que se hace referencia, es el estudio del impacto de las concentraciones salinas en la abstención de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en el proceso productivo de un ingenio azucarero del Valle del Cauca. En este artículo, se menciona que el proceso de obtención de Sacarosa es impactado por diferentes microorganismos; entre estos, la bacteria ácido-láctica *L. mesenteroides* se reseña como una de las principales fuentes de pérdidas de Sacarosa a causa de la fermentación que esta sufre al descomponerse en sus azúcares reductores formando sustancias como dextranas, ácido láctico y etanol; generando una disminución de la concentración de azúcar recuperable en el proceso de cristalización y producto final. Adicionalmente, la investigación pretendió mostrar algunas formas de controlar la actividad microbiana ocasionada por la *Leuconostoc mesenteroides* mediante el empleo de diferentes concentraciones de sales químicas, estando entre ellas $CaCl_2$, $NaClO$, $EDTA$, $NaNO_2$, Na_2SO_3 y $(NH_4)_3PO_4$ en el sustrato de crecimiento bacteriano;

permitiendo la identificación de diferentes formas de atacar a la bacteria que pueden ser implementadas en la industria, siendo muy relevante su empleo por su bajo costo y simplicidad (Angel et al., 2009).

Considerando el fin primario de los ingenios azucareros, que es disminuir al máximo las pérdidas de Sacarosa, se puede determinar que el control de la actividad microbiológica es una práctica común y necesaria, requiriendo el suministro de biocidas o realizando controles de asepsia en los puntos críticos de contaminación microbiana.

Por tanto, para alcanzar un control de la actividad microbiológica en un ingenio azucarero es necesario realizar un proceso investigativo y de estudio que permita la clasificación y cuantificación de los microorganismos presentes en los jugos de caña para establecer qué tipos se encuentran en las diferentes etapas de producción, como el género *Leuconostoc* y reconocer que puntos son críticos de contaminación en las etapas de producción. Contribuyendo a que los procesos de limpieza y asepsia que se realicen en el ingenio sean más efectivos contra estos microbiológicos, facilitando el control en las pérdidas de Sacarosa por actividad microbiana mejorando la calidad de los jugos.

Un referente de este proceso investigativo, de reconocer las etapas de mayor contaminación en la obtención de Sacarosa, fue llevado a cabo en el ingenio Manuelita S.A. Su objetivo se fundamentaba en evaluar las diferentes poblaciones de microorganismos de los jugos de caña en los diferentes puntos del proceso de producción con principal énfasis en los molinos, para determinar medidas de control que permitieran disminuir las pérdidas de Sacarosa por la actividad microbiológica. Consecuentemente, se realizó una clasificación y cuantificación de los microorganismos presentes en los jugos, mediante tinción de Gram a partir de muestras DAC en diferentes puntos del proceso productivo para determinar el comportamiento microbiológico facilitando la identificación de focos de

contaminación, partiendo de las poblaciones con que ingresa la caña al ingenio en el punto de molienda, hasta la obtención el jugo diluido; realizando una correlacionaron y recuento con las características fisicoquímicas de los jugos. El estudio determinó que, después de ingresar al ingenio, las poblaciones de microorganismos aumentaron enormemente en el jugo de primera extracción, siendo éste el punto y foco de contaminación más crítico del proceso de producción, los niveles microbiológicos se mantuvieron relativamente constantes en el resto de puntos de muestreo. Posteriormente, el ingenio valoró la efectividad de 3 biocidas: Lipesa 106C®, Busan 881® y Nalco 5581®; en diferentes concentraciones, y tiempos de contacto (Serrano, 2006).

De todo lo anterior, se determinaron diferentes vías de acción ante las especies del género *Leuconostoc*, entre ellas, el empleo de biocidas, mejores prácticas de limpieza en las fases de transformación y emplear los residuos de este proceso de fermentación en subproductos que pueden ser comercializados. Producto de todas estas investigaciones, surgen diversos conceptos que se deben tener claros para abordar la determinación de pérdidas de Sacarosa por acción de *Leuconostoc spp* en un ingenio azucarero.

3.2 MARCO CONCEPTUAL

Azúcares reductores: Los azúcares reductores, glucosa y fructosa son el resultado interludio de la descomposición química de la Sacarosa y son la característica fisicoquímica más empleada para la determinación de pérdidas de Sacarosa en los jugos e identificación de impurezas; permitiendo la identificación de gran variedad de microorganismos causantes de otros efectos metabólicos como ácidos orgánicos, etanol y CO_2 . Sin embargo, algunos autores sugieren el estudio de otras características fisicoquímicas como el ácido láctico, empleado como indicador más preciso de pérdidas por acción microbiana (Serrano, 2006).

°Brix: Es el porcentaje que mide la cantidad de sólidos solubles presentes en una solución pura de Sacarosa. El °Brix representa los sólidos presentes en una solución con alto contenido de Sacarosa cuando se comprueba por el hidrómetro °Brix (Alvarez, 2012).

Dextrano: El *dextrano* es un polímero formado por una cadena lineal de moléculas de glucosa de alto peso molecular con enlaces *glucosídicos* $\alpha(1\rightarrow6)$ y con algunas ramificaciones $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$. Son producto del proceso metabólico de bacterias ácido lácticas como las *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. y *Streptococcus* sp., siendo las *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum* las más conocidas; sus condiciones ideales de supervivencia se encuentran en una temperatura entre 20°C y 40°C, un pH ácido entre 5 y 6, y concentración de Sacarosa como alimento entre 10% y 15%. Condiciones encontradas fácilmente en la caña de azúcar, si esta sufre cualquier fisura en la superficie externa, la invaden y se reproducen rápidamente consumiendo la Sacarosa formando compuestos espesantes o gelificantes (Sánchez, 2005).

pH: El potencial de hidrogeniones o pH, es un parámetro y característica fisicoquímica que permite expresar la acidez o la alcalinidad de un líquido, como el exponente positivo de la concentración de los iones de hidrógeno presentes. El pH puede presentar tres estados al tomar valores entre 0 y 14, un pH de 7 es neutro, entre 0 y 7 indica acidez y entre 7 y 14 se le denomina básico (Blanco y Carbajal, 2013).

Pureza: La pureza en un producto de gran contenido en Sacarosa se obtiene a través del porcentaje de pureza en términos de la materia sólida o POL y los sólidos solubles como °Brix, permitiendo establecer el nivel de la pureza del jugo en términos de Sacarosa. (Alvarez, 2012).

Sacarosa: La Sacarosa es el azúcar de uso doméstico e industrial, siendo un disacárido, un hidrato de carbono que se forma a partir de la unión de dos

azúcares monosacáridos, formado por fructuosa y glucosa. Su obtención, es producto del procesamiento de la planta de la caña de azúcar al extraer sus jugos, los cuales se acumulan en las vacuolas de la célula, siendo más abundante en las zonas maduras de la planta como lo es el tallo, por ende menos abundante en las zonas nuevas que se encuentran en crecimiento como son la parte superior del tallo y las hojas enrolladas (Herrera, 2011).

De acuerdo con los conceptos relacionados en este marco, se puede analizar un conjunto de teorías que respalden y fundamenten la importancia de estos.

3.3 MARCO TEÓRICO

3.3.1 Caña de azúcar

Tomando como referencia el libro ingeniería de la caña de azúcar, la caña de azúcar es una planta herbácea que alcanza un gran tamaño en su etapa máxima de maduración y es cultivada en países tropicales y subtropicales. Esta planta es resultado de un proceso complejo de hibridación de varias especies, en las que destaca principalmente la *Saccharum Officinarum* y otras especies de *Saccharum*. La caña no se reproduce por semillas, sino que se realiza al sembrar trozos de sus tallos en el campo de cultivo, creciendo a partir de los cogollos de los nudos del tallo, lo que asegura una cosecha con características uniformes. Este tipo de reproducción de la caña permite que se desarrollen continuamente nuevos tipos al unir los mejores especímenes, constituyendo un factor clave para el mejoramiento de la productividad en el procesamiento de la caña de azúcar y la industria (Peter, 2012).

Este tipo de reproducción de la caña posee la ventaja de que no se requiere un nuevo proceso de siembra luego de cada cosecha, sino que se corta la caña dejando la base aun en la tierra y se deja crecer de nuevo para producir una

siguiente cosecha con iguales características, este tipo de cosecha se denominada rebrote o soca y puede realizarse varias veces hasta que es necesario arar y sembrar los fragmentos de tallo de caña nuevamente, a esta etapa se le conoce como renovación. (Peter, 2012).

El principal objetivo del procesamiento de la caña de azúcar es la extracción de la Sacarosa en forma de cristalización.

La Sacarosa se forma en la planta a través de la combinación de dos azúcares monosacáridos, fructosa y glucosa mas una molecula de agua en un proceso complejo (Peter, 2012) . Como se ilustra en la Figura 1.

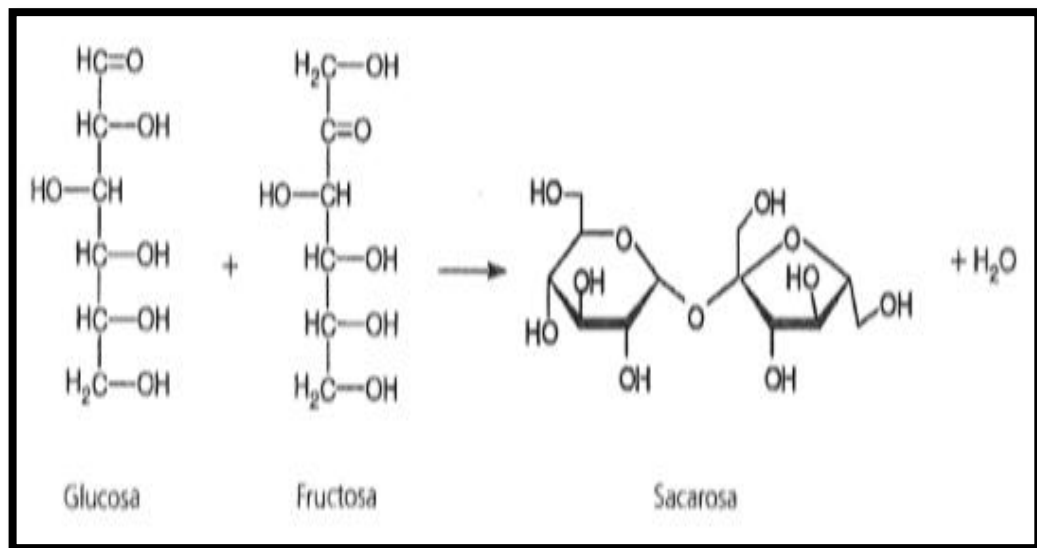


Figura 1. Formación de sacarosa a partir de glucosa y fructosa.

Fuente: (Peter, 2012)

Con base en la figura anterior, se puede situar que la sacarosa posee formula $C_{12}H_{22}O_{11}$ y se distingue como un disacárido por conformarse a partir de dos unidades monosacáridas glucosa y fructosa. Los azúcares monosacáridos son azúcares de seis carbonos que comparten la misma composición química $C_6H_{12}O_6$

producto del proceso de fotosíntesis. Estos azúcares son llamados monosacáridos dado que no pueden ser descompuestos por hidrolización en moléculas más pequeñas de carbohidratos por acción de enzimas o ácidos (Peter, 2012).

La reacción opuesta se denomina inversión y ocurre bajo condiciones específicas, donde la sacarosa junto a una molécula de agua se hidroliza y resulta la formación de los dos azúcares reductores, dando lugar a lo que se conoce como el jugo. Para la rigidez estructural del tallo de caña, además del jugo esta contiene aproximadamente 13 g de fibra vegetal (Peter, 2012).

Estos compuestos monosacáridos se constituyen como una impureza en el proceso de extracción de la sacarosa, las cuales se describen a continuación.

3.3.2 Impurezas

Los monosacáridos o azúcares reductores son las impurezas más abundantes en la caña. Debido a que estos son elementos básicos para el crecimiento y la formación de la sacarosa, un elevado contenido de azúcares reductores se encuentra en la sección superior e inmadura del tallo de caña. El contenido de azúcares reductores es más bajo en los nudos, los cuales son regiones inactivas (Peter, 2012).

Las impurezas inorgánicas constituyen aproximadamente 0,6% al 0,8% en tallos de caña frescos. El contenido inorgánico en la caña es más elevado en las hojas y los cogollos. (Peter, 2012). En la Figura 2, se presenta un corte de tallo de caña de azúcar, mostrando sus partes.

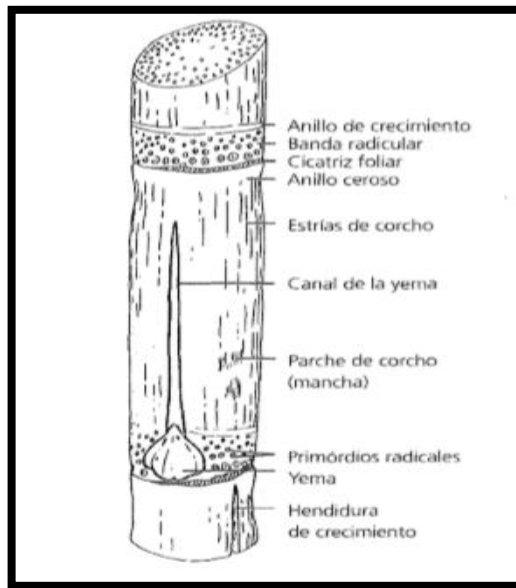


Figura 2. Tallo de caña de azúcar.

Fuente: (Peter, 2012)

3.3.3 Efecto de la tardanza entre cosecha y molienda

Luego del corte, la caña de azúcar está sujeta a un deterioro, esto debido a que existe una vía abierta para la entrada de microorganismos, esto deriva en pérdidas de sacarosa y la formación de impurezas. Por tanto, el tiempo entre cosecha y molienda debe mantenerse al mínimo (Solomon, 2009).

La velocidad de deterioro es más rápida en caña quemada que en caña verde, esto debido a que el calor del fuego agrieta la corteza y la cera protectora del tallo y expone parte del jugo. En caña sin quemar, el deterioro comienza en el momento del corte (Rein, 2013).

Los microorganismos del suelo o el aire infectan el jugo expuesto. De acuerdo con el organismo que predomine, los productos de la actividad microbiológica pueden

ser uno o más de los siguientes: dextranas, etanol, oligosacáridos y ácidos orgánicos. Todos los microorganismos usan azúcar como alimento. (Peter, 2012)

Las condiciones a las cuales la caña se encuentra expuesta determinan en gran medida si el producto residual del deterioro serán dextranas ó etanol. Las dextranas generalmente son formadas por la bacteria ***Leuconostoc spp*** que requiere condiciones anaerobias húmedas. Se ha demostrado que la formación de dextranas es considerablemente reducida bajo condiciones secas. La producción de etanol causada por levaduras no requiere humedad. La velocidad con la cual estos organismos metabolizan a la sacarosa también depende en gran medida de la temperatura y su actividad se reduce considerablemente en clima frío (Peter, 2012).

