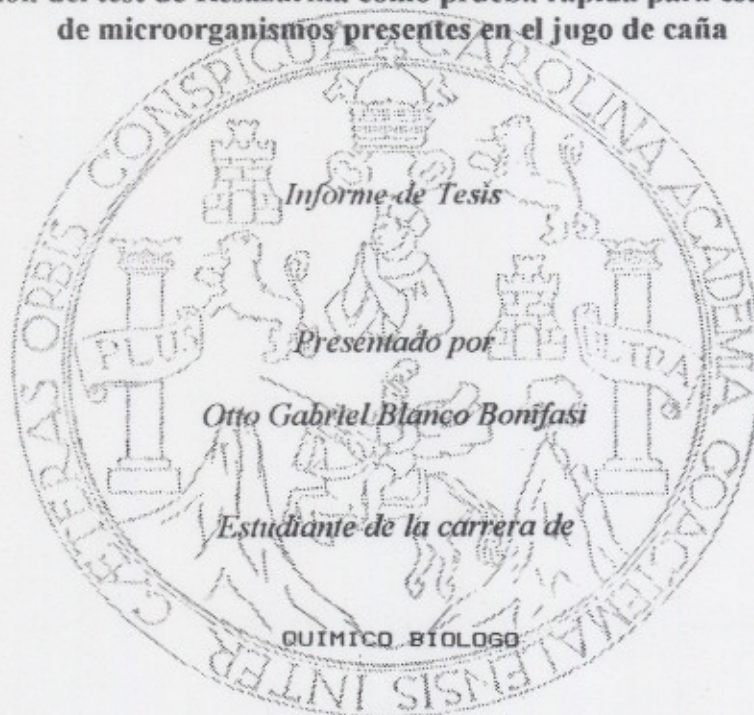


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Implementación del test de Resazurina como prueba rápida para estimar el número
de microorganismos presentes en el jugo de caña



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, octubre de 1995

DL
06/15
+ (1674)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

- DECANO LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR**
- SECRETARIA LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE**
- VOCAL I LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ**
- VOCAL II LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN**
- VOCAL III LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME**
- VOCAL IV BR. ANA MARIA RODAS CARDONA**
- VOCAL V BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA**

DEDICATORIA

A Dios

A la Virgen Santísima

A mis padres Guillermo Blanco Moreira y Sara Rudbi Bonifasi de Blanco

A mi esposa Rossana María Llerena Quan de Blanco

A mis hijos Pablo Gabriel y José Luis

A mis hermanos Luis Guillermo, Norma Iliana, Carmen y Fernando

A mis suegros Mario Leon Llerena Estrada y Lily Quan Ma de Llerena

A la familia Estrada García

A mis cuñados

A José Ramón Alvarez y Sra.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a la Licda. Diana Freire de Nave por su asesoría y consejos brindados para la elaboración de esta tesis. Al Lic. Oscar Monzón por su colaboración en la realización del proyecto. Al Ingenio Pantaleón por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación. A Lucy Santis por su valiosa colaboración y apoyo moral.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
3.1 Generalidades del proceso	4
3.2 Molienda	5
3.3 Caña de Azúcar	6
3.4 Microbiología de la caña de azúcar	7
3.5 Composición química del jugo de la caña	8
3.6 Medidas cuantitativas de microorganismos	10
4. Justificación	13
5. Objetivos	14
6. Hipótesis	15
7. Materiales y Métodos	16
7.1 Universo de Trabajo	16
7.2 Medios	16
7.3 Procedimiento	17
7.4 Diseño Experimental	19
8. Resultados	20
9. Discusión de Resultados	23
10. Conclusiones	25
11. Recomendaciones	26
12. Referencias	27
13. Anexos	30
13.1 Diagrama de flujo del proceso	30
13.2 Microorganismos en caña de azúcar	31

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

13.3 Composición de la caña de azúcar y del guarapo	32
13.4 Degradación de la sacarosa	33
13.5 Cálculos estadísticos	34

1. RESUMEN

El control de calidad microbiológico en jugos de caña es muy importante para los ingenios azucareros de Guatemala, en estas fábricas se reportan pérdidas por acción microbiana, sin embargo no se han realizado estudios que permitan establecer mejoras y nueva información para poder encontrar medidas más efectivas. El propósito de este estudio fue implementar el test de resazurina como prueba rápida para estimar el número de microorganismos presentes en el jugo de caña.

Para el efecto se realizó un estudio comparativo entre los recuentos aeróbicos en placa de jugos de caña y la respuesta de las mismas muestras al test de resazurina. Para esto se incluyeron 10 muestras de jugo de caña las cuales fueron analizadas por triplicado por los dos métodos. Dicho estudio se realizó en el Ingenio Pantaleón S.A., obteniéndose las muestras de caña en la misma finca. Las muestras de caña fueron llevadas a las instalaciones del ingenio donde se extrajo el jugo de caña utilizando el laboratorio del mismo ingenio para correr las pruebas.

Para la investigación se tomó como metodología de referencia el recuento aeróbico en placa de jugos de caña el cual ha sido utilizado y aceptado como la metodología oficial en el control de calidad microbiológico de jugos de caña. Paralelamente se corrió el test de resazurina el cual es un método que se basa en la reducción del colorante por acción microbiana.

