



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

**POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA
SUSTENTABLE**

**EFFECTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN LA
CALIDAD DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR DEL
INGENIO EL POTRERO, VER.**

Gloria Teresa González Vázquez

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

Amatlán de los Reyes, Veracruz

2016

La presente tesis, titulada: **Efecto de las bacterias ácido-lácticas en la calidad del jugo de caña de azúcar del Ingenio El Potrero, Ver.**, realizada por la alumna: Gloria Teresa González Vázquez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

ASESOR: 
DR. JUAN VALENTE HIDALGO CONTRERAS

ASESORA: 
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México

Junio 2016

Efecto de las bacterias ácido-lácticas en la calidad del jugo de caña de azúcar del Ingenio El Potrero, Ver.

Resumen

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es el principal cultivo para la obtención de azúcar en México. Sin embargo, se estiman pérdidas de sacarosa por asociación de microorganismos que la invierten ocasionando deterioro de la caña de azúcar. Por lo anterior, en el presente trabajo se confinaron tallos verdes, tallos quemados y tallos descargados en fabrica (batey) todos procedentes de la misma parcela, del jugo de estos tallos se aislaron y seleccionaron los microorganismos de acuerdo a dos secciones del tallo, sección 1 (nudos 0 al 5) y sección 2 (nudos 6 al 10) con tallos sin corteza y tallos con corteza. Se realizó una cinética de crecimiento para verificar la actividad microbiana y monitorear el decremento de sacarosa a cinco tiempos de confinamiento 0, 12, 24,30 y 36 horas. Se realizaron siembras en medios diferenciales y específicos con el apoyo de pruebas bioquímicas selectivas, para el aislamiento de microorganismos degradadores de sacarosa y coliformes totales, así mismo se realizó el análisis de calidad de jugo, determinando °Brix, Pol (%), Pureza (%) y azúcares reductores. Los resultados mostraron que la mayor presencia de microorganismos degradadores de sacarosa se encuentran en la parte basal del tallo (nudos 0-5), la incidencia de microorganismos degradadores de sacarosa aumentó a partir de la quema y conforme pasó el tiempo hubo mayor presencia, como sucedió con los tallos batey después de transcurridas 30 horas. Los datos obtenidos se analizaron con el programa SAS® para obtener una correlación entre el crecimiento bacteriano UFC y la calidad del jugo, obteniendo una correlación entre las UFC y Pol (%) del 55.4% a las 30 horas de confinamiento, lo que indicó que la presencia de microorganismos disminuyó la concentración de sacarosa. Se encontró que el contenido de sacarosa es más alto a las 24 horas posteriores a la cosecha, comprobando que a mayor tiempo el deterioro de la caña progresa de manera acelerada por la presencia de un complejo bacteriano que detona su crecimiento a una temperaturas de 34°C a 37°C afectando la calidad del jugo de la caña de azúcar y el contenido de sacarosa.

Palabras clave: Bacterias, deterioro, sacarosa, calidad de jugo.

Effect of lactic acid bacteria in the juice quality sugar cane from El Potrero mill.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is the main crop for the production of sugar in Mexico. However, sucrose losses are estimated by association of microorganisms causing deterioration of the sugarcane. Therefore, we maintain green stems, burned stems and unloaded at the mill (batey) stalks all from the same plot, the juice of these stems were confined were isolated and selected microorganisms according to two sections of the stem section 1 (internode 0 to 5) and section 2 (internode 6 to 10) stems without rind and stems with rind. It carry out a growth kinetics was performed to verify and monitor microbial activity to sucrose during five times: 0, 12, 24,30 and 36 hours. And it doing a differential and specific means to support selective biochemical tests, for the isolation of degraders sucrose and total coliforms, also the quality analysis juice was performed, determining ° Brix, Pol (%) Purity (%) and reducing sugars. The results showed that the increased presence of sucrose degrading microorganisms are found in the basal part of the stem (internode 0-5), the incidence of degraders of sucrose increased from burning and as time passed there was a greater presence as happened to the batey stems elapsed after 30 hours. The data obtained were analyzed with the SAS program to obtain a correlation between bacterial growth UFC and juice quality, obtaining a correlation between the UFC and Pol (%) 55.4% at 30 hours of confinement, indicating that the presence of microorganisms decreased sucrose concentration. It was found that the sucrose content deteriorates cane substantially from 24 hours is higher in the post-harvest, ensuring that the longer the presence of a bacterial complex that detonates its growth accelerated to a temperatures between 34 ° C to 37 ° C affecting the quality of the juice of the sugar cane and sucrose content.

Keywords: Bacteria, deterioration, sucrose, juice quality

Dedicatoria

A mis padres, que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente en todo momento, ellos son el motor que me impulsa a seguir siempre adelante.

A mi familia, que me brindó su apoyo incondicional.

A un hombre en especial, el cual me enseñó a nunca rendirme a pesar de todos los obstáculos y tener siempre la fuerza y valentía para seguir adelante, tal cual él lo hizo hasta su último respiro, te amo Abuelo y siempre estarás en mi corazón.

A mis dos grandes amigas Marisol y Rosario, que estuvieron siempre a mi lado sin importar nada brindándome sus conocimientos y apoyo, las quiero niñas.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada, la cual me ayudo a concluir mis estudios de Maestría en Ciencias. Gracias.

Al Colegio de Postgraduados, por abrirme las puertas de esta casa de estudios y darme la oportunidad de seguir superándome profesionalmente.

A la MAP zona Centro de Veracruz, que fue donde se realizó la investigación.

Al Ingenio Fideicomiso El Potrero, Ver., por permitirme realizar los muestreos en su zona de abasto.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas, por su dedicación, paciencia y esfuerzo para concluir este trabajo y sobre todo por haber creído en mí.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz, que a pesar de la distancia siempre tuve su total apoyo y orientación.

Al Dr. Juan Valente Hidalgo, por recibir su apoyo incondicional y oportuno para la culminación de este proyecto.

A mis amigos; Andrea, David, Eduardo, Isaac, Pedro, Rosario, Marisol y Jenith porque siempre estuvieron conmigo en los mejores y peores momentos de este camino, gracias por el apoyo.

A mis niños Simón, Margarita, Yeldi, Jerry, Irene y Erick que fueron parte del equipo de trabajo. Gracias.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	2
II. MARCO CONCEPTUAL	4
2.1 Innovación.....	4
2.2 Agroalimentario	4
2.3 Sustentable	5
2.4 Cadena agroalimentaria de la caña de azúcar.....	5
2.5 Caña de azúcar	6
2.5.1 Taxonomía.....	7
2.5.2 Característica del cultivo de la caña de azúcar.....	7
2.5.3 Morfología.....	8
2.5.4 Tipos de suelo	9
2.5.5 Clima	10
2.5.6 Usos.....	10
2.6 Composición	10
2.6.1 Sacarosa.....	10
2.6.2 Glucosa (dextrosa).....	11
2.6.3 Fructosa	11
2.7 Tipos de jugo (jugo primario)	12
2.7.1 Jugo mezclado.....	12
2.8 Características físico-químicas de los jugos.....	12
2.8.1 Azúcares reductores	12
2.8.2 Pol	12
2.8.3 Brix.....	13
2.8.4 Pureza.....	13
2.8.5 Dextranas.....	13
2.9 Pérdidas de sacarosa.....	14
2.9.1 Pérdidas indeterminadas.....	14
2.9.1.2 Perdidas químicas.....	14
2.9.1.3 Perdidas microbiológicas	15
3.0 Contaminación microbiológica	15
3.1 Microorganismos de interés (bacterias ácido-lácticas, BAL).....	16

3.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	17
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
VI. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo General	19
6.2 Objetivos Particulares	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1 Lugar de muestreo.....	20
7.1.2 Toma de muestra en el laboratorio del Colegio de Postgraduados	20
7.2 Unidad de muestreo.....	21
7.3 Variables de respuesta y unidades de medida	21
7.4 Carga microbiana	21
7.4.1 Aislamiento y purificación de microorganismos.....	22
7.5 Pruebas físico-químicas.....	23
7.5.1 Determinación de grados brix, pureza (%) y sacarosa (%)	23
7.5.2 Determinación de azúcares reductores	23
VIII. RESULTADOS	24
8.1 Población de microorganismos	24
8.2 Análisis fisicoquímicos	28
8.2.1 Azúcares reductores	28
8.3 Pruebas bioquímicas.....	34
8.4 Análisis Estadístico	36
IX. DISCUSIONES	41
X. CONCLUSIONES	46
XI. RECOMENDACIONES	46
XII. LITERATURA CITADA	47

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de la cadena agroalimentaria de la caña de azúcar (Aguilar et al. 2011)	6
Figura 2. Diferenciación de los tallos de la caña de azúcar (Patishtán 2014).	8
Figura 3. Morfología de la caña de azúcar (Amaya et al. 1995).	9
Figura 4. Estructura de una molécula de sacarosa (Lehninger, 1970).	11
Figura 5. Estructura de una dextrana (Larrahondo, 1995).	13
Figura 6. Morfología de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Cuervo et al. 2010).	17
Figura 7. Preparación de diluciones (González, 2016).	21
Figura 8. Conteo de colonias (UFC) (González, 2016).	22
Figura 9. Siembra en medios diferenciales, colonias verdes <i>E. coli</i> , colonias lilas <i>Klebsiella</i> y colonias rosa suave <i>Salmonella</i>	24
Figura 10. Comparación de crecimiento entre tallos verdes con corteza (VCC) y tallos verdes sin corteza (VSC). a) microorganismos presentes en VCC de bacterias degradadoras de sacarosa con 6.19×10^6 UFC/mL en el entrenado 0-5 a las 36 horas. b) microorganismos presentes en VSC de bacterias degradadoras de sacarosa en la sección 0-5 con 1.79×10^5 UFC/mL a las 36 horas.	25
Figura 11. Comparativo entre los tallos quemados con corteza (QCC) y tallos quemados sin corteza (QSC).	26
Figura 12. Presencia de microorganismos aislados del jugo de los tallos de batey a) la mayor presencia de bacterias degradadoras de sacarosa 1.44×10^6 UFC/mL se observó en la parte basal del tallo a las 36 horas BCC. b) mayor concentración de bacterias degradadoras d mayor concentración de bacterias degradadoras de sacarosa encontradas a las 30 horas en el entrenado 0-5 con un valor de 4.10×10^6 UFC/ml BSC.	27
Figura 13. Comparativo entre los porcentajes de azúcares reductores de los jugos correspondientes a los tallos verdes con corteza (VCC) y tallos verdes sin corteza (VSC) a) mayor porcentaje de azúcares reductores presentes en VCC en el entrenado 6-10 a las 30 horas. b) En los tallos VSC se tiene menor presencia de azúcares.	29
Figura 14. Comparación entre los porcentajes de azúcares reductores presentes en el tratamiento quema de tallos con corteza (QCC) y tallos sin corteza (QSC). a) Porcentaje de azúcares reductores correspondientes al tratamiento QCC, b) corresponde al porcentaje de los tallos QSC.	30
Figura 15. Comparativo de azúcares reductores presentes en tallos de batey con corteza (BCP) y tallos sin corteza (BSC). a) Porcentaje de azucares reductores en tallos BCC, b) tallos BSP donde ambos entrenados desarrollaron reductores de forma similar.	31
Figura 16. Formación de gomas característico de <i>Leuconostoc</i> en medio rico en sacarosa (González, 2016).	35

Lista de Tablas

Tabla 1. Estados productores de caña de azúcar (SAGARPA, 2012)	7
Tabla 2. Pruebas bioquímicas para selección de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Cuervo et al., 2010).....	23
Tabla 3. Valores de °Brix, pureza (%) y sacarosa (%) para todos los tratamientos.	32
Tabla 4. Pruebas bioquímicas para seleccionar a <i>L. mesenteroides</i> . Símbolos: cb- cocabacilos, c-cocos, b-bacilos, k-cadenas, r-racimos, + 90% o más de cepas son positivas, - 90% o más de cepas son negativas. Fuente: Cuervo (2010).	34
Tabla 5. Medias de mínimos cuadrados para UFC y Pol (%).	
Tabla 6. Coeficiente de correlación Pearson en relación con tiempo de incubación a las 24,30 y 36 horas.	39

INTRODUCCIÓN

En México la industria azucarera es una de las más importantes, debido a su relevancia económica y social en el campo, genera más de 2 millones de empleos, en forma directa como indirecta, se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios, genera un valor de producción primaria alrededor de 30 mil millones de pesos. De todos los municipios el estado de Veracruz tiene la producción más alta de la república con una cosecha de alrededor de 250,000 ha de cultivo de caña por año, que producen 6.5 millones de ton de azúcar con valor de 5.5 mil millones de pesos, representando el 38% de la producción nacional (SAGARPA, 2012).

Las plagas y enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción de azúcar a nivel mundial. En las últimas décadas, el número de organismos patógenos (bacterias, hongos etc.) inciden de tal manera que pueden llegar a reducir el rendimiento de la cosecha, incrementar costos de producción y tener pérdidas de sacarosa (INIFAP, 2012).

Entre los microorganismos presentes en el tallo de la caña de azúcar se encuentra: *Leuconostoc sp*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Bacillus* y *L. mesenteroides*; este último es causante de la mayoría de problemas para la industria debido a que hidroliza la sacarosa y forma dextranos que retardan la cristalización en los tachos y forma falso grano produciendo considerables mermas (Audisio y Carrillo, 2007).

En el estudio de la microflora contaminante durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar no se presentaron diferencias significativas con respecto al número de microorganismos en los jugos de primera extracción y diluido, éstos se encuentran en un período fisiológicamente activo, donde se requieren carbohidratos (azúcar) para realizar sus funciones metabólicas vitales. El nivel promedio de contaminación hallado fue de 106 UFC/mL de jugo de caña siendo el género *Leuconostoc spp* el predominante, se ha observado que causa pérdidas en la producción de azúcar y donde se puede perder entre el 1 a 5 % del total de azúcar (Mora 1995). Por lo anterior, el presente trabajo plantea el aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en tallos de caña cruda, quemada y de batey y confirmar el efecto de estas bacterias en la calidad del jugo de la caña de azúcar.

I. ANTECEDENTES

La agroindustria de la caña de azúcar es una actividad productiva de gran importancia social, cultural, política y económica (Sánchez, 1997; Crespo, 1988); su valor es de 3 mil millones de dólares anuales, lo que representa 11.6 por ciento del total de las materias primas agroindustriales. Los 164 mil agricultores de caña y los 51 ingenios del sector generan más de 450 mil empleos (11.35% del total de la agroindustria de alimentos), y beneficios directos para más de 2 millones de personas (CONADESUCA, 2015). Veracruz, Jalisco y San Luis Potosí producen el 61.1% del azúcar en México y cuentan con el 54.9% de los ingenios. Veracruz participa con el 41% de la producción nacional, contando para ello con 22 ingenios, de estas, 11 se encuentran en la región de Córdoba (CNIAA, 2014).

Sin embargo, en México esta agroindustria se ha visto afectada por plagas y enfermedades que reducen la calidad y rendimientos de este cultivo. En este sentido, las plagas y microorganismos presentes en la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción de azúcar a nivel mundial. En las últimas décadas, el número de organismos patógenos detectados sobre este cultivo ha crecido considerablemente y se han extendido de forma notable (INIFAP, 2012).

Por lo anterior, la bacteria del género *Leuconostoc* y al grupo coliformes se les ha relacionado como los principales microorganismos consumidores de sacarosa (Egan y Rehbein, 1963; Hernández, 1978; Duarte, 1982). Estas bacterias pueden causar pérdidas del 1-5% de sacarosa debido a las condiciones ideales en las etapas iniciales del proceso de extracción aunque también pueden afectar desde el corte de la caña (Eggleston, 2012). Conjuntamente con la degradación de azúcar existe evidencia que las bacterias del género *Leuconostoc* producen dextrana, polisacárido causante de daños en la producción de azúcar (Hernández, 1978).