Las bacterias del ácido láctico, también conocidas como LAB, son uno de los grupos más importantes para causar daños a los procesos de fermentación. Estas bacterias fermentan los carbohidratos a ácido láctico, reduciendo el rendimiento de etanol y, a medida que aumenta el ácido, inhiben la fermentación de las levaduras. Las cepas de LAB se agrupan según su patrón de fermentación y algunas son capaces de producir ácidos y otros productos además del ácido láctico. Las cepas que producen solo ácido láctico son generalmente consideradas como cepas homofermentativas y las cepas que producen tanto ácido láctico como ácido acético junto con cantidades considerables de etanol, glicerol y dióxido de carbono se conocen como heterofermentativas. Las especies de LAB predominantes pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, ***Leuconostoc*** y *Weisella* (Arunachalam et al., 2011).

En la Tabla 1, se muestra una lista con los diferentes productos de deterioro que se pueden presentar por la contaminación de la caña después de su corte o quema.

Tabla 1. Productos de la degradación de Sacarosa en caña de azúcar, determinados al investigar la tardanza entre quema ó corte y molienda.

PRODUCTO DE DETERIORAMIENTO	COMENTARIO
Ácidos orgánicos	Ácidos fórmico, acético y láctico, productos de actividad de microorganismo
Acidez	Correlaciona con caída de pH
Dextranas	Fermentación anaerobia por <i>Leuconostoc</i> en condiciones húmedas. Efecto severo en procesamiento.
Etanol	Puede ser buen indicador para caña quemada, dado que el valor en caña sana es cero. No útil para caña sin quemar. Producto de fermentación de levadura.
Polisacáridos	Incluye dextranas.
Oligosacáridos	Microbianos, enzimáticos y químicos. Las cantidades varían para diferentes variedades, por lo cual no es un buen indicador absoluto.
Azúcares invertidos	Inversión de sacarosa, enzimas y ácidos. El aumento de glucosa < fructuosa, debido a que la glucosa es usada preferencialmente por microorganismos.
Manitol	Asociado con formación de dextranas.

Fuente: Desarrollado por el autor, tomando como referencia (Peter, 2012)

3.3.4 Evaluación de calidad de caña

La evaluación de la calidad de caña se fundamenta en el análisis total en términos de POL, RDS o °Brix y fibra. Este último, indica la cantidad de azúcar presente en la caña suministrada a la fábrica, aunque no señala cuanto de este azúcar puede llegar a ser recuperado. Para estimar la recuperación de azúcar se requiere medir el contenido, la cantidad y clasificación de las impurezas en la caña (Peter, 2012).

Debido al efecto adverso de hojas y cogollos en la calidad de caña y la calidad del jugo extraído, generando resultados como aumento de la coloración y pérdida de Sacarosa en algunos casos se mide la cantidad de hojas, cogollos y la cantidad de materia extraña, particularmente de suelo.

3.3.5 Efecto en azúcar recuperable

Una caña fresca y limpia es la materia prima ideal para la obtención de sacarosa, esto facilita la extracción de la misma y proporciona jugo de alta pureza para el proceso. Reduciendo pérdidas por destrucción de sacarosa. Por tanto, la calidad de caña que ingresa a la fábrica, influye sobre la cantidad de azúcar que se extrae con el jugo y sobre la calidad o pureza de esta.

La cantidad de impurezas determina directamente la cantidad de Sacarosa perdida en miel. Por lo general una caña limpia y fresca que ha sido analizada directamente en el campo, posee una pureza mayor o igual a 90%. Después del corte de la caña y es suministrada al ingenio al proceso productivo, esta trae consigo adheridas hojas y cogollos y ha experimentado un deterioro entre cosecha y la molienda, esta situación afecta la pureza del jugo de la caña en una reducción del 5%, donde en realidad constituye un aumento de no-sacarosas del 50%, dado que su cantidad (100-pureza) se extiende de 10 a 15 unidades (Peter, 2012).

3.3.6 Suelo del campo y suciedad

El suelo en caña representa una variable de pérdida de sacarosa difícil de medir, conllevando a que muchas industrias azucareras, encuentren en este aspecto una respuesta a los incrementos en los costos de su producción (Singh et al., 2015).

Los sólidos no solubles en la caña se puntualizan como fibra, de manera que la suciedad del suelo en el campo es considerado para estudios analíticos como fibra. Para obtener una medida confiable del suelo en la caña, se debe emplear el análisis de cenizas, usando un horno apropiado (como una mufla diseñada para efectuar calcinaciones en recipientes cerámicos) para remover por combustión todo el material orgánico de las muestras de caña preparada (Peter, 2012).

3.3.7 Dextranas

Los componentes no-sacarosas pueden considerarse como una pérdida de pureza y calidad del proceso de obtención del azúcar o sacarosa, dentro de estos componentes, hay uno que debe ser considerado en detalle, dado que no sólo afecta la pérdida en mieles sino también el procesamiento del jugo de caña, que principalmente contiene dextranas.

Peter (2012), manifiesta que las dextranas, “no son un producto natural de la caña, sino una consecuencia de la acción microbiana en caña debido a grandes tardanzas (en particular con la cosecha mecánica) o en el mismo tándem de molinos. Las dextranas sólo constituyen un problema cuando su contenido en el jugo se eleva por encima de aproximadamente 2000 mg/kg DS”.

Esto generalmente es el resultado de largos períodos de clima desfavorable. Elevados niveles de dextranas incrementan la viscosidad de las masas cocidas hasta el punto que, en casos severos el azúcar prácticamente no se puede recuperar, mientras que en los menos severos, las dextranas reducen significativamente la velocidad de los cocimientos en tachos e incrementan la pérdida de azúcar en miel final. Adicionalmente, las dextranas en azúcar crudo son generalmente penalizadas por las refinerías. Además, debido a la actividad microbiológica, existe una producción de ácido láctico y ácido acético a partir de la Sacarosa que disminuye considerablemente el pH. Para neutralizar el aumento de la acidez, se requieren altas cantidades de cal, lo que provoca una mayor pérdida de sacarosa y el bloqueo durante la filtración. La cal con ayuda de las altas temperaturas del proceso de fabricación reacciona con las impurezas y los fosfatos propios del jugo de caña formando coágulos que retienen Sacarosa e impurezas; estos coágulos serán eliminados del jugo en la etapa de filtración generando en ciertos casos bloqueos o taponamientos por su gran cantidad y tamaño (Purushe et al., 2012).

3.3.8 Efecto en costos de fabricación

Los costos de procesamiento para la producción del azúcar son determinados por la cantidad de caña ingresada a transformación que por lo general se mide en toneladas. Aspectos como, la necesidad de tratar jugos de elevado color y posiblemente con mayor contenido de almidón, también acrecentará los costos.

Si una fábrica tiene que procesar más caña para obtener la misma cantidad de sacarosa requerida, esto se puede deber a la presencia de contenido en materia extraña, generando evidentemente sobrecostos.

Por tanto, las ventajas de reducir la suciedad de la caña, contar con caña fresca de menor contenido de impurezas son colosales; una caña sucia presenta mayor contenido de suelo que incrementa el mantenimiento de los equipos, acarrea a un mayor consumo de combustibles suplementarios y reduce la capacidad de las calderas.

3.3.9 Pérdidas de sacarosa a lo largo del molino

3.3.9.1 Pérdidas físicas

Una administración pobre y un manejo descuidado pueden resultar en pérdidas de sacarosa muy significativas en el tren de molinos. El derramamiento de jugo, las fugas en los tubos, canales y bombas glándula, el lavado sin cuidado y el mezclado del jugo con la lubricación de las mazas o sistemas de enfriamiento, causan pérdidas físicas de Sacarosa que necesitan ser prevenidas mediante una observación cuidadosa y atención detallada, dado que el contenido de Sacarosa en lodos de los drenajes del área de molinos debe ser monitoreado regularmente (Peter, 2012).

3.3.9.2 Pérdidas por destrucción de sacarosa

Las pérdidas por destrucción de sacarosa, resultan ser menos evidentes que las pérdidas físicas que se mencionaron anteriormente, como los derramamientos. Sin embargo, este tipo de pérdidas pueden ser a menudo mayores. La destrucción ocurre en tres formas: inversión acida, inversión enzimática e infección microbiológica. En un tren que no se limpia y desinfecta adecuadamente, las pérdidas pueden alcanzar 2% de la sacarosa total en caña. En una planta bien manejada, las pérdidas se deben reducir hasta aproximadamente la mitad de esta cifra, (Peter, 2012).

Inversión ácida envuelve la inversión química de sacarosa en fructosa y glucosa bajo condiciones ácidas. La tasa de inversión se incrementa a menor pH y con mayores niveles de temperatura. Incluso con el pH natural del jugo de caña del orden de 5.5, la cantidad de inversión es despreciable bajo las temperaturas de molienda. (Peter, 2012)

Inversión enzimática resulta a partir de proteínas, principalmente invertasa, que actúa como catalizador para promover la inversión de sacarosa. La invertasa puede encontrarse presente naturalmente en la caña o ser producida por el *Saccharomyces* sp y se inactiva a temperaturas por encima de aproximadamente 65 °C. Los productos son fructosa y glucosa, que no se cristalizan y por lo tanto no son recuperables como azúcar. Por el contrario, incrementan la cantidad de miel final y por lo tanto la pérdida de sacarosa en mieles (Peter, 2012).

Contaminación microbiana es causada por ciertos microorganismos, resaltándose la especie *Leuconostoc*, que destruye a la sacarosa para formar una variedad de productos de alto peso molecular principalmente dextranas, manitol y ácidos orgánicos. Estos productos son melasigénicos y algunos se arrastran durante todo el proceso azucarero hasta el azúcar crudo. Estos incrementan la viscosidad y pueden afectar seriamente procesos posteriores tales como la cristalización, la filtración y la remoción de color, incluso cuando se encuentran presentes en pequeñas cantidades (McCleskey et al., 1947).

Tilbury en la obra ingeniera de la caña por Peter, (2012), manifiesta que, las infecciones microbianas, particularmente debido al crecimiento de *Leuconostoc spp*, son usualmente la mayor causa de destrucción de sacarosa (> 60% en sus pruebas). En caso de infección severa, es posible percibir olores desagradables y apreciar crecimientos pegajosos y blandos.

Las reacciones de destrucción de la sacarosa por acción microbiológica, parten inicialmente en el deterioro de la caña después del corte, sus efectos incluyen reacciones de inversión química ácida y enzimática y pérdida de Sacarosa. El polisacárido de dextrano, formado principalmente por la bacteria *Leuconostoc spp* se ha informado a menudo como un indicador de deterioro de la caña, y es responsable de muchos de los numerosos impactos negativos que tiene el deterioro de la caña en el procesamiento de la fábrica, principalmente asociado con el aumento de la viscosidad en el jugo de caña. Los oligosacáridos también son productos del deterioro de la caña y son responsables de los problemas de deformación de los cristales de Sacarosa (Eggleston, 2002).

Las cepas de *Leuconostoc* pueden sobrevivir durante mucho tiempo en entornos desfavorables tan diversos como las industrias azucareras y el suelo donde crece la caña, las cepas crecen de manera asociativa como productores de ácido y su crecimiento asociativo se ha estudiado con respecto al metabolismo del citrato y la formación de aromas que afectan enormemente la producción de Sacarosa, además de la viscosidad en el jugo de caña (Hemme y Foucaud-Scheuneman, 2003). En la Figura 3, se presenta el metabolismo general de *Leuconostoc*.

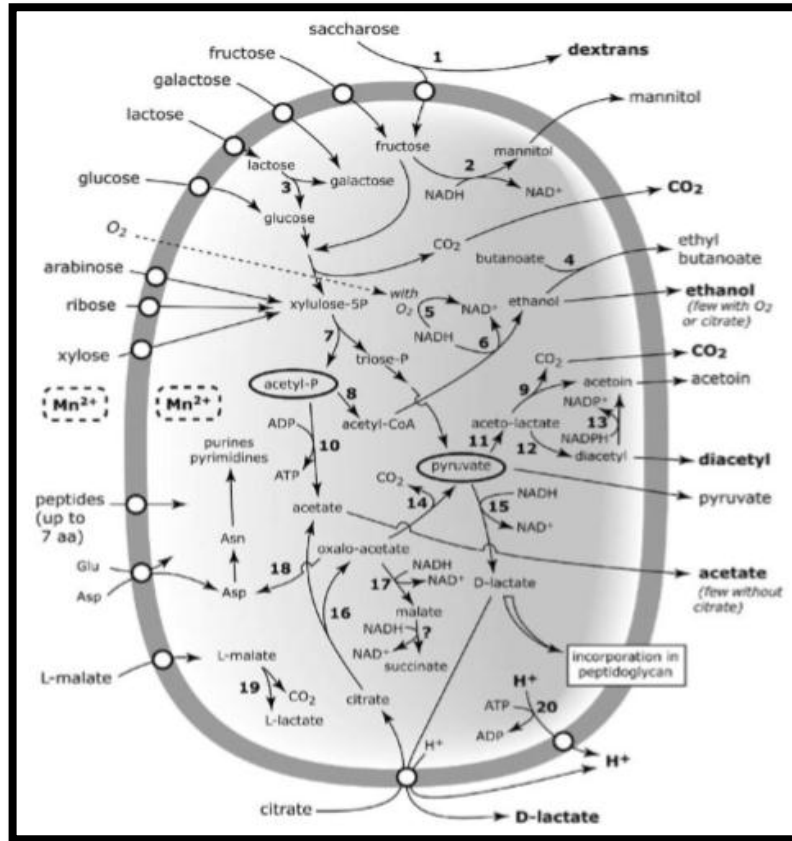


Figura 3. Metabolismo de *Leuconostoc*.

Fuente: (Hemme y Foucaud-Scheuneman, 2003)

Otros productos de la destrucción microbiológica de Sacarosa en los molinos incluyen el etanol (producido por levaduras tales como *Saccharomyces* sp.) y ácidos orgánicos, particularmente fórmico, acético y láctico, que bajan el pH, aumentan la demanda de cal para la neutralización y conducen a incrementos de las pérdidas en miel final (Peter, 2012).

3.3.9.3 Medición y control de la destrucción de Sacarosa

La destrucción de sacarosa causa una reducción en la masa de sacarosa y en la pureza, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, la medición de

estas estas pérdidas es un proceso complejo, dado que los cambios porcentuales de estos parámetros son relativamente pequeños.