Se encontró una correlación lineal de -0.9853 entre los dos métodos, hallándose una ecuación de predicción para poder encontrar el número de microorganismos conociendo en forma indirecta los tiempos de reducción de resazurina.

2. INTRODUCCION

La fabricación de azúcar en Guatemala, se lleva a cabo mediante la obtención de sacarosa a partir de la caña de azúcar. El proceso se inicia en la estación de molinos cuando es extraído el jugo que trae la caña. Las características fisicoquímicas del jugo de la caña hacen de él un medio adecuado para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. La estación de molinos es una etapa en la tecnología del proceso del azúcar donde la actividad microbiana es más pronunciada. Esta actividad resulta en la destrucción de sacarosa y la incorporación de productos metabólicos, los cuales causan molestias en etapas tardías del proceso (1).

En la industria de la caña de azúcar esta actividad esta altamente favorecida por las condiciones en que se extrae el jugo, en el cual la temperatura no se eleva a temperaturas de inhibición del crecimiento microbiano (1).

Las características de la microbiota del jugo de la caña varían dependiendo de las condiciones en que la caña es recibida, es decir su tiempo entre el corte y la entrega, condiciones de enfermedad de la caña, acción de insectos y roedores sobre ésta (1,2).

En cuanto a los análisis de laboratorio no se posee ninguna forma de control en la estación de molinos. En el presente estudio se pretende correlacionar el recuento aeróbico en placa (CAP) y el test de resazurina para detectar los cambios en la población microbiana del jugo extraído por los molinos. Además se propone el test de resazurina

como un método rápido para estimar el número de microorganismos presentes en los jugos de caña.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del proceso

El proceso de la caña de azúcar se inicia cuando ésta es cortada en el campo. Es transportada a la fábrica donde recibe varios lavados antes de pasar a la estación de molido (1,2).

La caña es descargada en los conductores que la llevan directamente a los molinos, por lo general son 7 molinos en los cuales se extrae el jugo que contiene la caña en un 85 a 90% dependiendo de la eficiencia de esta etapa. El jugo es bombeado de los molinos a una torre de sulfitación donde el jugo se hace pasar a contracorriente con anhídrido sulfuroso. Con esto se pretende reducir compuestos que le dan color al azúcar además de desnaturalizar proteínas presentes en el jugo. El jugo en forma continua pasa a un gran tanque donde se agrega cal para ascender el pH a valores entre 7.0-7.5. El jugo ya alcalinizado (jugo tratado con cal) es pasado por unos calentadores que lo llevan a temperaturas de 110°C. Inmediatamente el jugo ya calentado pasa a unos clarificadores donde se separa el sedimento o precipitado que se ha formado en las etapas anteriores. Este jugo se denomina jugo clarificado, éste es bombeado a los evaporadores donde se procede a eliminar agua por evaporación hasta concentrar el jugo a un °Brix de 60, con esto se pretende concentrar la sacarosa presente, pero sin llegar al punto de sobresaturación y consecuente cristalización de la sacarosa. En los tachos (evaporadores al vacío) se llega al punto de cristalización, esta mezcla es centrifugada para separar los sólidos de la miel (1,3)(anexo 13.1).

3.2 Molienda

La caña ya pesada y lavada es conducida a los molinos donde pasa por una serie de cuchillas (picadoras), que cortan la caña en pedazos, con ésto se consigue una mejor preparación de la caña para la molienda, aumentando el área de contacto entre los molinos y la caña. La combinación de tres masas dispuestas en forma triangular es la unidad de molienda. La caña se hace pasar por cada molino dándole una presión de 2000 PSI. Al mismo tiempo se agrega agua para aumentar la extracción del jugo. El jugo que sale del primer molino se llama jugo primario, el cual no contiene agua de dilución, el jugo ya mezclado con agua se llama jugo diluído. El jugo diluído es bombeado al departamento de evaporación.

Los molinos están impulsados por turbinas de vapor. El vapor se obtiene por la quema del bagazo que sale del último molino (3).

2.2.1 Imbibición

Proceso en el cual se aplica agua o jugo al bagazo para diluir y mezclarse con el bagazo que tiene este último.

El agua que se agrega a los molinos proviene de los condensados de evaporadores y tachos, éstos al llegar a los molinos poseen una temperatura entre 50 y 60 °C (4).

3.2.2 Eficiencia de la molienda

La eficiencia de la molienda se suele expresar en función del porcentaje total de sacarosa que contiene la caña extraída del guarapo, es decir sacarosa en jugo, en función

de sacarosa en caña. Existen otros factores que son independientes del funcionamiento mecánico de los molinos que influyen en porcentaje de extracción. Esto es la pérdida de sacarosa por la actividad microbiana la cual no se cuantifica, pero se estima que depende de las condiciones higiénicas de los molinos. Estas pérdidas se incluyen dentro de las pérdidas denominadas indeterminadas, esto se logra haciendo un balance de masa en el proceso. Estudios han demostrado que un poco de bagazo acidulado puede infectar la totalidad de guarapo que sobre él fluye. Los diseños más modernos de molinos evitan todos los pernos salientes y también las esquinas muertas en los canales del guarapo. En la actualidad los diseños modernos de transportadores de bagazo y todas las partes móviles del sistema de molinos se hacen más accesibles a la limpieza. Debe reconocerse que el guarapo ofrece un medio ideal para la propagación de microorganismos, y que para evitar tales propagaciones el jugo debe ser bombeado rápidamente a la fábrica. El lavado de molinos con agua a alta temperatura y presión es una buena medida para reducir las pérdidas, ya que esta agua a presión desplaza los acumulados que se forman en el colador de jugo y elevadores. La medición del aumento de la acidez del jugo de caña a intervalos a lo largo de los molinos ha indicado acidulación excesiva en algunas pruebas (3).

