

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE MICROBIOTA
ACIDOLÁCTICA ASOCIADA A LOS LODOS OBTENIDOS DEL CLARIFICADOR
Y DEL FILTRO ROTATORIO EN INCAUCA S.A.**

YEHUDY YELITZA LIZCANO DELGADO
Estudiante Décimo Semestre
Programa de Microbiología

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
2015

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE MICROBIOTA
ACIDOLÁCTICA ASOCIADA A LOS LODOS OBTENIDOS DEL CLARIFICADOR
Y DEL FILTRO ROTATORIO EN INCAUCA S.A.**

YEHUDY YELITZA LIZCANO DELGADO
Estudiante Décimo Semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGA

Asesor
ENRIQUE CABEZA HERRERA

Asesor externo
MARIA CAMILA CARDOZO GUZMAN

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2015

Nota de Aceptación

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, Diciembre de 2015

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO REFERENCIAL	5
3.1 BASES LEGALES	5
3.1.1 Norma Técnica Colombiana NTC 5034:	5
3.2 ANTECEDENTES	5
3.3 GENERALIDADES DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL AZÚCAR ..	6
3.4 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL AZÚCAR DE CAÑA	6
3.4.1 Patios de caña	6
3.4.2 Preparación de la caña	7
3.4.3 Molienda	7
3.4.4 Generación de vapor y energía eléctrica	7
3.4.5 Sulfitación, pesaje y alcalización	7
3.4.6 Calentamiento y clarificación	8
3.4.7 Filtración	8
3.4.8 Evaporación	9
3.4.9 Cristalización de la meladura	9
3.4.10 Envase y almacenamiento	9
4 METODOLOGÍA	11
4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS (BALPE)	11
4.2 CONSERVACIÓN DE BAL Y BALPE	11
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BAL MEDIANTE EL TEST RÁPIDO API	12
4.3.1 Preparación del inóculo	12
4.3.2 Inoculación del API	12
4.3.3 Lectura e Interpretación de los resultados	12

4.4 MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN LOS LODOS DEL CLARIFICADOR Y DEL FILTRO ROTATORIO.....	13
4.4.1 pH.....	13
4.4.2 °Brix.....	14
4.4.3 Determinación de dextranas	14
4.4.4 Determinación de acidez volátil / ácido acético	15
4.4.5 Determinación de ácido láctico.	16
4.4.6 Determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa mediante HPLC.	17
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	19
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	21
6.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	21
6.2 RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS	25
6.2.1 Acidez láctica.....	26
6.2.2 Cuantificación de Dextranas.	27
6.2.3 Acidez volátil.	28
6.2.4 Cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa.	29
6.2.5 Evolución del pH.	34
7. CONCLUSIONES	35
8. RECOMENDACIONES.....	36
9. GLOSARIO.....	37
10. REFERENCIAS	38
11. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración del azúcar. Fuente: INCAUCA S.A. 2011b	10
Figura 2. Hoja de resultados API	13

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización macroscópica de las BAL aisladas en agar MRS con azul de anilina	23
Tabla 2. Caracterización microscópica mediante tinción Gram de las BAL aisladas	23
Tabla 3. Resultados de la identificación microbiológica por API	24

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. API ® 50 – CHL.....	41
Anexo 2. Curva patrón para dextranas.	42
Anexo 3. Preparación de los patrones de azúcar para la determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa mediante HPLC	44
Anexo 4. Recuento de BAL de los lodos en cada día de muestreo.....	44
Anexo 5. Resultados fisicoquímicos de los lodos frescos saliendo del clarificador.....	45
Anexo 6. Resultados fisicoquímicos de los lodos obtenidos del filtro rotatorio	46
Anexo 7. Dextranas producidas por BALPE en agar MRS suplementado con 10% de sacarosa	47

INTRODUCCIÓN

El proceso de cosecha de INCAUCA S.A. tiene capacidad para suministrar 15.000 toneladas de caña diarias a la fábrica (INCAUCA, 2011a), que serán procesadas hasta obtener azúcar como producto final; de la cantidad inicial de caña se producirán aproximadamente 2.200 toneladas de lodos que se sedimentarán en el clarificador de donde se dirigen al tanque mezclador de cachaza para ser filtrados posteriormente por los filtros rotatorio y prensa, y así poder extraer el jugo azucarado que contienen, para ello se deben tomar los lodos y adicionarles bagacillo (esto mejora la filtrabilidad), una vez obtenido el jugo filtrado este continúa el proceso del azúcar llevando consigo los metabolitos que se hayan podido producir durante la filtración, mientras que el lodo es retornado al tanque mezclador de cachaza para ser reprocesado nuevamente en el filtro rotatorio (INCAUCA, 2011a).