Los microorganismos responsables por la mayor parte de la fermentación de la Sacarosa son mesófilos. Adicionalmente bacterias productoras de ácido láctico se encuentran activas, cada parte de ácido láctico formado equivale a aproximadamente ocho partes de sacarosa pérdida en el tren de molinos, donde esta razón es dependiente de la temperatura y otros factores. Como medida para control operacional, un nivel de ácido láctico mayor que 300 a 400 mg/kg DS en el jugo mezclado indicará que la higiene y desinfección del jugo son inadecuadas y que se requiere tomar acciones correctivas (Peter, 2012).

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación corresponde a un estudio descriptivo y explicativo en torno a las pérdidas de sacarosa, relacionadas con la actividad metabólica de *Leuconostoc spp* y la relación de esta actividad con los cambios de las variables fisicoquímicas consideradas.

Los estudios descriptivos se sitúan sobre una base de conocimientos existente, en donde el problema posee cierto nivel de claridad pero aún se necesita de investigación e información para poder establecer conclusiones o respuestas a los objetivos de la investigación. Este tipo de estudio requiere de un alto nivel de detalle, descripción completa del problema y del proceso científico para llegar a una respuesta. La investigación descriptiva está siempre en la base de la explicativa. Los estudios explicativos se originan de problemas claramente identificados en donde existen relaciones de causa y efecto (Jimenez, 1998). Como es la pérdida de Sacarosa por contaminación microbiológica en el jugo de caña de azúcar, empleando la experimentación como herramienta de investigación.

Por otra parte, según las posibilidades de alcance de los resultados, se considera un tipo de estudio aplicado, el cual permite generar resultados en un ámbito específico como es la producción de Sacarosa de mayor calidad en un ingenio azucarero.

4.2 UBICACIÓN

Este estudio se realizó en el Ingenio Sancarlos S.A, ubicado en la parte central del Valle del Cauca, en la Vía Riofrío Km. 7 Palomestizo, carretera Panamericana que comunica a Tuluá con la ciudad de Buga hacia el occidente. Las tierras de cultivo del ingenio se encuentran muy cerca de la fábrica, siendo este aspecto una ventaja que le permite tener una alta capacidad de supervisión y poco deterioro de la materia prima después del corte.

El ingenio cuenta con un tándem de 6 molinos en serie de forma consecutiva, el primer molino genera la mayor extracción de jugo mientras los molinos restantes continúan el proceso con adición de agua de maceración a 70 °C para la extracción del jugo de caña y se pase a las siguientes etapas del proceso de producción de azúcar.

4.3 REACTIVOS UTILIZADOS

En la Tabla 2, se muestran los reactivos empleados en el proceso de investigación, la descripción de su uso se presentará en las secciones 4.7 Técnicas de análisis microbiológicos y 4.8 Técnicas de análisis fisicoquímicos del presente documento.

Tabla 2. Reactivos utilizados en el proceso de investigación.

REACTIVO	PROPÓSITO	MÉTODO DE EMPLEO
Sulfato de aluminio e Hidróxido de calcio	Determinación de Pol	Polarimetría
Solución acuosa de azul de metileno al 1%	Determinación de azúcares	Método de Eynon y Lane
Solución de sulfato de		

cobre (Fehling A)		
Solución de tartrato de sodio y potasio (Fehling B).		
Solución de cloruro de bario al 10%	Determinación de dextranas en jugo	Margaret Claret (espectrofotometría).
Solución de ácido tricloroacético al 10%		
Etanol		
Tirillas de ensayo	Determinación de ácido láctico	Reflectometría
Agua petonada al 0,1%	Determinación de <i>Leuconostoc spp.</i>	Método de recuento en placa, de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacárido (balpe).
Agar MRS + Sacarosa 10% (Formulación g/L).		

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4 POBLACIÓN

Los materiales seleccionados para esta investigación, se definieron al tomar como insumo las etapas del proceso productivo de obtención de azúcar llevado a cabo por el ingenio en puntos estratégicos constituyendo la población de la investigación, permitiendo establecer de esta manera, la etapa o etapas en que ocurre la contaminación microbiológica generando pérdida de Sacarosa.

En la Figura 4, se muestra el proceso de producción de obtención de azúcar.

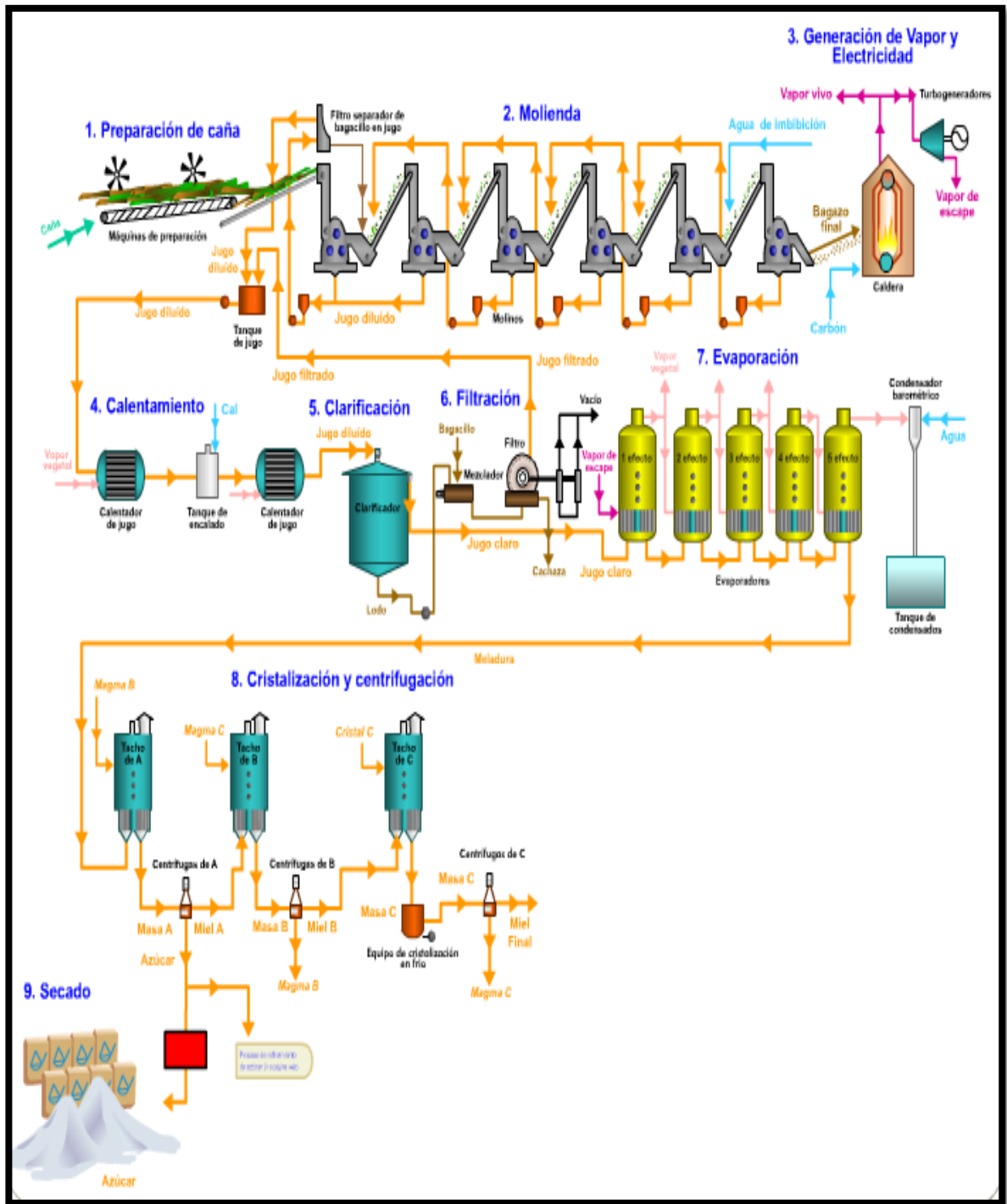


Figura 4. Proceso productivo de obtención de azúcar.

Fuente: (Cenicña, 2004)

Los puntos a analizar se resumen en la Tabla 3, donde se muestran los materiales a evaluar, la etapa productiva y la descripción de la misma.

Tabla 3. Materiales a evaluar en la investigación.

MATERIALES A EVALUAR	ETAPA	DESCRIPCIÓN
Jugo de primera extracción	Molienda	Jugo obtenido de la extracción del primer molino.
Jugo diluido	Molienda	Jugo obtenido en los molinos del 2 al 6 con adición de agua.
Jugo clarificado	Clarificación de jugo	Jugo obtenido a partir del proceso de clarificación, el cual ha sido sometido a temperaturas entre 80 °C y 90 °C
Jugo filtrado	Filtración	Jugo recuperado a partir del proceso de extracción de lodos del clarificador de jugo
Meladuras	Evaporación y clarificación	Jugo que pasa por un tándem de evaporadores con el fin de extraer el agua en forma de vapor y obtener una meladura con una concentración de °brix entre 60% y 70%
Miel primera	Centrifugación masa A	Se obtiene a partir del proceso de centrifugación de masa A el cual consiste en la separación del grano y la miel.

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4.1 Análisis en la etapa de molienda

Para esta etapa del proceso productivo del azúcar se tomaron muestras de jugos al momento de la obtención del jugo de primera extracción producto del primer molino y a partir del jugo diluido obtenido en los molinos del 2° al 6°, con adición de agua, tomándose la muestra del molino 4° que es donde se adiciona agua a alta temperatura.

En la Figura 5, se presenta la etapa de molienda para el proceso de producción de azúcar.

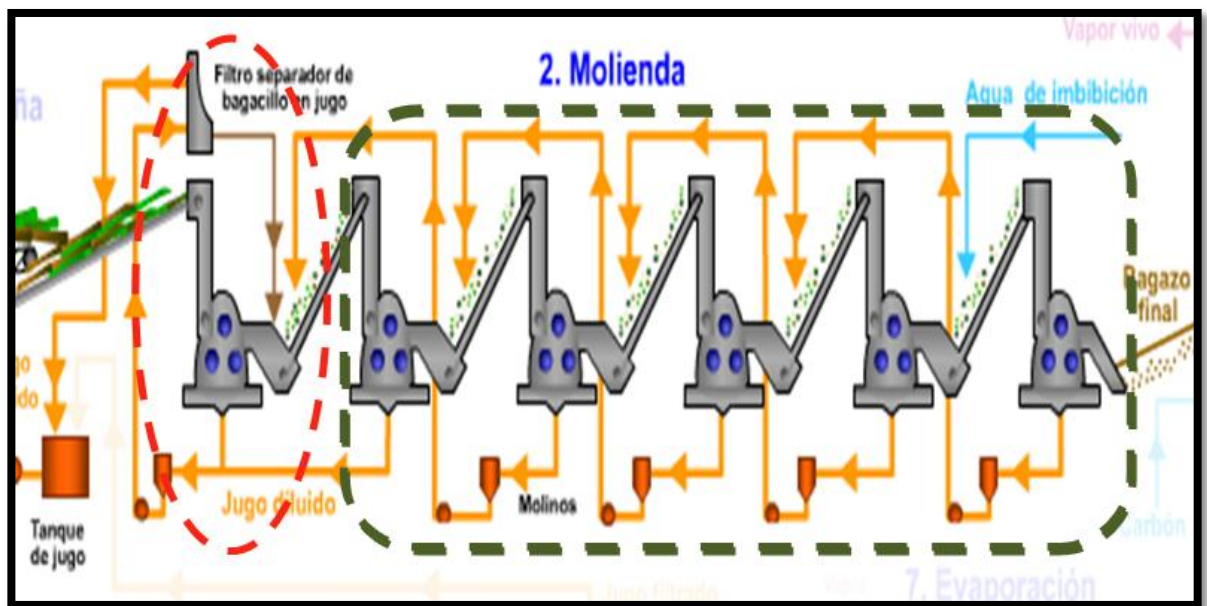


Figura 5. Etapa de molienda producción de azúcar.

Fuente: (Cenicaña, 2004)

4.4.2 Toma de muestra en el jugo de primera extracción

Después que la caña tomada como muestra fue colocada sobre la banda transportadora y entró a la etapa de molienda, se contabilizaron 5 minutos para

proceder a la toma de la muestra de jugo de la primera extracción en bolsas estériles y posteriormente en frascos de polipropileno previamente esterilizados.

4.4.3 Toma de muestra del jugo diluido

En el jugo mezclado que pasó de la báscula al tanque, se tomó la muestra de jugo diluido en frascos de polipropileno anteriormente esterilizados con un muestreador.

Estas pruebas permitieron determinar si las cargas de microorganismos *Leuconostoc spp* aumentaban en el trayecto del tándem de molinos al tener contacto con diferentes superficies.

En la Figura 6 se observan las muestras empleadas para el análisis microbiológico, obtenidas de la etapa de molienda.

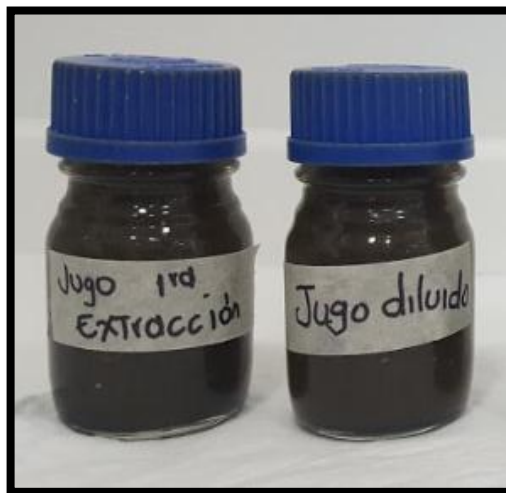


Figura 6. Muestras, etapa de molienda (Jugo de primera extracción, Jugo diluido).

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4.4 Toma de muestra del jugo clarificado

Después de que el jugo diluido es calentado a temperaturas controladas entre los 80 °C y 90 °C, pasa al proceso de clarificación, en el cual se retienen los sólidos insolubles del jugo diluido que es extraído por la parte superior del clarificador y la formación de lodo es evacuada por la parte inferior.

En la Figura 7, se presenta la etapa de clarificación para el proceso de producción de azúcar y obtención de la muestra de jugo clarificado.