3.3 Caña de Azúcar

La caña de azúcar es una hierba gigante que pertenece al género **Saccharum**. Las amplias variaciones en el tamaño, el color y el aspecto son resultado de las diversas condiciones de terreno, del clima, métodos de cultivo y de la selección local. En la actualidad la mayor parte de autoridades en la materia reconocen cinco especies: S.

sinense, S. barberi, S. spontaneum, S. robustum y S. officinarum. La planta cultivada de la caña de azúcar es víctima de numerosas enfermedades y plagas, muchas de las cuales han cambiado la historia de la industria en diversas partes del mundo debido a susceptibilidad a enfermedades, como el virus del mosaico o la acción de ciertas bacterias como xantomonas. De las plagas de insectos, la polilla barrenadora ha sido especialmente destructiva en el hemisferio occidental (5).

3.4 Microbiología de la Caña de Azúcar

La caña de azúcar posee una microbiota muy variada la cual tiene significado en el papel que toman los microorganismos en la fabricación de azúcares. Algunos estudios han demostrado que la cantidad de bacteria viables varía desde la pequeña cantidad que se encuentra en cañas cultivadas en montañas hasta la elevada cantidad que se encuentra en lugares cercanos a las costas. El tipo predominante que se encontró pertenece al género Bacillus sp. estudios de Honig demuestran que la microbiota varía según el tipo de suelo, clima, plagas (5).

Cuantitativamente, las hojas enfermas de los tallos contienen una mayor concentración de bacterias que las hojas normales. Se reconocen aproximadamente cincuenta microorganismos, entre éstas las más importantes Leuconostoc mesenteroides , Sacharomyces sp , Aerobacter aerógenes, Bacillus mesentericus , Pseudomona sp, Bacillus cereus, Penicillium sp, Actinomyces sp, Streptomyces sp. (5,6)(anexo 13.2).

La bacteria Leuconostoc mesenteroides es un microorganismo que se ha comprobado su propiedad para producir dextranos, el cual lo obtiene durante la degradación de la

sacarosa. La dextrana se encuentra presente en la caña que se ha dejado en el campo durante más de veinticuatro horas, desde el momento de su corte. La dextrana aparece en el jugo de caña, lo cual indica destrucción de sacarosa, puede ser un índice de la calidad microbiológica del jugo. Se puede determinar si la formación de dextrana es en el campo o se debe a condiciones de no asepsia en los molinos (7,19-21) (anexo 13.4).

Recientemente se identificó a Leuconostoc dextranicum en los jugos de caña como bacteria productora de dextrana a partir de la sacarosa, aunque se encuentra en menor cantidad que Leuconostoc mesenteroides (8).

El efecto de los microorganismos en la fabricación de azúcar es muy importante, la caña de azúcar lleva a los molinos una gran cantidad de microorganismos viables, la mayoría quedan en el jugo extraído, donde si la temperatura es apropiada para el crecimiento, el desarrollo microbiano se presenta inmediatamente. La aplicación de bactericidas para evitar pérdidas en la fábrica parece justificable. La producción de dextrana aumentan las dificultades para clarificar los jugos, además de interferir en la cristalización de la sacarosa. El principal problema de las refineras en relación con los microorganismos no es la acción de estos organismos, sino el hecho de que cierto número de ellos permanece en el producto final y puede resultar insatisfactorio para el consumidor industrial del azúcar (9) (anexo 13.2).

3.5 Composición Química del jugo de Caña

Existen diferencias entre la composición del jugo, dependiendo de las condiciones de cultivo, clima, especies de caña, tipo de suelo, variedades de caña susceptibles a ciertas

infecciones. Estas diferencias son más cuantitativas que cualitativas. La caña contiene un alto porcentaje de agua, el resto es fibra y sólidos suspendidos, entre éstos predomina la sacarosa, fructosa y glucosa (11).

3.5.1 Azúcares

El valor comercial de la caña de azúcar deriva de la preponderancia de la sacarosa como constituyente del jugo de la planta madura, los otros azúcares importantes que se encuentran presentes en concentraciones substanciales son la glucosa y fructosa. La sacarosa se hidroliza con facilidad en soluciones ácidas a velocidades que aumentan notablemente según el aumento de temperatura y de la disminución del pH, con la liberación de los monosacáridos constituyentes. A esta reacción hidrolítica se aplica generalmente el nombre de inversión, ya que produce un cambio de la actividad óptica dextrógira propia de la sacarosa a una actividad neta levógira equivalente a -39.5° .