En el proceso de elaboración de azúcar se originan pérdidas de sacarosa determinadas, aquellas que se pueden controlar y cuantificar, son originadas en el bagazo, la cachaza y la miel final; e indeterminadas, por acción microbiana, que se deben controlar y minimizar, estas pérdidas de sacarosa en miel final pueden representar hasta el 6% del total de la sacarosa contenida en la caña de azúcar produciendo deficiencia en el proceso y reduciendo la recuperación de azúcar (Mosquera *et al.*, 2012).

Los microorganismos utilizan los azúcares para la producción de ácidos tales como láctico, acético, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, propiónico, etc. Estos reducen la eficiencia de fermentación y la producción del etanol (Acevedo, 2005, citado por Gallego, 2007). Entre estos microorganismos se encuentran las Bacterias Acido Lácticas (BAL), las cuales tienen la capacidad de producir ácido láctico a partir de sacarosa en el caso de las BAL homofermentativas y ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ por las BAL heterofermentativas (Lyhs, 2002, citado por Cabeza, 2006).

Por otra parte, las BAL afectan otra sección del ingenio azucarero, como es la destilería, encargada de la producción de bioetanol, ya que proliferan en tanques de fermentación y tienen un efecto negativo en el proceso (Lucena, 2010). Esto se debe a la producción de sus metabolitos, entre ellos la acidez volátil / ácido acético que genera incrementos de la presión osmótica que estresan e inhiben la actividad de la levadura. (Oliva-Neto *et al.*, 2013).

Para poder encaminarse a diseñar un procesamiento más eficiente que permita disminuir las pérdidas de sacarosa en esta parte del proceso que abarca la filtración por rotatorios, y los efectos colaterales que tiene los metabolitos en los ingenios azucareros, es crucial tener un mejor entendimiento sobre la diversidad de BAL en los lodos implicados en el proceso del azúcar, por esto se lleva a cabo este proyecto permitiendo la identificación de la microbiota ácido láctica así como la caracterización fisicoquímica de los lodos.

Para la identificación de las bacterias aisladas de los lodos frescos saliendo del clarificador y del filtro rotatorio se empleará API®, ya que es un método rápido que permite la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas (Apiweb®, 2010).

El monitoreo de las características fisicoquímicas para observar el comportamiento de los lodos del clarificador y del filtro rotatorio se realiza mediante análisis que comprenden pH, °Brix, dextranas, acidez volátil / ácido acético, acidez láctica, y sacarosa por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) durante un periodo de 6 horas, tiempo en que el lodo permanece reprocesándose entre el filtro rotatorio y el tanque mezclador de cachaza, antes de continuar el proceso de producción de azúcar.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fisicoquímicamente los lodos obtenidos del clarificador y del filtro rotatorio, así como las bacterias ácido-lácticas (BAL) relacionadas con la producción de metabolitos que afecten la producción del azúcar en INCAUCA S.A.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorear la producción de metabolitos microbianos en los lodos del clarificador y del filtro rotatorio mediante análisis fisicoquímicos, en INCAUCA S.A.
- Cuantificar las pérdidas de sacarosa en los lodos del clarificador y del filtro rotatorio durante la producción del azúcar, en INCAUCA S.A.
- Identificar las bacterias ácido-lácticas aisladas de los lodos del clarificador y del filtro rotatorio en INCAUCA S.A.

2. JUSTIFICACIÓN

El deterioro microbiológico causa la mayoría de las pérdidas de sacarosa por inversión, disminuyendo la producción de azúcar blanco; los microorganismos emplean la sacarosa como sustrato para su crecimiento y excretan la enzima invertasa. De ahí la importancia de identificar las bacterias ácido lácticas presentes en el proceso de filtración por filtros rotatorios del proceso del azúcar y caracterizar sus correspondientes ácidos orgánicos, ya que al ser un punto de retorno este sirve como retroalimentador de la producción debido a que el lodo permanece recirculando entre el tanque mezclador de cachaza y los filtros rotatorios durante un tiempo estimado de 3 horas, permitiendo así un reflujo constante de material microbiológico y sus consecuentes metabolitos que pueden tener implicaciones en otros aspectos industriales como es el caso de la obtención de bioetanol en la destilería, que emplea como materia prima la miel final que se obtiene como un subproducto del proceso de elaboración del azúcar.