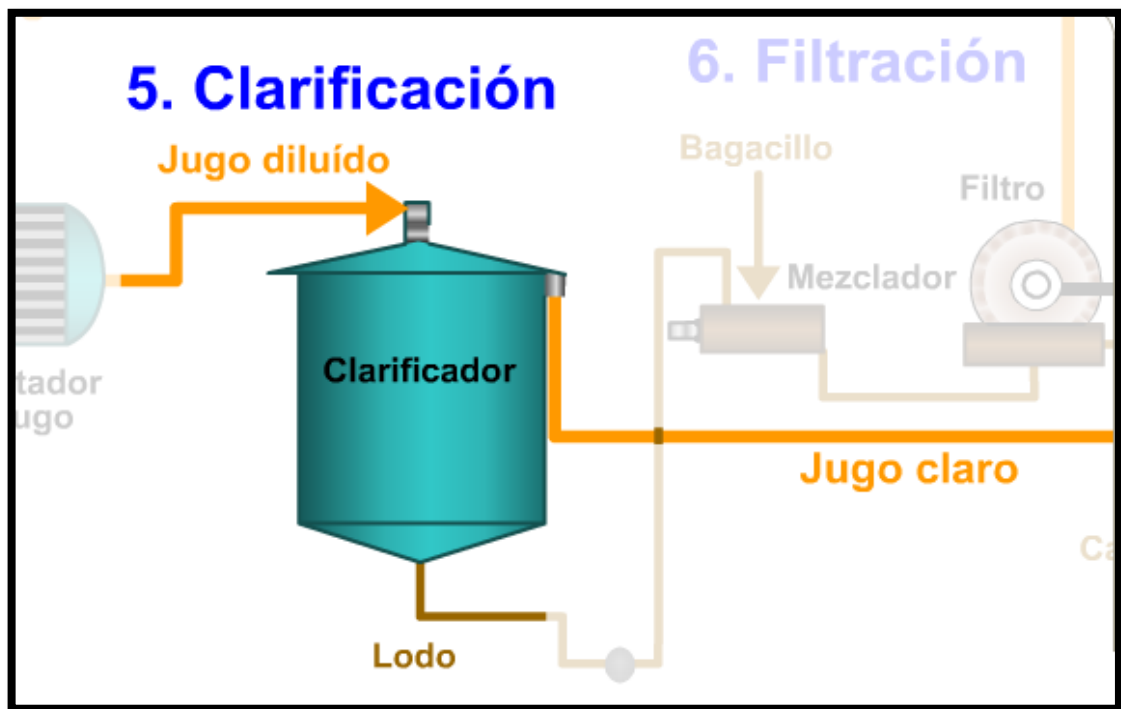


Figura 7. Etapa de clarificación proceso de producción de azúcar.

Fuente: (Cenicaña, 2004)

Para el caso de esta prueba, se tomaron muestras de igual manera que las anteriores en bolsas plásticas estériles y posteriormente en frascos mediante un muestreador como se muestra en la Figura 8.

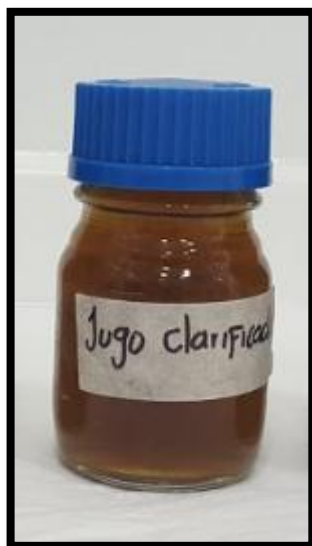


Figura 8. Muestra etapa de clarificación (Jugo clarificado).

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4.5 Toma de muestra de jugo filtrado

La Filtración, es el proceso en el cual se mezcla bagacillo en el lodo antes de la filtración para retener la cachaza y dejar pasar el jugo filtrado gracias a la acción de filtros y mallas rotatorias.

En la Figura 9, se presenta la etapa de filtración para el proceso de producción de azúcar y obtención de la muestra de jugo filtrado.

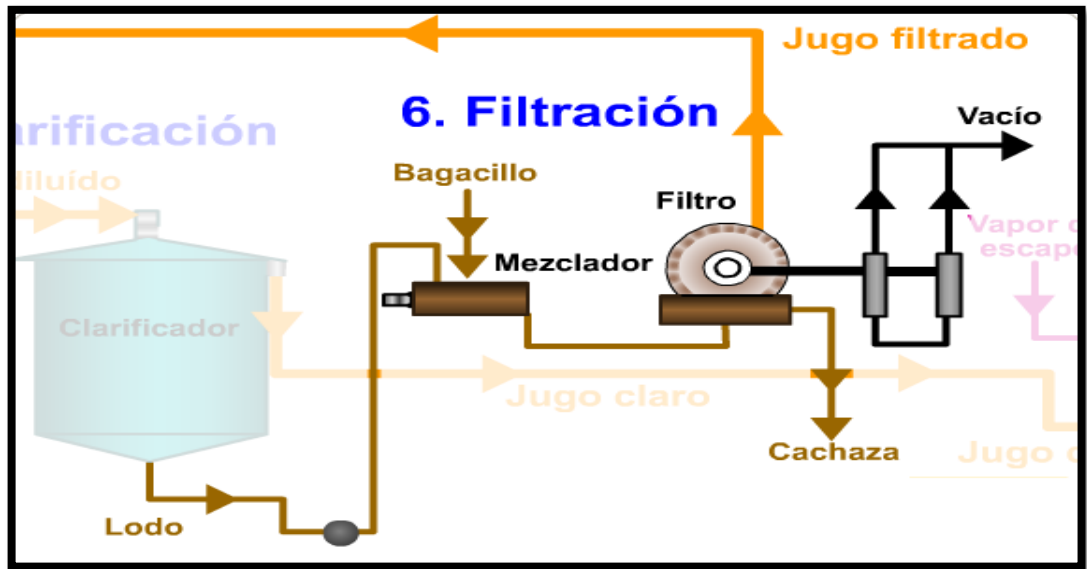


Figura 9. Etapa de filtración producción de azúcar.

Fuente: (Cenicaña, 2004)

Este punto de muestreo se tomó en bolsas plásticas y posteriormente en frascos anteriormente esterilizados mediante un muestreador. En la Figura 10 se presenta un ejemplo de muestra.



Figura 10. Muestra etapa de filtración (Jugo filtrado).

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4.6 Meladuras

La Evaporación, es el proceso en el que se evapora la mayor cantidad del agua presente en el jugo clarificado para alcanzar meladuras y pasar a la etapa de cristalización y centrifugación.

En la Figura 11, se presenta la etapa de filtración para el proceso de producción de azúcar y obtención de la muestra de jugo filtrado.

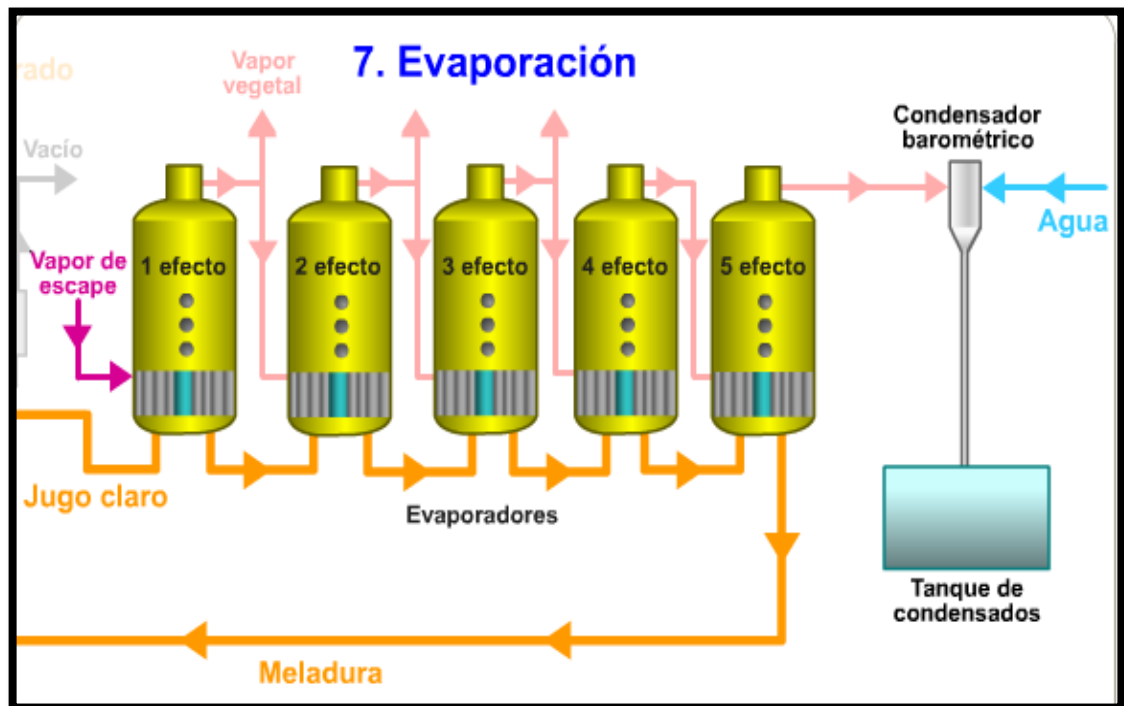


Figura 11. Etapa de evaporación, producción de azúcar.

Fuente: (Cenicaña, 2004)

Este punto de muestreo se tomó en bolsas plásticas y posteriormente en frascos anteriormente esterilizados mediante un muestreador. En la Figura 12, se presenta un ejemplo de muestra.

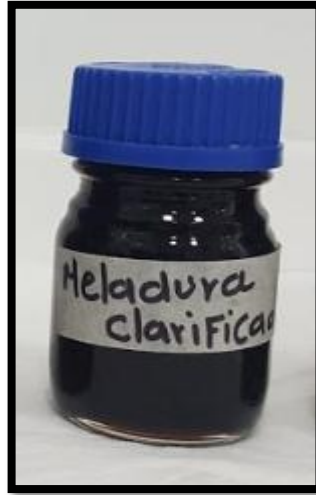


Figura 12. Muestra etapa de evaporación (Meladura clarificada).

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.4.7 Miel primera

La miel primera se forma a partir de los cristales de sacarosa mediante un proceso que emplea material semilla, obteniéndose acumulaciones de cristales de Sacarosa y miel de diferentes tamaños y proporciones que posteriormente se separan en las centrifugas.

En la Figura 13, se presenta la etapa de filtración para el proceso de producción de azúcar y obtención de la muestra de jugo filtrado.

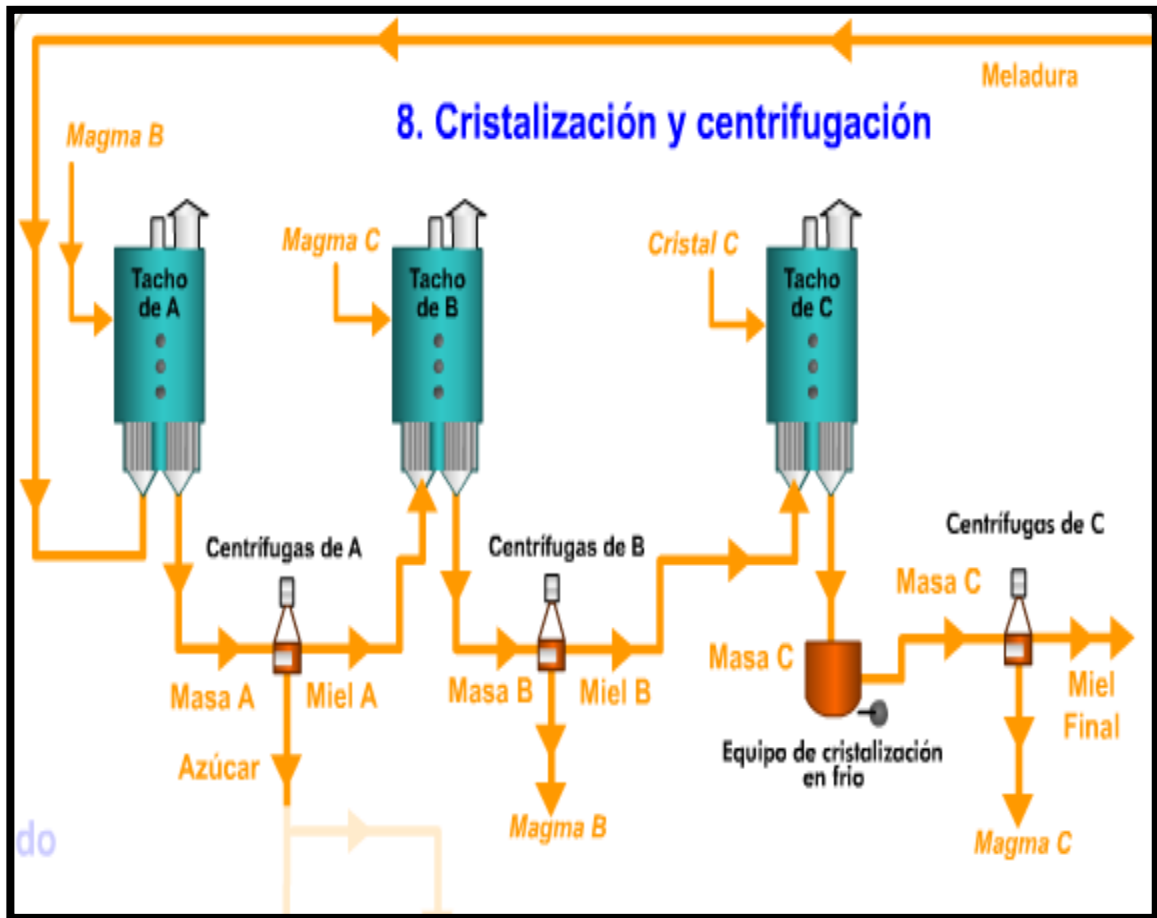


Figura 13. Etapa de cristalización y centrifugación.

Fuente: (Cenicaña, 2004)

Este punto de muestreo se tomó en la centrifuga A, después del tacho A para la obtención de miel primera o miel A. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas y posteriormente en frascos anteriormente esterilizados con ayuda de un muestreador. En la Figura 14, se presenta un ejemplo de muestra.



Figura 14. Muestra etapa de cristalización y centrifugación (Miel primera).

Fuente: Desarrollado por el autor.

En la toma de muestras se tuvo en cuenta la representatividad y el tamaño de la muestra para garantizar la integridad de los resultados como se muestra a continuación:

- **Representatividad**

Se tuvo especial atención en que la caña muestreada contara con las mismas características con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos y que no fueran a variar los resultados por factores como el tipo de caña, el clima, los tiempos de espera, entre otros.

- **Tamaño de Muestra**

Durante 8 días se realizaron análisis en diferentes tiempos, mañana y tarde en cada una de las etapas definidas anteriormente; obteniendo en total 16 resultados por cada variable propuesta de muestreo para asegurar normalidad en el análisis

de los datos. Los análisis se realizaron durante ocho días en un periodo de dos meses aproximadamente.

4.5 UNIDAD DE MUESTRA

Para la realización del análisis microbiológico de recuento de *Leuconostoc spp* y determinación de ácido láctico por reflectometría se tomaron aproximadamente 220g de muestra. Teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones de almacenamiento, las cuales se deben procesar lo más pronto posible y/o conservarlas a temperaturas de refrigeración entre 0 y 8 °C, por un tiempo máximo de 24 horas.