Las pérdidas de sacarosa se ha observado en todas las etapas del proceso de obtención del azúcar desde la caña en campo hasta el azúcar como producto terminado (Eggleston, 2012). Los métodos agronómicos para el corte de la caña de azúcar por medio de la quema tiene sus desventajas debido a que durante el quemado de la caña las temperaturas alcanzan hasta 800 °C y esto ocasiona que el tallo reviente por el cocimiento de los jugos o líquidos internos, al reventar los tallos estos quedan con la pulpa expuesta rica en sacarosa disponible para la

acción de los microorganismos. En este caso, la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* ha sido aislada frecuentemente de los tallos después de realizada la quema, y además la presencia de este microorganismo se incrementa considerablemente a medida que pasa el tiempo en el campo o durante el transporte hasta el batey (Zepeda, 2012).

La bacteria *L. mesenteroides* es un microorganismo que metaboliza la sacarosa y se ha comprobado su capacidad de producir dextranos y que se hacen evidentes después de transcurridas las 24 horas. Lo que evidencia que la degradación de sacarosa se presenta desde el campo y no en los molinos por falta de asepsia, es decir, los microorganismos presentes en el jugo de caña varían dependiendo de las condiciones de la caña que fue recibida, entre el corte y la entrega en fábrica, por alguna enfermedad de la caña, el tipo de suelo y el clima (Serrano, 2006).

II. MARCO CONCEPTUAL

2.1 Innovación

El concepto de innovación designa la incorporación del conocimiento propio o ajeno con el objeto de generar o modificar un proceso productivo (Sábato, 1975). La diferencia con la noción de investigación radica en que el conocimiento transferido puede ser el resultado directo o indirecto de la investigación, pero puede implicar también una observación fortuita, un descubrimiento inesperado, una intuición acientífica o una conexión aleatoria de hechos diversos. De acuerdo con el Manual de Oslo 2005, se pueden distinguir cuatro tipos de innovación:

- Innovaciones de producto: corresponde a la introducción de un bien, un nuevo servicio, o de uno existente pero significativamente mejorado en cuanto a sus características o al uso al que se destina.
 - Innovaciones de proceso: es la introducción de un nuevo (o significativamente mejorado) proceso de producción o de distribución. Ello implica cambios significativos en las técnicas, los materiales y/o los programas informáticos.
 - Innovaciones de mercadotecnia: es la aplicación de un nuevo método de comercialización que implique cambios significativos en el diseño o el envasado de un producto, así como en su posicionamiento, promoción o tarificación.
 - Innovación de organización: es la introducción de un nuevo sistema organizativo en las prácticas, la organización del lugar de trabajo o las relaciones exteriores de la empresa.
- Benavides (1998) propone diferentes clases que permiten tipificar la innovación, en este sentido es posible clasificarla de la siguiente manera:
- Por su naturaleza u objeto (producto, proceso, mercadotecnia y organizativa).
 - Por su grado de novedad (radicales o de ruptura, incrementales o adaptativas).
 - Por su impacto económico (básicas de mejora).

2.2 Agroalimentario

El sector agroalimentario ha estado estrechamente ligado al desarrollo del mundo productivo agrario y ganadero. En sus orígenes se trataba de una industria muy tradicional, vinculada al mundo rural, atomizada y de carácter local. A partir de los años 60', la agricultura y la ganadería tradicional comenzaron a evolucionar hacia el desarrollo de una producción más moderna e industrializada, con mayor orientación hacia los procesos de transformación y

distribución, y con creciente interés en la calidad de los productos. Durante la última década han aparecido una serie de factores que motivan un cambio y reestructuración profundos en el sector, cambio que es continuo y que prosigue, hoy en día, con la aparición de nuevos productos, la apertura y globalización de los mercados, y la implantación de nuevas tecnologías y métodos de trabajo. Las empresas se ven obligadas a una continua actualización con el fin de mantener o mejorar su nivel competitivo. En el caso de la tecnología, la innovación se constituye como un factor de diferenciación y competitividad para las empresas que la asimilen.

2.3 Sustentable

La sustentabilidad se refiere a la administración eficiente y racional de los recursos, de manera tal que sea posible mejorar el bienestar de la población actual sin comprometer la calidad de vida de las generaciones futuras. Uno de los principales retos que enfrenta México en materia de desarrollo sustentable es incluir al medio ambiente como uno de los elementos de la competitividad y el desarrollo económico y social. Entre los factores clave del desarrollo sustentable, se encuentra el crecimiento poblacional, la demanda energética, el cambio climático, la escasez de recursos y del agua, y el manejo de residuos.

En 1987, el desarrollo sustentable fue presentado formalmente por la Comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo de Naciones Unidas, como una alternativa al desarrollo socioeconómico tradicional, causante de graves daños ambientales al planeta.

En los últimos años, la perspectiva de los negocios ha cambiado, pues no sólo deben enfocarse a los beneficios económicos. Para calificar a una empresa, ahora los inversionistas no sólo consideran los datos financieros, sino otros factores que están implicados en los temas de desarrollo sustentable, por lo que no es exagerado considerar que en los próximos años las cuestiones de sustentabilidad y cambio climático serán el nuevo escenario competitivo de los negocios.

2.4 Cadena agroalimentaria de la caña de azúcar

La diversidad productiva de la caña de azúcar y de sus subproductos como lo es el azúcar, papel, cartón y, alimento pecuario entre otros, da la dimensión de su importancia económica y social para el país y la sociedad en general. Esto en gran medida debe de considerarse en la formulación de planes rectores, bajo un entorno de política y de desarrollo global, pues

México no es el único productor de caña de azúcar y de los diversos subproductos (Aguilar *et al.* 2011.).

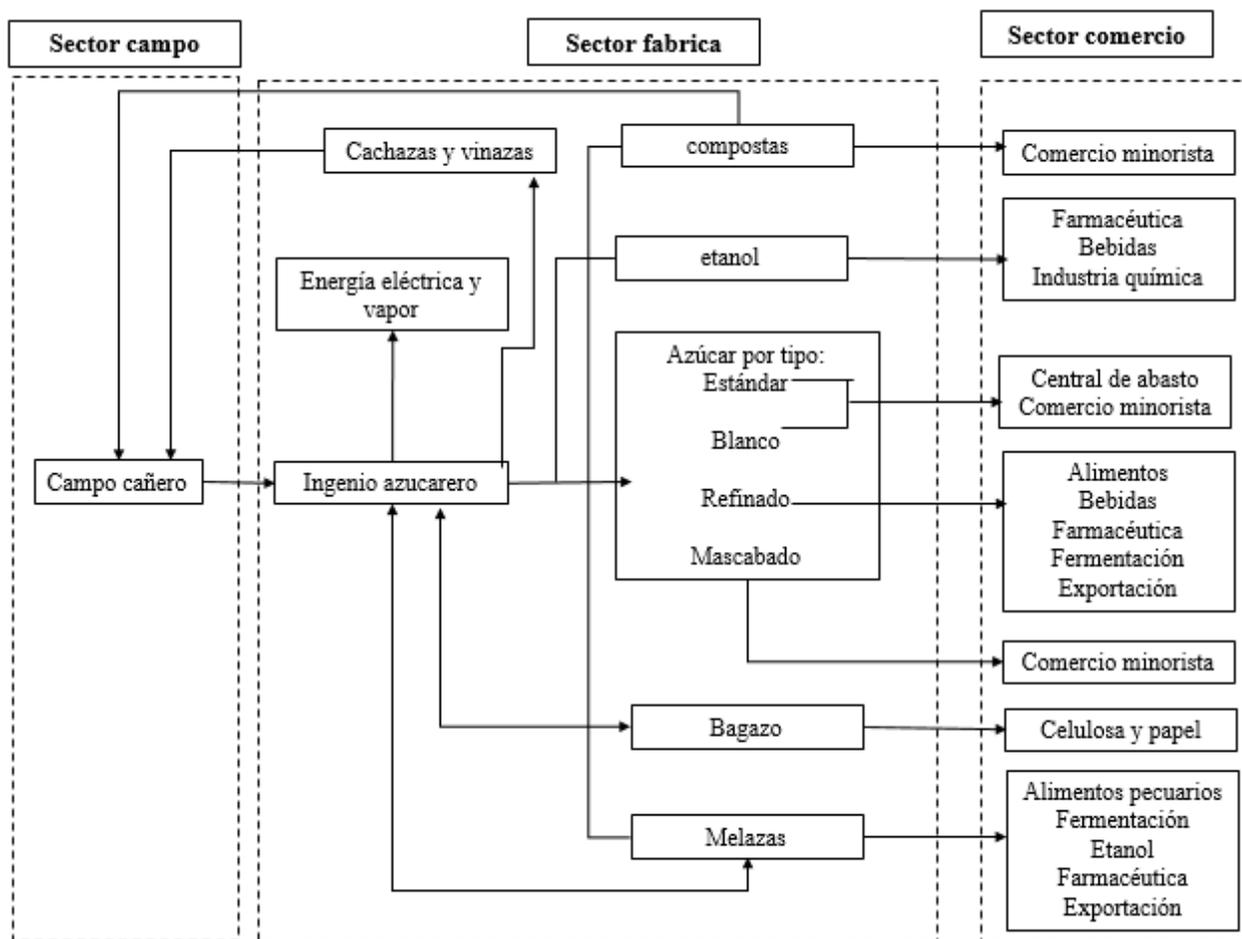


Figura 1. Estructura de la cadena agroalimentaria de la caña de azúcar (Aguilar *et al.* 2011)

2.5 Caña de azúcar

La caña de azúcar es una gramínea que pertenece al género *Saccharum*, que prospera en climas tropicales y subtropicales semicálidos (21-38 °C), y se desarrolla en suelos francos y arcillosos. El cultivo de esta especie originó un sistema agroindustrial que ocupa un lugar preponderante en la actividad económica y social de México (CNPR, 2007). Se cultiva en 15 estados de la república mexicana, estos se muestran en el cuadro 1, ordenados de mayor a menor producción (SAGARPA, 2012).

Tabla 1. Estados productores de caña de azúcar (SAGARPA, 2012)

Estado	Producción (toneladas)
Veracruz	18,628,734.59
Jalisco	6,221,412.79
Oaxaca	3,613,337.60
San Luis Potosí	3,032,325.34
Tamaulipas	2,779,645.00
Nayarit	2,746,019.69
Chiapas	2,634,040.35
Morelos	1,862,102.25
Puebla	1,773,849.45
Tabasco	1,664,111.00
Sinaloa	1,561,380.00
Quintana Roo	1,354,162.00
Michoacán	1,209,571.87
Colima	1,018,619.10
Campeche	322,308.50

2.5.1 Taxonomía

De acuerdo al National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015) la caña de azúcar se clasifica de la siguiente forma:

Reino: Vegetal	Clase: Monocotiledóneas	Familia: Poaceae
Subreino: Viridiplantae	Orden: Poales	Género: <i>Saccharum</i> .
División : Tracheophyta-plantas vasculares, traqueófitas	Subdivisión: Spermatophytina-spermatophytes	Subfamilia: Panicoideae Tribu: Andropogonae
Especie: <i>officinarum</i> L.		

2.5.2 Característica del cultivo de la caña de azúcar

Es un cultivo plurianual. Se corta cada 12 meses siendo soca y siendo soca se debe cortar entre 15 y 18 meses de desarrollo, la plantación dura aproximadamente 5 años. Tiene un tallo macizo de 2 a 5 m de altura con 3 o 5 cm de diámetro, siendo el órgano más importante ya que en él se almacenan los azúcares. El sistema radicular forma raíces finas y muy ramificadas las cuales tienen la habilidad para absorber agua y nutrientes necesarios para la planta (García *et al*, 2007 citado por Mata *et al.*, 2014).

2.5.3 Morfología

Tallo: El tallo de la caña se desarrolla a partir de las yemas de otro tallo que haya sido colocado en condiciones favorables, mediante la propagación asexual o vegetativa usual. Los tallos se componen de los nudos y el entrenudo. El entrenudo es la porción del tallo limitada por dos nudos, lo que convierte a cada canuto en una unidad, cuya longitud está limitada por factores internos y externos. El tallo mide entre 3 y 6 m de altura y entre 2 y 5 cm de diámetro. El diámetro de los entrenudos presenta una tendencia determinada (Figura 2). Estos son más gruesos a partir del nivel del suelo y van disminuyendo en grosor a medida que se asciende en altura hasta alcanzar un valor constante (Alexander *et al.* 1973 citado por Patishtan 2014).

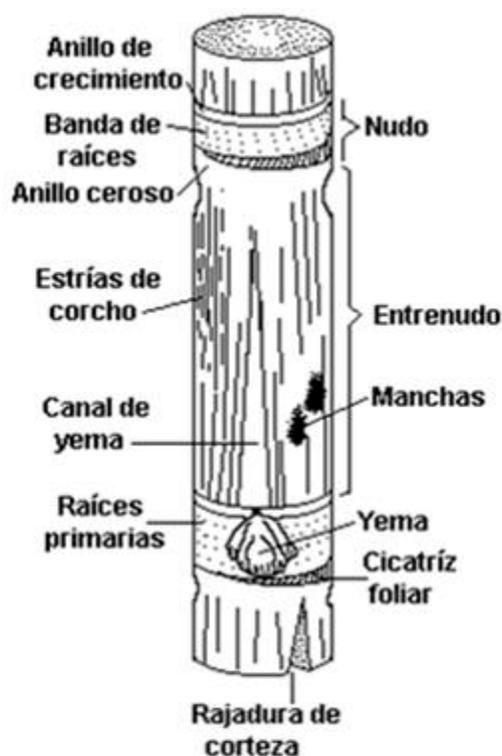


Figura 2. Diferenciación de los tallos de la caña de azúcar (Patishtán, 2014).

Hojas: El entrenudo se localiza entre dos nudos. En la parte apical del tallo, los entrenudos miden unos pocos milímetros y en ellos ocurre la división celular que, a su vez, determina la elongación y la longitud final. Las hojas de la caña de azúcar se originan en los nudos y se

distribuyen en posiciones alternas a lo largo del tallo a medida que éste crece. Cada hoja está formada por la lámina foliar y por la vaina o yegua (Figura 3) (Amaya *et al.* 1995).

Lámina foliar: es la parte más importante para el proceso de la fotosíntesis, y su disposición en la planta difiere con las variedades, siendo las más comunes el péndulo y la erecta (Figura 3, Amaya *et al.* 1995).

Yagua o vaina: tiene forma tubular, envuelve al tallo y es ancha en la base. Sus colores, generalmente es verde cuando joven, pero cambia a rojo- púrpura cuando la hoja logra su completo desarrollo (Figura 3).

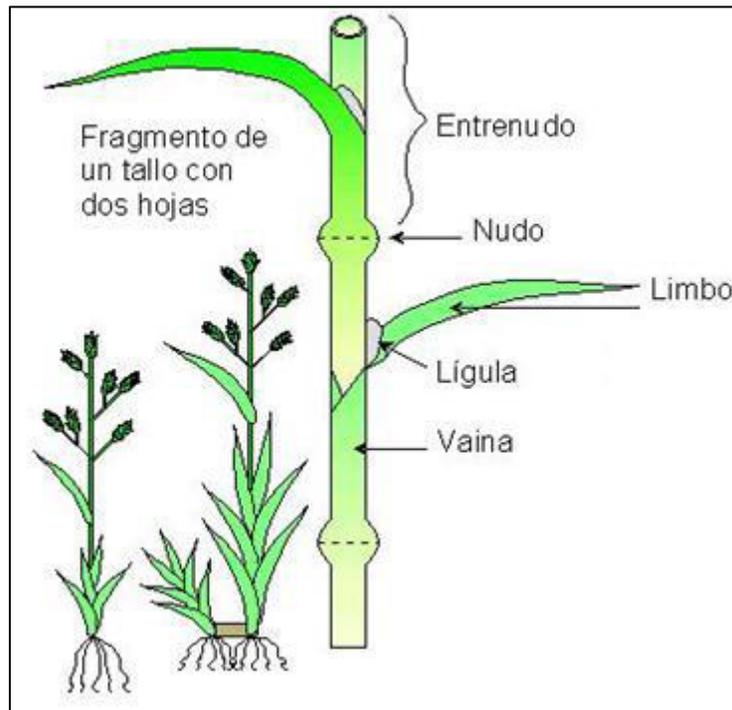


Figura 3. Morfología de la caña de azúcar (Amaya *et al.* 1995).