La relevancia de las bacterias ácido lácticas (BAL) además de su inesperada supervivencia en el lodo a 70°C, es la producción de exopolisacáridos que interfieren con la producción de azúcar, como es el caso de las dextranas que causan altas viscosidades y baja calidad de los productos (Ravelo-Ramos, 2003), por parte de las bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (BALPE).

Dentro de las BAL implicadas en las pérdidas de sacarosa los géneros más comúnmente encontrados son: *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp., los cuales pueden encontrarse en la superficie de los tanques donde cae la miel final o por el contrario venir inmersas en el jugo de caña después de la molienda, suministrando un medio de crecimiento ideal para estas bacterias. *Leuconostoc* spp. es responsable de una disminución significativa en la producción de azúcar y etanol debido a los procesos de inversión de la sacarosa, presentándose pérdidas cercanas al 20% del total producido en INCAUCA S.A. (INCAUCA S.A. com. pers. citado por Cuervo, 2010). Esto hace importante caracterizar los lodos frescos saliendo del clarificador y los lodos del filtro rotatorio para poder determinar la influencia de las BAL y sus metabolitos en la producción de azúcar y así cuantificar el porcentaje de sacarosa que se pierde durante la etapa de filtración por rotatorios, además de establecer las BAL presentes en los lodos y las BALPE responsables de la producción de dextranas en los mismos.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 BASES LEGALES

3.1.1 Norma Técnica Colombiana NTC 5034:

Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico. Técnica de recuento de colonias a 30 °C.

Esta norma describe un método horizontal para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico mediante el recuento de las colonias que crecen después de la incubación a 30° C durante 3 días.

Nota: en algunos productos alimenticios, existen bacterias de ácido láctico psicrótróficas o termofílicas que requieren de temperaturas de cultivo diferentes a 30 °C.

Esta norma es aplicable a los productos destinados para el consumo humano o alimentos para animales.

3.2 ANTECEDENTES

En 2002 CENICAÑA llevó a cabo un estudio sobre las pérdidas de sacarosa en tres ingenios azucareros en diferentes partes del proceso del azúcar, de acuerdo con los niveles de materia extraña y tiempos de permanencia entre corte y molienda se estableció una reducción de sacarosa entre 1% y 1,5% del porcentaje de sacarosa contenido en la caña. Además por cada hora de permanencia de la caña en el campo o en los equipos de transporte se observaron pérdidas de sacarosa entre 0,08% y 0,15% (CENICAÑA, 2002) demostrando que estas pérdidas no solo se dan a nivel del proceso de elaboración del azúcar sino que empiezan desde la molienda y tratamiento de la caña que se va a procesar.

En 2014 Efrén Corrales y Guillermo Garzón desarrollaron en la Universidad Santiago de Cali un proyecto cuyo objetivo fue la identificación y cuantificación de pérdidas de sacarosa en el efluente de elaboración del Ingenio Riopaila Castilla, planta Castilla. Esto surgió del interés en aprovechar la gran cantidad de sacarosa que se pierde en el proceso de elaboración del azúcar con un valor aproximado de \$1500 millones por año. Los resultados fueron una disminución de pérdidas de sacarosa que posiciona al ingenio en el primer lugar con las pérdidas de sacarosa más bajas de todo el sector azucarero en Colombia; la creación de seis nuevos

puestos de trabajo (inspectores de pérdidas); disminución del impacto ambiental con la reducción de sacarosa contaminante en el efluente final y un mejor manejo en el control de la sacarosa en el efluente final (Corrales y Garzón, 2014).

En 2015 Andrés Nova desarrolló un proyecto en INCAUCA S.A. para determinar las pérdidas de sacarosa generadas en el jugo diluido de los molinos Farrel y Fulton por causas biológicas, enzimáticas y químicas, realizando curvas de deterioro de 8 horas donde se comparaban las muestras con un control negativo, contrastando los resultados de diversas pruebas fisicoquímicas como pH, acidez volátil, acidez láctica, °Brix, dextranas, sacarosa mediante HPLC frente al recuento en placa, obteniendo como resultado un porcentaje de pérdidas biológicas, enzimáticas y químicas de 59,404003%, 42,7840124% y 47,9896207% respectivamente para cada una de las tres curvas realizadas en el proyecto (Nova, 2015)

3.3 GENERALIDADES DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL AZÚCAR

El procesamiento de la caña de azúcar comienza en el campo. La variedad de la caña, el suelo en que se cultiva, el manejo que incluye la dosis y época para la aplicación de fertilizantes, y el grado de madurez determinan la calidad del producto. La caña con óptima calidad da mayores rendimientos fabriles para beneficio, tanto de los ingenios como de los cultivadores del sector azucarero.