4.6 PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA

El muestreo se realizó en las horas de la mañana, entre 8 y 9 a.m., y en la tarde, entre 3 y 4 p.m. empleando un muestreador para eliminar la posibilidad de contaminación cruzada, dado que este rodea los frascos facilitando el intercambio entre las muestras sin estar en contacto directo con ellas.

Las muestras que se tomaron en cada etapa de muestreo se almacenaron en estado de refrigeración hasta su análisis en temperaturas entre 0 y 8 °C, por un tiempo máximo de 24 horas. Se tomaron muestras en las seis etapas claves del proceso de producción, durante los meses de agosto a septiembre de 2018.

4.6.1 Variables del estudio.

- Ácido láctico ppm/bx Vs Recuento de *Leuconostoc spp*
- Dextranas ppm Vs Recuento de *Leuconostoc spp*

4.6.1.1 Variables fisicoquímicas

Tabla 4. Variables fisicoquímicas del estudio.

VARIABLES FISICOQUÍMICAS	UNIDADES	ETAPA DEL PROCESO	CANTIDAD DE REPETICIONES	CANTIDAD DE MUESTRA A TOMAR EN (ml)
°Brix	%	Todas las variables fueron aplicadas a todas las muestras obtenidas en cada una de las etapas del proceso elegidas y presentadas en la Tabla 2.	Para cada variable se realizaron un total de 8 repeticiones, tomando muestras en mañana y tarde, obteniendo 16 muestras por cada material de estudio.	500
Sacarosa				
Pureza				
pH	pH			
Azúcares reductores	%			200
Dextranas	ppm			

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.7 TÉCNICA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

4.7.1 Recuento de *Leuconostoc spp*

Para la determinación de *Leuconostoc spp*, se empleó el método de recuento en placa de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacárido en balpe. Para esto se tomaron las muestras diluidas en agua peptonada en una concentración de 0,1% p/v, generando disoluciones seriadas base 10 hasta 10^5 ; cultivando 0.1 ml por duplicado de dos diluciones en agar MRS (Man Rogosa Sharpe) con 10% de Sacarosa previamente solidificado con formulación g/L, incubando las placas de agar de forma invertida durante 24 y 48 horas a una temperatura de 37 °C para posteriormente tomar los recuentos. En la Figura 15, se presenta un ejemplo de las muestras para recuento de los microorganismos *Leuconostoc spp* en balpe.

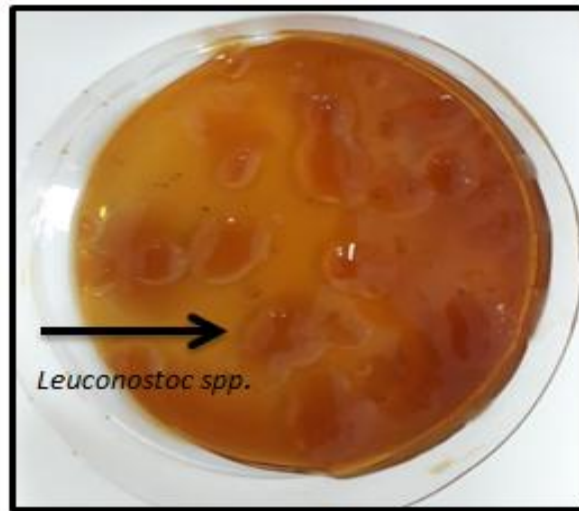


Figura 15. Método de recuento en placa, *Leuconostoc spp.*

Fuente: Desarrollado por el autor.

4.8 TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

4.8.1 Determinación de ácido láctico por Reflectometría

La concentración de ácido láctico se midió en todas las muestras por el método de reflectometría, utilizando tiras de ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico MERCK®, sumergiéndolas en una solución de la muestra diluida 1/100, posteriormente se retiró el exceso de líquido y se insertaron en el reflectómetro Reflectoquant RQflex plus 10 MERCK®, el cual permite realizar análisis cuantitativos rápidos de diversas muestras y parámetros mediante la evaluación de tiras de ensayo especiales en cinco minutos, registrando el valor obtenido en mg/l.

4.8.2 pH

Se tomaron aproximadamente 70 ml de la muestra dejándola enfriar en un vaso hasta llegar a una temperatura ambiente, se empleó un Peachímetro Fischer de electrodo combinado para determinar la concentración de iones de hidrógeno

evaluando si el valor de pH indica un material ácido (pH inferior a 7), alcalino (pH superior a 7) o neutro (pH igual a 7).

4.8.3 Porcentaje de Pureza.

Para la determinación del porcentaje de pureza se sacaron los grados de °brix y POL como se muestra en la sección 4.8.3.1 y 4.8.3.2 de este documento, dado que la relación entre POL y °brix permite establecer el nivel de la pureza del jugo en términos de Sacarosa.

4.8.3.1 Determinación de grados °Brix

Se tomaron aproximadamente 100 ml de la muestra filtrándola y se desecharon los primeros ml de esta para dar paso a la lectura de dos gotas de muestra en el refractómetro y se registró el valor de los grados °brix o sólidos disueltos.

4.8.3.2 Determinación de la sacarosa aparente por Polarimetría (POL)

Se midieron aproximadamente 150 ml de la muestra con un gramo de sulfato de aluminio e hidróxido de calcio como agentes clarificantes mezclándolos muy bien, posteriormente se realizó una filtración desechando los primeros ml y se procedió a tomar las medidas de POL ubicando el tubo del polarímetro a cero por ambos lados con ayuda de agua destilada y se colocó un poco de la muestra a analizar ya filtrada y se sacó la muestra para lectura de la polarización en un tubo con ayuda del sacarímetro.

Se determinaron los valores de sacarosa según los valores de °Brix y Polarización obtenidos utilizando las tablas de Expansión de Schmitz. Finalmente, la pureza se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\% \text{ sacarosa}}{\text{°Brix refractométrico}} * 100$$

4.8.4 Determinación de azúcares reductores mediante el método de Eynon y Lane.

Para determinar el porcentaje de azúcares reductores se tomó aproximadamente 50 ml de la muestra a una bureta. Donde también, se dispuso de 5 ml de Fehling A y 5 ml de Fehling B a un mismo *erlenmeyer*, posteriormente se agrega 5 ml de la muestra mezclando uniformemente.

Se ubicó el *erlenmeyer* sobre el equipo de agitación calentando la solución hasta estado de ebullición con movimientos suaves; se mantuvo el estado de ebullición durante aproximadamente 1 minuto; luego se adicionaron 4 gotas de reactivo azul de metileno provocando la coloración de la solución con este color característico.

Posteriormente, se ubicó la bureta con la muestra a la entrada del *erlenmeyer* con la solución en estado de ebullición y se añadió el jugo contenido en la bureta por gotas hasta que el pigmento azul desapareció y se tornó de un color rojo cobrizo.

4.8.5 Determinación de dextranas.

Se empleó el Margaret Claret, para la determinación de las dextranas al considerar estas como un subproducto polisacárido precipitado en etanol al 50%, a partir de una solución libre de almidones y proteínas, siendo su base principal de Sacarosa. De acuerdo con el procedimiento, se tomaron 100 ml de la muestra en un *beaker*, se tomaron 20 ml de ácido tricloroacético al 10% que precipitó la proteína del jugo, y 10 ml cloruro de bario al 10% precipito las sales, se procede a adicionar 5g de celite y luego se filtra en papel *whatman 5* la filtración subsecuente removi6 las proteínas y los s6lidos suspendidos. De la soluci6n filtrada se toman 2

alícuotas de 5ml a la primera se le adiciona 5ml de agua destilada (blanco), y a la segunda 5ml de etanol. Una vez formada la opacidad con etanol, se dejó en reposo durante 20 minutos y se procedió a realizar la lectura con el espectrofotómetro a 720 nm.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Después de la obtención de resultados se aplicó coeficiente de correlación tipo Pearson para establecer las relaciones entre las variables microbiológicas y fisicoquímicas evaluadas

- Ácido láctico ppm/bx Vs Recuento de *Leuconostoc spp*
- Dextranas ppm Vs Recuento de *Leuconostoc spp*

Para la presentación e interpretación de los resultados se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, análisis de regresión polinomial, analizando la varianza correspondiente para la obtención del coeficiente de determinación para cada variable, esto permitió establecer la correlación entre las variables fisicoquímicas y microbiológicas utilizadas. Se realizó también, análisis multivariado entre la concentración de ácido láctico y las demás variables fisicoquímicas. Como herramientas de trabajo se empleó un software estadístico Statgraphics Centurion XVII para el procesamiento de los datos y Microsoft Excel del paquete Microsoft Office 2016 para la tabulación y representaciones gráficas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

En la Figura 16, se presenta la concentración promedio de microorganismos *Leuconostoc spp* por etapa de producción de azúcar en el ingenio, la cual muestra que la contaminación microbiológica se presenta en un nivel significativo durante las primeras etapas de producción, en la etapa de molienda, jugos de primera extracción y jugo diluido.

Es importante recordar que los microorganismos *Leuconostoc spp* poseen una temperatura y pH óptimos para su crecimiento, los cuales rondan entre 27 y 37 °C de temperatura y 5,0 a 6,5 en pH. Por tanto, esos microorganismos no sobreviven a etapas posteriores a la de molienda por las altas temperaturas requeridas en el proceso de fabricación de la azúcar que están entre 80 y 90 °C (Hernández et al., 1977).

En la Figura 16 se observa un decrecimiento del recuento de *Leuconostoc spp* en las 2 primeras etapas, mientras que en las etapas subsiguientes el recuento de *Leuconostoc spp* es cercano a cero.

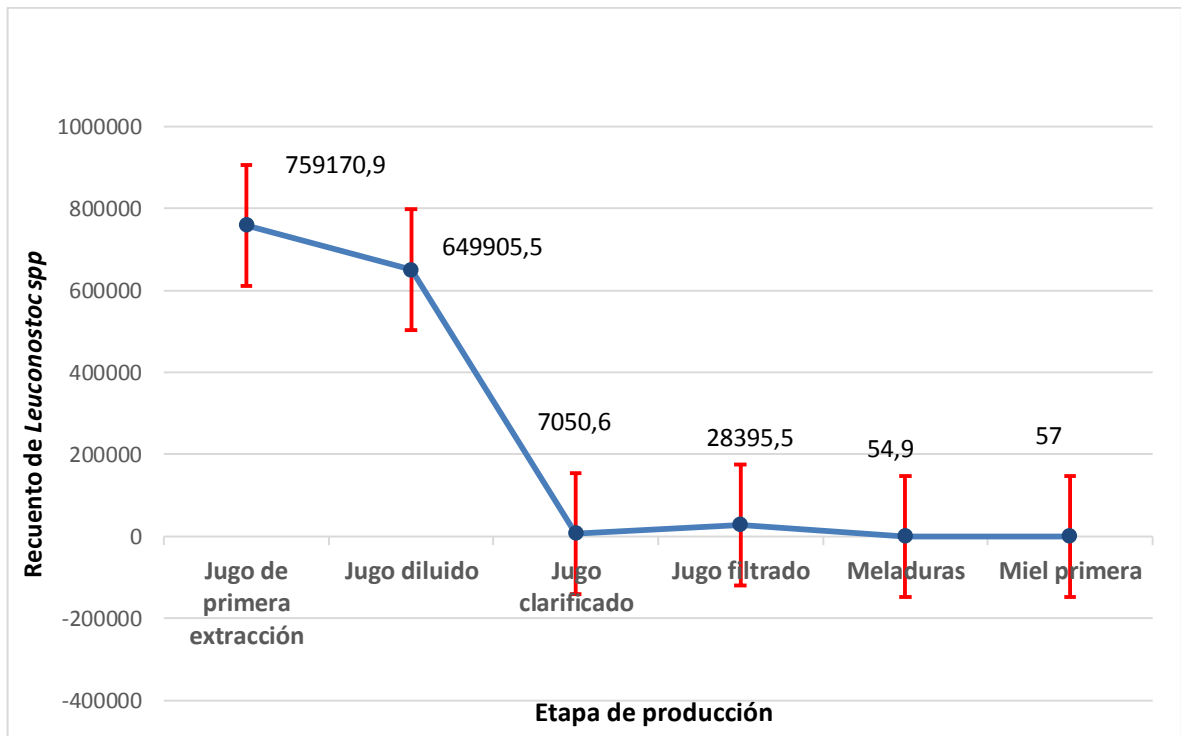


Figura 16. Promedio de recuento *Leuconostoc spp* por etapa de producción de azúcar en el ingenio azucarero.

Fuente: Desarrollado por el autor.

Por otra parte, se analizó la producción de ácido láctico con el propósito de establecer la relación entre el recuento de *Leuconostoc spp*, y la concentración de ácido láctico durante el proceso de elaboración de azúcar de caña. Los resultados muestran claramente un comportamiento inverso respecto del observado en la Figura 16, en las primeras etapas de producción, la concentración de ácido láctico es muy baja, y va aumentando hasta lograr su mayor valor en la etapa final de centrifugación, como se aprecia en la Figura 17.

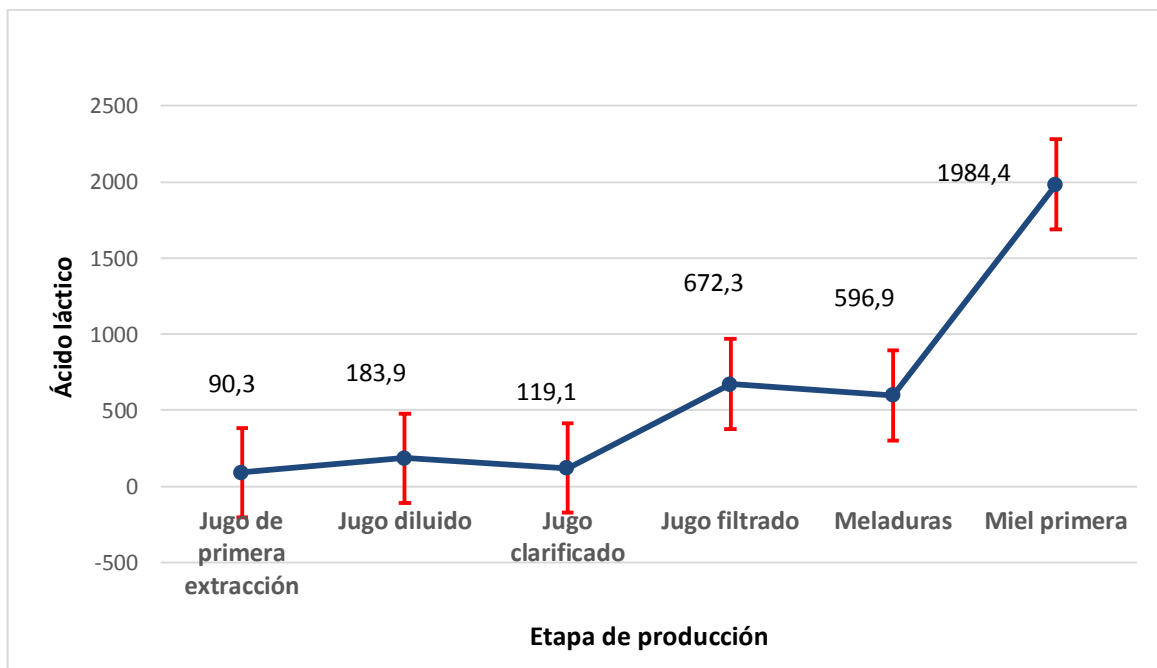


Figura 17. Promedio de ácido láctico por etapa de producción de azúcar en el ingenio azucarero.