Raíz: La función principal del sistema radicular es la de absorber agua y sales minerales, proporcionar anclaje y almacenar materiales de reserva (Subirós, 2000). La raíz primaria está ubicada en el embrión. Las raíces que originan el tallo, en la banda de raíces (zona cercana al entrenudo), son adventicias.

2.5.4 Tipos de suelo

Puede prosperar en diferentes tipos de suelos desde texturas arenosas, francas, francas-arcillosas y arcillosas, además puede adaptarse a diversas condiciones poco favorables

(Ridge 2013). El suelo ideal debe presentar una densidad de 1.1 g.cm³, con una porosidad total superior del 50 %, una capa freática bajo 1.5 a 2 metros desde la superficie, una elevada retención de agua y un pH de 6.5 (Aguilar 2001).

2.5.5 Clima

La caña de azúcar es una planta tropical, sin embargo puede adaptarse a un amplio rango de condiciones climáticas, se ha mencionado que se desarrolla mejor en regiones tropicales cálidas con una amplia y prologada radiación solar (Vargas, 2009).

2.5.6 Usos

El principal producto de este cultivo ha sido comúnmente el azúcar. En este caso el etanol se considera coproducto. El volumen de azúcar varía según la materia prima utilizada en la fabricación de etanol. Con miel pobre se pueden obtener 92 kg de azúcar por tonelada de caña, mientras que con miel rica se obtienen 124 kg, aunque esos valores dependen del nivel de sacarosa de la caña (Serrano, 2006). El bagazo de la caña es uno de los subproductos y se usa como fuente de energía. Por cada tonelada de caña se produce alrededor de 264 kg de bagazo (con un 50% de humedad), que se puede utilizar para la producción de energía eléctrica y calórica por medio de la cogeneración (Serrano 2006).

2.6 Composición

La caña está constituida principalmente por jugo y fibra, siendo la fibra la parte insoluble en agua formada por celulosa, lo que a su vez se compone de azúcares simples como la glucosa (dextrosa). A los sólidos solubles en agua expresados como porcentaje y representados por la sacarosa, los azúcares reductores y otros componentes, comúnmente se les conoce como Brix. La relación entre el contenido de sacarosa presente en el jugo y el Brix se le conoce como pureza del jugo. El contenido aparente de sacarosa expresado como % en peso y determinado por polarimetría, se conoce como “Pol” (Aguirre, *et al.* 2010).

2.6.1 Sacarosa

La sacarosa o azúcar de caña es un disacárido formado de la glucosa y fructuosa α -D-Glucopiranosil- β -D-fructofuranósido (Figura 4).

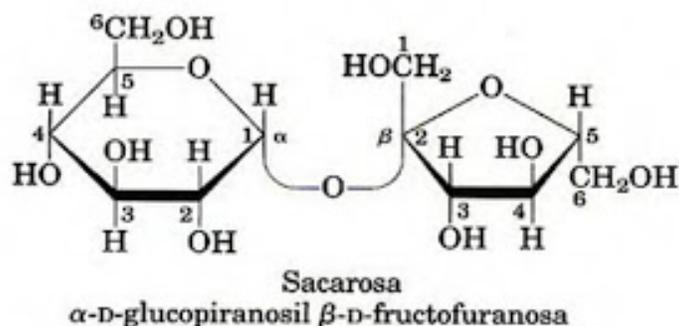


Figura 4. Estructura de una molécula de sacarosa (Lehninger, 1970).

La sacarosa es el azúcar de uso doméstico e industrial más común en el reino vegetal. La sacarosa se encuentra en todas las partes de la planta de la caña de azúcar donde se almacenan en las vacuolas de la célula, siendo más abundante en el tallo y menos abundante en las regiones de crecimiento activo, al revés de muchos oligosacáridos la sacarosa no contiene carbono anomérico libre (Lehninger, 1970).

2.6.2 Glucosa (dextrosa)

La glucosa es un monosacárido, tiene la fórmula $C_6H_{12}O_6$ con (peso molecular de 180.16 g/mol), es una aldohexosa y su estructura recibe el nombre de D-glucopiranososa porque al ciclarse forma un anillo de seis átomos uno de ellos de oxígeno, puede cristalizar en el agua tanto en la configuración α , como en la β y estas dos formas están en equilibrio en solución a temperaturas inferiores a $50^\circ C$, siendo la α -Dglucopiranososa la forma más estable. La glucosa anhidra forma cristales romboides que tienen un punto de fusión de $146^\circ C$, tienen una densidad de 1.544; una solución al 26% de glucosa tiene una densidad de 1.10643. El monohidrato de la glucosa $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, produce un cristal monocíclico esfenoidal, posee un extremo que se disuelve con mucha más rapidez que su forma anhidra, funde a $83^\circ C$. La glucosa es menos soluble en agua que la sacarosa; aún a $30^\circ C$, una solución saturada que contiene sólo un 57.6% de glucosa es soluble en metanol e insoluble en éter (Chen, 1996).

2.6.3 Fructosa

Llamada también azúcar de frutas, la fructosa es más dulce que la sacarosa y la glucosa; de las tres es la menos abundante en la caña. A semejanza de la glucosa es más abundante en las partes en crecimiento de la planta y menos abundante en la parte inferior del tallo y las raíces. La fructosa disminuye con la maduración y puede ser imposible de detectar en algunas variedades de alta pureza en la madurez. Las moléculas de fructosa se polimerizan para

formar leván e insulina un producto de almacenamiento de ciertas plantas. La fórmula empírica de la fructosa es igual a la de la glucosa $C_6H_{12}O_6$ (peso molecular 180.16 g/mol) los cristales ortorrómbicos de la fructosa tiene una densidad de 1.598 y una solución al 26% en peso tiene una densidad de 1.1088. Los cristales funden a 105 °C. La fructosa es muy soluble en agua y ligeramente soluble en etanol. Una solución saturada a 20 °C contiene un 78.94% de este azúcar. Al igual que la glucosa, la fructosa es un azúcar reductor, pero posee un grupo cetona en lugar de aldehído con el oxígeno fijado en el carbono 2 en lugar de estar en el carbono 1. Su designación corriente de levulosa surgió de la actividad levógira de sus soluciones y la designación de este monosacárido es la forma D que se encuentra al igual que la glucosa en forma α y β , en forma de anillos de cinco átomos, uno de ellos de oxígeno (Murray *et al.* 2001).

2.7 Tipos de jugo (jugo primario)

El jugo primario es el jugo extraído por el primer molino, antes de comenzar la dilución por efecto de la inhibición. También se le conoce con el nombre de jugo crusher (Serrano 2006).

2.7.1 Jugo mezclado

Es el jugo absoluto mezclado con los jugos procedentes de los molinos y el agua de dilución (Serrano 2006).

2.8 Características físico-químicas de los jugos

2.8.1 Azúcares reductores

Algunos azúcares tienen la propiedad de oxidarse en presencia de agentes oxidantes suaves como el ion Fe^{+3} o Cu^{+2} . Esta característica radica en la presencia de un grupo carbonilo libre, se oxida y genera un grupo carboxilo. Por lo tanto, aquellos azúcares con un grupo carbonilo libre son llamados azúcares reductores y aquellos en los que el grupo carbonilo se encuentra combinado en unión glucosídica se conocen como azúcares no reductores. Entre los azúcares reductores más comunes se encuentra la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa que presentan un carbono libre en su estructura y pueden reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas (Serrano, 2006).

2.8.2 Pol

El término Pol es la abreviatura de la palabra polarización. Es la lectura en la escala de °Z del polarímetro (Engelke, 2002).

2.8.3 Brix

A los sólidos disueltos que se encuentran en el jugo tales como: sacarosa, reductores y no azúcares se les conoce con el nombre de °Brix y se expresa en porcentaje (Larraondo, 1995). Se determina por medio de aerómetro, refractómetro y por desecación.

2.8.4 Pureza

Es la relación en porcentaje que existe entre el Pol contenido y los sólidos totales disueltos en el jugo. Cuando los sólidos totales solubles se expresan en grados API, Brix, y/o en sólidos refractométricos o por desecación las purezas reciben los nombres de pureza aparente refractométrica y verdadera (Larraondo, 1995).

2.8.5 Dextranas

Las dextranas son polisacáridos de cadena lineal formada por unidades de α D glucosa, unida por enlace α 1, 6. No son verdaderos productos naturales, se descubrieron en la fabricación del azúcar al observar masas que obturaban los filtros. Se forman por fermentación de la sacarosa en presencia de bacterias, que tienen un contenido de enzima específica. Esta enzima rompe el enlace entre glucosa y fructosa de la sacarosa, uniéndose la glucosa, polimerizándola y dando dextranas (Figura 5) (Larraondo, 1995). Las dextranas que se obtienen por fermentación de la sacarosa son de peso molecular mayor de 75000, 40000 y 10000 Da. Las dextranas exhiben un poder rotatorio mucho mayor que la sacarosa.

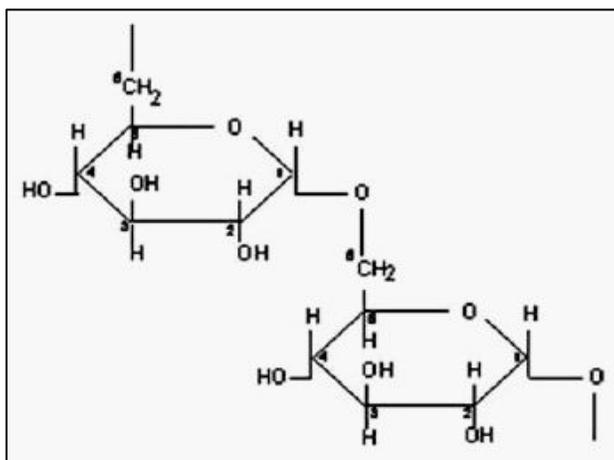


Figura 5. Estructura de una dextrana (Larraondo, 1995).

2.9 Pérdidas de sacarosa

En las fábricas de azúcar se presentan pérdidas que son definidas dependiendo del esquema de operación, realizando balances que incluyen la cuantificación de la sacarosa según las características físico-químicas de los jugos y productos intermedios del proceso. Teniendo en cuenta la sacarosa que ingresa en la caña, la presente en el bagazo, en la melaza final, en los efluentes, y el azúcar final obtenido, estos balances muestran un porcentaje de azúcar que se pierde en el proceso y que se conoce como “pérdidas indeterminadas” (Broadfoot, 2001).

2.9.1 Pérdidas indeterminadas

2.9.1.1 Perdidas físicas

En el lapso en que la caña va desde el campo hasta el ingenio, las pérdidas de sacarosa por inversión de la molécula en sus azúcares reductores se dan por causas físicas, químicas y microbiológicas. Las causas físicas incluyen pérdidas directas debidas a las pobres técnicas de corte de la caña (corte no al ras), almacenamiento y o transporte (caída de tallos durante el acarreo), dispersión, pérdidas de sacarosa en aguas y productos residuales y absorbentes (Clarke, 1996).

2.9.1.2 Perdidas químicas

Las pérdidas por la descomposición química incluyen la descomposición térmica, la acidez del jugo y la presencia de la enzima invertasa (Anónimo, 1993; Clarke, 1996). El jugo tiene una acidez natural que es neutralizada pocos minutos después de la extracción, disminuyendo la incidencia de este factor en la inversión de la molécula, y por lo general se mantiene a temperatura ambiente durante el proceso de extracción, lo que indica que cuando estos factores se mantienen en valores óptimos aseguran una inversión mínima (Anónimo, 1993). La enzima invertasa (β -D fructofuranósido fructohidrolasa, E.C 3.2.1.26 o β -fructofuranosidasa) en el jugo de caña tiene 2 orígenes: la caña de azúcar y la actividad microbiológica. La caña de azúcar sintetiza y cataboliza la sacarosa mediante esta enzima, para obtener la energía necesaria para sus funciones fisiológicas y la producción enzimática la enzima varía de acuerdo a los requerimientos nutricionales y el tiempo entre corte (cosecha) y molienda. La planta produce 2 tipos de enzima diferentes: una es más activa bajo condiciones ácidas y está presente en células inmaduras como las del cogollo, mientras que la otra es más activa en condiciones normales y se encuentra en tejidos maduros; sin embargo,

esta actividad enzimática se da en pequeña proporción por lo cual las pérdidas atribuidas a este factor son poco significativas (Pulido y Ferrer, 1977).

2.9.1.3 Pérdidas microbiológicas

El deterioro microbiológico causa entonces la mayoría de las pérdidas por inversión, disminuyendo la producción de azúcar blanca y aumentando la producción de melazas; los microorganismos encuentran en la sacarosa un buen sustrato para su crecimiento y excretan la enzima invertasa (Anónimo, 1993; Hollaus, 1978; Van der Poel *et al.*, 1998).

3.0 Contaminación microbiológica

Desde el momento que se corta la caña hasta que se clarifica el jugo extraído a altas temperaturas, la sacarosa está expuesta a la acción enzimática de una multitud de microorganismos que pueden provenir del suelo adheridos a tallos y hojas de la caña, o del aire contaminante y que se ven favorecidos por factores como la quema, corte, condiciones de temperatura, humedad alta y tiempos entre corte y molienda (Cerutti de Guglielmo *et al.*, 2000; Van der Poel *et al.* 1998). Cuando la caña entra en el molino, sus jugos circulan a través de los mismos y se contaminan con los microorganismos que se encuentran adheridos a las superficies de concreto y metal; sin embargo, la presencia de éstos en cualquier azúcar particular o producto intermedio de su fabricación no significa necesariamente que se estén produciendo cambios perjudiciales, ni tendrán significado desde el punto de vista económico, a menos que factores del medio, como temperatura, agua, O₂ y elementos nutritivos sean favorables para un incremento en la población (Anónimo, 1993; Honig, 1969).

Entre los microorganismos, que encuentran el medio ideal para su crecimiento en el jugo de caña, se han identificado 3 grupos principales de bacterias, aquellas productoras de exopolisacáridos donde se encuentra *Leuconostoc* sp; las aerobias espora-formadoras, como *Bacillus* sp, y aerobios no espora-formadoras como *Escherichia coli*. Las levaduras son igualmente importantes, sobre todo las osmofílicas capaces de desarrollarse en medios muy concentrados por su resistencia a elevadas presiones osmóticas, como las mieles y el azúcar; también se encuentran en menor proporción ciertas especies de mohos (Duarte y Polanco, 1982; Honig, 1969; Van der Poel *et al.* 1998). Las principales especies de microorganismos identificados en caña de azúcar y sus jugos son:

- Bacterias: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Escherichia coli*,

Enterobacter aerogenes, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Corynebacterium* sp., *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus fragilis* y *Clostridium* sp. En este grupo se destacan los bacilos que tienen la capacidad de formar endosporas y sobrevivir cuando las condiciones del medio no son favorables, y son importantes productores de levanos y otros heteropolisacáridos. Skole *et al.* (1977), reconocieron 2 vías de degradación de sacarosa por especies de *Bacillus*: las que forman levano y azúcares reductores y las que forman ácidos (Honig, 1969; Hernández y Duval, 1978).

- Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. rouxii*, *S. pombe*, *Candida tropicalis*, *C. mycoderma*, *C. intermedia*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia farinosa* *P membranofaciens*, *Kluyveromyces fragilis* y *Hansenula anomala*.
- Mohos: *Penicillium citrovorus*, *P. funiculosum*, *Aspergillus variatum*, *A. niger*, *Trichoderma viride* y *Monilia sitophila* (Sais, 1977; Duarte y Polanco, 1982; Tallgren *et al.*, 1999).

Este gran número de especies demuestra la diversidad de la microflora presente en los jugos de caña; sin embargo, hay algunas especies que se desarrollan en el jugo con más frecuencia que otras y que por lo tanto, adquieren una gran importancia económica al consumir la sacarosa con su ingreso en fábrica y formar exopolisacáridos. Entre ellas encontramos especies de *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum*, y miembros de bacterias coliformes, tales como *Enterobacter amnigenus*, *Rahnella* sp. y *E. aerogenes*, siendo la primera de mayor incidencia en los ingenios azucareros, aunque la última se ha encontrado frecuentemente en estudios de microflora asociados con la caña de azúcar (Duarte *et al.*, 1982; Pulido y Ferrer, 1977; Tallgren *et al.*, 1999).

3.1 Microorganismos de interés (bacterias ácido-lácticas, BAL)

En la caña de azúcar es posible encontrar una amplia diversidad microbiana, siendo comunes las bacterias productoras de ácido láctico a partir de la fermentación de la sacarosa, también llamadas bacterias ácido-lácticas. Dentro de este grupo, los géneros más comunes son: Lactobacilos, *Leuconostoc* y *Peiococcus*, que se encuentran en la superficie de las tinas (clarificador) donde cae la melaza o costra de sacarosa o por el contrario venir inmersas en el jugo de caña después de la molienda, suministrando un medio de crecimiento ideal para algunas de estas bacterias presentes en el jugo. *Leuconostoc* sp, es responsable de una disminución significativa en la producción de azúcar y etanol debido a los procesos de

fermentación de la sacarosa, con pérdidas cercanas al 20% del total producido (Cuervo *et al.*, 2010).

3.2 *Leuconostoc mesenteroides*

Las especies de *Leuconostoc*, especialmente *L. mesenteroides* está presente en el proceso de obtención de azúcar en el ingenio azucarero. Esta especie particular de bacteria es capaz de crecer muy rápidamente en las condiciones favorables que existen habitualmente en el jugo de caña antes del encalado y del calentamiento (Figura 6). *Leuconostoc* produce en el jugo de caña grandes cantidades de dextrana. En este sentido la dextrana disuelta en el jugo ocasiona mayor valor en sacarosa aparente (Pol) del que debiera obtenerse (Cuervo *et al.*, 2010).



Figura 6. Morfología de *Leuconostoc mesenteroides* (Cuervo *et al.* 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

En la caña de azúcar es posible encontrar una amplia diversidad microbiana, siendo comunes las bacterias productoras de ácido láctico a partir de la fermentación de la sacarosa, también llamadas bacterias ácido-lácticas. En este proyecto se propuso conocer el deterioro que presenta la caña de azúcar por el manejo de la materia prima desde su cosecha hasta la obtención del jugo en los molinos en fábrica, debido a la inversión de la sacarosa por bacterias ácido lácticas ocasionando pérdidas de 1 a 2 puntos o más en el contenido de sacarosa.

Algunos microorganismos ácido-lácticos degradan la sacarosa para la formación de dextranos. Dichos dextranos están presentes por el metabolismo de los microorganismos degradadores que metabolizan la sacarosa de los tallos de la caña de azúcar que son trasladados al ingenio en contenedores de los camiones, y detenidos por muchas horas a temperaturas por arriba de los 35 °C, previo a su descarga en el batey. Durante este tiempo se pueden tener pérdidas significativas de contenido de sacarosa de entre 1 – 5% por hectárea. El ingenio El Potrero, Ver., en este ciclo de cosecha (2016) obtuvo 124 Kg de azúcar pagando \$692.04 por tonelada de caña. Sabiendo que la pérdida por inversión de la sacarosa es del 5% se pueden estimar en 421.6 Kg de sacarosa/ha (\$2,347.05). Para comprobar que en este tiempo la actividad bacteriana reduce la calidad del jugo de la caña de azúcar, se caracterizó dicho jugo en una cinética de crecimiento bacteriano sobre tres tipos tallo de caña de azúcar determinando el contenido de sacarosa. Esto permitirá proponer una innovación factible y de bajo costo redituando en mejores ganancias por el buen manejo de la materia prima.

IV. HIPÓTESIS

Las actividades microbianas de las bacterias ácido lácticas afectan la calidad del jugo obtenido de los tallos de caña de azúcar verde, quemados y de batey resultando una disminución en el contenido de sacarosa y una reducción en el rendimiento.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las bacterias ácido lácticas afectan la calidad del jugo obtenido del tallo de la caña de azúcar?

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Demostrar el efecto que ocasionan las bacterias ácido-lácticas presentes en el tallo sobre el contenido de sacarosa del jugo de la caña de azúcar.

6.2 Objetivos Particulares

1. Aislar y caracterizar los microorganismos presentes en los tallos en verde, quemados y de batey a diferentes tiempos de confinamiento.
2. Realizar una cinética de crecimiento de los microorganismos aislados correlacionando la población bacteriana con la calidad del jugo obtenido de los tallos en verde, quemado y de batey de las muestras seleccionadas.
3. Realizar una propuesta de manejo de los tallos de caña en crudo, quemados y en batey en puntos críticos de control.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Lugar de muestreo

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada del Colegio de Postgraduados campus Córdoba y en la MAP centro. Para el estudio fue utilizada una parcela correspondiente al municipio de Cuitláhuac, Veracruz perteneciente a la zona de abasto del Ingenio El Potrero. Fue seleccionada debido a que se encontraba en labores de cosecha. La toma de muestras (tallos) se realizó en nueve puntos localizados en forma de “X” de donde se tomaron diez tallos por cada punto con un total de 90 tallos colectados. Se realizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos, dos secciones de tallo, y cinco horas.

Tratamiento 1.- Verde con corteza (VCC).	Sección 1.- Entrenudo 0-5	Horas: 0, 12, 24, 30, 36.
Tratamiento 2.- Verde sin corteza (VSC).	Sección 2.- Entrenudo 6-10	
Tratamiento 3.- Quema con corteza (QCC).		
Tratamiento 4.- Quema sin corteza (QSC).		
Tratamiento 5.- Batey con corteza (BCC).		
Tratamiento 6.- Batey sin corteza (BSC).		

7.1.2 Toma de muestra en el laboratorio del Colegio de Postgraduados

Los tallo de cada tratamiento (verde, quema y batey) fueron almacenados en cinco pilas en un área a una temperatura controlada de 37°C y de estos se realizaron muestreos en cinco tiempos distintos (0, 12, 24, 30 y 36 horas). Adicional a esto los tallos fueron procesados de acuerdo a los tiempos establecidos y se molieron con dos subtratamientos: tallos sin corteza exponiendo las fibras para la extracción de los jugos y tallos completos, además de la separación de dos secciones de los tallos en cuestión: sección 1(entrenudo cero al entrenudo cinco), sección 2(entrenudo seis al entrenudo diez). La molienda para la extracción del jugo

consistió en colocar las secciones de tallos por separado en un trapiche marca GUMADI®, sanitizando entre cada una de las moliendas de acuerdo a los tratamientos antes mencionados.

7.2 Unidad de muestreo

Se tomaron 700 mL de jugo de cada muestra para sus respectivos análisis.

7.3 Variables de respuesta y unidades de medida

1. Carga microbiana UFC/mL
2. Pureza %
3. Brix (%)
4. Sacarosa (%)
5. Azúcares reductores (%)

7.4 Carga microbiana

Las muestras se diluyeron en Tween 20® al 0.03% en diluciones seriadas base 10 hasta 10^{-4} , se sembró 0.1 mL de la dilución 10^{-2} y 10^{-4} (Figura 7), por cuádruplicado en placas con agar nutritivo (AN), agar papa (PDA) y medio Mayeux en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar, se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas en una incubadora Blinder®, después de transcurrido el tiempo se realizaron los conteos de UFC (Cerutti *et al.*, 2000).

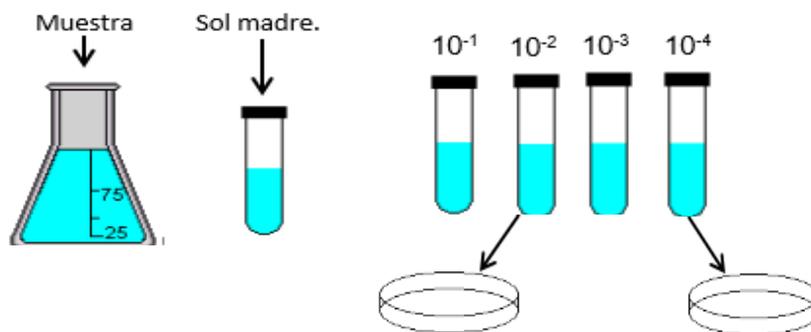


Figura 7. Preparación de diluciones (Foto de González, 2016).

Se identificaron de manera visual las colonias presentes en cada caja, se contaron sólo aquellas cajas que contenían de 25 a 250 colonias (Cerutti *et al.* 2000) por lo que las cajas que se seleccionaron fueron las de la dilución 10^{-4} (Figura 8).

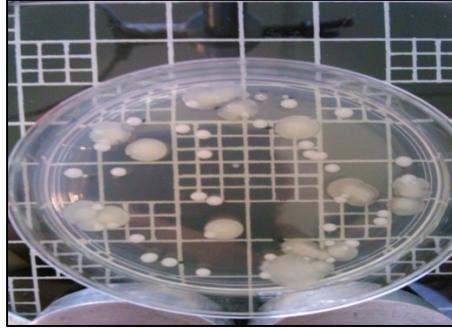


Figura 8. Conteo de colonias (UFC) (Foto de González, 2016).

Para el cálculo de UFC se usó la siguiente ecuación (Cerutti *et al.* 2000):

$$\text{UFC} = (\text{NC} * 1 / \text{FD} * 1 / \text{V})$$

Dónde:

UFC = Unidades formadoras de colonias

NC = Número de colonias en cada caja

FD = Factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inoculara la caja.

V= Volumen inoculado en la caja.

7.4.1 Aislamiento y purificación de microorganismos

Se analizaron colonias de distinta morfología de los diferentes tratamientos y medios de cultivo y cada colonia fue sembrada en forma individual con un asa bacteriológica estéril para tener colonias separadas de una sola especie bacteriana (Poinar y Thomas, 1978). Posteriormente se realizó la prueba de medios específicos para coliformes y para *Leuconostoc* (cuadro 2). Se realizaron pruebas bioquímicas a todas las colonias que no crecieron en medio de cultivo específico para coliformes, estas pruebas se hicieron conforme al manual de Bergey modificado por Cuervo *et al.* (2010).

Tabla 2. Pruebas bioquímicas para selección de *Leuconostoc mesenteroides* (Cuervo *et al.*, 2010).

Morfología celular	Tinción de Gram	Coloración de capsula	Agrupación	Formación de dextrana
Hidrolisis de almidón	Caldo glucosa 5%	Degradación de citratos (%)	Catalasa	Oxidasa
Movilidad	Crecimiento a 15 °, 37 °, 40 ° y 50 °C	Crecimiento en 3, 6.5 y 10 % de NaCl	Crecimiento en Agar nutritivo	Crecimiento en Mayeux
Crecimiento en Hipersacarosa				

7.5 Pruebas físico-químicas

7.5.1 Determinación de grados brix, pureza (%) y sacarosa (%)

Se colocaron 100 mL de muestra de jugo en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se le agrego 0.5g de sub-acetato de plomo, se hizo el filtrado de la muestra colocando un papel filtro sobre un vaso de precipitado, una vez lista la muestra se pesaron en un matraz aforado de 100 mL 26 gramos de jugo filtrado y se aforo, después esta muestra se colocó en el polarímetro para la obtención de los datos de acuerdo a la (NMX-F-271-1991). Se limpió con agua destilada el polarímetro una vez tomado la lectura. Por cada muestra se realizaron tres repeticiones.

7.5.2 Determinación de azúcares reductores

Del jugo extraído, se separaron 100 mL en 3 matraces Erlenmeyer de 125 mL, por cada 100 mL de jugo se le agregaron 0.5 g de oxalato de sodio, se realizó el filtrado de jugo colocando un papel filtro sobre cada vaso de precipitado. Mientras el filtrado finalizaba, se tomaron otros 3 matraces Erlenmeyer agregando 5 mL de Felhing® A y 5 mL de Felhing B®, a estos se le agregaron 20 mL de agua destilada, se colocaron los matraces con la solución Felhing® en la parrilla Barnstead® hasta empezar a ebullición, una vez empezada la ebullición se agregaron 2 gotas de azul de metileno, donde previamente se colocaron 50 mL de jugo filtrado en una bureta para titulación, esto se realizó hasta conseguir el cambio de color a rojo ladrillo, y en ese momento por el vire de color se detuvo la titulación. El volumen del jugo utilizado en la bureta fue tomado para la aplicación de la fórmula correspondiente (NMX-F-312-1978).

Azúcares reductores (%) = Factor Felhing / Gasto * Peso específico * 1000

VIII. RESULTADOS

8.1 Población de microorganismos

Se obtuvieron dos grupos de microorganismos, un grupo con coliformes entre los que destacaron *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, esto se corroboró mediante la siembra en medios de cultivo diferenciales (figura 9), y el segundo grupo de bacterias degradadoras de sacarosa. Lo anterior, se puede observar con el incremento de las coliformes y de manera simultánea a decaer los degradadores de sacarosa y viceversa. También, dentro de los tratamientos se encontró que los aislamientos obtenidos de los tallos el crecimiento bacteriano fue distinto, debido a que algunos microorganismos fueron capaces de adaptarse a altas temperaturas, otros a humedad elevada y algunos más requirieron tener el alimento disponible.

Se muestra la comparación de crecimiento de microorganismos entre tallos verdes con corteza (VCC) y tallos verdes sin corteza (VSC) (figura 10), se observó que el aumento de bacterias degradadoras de sacarosa se presentó en la parte basal del tallo que corresponde al entrenudo 0-5, en el caso de VCC los tallos tuvieron presencia de degradadoras de sacarosa del orden 6.19×10^6 UFC/mL a las 36 horas y en el caso de VSC a la misma hora fue de 1.79×10^5 UFC/mL. De igual manera, en el mismo tratamiento a las 36 horas y entrenudo 0 - 5, la presencia de coliformes en los tallos VCC fue de 6.18×10^5 UFC/ml y VSC de 1×10^5 UFC/mL.



Figura 9. Siembra en medios diferenciales, colonias verdes *E. coli*, colonias lilas *Klebsiella* y colonias rosa suave *Salmonella*.

