



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

REDUCCIÓN DE DEXTRANAS EN JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR
POR LA INHIBICIÓN DE *LEUCONOSTOC MESPENTEROIDES*
UTILIZANDO SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE
SUPEROXIDACIÓN CON PH NEUTRO

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA

ANAYELI CASIANO RIOS

ASESORES: M.C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

DRA. BRENDA ASTRID PAZ MICHEL

M. V. Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme todos los días.

A la empresa Esteripharma México, S.A. de C.V especialmente al Señor Mario Valbuena por el apoyo brindado para poder desarrollar mi trabajo y por la oportunidad de ser parte de la empresa.

A mis padres que han dado todo el esfuerzo para que yo ahora este culminando esta etapa de mi vida y darles las gracias por apoyarme en todo momento, por estar siempre junto a mí y gracias a ellos soy lo que ahora soy, por ser mi apoyo y mi fortaleza. Los amo.

A mis hermanos Juan y Javier por haberme dado fuerzas y apoyo incondicional que me han llevado a estar donde estoy.

A Jair por su infinita paciencia, por tu compañía, tú apoyo y palabras de aliento cuando más las necesitaba. Gracias por compartir mi vida y mis logros.

A la Dra. Brenda Paz Michel por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar este proyecto con éxito.

Al Profesor Gerardo Cruz Jiménez por el apoyo brindado en este proyecto así como la paciencia, confianza y su experiencia brindada para poder culminar mi trabajo de tesis.

Al laboratorio Biotest en especial a Lety, Jessi, Clau, Normis y Angel por la amistad brindada durante mi estancia en el laboratorio así como la ayuda desinteresada y apoyo para que pudiera culminar este proyecto.

A todos los que aportaron de una u otra forma a la realización de este proyecto.
Gracias.

ÍNDICES

Lista de abreviaturas	i
Índice General	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Índice de Esquemas	x
Índice de Gráficas	xii

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac/Ac	Ácido-ácido
BAL	Bacterias ácido-lácticas
BHI	Infusión Cerebro Corazón
°Brix	Grados Brix
°C	Grados centígrados
Cl ⁻	ión cloruro
Cl ₂	Cloro molecular
cm ²	centímetros cuadrados

cm ³	centímetros cúbicos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
dex	dextranas
e ⁻	electrón(es)
g	Gramos
H ⁺	Catión hidrógeno
H ₂	Hidrógeno molecular
H ₂ O	Agua
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
HClO	Ácido hipocloroso
h	Hora(s)
KIA	Kligler Iron Agar
L	Litros
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>
lb	Libras
log	logaritmo base 10
mg	Miligramos
mL	Mililitros

min	Minuto
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MS	Mesófilos aerobios
mV	milivolts
µg	Microgramos
µL	Microlitros
Na°	Sodio metálico
Na ⁺	ión sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaOCl _(aq)	Hipoclorito de sodio acuoso
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₃	Amoniaco
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno molecular
O ₃	Ozono
OCl _x ⁻	Fórmula general para hipocloritos, cloritos, cloratos y percloratos
OF	Óxido-fermentación
ORP	Potencial de Oxido Reducción

OH ⁻	Ión hidroxilo
PBS	Solución amortiguadora de ph a base de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeno
Pol	Grado de polarización
ppm	partes por millón
p/v	Relación peso-volumen
SES	Solución electrolizada de superoxidación con pH neutro
SESA	Solución electrolizada de superoxidada ácida
SFB	Suero fetal bovino
SIM	Sulfuro Indol Motilidad
SSFE	Solución salina fisiológica estéril
<i>sp</i>	No se ha identificado la especie
T	Temperatura
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
VIS	Visible
<i>vs</i>	versus (contra)
%RED	Porcentaje de azúcares reductores
(+)	Positivo
(-)	Negativo

- (aq) Acuoso
- (g) Gaseoso
- (l) Líquido
- " Igual que arriba, o igual que lo indicado arriba

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
1.- Introducción.....	2
2.- Antecedentes.....	4
2.1 Generalidades de la caña de azúcar	4
2.2 Proceso de Producción del Azúcar.....	7
2.2.1 Labores de campo y cosecha.....	7
2.2.2 Proceso Productivo de la caña de azúcar.....	8
3.- Factores Parámetros e Indicadores de Calidad en Jugos de Caña de Azúcar.....	11
3.1 Factores pre-cosecha involucrados en la calidad de la caña de azúcar.....	11
3.1.1 Variedad de la caña.....	11
3.1.2 Madurez de la Planta.....	13
3.1.3 Quema.....	13

3.1.4 Cultivos Sometidos a Condiciones de Estrés.....	13
3.2 Factores durante o post-cosecha involucrados en la calidad de la caña de Azúcar	13
3.2.1 Altura del Corte.....	14
3.2.2 Tipo de Corte.....	14
3.2.3 Factores Ambientales.....	14
3.2.4 Tiempo de espera y resguardo de caña entre el corte y la molienda.....	15
3.3 Parámetros e indicadores de calidad en jugos de caña de azúcar.....	15
3.3.1 pH.....	15
3.3.2 Grados Brix.....	16
3.3.3 Pol.....	16
3.3.4 Pureza.....	16
3.3.5 Azúcares Reductores.....	16
3.3.6 Presencia de Microorganismos Patógenos.....	17
3.4 Formación de dextranas y otros subproductos de descomposición.....	19
3.4.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20
4.- Control de la actividad microbiológica en industria azucarera.....	23
4.1 Soluciones Electrolizadas de Superoxidación y su acción potencial en la Industria cañera.....	25
4.1.1 Producción de SES.....	25
4.1.2 Mecanismo de Acción de las SES.....	28
5.- Planteamiento del Problema y Justificación del Proyecto.....	30

6.- Objetivos.....	31
6.1 Objetivos Generales.....	31
6.2 Objetivos Particulares.....	32
7.- Materiales y Métodos.....	32
7.1 Cuenta de bacterias aerobias en placa.....	35
7.2 Cuenta de mohos y levaduras.....	35
7.3 Identificación de algunos microorganismos patógenos en jugo de caña de ingenio.....	36
7.4 Purificación, siembra e identificación de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> por tinción de Gram, catalasa y oxidasa.....	36
7.4.1 Tinción de Gram.....	37
7.4.2 Catalasa y oxidasa.....	38
7.5 Curva de crecimiento para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	38
7.6 Valoración de soluciones electrolizadas de superoxidación e hipoclorito de sodio.....	39
7.6.1 Método Yodométrico.....	39
7.7 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de SES sobre <i>L. mesenteroides</i> por técnica de microplaca o técnica colorimétrica de Mossman...	42
7.7.1 Técnica colorimétrica de Mossman.....	42
7.8 Determinación de azúcares reductores (Método de Eynon y Lane).....	43

7.9 Determinación de Dextranas.....	43
7.10 Determinación de pH y ORP.....	44
7.11 Determinación de °Brix.....	44
7.12 Ensayos de desinfección sobre tallos y jugo de caña de ingenio con SES o NaOCl _(aq)	44
7.12.1 Tratamiento y valoración de tallos.....	44
7.12.2 Valoración y tratamiento del jugo de ingenio.....	45
7.12.3 Inhibición de formación de dextranas por tratamiento de jugo de ingenio con SES o NaOCl _(aq)	45
7.13 Ensayos de degradación a través del tiempo de jugo de caña contaminado con <i>L. mesenteroides</i>	45
7.13.1 Obtención y valoración del jugo de caña obtenido de tallos provenientes de ingenio.....	45
7.13.2 Curva de degradación de jugo de caña obtenido de tallos de ingenio, por infección controlada con <i>L. mesenteroides</i>	46
7.13.3 Ensayos de degradación de jugo de caña de tallos de ingenio por infección controlada con jugo de ingenio, tratado y sin tratar con SES o NaOCl _(aq)	46
8.- Resultados y Discusión.....	47
9.- Conclusiones.....	68
10.- Referencias Bibliográficas.....	69
Anexos.....	79

A.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	79
A.1.1 Preparación de medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) con 0.25% de suero fetal bovino (SFB).....	79
A.1.2 Preparación de medio Agar estándar (BHI).....	80
A.1.3 Preparación de medio para hongos y levaduras.....	80
A.1.4 Preparación de medio de cultivo selectivo Agar Mayeux.....	80
A.1.5 Preparación de soluciones de Fehling A y B.....	81
A.1.5.1 Solución Fehling A.....	81
A.1.5.2 Solución Fehling B	81
A.1.6 Solución de azul de metileno al 1%.....	82
Anexo 2. Construcción de curvas de calibración.....	82
A.2.1 Construcción de curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña.....	82
A.2.1.1 Curva D-(+)-Glucosa+D-(-)-Fructosa.....	82
A.2.1.2 Curva D-(+)-Glucosa.....	83
A.2.1.3 Curva D-(+)-Glucosa en presencia de D-(+)-Sacarosa.....	84
A.2.1.4 Curva D-(-)-Fructosa.....	85
A.2.2 Construcción de curva de calibración para determinar concentración de dextranas en jugos de caña.....	86
Anexo 3. Métodos de siembra masivo y por dilución.....	88
A3.1 Método masivo.....	88

A3.2 Método por dilución.....	89
Anexo 4. Identificación de flora bacteriana de jugos de caña de ingenio utilizando el equipo Vitek® 2.....	89
Anexo 5. Escala de McFarland.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la sacarosa, D-glucosa y D-fructosa.....	5
Figura 2. Etapas de labores de campo en el proceso productivo de la caña de azúcar. A) Preparación del terreno y siembra, B) Quema de cosecha, C) Corte y recolección por maquinaria, D) Corte y apilado manual, recolección por maquinaria y E) Transporte de caña a ingenios.....	8
Figura 3. Inicio del proceso de extracción de jugo de caña en el ingenio. A) Pesado e ingreso de camiones cargados, B) colocación de caña en bandas transportadoras al interior del ingenio, C) caña luego de pasar por máquina desfibradora, D) primer molino de extracción donde se aprecia el uso de jugo concentrado para apoyar lavado de bagazo y extracción del jugo, E) cuarto y último molino de extracción en donde se aprecia el uso de agua vegetal para apoyar lavado de bagazo y extracción del jugo. F) Tanque recolector.....	9
Figura 4. Etapas finales de producción de azúcar; A) Foto panorámica de región del ingenio donde ocurren procesos de clarificación, condensación y cristalización de sacarosa. B) Empacado de cristales de azúcar.....	11

Figura 5. Formación de dextrana a partir de sacarosa por acción de *L. mesenteroides* y la enzima dextransacarasa; A) Reacción química, B) Dextrana producida en caja de Petri por bacteria sembrada en medio Mayeux y C) Tinción de Gram de *L. mesenteroides*.....19

Figura 6. Ejemplo de celda electrolítica para producción de solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES).....25

Figura 7. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de microorganismos patógenos como quistes de giardia duodenalis, 15d tratados con A) agua desionizada (control), B) SES a 60 ppm por 15 minutos, C) SES 3.25 ppm por 15 minutos; *Bacillus sphaericus*^{15b} tratado con D) PBS (control), E) solución electrolizada superoxidada ácida (SESA; pH 2.6) a 60 ppm por 10 minutos, *Staphylococcus saprophyticus*^{15b} tratado con F) PBS (control), G) solución electrolizada superoxidada ácida (SESA; pH 2.6) a 60 ppm por 10 minutos.....28

Figura 8. Aspecto de jugo y de tallos provenientes de ingenio. La imagen muestra también los tallos en trozos para su análisis.....48

Figura 9. Tinción de Gram y morfología de microorganismos patógenos identificados en jugo de ingenio.....51

Figura 10. Tinción de Gram de *L. mesenteroides*.....52

Figura 11. Crecimiento de *L. mesenteroides* en medio selectivo Mayeux. A-B) Cajas Petri preparadas con medio Mayeux en el que creció la bacteria junto con presencia de dextranas. C) Acercamiento de la apariencia y cantidad de las gomas o dextranas formadas.....53

Figura 12. Crecimiento bacteriano en pruebas de dosis mínima inhibitoria de SES sobre distintas bacterias presentes en el jugo de ingenio. A: <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; A1) Método de Mossman, A2) Crecimiento en caja; B: <i>Candida intermedia</i> ; B1) Método de Mossman, B2) Crecimiento en caja; Crecimiento en caja de C) <i>Enterobacter cloacae</i> , D) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , E) <i>Cryptococcus laurentii</i> , F) <i>Pantoea spp</i> y G) <i>Pediococcus pentosaceus</i>	55
Figura 13. Curva teórica de crecimiento bacteriano.....	60
Figura A1. Método masivo de siembra. A) Inoculación primaria, B) Estría en ángulo recto, C) Estría en ángulo recto para producir una "esfera" de desarrollo.....	88
Figura A2. Método de siembra por dilución.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la caña de azúcar, en porcentaje de peso.....	5
Tabla 2. Componentes del jugo de caña de azúcar, en porcentaje de peso.....	6
Tabla 3. Valores de pH, azúcares reductores, concentración de dextranas y de UFC/mL de mesófilos aerobios, hongos, mohos y levaduras, presentes en jugo de ingenio y en jugo extraído de tallos de caña de azúcar.....	48
Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas primarias para <i>L. mesenteroides</i>	52
Tabla 5. Resultados de pruebas bioquímicas secundarias para <i>L. mesenteroides</i> , realizadas con y sin suero fetal.....	52

Tabla 6. Variación a través del tiempo de parámetros de la calidad del jugo de caña contaminada selectivamente con 1×10^8 UFC de <i>L. mesenteroides</i> . La desviación estándar se ilustra entre paréntesis.....	61
Tabla 7. Variación a través del tiempo de parámetros de la calidad del jugo de caña contaminada selectivamente con 12×10^8 UFC de <i>L. mesenteroides</i>	62
Tabla 8. Parámetros de pH, ORP, concentración de dextranas, UFC/mL de mesófilos aerobios y bacterias ácido-lácticas (BAL) en jugo de ingenio, antes y después de tratamiento con SES o $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60, 30 y 15 ppm.....	64
Tabla 9. Variación en parámetros de: A) Jugo de tallos sin tratar, B) Jugo de tallos sin tratar e incubado 48 horas, C) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio, D) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio e incubado 48 horas, E) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 μL de SES a 60 ppm, F) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 μL de SES a 60 ppm y el jugo de tallos incubado 48 horas, G) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 μL de $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm, H) Jugo de tallos contaminados con 100 μL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 μL de $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm y el jugo de tallos incubado 48 horas.....	65
Tabla A1. Datos para preparación de estándares de dextranas.....	87
Tabla A2. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias Gram negativas en equipo Vitek®2.....	90
Tabla A3. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias Gram positivas en equipo Vitek®2.....	91
Tabla A4. Composición de soluciones para estandarizar en escala de McFarland.....	92

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de extracción de jugo de caña, recolección de jugo hacia sistema de canaletas (de derecha a izquierda, indicado con flechas azules) y eliminación de bagazo hacia calderas (de izquierda a derecha, indicado con flechas verdes).....	10
Esquema 2. Proceso de extracción de sacarosa a partir de jugo de caña.....	11
Esquema 3. Factores que afectan la recuperación de sacarosa en ingenios azucareros.....	22
Esquema 4. Reseña general de metodología.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Concentración porcentual de mesófilos aerobios en tallos de caña antes y después de tratamiento con SES.....	56
Gráfica 2. Disminución porcentual de mesófilos aerobios en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 44 y 6 ppm.....	57
Gráfica 3. Disminución en cuentas de mesófilos aerobios en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 6 ppm durante 0, 1, 5 y 30 minutos.....	58
Gráfica 4. Disminución en cuentas de levaduras en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 6 ppm durante 0 y 5 minutos.....	58

Gráfica 5. Curva de crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> en medio de cultivo BHI modificado.....	59
Gráfica 6. Valores de pH, log [dextranas] y °Brix en jugos de tallos contaminados con inóculos de 1×10^8 UFC o 12×10^8 UFC de <i>L. mesenteroides</i>	62
Gráfica 7. Variación en concentración del log de dextranas (dex), bacterias ácido-lácticas (BAL) y mesófilas aerobias (MA) con y sin tratamiento de diferentes concentraciones de los antisépticos.....	64
Gráfica A1. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña con patrones de D-(+)-Glucosa y D-(-)-Fructosa.....	83
Gráfica A2. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando patrón de D-(+)-Glucosa.....	84
Gráfica A3. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando patrón de D-(+)-Glucosa mezclado con D-(+)-Sacarosa.....	85
Gráfica A4. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando D-(-)-Fructosa como patrón.....	86
Gráfica A5. Curva de calibración para determinar concentración de dextranas en jugos de caña.....	88

RESUMEN

La industria azucarera es una de las más importantes a nivel mundial ya que tiene grandes aportaciones a nivel económico y social, por ello se realizaron estudios sobre tallos y jugos de caña para mejorar la producción de azúcar, la cual puede verse afectada por diversos factores, principalmente el contenido de sacarosa en tallos y presencia de microorganismos patógenos de sus jugos. El objetivo de la investigación fue evaluar la efectividad de un antiséptico de amplio espectro, solución electrolizada de superoxidación con pH neutro, para minimizar la flora bacteriana nociva en tallos y jugos de caña y con ello disminuir la producción de dextranas, formadas a partir de la degradación de la sacarosa por acción de la bacteria ácido láctica *Leuconostoc mesenteroides*. Se realizó la identificación y aislamiento de múltiples bacterias, entre ellas *L. mesenteroides*, presentes en tallos y jugo de ingenio.

También se realizó un análisis comparativo entre el poder germicida de la SES vs $\text{NaOCl}_{(aq)}$; luego de los tratamientos se estudiaron los cambios en la contaminación bacteriana, la variación de propiedades físico-químicas (pH y °Brix) y de algunos parámetros de calidad de los jugos de caña, monitoreando subproductos metabólicos como azúcares reductores y especialmente formación de dextranas. Para ello se realizaron cuentas bacterianas, valoraciones titulométricas y espectrométricas del jugo sometido a diferentes tratamientos. Con base en los resultados se estableció la mayor efectividad de las soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro (SES) vs las soluciones acuosas de hipoclorito de sodio en la reducción de microorganismos patógenos que afectan los rendimientos de sacarosa en los ingenios azucareros. La presente tesis es una evidencia de que podría ser factible mejorar la calidad de los jugos procesados en

los ingenios Mexicanos, por lo tanto es también una propuesta para montar un proyecto piloto del uso de la SES en el ingenio.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia comercial, económica y social del azúcar como producto directo y como materia prima para la industria (principalmente la de alimentos y bebidas) queda de manifiesto a nivel internacional puesto que se consume en todo el mundo constituyendo la principal fuente de calorías para la población de la mayoría de los países. Durante el ciclo 2010/2011 se produjeron 161 millones de toneladas, siendo Brasil (24%), India (17%) y la Unión Europea (9%) las tres principales regiones productoras; México (3.4%) ocupó el séptimo lugar como productor mundial.¹

La industria azucarera en México es históricamente de las más importantes a nivel económico y social ya que genera cerca de 3 millones de empleos directos e indirectos y representa un valor de producción primario de casi 30 mil millones de pesos.¹ La eficiencia con la que operan los ingenios es de vital importancia ya que de ello depende la máxima recuperación de azúcar y por ende la producción bruta del país. Como ejemplo se compara la producción del periodo 2009/2010 de los ingenios Mexicanos con la de Brasil, tomando en cuenta dos cifras importantes: los rendimientos en campo (pre-cosecha: superficie cosechada/sembrada; t/ha) y los del ingenio (post-cosecha: producción de azúcar/toneladas molidas de caña; t). Respecto al rendimiento en campo, México alcanzó el 87.1%, mientras que Brasil el 92.5%. La producción de sacarosa en los ingenios Mexicanos fue menos competitiva al obtener sólo 11.5% de azúcar respecto de las toneladas molidas de caña, contra el 13.7% que obtuvo Brasil.² Es claro que en ambos casos se podrían lograr mejoras significativas que derivarían

en mejor posicionamiento de la industria Mexicana y mayores ganancias respecto al precio que rige el mercado internacional. Un estudio realizado por la secretaría de economía sobre la eficiencia de producción en campo y en fábrica de los 57 ingenios azucareros que operaron en los periodos 2000/2001-2009/2010, reveló que el 40% presentó una eficiencia de producción en fábrica inferior al promedio nacional.² Datos más recientes (Campo y Fábrica: Zafra 2012/2013) indican un incremento del 27% en la producción total de azúcar (cerca de 7 millones de toneladas) pero no se registra un incremento en la eficiencia de fábrica.³ Es evidente que las mayores pérdidas de sacarosa ocurren en la producción de azúcar a nivel de ingenio (operaciones de post-cosecha). Esta afirmación también es válida en otros países; por ejemplo más de tres décadas de estudios realizados por investigadores en la India⁴ concluyeron que la acción enzimática y bacteriana representa la principal causa del deterioro post-cosecha de la caña de azúcar, agudizándose con lapsos largos de tiempo de espera entre el corte de la caña y su molienda, y en muchos casos durante todo el proceso de recuperación de la sacarosa. La acción enzimática es intrínseca al metabolismo de la caña, aunque se ve incrementada a partir del corte de la misma. La realizan las enzimas denominadas invertasas, que transforman a la sacarosa en glucosa y fructosa (azúcar invertida) y cuya acción se ve favorecida a temperatura alta y pH ácido. Respecto al deterioro bacteriano, se conoce que el principal microorganismo responsable es la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* que depreda sacarosa, por utilizarla como fuente de energía, y la transforma en ácidos orgánicos (acidificando el pH del medio) y en dextrano, un polisacárido gomoso que introduce problemas adicionales al proceso de producción de azúcar y disminuye su índice de pureza.⁴ Por lo tanto es claro que hay un efecto simbiótico entre la infección bacteriana y la acción enzimática para la disminución de sacarosa en los jugos de caña de azúcar cosechada; entonces el papel de los

antimicrobianos es fundamental para la solución, parcial o total, de esta problemática. El uso de bactericidas por lo tanto ha sido obligado en la industria del azúcar, sin embargo, conscientes de la importancia de ofrecer alimentos libres de contaminantes y de cuidar la rentabilidad para el productor en las etapas de siembra, cosecha y pos-cosechas se plantea explorar la aplicación de productos innovadores, soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro (SES), en la desinfección y conservación de alimentos. Esta tesis estudia el efecto de las SES en la minimización de flora bacteriana nociva y la disminución de subproductos indeseados en tallos y jugos de caña que afectan su calidad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) es una gramínea tropical en cuyo tallo, formados por nudos y entrenudos, se forma y acumula jugo rico en sacarosa, un carbohidrato disacárido de fórmula general $C_{12}H_{22}O_{11}$ y compuesto de los monosacáridos D-glucosa y D-fructosa, condensados en grupos glucosídicos a través de enlaces tipo éter⁴ [Figura 1]. En presencia de ácidos diluidos o de enzimas invertasas, la sacarosa se hidroliza a una mezcla equimolar de D-glucosa + D-fructosa, escindiendo el enlace glucosídico -C-O-C-. A dicha mezcla se le conoce con el nombre de azúcar invertida; esto se deriva de que la sacarosa es dextrorrotatoria (+66.5°), pero al hidrolizarse el poder levorrotatorio de la fructosa (-92°) es más fuerte que el dextrorrotatorio de la glucosa (+52.5°), por lo que el hidrolizado tiene finalmente (-20°). A este cambio de signo de la rotación del plano de la luz polarizada se le llama inversión.⁵

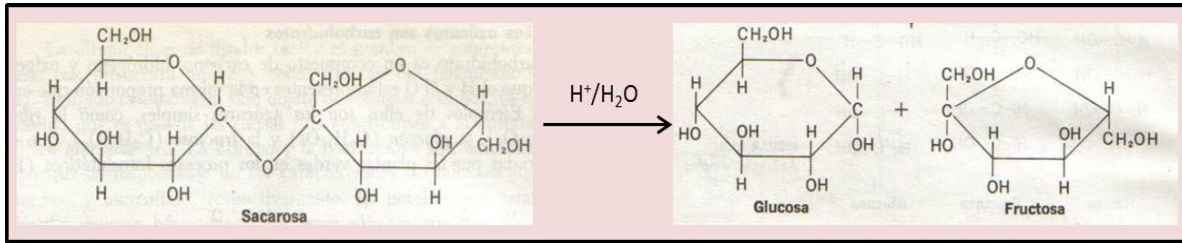


Figura 1. Estructura química de la sacarosa, D-glucosa y D-fructosa.