Fuente: Desarrollado por el autor.

A nivel estadístico existe un coeficiente de correlación de $-0,75$ entre la variable de microorganismos *Leuconostoc spp* y ácido láctico que representa una correlación considerable con 75% , siendo la significancia o valor-p de $0,08$ o el 8% que es buen valor y cumple con el máximo aceptable que es del 10% . Por lo que es viable considerar esta relación en la fábrica como estrategia para determinar controles que permitan disminuir la contaminación microbológica y por ende el decrecimiento de la pérdida de Sacarosa.

En este punto, es importante analizar la correlación inversa entre estas variables para poder interpretar adecuadamente este comportamiento y tomar medidas en la fábrica. Se puede decir que la producción de ácido láctico está directamente influenciada por el descenso de las cargas microbianas en las primeras etapas del proceso cuando no existe un buen protocolo de limpieza y desinfección.

El origen de la contaminación microbiana se presenta no solamente por la materia prima que proviene de los campos de cultivo sino también por los contenedores y canales que transportan los jugos en las primeras etapas de producción que no reciben aun altas temperaturas o controles de pH que disminuyan las poblaciones microbiológicas *Leuconostoc spp.* Situación que lo permite en las etapas posteriores desde el jugo clarificado hasta la miel primera como se mostró en la Figura 17.

Sin embargo, en el comportamiento del ácido láctico, presentado en la Figura 16, se puede apreciar que aunque los microorganismos de estudio de este proyecto el *Leuconostoc spp* productores de esta sustancia desaparecen, los niveles de ácido láctico continúan ascendiendo hasta el final del proceso de fabricación, esta situación puede ocurrir por varias razones, una puede ser que en estas etapas finales existen poblaciones de microorganismos diferentes a los *Leuconostoc spp* y continúan generando ácido láctico sobreviviendo a las altas temperaturas y a los controles de pH, como ocurre con las bacterias ácido termófilas, las cuales también son generadoras de ácido láctico por la degradación de la Sacarosa (Mazzolia et al., 2014).

Otro motivo del incremento de ácido láctico es el tiempo de retención de materiales en tanques de almacenamiento, los cuales pueden contener biopelículas dado las bajas de frecuencias de limpieza de estos, favoreciendo a la contaminación del material y por ende al deterioro de la sacarosa e incrementando la formación de ácido láctico.

Con base en este proceso de análisis, la fábrica estableció como protocolo diario, la toma de muestras de ácido láctico en jugo de primera extracción, jugo diluido y jugo filtrado, como puntos críticos de contaminación microbiológica como se ha mencionado anteriormente y cada 15 días en jugo mezclado, clarificado y meladuras. Esta decisión fue tomada gracias a los resultados que permitieron

identificar que en los periodos de retención o permanencia, el impacto microbiológico se intensificaba, por tanto, lo ideal sería hacer una limpieza constante de los tanques, filtros, mallas, bombas y tuberías que son focos clave de contaminación en donde se forman biopelículas por la dificultad para realizar una limpieza en profundidad, resultando en la unión de material polimérico extracelular, detritus inorgánicos y células microbianas formando capas delgadas de suciedad. No obstante, en la práctica estos no pueden ser limpiados constantemente dado a la capacidad de almacenamiento y disponibilidad de tanques, lo que permiten estas pruebas es priorizar que tanques poseen mayor contaminación y proceder a su limpieza, realizando liquidaciones del tanque evacuando el material de acuerdo a las condiciones del proceso hasta lograr su vaciado y proceder a la limpieza.

5.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.

5.2.1 Temperatura y pH

La temperatura ideal para el desarrollo de las *Leuconostoc spp* en jugos de caña se encuentra entre 27 °C y 37 °C; normalmente estas bacterias son eliminadas en etapas posteriores del proceso en el ingenio cuando se alcanzan altas temperaturas superando este rango aceptable de supervivencia, pero sus efectos o subproductos metabólicos como las dextranas y azúcares reductores se conservan en los jugos causando inconvenientes posteriores como taponamientos en la etapa de filtración. En cuanto al pH, para cada especie de microorganismo existe de igual manera un rango aceptable de supervivencia, en general, las bacterias *Leuconostoc spp* encuentran un valor ideal entre 5,0 a 6,5 en un pH ácido por ser menor a 7 (Hernández et al., 1977).

Estos valores de temperatura y pH son fácilmente encontrados en el jugo de la caña como lo muestra la Tabla 5, donde se observa diferentes grados de variación de los valores de pH entre las diferentes etapas de muestreo.

Tabla 5. Promedios de pH en cada etapa de muestreo.

MATERIAL	ETAPA	pH
Jugo de primera extracción	Molienda	5,4 +/- 0,2
Jugo diluido	Molienda	5,3 +/- 0,2
Jugo clarificado	Clarificación de jugo	6,7 +/- 0,2
Jugo filtrado	Filtración	7,8 +/- 0,2
Meladuras	Evaporación y clarificación	6,7 +/- 0,2
Miel primera	Centrifugación masa A	4,3 +/- 0,2

Fuente: Desarrollado por el autor.

Según los resultados obtenidos en el proceso investigativo la temperatura que se maneja en cada etapa de producción y el pH encontrado en la Tabla 5, permite establecer que la mayor parte del proceso de molienda para la extracción favoreció la asimilación de la Sacarosa por parte de la actividad microbiana puesto que los jugos en esa etapa no han alcanzado aún temperaturas ni valores de pH capaces de exterminar o reducir los microorganismos presentes. Además, el movimiento constante de los jugos por las diferentes etapas, entre los molinos a tanques de filtración y canales permite la aireación de los mismos, lo que posibilita la proliferación de los microorganismos como *Leuconostoc spp.*

5.2.2 Recuento de *Leuconostoc spp* y su correlación con las características fisicoquímicas de los jugos en las etapas de muestreo

Se realizó un recuento de la población de *Leuconostoc spp* en BALPE, correlacionando los resultados con las características fisicoquímicas de los jugos. Se consideraron correlaciones significativas o con valor-P aquellas con valores menores a 0,1 lo que representa 10% de significancia, distinguiendo los valores

positivos como correlación significativa directa, en donde ambas variables disminuyen o aumentan al tiempo, y los valores negativos como correlación significativa inversa, donde las variables se comportan una en aumento y la otra en disminución.

El análisis microbiológico de las muestras permitió determinar la relación entre el recuento de *Leuconostoc spp*, y la concentración de ácido láctico durante el proceso de producción de azúcar de caña, empleando para este estudio la técnica de Reflectometría, utilizando tiras de ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico MERCK®, usando como equipo el reflectómetro Reflectoquant RQflex plus 10 MERCK®, el cual permite realizar análisis cuantitativos en aproximadamente cinco minutos, registrando el valor obtenido en mg/l.

La correlación de estos análisis microbiológicos con los parámetros físico-químicos evaluados se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Correlaciones entre los análisis microbiológicos y las características físicoquímicas de los jugos en cada etapa de muestreo.

ÁCIDO LÁCTICO						
Características físicoquímicas	Jugo de primera extracción	Jugo diluido	Jugo clarificado	Jugo filtrado	Meladuras	Miel primera
°Brix	NS	NS	NS	NS	S (+) 0,5	NS
Sacarosa	NS	NS	NS	NS	S (+) 0,5	NS
Pureza	S (-) -0,5	NS	NS	S (+) 0,6	NS	S (+) 0,7
pH	NS	NS	S (-) -0,6	NS	NS	S (+) 0,5
Azúcares reductores	S (+) 0,7	S (+) 0,6	NS	NS	NS	NS

Dextranas	S (+) 0,5	NS	S (+) 0,5	NS	S (+) 0,5	NS
LEUCONOSTOC						
Características fisicoquímicas	Jugo de primera extracción	Jugo diluido	Jugo clarificado	Jugo filtrado	Meladuras	Miel primera
°Brix	NS	NS	NS	NS	S (-) -0,5	NS
Sacarosa	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pureza	NS	NS	NS	NS	NS	S (-) -0,5
pH	NS	NS	NS	S (+) 0,4	NS	NS
Azúcares reductores	S (-) -0,4	NS	NS	NS	NS	NS
Dextranas	NS	NS	S (+) 0,98	S (+) 0,9	NS	NS
NS	Correlación no significativa					
S (+)	Correlación significativa directa					
S (-)	Correlación significativa inversa					

Fuente: Desarrollado por el autor.

Para el análisis estadístico de la correlación presentada en la Tabla 6, del recuento de *Leuconostoc spp* y ácido láctico junto con las variables fisicoquímicas, se emplearon diferentes modelos lineales con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVII y el coeficiente de correlación que dependiendo de su signo fue posible determinar si existió una relación directa o inversa, una relación es directa cuando el coeficiente de correlación es positivo o inversa cuando el coeficiente de correlación es negativo; en la tabla se encuentran en color rojo los coeficientes de correlación resultantes, evidenciando en su mayoría correlaciones débiles (+/- [entre 0,1 y 0,5]) y medias (+/- [entre 0,5 y 0,75]), dentro las correlaciones entre ácido láctico y características físicas, todas pertenecen a estos dos rangos siendo en su mayoría relaciones directas, es decir que a medida que aumenta la generación de ácido láctico aumentan características como el

°brix, sacarosa, azúcares reductores y dextranas en diferentes etapas del proceso de producción; es importante mencionar que la correlación de estas variables no es constante en todas las etapas debido a que se manejan diferentes grados de temperatura, pH y exposición a contaminación microbiológica según la etapa de producción. Por ejemplo, dentro de los resultados de correlación entre ácido láctico y otras características físicas químicas se obtuvieron solo dos relaciones inversas, la primera de ellas en el jugo de primera extracción en la relación de ácido láctico y pureza, donde se evidencia que a medida que el ácido láctico aumenta la pureza disminuye.

En la Figura 18, se evidencia el anterior comportamiento de relación inversa.

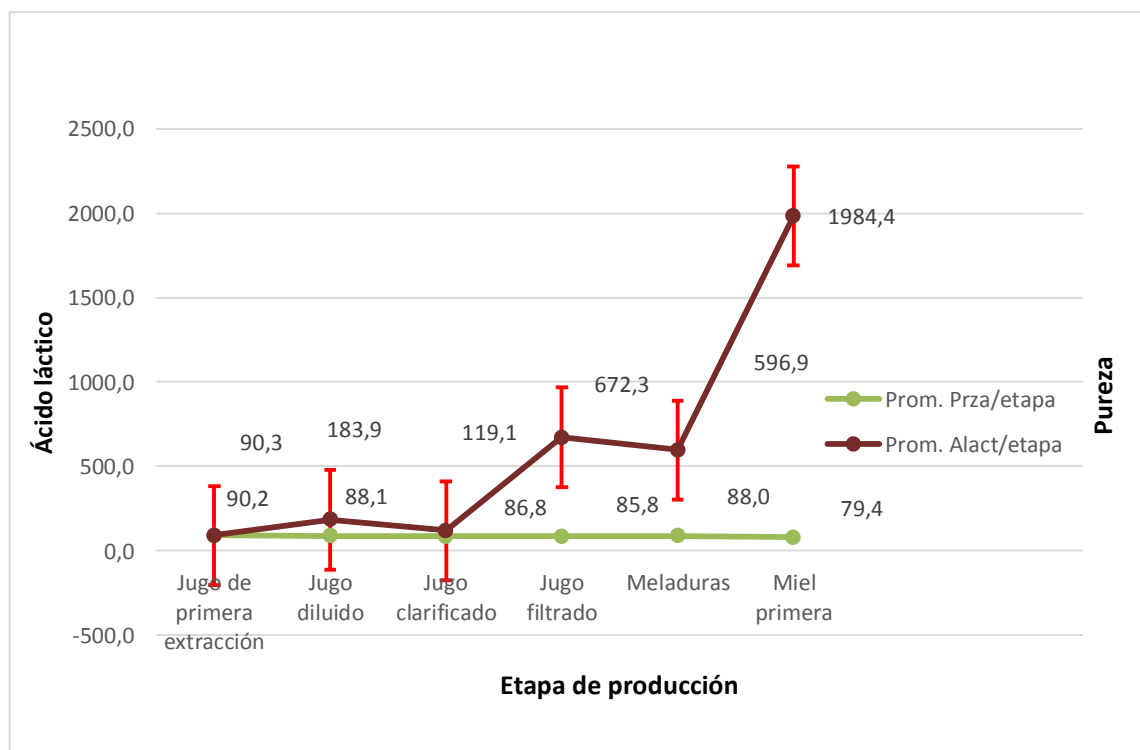


Figura 18. Promedio de ácido láctico ppm/bx y pureza por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

La segunda de las relaciones inversas en la correlación entre ácido láctico y otras características fisicoquímicas, se presenta en el pH en la etapa de clarificado. Esto ocurre por efectos de la temperatura y la adición de hidróxido de calcio para controlar los niveles de pH en los jugos, estos presentaban un pH ácido por el proceso de inversión el cual es controlado con la adición de hidróxido de calcio por lo que a medida que aumentaba la temperatura en el proceso de producción, de igual manera lo hizo el pH; este incremento constante en la temperatura elimina en gran medida los microorganismos causantes de la generación de ácido láctico por lo que se genera un decrecimiento de esta sustancia, generando una relación inversa entre pH y ácido láctico en esta etapa.

En la Figura 19, se evidencia el anterior comportamiento de relación inversa.