La calidad se reconoce en el momento de la molienda por la cantidad de azúcar recuperable por tonelada de caña molida, esto depende de: (1) alto contenido de sacarosa, (2) bajo contenido de materiales extraños, (3) bajo contenido de sólidos solubles diferentes de la sacarosa, y (4) bajos niveles de fibra (Larrahondo, 1995).

3.4 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL AZÚCAR DE CAÑA

3.4.1 Patios de caña

La fábrica inicia su trabajo con el proceso de muestreo de la caña que viene del campo, para medir la calidad y con esto poder estimar la cantidad de azúcar que se puede obtener. Una vez efectuada la muestra, los vehículos transportadores pasan por básculas electrónicas de pesado y posteriormente son descargados.

3.4.2 Preparación de la caña

La caña es entregada a conductores que la envían a dos tandems de molinos (Farrel y Fulton) los cuales poseen desfibradoras que fraccionan la caña para romper la corteza y facilitar la extracción del jugo en los molinos.

3.4.3 Molienda

Compuesto por seis molinos y cada molino se compone de seis mazas. Estas mazas son cilindros de gran tamaño que se encargan de comprimir la caña para extraer el jugo. El residuo llamado bagazo va pasando de un molino a otro para extraer la mayor cantidad de jugo posible. Al material que sale de cada molino se le adiciona jugo del molino inmediatamente siguiente, para lograr extraer la mayor cantidad de sacarosa de la caña.

Antes que el bagazo pase por el último molino, se le agrega agua con el propósito de mejorar la extracción de jugo y sacarosa. El jugo extraído se hace pasar por sistemas de filtración que tienen mallas encargadas de separar la mayor cantidad de bagacillo del jugo, enviando el jugo crudo hacia el proceso y retornando el bagacillo a los molinos.

3.4.4 Generación de vapor y energía eléctrica

El bagazo con bajo contenido de humedad que sale del último molino, es enviado a las calderas para ser utilizado como combustible en la generación de vapor. Parte del vapor generado se utiliza en los turbogeneradores, que producen la energía eléctrica que requiere la fábrica y un excedente que es vendido a la red pública. El vapor restante, se emplea para el accionamiento de las turbinas de molinos, donde después de realizar su trabajo se expande y sale del proceso como vapor de escape, que se utiliza en los pre- evaporadores de jugo claro.

3.4.5 Sulfitación, pesaje y alcalización

El jugo crudo se hace pasar por un sistema de sulfitación con el fin de evitar la producción de compuestos coloreados durante los procesos siguientes. El azufre es quemado para producir dióxido de azufre (SO_2) que se pone en contacto con el jugo por medio de eyectores.

Posteriormente, el jugo pasa por las básculas para su pesaje, con el propósito de evaluar el rendimiento del proceso y la cantidad de jugo que resulta de la caña procesada. El jugo sulfitado se pre-encala con la adición de lechada de cal para evitar la inversión de sacarosa y se envía hacia un primer calentamiento para posteriormente realizarle la segunda alcalización.

3.4.6 Calentamiento y clarificación

El jugo alcalizado pasa a la siguiente etapa de calentamiento a una temperatura cercana a los 105 °C para activar las reacciones entre la cal y los óxidos de fósforo presentes en el jugo y precipitar las impurezas orgánicas e inorgánicas en la clarificación. Posteriormente, el jugo es alimentado a un clarificador rápido de bajo tiempo de retención en el que las impurezas del jugo se precipitan por la acción de la gravedad.

El proceso de clarificación, se ayuda con la adición de floculante que al entrar en contacto con el jugo retiene las impurezas y las precipita, separando así el jugo clarificado (líquido de baja turbiedad) del lodo (sólidos insolubles contenidos en el jugo diluido que aún conservan sacarosa).

3.4.7 Filtración

Los lodos sedimentados en el clarificador, se conducen a la estación de filtros (Prensa y Rotatorio) donde se les aplica agua caliente para extraerles el jugo azucarado que contienen.