Los constituyentes minerales se determinan por incineración de la muestra, pero no es una medida directa de la concentración de sales que existe en el guarapo. Sólo se puede determinar el contenido verdadero de sales por medio de determinaciones de los ácidos y las bases individuales, ya que los ácidos orgánicos rinden carbonatos al ser incinerados, pero no en cantidades plenamente originales a los ácidos originales. Otros constituyentes como ácidos orgánicos, proteínas, almidón, gomas naturales, son compuestos que se encuentran dentro del jugo (10-13) (anexo 13.3).

3.6 Medidas cuantitativas de microorganismos

La metodología para el recuento de microorganismos se clasifica en métodos directos o métodos indirectos, entre los primeros se encuentra el conteo directo al microscopio, recuento aeróbico en placa, pesando masa celular o midiendo el contenido de nitrógeno en ésta. Los métodos indirectos son aquellos que relacionan el grado de actividad bioquímica al tamaño de la población microbiana (22).

3.6.1 Test de resazurina

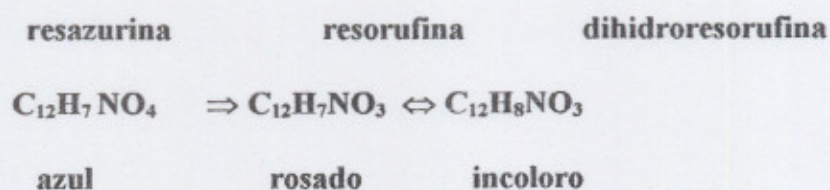
Recientemente se ha tratado de estimar el número de microorganismos por reacciones de reducción de colorantes, siendo la resazurina un colorante que ha dado resultado para estimar en forma indirecta pero rápida el número de microorganismos en jugos de caña (11,13).

El color de la resazurina a pH neutro es azul, cuya fórmula molecular es $C_{12}H_7NO_4$, este compuesto se reduce a resorufina ($C_{12}H_7NO_3$) que se observa de color rosado, el color va cambiando paulatinamente durante la reacción hasta llegar a su color plenamente rosado, este cambio no es reversible, detectándose a un potencial de oxido-reducción entre 0.2 y 0.05 voltios (12,13).

FUNDACION DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Centro

La reducción del colorante de azul original al rosado parece ser más independiente del contenido de oxígeno y del potencial de oxido-reducción que el cambio de rosado a incoloro que es la segunda etapa la cual es reversible, pasando de resorufina a dihidroresorufina ($C_{12}H_8NO_3$), estos ensayos no deben realizarse en plena luz del sol ya que pueden producirse cambios rápidos en el color (13).

La comprensión de los potenciales de oxidación-reducción, explica las relaciones de los microorganismos con el oxígeno y su interacción con colorantes como la resazurina y el azul de metileno. El potencial de oxidación-reducción es una medida de la tendencia de un sistema reversible a aceptar o donar electrones. En sistemas biológicos tales como los cultivos de microorganismos las reducciones y las oxidaciones son la fuente de energía para los procesos celulares. Los productos de fermentación son resultado de las reacciones de oxidación-reducción que han tenido lugar en las células. En estas reacciones es donde entra en juego la resazurina, ya que ésta se reduce en presencia de cierto tipo de microorganismos presentes en los jugos de caña, cambiando su color de forma oxidada a forma reducida (3,14-16).



2.6.2 Recuento aeróbico en placa para jugos de caña

Existe varias formas de estimar el número de microorganismos totales en los jugos de caña, entre éstos el recuento aeróbico es el método oficial de la Asociación de Metodología y Análisis del Azúcar (ICUMSA) (18).

En este procedimiento se introduce una cantidad medida de inóculo a una caja de petri, después de esto se adiciona agar fundido el cual mediante agitación rotatoria de la caja, se mezcla al inóculo. Cuando el medio se solidifica los microorganismos quedan atrapados en

el agar. Se da por supuesto que cada microorganismo se desarrolla y se reproduce hasta formar una masa visible de microorganismos , o sea una colonia. La técnica de conteo en placa para jugos es un método oficial utilizando agar plate count , lo cual ha dado resultados satisfactorios para estimar carga microbiana (19-21).

4. JUSTIFICACIÓN

La inversión de sacarosa por acción microbiana representa un problema en los ingenios azucareros de Guatemala, a pesar que éstos gastan una cantidad considerable de dinero en bactericidas. El recuento aeróbico en placa en jugos de caña se ha ensayado en algunos ingenios pero no ha sido de gran ayuda debido a que los resultados se obtienen después de 24 horas de cultivo, por lo que no se pueden tomar decisiones tendientes a corregir el proceso. La adopción en los ingenios azucareros de una prueba rápida y relativamente sencilla como la prueba de resazurina, que refleje un estimado de la población microbiana presente en los jugos de caña podría ser una herramienta útil en el proceso y poder tomar las medidas preventivas en el momento justo.

5. OBJETIVOS

- 5.1 Establecer la relación entre los tiempos de reducción de resazurina y los recuentos aeróbicos en placa de los jugos de caña.
- 5.2 Implementar la prueba de resazurina al proceso de control de calidad de los jugos de caña.