El 70% de la producción mundial del azúcar se obtiene de la caña, el resto proviene del betabel. La sacarosa es sintetizada por la caña a través de la fotosíntesis y extraída de sus jugos en los ingenios azucareros. Adicionalmente a la sacarosa, la caña y el jugo de caña contienen otros compuestos y productos [Tablas 1 y 2]. El contenido de sacarosa en la caña es de alrededor del 14-17%, mientras que en sus jugos oscila entre un 10 y 20%. Mediante el proceso de extracción, en los ingenios azucareros, se obtiene el jugo de caña que es purificado por medios físicos y químicos. La evaporación del agua y la separación de los cristales de azúcar dan lugar al azúcar refinado comercial, que contiene alrededor de 99.99% de sacarosa.^{6,7}

COMPONENTE	%
AGUA	74.50
FIBRA	10.00
AZÚCARES TOTALES,	14.00
de los cuales:	
Sacarosa	12.50
Glucosa	0.90

Fructosa	0.60
CENIZAS	0.50
COMPUESTOS NITROGENADOS	0.40
ACIDOS Y GRASAS	0.60

Tabla 1. Componentes de la caña de azúcar, en porcentaje de peso.⁸

COMPONENTE	%
AGUA	75-88
AZUCARES	17-21
Sacarosa	10-20
Glucosa	2-4
Fructosa	2-4
Sales	1-3
Ácidos orgánicos libres	1.5-5.25
Componentes orgánicos menores	0.5-0.6
Otros	3-5

Tabla 2. Componentes del jugo de caña de azúcar, en porcentaje de peso.⁸

La composición presentada en las tablas 1 y 2 corresponde a caña madura (11-12 meses), puesto que la caña en estados más tempranos (o tardíos) de su desarrollo mantiene concentración distinta de los componentes indicados, siendo la diferencia más significativa, el mayor porcentaje de azúcares reductores (hasta

3.3%) y menor porcentaje de sacarosa en tallos.^{8b} Por esto es importante cosechar la caña una vez que ha madurado, no antes ni después.

2.2. Proceso de producción del azúcar

2.2.1. Labores de campo y cosecha⁹

La caña de azúcar está catalogada como cultivo plurianual, pues se corta cada 12 meses y la plantación dura aproximadamente 5 años. La caña se propaga mediante la plantación de trozos de caña, de cada nudo sale una planta nueva idéntica a la original. La planta retoña varias veces y puede seguir siendo cosechada. A estos cortes sucesivos se les llaman [zafras](#) y se definen también como los periodos de cosecha y recolección de los tallos. La caña tiene una riqueza de sacarosa del 14% aproximadamente, aunque varía a lo largo de toda la recolección.⁶

El proceso productivo se inicia con la preparación del terreno, la selección de la variedad y la siembra de la caña [**Figura 2A**]. Cuando la planta alcanza su periodo de maduración, es decir cuando alcanza su máximo peso y óptimo contenido de azúcar (lecturas Pol > 13%), se procede a la quema del terreno para eliminar impurezas y poder realizar un corte adecuado [**Figura 2B**]. Las cañas son cortadas, a mano o a máquina y se apilan en camiones de carga que las conducen a los ingenios [**Figuras 2C-E**]. No debe transcurrir mucho tiempo en el transporte puesto que desde el momento en que han sido quemadas, se inician procesos químicos y microbiológicos que inducen pérdidas por formación de polisacáridos e inversión de la sacarosa.



Figura 2. Etapas de labores de campo en el proceso productivo de la caña de azúcar. A) Preparación del terreno y siembra, B) Quema de cosecha, C) Corte y recolección por maquinaria, D) Corte y apilado manual, recolección por maquinaria y E) Transporte de caña a ingenios.

2.2.2. Proceso productivo de la caña de azúcar⁹

Cuando la caña ingresa al ingenio, previo pesado [Figura 3A], el proceso extractivo del azúcar inicia colocando la caña en bandas transportadoras [Figura 3B] que las dirigen a las máquinas picadoras y desfibradoras [Figura 3C], posteriormente se conducen al tándem de 4 molinos en donde ocurre el proceso de extracción del jugo de caña [Figuras 3D-E]. La extracción es asistida por el mismo jugo y agua caliente que se van exprimiendo durante el mismo proceso. Del primer molino se obtiene el jugo más concentrado, proveniente de la caña recién desfibrada, cuya extracción es asistida por humectación con jugo proveniente del segundo molino.

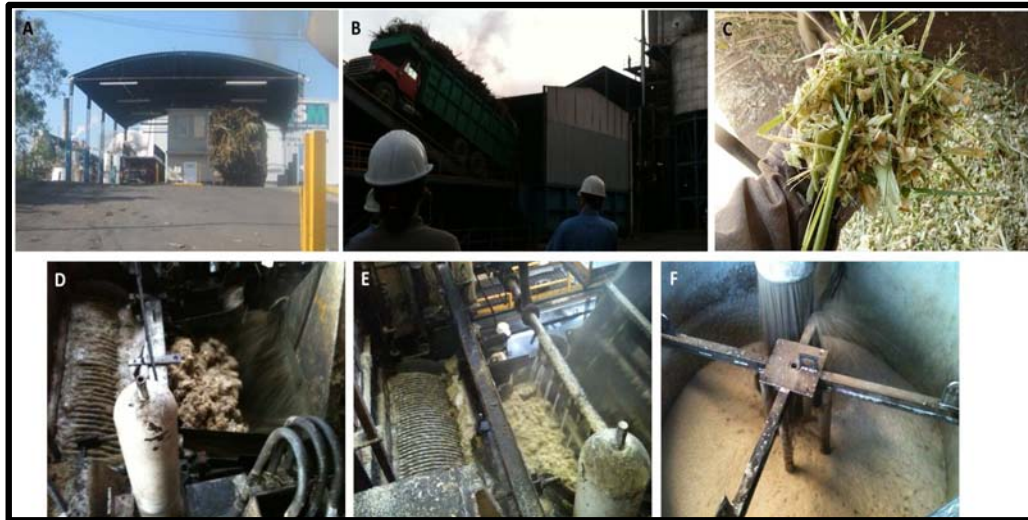
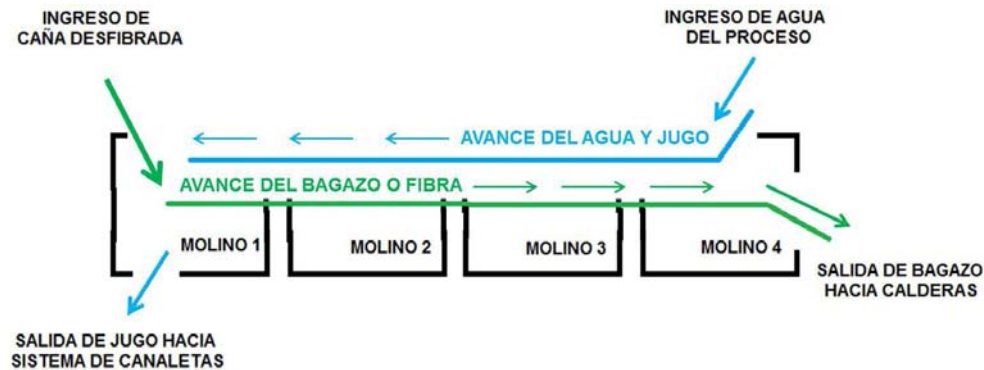


Figura 3. Inicio del proceso de extracción de jugo de caña en el ingenio. A) Pesado e ingreso de camiones cargados, B) colocación de caña en bandas transportadoras al interior del ingenio, C) caña luego de pasar por máquina desfibradora, D) primer molino de extracción donde se aprecia el uso de jugo concentrado para apoyar lavado de bagazo y extracción del jugo, E) cuarto y último molino de extracción en donde se aprecia el uso de agua vegetal para apoyar lavado de bagazo y extracción del jugo. F) Tanque recolector.

El jugo resultante se conduce al taque recolector [Figura 3F] mediante un sistema de canaletas y el bagazo o fibra remanente pasa al segundo y tercer molino, en donde la extracción es asistida por jugo proveniente del tercer y cuarto molinos. Finalmente, en el cuarto molino el bagazo remanente se enjuaga con agua vegetal caliente ($T= 60-70^{\circ}\text{C}$; $\text{ORP}= 383$; $\text{pH}= 2.86$), que es el agua obtenida de los tallos como resultado del mismo proceso extractivo de azúcar, y la fibra enjuagada se conduce a las calderas para ser utilizada como combustible para el mismo proceso.

De este modo el agua caliente, utilizada para enjuagar el bagazo en el cuarto molino, se va concentrando al utilizarse sucesivamente en el tercero, segundo y primer molinos, como apoyo para la extracción del jugo [Esquema 1]. Al final del sistema de canaletas se encuentra un filtro por el que pasa el jugo directo hacia el

tanque recolector, ahí el jugo crudo es pesado y además se le determinan las primeras lecturas sobre sus parámetros de calidad: pH, brix y pol.

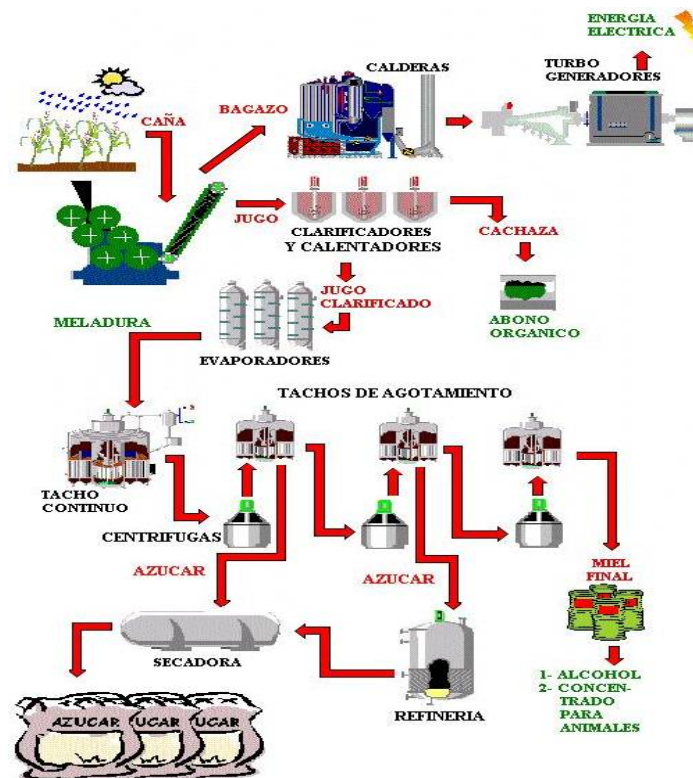


Esquema 1. Proceso de extracción de jugo de caña, recolección de jugo hacia sistema de canaletas (de derecha a izquierda, indicado con flechas azules) y eliminación de bagazo hacia calderas (de izquierda a derecha, indicado con flechas verdes).

El jugo sale desde el tanque recolector hacia el tanque de clarificación donde es purificado por sedimentación luego de ser sometido a dos procesos: sulfitación con ácido sulfúrico y neutralización con hidróxido de sodio. Este último proceso se conoce como "lechada de cal". El producto resultante de estos dos procesos se denomina meladura. La meladura pasa a filtros rotatorios a alta temperatura y vacío que separan la fracción más ligera (jugo clarificado) y la envían a condensadores y evaporadores. En esta etapa se extrae del 75-85% del agua, lo que resulta en el jarabe. Finalmente el jarabe se conduce a los tachos en donde ocurre la cristalización de la sacarosa [Figura 4A]. Los cristales de azúcar resultantes se empacan en costales para su distribución [Figura 4B]. En el esquema 2 se presenta el proceso de extracción del azúcar.



Figura 4. Etapas finales de producción de azúcar; A) Región del ingenio donde ocurren procesos de clarificación, condensación y cristalización de sacarosa. B) Empacado de cristales de azúcar.



Esquema 2. Proceso de extracción de sacarosa a partir de jugo de caña.

3. FACTORES, PARÁMETROS E INDICADORES DE CALIDAD EN JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR ^{7,8}

La calidad de la caña de azúcar y de sus jugos son determinantes para una buena recuperación de sacarosa. En general, las principales características que aseguran dicha recuperación son: a) alto contenido de sacarosa en el tallo, b) bajo

contenido de materiales extraños en la cosecha, c) bajo contenido de sólidos solubles diferentes de la sacarosa en el jugo, incluidos dextranos y azúcares reductores, así como d) bajos niveles de fibra. Algunos autores⁴ han clasificado el deterioro de la caña en dos tipos:

a) Deterioro por procesos asociados a actividad enzimática de invertasas, metabolismo y respiración de la planta (no microbianos; caña rancia o envejecida). Se favorecen cuando existen largos lapsos entre el corte y la molienda y en condiciones de temperatura elevada y pH ácido.

b) Deterioro por procesos microbianos (caña agria). Se favorece cuando los tallos presentan múltiples fracturas o cortes, en presencia de contaminación bacteriana (especialmente *Leuconostoc mesenteroides*) y cuando existen condiciones de humedad y temperatura altas.

Existen numerosos factores que potencialmente afectan la calidad de la caña de azúcar y estos pueden ocurrir pre- y/o post- cosecha. Es importante señalar e identificar que varios de ellos son concomitantes, lo que exacerba la degradación. A continuación se describen los más importantes.

3.1. Factores pre-cosecha involucrados en la calidad de la caña de azúcar

3.1.1. Variedad de la caña

Dependiendo de su variedad, la caña de azúcar puede ser más o menos susceptible al deterioro o inversión por procesos intrínsecos a su metabolismo; además de ser más propensas a infecciones bacterianas que disminuyen la calidad de sus jugos (*vide infra*).

3.1.2. Madurez de la planta

Se considera que la caña de azúcar ha alcanzado su etapa de madurez cuando la lectura Pol de sus jugos es >13%. En ese punto está lista para el corte ya que antes o después, el tallo es más susceptible a deterioro metabólico.

3.1.3. Quema

En general se realiza quema del cultivo inmediatamente antes del corte ya que permite eliminar impurezas y facilitar el corte. Sin embargo, la quema no debe ser excesiva ya que la cera protectora de los tallos se ve afectada y esto promueve la ocurrencia de fracturas, exposición de la pulpa y contaminación por microorganismos patógenos.

3.1.4. Cultivos sometidos a condiciones de estrés

Se consideran condiciones de estrés por ejemplo a las heladas. Los cultivos que han sufrido disminución drástica de temperatura (-12°C), presentan deterioro en la calidad de los jugos. Esto es, menor pH y concentración de sacarosa, así como aumento de subproductos indeseables y metabolitos bacterianos. Se demostró que los tallos de cañas que alcanzaron dichas temperaturas, presentaron daño significativo en sus tejidos, lo que condujo a mayor actividad enzimática y proliferación bacteriana. Estudios realizados *in vitro* demostraron que el jugo de caña, incluso congelado, experimenta al paso de los días proliferación bacteriana y detrimento de sus propiedades organolépticas características, siendo significativo a partir del día 10.¹²

3.2. Factores durante o post-cosecha que afectan la calidad de la caña de azúcar

3.2.1. Altura del corte

La altura de corte inferior debe hacerse a ras del suelo, evitando tocones superiores a dos centímetros de altura. Esto es porque la máxima concentración de sacarosa se localiza en el entrenudo más bajo. El corte superior se hará a cinco centímetros encima del último nudo visible, puesto que más allá de este punto la cantidad de sacarosa es despreciable.⁹

3.2.2. Tipo de corte

El corte de la caña puede realizarse a mano o con maquinaria. Está documentado que los tallos cortados con apoyo de maquinaria presentan mayor degradación por ser los más maltratados con exceso de cortes y fracturas. Esto aumenta la infección por microorganismos patógenos y la actividad metabólica intrínseca de la planta. Sin embargo, las máquinas cosechadoras representa un apoyo muy importante al momento del corte de los tallos puesto que este procedimiento es mucho más rápido que el corte a mano.

3.2.3. Factores ambientales

En condiciones ambientales de alta temperatura (>30°C) y humedad (>40%), se promueve la actividad metabólica de la planta. Esto es, las invertasas aceleran su actividad lo que deriva, entre otras cosas, en mayor formación de azúcares invertidos a expensas de la sacarosa. Cuando las cañas son cortadas y apiladas en condiciones de humedad elevada, la proliferación de hongos y moho sobre los tallos se favorece, esto genera condiciones anaerobias que coadyuban el desarrollo de bacterias anaerobias facultativas como las ácido lácticas *Leuconostoc mesenteroides*, principales responsables de generación de dextranas por depredación de sacarosa. Además, la actividad de estas bacterias forman

ácidos orgánicos que bajan el pH de los jugos, lo que favorece la inversión enzimática.

3.2.4. Tiempo de espera y resguardo de caña entre el corte y la molienda

La molienda debe ser lo más pronto posible, evitando lapsos de espera superiores a 24 horas debido a la degradación por enzimas invertasas y por microorganismos nocivos como hongos, levaduras, esporas y bacterias ácido lácticas. Junto con los factores climáticos representan las variables más importantes en la degradación de la calidad de los jugos de caña de azúcar.

3.3. Parámetros e indicadores de calidad en jugos de caña de azúcar

Las características fisicoquímicas intrínsecas de los jugos, inmediatamente después de la molienda, determinan su calidad y son parámetros o indicadores útiles y de primera mano al momento de establecer la frescura de los jugos. Sin embargo también existen indicadores que se derivan de múltiples procesos de degradación, como subproductos microbianos o metabólicos, que incluso suelen ser indicadores más exactos de la calidad de los jugos de caña. A continuación se describen los más representativos:

3.3.1. pH

Intensidad de acidez o alcalinidad de una sustancia. Para el caso del jugo de caña el pH determina el grado de frescura puesto que actividad enzimática (invertasas) y microbiológica tienden a reducirlo por formación de ácidos orgánicos.

3.3.2. Grados Brix

Los Brix representan la concentración de sólidos disueltos en una solución de sacarosa, basándose en una relación entre los índices refractivos a 20°C y el % de masa total de sólidos solubles de una solución acuosa de sacarosa pura.

3.3.3. Pol

La riqueza en sacarosa de los jugos de caña se determina mediante polarimetría, de donde se deriva la expresión de Pol; este aparato envía un rayo de luz polarizada a través de una solución de sacarosa y mide la rotación de luz después de pasar por el líquido. Con el valor de rotación resultante se estima el % de sacarosa en el jugo mediante fórmulas y tablas establecidas.

3.3.4. Pureza

La relación de la lectura del polarímetro (Pol) con los ° Brix determinar la pureza de una solución en términos de sacarosa.

3.3.5. Azúcares reductores

Así se definen los monosacáridos encontrados en el jugo de caña, principalmente glucosa y fructosa. Químicamente son moléculas que no pueden descomponerse en sacáridos más simples y que poseen un grupo carbonilo intacto que puede reaccionar, como reductor, con otras moléculas. La técnica más utilizada para determinar la concentración de azúcares reductores en jugos de caña es la técnica colorimétrica de Fehling-Müller, el cual se basa en la propiedad que tienen los monosacáridos y otras sustancias reductoras en reducir sales de Cu^{2+} , por ejemplo sulfato cúprico (CuSO_4) a óxido cuproso (Cu_2O), en el que el cobre presenta estado de oxidación 1+. El cobre cambia su estado de oxidación de 2+ a

1+ y la cantidad de cobre reducido está en proporción con los azúcares reductores, comúnmente expresados como azúcar invertido.¹⁰

3.3.6. Presencia de Microorganismos Patógenos

El deterioro de la caña empieza casi inmediatamente después del corte, a medida que pasa el tiempo y conforme aumenta su permanencia en los patios de molido o en el campo, el deterioro se incrementa. Cuando las condiciones de temperatura y humedad son altas, el hacinamiento de los tallos promueve el desarrollo de múltiples tipos de hongos, levaduras y mohos, lo que los deteriora severamente, debido a procesos de fermentación, y además promueve el crecimiento de microorganismos mesófilos y bacterias anaerobias facultativas como las ácido-lácticas. Esta flora bacteriana afecta significativamente la calidad después del corte ya que proliferan rápidamente sobre las zonas de pulpa expuesta, debido a fisuras ocasionadas por cortes o fracturas. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos ocurre por fisión binaria, por consiguiente el número de células se doblan durante un cierto periodo de tiempo lo que se denomina crecimiento exponencial. Algunos autores han descrito concentraciones promedio de estas bacterias en los jugos, que van desde las 1×10^6 - 1×10^8 UFC/mL para mesófilos y de 8×10^4 - 3×10^5 UFC/mL para bacterias ácido-lácticas.^{4a, 5,7} Ejemplos de los múltiples microorganismos que se han detectado en los jugos de caña son los siguientes:⁷

•Bacterias: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus luteus* y *Clostridium spp.* En este grupo se

destacan los bacilos que tiene la capacidad de formar endosporas que sobreviven cuando las condiciones del medio no son favorables, así como bacterias ácido-lácticas, que aunque no todas forman esporas, también son importantes productores de oligosacáridos y otros subproductos no deseados de degradación de sacarosa.

•Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pombe*, *Candida tropicalis*, *Candida micoderma*, *Candida intermedia*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranofaciens*, *Peronospora farinosa*, *Kluyvoromyces fragilis* y *Hansenula anómala*.

•Hongos y Mohos: *Penicillium citrovorus*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus variatum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Monilia sitophila*.

La diversidad de la microflora presente en los jugos de caña es basta, sin embargo, hay muchas especies que se desarrollan en el jugo con más frecuencia que otras y que por lo tanto, adquieren una gran importancia económica por depredar la sacarosa y sintetizar subproductos no deseados que entorpecen o complican los procesos realizados en los ingenios azucareros. En este campo, son especialmente importantes *Leuconostoc mesenteroides*, así como algunas bacterias coliformes como *Enterobacter amnigenus* y *Escherichia coli*.

En el caso de las bacterias ácido-lácticas, *L. mesenteroides*, sintetiza dextransacarasa, una enzima que cataliza la formación de oligosacáridos y polisacáridos como las dextranas, sintetizadas a partir de la sacarosa como materia prima. De este modo contribuyen a la pérdida de la misma, además de complicar los procesos extractivos del ingenio.

3.4. Formación de dextranas y otros subproductos de descomposición

Las dextranas son polisacáridos constituidos principalmente por unidades de glucosa unidas en forma de cadenas rectas mediante enlaces alfa 1-6 [Figura 5A]. En medicina tienen aplicación como sustituto del plasma sanguíneo,¹¹ sin embargo en agronomía, específicamente en la industria azucarera, la formación de dextranas no sólo implican depredación de sacarosa por parte de bacterias, sino que su presencia en los jugos también incrementa la viscosidad lo que complica significativamente la filtración, clarificación y evaporación de los jugos, así como la cristalización del azúcar, generando problemas en los evaporadores y los tachos. Adicionalmente las dextranas causan elongación de los cristales de azúcar a lo largo del eje "C", esto ocasiona morfologías anormales, disminuye la calidad y también incrementa las pérdidas de sacarosa por no recuperarse de las mieles y agua de lavado. Las dextranas, al igual que la sacarosa, tienen poder dextrorrotatorio, por lo tanto eleva, falsamente, los valores de Pol, lo que resulta en parámetros sobreestimados en pureza de los jugos.