En el tanque mezclador de cachaza se toman los lodos y se les adiciona bagacillo (partícula fina de bagazo) para darle mayor consistencia y mejorar la filtrabilidad. Luego son procesados en los filtros que retiran la parte líquida, denominada jugo filtrado, quedando una torta seca llamada cachaza (mezcla de lodo y bagacillo), que es enviada al proceso de compostaje para la producción de abonos orgánicos.

El lodo regresa al tanque mezclador de cachaza para mezclarse nuevamente con bagacillo y volverse a filtrar, se estima que el mismo lodo permanece 3 horas en este proceso repetitivo, mientras que el jugo filtrado continúa el proceso hacia los evaporadores.

3.4.8 Evaporación

El jugo filtrado se bombea a un sistema de evaporación de cinco efectos para eliminarle parte del agua que contiene. Por medio de vapor y el vacío, los evaporadores concentran el jugo desde 15 a 68° Brix, dando como resultado la meladura, que antes del último efecto es enviada a la clarificación. Este es un proceso donde se le adiciona a la meladura Ácido Fosfórico, Cal, pequeñas burbujas de aire micronizado y floculante para coagular y remover las impurezas.

3.4.9 Cristalización de la meladura

Para la cristalización de la sacarosa se utiliza un sistema de dos plantas. Las diferentes plantas se elaboran en tachos batch y uno continuo. Existen unos equipos tachos en el que se obtiene masas con diferentes proporciones de cristales y miel; componentes que luego son separados en las centrifugas.

Luego del proceso de centrifugación los cristales de sacarosa son enviados al proceso de secado. El líquido que contiene sacarosa y que no fue cristalizado se conoce como miel final y es empleado en la destilería para la obtención de etanol.

3.4.10 Envase y almacenamiento

El azúcar seco y frío se lleva a tolvas que alimentan a las envasadoras de azúcar en las diferentes presentaciones con que se surten los mercados nacional e internacional. Una vez envasado el azúcar se lleva a las bodegas de producto terminado donde se almacena y/o se carga en vehículos de carga, para su distribución.