6. HIPÓTESIS

El tiempo de reducción de resazurina se asocia con los recuentos aeróbicos en placa de jugos de caña.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de Trabajo

Muestras de jugo de caña extraídas por un molino de rodillo de cuatro masas.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos

7.2.1.1 Otto Blanco Bonifasi (investigador)

7.2.1.2 Diana Freire (asesor)

7.2.2 Recursos institucionales

7.2.2.1 Ingenio Pantaleón S.A.

7.2.2.2 Ingenio Concepción S.A.

7.2.3 Recursos Materiales

7.2.3.1 Materiales y equipo

7.2.3.1.1 Tubos de ensayo pyrex de 16 x 125 mm

7.2.3.1.2 Pinzas para tubo de ensayo

7.2.3.1.3 Gradillas

7.2.3.1.4 Pipetas volumétricas de 1 y 10 ml

7.2.3.1.5 Cajas de petri

7.2.3.1.6 Asa

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

7.2.3.1.7 Mechero

7.2.3.1.8 Erlenmeyer de 250ml

7.2.3.1.9 Incubadora

7.2.3.1.10 Baño de María

7.2.3.1.11 Autoclave

7.2.3.1.12 Cronómetro

7.2.3.2 Reactivos

7.2.3.2.1 Resazurina

7.2.3.2.2 Agar plate count

7.3 Procedimiento

7.3.1 Obtención de muestra

Se extrajo el jugo de caña haciendo pasar caña por un molino de rodillo de cuatro masas , a una presión de 2000 PSI, se tomaron 11 ml por cada muestra

7.3.2 Procesamiento y análisis de muestras

7.3.2.1 Prueba de resazurina

7.3.2.1.1 Reactivos
Resazurina

7.3.2.1.2 Preparación

7.3.2.1.2.1 Esterilizar 200 ml de agua en un balón de 200 ml

7.3.2.1.2.2 Agregar 11 mg de Resazurina al balón y disolver

7.3.2.1.2.3 Trasvasar a frasco oscuro previamente autoclaveado

7.3.2.1.3 Procedimiento

7.3.2.1.3.1 Medir 10 ml de jugo de caña y transferir a tubo ensayo

7.3.2.1.3.2 Agregar 1 ml de reactivo de resazurina

7.3.2.1.3.3 Tapar tubos y colocarlo en incubadora a 36°C

7.3.2.1.3.4 Programar cronómetro para medir tiempos de reducción

7.3.2.1.3.5 Observar tubos cada 30 minutos

7.3.2.1.4 Interpretación

El cambio de color de morado a rosado es indicativo de reducción anotando tiempo de reducción de la muestra

7.3.2.2 Recuento aeróbico en placa para jugos de caña

De las muestras tomadas para el test de resazurina simultáneamente se tomó 1 ml para realizar recuento aeróbico en placa.

7.3.2.2.1 Preparación

7.3.2.2.1.1 Pesar 22.5 grs de Agar Plate Count por 1000 ml de solución

7.3.2.2.1.2 Preparar 1000 ml de agua estéril y agregar agar, hirviendo a la solución.

7.3.2.2.1.3 Autoclavear a 121°C durante 15 minutos

7.3.2.2.2 Procedimiento

7.3.2.2.2.1 Preparar 3 erlenmeyer con 99 ml de agua estéril cada uno

7.3.2.2.2.2 Tomar 1 ml de muestra y hacer diluciones seriadas

7.3.2.2.2.3 De la dilución de 1:1000000 tomar 1 ml y colocarlo en caja

7.3.2.2.2.4 Vaciar 20 ml aproximadamente de agar fundido a 50°C sobre cada alícuota sembrada y mezclar rotando suavemente la caja

7.3.2.2.2.5 Colocar las cajas en una incubadora, en forma invertida para evitar que se condense agua en el medio de cultivo

7.3.2.2.2.6 Contar el número de colonias y reportar el número en UFC/ml

7.4 Diseño Experimental

Este proyecto se desarrolló comparando los resultados de los tiempos de reducción de cada muestra, contra los resultados de recuento aeróbico en placa de la misma. Se tomó una muestra de jugo de caña y de ésta se hizo diluciones de 1:1 hasta 1:10, obteniendo un total de 10 muestras; a cada una de estas diluciones se le hizo recuento aeróbico en placa y la prueba de resazurina simultáneamente y por triplicado. Los resultados se tabularon y se analizaron por regresión lineal, comparando pendientes, encontrando la ecuación de regresión y validándola.

- **Asociación :** r (coeficiente regresión lineal) y t (pendientes)
- **Regresión :** ecuación de predicción $Y = B_0 - M_1X$ $Y = \text{test resazurina}$ $X = \text{RAP}$

8. RESULTADOS

El estudio se llevó a cabo tomando muestras de jugo de caña y realizando diluciones, obteniendo diez muestras.

De cada una de las muestras se tomaron 30 ml para aplicarles el test de resazurina y 3 ml para realizar recuentos aeróbicos en placa.

Las muestras fueron analizadas por triplicado, obteniéndose tres resultados de cada muestra, éstos fueron tratados estadísticamente para obtener las medias de cada grupo de resultados. En la prueba de RAP por cada muestra se hicieron tres recuentos con sus respectivas diluciones.