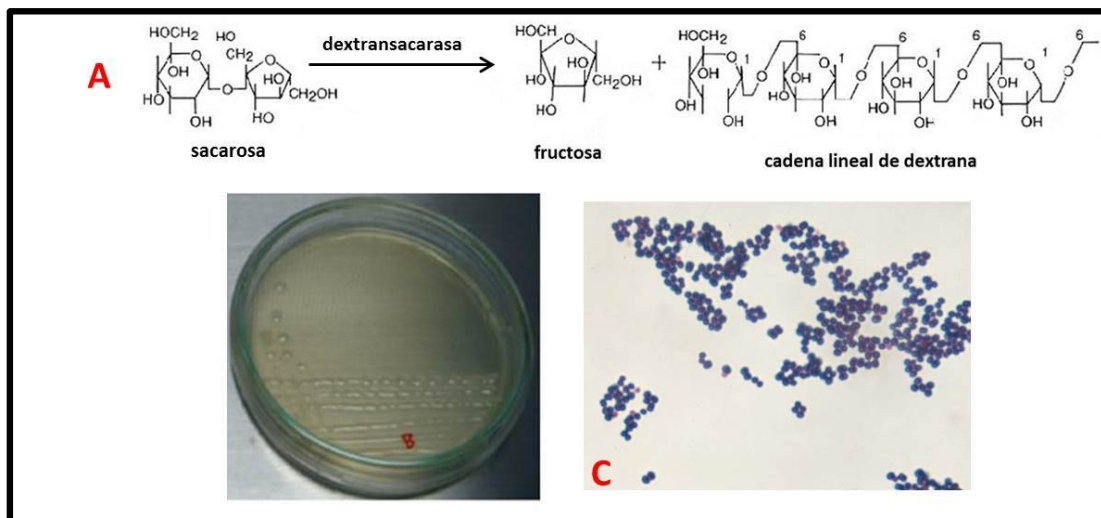


Figura 5. Formación de dextrana a partir de sacarosa por acción de *L. mesenteroides* y la enzima dextransacarasa; A) Reacción química, B) Dextrana producida en medio Mayeux y C) Tinción de Gram de *L. mesenteroides*.

3.4.1. *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc [Figura 5B-C] es un género de bacterias del ácido láctico Gram-positivas de la familia *Leuconostocaceae*. Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina y son catalasa negativa (lo cual los distingue de *Staphylococcus*). Son heterofermentativos, capaces de producir dextrano a partir de la sacarosa. Este género forma parte de los fermentadores mesófilos, son anaerobios facultativos. El género *Leuconostoc* comprende un grupo de bacterias lácticas que se encuentran principalmente en vegetales, aunque es común encontrarlos en cárnicos y productos lácteos. Actualmente comprende ocho especies: *Leuconostoc mesenteroides* (con tres subespecies: *mesenteroides*, *cremoris* y *dextranicum*), *L. lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. fallax* y *L. argentinum*.⁷ Son bacterias en forma de cocos que se disponen en pares o en cadenas. Su metabolismo es de tipo heterofermentativo y producen dextranos, ácidos orgánicos, alcoholes y CO₂ como consecuencia de la fermentación de los azúcares. No son capaces de producir NH₃ a partir de arginina, lo que los diferencia de los lactobacilos heterofermentativos. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre los 25 y 30° C. El crecimiento de estas bacterias se ve favorecido en condiciones anaerobias y algunas especies son capaces de producir, aunque muy infrecuentemente, infecciones en los seres humanos. Se consideran patógenos oportunistas asociados a bacteriemia por dispositivos intra-vasculares y al uso de nutrición parenteral total, generalmente en pacientes críticos o inmunocomprometidos.^{7d}

En jugos de caña con presencia de *L. mesenteroides*, la síntesis de dextranas ocurre a partir de sacarosa mediante la acción de la enzima dextransacarasa. De cada molécula de azúcar que se consume, solamente la

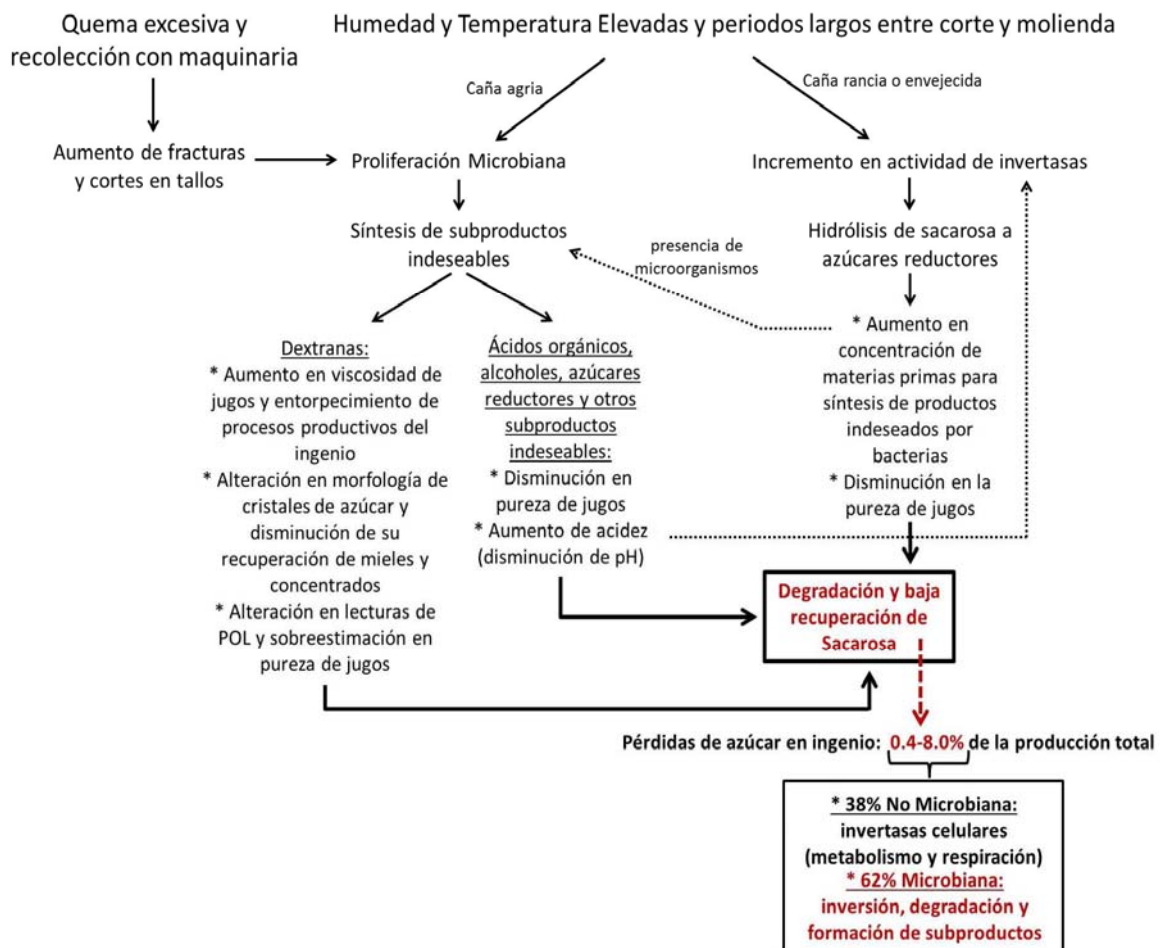
fracción de glucosa participa en la síntesis permaneciendo la fructosa como subproducto; ésta se descompone principalmente en manitol, aunque también se forman otros ácidos orgánicos y subproductos coloreados que inducen un descenso del pH. El aumento de acidez es factor concomitante para la tasa de inversión de la sacarosa por catálisis ácida, lo que contribuye a pérdidas adicionales de azúcar comercial. Entre los principales subproductos originados durante la acción microbiológica de *L. mesenteroides* se cuenta al ácido acético, láctico y butírico, manito y etanol, los cuales coadyuvan el descenso de pH de los jugos y la síntesis de materiales coloreados. Las condiciones de pH, temperatura, contenido de carbohidratos y humedad del jugo de caña, ayudan a que el crecimiento de bacterias sea tan abundante, que puede causar un aspecto desagradable y perjudicial, aumentando la viscosidad y turbidez.⁷ Las reacciones de óxido-reducción producidas en el jugo de caña como consecuencia su metabolismo, incluyen hidrólisis de carbohidratos y proteínas en subproductos más sencillos, como ácidos orgánicos, cetonas, aldehídos, aminas, amoníaco y otros gases.

En general, los principales subproductos formados durante el deterioro de la caña o de sus jugos indicadores del deterioro de la caña de azúcar son: ácidos orgánicos como ácido láctico, acético y butírico, alcoholes o polialcoholes como etanol y manitol, oligosacáridos y polisacáridos como las dextranas. Por lo tanto la medición de algunos de estos parámetros correlaciona con el grado de degradación o depredación de la sacarosa en los jugos. Por ejemplo, se ha descrito que las pérdidas de azúcar correlacionan con hasta 1.9 veces la formación de dextranas, y que por 0.1% de dextrana formada, hay 0.05% de sacarosa consumida.⁴ Por lo tanto, el control de la flora microbiológica en los jugos

es determinante para asegurar una buena calidad en los mismos y con ello, una buena recuperación de azúcar.

El esquema 3 ilustra un resumen de los factores más significativos que afectan la calidad de los jugos de caña y por lo tanto la recuperación de sacarosa.

FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE CAÑA DE AZÚCAR Y DE SUS JUGOS



Esquema 3. Factores que afectan recuperación de sacarosa en ingenios azucareros

4.- CONTROL DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA EN LA INDUSTRIA AZUCARERA

Tal como se ha venido mencionando la calidad en la caña de azúcar y sus jugos es fundamental para una buena recuperación de sacarosa y optimización de procesos extractivos en los ingenios. Se sabe que más del 50% de las pérdidas están asociadas a la actividad microbiana de la flora patógena encontrada en los jugos (*vide supra*); por lo tanto se han propuesto múltiples estrategias para su control y erradicación, para de esta manera disminuir las pérdidas millonarias en la industria azucarera. Como ejemplo, algunos autores sugieren la implementación de programas integrales en el control de la calidad que involucran: selección cuidadosa de los tallos cosechados, lapsos cortos entre corte y molienda, uso de agentes bactericidas y antisépticos, aplicación de agentes anti-invertasas y limpieza del proceso.⁴ En general, varias de estas estrategias no son viables o aplicables a los procesos industriales, como la selección cuidadosa de los tallos cosechados o la sanitización o limpieza de los procesos. Esto es porque los camiones transportadores son cargados varias veces al día con 20-30 toneladas de caña que deben llegar rápido al ingenio para su proceso y de igual manera, la caña tal cual se entregan a los molinos, presenta gran cantidad de microorganismos patógenos (bacterias, levaduras y hongos) provenientes del suelo, aguas de lavado de caña, condiciones de cosecha, etc. Por lo tanto, al momento de la extracción de los jugos, los microorganismos permanecen en él y viajan a través de todos los equipos y maquinaria involucrados en el proceso, propagando la contaminación. Esto impide establecer un control real de los parámetros de limpieza en el ingenio durante el proceso extractivo, el cual es continuo. Por ejemplo, en el Ingenio Quesería operan 24 horas procesando 350 toneladas de caña/hora con apoyo de 80 toneladas de agua vegetal/hora para el

proceso extractivo. Se realizan lavados de zonas específicas una vez al día y el mantenimiento y limpieza de la mayoría de los equipos se hace 1 vez al año.⁹

Un procedimiento que ha sido aplicado en la industria cañera para optimizar la recuperación de sacarosa es el uso de desinfectantes o antisépticos (principalmente bactericidas). Por ejemplo se utilizan, en diferentes etapas del proceso, aldehídos como el glutaraldehído y soluciones de formaldehído al 30 o 50%, compuestos cuaternarios de amonio, tiocarbamatos, soluciones de hipoclorito de calcio o sodio, sales halogenadas (iodo o flúor), peróxido de hidrógeno, ozono, entre otros. La problemática principal de estos agentes es su baja o moderada efectividad, requisitos de seguridad para su aplicación y en algunos casos, alta residualidad y potencial toxicidad.^{4, 13}

Ejemplos representativos de algunos productos comerciales y no comerciales que adicional a su efecto bactericida presentan inhibición de enzimas invertasas son:

* Busan 881®: De la familia de los ditiocarbamatos. Bactericida de amplio espectro compuesto por cianoditiocarbamato de disodio y N-metilditiocarbamato de potasio. Es muy corrosivo en piel y ojos por lo que debe manejarse con precaución.^{4, 7}

* Lipesa 106C®: De la familia de los aldehídos. Glutaraldehído, reacciona con las proteínas de superficie de las bacterias, induciendo desnaturalización, entrecruzamiento y muerte del patógeno. Se conoce la toxicidad e irritabilidad del compuesto por lo que debe manejarse con precaución.^{4, 7}

* Soluciones electrolizadas de superoxidación: Algunos autores han mencionado el uso exitoso de soluciones electrolizadas de superoxidación para el tratamiento de tallos cosechados de caña, de lo que reportan menor actividad de

invertidas y recuperación de dextranas.^{4a} A continuación se revisa en detalle su síntesis, composición y potencial aplicación en industria cañera.

4.1. Soluciones Electrolizadas de Superoxidación y su acción potencial en la industria cañera

Desde hace varias décadas, las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) han sido utilizadas como antisépticos efectivos en el combate de bacterias, virus, hongos y parásitos.¹⁴⁻²¹ Se han aplicado con éxito en el ámbito de la medicina, agroindustria y agroveterinaria, ya sea como desinfectantes de superficies inanimadas y equipos, o en la desinfección de alimentos y para la profilaxis y desinfección de heridas en mamíferos.¹⁴

Inicialmente se utilizaron primero soluciones electrolizadas con pH ácido¹⁵⁻¹⁸ cuyo uso fue eventualmente sustituido por soluciones electrolizadas con pH neutro dado su eficiente poder microbicida como sanitizantes de amplio espectro, mayor estabilidad, caducidad, biocompatibilidad e inocuidad respecto a las SES con pH ácido; así como una menor o nula actividad corrosiva y de alteración en propiedades organolépticas de alimentos.^{14,19-23}

4.1.1. Producción de SES

Las SES se obtienen a partir de la electrólisis controlada de soluciones acuosas salinas, como soluciones de cloruro de sodio (NaCl) [Figura 6].

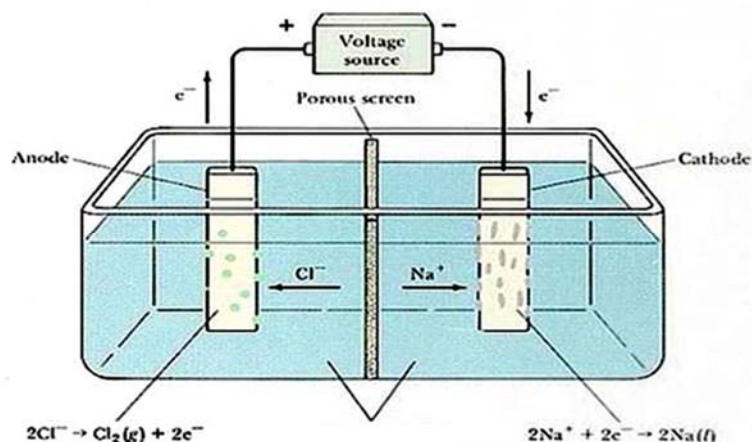


Figura 6. Ejemplo de celda electrolítica para producción de solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES)

La celda electrolítica está equipada de un par de electrodos, ánodo y cátodo, en los que ocurren las reacciones electroquímicas que dan origen a la SES. Inicialmente, y por efectos de solvatación, el NaCl se disocia en el agua en iones sodio (Na^+) cargados positivamente y denominados cationes, y en iones cloruro (Cl^-), cargados negativamente y llamados aniones.

Posteriormente, y al momento en que se aplica el voltaje eléctrico en la celda, los cationes migran hacia el electrodo negativo (cátodo) y los aniones lo hacen hacia el electrodo positivo (ánodo).

En el cátodo ocurren reacciones de reducción, esto es que los cationes sodio ganan electrones para reducir su estado de oxidación de +1 a 0 (**ecuación 1a**). El sodio metálico formado reacciona de forma instantánea y exotérmicamente en el medio acuoso formando hidróxido de sodio (NaOH) e hidrógeno molecular (H_2 (g)) que se disuelven en el medio (**ecuación 2a**). El NaOH se solvata y nuevamente genera cationes sodio (Na^+) y aniones hidroxilo (OH^-), lo que genera un aumento en el pH del medio (**ecuación 2b**).



Por otro lado, los aniones cloruro migran hacia el electrodo positivo (ánodo) en donde se oxidan, es decir en donde ceden electrones para incrementar su estado de oxidación, de -1 a 0 (**ecuación 1b**). Una parte del cloro molecular formado (Cl_2 (g)) se disuelve sin reaccionar en el agua, mientras que otra parte

reacciona formando ácido hipocloroso (HOCl) y cationes hidrógeno (H⁺) (**ecuación 3**), lo que ocasiona una disminución del pH del medio. Por lo tanto, el lado de la celda provisto del electrodo positivo (ánodo) siempre tendrá un pH ácido y el lado de la celda provisto del electrodo negativo (cátodo) siempre presentará pH alcalino. La titulación controlada de estas dos soluciones, da origen a la solución electrolizada de superoxidación con pH neutro.



Tal como se describió, a partir de NaCl las reacciones electrolíticas principales forman NaOH, Cl₂, O₂ e H₂ (**ecuación 4**), pero adicionalmente las SES tienen disueltas otras sales y moléculas, también resultantes del proceso de electrólisis, como: OCl_x⁻ (x=2-4), O₃, etc; las cuales se denominan en conjunto: especies activas de cloro y oxígeno.



El control del pH de una solución que contiene todo este tipo de especies disueltas es fundamental ya que muchos equilibrios favorecen a una u otra forma de los iones, los cuales a su vez, presentan propiedades diferentes. Por ejemplo, se sabe que el HOCl es más efectivo que el OCl⁻ por ser una molécula neutra y aproximarse más fácilmente a la periferia negativamente cargada de muchos microorganismos patógenos como las bacterias;¹¹ además, el HOCl obedece a un equilibrio regulado por el pH entre su forma molecular y su forma ionizada, OCl⁻ (anión hipoclorito):



A valores de pH de 7.5, la proporción HOCl:OCl⁻ es 50/50. Cuando el pH desciende hasta 7.0 la proporción varía a 78:22 y si el pH cae a 6.5, los valores cambian a 95:5. Cuando el pH desciende a valores menores que 2, el equilibrio mostrado en la ecuación 3, está favorecida a la izquierda produciendo liberación de cloro gas al medio.²⁵ Por lo tanto es fundamental el control del pH si se desea encontrar mayor proporción de HOCl vs OCl⁻ y evitar la producción de Cl₂ (g), dada su toxicidad.

4.1.2. Mecanismo de acción de la SES

La naturaleza de las especies activas de cloro y oxígeno de las SES, las provee de un alto ORP (800-950 mV) lo que las caracteriza como soluciones superoxidantes. Esto es que, al entrar en contacto con diferentes materiales, "secuestran" o "depredan" electrones disponibles. Para el caso de microorganismos nocivos, está descrito^{14d, m, 15b} que la SES induce daño oxidante de tipo lisis osmótica, ocasionando desequilibrio en los fluidos inter- e intracelulares. Esto resulta en pérdida de turgencia por formación de poros en la membrana, pared, cápsula, etc., del microorganismo patógeno [Figura 7].

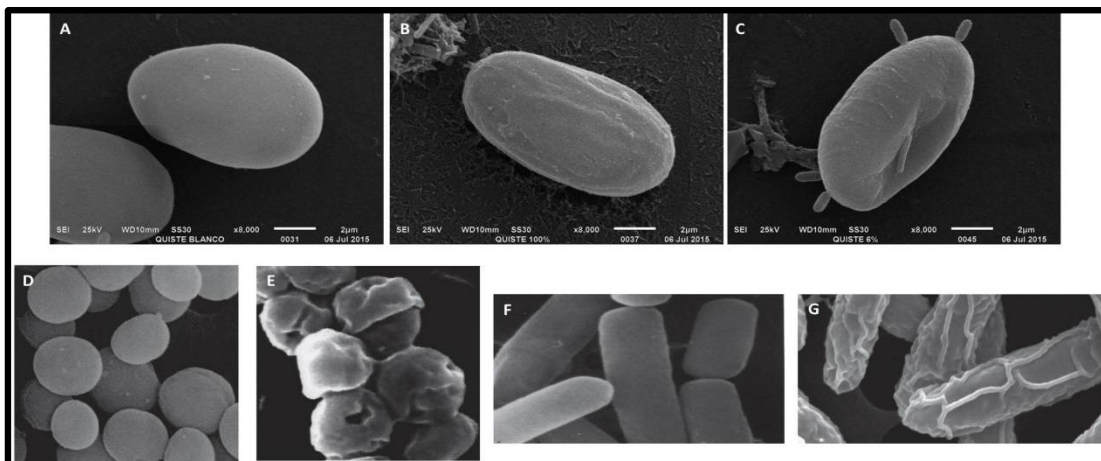


Figura 7. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de microorganismos patógenos como quistes de *Giardia duodenalis*,^{15d} tratados con A) agua desionizada (control), B)

SES a 60 ppm por 15 minutos, C) SES 3.25 ppm por 15 minutos; *Bacillus sphaericus*^{15b} tratado con D) PBS (control), E) solución electrolizada superoxidada ácida (SESA; pH 2.6) a 60 ppm por 10 minutos, *Staphylococcus saprophyticus*^{15b} tratado con F) PBS (control), G) solución electrolizada superoxidada ácida (SESA; pH 2.6) a 60 ppm por 10 minutos.

También existen reportes en la literatura que detallan efectos nocivos de las SES sobre los mecanismos de respiración y alimentación de los microbios,²⁶ aunque sin lugar a duda, el mecanismo primario de daño celular ocurre por lisis osmótica. Este tipo de mecanismo impide que los microorganismos puedan desarrollar un contra-mecanismo de resistencia ante este tipo de soluciones; esto aunado a sus propiedades de inocuidad, atoxicidad, ausencia de subproductos residuales, manejo sencillo al momento de aplicar y amabilidad con el ambiente, las convierte en los antisépticos ideales.

Dado que las SES han logrado eliminar eficientemente a múltiples microorganismos nocivos, se les han atribuido otras bondades,²⁷ por ejemplo en las áreas de agronomía y veterinaria se ha descrito aumento en la germinación de semillas y crecimiento de brotes,^{14e,f,27a,b} incremento en la eclosión de huevo fértil de aves,^{27d,j} elevación en cosecha de camarón y tilapia en granjas,^{27c,e,f} prolongación de vida de anaquel en alimentos perecederos,^{22,27e,i,j} y aumento en la recuperación de sacarosa de caña de azúcar.^{24g,h} Por lo tanto, las SES se colocan como antisépticos de vanguardia, seguros y eficientes en el combate de múltiples microorganismos nocivos, cuya eliminación genera beneficios adicionales como los anteriormente mencionados e incluso con proyección internacional, como sería para el caso de la industria cañera Mexicana. Precisamente sobre este punto se desarrolla la presente tesis de licenciatura.

5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Tal como se mencionó en la introducción (*vide supra*) existen 57 ingenios azucareros operando en la República Mexicana, de los cuales el 40% reportó índices de eficiencia en fábrica inferiores al promedio nacional durante los periodos de zafra 2000-2011, y aunque en el periodo 2012-2013 se registró un incremento del 27% en la producción total de azúcar, no se atribuye dicho incremento a la mayor eficiencia en las labores desarrolladas en los ingenios (post-cosecha). De acuerdo con lo anteriormente revisado sobre la calidad de la caña de azúcar y sus jugos y sobre su efecto en la recuperación eficiente de sacarosa y óptima operación de los ingenios, se sabe que más del 60% de la pérdida de sacarosa correlaciona con la elevada concentración de flora microbiana, especialmente las bacterias ácido lácticas formadoras de dextranas, *Leuconostoc mesenteroides*. Por lo tanto el control o erradicación de este tipo de patógenos afectaría la calidad de los jugos de caña en ingenios y por lo tanto en la recuperación del azúcar, que de ser aplicable a nivel industrial, implicaría un impacto positivo en el sector económico y productivo de la industria azucarera.