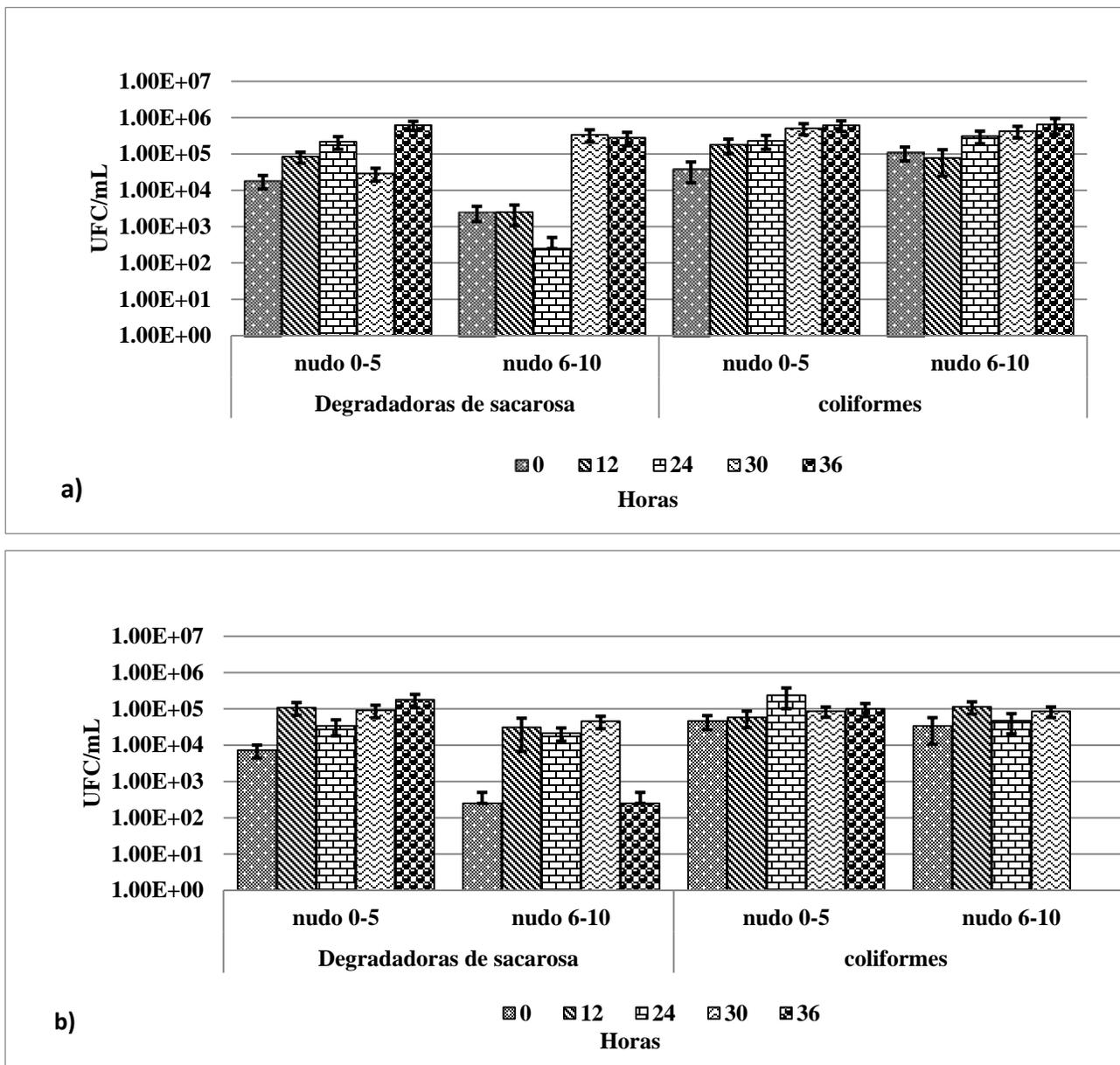


Figura 10. Comparación de crecimiento entre tallos verdes con corteza (VCC) y tallos verdes sin corteza (VSC). **a)** microorganismos presentes en VCC de bacterias degradadoras de sacarosa con 6.19×10^6 UFC/mL en el entrenudo 0-5 a las 36 horas. **b)** microorganismos presentes en VSC de bacterias degradadoras de sacarosa en la sección 0-5 con 1.79×10^5 UFC/mL a las 36 horas.

Por otra parte, se realizó un comparativo entre los tallos quemados con corteza (QCC) y tallos quemados sin corteza (QSC) (figura 11) donde se observó que el mayor crecimiento de microorganismos degradadores de sacarosa fue de 4.02×10^6 UFC/mL en los tallos QCC y en los tallos QSC de 1.09×10^5 UFC/mL del entrenudo 0-5 a las 36 horas. De acuerdo a lo

anterior, la presencia de coliformes en los tallos QCC fue de 6.84×10^5 UFC/ml y QSC de 1.43×10^5 UFC/mL.

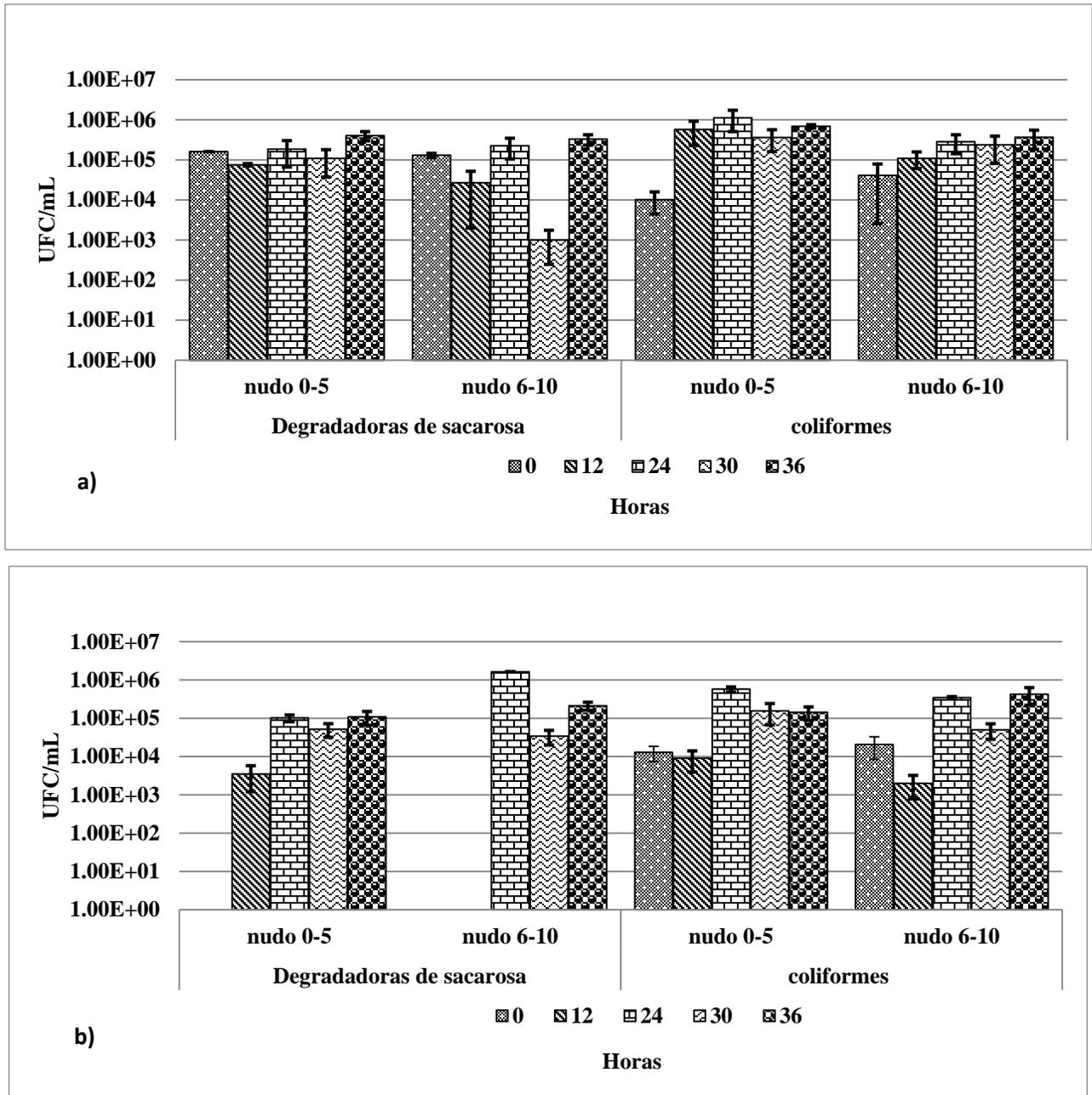


Figura 11. Comparativo entre los tallos quemados con corteza (QCC) y tallos quemados sin corteza (QSC). **a)** bacterias encontradas en QCC con un mayor número de degradadores de sacarosa en el entrenudo 0-5 a las 36 horas con un valor de 4.02×10^6 UFC/mL. **b)** bacterias presentes en los tallos QSC donde el incremento se presentó en el entrenudo 0-5 con 1.09×10^5 UFC/mL a las 36 horas.

Los microorganismos del jugo de los tallos de batey fueron aislados a partir de la hora de descarga, estos se obtuvieron a partir de las 24 horas. Este tratamiento tuvo un incremento mayor en los tallos BSC específicamente para la sección del entrenudo 0-5 y a las 30 horas (4.10×10^6 UFC/mL) (figura 12), en cambio los BCC a las 30 horas de la misma sección tuvieron presencia de degradadores de sacarosa de 1.4×10^6 UFC/mL. De igual manera, en el mismo tratamiento a las 30 horas y entrenudo 0 - 5, la presencia de coliformes en los tallos BSC fue de 1.39×10^6 UFC/ml y BCC de 2.06×10^6 UFC/mL. Esto debido a que se mantienen incubando por estar almacenados los tallos quemados y con la pulpa expuesta dentro del camión durante tantas horas a una temperatura y humedad constante (Discusión). Por lo tanto, los microorganismos tienen las condiciones idóneas para alimentarse y el deterioro del contenido del tallo es mayor.

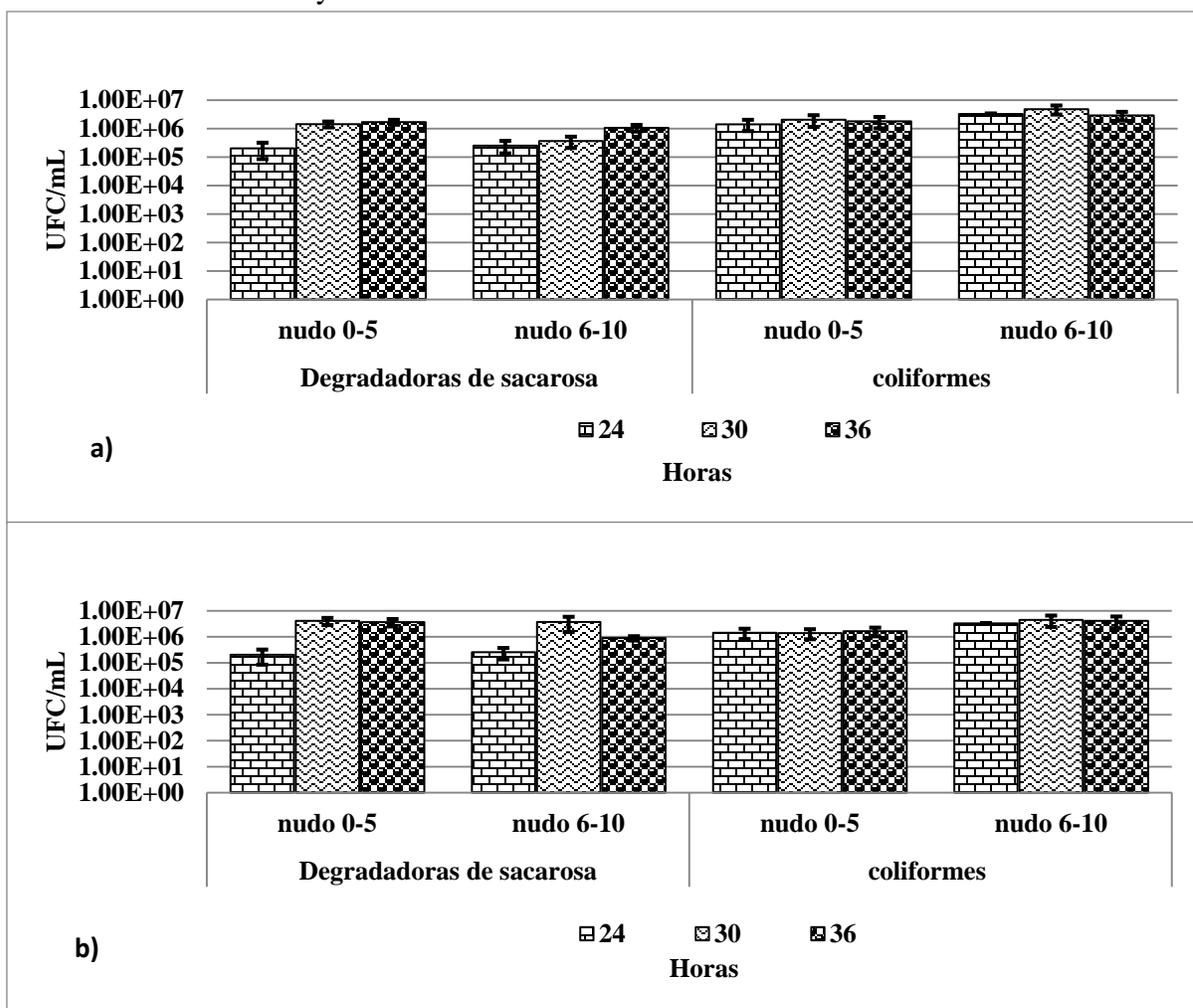


Figura 12. Presencia de microorganismos aislados del jugo de los tallos de batey a) la mayor presencia de bacterias degradadoras de sacarosa 1.44×10^6 UFC/mL se observó en la parte basal del tallo a las 36 horas BCC. b) mayor concentración de bacterias degradadoras de sacarosa encontradas a las 30 horas en el entrenudo 0-5 con un valor de 4.10×10^6 UFC/ml BSC.

8.2 Análisis fisicoquímicos

La determinación de las características fisicoquímicas de los jugos permitió establecer un comparativo del comportamiento de los parámetros como la caída de pureza, el incremento de azúcares reductores y la caída de sacarosa, con relación a cada uno de los tratamientos que fueron sometidos los tallos.

8.2.1 Azúcares reductores

Se observó un comparativo entre los porcentajes de azúcares reductores de los jugos correspondientes a los tallos VCC y tallos VSC (Figura 13), en donde se aprecia que los azúcares reductores presentó mayor cantidad en el entrenado 6 - 10 en tallos VCC (1.10% a las 30 horas), y conforme pasó el tiempo; los azúcares reductores empezaron aparecer en el entrenado 0 – 5 (0.74% a las 30 horas) donde al paso de las horas la presencia de bacterias se incrementó y al paso del tiempo se expresó la degradación de sacarosa y la formación de otros azúcares, por el contrario los tallos VSC se comportaron de manera semejante a los mismos tiempos y sin diferencias significantes en entrenados con la presencia de azúcares reductores con 0.49% como punto máximo a las 30 horas.