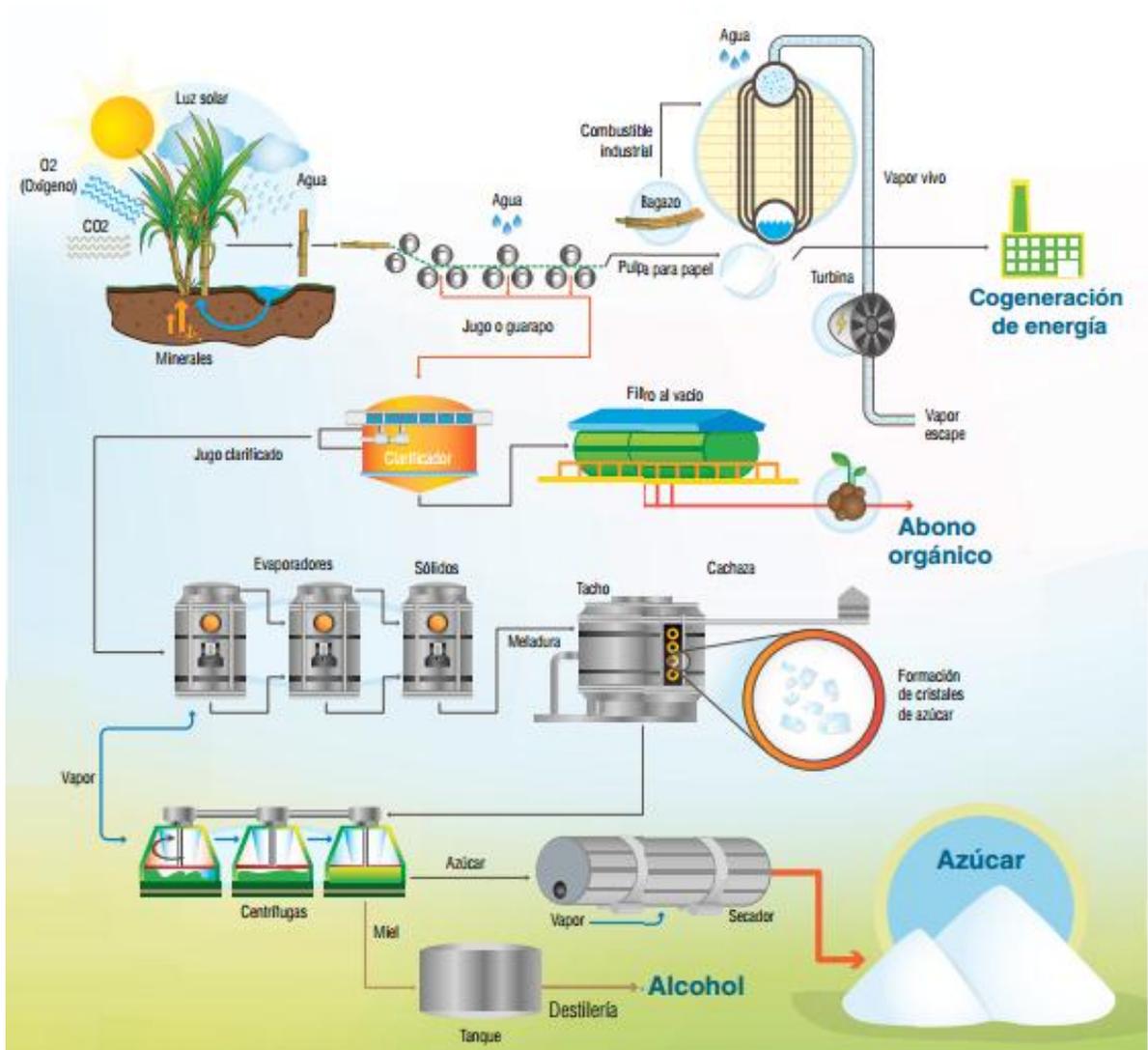


Figura 1. Proceso de elaboración del azúcar. Fuente: INCAUCA S.A., 2011b.

4 METODOLOGÍA

Para determinar la población de bacterias ácido lácticas presente en los lodos frescos del clarificador y del filtro rotatorio se tiene en cuenta la siembra en placa en agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe) y MRS suplementado con 10% de sacarosa para bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos, los aislados son conservados y posteriormente identificados con API.

4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS (BALPE)

- Tomar 10 mL de muestra y diluir en 90 mL de agua peptona estéril al 0,1% obteniendo una factor de dilución 1:10 con una concentración final de 10^{-1} .
- De la dilución anterior transferir 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptona estéril al 0,1% (10^{-2}) para el lodo de clarificador y se realiza otra dilución (10^{-3}) para el lodo del filtro rotatorio
- Tomar 1 mL de las últimas dos diluciones y sembrar por duplicado en profundidad del agar Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubar a 35°C por 48 horas en aerobiosis, para BAL. (NTC 5034)
- De las colonias obtenidas anteriormente realizar resiembras de cada morfología en agar MRS hasta obtener cultivos puros
- De las morfologías encontradas realizar siembras en agar MRS suplementado con 10% de sacarosa e incubar a 35°C por 48 horas en aerobiosis, para BALPE. (NTC 5034 modificado)

4.2 CONSERVACIÓN DE BAL Y BALPE

Cada una de las cepas seleccionadas (Gram positivas, catalasa negativas, oxidasa negativa) se inocula en agar Rogosa y se almacena a 5°C.

Para su conservación a largo plazo, las cepas son congeladas a -20°C en glicerol al 20%, a una concentración correspondiente a McFarland #2 en tubos eppendorff (Tobía *et al.*, 2003).

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BAL MEDIANTE EL TEST RÁPIDO API

4.3.1 Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (2 mL) o utilizar un tubo que contenga agua destilada estéril sin aditivos.
- Tomar todas las colonias del cultivo con la ayuda de un hisopo estéril.
- Realizar una suspensión densa en la ampolla.
- Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (5 ml) y realizar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión: anotar dicho número de gotas (n).
- Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium e inocular con 2 veces el número de gotas citadas (o sea 2n).
- Homogeneizar.

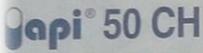
4.3.2 Inoculación del API

Cada microtubo del sistema debe inocularse con la suspensión del cultivo puro del microorganismo a ser identificado y se cubren las pruebas con aceite de parafina (Anexo 1). Se incuba a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aeróbicamente durante 48 horas (± 6 horas).

4.3.3 Lectura e Interpretación de los resultados

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

En cada tubo se investiga la acidificación producida, que se traduce por el cambio de color a AMARILLO del púrpura de bromocresol contenido en el medio. En el ensayo de esculina (tubo n° 25) se observa un viraje de color de púrpura a NEGRO (BioMérieux® S.A.). De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-), comparando con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante.