Inicialmente se plantea investigar, *in vitro*, el efecto de un antiséptico sobre la caña de azúcar y sus jugos, monitoreando cambios en la contaminación bacteriana, variación de propiedades físico-químicas (pH y Brix) y formación de subproductos metabólicos como dextranas y azúcares reductores. El antiséptico a utilizar es una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES) fabricada por Esteripharma México, S.A. de C.V., que ha demostrado^{14, 21a, 23,27} ser un antiséptico de amplio espectro (bacterias, virus, hongos, esporas, levaduras, algunos parásitos y sus quistes), inocuo, amigable con el ambiente y actualmente posicionada exitosamente como sanitizante de alto nivel²⁸ en el área de la

medicina y la industria alimentaria. Además, en la literatura existe amplia evidencia sobre el uso de las soluciones electrolizadas de superoxidación como antisépticos de alto nivel en diversos rubros del sector productivo y de servicios.¹⁴⁻²² En particular, estudios *in vitro*^{29a} y sobre productos cárnicos^{29b} han descrito la disminución significativa de las UFC/mL de la bacteria *Leuconostoc spp.*, luego del tratamiento por aspersión con una solución similar a la SES pero con pH ligeramente ácido. Incluso existen investigaciones realizadas directamente en ingenios azucareros de la India que demuestran un incremento del 15% en la pureza del jugo de caña de azúcar y del 24% en la recuperación de sacarosa, luego de 120 horas de resguardo, luego de tratar con un solución similar con pH ligeramente ácido.^{4a} De acuerdo con lo anterior, se propone que el tratamiento con SES de la caña y/o de sus jugos contaminados con flora patógena nociva, especialmente con *Leuconostoc spp.*, generará la erradicación o disminución de la misma, así como de sus subproductos indeseables como las dextranas y azúcares reductores, sin alterar las propiedades organolépticas. Además, al ser inocua y amigable con el ambiente, ofrece ventajas adicionales obvias de seguridad sobre los bactericidas comúnmente utilizados en la industria cañera (*vide supra*). El proyecto se planteó en función de los siguientes objetivos:

6.- OBJETIVOS

6.1. Objetivos Generales:

1.- Establecer la efectividad de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES) en la eliminación de microorganismos presentes en tallos y jugo de caña de azúcar, especialmente *L. mesenteroides*.

2.- Determinar la conveniencia de utilizar una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro para mejorar la calidad de jugos de caña de azúcar

como consecuencia de la eliminación de *L. mesenteroides* y disminución de subproductos metabólicos microbianos.

6.2. Objetivos Particulares:

1.- Cuantificar y caracterizar parte de la flora bacteriana patógena presente en jugo de caña obtenido de ingenio.

2.- Aislar, cuantificar y caracterizar la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* a partir de jugo de caña obtenido de ingenio.

3.- Determinar el efecto microbicida, comparativamente con una solución acuosa de NaOCl, de una solución electrolizada de superoxidación de pH neutro, a diferentes concentraciones, sobre las bacterias presentes en caña de azúcar y sus jugos, especialmente sobre *Leuconostoc mesenteroides*.

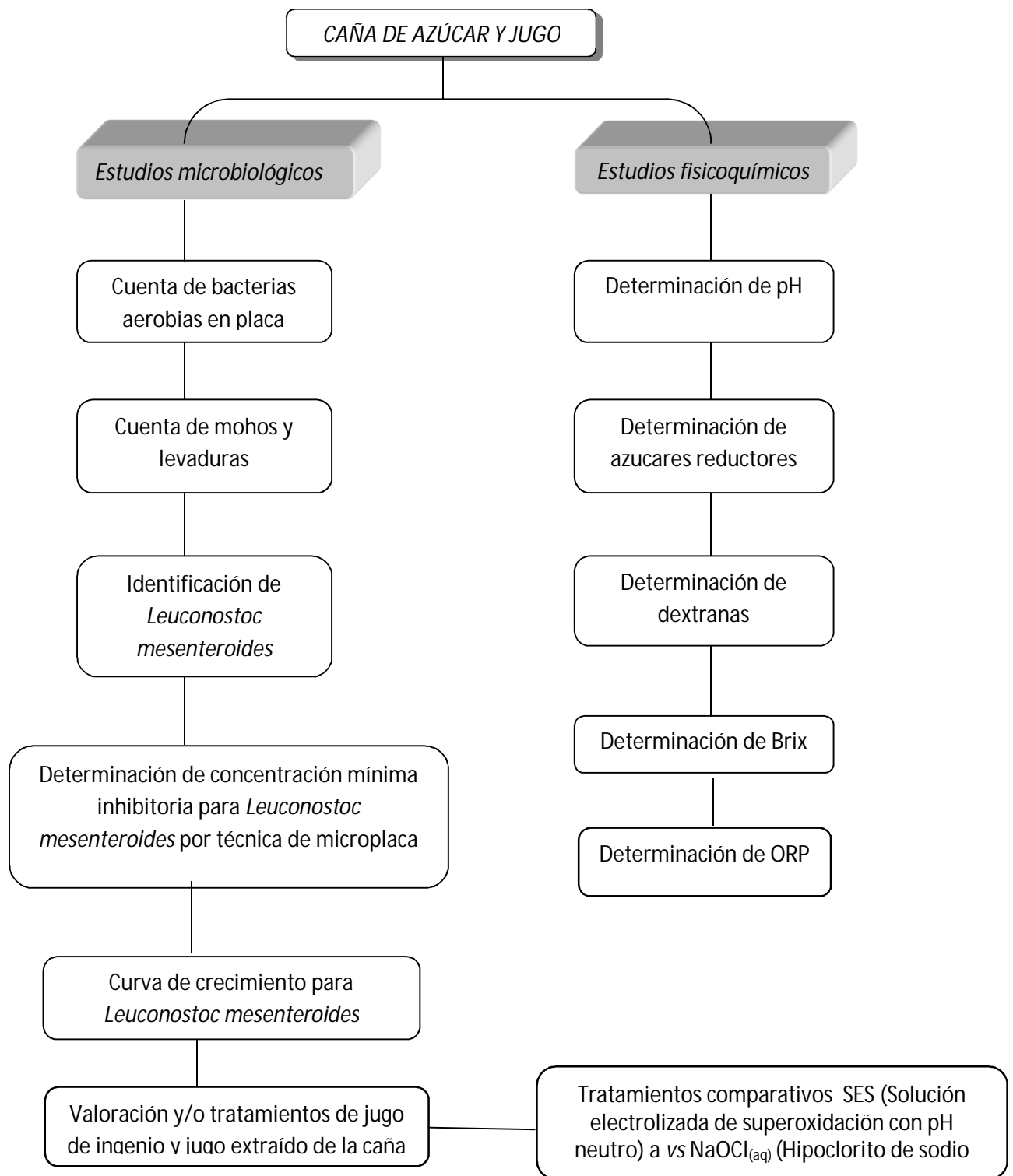
4.- Establecer un análisis comparativo entre la calidad de jugos de caña contaminados con *L. mesenteroides*, tratados y sin tratar con SES o solución acuosa de NaOCl, determinando °Brix, porcentaje de azúcares reductores (%RED), concentración de dextranas y pH.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluará, *in vitro*, el potencial de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro a distintas diluciones para eliminar flora microbiana nociva presente en tallos y jugo de caña procedentes del ingenio Quesería, perteneciente al grupo Beta San Miguel. Este ingenio se encuentra en la localidad de Quesería, ubicada en el municipio de Cuauhtémoc, Colima, México y actualmente procesan la variedad precoz de caña CP722086. También se

establecerá un análisis comparativo de dicho potencial contra una solución acuosa de NaOCl con similares características de concentración de especies oxidantes.

Se determinará la calidad del jugo proveniente del ingenio o del jugo derivado de tallos de caña, también provenientes del ingenio, tratados y sin tratar con SES o NaOCl_(aq) a partir de análisis fisicoquímicos, bioquímicos y microbiológicos. Se determinará pH, ° Brix, concentración de azúcares reductores y dextranas. También se realizarán conteos de bacterias aerobias y bacterias ácido-lácticas procurando identificarlas; en algunos casos también se determinará carga de mohos, hongos y levaduras. Para el caso de los jugos la evaluación se hará de manera directa mientras que para los tallos, se obtendrá el jugo de manera manual utilizando un exprimidor de presión. El jugo así obtenido se analizará de manera directa y además se utilizará para realizar experimentos de variación en calidad de los jugos a través del tiempo, mediante infecciones controladas con *L. mesenteroides* aislado de los mismos jugos provenientes del ingenio. Cuando el análisis de los jugos no sea inmediato, las muestras de conservarán congeladas por periodos no mayores a 5 días. El esquema 4 muestra el plan general de trabajo y en la sección de anexos se incluye la preparación de medios de cultivo y soluciones; así como el detalle de la construcción de curvas de calibración de las distintas mediciones.



Esquema 4. Reseña general de metodología.

7.1. Cuenta de bacterias aerobias (mesófilos) en placa³⁰

1. Se transfirió 1ml de muestra a un tubo con 9 ml de solución salina fisiológica estéril (SSFE), se agito perfectamente y se efectuaron las siguientes diluciones decimales: 1×10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

2. Se colocaron, en cajas Petri estériles y por duplicado, 100 μ L de las diluciones 1×10^{-1} y 10^{-3} .

3. Posteriormente se agregaron 15-18 ml de BHI (infusión cerebro corazón) a cada placa, se homogenizaron mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.

4. Se dejaron solidificar para incubar durante 48 h a 37°C.

5. Se contaron las UFC contenidas en cada una de las cajas con ayuda de un contador de colonias.

7.2. Cuenta de mohos y levaduras³¹

1. Se transfirió 1ml de muestra a un tubo con 9 ml de SSFE, se agitó y se efectuaron las siguientes diluciones decimales: 1×10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

2. Se colocó, en cajas Petri estériles y por duplicado, 1 ml de las diluciones: 10^{-3} y 10^{-5} .

3. Posteriormente se agregaron 15-18 ml de agar papa dextrosa a cada placa, se homogenizó mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.

4. Se dejó solidificar para incubar durante 3, 4 y 5 días a 25°C.

5. Se contaron las UFC contenidas en cada una de las cajas con ayuda del instrumento contador de colonias.

7.3. Identificación de algunos microorganismos patógenos en jugo de caña de ingenio

Con un asa se tomó una muestra del jugo de ingenio y se sembró en una caja de medio BHI por método masivo (**anexo 3**) y se incubó 24 h a una temperatura de 25° C; pasado este tiempo se observó el crecimiento de diferentes colonias de bacterias las cuales se sembraron por separado en diferentes cajas por método masivo. Posteriormente se realizó a cada muestra una coloración de Gram para observar microscópicamente su morfología bacteriana corroborar su pureza. Cada bacteria purificada se caracterizó utilizando el equipo Vitek® 2 (**Anexo 4**).

7.4. Purificación, siembra e identificación de *Leuconostoc mesenteroides* por tinción de Gram, catalasa y oxidasa³²

El crecimiento, purificación, aislamiento y propagación de *L. mesenteroides* se realizó utilizando los medios BHI (Brain Heart Infusion),^{32e} BHI Modificado, Agar Mayeux³⁷ y Agar Mayeux modificado.

El medio Agar Mayeux se utilizó para hacer crecer selectivamente a *L. mesenteroides* en conjunto con la dextrana producida. Adicionalmente se preparó un medio Agar Mayeux modificado (sin sacarosa), para poder contar las UFC de *L. mesenteroides* sin obstrucción, por presencia de dextranas.

En los medios BHI se comparó si las características y velocidad de crecimiento de *L. mesenteroides* era similar a lo observado en los medios Mayeux y se utilizó como medio de cultivo adicional.

Para purificar a la bacteria, inicialmente se sembraron (con asa) alícuotas del jugo de ingenio en medio BHI por técnica de dilución (**anexo 3**). Se incubó 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron resiembras, en medio BHI Modificado, de las colonias con morfología características de *L. mesenteroides*, inicialmente crecidas en medio BHI. Se realizó la coloración de Gram y se observó microscópicamente su morfología y pureza. En caso de no estar pura, se repiten las siembras en medio selectivo o BHI. Una vez pura se realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su identificación, de la manera a continuación descrita. La propagación de la bacteria pura se realizó en medio Mayeux modificado por técnica masivo (**anexo 3**).

7.4.1. Tinción de Gram^{32b-d}

Frotis: Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica hasta el rojo vivo y esperar a que enfríe un poco. Posteriormente, tomar con el asa una gota de agua estéril y agregar en un portaobjetos. Flamear nuevamente el asa y esperar a que enfríe. Tomar con el asa un poco de muestra bacteriana a partir de una colonia aislada, agregar en la gota de agua que está en el portaobjetos y homogeneizar suavemente con movimientos circulares. Esperar a que seque al aire libre o poner durante uno o dos segundos con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

Tinción: Agregar cristal violeta; solo el suficiente para que se cubra el extendido bacteriano, dejar actuar durante 60 segundos. Agregar el lugol; solo el suficiente, dejar actuar durante 60 segundos. Decantar y enjuagar con agua. Agregar una o dos gotas de alcohol-acetona e inmediatamente enjuagar con agua

corriente. Agregar Safranina; solo la suficiente. Dejar actuar durante 60 segundos. Enjuagar con agua corriente. Dejar secar a temperatura ambiente. Observar en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

7.4.2. Catalasa y oxidasa^{32b-d}

Oxidasa: Se toma con un palillo grueso de madera una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 24h. La muestra se pone en contacto con un disco impregnado de tetrametil-*p*-fenilendiamina, dimetil-*p*-fenilendiamina o indofenol. Se debe observar una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

Catalasa: El reactivo utilizado en la prueba es el peróxido de hidrogeno al 30%; se pone una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con un palillo plano tomar un poco de bacteria a partir de una colonia aislada, si se observa el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa.

7.5. Curva de crecimiento para *Leuconostoc mesenteroides*

La bacteria *L. mesenteroides* se purificó y propagó de acuerdo a lo descrito en 7.4. Posteriormente se estandarizó al 1.0 de la escala de McFarland (**anexo 5**) en 3 ml de SSFE. Se tomó 1 ml del estándar, se colocó en un matraz con 99 ml de medio de cultivo BHI suplementado con 1ml de SFB (BHI Modificado) y se mantuvo en agitación durante una hora. Se tomaron alícuotas, de 100 µL, al tiempo 0 (antes de iniciar agitación) y desde la hora 1 (posterior a la agitación) y hasta 7 horas post-agitación; adicionalmente a las 17, 18, 19 y 20 horas post-agitación. Las alícuotas se colocaron en una placa de lectura de 96 pozos y se leyó su absorbancia inmediatamente después de ser tomadas, utilizando un lector

de placas ELx800 BioTek, operando a 550 nm. El experimento se realizó por duplicado.

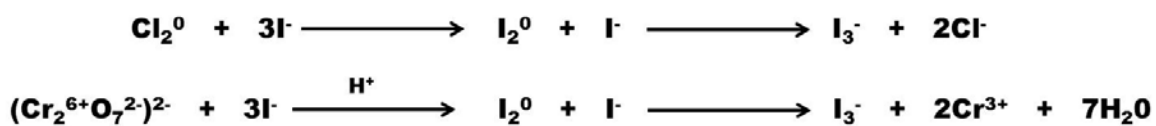
7.6. Valoración de solución electrolizada de superoxidación e hipoclorito de sodio

Se utilizó solución electrolizada de superoxidación con pH neutro al 0.006% e intervalo de pH entre 6.7-7.0 y ORP de 850-870 mV. La solución fue proporcionada por la casa farmacéutica Esteripharma México S.A. de C.V. También se utilizó solución de NaOCl al 4.00-4.99% (Sigma-Aldrich, 239305). A partir de ambos antisépticos se prepararon diversas soluciones de trabajo diluidas utilizando agua bidestilada. El intervalo de pH de las soluciones de trabajo a partir del NaOCl, fue de 8.57-7.35, mientras que su ORP de entre 780-814 mV. Para valorar a los agentes antisépticos se utilizó el método colorimétrico analítico de yodometría 4500-Cl B³³, esta técnica es válida para determinar la concentración de cloro activo para el caso del NaOCl y las especies activas de cloro y oxígeno para el caso de la SES. Se utilizó la misma concentración de cloro libre de NaOCl que de SES, el ajuste se realizó utilizando agua bidestilada con pH de 6.10 y ORP de 672 mV.

7.6.1. Método yodométrico³³

El método yodométrico es una titulación redox indirecta del agente oxidante. En este caso el cloro residual oxidará al ión yoduro (I^- , incoloro) a yodo molecular (I_2^0 ; anaranjado o amarillo, dependiendo de la concentración), el cual es volátil y muy insoluble, por lo que la reacción se realiza utilizando exceso de yoduro de potasio (KI) lo que promueve la formación del ión triyoduro (I_3^- , anaranjado o amarillo, dependiendo de la concentración) [Ecuación 6].³³ Este ión se reduce nuevamente a ión yoduro por adición de solución patrón de tiosulfato de sodio. El

el ión yoduro excedente presente en el medio acuoso para formar el anión triyoduro (I_3^- , estado de oxidación 1-). Los agentes oxidantes se reducen y el ión yoduro se oxida:



El cloro cambia su número de oxidación de 0 a -1 (reducción); el cromo del ión dicromato pasa de +6 a +3 (reducción) y el ión yoduro pasa de -1 a 0 (oxidación).

En la ecuación 8, el agente reductor tiosulfato (el estado de oxidación de los azufres es mixto, uno es 5+ y el otro el 1-) reacciona con el complejo molecular I_3^- (estado de oxidación 1-). El agente reductor se oxida al reaccionar con el complejo molecular I_3^- , obteniéndose anión tetratioato y ión yoduro (I^-):



Uno de los azufres del ión tiosulfato pasa de -1 a 0 (oxidación), mientras que el yodo molecular pasa de 0 a -1 (reducción).

Los cambios en los estados de oxidación inducen cambios en la coloración de la solución al momento de titularse que indican su punto final y por medio de unos ajustes aritméticos se logra conocer la concentración inicial del agente oxidante, que para el caso del $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ será cloro residual, mientras que para la SES serán las especies activas de cloro y oxígeno.

7.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de SES sobre *L. mesenteroides* y otros patógenos presentes en jugo de caña por técnica de microplaca o técnica colorimétrica de Mosmann.

7.7.1. Técnica colorimétrica de Mosmann³⁴

El método fue desarrollado en 1983 por Mosmann y modificado por Francois Denizot y Rita Lang. El MTT, también conocido como azul de Tiazol, es una sal de tetrazolio soluble en agua de coloración amarilla. La prueba colorimétrica de MTT ha sido previamente descrita para medir la citotoxicidad y proliferación celular. La prueba se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa de células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo) en MTT formazán, un producto de color azul. La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 590 nm.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó por microdilución en placa de 96 pozos. Se estandarizó la bacteria al 0.5 de la escala de McFarland en un tubo de 2 ml de SSFE y se colocaron 100 μ L del estandarizado sobre pozos de la placa, previamente cargados con 100 μ L de SES a: 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.93 y 0.0 μ g/ml, estandarizados con SSFE. Cada pozo se mezcló con la micropipeta y se dejó actuar 1 min. A cada pozo de la placa se añadieron 15 μ L de reactivo MTT y se incubó a 37°C durante 30 min. Finalmente se leyó su absorbancia en un lector de placas ELx800 a 540 nm. La prueba de viabilidad bacteriana se realizó para todos los pozos. Se sembraron 5 μ L del inóculo de cada pozo en una placa de agar de BHI y se realizó el conteo de UFC luego de incubar 24 h a 25°C. Cada ensayo con su respectivo control de crecimiento y esterilidad se realizó por duplicado.

7.8. Determinación de azúcares reductores (Método de Eynon y Lane) ^{7,10}

Se transfieren 50 ml de la muestra a analizar en una bureta. Aparte, en un matraz Erlenmeyer se colocan (en el siguiente orden) 5 ml de solución de Fehling A, 5 ml de solución de Fehling B, 20 ml de agua destilada y 5 ml de la muestra a analizar. El matraz se agita con ayuda de agitador magnético, se calienta hasta ebullición y se mantiene así durante 2 minutos. Se agregan 3 gotas de azul de metileno al 1% y se coloca la bureta con la muestra a 2 cm de la boca del matraz Erlenmeyer y mientras está en ebullición y agitación se agrega la muestra de la bureta hasta que desaparezca la coloración azul y aparezca una tonalidad color rojo ladrillo. Se registra la cantidad de ml de muestra gastados para producir el vire. Las lecturas del volumen fueron interpretadas en función de la curva estándar preparada a partir de soluciones patrón de D-glucosa y D-fructosa (1:1), la cual correspondió a una ecuación exponencial, $y = 8616.1x^{-1.075}$; $R^2 = 0.9967$.

7.9. Determinación de dextranas³⁵

Para la determinación de concentración de dextranas en los jugos de caña analizados se siguió la metodología descrita en la NMX-F-476-SCFI-2011. Los resultados fueron interpretados con la curva de calibración construida, cuyos resultados se muestran en el apéndice 2.

Se colocaron 2 ml del jugo de caña a analizar en un tubo de ensayo y se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 10% para realizar digestión durante 5 minutos. Posteriormente se filtró 1ml de la solución digerida a otro tubo de ensayo utilizando un microfiltro provisto de una membrana de celulosa poro 0.45 μm (Millipore®; Cat. No. HATF 13750). Finalmente se adicionó 1 ml de alcohol etílico absoluto, se homogenizó y se dejó reaccionar durante 5 minutos. La turbidez

formada se leyó en espectrofotómetro operando en modo VIS a una longitud de onda de 720 nm.

7.10. Determinación de pH y ORP

La medición de pH y ORP se realizó de manera directa sumergiendo en los jugos un equipo Combo pH & ORP Hanna Instruments Hi 98121 combinados de pH/ORP/Temperatura.

7.11. Determinación de ° Brix

Se utilizó un refractómetro con capacidad para registrar lecturas de 0° a 32°Brix (Refractómetro portátil ATAGO Hand Refractometer, N-1E). Las alícuotas de jugo a analizar se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm (Millipore®; Cat. No. HATF 13750); se tomó una gota de la solución y se colocó en la ventana de lectura del refractómetro. Se observó la escala y se registró la lectura indicada, la cual es igual a los grados Brix de la muestra.

7.12. Ensayos de desinfección sobre tallos y jugo de caña de ingenio con SES o NaOCl_(aq)

7.12.1. Tratamiento y valoración de tallos

Los tallos se manejaron tal cual fueron recibidos del ingenio. Se picó la caña sin pelar ni lavar en trozos de aproximadamente 2-3 cm² y se formaron pilas de 10 g de muestra. Algunas fueron infectadas por aspersión con 100-300 µL de jugo de ingenio. Luego de 1 minutos algunas pilas fueron tratadas por aspersión con 450 µL de agua bidestilada (blanco) o SES a 44 y 6 ppm, partiendo de una SES a 60 ppm y diluyendo con agua bidestilada. Se dejaron reaccionar durante 1, 5, 10 ó 30 minutos y se procedió a moler, cada pila, en licuadora casera (máxima velocidad, 30 segundos) utilizando 100 ml de agua bidestilada. El jugo resultante

se pasó por filtro de gaza y algodón para retirar fibra y remanentes sólidos y se conservó congelado a 4°C en tubos Falcón® de 15 ml hasta su análisis microbiológico. Los análisis se realizaron por duplicado o triplicado.