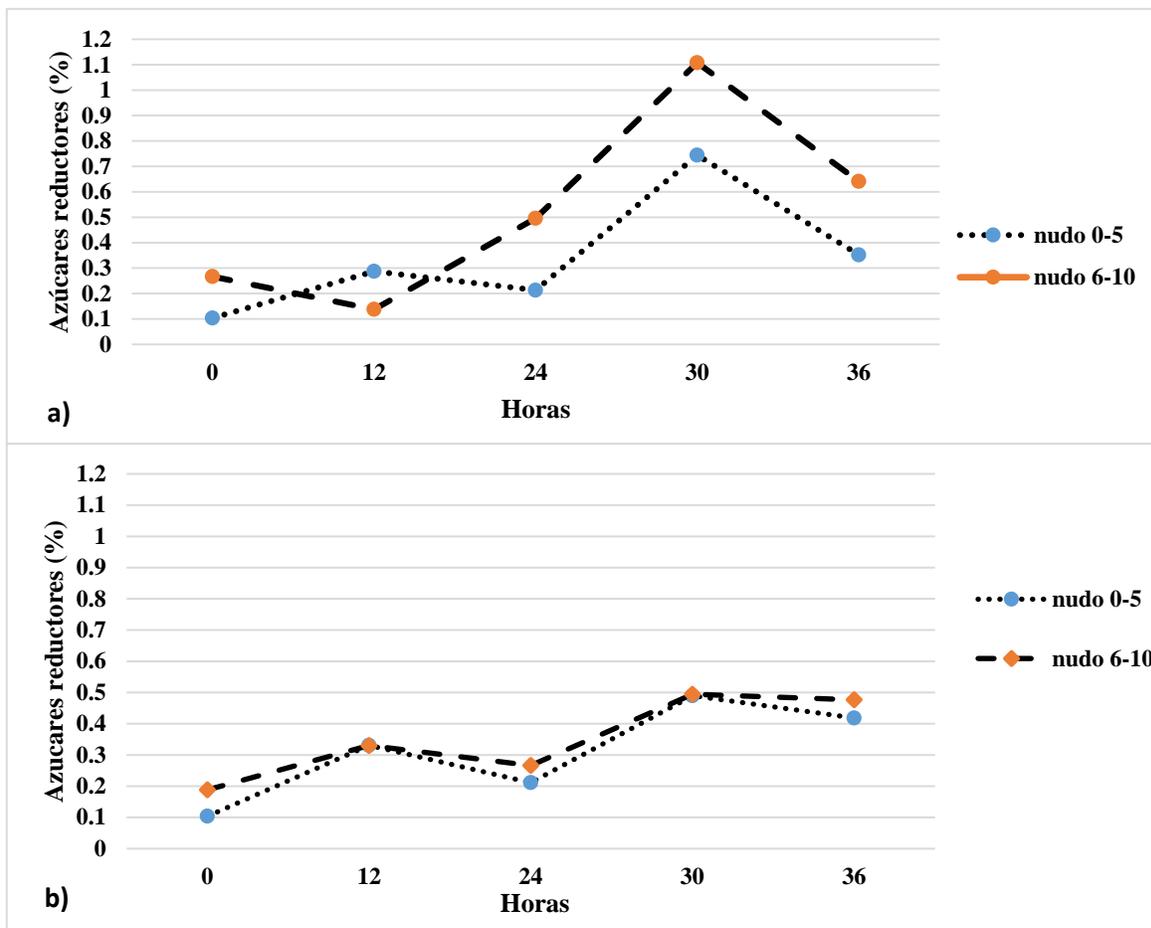


Figura 13. Comparativo entre los porcentajes de azúcares reductores de los jugos correspondientes a los tallos verdes con corteza (VCC) y tallos verdes sin corteza (VSC) a) mayor porcentaje de azúcares reductores presentes en VCC en el entrenado 6-10 a las 30 horas. b) En los tallos VSC se tiene menor presencia de azúcares.

Comparación entre los porcentajes de azúcares reductores que estuvieron presentes en el tratamiento de tallos QCC y tallos QSC, donde se aprecia que desde la hora cero el entrenado 6-10 QCC tuvo mayor cantidad de azúcares reductores (0.61%) y en la misma hora con el nudo 0 – 5 fue de 0.27% (figura 14); y a la hora pico para ambos fue a las 30 horas con QCC (0.78%) nudos 6 – 10 y nudos 0 – 5 (0.63%). En cambio en ambos entrenados y tratamientos QSC se comportaron de manera semejante de principio a fin entre 0.18 (0 -5) a 0.33 (6 – 10) a las cero horas con un punto máximo a las 30 horas entre 0.67 (0 – 5) a 0.78 (6 – 10) (Figura 14).

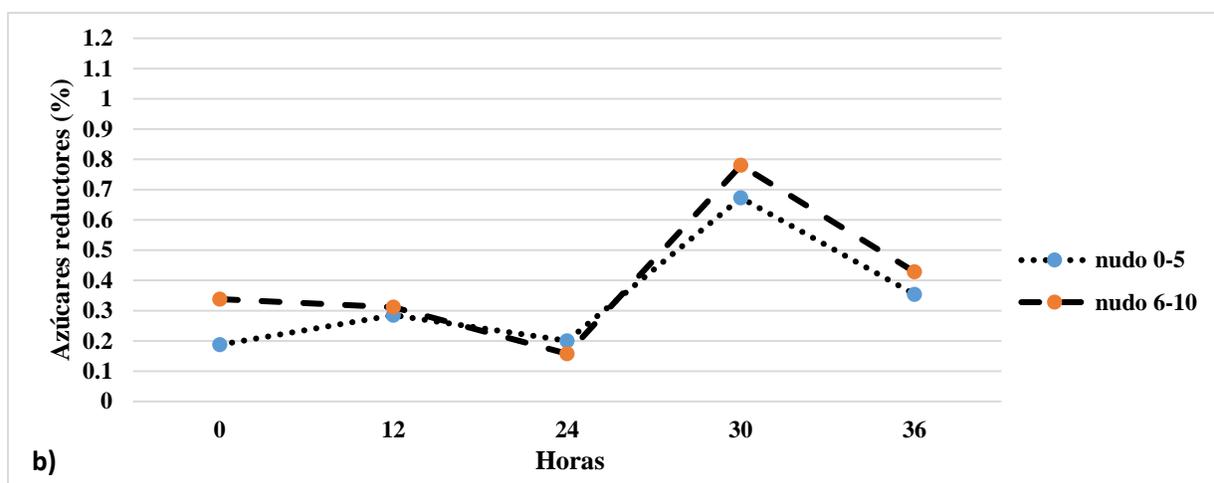
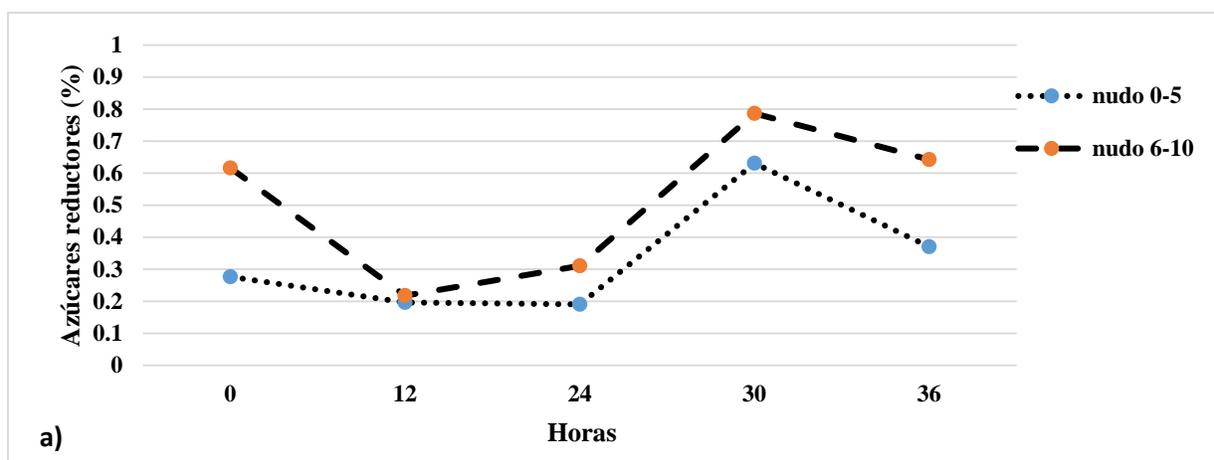


Figura 14. Comparación entre los porcentajes de azúcares reductores presentes en el tratamiento quema de tallos con corteza (QCC) y tallos sin corteza (QSC). **a)** Porcentaje de azúcares reductores correspondientes al tratamiento QCC, **b)** corresponde al porcentaje de los tallos QSC.

El análisis de azúcares reductores se realizó a las 24 horas para los tallos provenientes del batey, aun cuando estos fueron descargados en fábrica a las 20 horas después de ser cortados. Para este tratamiento ambos entrenados iniciaron prácticamente iguales, sin embargo el entrenado 6-10 descendió a las 30 horas (0.46%) para el caso de los tallos con corteza (BCC) y en este mismo tratamiento el entrenado 0-5, la tendencia desde las 24 horas fue ascendente con 0.11% hasta las 36 con 0.36% al observar la presencia de microorganismos y el posible deterioro de los tallos por presencia de reductores, a diferencia de los tallos sin corteza (BSC) estos entrenados tienen el mismo desarrollo de reductores no obstante el entrenado 6-10 fue ligeramente elevado en todas las horas (24 a 36 horas) (figura 15).

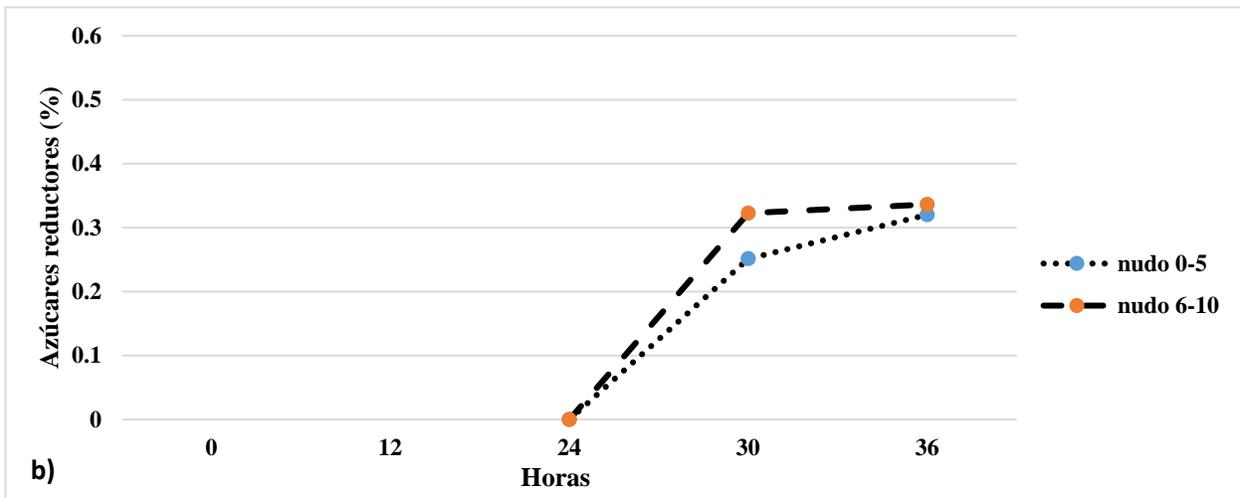
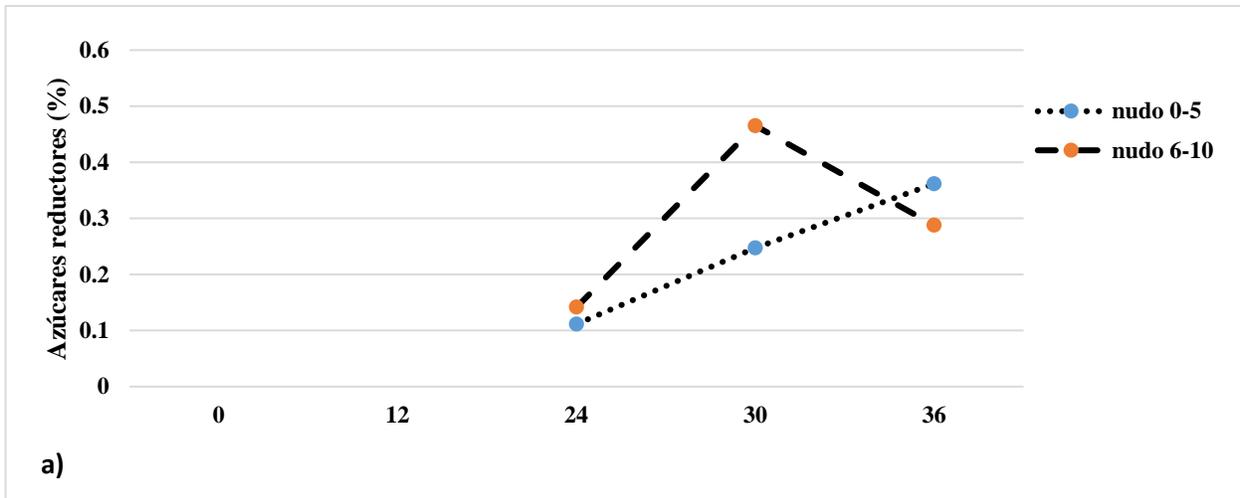


Figura 15. Comparativo de azúcares reductores presentes en tallos de batey con corteza (BCP) y tallos sin corteza (BSC). **a)** Porcentaje de azúcares reductores en tallos BCC, **b)** tallos BSP donde ambos entrenudos desarrollaron reductores de forma similar.

Se observan los valores correspondientes a los análisis de calidad del jugo, °Brix, % Pureza y % Sacarosa para los tallos en verde con corteza (VCC), verde sin corteza (VSC), quema con corteza (QCC) quema sin corteza (QSC), batey con corteza (BCC) y batey sin corteza ((BSC) (tabla 3) , los tallos de batey se analizaron a partir de las 24 horas que fue el tiempo en que llegaron las muestras al laboratorio del Colegio de Postgraduados. El porcentaje de sacarosa disminuyó en las muestras de batey como se observa en rojo en la tabla 3, esto se ocasionó por el aumento de microorganismos degradadores de sacarosa como se observó anteriormente.

Tabla 3. Valores de °Brix, Pureza (%) y Sacarosa (%) para todos los tratamientos.

Tratamiento	Prueba	Horas					
		Nudos	0	12	24	30	36
VCC	Brix	0-5	5.106	4.653	4.686	4.707	4.93
		6-10	2.783	4.886	5.007	4.573	3.117
	Pureza	0-5	15.68	14.263	14.71	14.41	12.113
		6-10	11.13	14.896	15.353	14.007	10.257
	Sacarosa	0-5	5.23	4.733	5.877	4.75	5.413
		6-10	0.216	4.936	5.087	4.643	5.01
VSC	Brix	0-5	4.92	4.536	4.99	7.603	0.14
		6-10	4.326	5.83	4.71	7.673	0.127
	Pureza	0-5	15.32	13.91	15.32	23.56	20.42
		6-10	13.24	18.133	14.346	23.807	20.377
	Sacarosa	0-5	5.006	4.606	4.0766	7.81	5.14
		6-10	4.386	5.716	4.7833	7.888	5.127

Continuación tabla 3. Valores de °Brix, Pureza (%) y Sacarosa (%) para todos los tratamientos:

Tratamiento	Prueba	Nudo	Horas				
			0	12	24	30	36
QCC	Brix	0-5	4.63	4.61	4.527	4.563	5.123
		6-10	4.56	3.636	6.437	4.087	4.95
	Pureza	0-5	14.21	14.126	13.77	15.73	13.97
		6-10	13.98	11.096	18.217	15.17	12.487
	Sacarosa	0-5	4.7	4.655	4.83	4.63	5.21
		6-10	4.66	3.683	6.583	4.14	5.03
QSC	Brix	0-5	4.83	4.313	4.743	0	1.0
		6-10	5.726	5.023	3.47	2.863	2.769
	Pureza	0-5	5.314	13.745	14.56	10	9.186
		6-10	18.07	13.957	10.587	8.61	6.76
	Sacarosa	0-5	4.59	4.563	4.56	3.02	4.71
		6-10	6.003	3.88	3.507	2.85	4
BCC	Brix	0-5	NP	NP	4.656	5.206	4.64
		6-10	NP	NP	0	0.206	4.847
	Pureza	0-5	NP	NP	14.796	11.1	14.21
		6-10	NP	NP	0	15.993	14.853
	Sacarosa	0-5	NP	NP	4.89	5.3	3.923
		6-10	NP	NP	0	0.096	3.71
BSC	Brix	0-5	NP	NP	0	9.843	4.509
		6-10	NP	NP	14	0.167	4.08
	Pureza	0-5	NP	NP	0	18.807	14.21
		6-10	NP	NP	4.63	16.883	10.03
	Sacarosa	0-5	NP	NP	4.6566	10.203	3.257
		6-10	NP	NP	0	0.167	3.005

8.3 Pruebas bioquímicas

Del total de microorganismos que crecieron en medio específico de sacarosa se realizó la separación por morfología bacteriana y se aisló un total de diez bacterias. A estas se les realizaron pruebas bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey modificado por Cuervo (2010), los resultados obtenidos demuestran que de los diez aislamientos siete dieron resultados distintos a lo descrito por Cuervo (2010) (tabla 4).