El test de resazurina se aplicó por triplicado para cada muestra.

UNIVERSIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Tabla 1

Recuentos aeróbicos en placa de cada muestra de jugo de caña realizados por triplicado dilución 1:10000

MUESTRA	RECuento AEROBICO EN PLACA			*X
	UFC/mL			
1	300	305	298	301
2	255	258	245	252
3	230	214	227	222
4	176	169	177	174
5	141	138	129	136
6	120	118	124	120
7	100	89	105	98
8	80	75	91	82
9	51	60	58	56
10	26	20	28	24

* Promedio aritmético de cada grupo de datos

Tabla 2

Test de resazurina para muestras de jugo de caña realizado por triplicado

M	Ψ TIEMPOS DE REDUCCION			* X
	En horas			
1	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.35	1.50	1.50	1.45
3	2.00	1.85	2.00	1.95
4	3.25	3.30	3.15	3.23
5	4.00	4.25	4.00	4.08
6	5.15	5.20	4.75	5.03
7	6.00	6.00	5.90	5.97
8	6.50	6.45	6.15	6.37
9	7.00	7.10	7.00	7.03
10	8.00	8.15	8.00	8.05

* Promedio aritmético de cada grupo de datos

Ψ Tiempo de reducción en horas

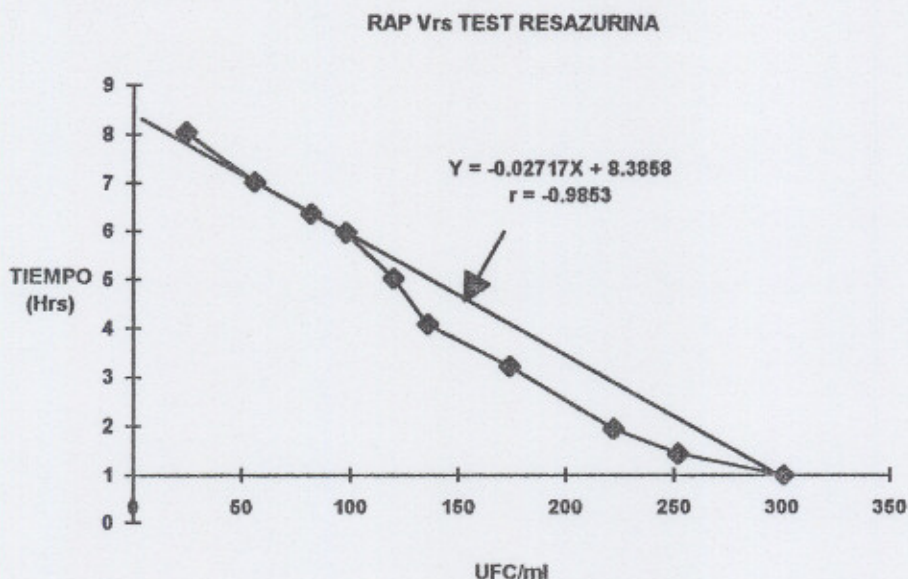
Tabla 3

Tiempos de reducción de resazurina vrs recuentos aeróbicos en placa de muestras de jugo de caña

M	RAP	Test resazurina
1	301	1.00
2	252	1.45
3	222	1.95
4	174	3.23
5	136	4.08
6	120	5.03
7	98	5.97
8	82	6.37
9	56	7.03
10	24	8.05

Gráfica 1

Regresión lineal de resultados de RAP y test de resazurina en jugos de caña



Los resultados de plotear RAP contra test de resazurina, se muestra en la gráfica 1, realizándose una regresión lineal de la misma, encontrándose que el coeficiente de correlación lineal (r) es igual a -0.9853 . De la misma gráfica se calculó la ecuación de la recta corregida por correlación lineal siendo la siguiente: $Y = -0.02717X + 8.3958$, donde la pendiente (m) es igual a -0.02717 y el intercepto es igual a 8.3958 (anexo 13.5).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El test de resazurina fue realizado en jugos de caña , las muestras fueron analizadas por triplicado tomándose las medias aritméticas de cada muestra, obteniéndose un grupo de datos para el test de resazurina y para el recuento aeróbico en placa. Los resultados indican que hay correlación o asociación entre los tiempos de reducción de resazurina y los recuentos aeróbicos de cada muestra, obteniéndose un **coeficiente de correlación lineal de -0.9853**. Aunque el coeficiente de correlación es aceptable se pudo observar en la gráfica 1 poca sensibilidad del método cuando los recuentos aeróbicos son altos , aunque el mismo puede ser utilizado como una prueba rápida que dé el número de microorganismos existentes en una muestra de forma estimada. El método es válido dentro de los rangos muestreados ya que los jugos de caña no presentan en su mayoría recuentos mayores de 3,500,000 UFC/ml (18).

El test de resazurina para jugos de caña presenta dificultad para su interpretación , ya que los cambios de color de la resazurina por acción microbiana puede ser enmascarado por los pigmentos propios del jugo de caña (15).

Los jugos de caña poseen un color amarillo característico que dependiendo de su intensidad puede variar el color que se obtiene al mezclar resazurina con jugo de caña.