7.12.2. Valoración y tratamiento del jugo de ingenio

Inicialmente el jugo se valoró tal cual fue recibido del ingenio. Se determinó de manera directa su pH y ORP, concentración de azúcares reductores y dextranas. La carga microbiológica patógena se realizó utilizando los medios apropiados para microorganismos aerobios, bacterias ácido lácticas, mohos, hongos y levaduras (*vide supra*). Los tratamientos del jugo con SES o NaOCl_(aq) se realizaron utilizando concentraciones de 60, 30 y 15 ppm del antiséptico. Se mezclaron 100 µL de jugo con 100 µL del respectivo antiséptico y se dejaron reaccionar durante 60 segundos. Posteriormente se sembraron en medio Agar Mayeux y Agar Mayeux modificado y se realizaron los conteos respectivos de UFC. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.12.3. Inhibición de formación de dextranas por tratamiento de jugo de ingenio con SES o NaOCl_(aq)

Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección 7.12.2 sólo que, de manera adicional, la dextrana formada en las cajas con medio Mayeux se disolvió en 10 ml de agua bidestilada estéril para determinar su pH y concentración. Los experimentos se realizaron por triplicado sextuplicado.

7.13. Ensayos de degradación a través del tiempo de jugo de caña contaminado con *L. mesenteroides*

7.13.1 Obtención y valoración del jugo de caña obtenido de tallos provenientes de ingenio

La caña, recibida del ingenio como tallos de 50-60 cm de longitud, se peló y picó en trozos de aproximadamente 9cm². Posteriormente se colocaron en un exprimidor manual y se extrajo su jugo por compresión. Del jugo resultante se determinó de manera directa el pH, ORP, concentración de azúcares reductores y dextranas. Los ° Brix se determinaron luego de pasar una alícuota de los jugos a través de una membrana 0.45 µm (Millipore®; Cat. No. HATF 13750). La carga microbiológica patógena se realizó utilizando los medios apropiados para microbios aerobios y para bacterias ácido- lácticas (*vide supra*).

7.13.2. Curva de degradación de jugo de caña obtenido de tallos de ingenio, por infección controlada con *L. mesenteroides*

La obtención y valoración inicial de los jugos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 7.13.1. La bacteria *L. mesenteroides* se aisló, purificó, concentró a partir de jugo de ingenio. La muestra se estandarizó a 3 ml con 1x10⁸ o 12x10⁸ UFC/ml (turbidez McFarland), de acuerdo a lo descrito en la sección 7.6. Posteriormente se colocó 1 ml del inóculo en 199 ml de jugo de caña y se incubó a temperatura ambiente por 0, 1, 3, 5 y 24 horas. De cada tiempo se tomaron alícuotas que se valoraron para pH, ° Brix, concentración de azúcares reductores, concentración de dextranas y carga bacteriana. Los experimentos se realizaron por triplicado para el inóculo de 1x10⁸ y un solo experimento para el inóculo de 12x10⁸, con sus respectivos controles negativos (jugo sin contaminar).

7.13.3 Ensayos de degradación de jugo de caña obtenido de tallos de ingenio por infección controlada con jugo de ingenio, tratado y sin tratar con SES o NaOCl_(aq)

Para la valoración y tratamiento del jugo de ingenio, contaminado con *L. mesenteroides*, se procedió de acuerdo a lo descrito en 7.12.2. Para obtención y

valoración inicial del jugo de caña a partir de tallos de ingenio, se procedió como describe la sección 7.13.1. Posteriormente, se colocaron 4 alícuotas de 20 ml de jugo de caña exprimido de tallos y se infectaron, respectivamente con 0 μL de jugo de ingenio (control), 100 μL de jugo de ingenio sin tratar (control positivo), 100 μL de jugo de ingenio tratado con SES a 60 ppm de especies activas de cloro y oxígeno, y 100 μL de $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm de cloro activo. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 0 y 48 horas y en cada tiempo se determinaron sus valores de pH, ORP, concentración de azúcares reductores, ° Brix y concentración de dextranas. Se realizaron siembras de cada muestra en medio Agar Mayeux y medio Agar Mayeux modificado luego de incubar a temperatura ambiente 0 y 48 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado y los análisis estadísticos para todos los ensayos se realizaron utilizando el paquete Microsoft Excel 2010.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se realizó la valoración del jugo de ingenio tal cual se recibió y del jugo de los tallos, extraído como se detalla en la sección 7.12.1. El jugo presentó un color verde intenso, mientras que los tallos tenían adherida gran cantidad de ceniza y suciedad [**Figura 8**]; sus valores de pH, azúcares reductores, concentración de dextranas y UFC/ml de mesófilos, hongos, mohos y levaduras se muestran en la tabla 3.



Figura 8. Aspecto de jugo y de tallos provenientes de ingenio. La imagen muestra también la dimensión de los trozos en que fueron cortados los tallos para su análisis.

Parámetro	pH	°Brix	RED %	DEX ppm	Mesófilos UFC/mL	Hongos/Mohos Levaduras UFC/mL
JUGO DE INGENIO	5.3 (0.2)	20.25 (0.5)	0.55 (0.15)	1362 (101)	2.5×10^8	23,000 4.95×10^6
TALLOS DE INGENIO	5.7 (0.1)	19.8 (2.4)	0.36 (0.1)	415 (79)	2.7×10^7	---- 18,000
LITERATURA ⁴⁻⁹	5.4-5.7	19.8-21.1	0.14-4.0	50-250	1×10^6 - 1×10^8	2000-7000 1.5×10^5 - 8×10^5

Tabla 3. Valores de pH, azúcares reductores, concentración de dextranas y de UFC/ml de mesófilos aerobios, hongos, mohos y levaduras, presentes en jugo de ingenio y en jugo extraído de tallos de caña de azúcar. La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Se puede observar que los valores de ° Brix obtenidos corresponden a lo descrito en la literatura para jugos obtenidos de tallos maduros, ya que está documentado que existe variación en los ° Brix dependiendo de la edad de la planta.^{8b} Con respecto a los azúcares reductores en jugos y tallos de caña de azúcar, existe gran diversidad de intervalos descritos en la literatura; en general los identifican desde 0.14% hasta 4.0% en peso.⁴⁻⁹ Esto es porque existen múltiples factores que alteran la concentración de estos azúcares en los tallos y sus jugos; principalmente la variedad de caña, la zona de siembra y cosecha, la edad de la planta y las condiciones climáticas. Fermín-Subirós presenta un análisis completo sobre la variación de diversos parámetros de jugos de caña, dependiendo su

variedad y madurez, y en él describe variación en concentración de azúcares reductores desde 0.14% hasta 3.5% en peso.^{8b} Por otro lado, Serrano-Galvis menciona que en cañas maduras, el contenido de azúcares reductores se encuentra entre 0.4-0.6% peso,⁷ valores muy similares a los descritos por Sandoval-Larriva y Esparza-Tovar de 0.39-0.57% peso,⁵ y ligeramente inferiores a los documentados por Marín-Ocampo de 0.52-0.66% peso.^{8e} Para el caso del jugo de los tallos provenientes de Colima, se encontró un contenido de azúcares reductores del 0.36(0.1)% en peso, lo que está dentro de los parámetros descritos en la literatura, aunque ligeramente por debajo de lo descrito por los últimos 3 autores. El jugo de ingenio presentó valores más elevados, de 0.55 (0.15) % en peso, lo que se puede esperar debido a la mayor carga bacteriana y menor pH. En ambos casos las UFC de hongos, mohos y levaduras fue muy superior a lo reportado, y se pueden justificar estos resultados con el hecho de que tanto el jugo de ingenio como los tallos, no fueron analizados de inmediato, sino que pasaron 1-3 días (en refrigeración a 4°C para el caso del jugo y a temperatura ambiente para los tallos) en lo que llegaron a nuestro laboratorio para poder ser analizados. Como resultado también se observa una carga de mesófilos aerobios un tanto superior a lo descrito en la literatura, así como valores elevados de dextranas [Tabla 3]. En la literatura está descrito que la concentración de dextranas se incrementa significativamente en tallos de caña quemados o cortados, a través del tiempo que pasan sin ser procesados.^{8f} Es importante mencionar que independiente del efecto que tuvo el tiempo de transporte de las muestras sobre su disminución de calidad, el jugo de caña de ingenio venía seriamente contaminado con levaduras, de modo que muestras de cristales de azúcar provenientes de las etapas casi finales del proceso de dichos jugos, también presentaron contaminación microbiológica de 81 UFC/ml, pero únicamente por levaduras.

De la contaminación de mesófilos aerobios encontrada en el jugo de ingenio (2.5×10^8 UFC/ml), hongos (23,000 UFC/ml) y levaduras (4.95×10^6 UFC/ml), se lograron identificar varios microorganismos patógenos. Para lograrlo, se utilizaron técnicas como tinción de Gram, bioquímicas primarias y secundarias, así como el equipo Vitek® 2 (**sección 7.3 y Anexo 5**).

Se identificó a los bacilos Gram negativos *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pantoea spp.*; así como a las levaduras *Cryptococcus laurenti*, *Pediococcus pentosaceus* y *Candida intermedia* [**Figura 9**]. Las levaduras presentes en los cristales de azúcar correspondieron a *Cryptococcus laurenti*.

Todos estos microorganismos se caracterizan por participar en la fermentación de azúcares y ser patógenos ambientales; son importantes productoras de lévanos, otros heteropolisacaridos y azúcares reductores (glucosa y fructosa). Las levaduras se encuentran en la naturaleza principalmente donde haya presencia de azúcares; intervienen en el proceso de fermentación transformando la sacarosa en CO₂ y alcohol (etanol) por medio de reacciones bioquímicas. Por lo tanto también hay disminución de pH y pérdidas considerables de sacarosa en los jugos de caña contaminados con levaduras.

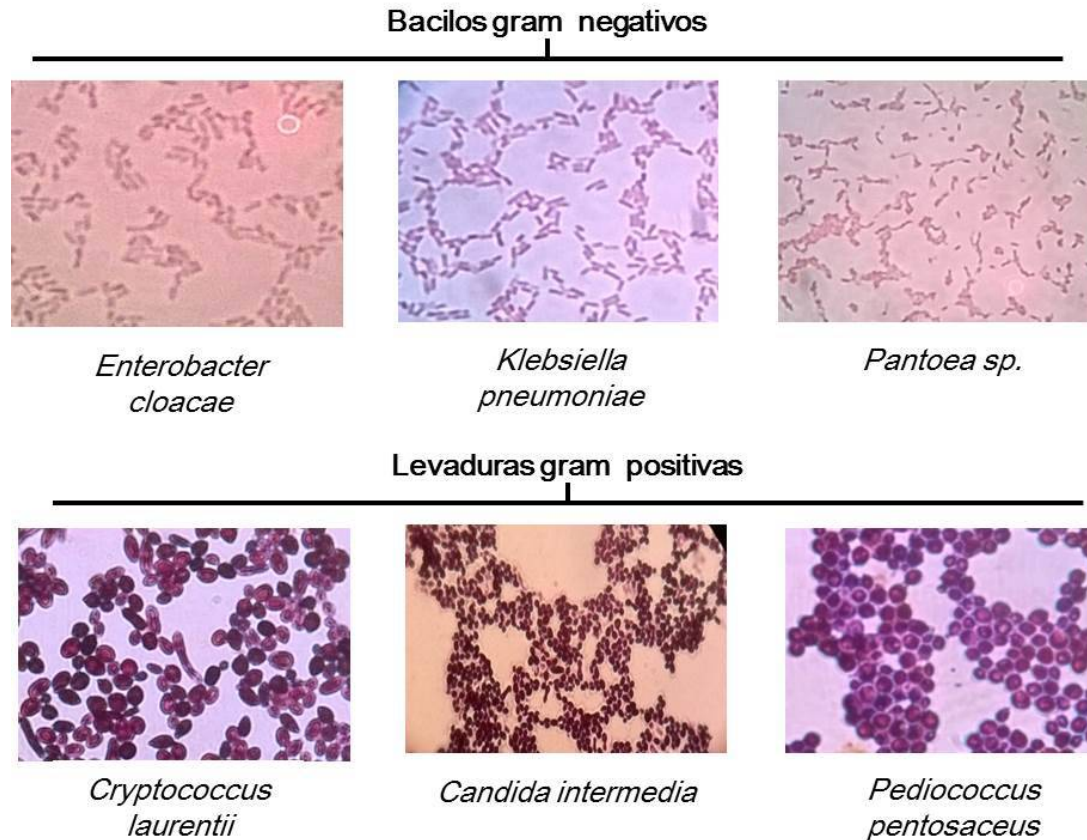


Figura 9. Tinción de Gram y morfología de microorganismos patógenos identificados en jugo de ingenio.

Adicionalmente a estos patógenos, se identificó a la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* por pruebas bioquímicas primarias [Tabla 4] y secundarias [Tabla 5], así como por tinción de Gram [Figura 10]. Las bacterias ácido lácticas obtienen su energía de la fermentación de azúcar produciendo cantidades considerables de ácido los cuales acidificaran los jugos de caña, esto ocasiona la producción de una enzima invertasa la cual transforma la sacarosa en azúcares reductores, estas bacterias ácido lácticas se reproducen más rápidamente que las levaduras y compiten por la sacarosa presente en los jugos de caña.

GRAM	Gram + (cocos en pares y cadenas cortas)
CATALASA	-
OXIDASA	-
MOTILIDAD	-
OF (sin suero fetal bovino)	Inerte
OF (con suero fetal bovino)	O+ fermentador
OF (sin suero fetal bovino con sacarosa)	Inerte
OF (con suero fetal bovino con sacarosa)	O+ fermentador

Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas primarias para *L. mesenteroides*.

UREA	-
KIA	Ac/Ac
SIM	Indol(-), motilidad(-), H ₂ S(-)
CITRATOS	-

Tabla 5. Resultados de pruebas bioquímicas secundarias para *L. mesenteroides*, realizadas con y sin suero fetal.

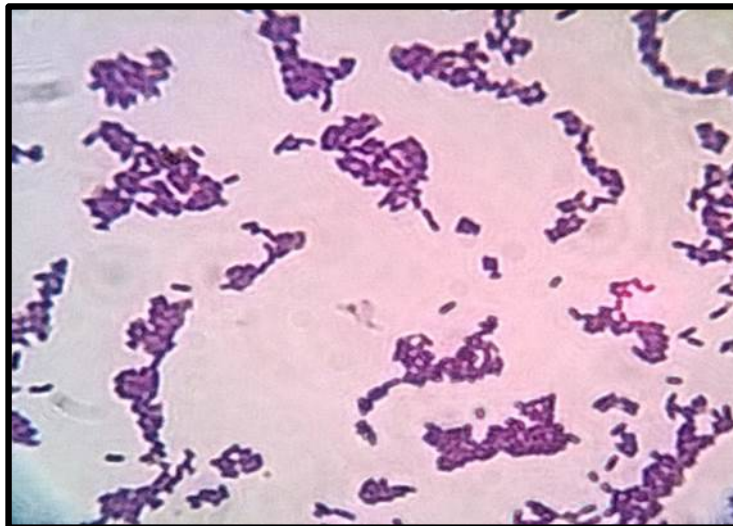


Figura 10. Tinción de Gram de *L. mesenteroides*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas coinciden con lo descrito en la literatura para esta bacteria; ^{32a} son bacterias ácido lácticas, Gram positivas, cocoides agrupados en pares o cadenas cortas [**Figura 10**], tienen un lento

crecimiento que va de 24 a 48 horas a temperatura ambiente. Se observó buen crecimiento, como pequeñas colonias viscosas, lisas y de color crema, en medio Mayeux modificado (sin producción de dextranas) y BHI modificado. *L. mesenteroides* es de las principales bacterias responsables de producir dextranas y ácidos orgánicos, lo que disminuye el pH de los jugos y su calidad. Prueba de esto fue cuando se sembró a la bacteria pura en medio selectivo Mayeux, lo que permitió observar la formación de gomas translúcidas identificadas como dextranas (*vide infra*) [Figura 11].

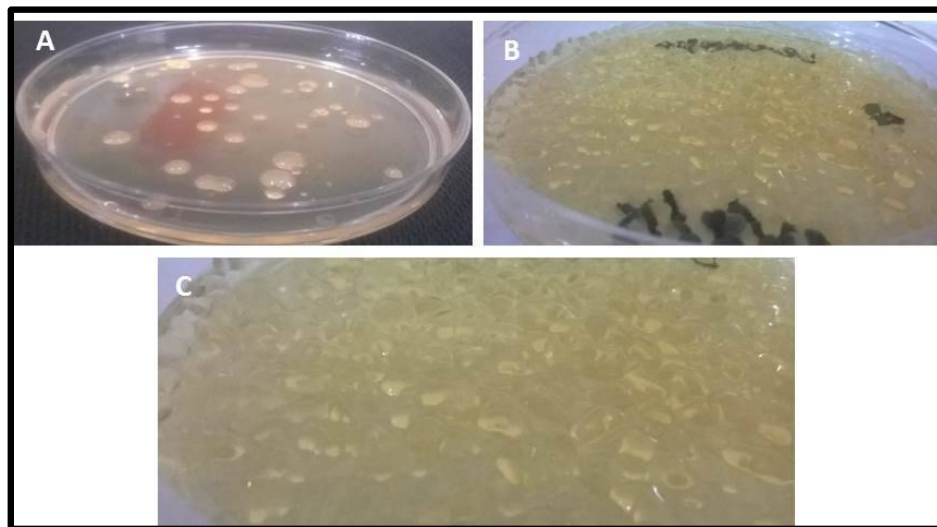


Figura 11. Crecimiento de *L. mesenteroides* en medio selectivo Mayeux. A-B) Cajas Petri preparadas con medio Mayeux en el que creció la bacteria junto con presencia de dextranas. C) Acercamiento de la apariencia y cantidad de las gomas o dextranas formadas.

La presencia de esta goma es característica del género *Leuconostoc spp* cuando crece en un medio selectivo como Mayeux, puesto que este género bacteriano toma la sacarosa presente en el medio selectivo produciendo polisacáridos gomosos translúcidos, denominados dextranas, por medio de la enzima dextransacarasa.

Luego de la identificación de algunos microorganismos patógenos y a la principal bacteria ácido-láctica responsable de la degradación de los jugos de caña, se procedió a realizar retos *in vitro* de su viabilidad frente a diferentes concentraciones de solución electrolizada de superoxidación con pH neutro. Los retos se realizaron con el método de concentración mínima inhibitoria por técnica de microplaca (ver sección 7.7).

Los patógenos *Pantoea spp.*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* mostraron viabilidad desde el pozo 3, esto es que SES a 15 ppm pudo eliminarlos. Por su parte, *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc mesenteroides* mostraron inhibición hasta el 3er pozo, o sea con SES a 7.5 ppm. Finalmente *Cryptococcus laurenti* y *Candida intermedia* se eliminaron hasta el pozo 4, es decir con SES a 3.25 ppm [Figura 12]. Las concentraciones de inhibición se calculan dividiendo entre dos la concentración originalmente colocada en cada pozo, ya que un volumen igual de SSFE con el inóculo bacteriano se agregó para el reto.

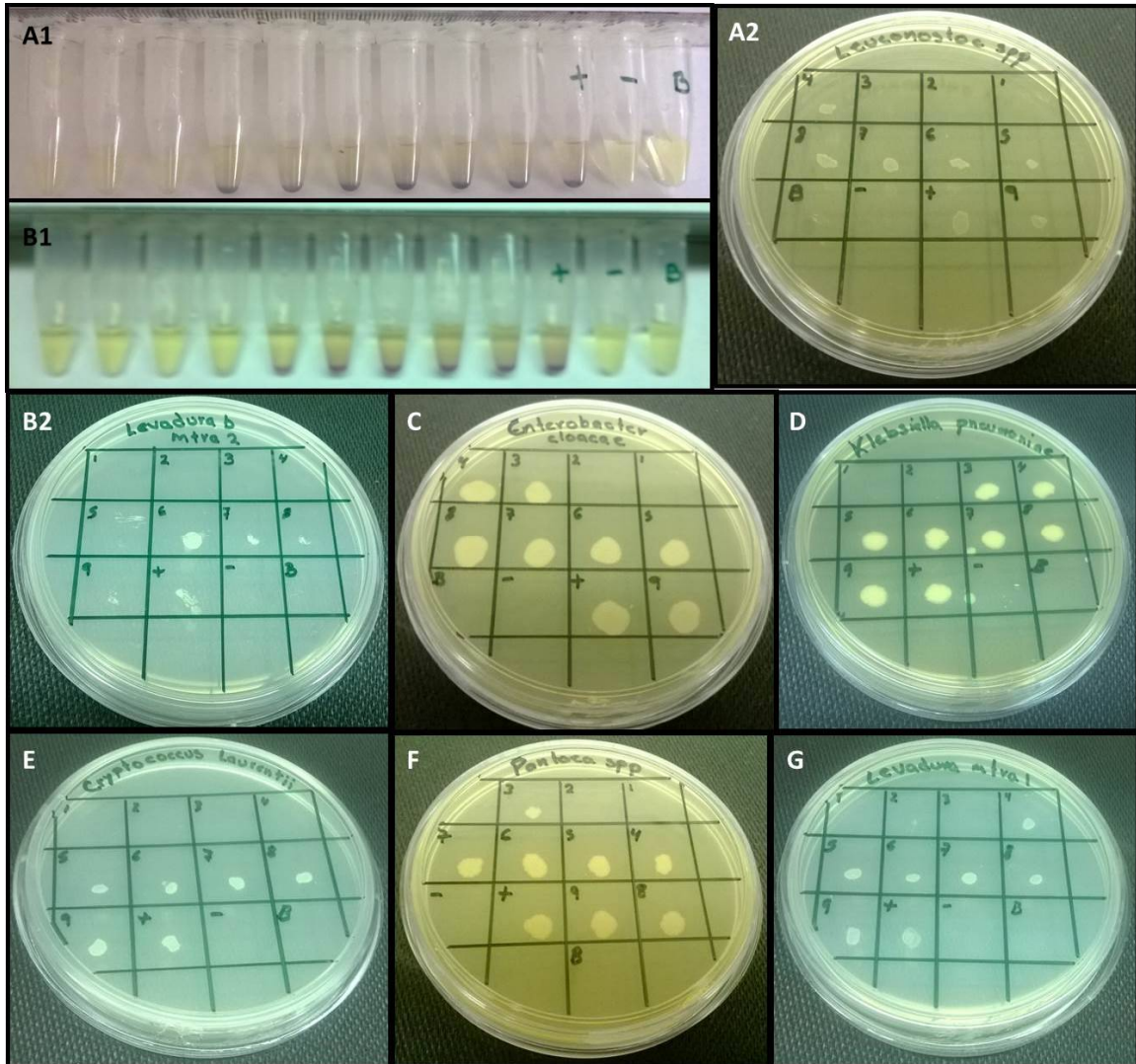
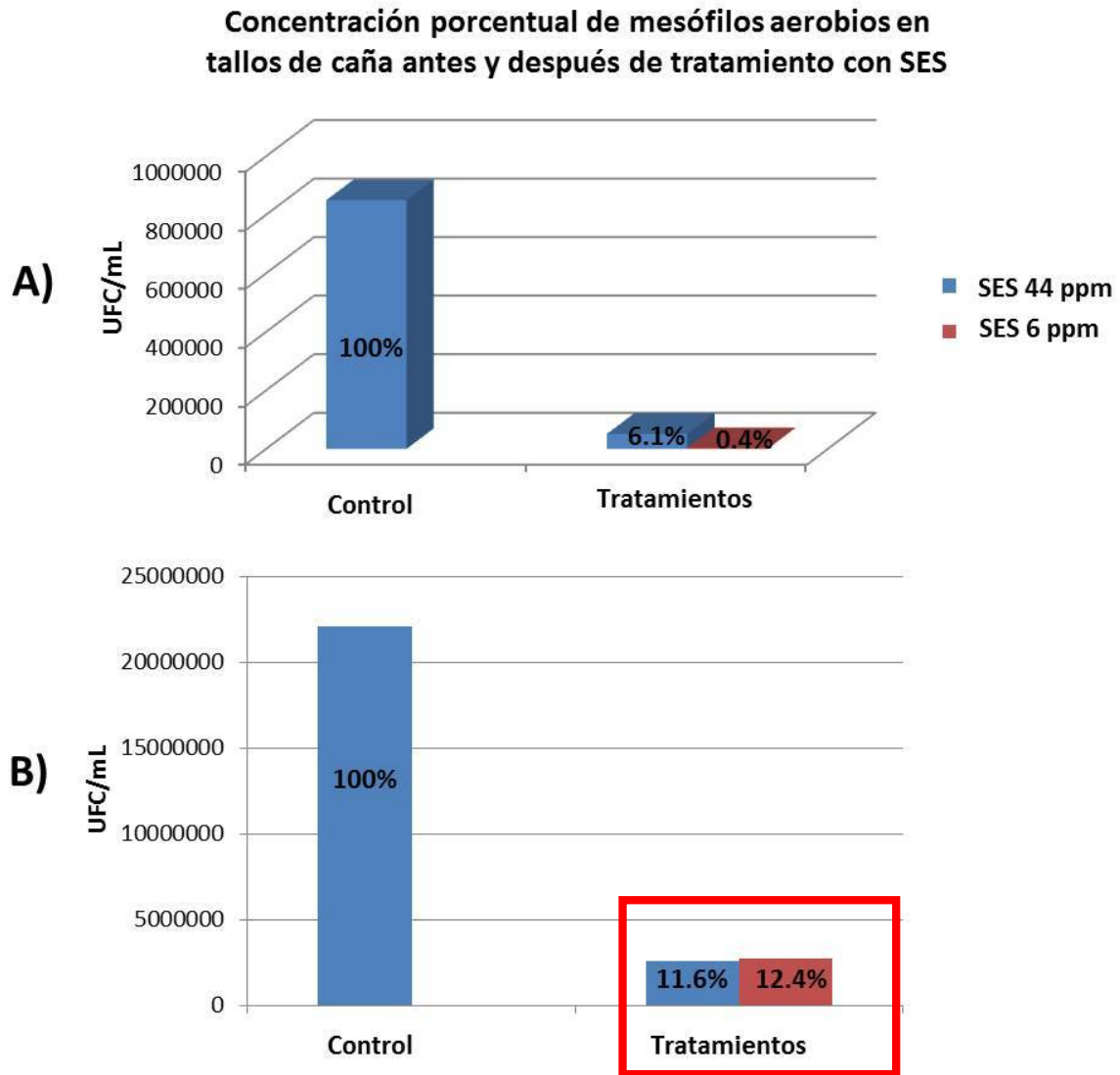


Figura 12. Crecimiento bacteriano en pruebas de dosis mínima inhibitoria de SES sobre distintas bacterias presentes en el jugo de ingenio. A: *Leuconostoc mesenteroides*; A1) Método de Mosmann, A2) Crecimiento en caja; B: *Candida intermedia*; B1) Método de Mosmann, B2) Crecimiento en caja; Crecimiento en caja de C) *Enterobacter cloacae*, D) *Klebsiella pneumoniae*, E) *Cryptococcus laurentii*, F) *Pantoea spp* y G) *Pediococcus pentosaceus*.