 12198 A

REF : _____ / _____ / _____
 Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Orígem / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



 BIOMÉRIEUX

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RVA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GUG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG

Imprimé en France / Printed in France

Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Incub./Inkub./Θερμοκρασία επίωασης :

Figura 2. Hoja de resultados API.

Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica (Apiweb®. 2010).

4.4 MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN LOS LODOS DEL CLARIFICADOR Y DEL FILTRO ROTATORIO

Para observar el comportamiento de los lodos durante un tiempo de 6 horas se deben hacer muestreos cada dos horas de cada material a analizar, es decir, se toma el lodo saliendo del clarificador antes de entrar al filtro rotatorio y el lodo que está recirculando en el filtro hacia el tanque mezclador de cachaza, a estos lodos se les cuantifica la concentración de sacarosa por medio de HPLC además se les aplican otros análisis (Ácido láctico, acidez volátil, dextranas, pH y °Brix), por otra parte, las siembras de bacterias ácido lácticas (BAL) y ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (BALPE) se realizan en tiempos aleatorios del muestreo.

4.4.1 pH

- Enfriar la muestra a temperatura ambiente.

- Lavar los electrodos y el recipiente con una porción de la muestra a analizar.
- Llenar el beaker hasta cubrir el bulbo de los electrodos.
- Ajustar el dial a la temperatura de la muestra.
- Presionar el botón de lectura.
- Esperar hasta que se estabilice el pH-metro. Leer el pH.
- Presionar el botón de stand-by
- Lavar los electrodos con agua destilada y dejarlos en agua destilada. (INCAUCA S.A. a.)

4.4.2 °Brix

- Tomar 20 cm³ de muestra
- Adicionar una cucharadita de ayudante de filtración y agitar el contenido del envase
- Colocar en la unidad óptica del refractómetro agua destilada para verificación de cero
- Colocar en la unidad óptica del refractómetro el jugo filtrado necesario para hacer la determinación.
- Leer el % de brix que indica el refractómetro. (INCAUCA S.A. b.)

4.4.3 Determinación de dextranas

Las dextranas son polisacáridos (polímeros de la glucosa) que precipitan en etanol al 50% a partir de una solución de sacarosa, libre de almidones y proteínas. La muestra debe ser tratada antes de ser sometida al análisis con el fin de eliminar las interferencias. La proteína es precipitada con la adición de ácido tricloroacético, las sales se precipitan con cloruro de bario, una posterior filtración elimina los sólidos suspendidos, las proteínas y parte del almidón insoluble en jugo. Una vez formada la turbiedad con el etanol se lee en un espectrofotómetro a 720 nm.

- Para la muestra se toman 50 mL de muestra y se le adiciona 10mL de la solución de ácido tricloroacético al 10% y 5 mL de la solución de Cloruro de Bario al 10%.
- Adicionar una cucharadita de ayudante de filtración y filtrar con papel filtro
- Tomar del filtrado dos alicuotas de 10 mL y colocarlas por separado en un tubo de ensayo y adicionar a una alicuota 10 mL de agua destilada (blanco)

y a la otra 10 mL de etanol absoluto gota a gota, agitando suavemente durante la dición del etanol y dejar reposar por 20 minutos.

- Leer la absorbancia de la muestra en el espectrofotometro a una longitud de onda de 720 nm, usando el blanco para cuadrar el cero del instrumento.
- A partir de la ecuación de regresión de la curva patrón, obtener la concentración de dextranas sustituyeno en Y el valor de la absorbancia. (INCAUCA S.A. c.)

4.4.4 Determinación de acidez volátil / ácido acético

La acidez volátil hace referencia a la presencia de ácido acético, propiónico, valérico y butírico, los cuales inhiben la actividad de la levadura, también son un indicativo de la proliferación de bacterias acidolácticas en los materiales azucarados. Esto incide en la reducción de la eficiencia de fermentación y en la conversión de etanol.

4.4.4.1 Recomendaciones previas a las destilaciones.

- Si el equipo lleva tiempo sin destilar ninguna muestra, tomar 50 mL de agua destilada, ajustar el tiempo de destilación en 5 minutos y activar el modo de destilación automática.
- Recolectar el destilado en un vaso de precipitado de 500 mL y descartarlo.