Los cambios de coloración pueden ser un problema para la implementación del test de resazurina en jugos de caña si no se tiene una persona debidamente entrenada para poder interpretar los análisis en forma correcta .

La presencia de azúcares reductores como glucosa y fructosa podrían interferir en forma directa sobre el test de resazurina ya que concentraciones altas de estos azúcares

pueden reducir a la resazurina y dar resultados falsos (22).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se encontró que existe asociación entre los tiempos de reducción de resazurina y los recuentos aeróbicos en placa de jugos de caña.
- 10.2 Se encontró una ecuación de predicción entre los tiempos de reducción de resazurina y los recuentos aeróbicos en placa de jugos de caña.
- 10.3 Los pigmentos del jugo de caña pueden enmascarar el viraje de resazurina.
- 10.4 El test de resazurina es un método con respuesta más rápida que el RAP.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar estudio sobre la interferencia de azúcares reductores en el test de resazurina en jugos de caña.
- 11.2 Realizar estudio sobre la clasificación de microorganismos presentes en el jugo de caña con mayor frecuencia en Guatemala.
- 11.3 Al implementar el test de resazurina en jugos de caña debe entrenarse debidamente al personal de laboratorio para poder interpretar los resultados en forma correcta.

12. REFERENCIAS

1. Spencer N. Manual del azúcar de caña. 9ed. Barcelona. Montaner y Simon, 1987. 940p.
2. Payne J, et al. Sugar Cane Factory Analytical Control. 2ed. London. Elsevier, 1989. 190p.
3. Honig P. Principios de Tecnología Azucarera. 2ed. México. Continental, 1975. 582p.
4. Kokusawa L. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 4ed. New York. Omega, 1985. 403p.
5. Sebestyen M, et al. Microbiological Investigation in the Polish Sugar Industry. J Sugar 1992;4:20-28.
6. Abele C, et al. The Methylene Blue Reduction Test as a Means of Estimating the Bacterial Content of Milk, to Determine its Suitability for Pasteurization or as a Basis for Grading. J Milk 1989;8:67-79.
7. Payers K, et al. The Resazurin Reduction Test in Milk. J Milk 1990;4:33-39.
8. Thornton H, et al. Standardization of the Methylene Blue Reduction Test by the Use of Methylene Blue Thiocyanate. Amer J Pub Health 1991;2:92-96.
9. Gurha S, et al. Chemical Control of Bacterial Contamination in Sugars. Sugar C 1992;208:25-32.

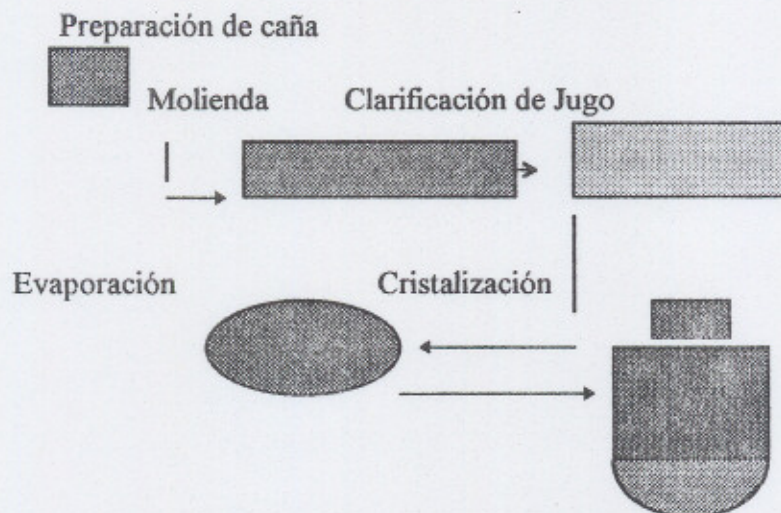
10. Nodarse M. Control Operation in the Milling Station. Int. Sugar JNL. 1992;84:1008:266-293.
11. Buckman Laboratories, Resazurina como Método para Evaluación de Bactericidas. México 1993.
12. Meade GP, Chen A. Cane Sugar Handbook. 11ed. New York. Wiley. 1986. 800p.
13. Atkins PC, Mc Cowage RJ. Dextran An Overview of the Australian Experience. Proc Sugar Proc. 1994;8:108-140.
14. Imrie FKE, Tibury RH. The Polysaccharides of Sugar Cane. Sugar Technol. 1992;4:291-295.
15. Anon J. Changes in Methods for Bacterial Count Official First Action. Assoc Off Anal Chem. 1987;60:493-494.
16. Brodsky MH, Entis MP. Determination of Aerobic Plate and Yeast and Mold Counts in Foods. J Food Proct. 1982;45:301-304.
17. Insalata N, Backer E. The Need and Perspectives for Rapid Microbiological Test Methods. Food Technol. 1987;21:145-150.
18. Clarke MA, Bergeron J, Cole F. Dextrana en Azúcares. J Sugar. 1993;8:31- 33.
19. Fegan M, Maners JM. Microbiology cane sugar. SG Microbiology. 1993;139:75-81.