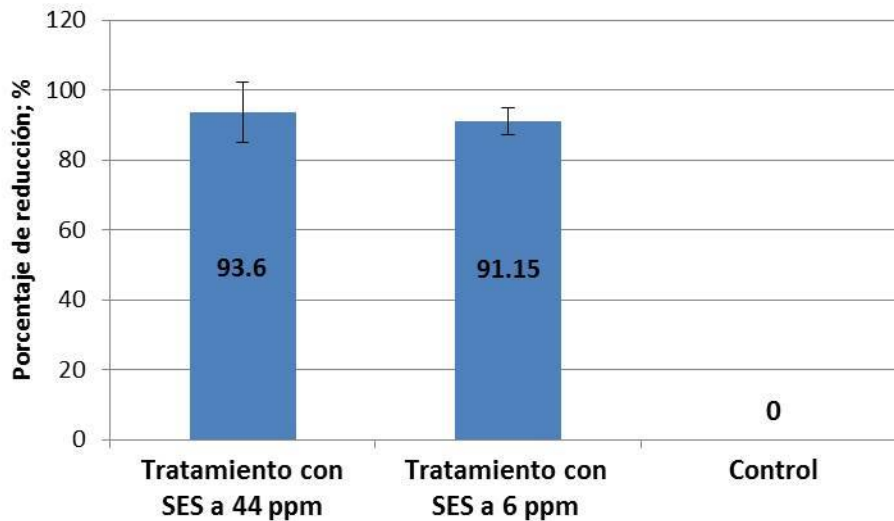
Luego de realizar las determinaciones *in vitro* anteriores y tomando como base las concentraciones inhibitorias obtenidas, se procedió a hacer tratamientos de los tallos de caña con SES en dos concentraciones y a diferentes tiempos de contacto, de acuerdo a lo descrito en la sección 7.12.1. Inicialmente se retaron

pilas de caña tal cual se recibieron del ingenio [Figura 8] (sin infección adicional) con SES a 44 y a 6 ppm durante 30 minutos [Gráficas 1 y 2].



Gráfica 1. Concentración porcentual de mesófilos aerobios en tallos de caña antes y después de tratamiento con SES.

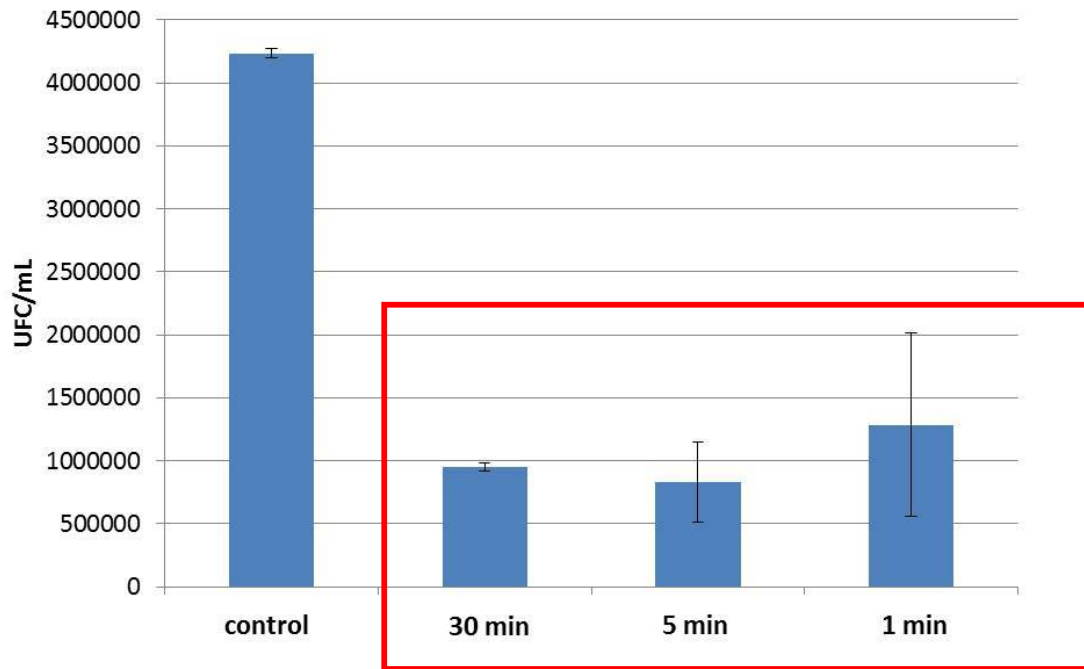
Disminución en concentración porcentual de mesófilos aerobios en tallos de caña luego de tratamiento con SES



Gráfica 2. Disminución porcentual de mesófilos aerobios en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 44 y 6 ppm.

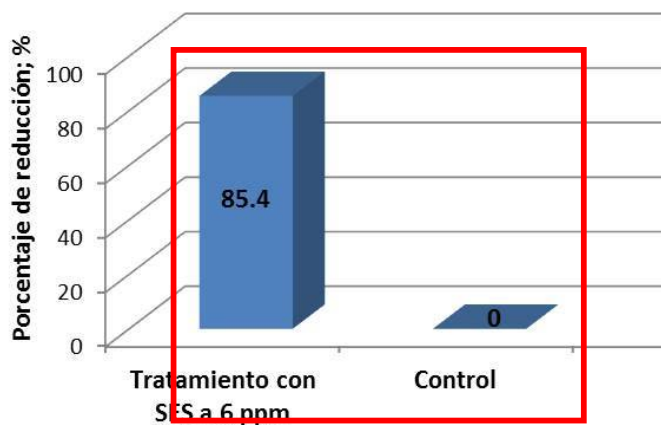
Los resultados demuestran que el tratamiento con SES a 44 ppm logró disminuir la contaminación de mesófilos aerobios en 93.6%, mientras que el tratamiento a 6 ppm la redujo en 91.2% [Gráfica 2]. Debido a que los porcentajes de reducción fueron similares, los tratamientos análogos a diferentes tiempos de contacto se continuaron únicamente con SES a 6 ppm [Gráficas 3 y 4] y sobre pilas de caña picada e infectada con 100 μ L de jugo de ingenio. Para determinar la mejor relación v/p del tratamiento, se realizaron experimentos previos utilizando diferentes volúmenes de SES (1000, 800, 450 y 200 μ L) a 6 ppm para asperjar 10 gramos de caña picada y se determinó que la mejor relación era de 450 μ L de SES por cada 10 gramos de caña desfibrada. Los resultados se realizaron por duplicado o triplicado.

Conteo de mesófilos aerobios en tallos de caña luego de tratamiento a diferentes tiempos con SES a 6 ppm



Gráfica 3. Disminución en cuentas de mesófilos aerobios en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 6 ppm durante 0, 1, 5 y 30 minutos.

Disminución en concentración porcentual de levaduras en tallos de caña luego de tratamiento con SES

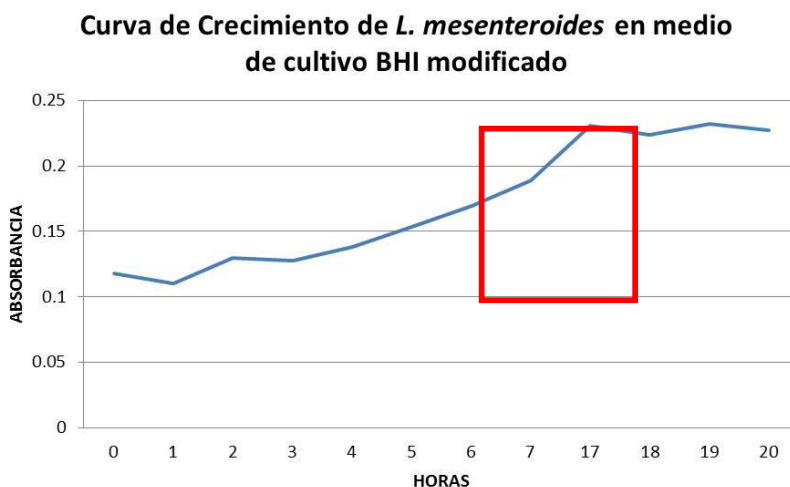


Gráfica 4. Disminución en cuentas de levaduras en tallos de caña de ingenio tratados con SES a 6 ppm durante 0 y 5 minutos.

De acuerdo con las inhibiciones observadas se determinó que el tratamiento con SES a 6 ppm (450 μ L/10 g tallos picados o desfibrados) durante 5 minutos o 1 minuto, disminuye la carga bacteriana entre un 70 y 50%; así como la carga de levaduras hasta en un 85.4%. Por lo tanto el tratamiento de tallos de caña bajo estas condiciones y justo a partir de que entran picadas o desfibradas a la banda que los conducirá a los molinos (aproximadamente 1 minuto para que comiencen a ser molidos o exprimidos) podría disminuir significativamente su contaminación y con ello elevar la calidad de sus jugos.

Con relación al análisis de la variación en la calidad de los jugos de caña con mayor o menor concentración de bacterias, se tomó como modelo la infección controlada con *Leuconostoc mesenteroides*, por ser de las principales bacterias ácido-lácticas identificadas en la industria cañera, causante de degradación de jugos por disminución de pH y generación de polisacáridos de alto peso molecular como las dextranas.

Inicialmente se determinó la curva de crecimiento de *L. mesenteroides* con el fin de evaluar su comportamiento en medio BHI modificado [Gráfica 5].



Gráfica 5. Curva de crecimiento de *L. mesenteroides* en medio de cultivo BHI modificado.

La curva mostró las fases características del crecimiento bacteriano [Figura 13]:³⁶

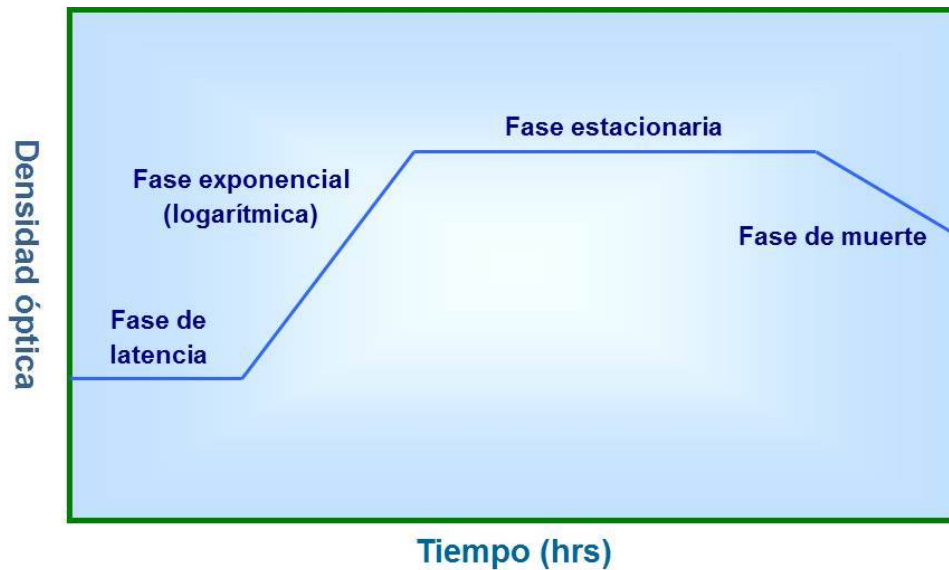


Figura 13. Curva teórica de crecimiento bacteriano.

- * **Fase de latencia:** en esta etapa no se produce un aumento inmediato del número de células o de masa, esto no quiere decir que las células permanezcan inactivas o latentes, al contrario, durante este estadio cada una de las células se encuentran muy activas sintetizando nuevos componentes. La duración de esta fase varía según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio.
- * **Fase exponencial:** aquí los microorganismos se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones en que crecen. La velocidad de crecimiento es constante; es decir, los microorganismos se dividen y se multiplican en número a intervalos regulares. La población es más uniforme, química y fisiológicamente.

- * **Fase estacionaria:** el crecimiento de la población cesa, esta fase se puede atribuir a gran variedad de circunstancias, sobre todo al agotamiento de algunos nutrientes y, en grado menos frecuente, a la producción de sustancias tóxicas durante el crecimiento.
- * **Fase de muerte:** después del periodo estacionario las bacterias pueden morir más rápidamente que la producción de células nuevas. En esta etapa, el número de células viables desciende exponencialmente, mueren a diferentes periodos debido a gran variedad de condiciones, la más importante es el agotamiento de las sustancias nutritivas y acumulación de subproductos tóxicos, dependiendo la naturaleza de la bacteria.

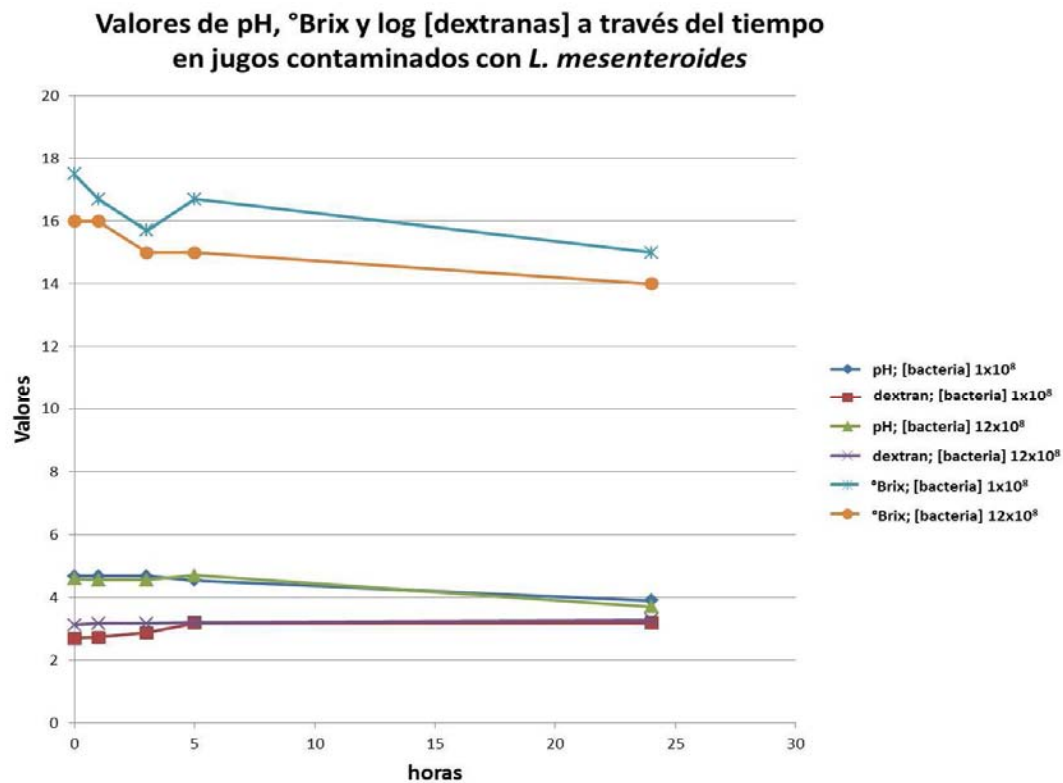
Posteriormente se procedió a realizar experimentos controlados de infección de jugos obtenidos de exprimir directamente los tallos de caña provenientes del ingenio (ver sección 7.13.1 y 7.13.2). La infección se realizó con inóculos de 1×10^8 [Tabla 6] ó 12×10^8 UFC/ml [Tabla 7] de *L. mesenteroides* y se fueron evaluando los diferentes parámetros de calidad de los jugos [pH, ° Brix, %red (azúcares reductores) y concentración de dextranas (ppm)] pre-infección y luego de 1, 3, 5 y 24 horas post-infección. La gráfica 6 muestra algunas de sus tendencias.

Horas post-infección	pre-infección	1	3	5	24
pH	4.67(0.06)	4.67(0.06)	4.67(0.06)	4.53(0.06)	3.90(0.1)
°Brix	17.7(5.5)	16.7(2.5)	15.7(3.1)	16.7(2.1)	15(1.0)
%red	0.17(0.09)	0.18(0.006)	0.17(0.03)	0.18(0.006)	0.08(0.006)
dextranas (ppm)	502(62)	532(125)	732(77)	1497(355)	1497(343)

Tabla 6. Variación a través del tiempo de parámetros de la calidad del jugo de caña contaminada selectivamente con 1×10^8 UFC de *L. mesenteroides*. La desviación estándar se ilustra entre paréntesis.

Horas post-infección	pre-infección	1	5	24	72
pH	4.59	4.55	4.70	3.70	3.30
°Brix	16.0	16.0	15.0	14.0	14.0
%red	0.15	0.20	0.21	0.12	0.12
dextranas (ppm)	1307	1481	1557	1886	1867

Tabla 7. Variación a través del tiempo de parámetros de la calidad del jugo de caña contaminada selectivamente con 12×10^8 UFC de *L. mesenteroides*.



Gráfica 6. Valores de pH, log [dextranas] y ° Brix en jugos de tallos contaminados con inóculos de 1×10^8 UFC o 12×10^8 UFC de *L. mesenteroides*.

El análisis de los resultados anteriores deja claro el aumento de dextranas a través del tiempo a partir del jugo de caña fresco por actividad metabólica de *L. mesenteroides*. Adicionalmente se aprecia una disminución del pH por la

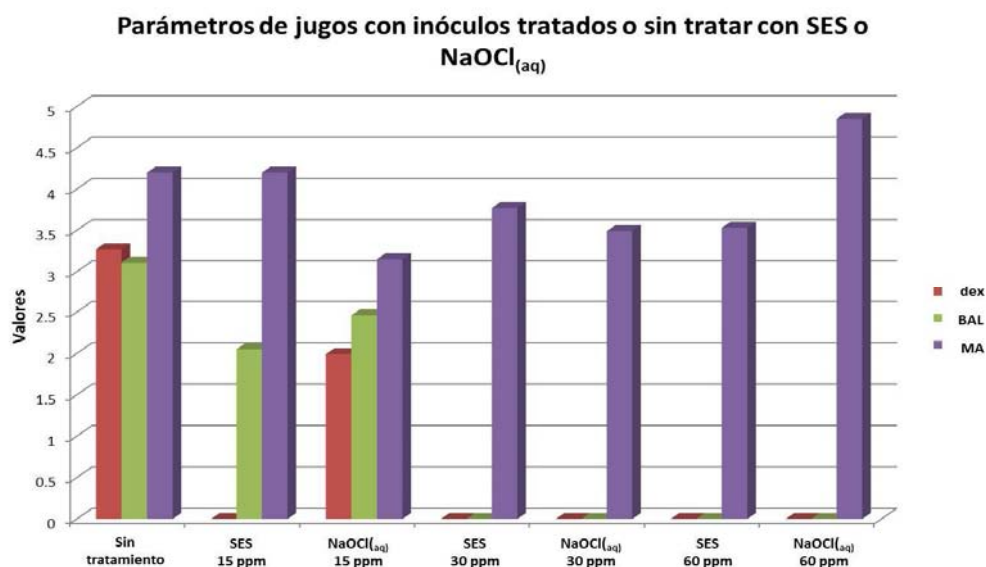
concomitante formación de ácidos orgánicos. Cabe señalar que la concentración porcentual de azúcares reductores en los jugos, mostraron disminución en los experimentos con tiempos más largos; esto es debido a que, de acuerdo en lo descrito en la literatura, ^{4,7} las bacterias utilizan la glucosa para sintetizar más dextranas y transforman la fructosa en manitol, que son los productos de descomposición finales y siempre presentes en jugos de caña deteriorados. Cabe señalar que en la medida que avanzaba el tiempo, los jugos iban presentando más y más sedimentos, de modo tal que los jugos de 24 y 72 horas estaban con mucha materia no disuelta y con olor a fermentado. Esto explica la disminución de ° Brix a través del tiempo. Por lo tanto queda de manifiesto la enorme influencia que tiene la contaminación de los jugos de caña de ingenio con *L. mesenteroides* en su disminución de calidad o degradación, y a mayor contaminación mayor degradación [**Gráfica 6**].

Tomando en cuenta lo anterior, se procedió a realizar un análisis de los parámetros de calidad de jugos extraídos directamente de los tallos de caña provenientes del ingenio (ver sección 7.13.1) antes y después de 48 horas de ser infectados con inóculos de jugo de ingenio (ver sección 7.13.3) altamente contaminado, no solo con *L. mesenteroides*, sino con flora bacteriana diversa (*vide supra*). La infección de los jugos fue realizada con inóculos de jugo de ingenio, tratados y sin tratar con solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES) o NaOCl_(aq) a 60 ppm y se realizó un análisis comparativo entre el poder bactericida de los antisépticos utilizados (ver sección 7.12.2). También se evaluó la capacidad de las bacterias contenidas en 100 µL de jugo de ingenio para formar dextranas en caja con medio Mayeux, antes y después de tratamientos a 60, 30 y 15 ppm de los mismos antisépticos (ver sección 7.12.3). En la tabla 8 y la gráfica 7 se muestran los resultados de la variación de parámetros en jugo de ingenio con y

sin tratamiento de SES o $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a diferentes concentraciones y en la tabla 9 se presentan los resultados de variación de parámetros en jugos de tallos de caña infectados con jugo de ingenio con y sin tratamiento a 60 ppm con los mismos antisépticos.