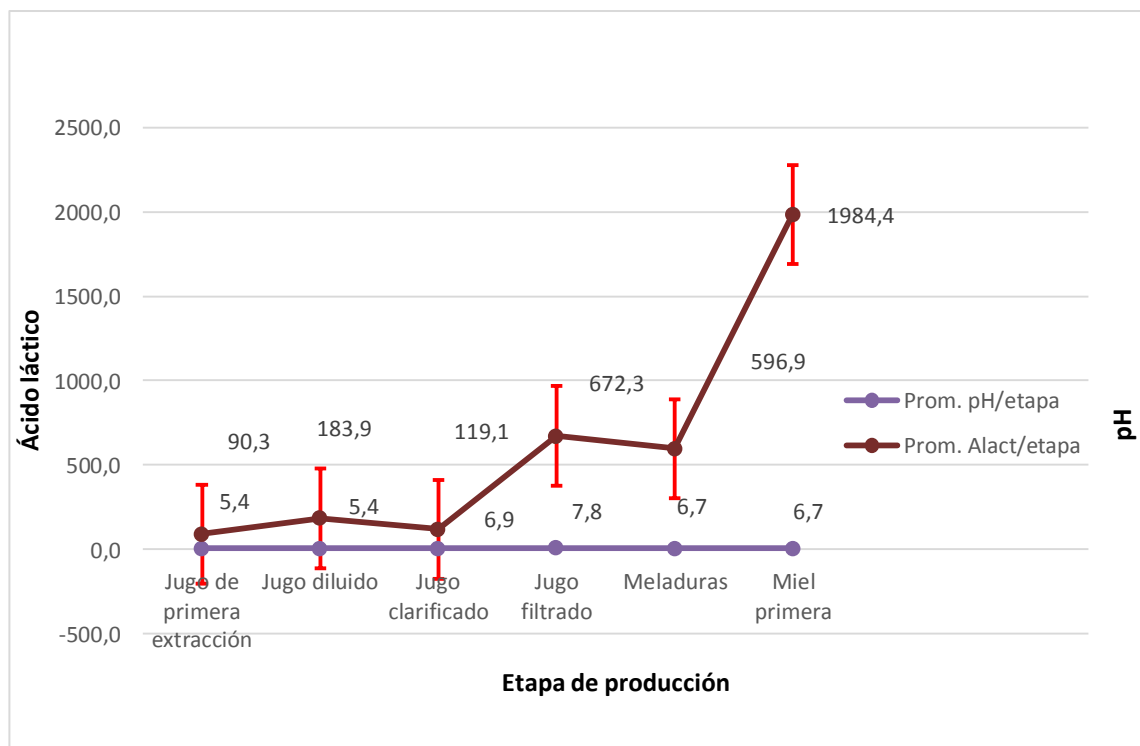


Figura 19. Promedio de ácido láctico ppm/bx y pH por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

En cuanto a las correlaciones entre recuento de *Leuconostoc spp* y características fisicoquímicas, se presentaron tres relaciones directas y tres relaciones inversas. Es importante analizar cada una de ellas dado el comportamiento que se evidencio en el análisis microbiológico, donde la carga de microorganismos *Leuconostoc spp* se ve gravemente afectada por la temperatura en las diferentes etapas del proceso de producción del azúcar.

En primera medida, es importante recordar que las relaciones inversas, ocurren porque ambas variables de estudio se comportan de manera contraria, es decir cuando una aumenta, la otra disminuye. Estos casos se presentaron en tres etapas, la primera de ellas en la correlación de recuento de *Leuconostoc spp* y °brix en la etapa de meladuras, esta situación ocurrió porque en etapas previas las altas temperaturas y los controles de pH eliminan en gran medida los microorganismos *Leuconostoc spp*, llegando a un valor de casi cero en las etapas finales. Sin embargo, en estas últimas etapas los niveles de °brix manifestaron su más alto valor generando una relación inversa, esto debido a la reducción en la temperatura y a otros posibles microorganismos no contemplados en este proyecto diferentes a los *Leuconostoc spp* que lograron sobrevivir hasta esta etapa y se encontraban en condiciones ideales de temperatura, pH y nutrientes (Sacarosa) para su desarrollo.

En la Figura 20, se evidencia la relación entre el promedio de recuento de *Leuconostoc spp* y °brix por etapa de producción de azúcar en el ingenio.

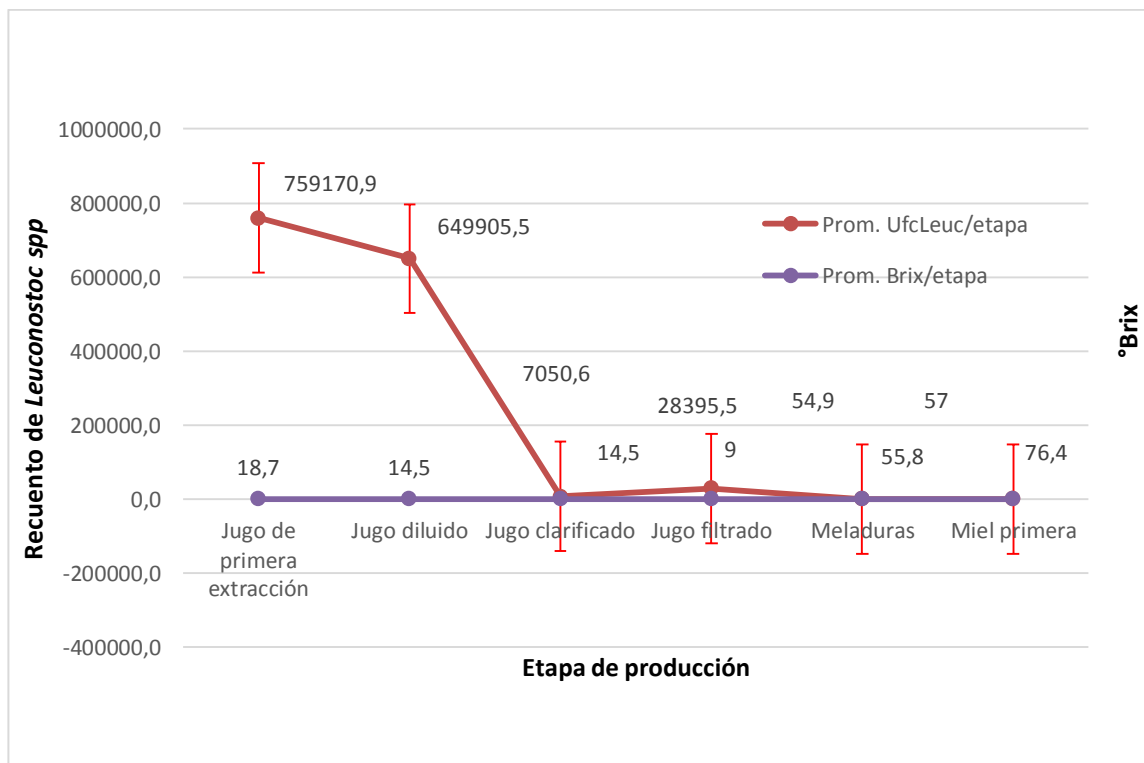


Figura 20. Promedio de Recuento de *Leuconostoc spp* y °brix por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

El segundo caso de relación directa se presenta en la correlación de recuento *Leuconostoc spp* y pureza, y su origen es el mismo que se mencionó anteriormente para la correlación de ácido láctico y esta variable, a medida que la contaminación aumenta, la pureza disminuye generando una relación inversa; este caso se presentó en la última etapa de producción en miel primera, donde la temperatura y el pH disminuyeron considerablemente generando un aumento leve del recuento de *Leuconostoc spp* viéndose afectada la pureza.

El tercer caso de relación inversa, se presenta en la correlación de estos microorganismos y los azúcares reductores en la etapa de jugo de primera extracción, esta situación ocurre dado que la caña seleccionada se encuentra en un estado de maduración ideal, por lo que su carga de azúcares reductores es

muy bajo. Sin embargo, la contaminación externa de la caña por el campo y por el procesamiento en el tándem y los molinos genera el valor más alto de contaminación por *Leuconostoc spp*, manifestando a nivel estadístico una relación inversa, situación que cambia en las etapas finales de producción donde el *Leuconostoc spp* alcanza valores cercanos a cero por efectos de la temperatura y el pH pero los azúcares reductores alcanza sus valores máximos; esto debido a la actividad microbiana durante el proceso de producción y posiblemente a microorganismos diferentes a los estudiados en este proyecto. En la Figura 21, se evidencia el comportamiento de azúcares reductores por etapa de producción de azúcar en el ingenio.

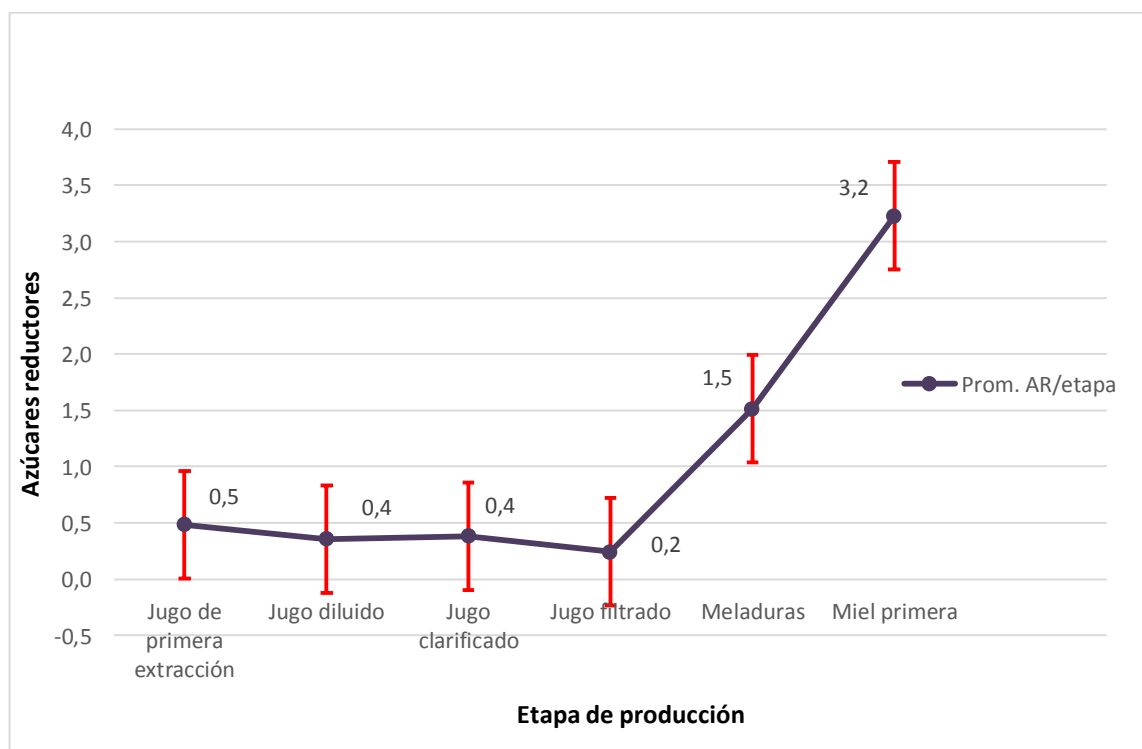


Figura 21. Promedio de azúcares reductores por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la correlación de recuento de *Leuconostoc spp* y características fisicoquímicas solo surgieron tres relaciones

directas, la primera de ellas asociada al pH en la etapa de filtrado donde ambas variables manifestaron un comportamiento de crecimiento. Es así como el pH se mantuvo controlado por el proceso inmediatamente anterior, Sin embargo, en este punto se pudo evidenciar un crecimiento exponencial de estos microorganismos, asociado posiblemente a la alta carga orgánica contenida en el material insoluble retenido en las bateas y filtros, para este caso esta relación no refleja el grado real del comportamiento entre la acción microbiana y el pH como indicador de la inversión de la sacarosa. Es decir que la etapa de filtración es un espacio apto para que sobrevivan microorganismos *Leuconostoc spp*, teniendo en cuenta el descenso de la temperatura en esta etapa del proceso donde se obtiene la separación de los lodos y se recupera líquido con contenido de sacarosa al proceso.

En la Figura 22, se evidencia la relación entre el promedio de Recuento de *Leuconostoc spp* y pH por etapa de producción de azúcar en el ingenio.

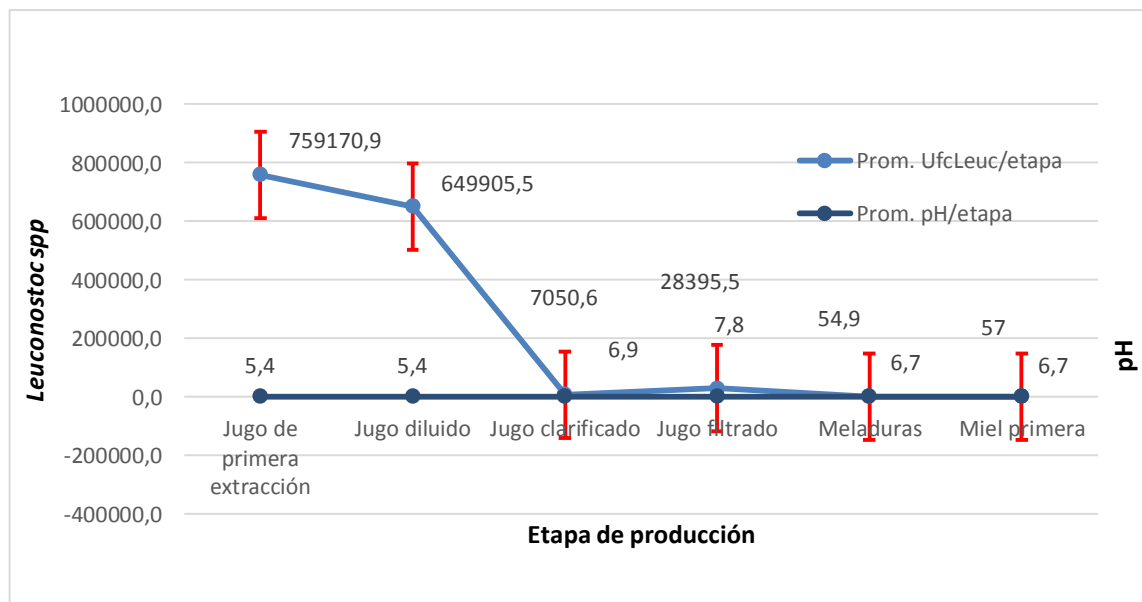


Figura 22. Promedio de recuento de *Leuconostoc spp* y pH por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

Las últimas dos relaciones directas en la correlación entre recuento de *Leuconostoc spp* y características fisicoquímicas, obedece solamente a dextranas en dos etapas de producción de azúcar, clarificado y filtrado. Estas relaciones representaron las correlaciones más fuertes de la investigación con un valor superior a 0,9 entre mayor sea la contaminación por estos microorganismos, mayor será la cantidad de generación de dextranas. Por lo puede inferirse que las etapas previas a la obtención de estos jugos, son los puntos críticos donde ocurre la mayor contaminación microbiológica, siendo donde se obtiene el jugo de primera extracción y el jugo diluido, etapa de molienda.

En la Figura 23, se evidencia la relación entre el promedio de recuento de *Leuconostoc spp* y dextranas por etapa de producción de azúcar en el ingenio.