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para seleccionar a *L. mesenteroides*. Símbolos: **cb**- coco-bacilos, **c**- cocos, **b**-bacilos, **k**-cadenas, **r**-racimos,+ 90% o más de cepas son positivas, - 90% o más de cepas son negativas. Fuente: Cuervo (2010).

Pruebas	Microorganismo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Morfología Celular	cb	b	b	b	b	cb	cb	c	b	c
Coloración de Gram	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Coloración de Esporas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coloración de Capsula	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Agrupación	k	r	k	k	k	k	k	k	k	r
Formación de Dextrana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis del Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caldo glucosa 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradación de Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Crecimiento en:										
Agar Nutritivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipersacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mayeux	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:										
15°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en:										
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De acuerdo a las pruebas realizadas para seleccionar aislamientos de *Leuconostoc mesenteroides* se encontró que no necesita citrato como única fuente de energía, no presenta movilidad, es negativa para hidrolisis de almidón así mismo para catalasa y oxidasa, tiene crecimiento bajo en agar nutritivo pero alto desarrollo en medio hipersacarosado y en Mayeux en estos últimos hace la formación de gomas (figura 16), también tiene crecimiento positivo para NaCl 3% y desarrolla a temperaturas de 37 y 40 °C. Sin embargo, en las pruebas realizadas observamos que hay diferencia entre la estructura celular porque tenemos cinco aislamientos en forma de bacilos, dos pertenecen a cocos y tres a coco-bacilos donde esta última estructura es la referencia para identificar a *Leuconostoc* por lo que podemos decir que además de *Leuconostoc mesenteroides* están presentes otros microorganismos con capacidad para degradar sacarosa de tallos de caña de azúcar.



Figura 16. Formación de gomas característico de *Leuconostoc* en medio rico en sacarosa (Foto de González, 2016).

8.4 Análisis Estadístico

Para el análisis el modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + N_j + H_k + (T * N)_{ij} + (T * H)_{jk} + (T * N * H)_{ijk} + e_{ijkl}$$
$$i = 1, \dots, 6; j = 1, 2; k = 1, 2, 3$$

Donde Y_{ijk} corresponde a las variables respuesta UFC, Pol, Azúcares reductores y Pureza; μ es la media general, T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento, N_j es el efecto del j -ésimo nudo, H_k es el efecto del k -ésimo tiempo, $(T*N)_{ij}$ es el efecto de la interacción tratamiento y nudo, $(T*H)_{jk}$ es el efecto de la interacción del tratamiento y hora, $(T*N*H)_{ijk}$ es el efecto de la interacción del tratamiento, nudo y hora y e_{ijkl} corresponde al error experimental con $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$.

Cada una de las variables respuesta fueron analizadas bajo el diseño experimental antes mencionado usando el procedimiento mixto (Proc Mixed) de SAS (Statistical Analysis System version 9.3), utilizando la prueba de Tukey para la comparación de medias.

Adicionalmente se realizó un análisis de correlación de Pearson para conocer el grado de asociación entre las variables UFC y la calidad del jugo.

En la tabla 5 se muestran las medias de la interacción entre los efectos tratamientos, nudos y horas, para las variables UFC y Pol que resultaron significativos ($\alpha = 0.05$)

Tabla 5. Medias de mínimos cuadrados para UFC y Pol (%).

Medias de mínimos cuadrados para UFC							
Efecto	trt	nudos	horas	Estimador	Error estándar	Pr > t 	Alfa
trt*nudos*horas	t1	0	36	358000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	0	24	433500	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	0	36	888000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	6	24	255000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	6	36	564000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t3	0	24	204000	58751	0.0007	0.05
trt*nudos*horas	t4	0	36	553000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	6	36	455000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	0	30	848500	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	0	24	207000	58751	0.0006	0.05
trt*nudos*horas	t5	0	36	1054500	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	6	30	1225000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	6	36	959000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	0	30	1225000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	0	36	959000	58751	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	6	36	899000	58751	<.0001	0.05

Medias de mínimos cuadrados para Pol							
Efecto	trt	nudos	horas	Estimador	Error estándar	Pr > t 	Alfa
trt*nudos*horas	t1	0	24	5.0767	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t1	0	30	7.81	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t1	6	24	4.7833	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t1	6	30	7.888	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	0	24	4.8767	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	0	30	4.75	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	0	36	5.01	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	6	24	5.0867	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t2	6	30	4.6433	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t3	0	24	4.8233	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t3	6	24	3.5067	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t3	6	30	2.85	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	0	24	4.56	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	0	30	4.63	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	0	36	5.21	0.2079	<.0001	0.05

trt*nudos*horas	t4	6	24	6.5833	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	6	30	4.14	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t4	6	36	5.03	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	0	30	10.2033	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	0	36	4.71	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t5	6	24	4.63	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	0	24	4.89	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	0	30	5.3	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	0	36	4.71	0.2079	<.0001	0.05
trt*nudos*horas	t6	6	36	4.9233	0.2079	<.0001	0.05

Por los resultados obtenidos se observó el efecto del tratamiento por cada variable a través de una comparación de medias con el método de Tukey-Kramer. El análisis se realizó con la función Proc Mixed del programa SAS®, se realizó a un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

En la tabla 6 se muestran los coeficientes de correlación entre las variables de las UFC correspondientes a las 24, 30 y 36 horas y los parámetros de calidad de jugo, donde observamos que entre más se acerquen los coeficientes de correlación a 1 o -1 mayor será el nivel de asociación entre las variables.

Tabla 6. Coeficiente de correlación Pearson en relación con tiempo de incubación a las 24,30 y 36 horas.

Coeficientes de correlación Pearson, N=36 Prob > r suponiendo H0: Rho=0 24 horas					
	UFC	Azucares-reductores	Pol	Brix	Pureza
UFC	1.00000	0.26248	0.12177	0.11327	0.13557
		0.122	0.4793	0.5107	0.4305
Azucares-reductores	0.26248	1.00000	0.4916	0.50254	0.4809
	0.122		0.0019	0.0018	0.003
Pol	0.12177	0.49916	1.00000	0.99919	0.99021
	0.4793	0.0019		<.0001	<.0001
Brix	0.11327	0.50254	0.99919	1.00000	0.98939
	0.5107	0.0018	<.0001		<.0001
Pureza	0.13557	0.4809	0.99021	0.98939	1.00000
	0.4305	0.003	<.0001	<0.0001	
30 horas					
UFC	1.00000	-0.67927	0.21744	0.2131	0.23268
		<.0001	0.2027	0.2121	0.172
Azucares-reductores	-0.67927	1.00000	-0.16981	-0.16044	-0.18452
	<.0001		0.33221	0.3499	0.2813
Pol	0.21744	-0.16981	1.00000	0.99984	0.99746
	0.2027	0.3221		<.0001	<.0001
Brix	0.2131	-0.16044	0.99984	1.00000	0.99719
	0.2121	0.3499	<.0001		<.0001
Pureza	0.23268	-0.18452	0.99746	0.99719	1.00000
	0.172	0.2813	<.0001	<.0001	
36 horas					
UFC	1.00000	-0.34445	0.554441	0.54758	0.54618
		0.0397	0.0005	0.0005	0.0006
Azucares-reductores	-0.34445	1.00000	-0.14774	-0.17176	-0.17239
	0.0397		0.3899	0.3165	0.3147

Pol	0.55441	-0.14774	1.00000	0.999	0.99888
	0.0005	0.3899		<.0001	<.0001
Brix	0.54758	-0.17176	0.999	1.00000	0.99998
	0.0005	0.3165	<.0001		<.0001
Pureza	0.54618	-0.17239	0.99888	0.99998	1.00000
	0.0006	0.3147	<.0001	<.0001	

De los datos que se obtuvieron en la correlación de Pearson entre las variables analizadas se validó la hipótesis nula, comparando el coeficiente de correlación con un nivel de confiabilidad del 99% ($\alpha=0.01$).

En la tabla 6 con rojo se destaca la correlación existente entre UFC y Pol (%) en cada una de las horas, como se aprecia existe una correlación entre las variables de 12% para 24 horas, 21% para 3° horas y drásticamente para 36 horas la correlación aumenta considerablemente en un 55.4% . con ello podemos decir que a pesar de que la correlación entre UFC y Pol para las horas 12y 24 no fue significativa, la presencia de microorganismos en relación a la disminución de Pol es existente como se observó para las 36 horas.

IX. DISCUSIONES

Respecto a los microorganismos que encontramos en los tallos coincidimos con los estudios realizados por Silliker (1980) que reportó aproximadamente 50 diferentes microorganismos de la caña verde y 17 de la superficie de la caña quemada, además de la especie productora de polisacáridos, *Leuconostoc mesenteroides*. Dentro de los aislamientos encontrados están los géneros de levaduras (*Saccharomyces*, *Torula* y *Pichia*) que también se encuentran en el jugo y no contienen invertasa, bacterias que causan una destrucción activa de los azúcares reductores como *Pseudomonas* y bacilos del suelo (*Bacillus cereus*); así como *Penicillium* y otros hongos (*Actinomicetes*) que causan fuerte inversión tanto en los jugos como en las meladuras y los que constituyen agentes más activos del deterioro de los azúcares crudos. En nuestro caso encontramos a coliformes del tipo de *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* con una población de los tratamientos en verde, VCC entrenado 0 – 5 de 6.18×10^5 UFC/mL y el entrenado 6 – 10 6.48×10^5 UFC/mL y en VSC entrenado 0 – 5 con 2.38×10^5 UFC/mL y en el entrenado 6 – 10 1.14×10^5 UFC/mL; en el caso de los tallos quemados QCC (0 – 5) con 1.12×10^6 UFC/mL y QCC (6 – 10) con 2.83×10^5 UFC/mL y en el caso QSC (0 – 5) con 5.74×10^5 UFC/mL y QSC (6 – 10) con 4.24×10^5 UFC/mL y finalmente para tallos en batey, BCC (0 – 5) con 2.06×10^6 UFC/mL y BCC (6 – 10) con 4.28×10^6 UFC/mL y BSC (0 – 5) 1.65×10^6 UFC/mL y BSC (6 – 10) con 4.48×10^6 UFC/mL, lo anterior tomando los valores máximos de UFC/mL del conjunto de coliformes presentes. En cambio, para el caso de las bacterias degradadoras de sacarosa se observó que los tratamientos en verde, VCC (0 – 5) con 6.19×10^5 UFC/mL y VCC (6 – 10) con 3.37×10^5 UFC/mL y en VSC (0 – 5) con 1.79×10^5 UFC/mL y VSC (6 – 10) con 4.54×10^4 UFC/mL; en el caso de los tallos quemados QCC (0 – 5) con 4.02×10^5 UFC/mL y QCC (6 – 10) con 3.28×10^5 UFC/mL y en el caso QSC (0 – 5) con 1.09×10^5 UFC/mL y QSC (6 – 10) con 1.64×10^5 UFC/mL y finalmente para los tallos en batey, BCC (0 – 5) con 1.71×10^6 UFC/mL y BCC (6 – 10) con 1.08×10^6 UFC/mL y BSC (0 – 5) 4.10×10^6 UFC/mL y BSC (6 – 10) con 3.72×10^6 UFC/mL; lo anterior tomado los valores máximos del conjunto de bacterias degradadoras de sacarosa. Dentro de las degradadoras de sacarosa encontramos de manera coincidente con otros autores a la bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, entre otras por definir como posibles endófitos (Watt y Cramer, 2009) y saprofitos.

Cabe destacar que los organismos presentes en la caña de azúcar serán tan diversos como el contacto del cultivo lo permita o la propia biodiversidad de microorganismos (microbiota) del suelo este presente debido al manejo agronómico del cultivo, que en ocasiones estas labores limitan la diversidad de microorganismos (Pisa *et al.*, 2011; Chandrashekar *et al.*, 2014;). Mayeux (1960) encontró un elevado número de bacterias coliformes entre estas, el género *Enterobacter* con 1×10^5 UFC/g en suelo próximo a la caña y en menor cantidad, a medida que aumenta la distancia del tallo, encontró a *L. mesenteroides* a nivel de la rizosfera en una concentración de 5×10^3 UFC/g. De igual manera, Pisa *et al.* (2011) encontró al género *Bacillus* como el más predominante (19.7%) y a los clasificados como fijadores de nitrógeno y/o promotores del crecimiento a los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Burkholderia*, aunque este último fue encontrado con menor prevalencia.

Por lo tanto, dependerá del lugar, el tipo de suelo y condiciones ambientales para que la presencia o ausencia en mayor grado se manifieste en el cultivo de caña y desde luego, si es verde o cruda, quema y próxima al ingreso a los molinos en el batey para que los microorganismos asociados a los tallos se manifiesten causando deterioro. Para ello, Whittaker y Botha (1997) y Witt y Cramer (2009) mencionan que la demanda de sacarosa comprende dos componentes: el crecimiento y la respiración. Para el caso del crecimiento del tallo este se detiene en la cosecha sin embargo la respiración continúa y ocasiona un consumo de azúcares para producir energía. Es decir, el ciclo de azúcares entre sacarosa y hexosas se produce naturalmente en el tallo a nivel del parénquima y apoplastos (Bull, 1972; Moore, 1995; Dong *et al.* 1997), lo que significa que tanto la sacarosa y hexosas se consumen durante la actividad respiratoria después de la cosecha. Además, la alta concentración de azúcar dentro de los entrenudos maduros proporciona un entorno para la proliferación de microbios, que pueden ser endofíticos o entrar en el tallo cosechado a través de los sitios de daño. Por lo tanto, la pérdida de postcosecha de azúcar del tallo es atribuible tanto a la actividad microbiana y la respiración de las planta (Witt y Cramer, 2009). Además, esta actividad de deterioro por microorganismos aumenta por el tiempo de permanencia en los patios del ingenio o en el campo (CENICAÑA, 1983; Larrahondo, 1995). Esta debido a que los agentes enzimáticos, químicos y microbiológicos continúan aumentando con el paso del tiempo. Inicialmente, la enzima invertasa, que ocurre naturalmente en la caña se activa después de la cosecha, especialmente cuando la temperatura ambiente es elevada. Grandes

cantidades de invertasa se liberan durante la molienda, convirtiendo la sacarosa en azúcares invertidos, reduciendo así la pureza (Solomon et al. 2006). Incluso, se ha encontrado que cuando la caña se quema e inmediatamente se corta, los °Brix aumenta entre 10% y 16% en las primeras horas, en relación con la caña que se corta sin quemar; de la misma forma, cuando se quema y se deja “en pie”, presenta un descenso continuo de la Pol, debido al deterioro por microorganismos y mayor dilución de los metabolitos por la absorción de agua a través del sistema radicular de la planta. Los resultados muestran una pérdida diaria de 2.7% en Pol cuando es mayor a las 48 horas de realizada la cosecha (CENICAÑA, 1983; Larrahondo, 1983).