	Jugo de ingenio sin tratar	Tratado con SES a 60 ppm	Tratado con $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm	Tratado con SES a 30 ppm	Tratado con $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 30 ppm	Tratado con SES a 15 ppm	Tratado con $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 15 ppm
pH	4.38 (0.13)	4.51 (0.13)	4.56 (0.12)	4.36 (0.04)	4.4 (0.02)	4.46 (0.08)	4.46 (0.07)
ORP mV	405 (34.7)	444 (20.2)	427 (24.4)	443 (3.5)	429 (3.6)	421 (3.5)	408 (3.7)
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	1.6×10^4 (5396)	3.4×10^3 (1763)	1.4×10^3 (3565)	5.9×10^3 (1550)	3.1×10^3 (651)	1.6×10^4 (1430)	7.1×10^4 (10097)
BAL (UFC/mL)	1.3×10^3 (329)	0	0	0	0	111 (14)	290 (14)
Dextranas (ppm)	1845 (240)	0	0	0	0	0	98 (33)

Tabla 8. Parámetros de pH, ORP, concentración de dextranas, UFC/mL de mesófilos aerobios y bacterias ácido-lácticas (BAL) en jugo de ingenio, antes y después de tratamiento con SES o $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60, 30 y 15 ppm.



Gráfica 7. Variación en concentración del log de dextranas (dex), bacterias ácido-lácticas (BAL) y mesófilas aerobias (MA) con y sin tratamiento de diferentes concentraciones de los antisépticos.

En la tabla 8 se aprecia el efecto de la contaminación con bacterias ácido-lácticas sobre el pH del jugo y su concentración de dextranas. El jugo sin tratamiento mostró un pH ácido de 4.38, concentración de BAL de 1.3×10^3 y concentración de dextranas de 1845 ppm. Los resultados de tratar 1:1 el jugo de ingenio con SES o $\text{NaOCl}_{(aq)}$ muestran una reducción completa sobre la producción de dextranas cuando la concentración de los antisépticos es desde 15 ppm para SES (7.5 ppm de concentración final en volumen total) o desde 30 ppm para $\text{NaOCl}_{(aq)}$ (7.5 ppm de concentración final en volumen total). Claramente la SES mostró superioridad para eliminar BAL y la consecuente producción de dextranas y dicha eliminación correlacionó con valores de ORP superiores a 420 mV.

	A	B	C	D	E	F	G	H
pH	3.53 (0.02)	2.74 (0.60)	3.56 (0.04)	2.57 (0.16)	3.54 (0.06)	2.59 (0.25)	4.53 (1.5)	2.58 (0.28)
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	2.9×10^4 (1909)	3.8×10^4 (2436)	2.7×10^5 (15200)	3.2×10^5 -	2.7×10^4 (2121)	2.9×10^4 -	2.2×10^4 (5303)	2.7×10^4 -
° Brix	11 (0.7)	10 (1.4)	10 (1.4)	7.5 (0.71)	8.5 (2.1)	9.5 (0.71)	9 (1.4)	9 (1.4)
%RED	0.35 (0.06)	0.22 (0.03)	0.49 (0.06)	0.39 (0.18)	0.52 (0.29)	0.32 (0.06)	0.39 (0.04)	0.26 (0.03)
Dextranas (ppm)	225 (10)	286 (61)	243 (35)	458 (189)	188 (7)	323 (18)	234 (23)	277 (31)

Tabla 9. Variación en parámetros de: A) Jugo de tallos sin tratar, B) Jugo de tallos sin tratar e incubado 48 horas, C) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio, D) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio e incubado 48 horas, E) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 mL de SES a 60 ppm, F) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 mL de SES a 60 ppm y el jugo de tallos incubado 48 horas, G) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 mL de $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm, H) Jugo de tallos contaminada con 100 mL de jugo de ingenio previamente tratado con 100 mL de $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a 60 ppm y el jugo de tallos incubado 48 horas.

Por otro lado, los resultados sobre la variación en los parámetros de calidad del jugo de tallos de ingenio, antes y después de ser contaminada con inóculo de jugo de ingenio sometido o no a tratamiento con los mismos antisépticos, generó resultados muy variables [Tabla 9]. En general se observó que tanto el pH como los ° Brix disminuyen luego de periodos largos de incubación (48 horas). La concentración de dextranas y las UFC/ml de mesófilos aumentan, también como es de esperar, pero el % RED disminuye, lo que no está de acuerdo con un decremento en el pH pero sí con la degradación del jugo a otros subproductos de degradación como más dextranas, oligosacáridos y/o polisacáridos de alto peso molecular, alcoholes como el manitol y otros ácidos orgánicos. La muestra de jugo contaminada con inóculo de ingenio mostró un incremento en las UFC/ml de mesófilos aerobios, como era de esperarse, respecto de la muestra de jugo de caña de tallos de ingenio sin infección adicional. También se apreció mayor %RED, congruente con el aumento de bacterias en el medio.

El tratamiento del jugo de ingenio utilizando para contaminada los jugos de tallos, con SES o $\text{NaCl}_{(aq)}$, redujo la población bacteriana del inóculo, lo que se reflejó en la concentración de bacterias encontradas en los jugos de tallos infectados. Esto impactó en la concentración de dextranas, que fue menor respecto a los controles. También se observó una ligera disminución de ° Brix en las muestras infectadas con inóculos tratados, lo que podría correlacionar con menor cantidad de dextranas disueltas. Los valores de pH no mostraron gran variación, mientras que el %RED pareció aumentar luego del tratamiento del inóculo con la SES, contrario al tratamiento con $\text{NaOCl}_{(aq)}$. Cabe señalar que muchos de los datos arrojaron alta desviación estándar, lo que apoya diversidad en las características iniciales de las muestras utilizadas para cada repetición, lo que hace complicado su análisis y comparación.

En general, comparativamente con las muestras control, se observó una disminución tanto en la concentración de dextranas como de mesófilos aerobios y de bacterias ácido-lácticas en los jugos o tallos de caña tratados con alguno de los antisépticos. Entre ambos antisépticos, la SES mostró mayor potencial germicida que el $\text{NaOCl}_{(aq)}$ a la misma concentración de cloro activo. Esto demuestra que la reducción de bacterias tanto en tallos como en jugo mejora la calidad de los mismos. Los tratamientos con SES a menor concentración fueron más eficaces en la reducción de mesófilos aerobios y levaduras cuando se aplicaron sobre los tallos desfibrados o picados que cuando fue directamente sobre los jugos de caña.

Por otro lado, la implementación del uso de SES para reducir la carga bacteriana de los jugos de ingenio y con ello elevar su calidad y la consecuente recuperación de sacarosa, implicaría involucrar pasos adicionales en los procesos operativos del ingenio, dada la gran cantidad de toneladas procesadas diariamente. De acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis, se requerirían 15,750 litros de SES (6 ppm)/hora para disminuir hasta un 50% de la carga bacteriana en tallos desfibrados, lo que impactaría directamente en la calidad de sus jugos.

La viabilidad del proyecto podría ser evaluada si se montara una prueba piloto en el ingenio, lo cual no puede realizarse en cualquier época del año, dados los calendarios de limpieza general, especialmente de los molinos y desfibradoras. Sin embargo es claro que, *in vitro*, la SES disminuye significativamente la carga bacteriana y subproductos no deseables en los jugos, y de funcionar a gran escala, podría representar beneficios económicos significativos para la industria azucarera Mexicana o del mundo.

9.- CONCLUSIONES

1.-Se logró establecer la efectividad y las concentraciones de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES) para mejorar la calidad de los jugos por la eliminación de microorganismos patógenos presentes en tallos y jugos de caña especialmente *L. mesenteroides*.

2.-Se utilizó un antiséptico que fue una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro comprobándose su efectividad en la reducción o eliminación de mesófilos aerobios, bacterias ácido-lácticas principalmente *L. mesenteroides* presentes en jugo y tallos de caña.

3.- Tanto los tallos como el jugo de caña de ingenio presentan cargas elevadas de microorganismos patógenos característicos, de los cuales pudieron aislarse y caracterizarse, *Pantoea sp.*, *Enterobacter cloacae.*, *Klebsiella pneumoniae.*, *Pediococcus pentosaceus.*, *Cryptococcus laurenti.*, *Candida intermedia* y *Leuconostoc mesenteroides*.

4.-Los medios de cultivo BHI, BHI modificado y Mayeux son útiles para cuantificar las UFC de *L. mesenteroides* ya que crecieron sin formación de dextranas, lo que si ocurre en el medio de cultivo Mayeux.

5.- Los antisépticos, solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (SES) y solución de hipoclorito de sodio acuoso ($\text{NaOCl}_{(aq)}$) en concentraciones de 60 y 30 ppm son igualmente efectivos en la reducción *L. mesenteroides* presente en jugo de caña, pero a concentraciones menores la SES supera al $\text{NaOCl}_{(aq)}$.

6.- Los principales parámetros de calidad de los jugos de caña que se ven afectados por contaminación con *L. mesenteroides* son pH que va de 4.7-5.7 , °Brix de 19 -20.5 y dextranas que disminuyen a medida que pasa el tiempo, la

disminución es mayor mientras muestren mayor carga bacteriana; el porcentaje de azúcares reductores varía significativamente dependiendo de la concentración presente de bacterias, pH y tiempo de incubación esto es porque son subproductos intermedios en la degradación de los jugos. Por lo tanto no se identificó una correlación. La concentración de dextranas es un parámetro que correlaciona directamente con su grado de deterioro y el mejor parámetro de calidad para determinar su frescura.

7.- Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la potencial efectividad de la SES para mejorar la calidad de jugos de ingenio y por lo tanto apoyan al montaje de una prueba piloto para valorar su escalamiento al proceso industrial.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- SAGARPA, "*Impactos caña de azúcar*", **2007-2012**.
- 2.- "*Análisis de la Situación Económica, Tecnológica y de Política Comercial del Sector Endulcorantes en México*"; Secretaría de Economía; Dirección General de Industrias Básicas; Febrero, **2012**.
3. INFOCaña; www.conadesuca.gob.mx
- 4.- a) Solomon, S., *Sugar Tech.*, **2009**, 11(2), 109. b) Eggleston, G., Morel Du Boil, P.G., Walford, S.N., *Proc S Afr Sug Technol Ass*, **2008**, 81, 72. c) Solomon, S., *Sugar Tech*, 2 (1-2), **2000**, 1.
- 5.- Sandoval, Larriba, E., Esparza, Tovar, M., "*Evaluación del deterioro de la calidad de la caña de azúcar (Saccharum officinarum L.), quemada y sin quemar en la zona de influencia del ingenio El Potrero, Veracruz*", Tesis de Licenciatura,

Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Chapingo, México, **Noviembre de 1996**.

6.- Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, "*Monografía de la Caña de Azúcar*", **2010**.

7.- Serrano-Galviz, L., "*Determinación de las Poblaciones Microbiológicas en el Proceso de Extracción de Jugo de Caña de Azúcar en el Ingenio Manuelita S.A.*", Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., **Febrero de 2006**.

8.- a) Díaz-Montejo, L.L., Portocarrero-Rivera, E.T., "*Manual de Producción de Caña de Azúcar (Saccharum officinarum L.)*", Zamorano, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Honduras, Diciembre, **2002**. b) Fermín Subirós, J., *Agronomía Costarricense*, 22(2), **1998**, 173. c) Larrahondo, J.E., "*Calidad de la Caña de Azúcar en: El cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia, Cali*", CENICAÑA, **1995**, p. 337. d) Monzón, O., "*Relación del contenido de los azúcares reductores con otros parámetros de evaluación den los jugos de pre-cosecha*"; Ponencia Oral, XII Congreso nacional de la Asociación de Técnicos Azucareros de Guatemala, Hostales del Irtra, Retalhuleu, Guatemala, **Agosto de 2011**. e) Marín-Ocampo, L.V., "*Determinación de las condiciones apropiadas de preparación de un floculante como componente fundamentan en el proceso de clarificación de jugo en Riopaila Castilla S.A., Planta Riopaila*", Tesis de Grado, Facultad de Tecnologías, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia, **Noviembre de 2012**. f) Rodríguez-Jiménez, E., *Biotecnología Aplicada*, 22, **2005**, 11.

9.- Información y procesos productivos de Grupo Beta San Miguel, Ingenio Quesería, Colima, Col., **2014**.

10.- a) NMX-F-302-1985, "*Alimentos para uso humano. Azúcar. Determinación de sustancias reductoras en muestras de azúcar crudo*".

- 11.- Orduña Rojas, H., Santillán Luna, S., Lorence Quiñones, A., "*Producción de Dextrinas para uso Clínico*", Informe Técnico, Ciencias Biológicas de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., **1996**.
- 12.- Eggleston, G., Legendre, B., Tew, T., *Food Chemistry*, **2004**, 87, 119.
- 13.- Baikow, V.E., "*Manufacture and refining of raw cane sugar*"; Sugar series 2, 2nd completely revised ed., Elsevier, **1982**, New York, USA., p 83.
- 14.- a) Velazquez-Meza, M.E., Hernández-Salgado, M., Sánchez-Alemán, M.A., *Microbial Drug Resistance*, 21(4), **2015**, 1. b) Cabello Gutiérrez C., Rosette Olvera, D.P., Manjarrez Zavala M. E., *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.*, 22(4), Octubre-Diciembre **2009**, 280. c) Cabello Gutiérrez C., "*Tecnología y producto innovadores para mitigar infecciones virales de vías respiratorias en un modelo murino*"., INER-Esteripharma México, S.A. de C.V., Proyecto CONACyT 181140, Convocatoria **2012**. d) Paz-Michel, B.A., Fonseca-Liñán, R., Argüello-García, R., Ortega-Pierres, M.G., "*Análisis del efecto in vitro e in vivo de la solución electrolizada de superoxidación de pH neutro (SES) en trofozoítos y quistes del protozooario parásito Giardia duodenalis*"., CINVESTAV-Esteripharma México, S.A. de C.V., Proyecto CONACyT 182032, Convocatoria **2012**. e) Marroquín-Cardona A., Chávez-Bautista M., Sandoval-Coronado C., Torres-Castillo J., Méndez Albores A., "*Effects of Neutral electrolyzed oxidizing water on aspergillus inactivation in tomato seeds*", 54th Annual Meeting and ToxExpo, Society of Toxicology, San Diego California, **Marzo-2015**. f) Vásquez-López A., Villarreal-Barajas T., "*Efecto fungicida de la SES contra Galactomyces geotrichum en frutos de jitomate (Solanum lycopersicum L)*"; Congreso internacional de fitopatología 2015, Distrito Federal, México, **Julio-2015**. g) R. M. S. Thorn, S. W. H. Lee, G. M. Robinson, J. Greenman, D. M. Reynolds, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2011**, DOI: 10.1007/s10096-011-1369-9. h) Yu-Ru Huang, Yen-Con Hung, Shun-Yao Hsu, Yao-Wen Huang, Deng-Fwu Hwang, *Food Control*, **2008**, 19(4), 329. i) Aider, M., Gnato, E., Benali, M., Plutakhin, G., Kastyuchik, A., Labrie, S., *Innovative Food Science and Emerging Tech.*, **2012**, 15, 38. j) Casteel, M.J.,

Sobsey, M.D., Arrowood, M.J., *Water Science and Technology*, **2000**, 14(7), 127.
k) Venczel, L.V., Arrowood, M., Hurd, M., Sobsey, M.D., *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63(4), 1598. l) Bajszár, G., Dekonenko, A., *Appl and Environm Microbiol.*, **2010**, 76(6), 1732. m) Muhammad Imran Al-Haq, Junichi Sugiyama, Seiichiro Isobe, *Food Sci. Technol. Res.*, **2005**, 11(2), 135.

15.- a) S. P. Walker, A. Demirci, R. E. Graves, S. B. Spencer, R. F. Roberts, *Transactions of ASABE*, **2005**, 48, 1827. b) Osafune Tetsuaki, Ehara Tomoko, Ito Takashi, *Environmental health and preventive medicine*, **2006**, 11(4), 206. c) Susan McCarthy, William Burkhardt III, *Food Control*, **2012**, 24(1-2), 214. d) Hricova D, Stephan R, Zweifel C., *Journal of Food Protection*, **2008**, 71(9), 1934.

16.- a) J. T. Walker, D. J. Bradshaw, M. R. Fulford, P. D. Marsh, *Appl. Environ. Microbiology*, **2003**, 69(6), 3327. b) Giancarlo Spinzi, M.D., Alessandro Rampoldi, M.D., Luca Ferlin, M.D., Riccardo Terramocci, M.D., Giancarlo Butti, Giorgio Minoli, *The American Journal of Gastroenterology*, **2003**, 98(9 Supplement), S280. c) Nagamatsu Y., Tajima K., Kakigawa H., Kozono Y., *Dental materials journal*, **2001**, 20(2), 148. d) Yukihiro Sakurai, Masami Nakatsu, Yuko Sato and Kinuko Sato, *Digestive Endoscopy*, **2003**, 15(1), 19. e) N.S. Meakin, C. Bowman, M.R. Lewis, S.J. Dancer, *Journal of Hospital Infection*, **2012**, 80(2), 122.

17.- a) Abdulsudi Issa-Zacharia, Yoshinori Kamitani, Happiness Muhimbula, Koichi Iwasaki, *African Journal of Microbiology Research*, **2010**, 4(20), 2174. b) K. Whangchai, K. Saengnil, C. Singkamanee, J. Uthaibutra, *Crop Protection*, **2010**, 29(4), 386. c) Jun Xie, Xiaohong Sun, Yingjie Pan, Yong Zhao, *Food Control*, **2012**, 23(2), 320. d) Abdulsudi Issa-Zacharia, Yoshinori Kamitanic, Nami Miwac, Happiness Muhimbulab, Koichi Iwasaki, *Food Control*, **2011**, 22(3-4), 601. e) Koide Shoji, Shitanda Douglas, Note Mizuho, Cao Wei, *Food Control*, **2011**, 22(3-4), 452. f) Chunling Zhang, Zhanhui Lu, Yongyu Li, Yuchao Shang, Gong Zhang, Wei Cao, *Food Control*, **2011**, 22(5), 792. g) Rodríguez-García, O., González-Romero, V.M., Fernández-Escartín, E., *Journal of Food Protection*, **2011**, 74(9), 1552. h) Tian,

Peng, Yang, David, Mandrell, Robert, *Journal of food protection*, **2011**, 74(8), 1364.

18.- a) Naoki Yahagi, Masashi Kono, Masaki Kitahara, Akito Ohmura, Osao Sumita, Toshimasa Hashimoto, Katsuaki Hori, Chen Ning-Juan, Paul Woodson, Shoji, Kubota, Arata Murakami, Shunichi Takamoto, *Artificial Organs*, **2000**, 24(12), 984. b) Shuichi Sekiya, Kitaro Ohmori, Kiyonori Harii, *Artificial Organs*, **1997**, 21(1), 32-38. c) Shigeto, S., Matsumoto, K., Yaguchi, H., Okuda, T., Miyajima, S., Negi, A., Shimazaki, J., Tsubota, K., *Experimental Eye Research*, **2000**, 70, 1. d) Sung-Hoon Lee, Bong-Kyu Choi, *The Journal of microbiology* (The Microbiological Society of Korea), **2006**, 44(4), 417. e) Ogino, H., Ueda, Y., Sugita, T., Matsuyama, K., Matsubayashi, K., Nomoto, T., Yoshimura, S., Yoshioka, T., *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **2000**, 48, 43-44. f) Kubota A, Nose K, Yonekura T, Kosumi T, Yamauchi K, Oyanagi H., *Surgery Today*, **2009**, 39(6), 514. g) Mahadevan D. Tata, Kong C. Kwan, Mohammed R. Abdul-Razak, Sharminithevi Paramalingam, Wing C. Yeen, *The Annals of Thoracic Surgery*, **2009**, 87(5), 1613-1614.

19.- a) M. Arevalo-Sánchez, C. Regalado, S. E., Martín, J. Domínguez-Domínguez, B. E. García-Almendárez, *Food Control*, **2012**, 24(1-2), 116. b) Gill, C.O., *J Food Prot.*, **2009**, 72(8), 1790. c) Handojo A, Lee J, Hipp J, Pascall MA., *Journal of food protection*, **2009**, 72(6), 1315. d) Deza MA, Araujo M, Garrido MJ., *Journal of food protection*, **2007**, 70(1), 102. e) G. Wu, X. Yu, Z. Gu, *Journal of Hospital Infection*, **2008**, 68(4), 348. f) Monnin A., Lee J., Pascall, M.A., *Journal of Food Engineering*, **2012**, 110(4), 541. g) García Nachón, F.J., Díaz Téllez, J., Rivas Espinoza, V., González H, J.S., Nachón G., M.G., García García, F., Santiago García, J., *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(2), **2008**, 5.

20.- a) Abadias M, Usall J, Oliveira M, Alegre I, Viñas I., *International Journal of Food Microbiology*, **2008**, 123(1-2), 151. b) A. Tomás-Callejas, G.B. Martínez-Hernández, F. Artés, F. Artés-Hernández, *Postharvest Biology and Technology*, **2011**, 59(3), 298. c) H. Yang, B. L. Swem, Y. Li, *Journal of Food Science*, **2003**, 68(3), 1013. d) Jane L. Guentzel, Michael A. Callan, Kang Liang Lam, Stuart A.

Emmons, Valgene L. Dunham, *Crop Protection*, **2011**, 30(10), 1274. e) Dunham, *Food Microbiology*, **2008**, 25(1), 36. f) Jun Wang, S. M. E. Rahman, Tian Ding and Deog-Hwan Oh, *Food, Sci. Biotechnol.*, **2011**, 20(5), 1367. g) Jane L. Guentzel, Kang Liang Lam, Michael A. Callan, Stuart A. Emmons, Valgene L. Dunham, *International Journal of Food Microbiology*, **2010**, 143(1-2), 54. h) S. M. E. Rahman, Tian Ding, Deog-Hwan Oh, *International Journal of Food Microbiology*, **2010**, 139(3), 147.

21.- a) Paz-García J., *Revista ADM*, Vol. LXIII No. 1, Enero-Febrero **2006**, 12. b) Duc, Q. le., Breetveld, M., Middelkoop, E., Sheper, R. J., Ulrich, M. M. W., Gibbs, S., *British Journal of Dermatology*, **2007**, 157(1), 33. c) Abdul Ramzisham Rahman Mohd, Mohd Khairulasri Ghani, Rafli Ruzairee Awang, Joanna Ooi Su Min, Mohd Zamrin Dimon, *The heart surgery forum*, **2010**, 13(4), 228. d) Vanita Kapur, Anil Kumar Marwaha, *Indian Journal of Surgery*, **2011**, 73(1), 48. e) J. Rossi-Fedele, J. A. Poli de Figueiredo, L. Steier, L. Canullo, G. Steier, A. P. Roberts, *J. Appl. Oral Sci.*, **2010**, 18(5), 498. f) Nachón García, F.J., Díaz Téllez, J., Benítes Obeso, F., García García F., Santiago García, J., Martínez Chacón, A.J., *Cirujano General*, 32(1), **2010**, 11. m) Nachón García, F.J., Díaz Téllez, J., Nachón García, M.I.C., *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 5(2), Julio-Diciembre **2005**, 15.

22.- a) Rahman, S.M.E., Jiyong Park, Kyung Bin Song, Naif A. Al-Harbi, Deog-Hwan Oh, *Journal of Food Science*, **2012**, 77(1), M35. b) Abou-Taleb M, Kawai Y., *Journal of Food Protection*, **2008**, 71(4), 770.

23.- a) Torres-Capetillo E., Carrillo-Fuentevilla, R., De la Garza-Ramos, M.A., Mercado-Hernández, R., Torre-Martínez, H.H.H., Segoviano-Ramirez, J.C., *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(4), **2013**, 64. b) Reyes-Ayala, J.A., "Estudio hematológico de sangre de perro tratada con Soluciones Electrolizadas de Superoxidación", Tesis de Licenciatura, FES Cuautitlán Izcalli, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, **2014**. c) Valencia Avilés M.I., "Efecto citotóxico de la solución electrolizada superoxidada con pH neutro en células MDCK comparada con diferentes soluciones desinfectantes como el hipoclorito de

sodio, etanol y glutaraldehído", Tesis de Técnico superior universitario, Universidad Tecnológica de Tecámac, Tecámac, Estado de México; Junio, **2011**.

d) González-Espinosa, D., Pérez-Romano, L., Guzmán-Soriano, B., Arias, E., Bongiovanni, C.M., Gutiérrez, A.A., *International Wound Journal*, **2007**, 4(3), 241.

e) Leo Kunigk, Janaina Regina Schramm, Cynthia Jurkiewicz Kunigk, *Braz. J. Food Technol.*, **2008**, 11(2), 153.