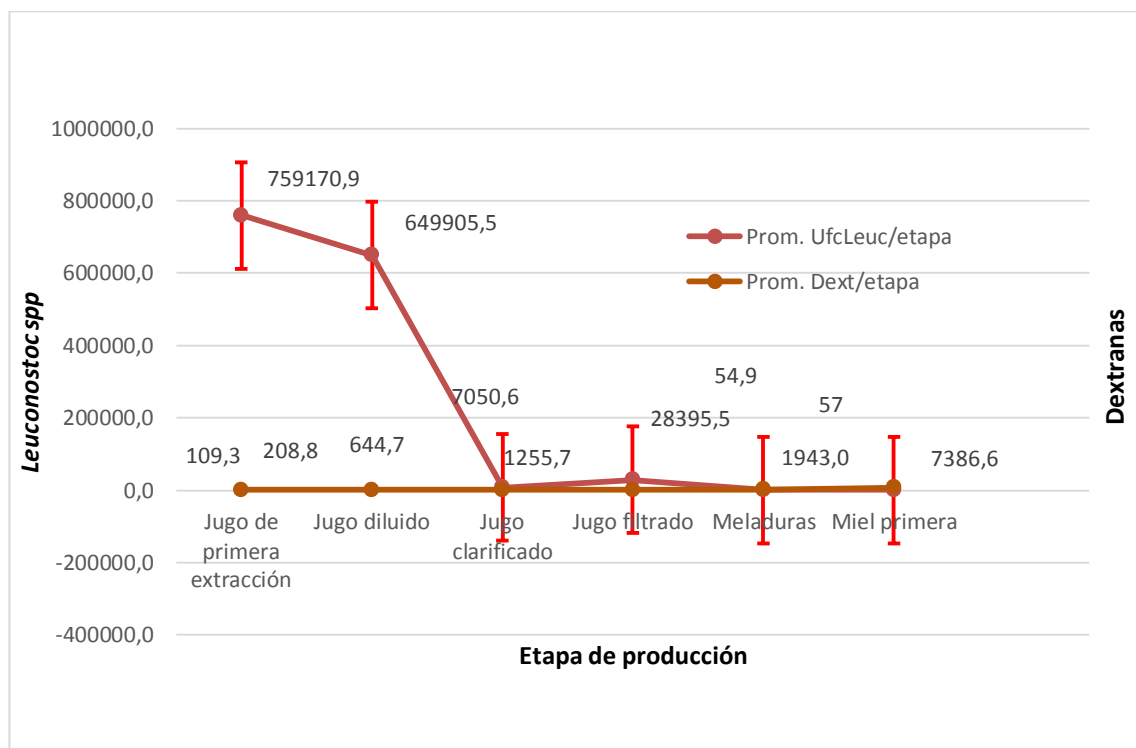


Figura 23. Promedio de recuento de *Leuconostoc spp* y dextranas por etapa de producción.

Fuente: Desarrollado por el autor.

5.3 CONTROLES PARA DISMINUIR LAS PÉRDIDAS DE SACAROSA DURANTE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCAR DE CAÑA EN EL INGENIO.

La actividad microbiana más evidente es causada por *Leuconostoc spp*, que es una bacteria formadora de limos o dextranas y ácido láctico. Estos limos son comúnmente encontrados en tándem de molinos donde no se da suficiente atención a la limpieza como se evidenció en el proceso investigativo.

Cada parte de ácido láctico formado equivale a aproximadamente ocho partes de Sacarosa pérdida en el tándem de molinos, donde esta razón es dependiente de la temperatura y otros factores (Mackrory et al., 1984). Para controlar estas pérdidas de Sacarosa, la primera clave es un lavado minucioso y regular de esta zona en la etapa de molienda.

Prevenir o limpiar cualquier vertimiento de jugo en el tándem para evitar que se convierta en un espacio idóneo para el cultivo microbiológico, en cada turno limpiar, con vapor saturado de escape o vapor o con agua caliente, todas las áreas accesibles de los molinos que están en contacto con el jugo. Prestar particular atención a las mallas de jugo, al interior de las cureñas y a los canales de jugo. En las paradas de mantenimiento, limpiar minuciosamente estas y otras áreas potenciales de contaminación tales como los extremos de las mazas, las bandejas de jugo, canales y tanques de succión de las bombas. Idealmente, se debe limpiar con vapor durante suficiente tiempo para incrementar la temperatura de las superficies hasta más de 75 °C durante al menos uno o dos minutos. Algunos molinos utilizan bandejas de jugo, canales de jugo y tanques de succión de cobre, lo cual inhibe el crecimiento del *Leuconostoc spp* (Peter, 2012).

La esterilización química utilizando bactericidas y biocidas puede ser muy efectiva. En la industria existen diferentes productos comerciales disponibles, utilizando compuestos tales como amonio cuaternario, derivados halógenos

(blanqueadores), *tiocarbamatos*, *formaldehidos* y compuestos de azufre. Cada uno tiene ventajas y desventajas y no todos tienen aprobación para su uso en plantas de alimentos. El uso inadecuado del amonio puede provocar toxicidad en el producto, hacer que pierda su coloración blanquecina y alterar los niveles de pH por ende promoviendo a la pérdida de sacarosa por afectar el control de esta característica físico química. Resultados obtenidos en diferentes países han mostrado que la eficacia de estos productos puede variar ampliamente con las condiciones locales y cuando sea posible se deben probar productos alternativos como el uso de vapor o agua caliente como se mencionó anteriormente, además de ser mucho más económico y amigable con el medio ambiente. Un ensayo microbiológico completo sería la medición más confiable, pero el monitoreo cuidadoso del ácido láctico en el jugo mezclado brinda una guía más simple (Chauwin et al., 2015).

El rango de pH encontrado en los molinos y difusores entre 5.0 y 6.5 no tiene un efecto significativo sobre la actividad microbiológica. Para el control de la actividad microbiana en molinos se requiere simplemente operar con una temperatura promedio de aproximadamente 85 °C. Esto asegura que la temperatura en ninguna de las etapas estará por abajo de 75 °C, la cual es considerada como mínima temperatura de operación. Se debe instalar suficiente capacidad en los calentadores de jugo a la entrada del difusor, con el objeto de alcanzar una temperatura del colchón de por lo menos 75 °C dentro de la primera etapa. Bajo estas condiciones, el jugo mezclado que sale del difusor se encuentra a una temperatura de aproximadamente 60 a 65 °C. Si las temperaturas se mantienen por encima del valor mínimo mencionado no es necesario utilizar biocidas. Las pérdidas de Sacarosa en la etapa de molienda pueden llegar a ser muy elevadas si las temperaturas no se mantienen por encima de 70 °C (Peter, 2012).

Uno de los mayores efectos de la contaminación microbiana es la generación de ácido láctico, el cual puede ser determinado de manera rutinaria con la técnica de Reflectometría, utilizando tiras de ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico MERCK®, usando como equipo el reflectómetro Reflectoquant RQflex plus 10 MERCK®, el cual permite realizar análisis cuantitativos en aproximadamente cinco minutos, registrando el valor obtenido en mg/l empleado en este proyecto de investigación. Adicionalmente, los casos severos de pérdidas microbiológicas serán evidentes en correspondientes caídas de la pureza del jugo. La medición rutinaria del ácido láctico en el jugo se recomienda como medición de control. Un promedio de 300 mg/kg de ácido láctico por RDS representa un valor realista tanto para un tandem de molinos como para los difusores (Peter, 2012).

En el proceso investigativo, también se identificó la etapa de filtración como punto clave de contaminación por la disminución de la temperatura, lo que potencializa el crecimiento microbiano por el alto material orgánico contenido en los sólidos retenidos en las mallas de los filtros y bateas proporcionando un entorno ideal para la fermentación de la Sacarosa.

El diseño del sistema de cernido debe contar con áreas de drenaje adecuadas con elementos metálicos limpios, así como mínimos recodos o ranuras que puedan promulgar el desarrollo de organismos. El área bajo las mallas de difícil acceso es particularmente crítica. Es necesario efectuar una limpieza rutinaria de las mallas y de los elementos metálicos que se encuentran alrededor. La limpieza con vapor es el método más efectivo pero exige mano de obra significativa. Los biocidas pueden ser también efectivos cuando se usan apropiadamente. Las mallas rotativas pueden ser diseñadas para funcionar en forma más higiénica. Las boquillas de dispersión de vapor (spray) montadas cerca del tambor son efectivas para la limpieza del tambor y no requieren trabajo adicional cuando se operan mediante un temporizador (Peter, 2012).

6 CONCLUSIONES

Después de todo el proceso investigativo y de los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

- La etapa de contaminación microbiológica más crítica determinada en el estudio fue la molienda, donde hubo un incremento significativo de factores de contaminación asociados a *Leuconostoc spp.*
- Las poblaciones microbiológicas de *Leuconostoc spp* presentes en el jugo de primera extracción en la etapa de molienda permanecieron con un recuento constante en los siguientes puntos donde se tomaron las muestras, a excepción del 4º molino, en donde los resultados evidenciaron un descenso por la temperatura.
- La temperatura y los controles de pH, intervinieron como un factor determinante en la proliferación y supervivencia de los microorganismos, notándose que en las etapas finales del proceso de fabricación del azúcar de caña, el recuento de microorganismos *Leuconostoc spp* es cercana a cero por las altas temperaturas.
- Entre los parámetros fisicoquímicos determinados, solo las dextranas en los jugos de caña fueron indicadores apropiados de la población microbiológica presente.
- La concentración del ácido láctico producida fue inversamente proporcional al recuento microbiano, lo que indica la actividad de microorganismos diferentes a *Leuconostoc spp* implicados en la producción de ácido láctico, sobrevivientes al incremento térmico y las condiciones extremas de pH.

7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que en trabajos futuros se realice un análisis, seguimiento e identificación de microorganismos diferentes a *Leuconostoc spp* para hacer el control respectivo.
- Continuar con los análisis de ácido láctico determinados por la fábrica producto del estudio realizado en este proyecto para identificar las fuentes de contaminación más críticas por tiempos de retención o permanencia de jugos.
- Considerar otras variables como la actividad de enzimas involucradas en la degradación y pérdida de Sacarosa.
- Implementar el uso de vapor o agua caliente como principal control de actividad microbiana, al ser una estrategia económica, amigable con el medio ambiente y de fácil manejo rutinario.
- Continuar con las investigaciones para la clasificación y cuantificación de la actividad microbiana en el tándem que permitan identificar los diferentes microorganismos a nivel de géneros y especies más frecuentes para determinar su incidencia en la pérdida de Sacarosa en la etapa de molienda, como punto crítico de contaminación microbiana. Los resultados de correlación en esta etapa evidenciaron la incidencia de microorganismos diferentes a los *Leuconostoc spp* por la continua generación de ácido láctico y dextranas en todo el proceso productivo de azúcar y los recuentos de *Leuconostoc spp* llegaron casi a cero al final de este.

- Determinar mejores controles de limpieza y asepsia en las superficies de contacto con la caña desde que es traída de los campos de cosecha, hasta que llega a la etapa de molienda y generación del jugo de primera extracción, para evitar la contaminación cruzada por estas superficies.
- Mantener los controles de limpieza y desinfección en el área de filtros, con incrementos de temperatura a través de la línea de retorno del jugo filtrado al proceso, para evitar la proliferación bacteriana que re contamine las primeras etapas del proceso, como es el jugo mezclado.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, G. (04 de 2012). *Comparación entre dos métodos para la reducción de cargas bacterianas en molinos de una industria azucarera*. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/22/22_0175.pdf
- Arunachalam, M., Limayem, A., & Ricke, S. (2011). Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Elsevier*.
- Blanco, V., & Carbajal, S. (09 de 2013). *Determinación microbiológica, pH, acidez y grados brix en bebidas carbonatadas de máquinas dispensadoras en los food court de metrocentro, San Salvador*. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4716/1/16103387.pdf>
- Brotherton G.A.; Noble A.G. (1982): Performance and capacity of juice screening systems. *Sugar Cane Technol.*
- Cenicaña. (2004). *Proceso de obtención de azúcar*. Obtenido de http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php
- Chauwin, J., Launay, B., & van Haute, E. (2015). The use of monochloramine to replace formaldehyde in the sugar beet process (extraction). *semanticscholar*.
- Eggleston, G. (2002). Deterioration of cane juice—sources and indicators. *Elsevier*.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheuneman, C. (2003). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Elsevier*.

- Hernández , N., Pérez , M., Dauval , C., & Herrera , N. (1977). Acción de las levaduras sobre los componentes de jugo de caña. Centro Azúcar. *Portal Pedrosa A.*
- Herrera, A. (2011). *Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio Pichichí S.A.* Obtenido de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2085/6641227H565.pdf;jsessionid=3A112AA3006541D4C15BDD4F0683066B?sequence=1>
- Jimenez, R. (1998). *Metodología de la investigación.* Obtenido de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/bioestadistica/metodologia_de_la_investigacion_1998.pdf
- Larrahondo, J. (1995). *Calidad de la caña de azucar.* Cali: Cenicaña.
- Mackrory , L., Cazalet , J., & Smith , I. (1984). A comparison of the microbiological activity associated with milling and come diffusion. *Sugar Technol.*
- Mazzolia, R., Bosco, F., Mizrahi , I., Bayerd, E., & Pessionea , E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Elsevier - Biotechnology Advances.*
- Mccleskey, C., Faville, L., & Barnett, A. (1947). Characteristics of leuconostoc mesenteroides from cane juice. *Louisiana State University.*
- Peacock S.D: Lave D.J. (2004): Clear juice heaters - do we need them?. *Sugar Technol. Ass.*
- Peter, R. (2012). *Ingeniería de la Caña.* Berlín, Alemania: Elbe Druckerei Wittenberg.
- Purushe, S., Prakasha, D., Nawani, N., Dhakephalkarc, P., & Kapadnisa , B. (2012). Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. *Elsevier.*

- Rein, P. (2013). Recent developments in sugarcane processing. *Louisiana State University*. .
- Sánchez, J. (2005). *Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos*. Obtenido de <http://digital.csic.es/handle/10261/4796>
- Serrano, L. (02 de 2006). *Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio Manuelita S.A.* Obtenido de <https://docplayer.es/12697881-Laura-serrano-galvis-trabajo-de-grado-presentado-como-requisito-parcial-para-optar-al-titulo-de-microbiologo-industrial.html>
- Singh, P., Solomon , S., Prajapati , C., Kumar, S., Misra, V., & Chandra, A. (2015). Deterioration of fresh and stale cane juice at high ambient temperature in relation to expression of invertases and the growth of *Leuconostoc* sp. *Indian Institute of Sugarcane Research*.
- Solomon, S. (2009). Post-harvest deterioration of sugarcane. *Indian Institute of Sugarcane Research*.