Por lo anterior, coincidimos que en el presente estudio al cabo de 36 horas hubo una disminución de la sacarosa (Pol), donde los tratamientos con tallos VCC (0 – 5) fue de 5.413% y VCC (6 – 10) con 5.01% y en VSC (0 – 5) fue de 5.140% y VSC (6 – 10) con 5.127%; en el caso de los tallos quemados QCC (0 – 5) con 5.21% y QCC (6 – 10) con 5.03% y en el caso QSC (0 – 5) con 4.71% y QSC (6 – 10) con 4.0% y finalmente para los tallos en batey, BCC (0 – 5) con 3.923% y BCC (6 – 10) con 3.71% y BSC (0 – 5) 3.257% y BSC (6 – 10) con 3.05%, y desde tallos en crudo hasta batey se obtuvo un decremento de sacarosa (Pol) de 2.39 % a las 36 horas a 37 °C. En este sentido, Watt y Cramer (2009) mencionan que las tasas de respiración después de la cosecha (12 h después de la cosecha) en entrenudos maduros a 23 °C, se consumen alrededor de 0.27 mg de carbohidratos (azúcares) por gramo de tallo en un día, lo que representa una pérdida sustancial si se considera a nivel de cultivos. También, resaltan que la respiración es dependiente de la temperatura, y con alta temperatura (40 °C), la tasa de respiración aumenta más de cinco veces a 1.47 mg de carbohidratos consumidos por gramo de peso del tallo fresco por día. La tasa de respiración en los entrenudos del tallo maduro no sólo está influenciada por la temperatura, sino también por el tiempo de espera después de la cosecha. A alta temperatura (30 °C), la actividad respiratoria sigue aumentando, alcanzando una tasa de 1.93 mg de carbohidratos consumidos por gramo de peso fresco por día a las 48 h, mientras que a 10 °C durante 48 horas la tasa osciló entre 0.21 y 0.43 mg de carbohidratos consumidos por gramo de peso fresco por día. Incluso se observó que a bajas temperaturas, hubo un nivel basal de la respiración, lo que redundo en la pérdida de azúcar en los entrenudos maduros. Ellos plantean el supuesto que la sacarosa constituye 15% de la masa fresca de un tallo, donde 1.6% de sacarosa dentro de un tallo se

perdería debido a la respiración después de 72 h a 30 °C, aumentando a una pérdida de 3.2% después de 120 h. A 10 °C, la sacarosa que se consume por la respiración fue de 0.2% y 1.9% de total de sacarosa presente después de 72 h y 120 h, respectivamente.

El porcentaje de °Brix para en este estudio encontramos en los tallos en verde que VCC (0 – 5) fue de 4.93% y VCC (6 – 10) con 3.117% y en VSC (0 – 5) fue de 0.14% y VSC (6 – 10) con 0.12%; en el caso de los tallos quemados QCC (0 – 5) con 5.12% y QCC (6 – 10) con 4.95% y en el caso QSC (0 – 5) con 1.0% y QSC (6 – 10) con 2.7% y finalmente para los tallos en batey, BCC (0 – 5) con 4.64% y BCC (6 – 10) con 4.84% y BSC (0 – 5) 4.5% y BSC (6 – 10) con 4.08%, en este caso los resultados no fueron muy concluyentes por la variabilidad de los resultados (verde y quemada), en cambio para el caso de resultados en batey los sólidos solubles se mantuvieron uniformes en todo el tallo completo (secciones de 0 – 5 y 6 – 10). En el caso de los tallos de batey a las 36 horas se incrementó conforme la sacarosa fue disminuyendo (Larraondo, 1983).

En el caso de azúcares reductores con tallos en verde VCC (0 – 5) fue de 0.74% y VCC (6 – 10) con 1.10% y en VSC (0 – 5) fue de 0.49% y VSC (6 – 10) con 0.49%; en el caso de los tallos quemados QCC (0 – 5) con 0.63% y QCC (6 – 10) con 0.78% y en el caso QSC (0 – 5) con 0.67% y QSC (6 – 10) con 0.78% a las 30 horas, en cambio para los tallos en batey a las 36 horas, BCC (0 – 5) fue 0.36% y BCC (6 – 10) a las 30 horas con 0.46% y BSC (0 – 5) a las 36 horas con 0.32% y BSC (6 – 10) a las 30 horas con 0.32%. En el caso de tallos de batey a las 36 horas la tendencia en % de azúcares reductores tuvo un comportamiento hacia el alza, el incremento está dado debido a la inversión de la sacarosa conforme al tiempo (Watt y Cramer, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos podemos decir que la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* y otras bacterias ácido-lácticas están presentes desde la caña en verde con un incremento considerable a partir de la quema; y conforme transcurrió el tiempo se fueron reproduciendo las UFC, y al mismo tiempo la degradación de sacarosa después de transcurridas 24 horas con respecto al corte. Lo anterior, coincide con lo mencionado por El-Maghraby *et al.*, (2009) y Watt y Cramer (2009), quienes indican que el contenido de sacarosa decrece al incrementar el período de almacenamiento en postcosecha. Según los mismos autores, esto podría atribuirse a la mayor tasa de inversión de la sacarosa, debido a

la creciente actividad de las enzimas de degradación y a una mayor tasa de respiración con el aumento del tiempo de molienda después de la cosecha.

X. CONCLUSIONES

La hipótesis en este sentido se cumple debido a que la actividad microbiana de las bacterias ácido lácticas afectan la calidad del jugo en los tallos crudos, quemados y en batey con un resultado en la disminución de sacarosa (Pol) de 2.39% a las 36 horas a 37 °C. En cambio, a las 24 horas 1.28% de Pol para todos los tratamientos que se traducen en pérdidas en rendimiento. Solo en el caso de tallos en verde a las cero horas hubo una Pol de 0.22 y a las 12 horas una Pol de 0.28%, y en el caso de tallos quemados a las cero horas 0.11% y a las 12 horas 0.12%. Sin embargo, la presencia de coliformes (*E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*) con respecto a la presencia a las bacterias ácido lácticas tuvieron un comportamiento inversamente proporcional, al incrementar la población (UFC/mL) de bacterias ácido lácticas, la comunidades bacterianas de coliformes disminuyeron. En cambio, la presencia de coliformes induce la degradación de sacarosa debido a procesos de fermentación, por lo que posiblemente, no solo las bacterias ácido lácticas sean las directamente involucradas.

XI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar corte en verde
- Realizar un plan de obtención de antagonistas que inhiban el desarrollo de bacterias como *Leuconostoc*, otras ácido lácticas y posibles coliformes.
- En caso de tallos quemados procesar en menos de 24 horas
- Reingeniería en fábrica para la recepción de la materia prima
- Mantenimiento preventivo de los molinos

XII. LITERATURA CITADA

- Aguirre, J., Magaña, R., Martínez, S., Gómez, A., Ramírez, J.C., Barajas, R., Plascencia, A., Bárcena, R. & García, D.E. 2010. Caracterización nutricional y uso de la caña de azúcar. *Zootecnia Tropical*.
- Aguilar, R.N. 2011. Competitividad de la agroindustria azucarera de la Huasteca México. Tesis Doctoral de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de SLP. 502 p.
- Amaya E. A., J. H Cock., A. Hernández y J. Irvine. 1995. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali. *Biología. CENICANA*. pp. 31-62.
- Anónimo. Buckman Laboratories, Inc. 1993. Information Release. Evaluating the benefits of Busan 881 as a Sanitation aid for Cane Sugar Mills. Memphis, Tennessee, USA.
- Audisio C.M., Carrillo. M. 2007. Manual de microbiología de los alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. pp.176.
- Benavides, C. 1998. Tecnología Innovación y Empresas. Madrid España. Editorial Pirámide.
- Broadfoot, R. 2001. Aspects of sucrose losses: impact on profitability, competitiveness and the environment. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 24, Brisbane, Australia. Proceedings.339-340 pp.
- . Bull, T. A, Gayler K. R., Glasziou, K. T.1972. Lateral Movement of Water and Sugar Across Xvlem in Sugarcane Stalks. 49: 1007-1011.
- Cerutti de Guglielmone G.I., Diez O.A., Cárdenas G.J., Oliver G. 2000. Determinación de contenidos microbianos y cuantificación de dextranos en la Industria Azucarera Tucumana. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. pp. 19 – 27.
- Clarke M. 1996. Dextran in sugar factories causes and control. Sugar Processing Research Institute. Presentation at the Congress of the Association of Sugar Technologist, Acapulco, México. pp. 1-30.
- Chen James C.P. 1996. Manual del azúcar de caña: para fabricantes de la caña de azúcar y químicos especializados. México. Editorial Limusa.
- Chandrashekar, M.A., Soumya Pai K and Raju, N.S. 2014. Fungal Diversity of Rhizosphere Soils in Different Agricultural fields of Nanjangud Taluk of Mysore District, Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3: 559-566.
- CNIAA, 2014. Manual Azucarero Mexicano 2014. México: CNIAA. <http://www.camaraazucarera.org.mx/>
- CONADESUCA. 2015. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA), con Información de las Delegaciones de la SAGARPA en los Estados. Avance de Siembras y Cosechas Perennes 2014. <http://www.conadesuca.gob.mx/>
- Crespo, H. 1988. Historia del azúcar en México. México: Fondo de Cultura Económica.
- Cuervo, R, A., Ledesma, A, J., Durán, V, J., Argote V, F. 2010. Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el

- rendimiento de azúcar y etanol. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 8:32-40.
- CNPR-Unión nacional de cañeros. 2007-2012-. México DF.
- Dong, Z., McCully, M. E., and Canny, M. J. 1997. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems Anatomical and physiological data. *Ann. Bot.* 80:147-158.
- Duarte E., Guillermo A., Polanco N., López M. (1982). Análisis Microbiológico de productos azucareros. *Revista Científico-Técnica, La Habana.* pp 28.
- El-Maghraby, S; Ahmed, AZ; El-Soghier, KS. 2009. Post-harvest change studies in sugar cane cultivars under upper Egypt condition. *African Crop Science Conference Proceedings.* 9: 31-37.
- Engelke, J. 2002. Sugarcane, measuring comercial quality. *Department of Agriculture.* 25:23
- Egan, B. T. y Rehbein, C. A. 1963. Bacterial deterioration of mechanically harvested cup up sugar cane during storage over weekends. *Proc. Queensl. Soc. Sugar Cane Technol.* 30:11-19.
- Eggleston, G. 2012. Deterioration of cane juice-sources and indicators. *Food Chemistry* 78:95-103.
- García, H.R., Albarracín, L.C., Toscano, A., Santana, N.J., Insuastry, O. 2007. Guía tecnológica para el manejo integral del sistema productivo de caña panelera. CORPOICA. Bogotá, Colombia. pp.12.
- Hernández M.T., Dauval C., Pérez M.E. 1978. Acción de *L. mesenteroides* y otros microorganismos sobre los componentes del jugo de caña. *Centro Azúcar (Cuba),* 5:67-87.
- Hollaus F. 1978. The microbiology of beet sugar manufacturing: Practical consideratios on operational checks and measures against microorganisms. *La sucrerie Belge.* 97:3-11.
- Honig P. 1969. Microbiología azucarera. pp: 315-454. In (ed) *Principios de tecnología Azucarera.* España.
- Holland G., Buckley M. E., Frampton S. 1990. Experiences in the use of biocides for microbiological control in the raw factory. *Sugar Technology.* British Sugar plc Technical. pp:85.
- INIFAP, 2012. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con Información de las Delegaciones de la SAGARPA en los Estados. *Avance de Siembras y Cosechas Perennes 2012.*
- Landon W., Trost, Steele F., 2002. Review article: Control of microbiological losses prior to cane delivery, and during sugar processing. *International Sugar Journal.*104:118-123.
- Larrahondo, J.E. 1995. Calidad de la caña de azúcar. pp: 337-354. In (ed).*El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia Cali.* Colombia.

- Lehninger, A.L. 1970. Principios básicos de bioquímica. Nelson, D.L. (trad). Editorial Omega. España.
- NCBI 2015. *Saccharum officinarum* taxonomy. 2015
- NMX-F-271-1991. Industria Azucarera. Determinación de Pol (sacarosa aparente) en muestras de jugos de especies vegetales productoras de azúcar. Método del peso normal. Sugarin Dusty. Determination of Pol (apparent saccharose) in juice samples of vegetal species which produce sugar – standard method. Normas Mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-312-1978. Determinación de reductores directos y totales en alimentos. Method of test for total and direct reducing substances in food. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Mata, H., Rodríguez, V.H., Patishtán, J. 2014. Origen y descripción botánica. pp: 29-39. In (ed) Manejo integral de la caña de azúcar. CIRENE-INIFAP. Nuevo León México.
- Mayeux, P.A. 1960. Some studies on the microbial flora of sugar cane. Thesis Louisiana State University. 697-708 pp.
- Mora, Z. 1995. Estudio de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar. Tesis, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Programa Académico de Biología. Cali, Colombia.
- Moore, P.H. 1995. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Acomulation in the Sugar Stem. Australian Journal of plant physiology. 22: 661-679.
- Murray, K.R., Granner, K.D., Rodwell, W.V. 2001. Bioquímica de Harper. Edición 15. Editorial Limusa. México.
- OCCDE y Eurostat. 2005. Oslo Manual: Guidelines for Collecting and Interpreting Innovation. 3rd Edtion. 308pp
- Osorio, C.G. 2007. Manual: Buenas prácticas agrícolas –BPA- y buenas prácticas de manufactura –BPM- en la producción de caña y panela. Manual Técnico. FAO. pp.199.
- Patishtán, J., Mata, H., Vázquez, E. 2014. Fases de crecimiento. pp: 41-46. In (ed) Manejo integral de la caña de azúcar. CIRENE-INIFAP. Nuevo León México.
- Pisa, G., Magnani, G.S., Weber, H., Souza, E.M., Faoro, H., Monteiro, R.A., Daros, E., Baura, V. 2011. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. Brazilian Journal. 44: 1215-1221.
- Pulido M.L., Ferrer V. 1977. Programa coordinado de tratamiento químico para centrales. Congreso de Asociación de Técnicos azucareros, San Juan de Puerto Rico. Buckman Laboratorios.
- Poinar, G.O, Thomas, G.M. 1978. Laboratory guie to insect pathogens and parasites. Plenum press, New York.
- Ridge, R. 2003. Fertilizing for high yield and quality sugarcane. IPI Bullelin. International Potash Institute. Horgen, Switzerland. 21:117.

- Sábato, J, Botana, N. 1975. El pensamiento latinoamericano en la problemática de la Ciencia, Tecnología, Desarrollo y Dependencia. Buenos Aires. Editorial Paidós.
- SAGARPA (2012). Importancia de la agroindustria de la caña de azúcar. México D.F.
- Sais Herrera T. 1977. Estudios de la flora microbiana en jugos de caña de varias unidades industriales y a escala semi-industrial. *Ciencia agrícola*. 4:3-19.
- Sánchez, F., M. 1997. Desarrollo de la producción de caña de azúcar en la república mexicana. Montecillo Texcoco: Colegio de Postgraduados.
- Serrano L. 2006. Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el Ingenio Manuelita S.A. Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C.
- Silliker J. H., Chairman, R., Elliott, P. 1980. *Ecología Microbiana de los Productos Alimenticios*. Editorial Coordinador. Zaragoza – España.
- Solomon, S; Banerji, R; Shrivastava, AK; Singh, P; Singh I; Verma, M; Prajapati, CP; Sawnani, A. 2006. Post harvest deterioration of sugarcane and chemical methods to minimize sucrose losses. *SugarTech* 1:74-78.
- Subiros, P. 2000. Cultivo de la caña de azúcar. Editorial Eulack. San José Costa Rica.
- Tallgren A.H., Airaksinen U., Weissenberg R., Ojano H., Kuusisto J., Leisola M. 1999. Exopolisaccharide-producing Bacteria from sugar Beets. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:862 - 864.
- Van der Poel P.W., Schiweck H., Schwartz T. 1998. *Sugar technology: Beet and Cane Sugar Manufacture*. pp.993 – 1007.
- Vargas, R.J. 2009. Mapeo digital del suelo y su evaluación con fines de producción de caña de azúcar en los municipios de Ixiamas y San Buenaventura. *Conservación internacional Bolivia y conservación estratégica*. Serie técnica. pp.123.
- Watt, D.A., y Cramer MD. 2009. Post-harvest biology of sugarcane. *Sugar tech*. 2:142-145
- Whittaker, A. and Botha F.C. 1997. Carbon Partitioning during Sucrose Accumulation in Sugarcane Internodal Tissue. 5: 1651-1659.
- Zepeda Guardado, E. R 2012. Propuesta de alternativas para la reducción de pérdidas de sacarosa en un ingenio azucarero. Tesis doctoral Universidad de El Salvador.