24.- Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J., *FEMS Microbiology Reviews*, 28, **2004**, 645.

25.- Suslow, T., *"Postharvest Chlorination"*, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Pub. 8003, **1997**, ISBN 978-1-60107-183-5.

26.- a) Xinping Zeng, Guoqing Ye, Wwnwei Tang, Ting Ouyang, Lin Tian, Yaming Ni, Ping Li, *Journal of Bioscience and bioengineering*, **2011**, 112(1), 86. b) T.E. Cloete, M.S. Thantsha, M.R. Maluleke, R. Kirkpatrick, *Journal of Applied Microbiology*, **2009**, 107(2), 379-384. c) Zeng X, Tang W, Ye G, Ouyang T, Tian L, Ni Y, Li P., *Journal of Food Science*, **2010**, 75(5), 253-260. d) V. Zinkevich, I. B. Beech, R. Tapper, I. Bogdarina, *Journal of Hospital Infection*, **2000**, 46(2), 153.

27.- a) Liu Rui, Hao Jianxiong, Liu Haijie, Li Lite, *Food Control*, **2011**, 22(8), 1311. d) M. R. Bonde, S. E. Nester, A. Khayat, J. L. Smilanick, R. D. Frederick, N. W. Schaad, *Plant Disease*, **1999**, 627. b) Lu, Zhan-Hui, Zhang, Yan, Li, Li-Te, Curtis, Rempel B., Kong, Xiao-Lin, Fulcher, R. Gary, Zhang, Gong, Cao, Wei, *Journal of Food Protection*, **2010**, 73(3), 483. c) Treviño-Mallón, I., *"Efecto de una solución de superoxidación (SES), como desinfectante en la producción de tilapia del nilo (Oreochromis niloticus), en la granja Santa Rita del Vergel, Ciudad de Ayala, Estado de Morelos, México"*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F., **2012**. d) G. M. Fasenko, E. E. O'Dea Christopher, L. M. McMullen, *Poult. Sci.*, 2009, 88(5), 1121. e) Paez, Esquiliano, D., y col., *"Plataforma tecnológica a través de soluciones de superoxidación, como una propuesta ecológica, inocua económica, para el manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad, desarrollo, cultivo, almacenamiento e incremento de la vida de anaquel de productos perecederos"*, BOCAMAR-

UNAM-Esteripharma México, S.A. de C.V.; Proyecto CONACyT 140170, Convocatoria **2009**. f) Páez-Esquiliano, D., y col., "*Evaluación de una solución de superoxidación en la producción de peces de agua dulce*", Esteripharma México S.A. de C.V., **2010**, resultados sin publicar. g) S. Solomon and Priyanka Singh, *Sugar Tech*, 2009, 11(2), 228. h) Valdez Perez M.L., "*Acción de una solución electrolizada de superoxidación (ses), para prolongar la vida útil del camarón crudo enhielado y refrigerado*", tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM, **2010**. i) Páez Esquiliano D., et al., "*Tecnología inocua e innovadora para abatir el uso indiscriminado de los antibióticos y antimicrobianos en la producción de pollos de engorda con base en las soluciones de superoxidación a 60 ppm*", Universidad Autónoma de Guerrero-UNAM-Bakity-Esteripharma, México, S.A. de C.V., Proyecto CONACyT 184037, Convocatoria **2012**.

28.- Autorización COFEPRIS No. 06330010490086 SSA.

29.- a) Nakayama, M., et al., *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, **2003**, 31(8), 421. b) Veasey, S.R., Muriana, P.M., *The Use of Hypochlorous Acid Generated by Electrolysis for the Treatment of Pathogens and Spoilage Microorganisms on Meat Products*, Oklahoma Agricultural Experiment Station, **2007**.

30.- NOM-092-SSA1-1994, "*Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*".

31.- NOM-111-22A1-1994, "*Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*".

32.- a) Cuervo-Mulet, R.A., *Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 8 Núm. 2, **2010**, 31. b) Koneman, "*Diagnostico bacteriológico, texto y atlas a color*", Editorial Panamericana, 6ta edición, Argentina, **2006**. c) MacFadin, "*Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*", Editorial Panamericana, 3ra edición, Argentina, **2003**. d) Bailey, Scott., "*Diagnostico bacteriológico*", Editorial Panamericana, 12va edición, Argentina,

2007. e) Flores, M., Welch, D., "Clinical microbiology procedures handbook", Sección 6, *Mycology: culture media*, Editorial Isenberg, Vol 1, American Society for Microbiology, Washington, D.C, **1992**, p.6.7.1-6.7.3.

33.- a) APHA, AWWA, WPCF, "Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales", Ediciones Díaz de Santos, S.A., 17ava Edición, Madrid, España, **1992**, p. 4-55. "Método Yodométrico I, 4500-Cl B". b) Van Biesen, G., "Electrochemistry: Methods Involving Iodide", Manual para Impartición de Curso, C3100-Winter, Memorial University of Newfoundland, 2011, Newfoundland and Labrador, Canada, p. 45. c) Bobrow test preparation services, "CliffsAP Chemistry", 4ta Edición, Wiley Publishing, Inc., 2007, Hoboken, N.J., USA, p. 344. d) Palmer, A.D., Ramette, R.W., Mesmer, R.D., *Journal of Solution Chemistry*, 13(9), **1984**, 673. e) Teresa, Sarmo, M.C., "Métodos de Oxidación Reducción en que interviene Yodo", Tema 11; Química Analítica Cuantitativa, Manual de apoyo para Impartición de Curso, Química Analítica I, Universidad Nacional del Nordeste, FACENA, Corrientes, Argentina.

exa.unne.edu.ar/quimica/quimica.analitica/arch_descargas/teoria/redox/Quimica%20Analitica-redox2.doc. f) Martín-Sánchez, M., Martín-Sánchez, M.T., Pinto, G., *Educ. Química*, 24(1), **2013**, 31.

34.- Velazquez-Meza, M.E., y col., *"Evaluación de la actividad inhibitoria de una SES en aislamientos clínicos causantes de infecciones nosocomiales"*, Poster A67, INER-Esteripharma México, S.A. de C.V., XXXVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, Guadalajara, Jalisco, **29 Mayo-1 Junio de 2013**.

35.- NMX-F-476-SCFI-2011, *"Método para la determinación de dextranas en azúcares y materiales azucarados"*.

36.- Soto-Maldonado, S., Hernández-Bedolla, M.A., "Estudio comparativo de dos medios de cultivo (líquido) para el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) Serotipos 1-10", Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, **2006**.

- 37.- a) Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R. *J. Dairy Science*, **1962**, 45, 655.
- b) Buttiaux, R., Beerens, H., Tacquet. *Manuel des techniques bactériologiques*. 4ta Ed., Flammarion, **1962**, p. 455-458.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones y medios de cultivo

Todos los reactivos y disolventes utilizados son grado reactivo a menos que se haga alguna otra especificación. El agua utilizada fue bidestilada.

A.1.1. Preparación de medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) Modificado con 0.25% de suero fetal bovino (SFB)^{32e}

Reactivos para 1 L de medio

Infusión cerebro corazón (sólidos).....	8.0 g
Peptona de carne.....	5.0 g
Peptona de caseína.....	16.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Dextrosa.....	2.0 g
Fosfato disódico.....	2.5 g
Agar.....	13.5 g
Suero fetal bovino.....	2.5 mL

Procedimiento:

Disolver en calor el BHI (BD[®] Bioxon) en agua destilada. Esterilizar en Autoclave (AESAS MOD. CV 250), a una temperatura de 121 °C y 15 lb de presión, por 15 minutos. Al enfriarse un poco el medio, agregar 0.25% de SFB. Vaciar el medio en cajas Petri desechables. Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración. NOTA: Una caja Petri debe contener de 20 a 25 mL de medio.

A.1.2. Preparación de medio Agar estándar (BHI)

Se procede como en la preparación del medio BHI Modificado pero se omite la adición de suero fetal bovino (SFB).

A.1.3 Preparación de medio para hongos y levaduras

Reactivos para preparar 1 litro de medio:

Agar..... 15.0

Dextrosa20.0

Infusión de papa..... 4.0

pH 5.6 ± 0.2

Procedimiento: Rehidratar 39 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles. También se puede utilizar el medio preparado comercial Agar Papa-Dextrosa (DIBICO S.A. DE C.V; Catálogo No. 1059).

A.1.4. Preparación de medio de cultivo selectivo Agar Mayeux³⁷

Reactivos para 1 L de medio:

Triptona.....10 g

Gelatina.....2.5 g

Extracto de levadura.....5 g

Sacarosa.....	100 g
Glucosa.....	5 g
Citrato de sodio.....	1 g
Azida de sodio.....	75 mg
Agar bacteriológico.....	15 g

Procedimiento:

Disolver en calor el medio Mayeux en agua destilada. Esterilizar en Autoclave (AESAS MOD. CV 250) a una temperatura de 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos. Vaciar el medio en cajas Petri desechables. Esperar a que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

A.1.5. Preparación de soluciones de Fehling A y B^{7,10}

A.1.5.1. Solución Fehling A

Pesar 69.28 g de sulfato de cobre pentahidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ponerlos en un matraz aforado de 1000 cm^3 , agregar agua hasta la mitad agitando hasta disolver los cristales, aforar con agua y mezclar.

A.1.5.2. Solución Fehling B

Pesar 346 g de cristales de tartrato de sodio y potasio en un vaso de precipitados previamente tarado, añadir 350 cm^3 de agua y agitar hasta disolución total. Pesar 10 g de hidróxido de sodio, NaOH, en otro vaso de precipitados previamente tarado, añadir poco a poco 250 cm^3 de agua y agitar hasta disolución total. Transferir las dos soluciones a un matraz aforado de 1000 cm^3 utilizando

agua para lavar los dos vasos e incorporar los lavados al matraz. Agitar y enfriar a temperatura ambiente, aforar con agua y mezclar.

A.1.6. Solución de azul de metileno al 1%¹⁰

Pesar 1 g de azul de metileno, ponerlo en un matraz aforado de 100 cm³, agregar agua hasta la mitad del volumen, disolver, aforar con agua y mezclar.

Anexo 2. Construcción de curvas de calibración

A.2.1. Construcción de curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña

A.2.1.1. Curva D-(+)-Glucosa+D-(-)-Fructosa

Se prepararon soluciones patrón con diferente concentración de D-(+)-Glucosa+D-(-)-Fructosa (J. T. Baker, CAS 50-99-7 y 57-48-7, respectivamente). Todos los patrones se aforaron a 100 mL de agua bidestilada.

Patrón 1: 33 mg de D-glucosa y 33 mg de D-fructosa.

Patrón 2: 51 mg de D-glucosa y 52 mg de D-fructosa.

Patrón 3: 72 mg de D-glucosa y 73 mg de D-fructosa.

Patrón 4: 121 mg de D-glucosa y 121 mg de D-fructosa.

Patrón 5: 177 mg de D-glucosa y 177 mg de D-fructosa.

Posteriormente se procedió a titular los patrones siguiendo la metodología descrita por Eynon y Lane:^{7,10}

Los 100 mL del estándar a analizar se colocan en una bureta. Aparte, en un matraz Erlenmeyer se colocan (en el siguiente orden) 5 mL de solución de Fehling A, 5 mL de solución de Fehling B, 20 ml de agua destilada y 5 ml del estándar a analizar. El matraz se agita con ayuda de agitador magnético, se calienta hasta

ebullición y se mantiene así durante 2 minutos. Se agregan 3 gotas de azul de metileno al 1% y se coloca la bureta con la muestra a 2 cm de la boca del matraz Erlenmeyer y mientras está en ebullición y agitación se agrega la muestra de la bureta hasta que desaparezca la coloración azul y aparezca una tonalidad color rojo ladrillo. Se registra la cantidad de mL de muestra gastados para producir el vire. Los mL registrados vs los mg contenidos se graficaron utilizando el paquete Microsoft Excel®, lo que resultó en una correlación exponencial $y = 8616.1x^{-1.075}$ con $r^2 = 0.9967$ [Gráfica A1]. A partir de esta curva se determinó la concentración de azúcares reductores presentes en los jugos de caña. Los ensayos se realizaron por duplicado e incluso se construyeron curvas utilizando sólo D-glucosa o sólo D-fructosa (*vide infra*). La curva con ambos azúcares reductores fue la utilizada para los cálculos.



Gráfica A1. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña con patrones de D-(+)-Glucosa y D-(-)-Fructosa.

A.2.1.2. Curva D-(+)-Glucosa

Se prepararon soluciones patrón con diferente concentración de D-glucosa (J. T. Baker, CAS 50-99-7). Todos los patrones se aforaron a 100 mL de agua bidestilada.

Patrón 1: 56.0 mg de D-glucosa.

Patrón 2: 87.0 mg " .

Patrón 3: 188.0 mg " .

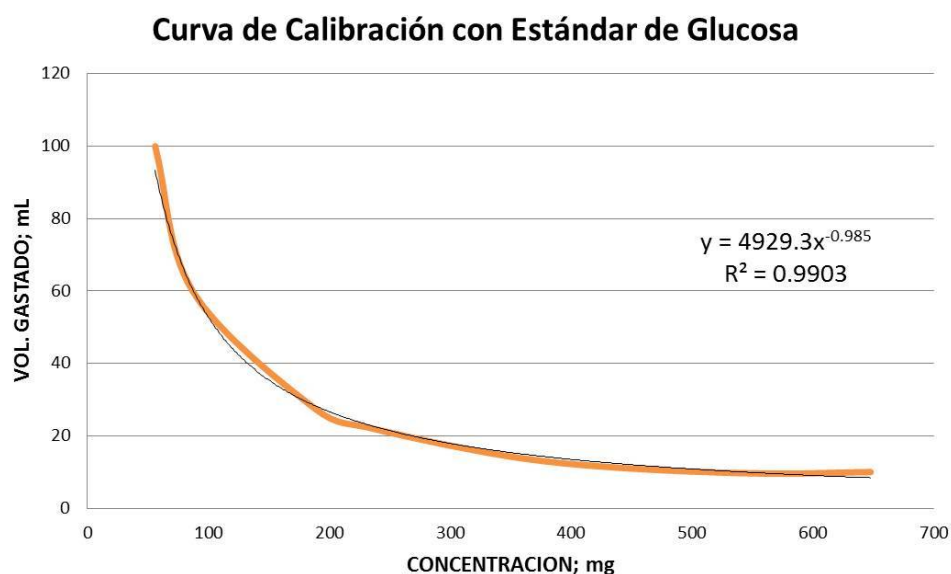
Patrón 4: 235 mg " .

Patrón 5: 344 mg " .

Patrón 6: 435 mg " .

Patrón 7: 555.0 mg " .

Posteriormente se procedió a titular los patrones siguiendo la metodología descrita en el punto anterior:



Gráfica A2. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando patrón de D-(+)-Glucosa.

A.2.1.3. Curva D-(+)-Glucosa en presencia de D-(+)-Sacarosa

Se prepararon soluciones patrón con diferente concentración de D-glucosa (J. T. Baker, CAS 50-99-7) en presencia de 1 gramos de D-Sacarosa (J. T. Baker, CAS 50-99-7), para confirmar la no interferencia de ésta última. Todos los patrones se aforaron a 100 mL de agua bidestilada.

Patrón 1: 21.0 mg de D-glucosa. + 1.0 gr de D-sacarosa.

Patrón 2: 54.0 mg "

Patrón 3: 87.0 mg "

Patrón 4: 188 mg "

Patrón 5: 235 mg "

Patrón 6: 344 mg "

Patrón 7: 435.0 mg "

Patrón 8: 554.0 mg "

Posteriormente se procedió a titular los patrones siguiendo la metodología descrita en el punto anterior:



Gráfica A3. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando patrón de D-(+)-Glucosa mezclado con D-(+)-Sacarosa.

A.2.1.4. Curva D-(-)-Fructosa

Se prepararon soluciones patrón con diferente concentración de D-(-)-Fructosa (J. T. Baker, CAS 57-48-7). Todos los patrones se aforaron a 100 mL de agua bidestilada.

Patrón 1: 54.0 mg de D-fructosa.

Patrón 2: 110.0 mg " .

Patrón 3: 214.0 mg " .

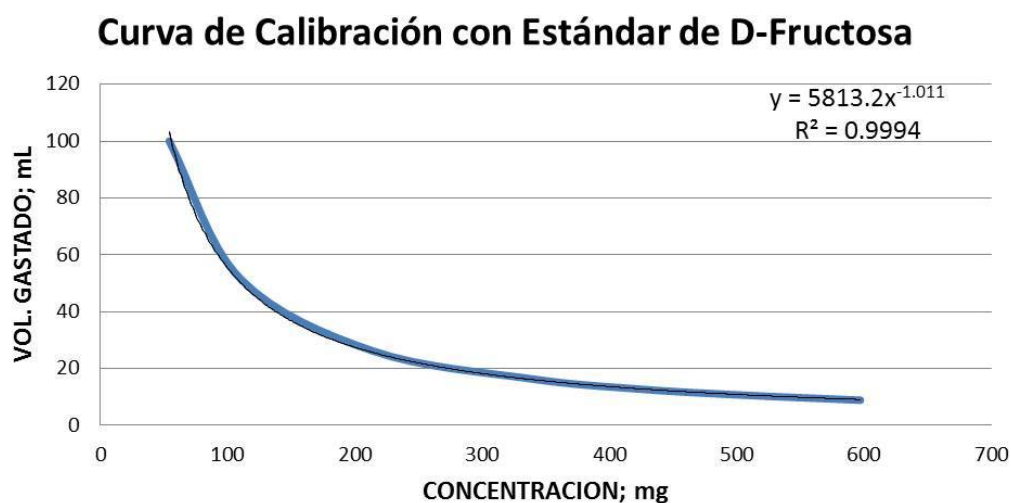
Patrón 4: 337 mg " .

Patrón 5: 420 mg " .

Patrón 6: 499 mg " .

Patrón 7: 597.0 mg " .

Posteriormente se procedió a titular los patrones siguiendo la metodología descrita en el punto anterior:



Gráfica A4. Curva de calibración para determinar concentración de azúcares reductores en jugos de caña utilizando D-(-)-Fructosa como patrón.

A.2.2. Construcción de curva de calibración para determinar concentración de dextranas en jugos de caña³⁵

Se preparó una solución madre de dextranas disolviendo y aforando a 100ml con agua destilada, 0.2 g del estándar Dextran, MW ca 500,000 (Alfa

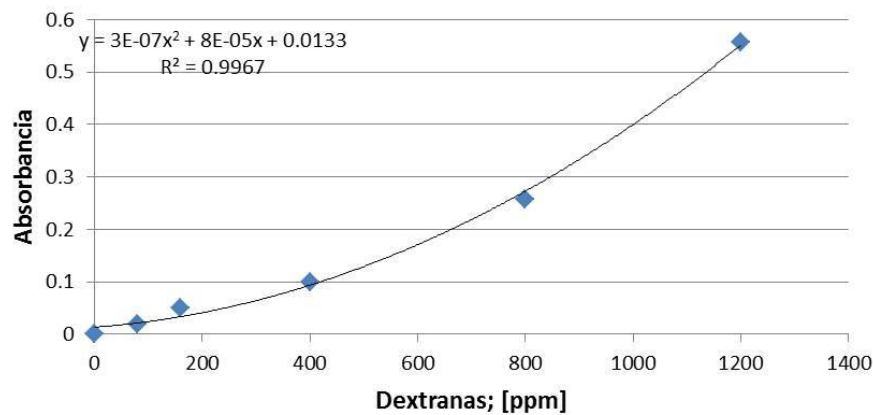
Aesar®; No. J63702). A partir de la solución madre de dextranas se preparan las siguientes soluciones, a diferente concentración y aforadas a 25 mL:

Vol. Solución madre (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración final de dextranas (ppm)
0.0	25	0
1.0	24	80
2.0	23	160
5.0	20	400
10.0	15	800
15.0	20	1200

Tabla A1. Datos para preparación de estándares de dextranas.

Se colocan 6 tubos en una gradilla y a cada tubo se agregan 5 ml de las soluciones preparadas. A cada tubo se agregan 5 mL de alcohol etílico y se dejan reposar 5 min. Finalmente se lee su absorbancia en espectrofotómetro operando en región VIS a una longitud de onda de 720 nm. Los resultados se grafican utilizando el paquete Microsoft Excel®, lo que resultó en una correlación lineal $y = 3004.8x + 63.895$ con $r^2 = 0.978$ [Gráfica A5]. A partir de esta curva se determinó la concentración de dextranas presentes en los jugos de caña. Los ensayos se realizaron por duplicado. La mejor correlación obtenida es la que se presenta.

Curva de Calibración con Estándares de Dextranas



Gráfica A5. Curva de calibración para determinar concentración de dextranas en jugos de caña.

Anexo 3. Métodos de siembra masivo y por dilución.

A3.1 Método masivo

Se flamea el asa y se toma una muestra de la población bacteriana, se hace una estría en medio de la placa Petri; se sigue haciendo un estriado en zigzag que abarque toda la placa y se continúa en sentido contrario con el estriado en zigzag con la finalidad de que toda la placa quede cubierta. A continuación, las placas se incuban en un lugar adecuado, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles [Figura A1].

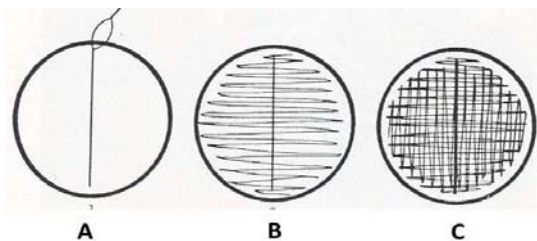


Figura A1. Método masivo de siembra. A) Inoculación primaria, B) Estría en ángulo recto, C) Estría en ángulo recto para producir una "esfera" de desarrollo.

A3.2 Método por dilución

Es el método más fácil y el más usado. Con un asa de siembra se toma una muestra de la población mixta y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa Petri [Figura A2-A]. Se van haciendo estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos [Figura A2-B]. A continuación se flamea el asa, se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie de medio sin sembrar aún [Figura A2-C]. Repitiendo este proceso varias veces se logra separar células individuales. A continuación, las placas se incuban en un lugar adecuado, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles.

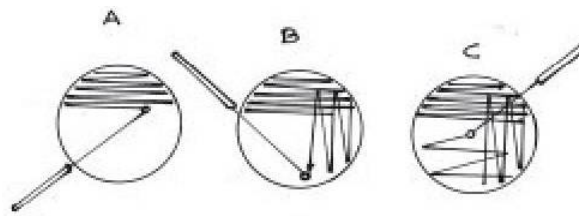


Figura A2. Método de siembra por dilución.

Anexo 4. Identificación de flora bacteriana de jugos de caña de ingenio utilizando el equipo Vitek® 2.

Una vez teniendo la bacteria pura se prepara una suspensión de 3 ml de SSF con la bacteria pura y se lee en el Densichek; para bacterias debemos tener una lectura de 0.6-0.8 para Gram positivas y Gram negativas, para levaduras se hace el mismo procedimiento pero con lecturas de 1.8-2 en el Densichek. Se coloca el tubo con la suspensión bacteriana en el casete y se coloca la tarjeta con el tubo indicador dentro de la suspensión, se procede a meterse en el Vitek® 2 y a leerse de acuerdo al manual de uso. En las tablas siguientes se muestran las pruebas bioquímicas que el equipo Vitek® 2 realiza para identificar a bacterias Gram negativas [Tabla A2] y Gram positivas [Tabla A3].