INSTITUTO DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

20. Brown CF. et al. Technical and economic justification for the use of sugar process chemicals. Sugar J.1991,12(1):7-9.
21. Rabelo BS. et al Measures to check sugar cane post harvest biodeterioration.Sugar J. 1990;54(1):15-20.
22. Pelczar JM. et al Microbiología . 4ed. México. Mcgrw-Hill,1983.826p.

ANEXO 13.1

Diagrama de flujo de la Fabricación de Azúcar



ANEXO 13.2

Microorganismos en caña de azúcar UFC/ml (1)

Tallo	Total	Bacteria	Hongos	Levadura
1	440,000	430,000	1100	200
2	194,000	193,000	590	110
3	98,000	73,000	7,700	13,000
4	180,000	170,000	8,500	50,000

(1)

Fuente: Payne J. Sugar Cane Factory Analytical Control. 2ed .London .EPC, 1989. 190p.

ANEXO 13.3

Composición de la Caña de Azúcar y del Guarapo (2)

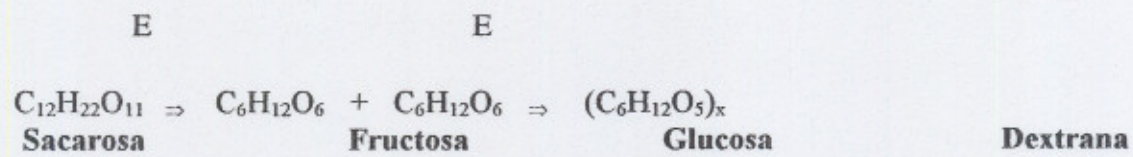
Componentes	Porcentaje	% sol. solubles
Agua	73-76	
Sólidos	24-27	
Fibra seca	11-16	
Sólidos solubles	10-16	
Componentes guarapo	75-92	
Azúcares		
Sacarosa		78-88
Glucosa		2-4
Fructosa		2-4
Sales	3-7.5	
Ácidos inorgánicos		1.5-4.5
Ácidos orgánicos		1-3
Ácidos orgánicos libre	0.5-2.5	
Ácidos carboxílicos		0.1-0.5
Aminoácidos		0.5-0.2
Proteínas		0.5-0.6
Almidón		0.001-0.050
Gomas		0.30-0.60
Ceras		0.05-0.15

(2)

Fuente: Spencer M. Manual del Azúcar de caña. 9ed. Barcelona.Montaner y Simon S.A. ,1987. 940p.

Anexo 13.4

Degradación de la Sacarosa y formación de Dextrana por la Dextranosacarasa (3)



E = Dextranosacarasa

(3)

Fuente: Nodarse M. Control Operation in the Milling station. J tecnol sugar 1987; 7:93-97.

ANEXO 13.5

Cálculos Estadísticos

r = coeficiente de correlación lineal

$$r = \frac{n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2][n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]}}$$

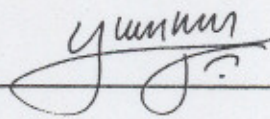
m = pendiente

$$m = \frac{n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

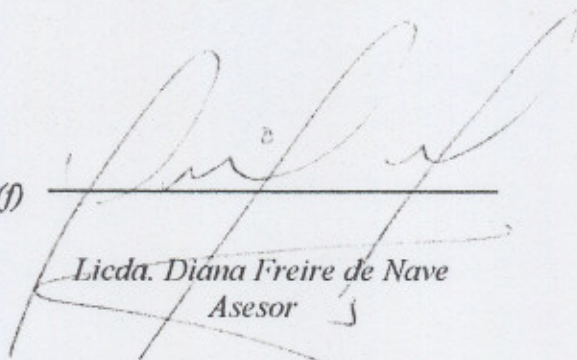
PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

intercepto = b


$$b = \frac{(\Sigma y)(\Sigma(x^2)) - (\Sigma x)(\Sigma xy)}{n(\Sigma(x^2)) - (\Sigma x)^2}$$

① 

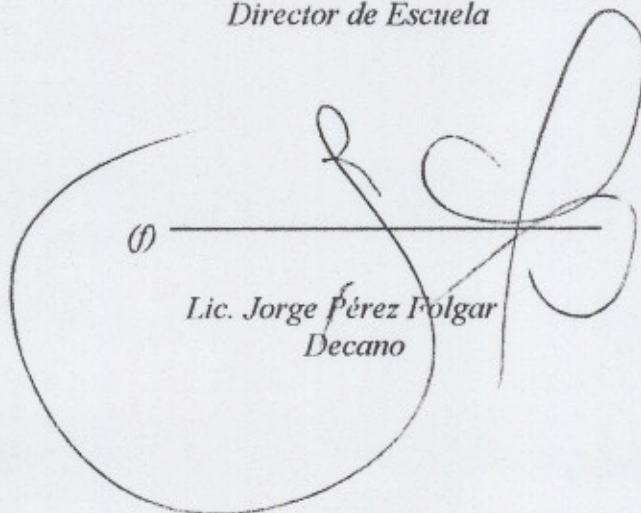
Otto Gabriel Blanco Bonifasi

① 

Licda. Diana Freire de Nave
Asesor

① 

Lic. Gerardo Arroyo Catalán
Director de Escuela

① 

Lic. Jorge Pérez Folgar
Decano