4.4.4.2 Procedimiento de análisis.

- Tomar 50 mL de la muestra en un beaker de 100 mL y adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y homogenizar.
- Transferir la solución al tubo de destilación de vidrio, evitando que se produzcan pérdidas de la muestra.
- Lavar el beaker con 5 mL de agua destilada y transferir los lavados al tubo de destilación.
- Abrir la tapa de protección y ubicar el tubo con la muestra en el soporte del equipo. Ajustar la boca del tubo al tapón de goma y cerrar la tapa de protección.
- Introducir el tubo de salida del condensado dentro de un balón aforado de 100 mL y ubicarlo en la bandeja de acero inoxidable.

- Precionar el interruptor para activar el ciclo automático de destilación y esperar recolectar el volumen necesario para completar el aforo en el balon de 100 mL.
- Transferir todo el destilado a un erlenmeyer de 250 mL y adicionar de dos a tres gotas del indicador fenolftaleína.
- Titular el destilado con una solución 0.1N de Hidróxido de sodio y registrar el volumen gastado.

4.4.4.3 Estimación del factor de recuperación en la destilación

- Preparar una solución estándar de 5000 ppm de ácido acético (2,4 mL de ácido acético y completar con agua destilada en un frasco volumétrico de 500 mL), adicionar 50 mL de esta solución en un frasco volumétrico de 250 mL y adicionar agua destilada hasta completar el volumen, obteniendo un concentración de 1000 ppm.
- Realizar el procedimiento explicado anteriormente para cada muestra, el volumen obtenido en la titulación de ácido acético a una concentración de 1000 ppm (A) y el de ácido acético a la concentración de 5000 ppm (B) (INCAUCA S.A. d.).

4.4.4.4 Expresión de resultados.

- Factor de recuperación

$$FR = \frac{A}{B}$$

- Acidez volátil:

$$\text{Acidez Volátil} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Volumen de la titulación} \times 0.1 \times 60000}{F.R \times mL \text{ de muestra}}$$

4.4.5 Determinación de ácido láctico.

- Tomar 40 mL de la muestra y adicionarlos en un vaso de precipitado.

- Encender el reflectómetro y se ajusta con el código de la tira de ensayo.
- Pulsar la tecla START del equipo e introducir de forma simultánea la tira de ensayo con ambas zonas de reacción durante 3 segundos en la muestra.
- Luego de transcurrido los 3 segundos se introduce la tira con las zonas de reacción en dirección a la pantalla hasta el tope en el adaptador de tiras y se espera que termine de transcurrir la cuenta regresiva del tiempo de reacción.
- Leer en la pantalla el valor de medición en mg/L de ácido láctico. (Reflectómetro EMD Millipore Corporation 2013)

4.4.6 Determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa mediante HPLC.

La determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa se realizó siguiendo el método ICUMSA GS7/4/8-23 (ICUMSA, 2002)

4.4.6.1 Preparación de la muestra para medición de azúcares.

Para la preparación de la muestra a analizar se pesa con precisión cuatro gramos de la misma y se adiciona en un matraz y se afora hasta 100 mL con agua destilada estéril, y posteriormente filtrar con una membrana de 0,45 μm antes de inyectar la muestra en el equipo.

4.4.6.2 Medición de azúcares (Sacarosa, Glucosa, Fructosa).

Para la medición de los azúcares simples se inyectan 20 μL de la solución inicial en el cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity, el cual está equipado con una columna de separación de intercambio iónico marca Hi-Plex y tipo Ca de longitud 300 x 7,7 mm de diámetro.

Condiciones para el análisis cromatográfico:

- ✓ Fase móvil: Agua destilada.
- ✓ Velocidad de flujo: 0,600 mL/min
- ✓ Temperatura de la columna: 84.99 °C
- ✓ Duración de la carrera: 16 min

4.4.6.3 Identificación y cuantificación de los azúcares (Sacarosa, Glucosa, Fructosa):

- Para la identificación de los azúcares se inyectaron los patrones de azúcares preparados previamente y fueron comparados los tiempo de retención obtenidos para los patrones con los de la muestras.
- Para la cuantificación de los azúcares identificados, se realizó una curva de calibración para cada uno de ellos usando las soluciones patrones descritas al comienzo del método (Anexo 3), e interpolando el valor del área obtenida para cada azúcar identificado en la recta de regresión respectiva. El contenido final de azúcares se expresó en porcentaje peso-peso (%P/P) de producto.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Mes / Semana	Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
ACTIVIDAD	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inicio de pasantía		X																						
Inducción en el laboratorio			X																					
Preparación de material para el análisis microbiológico de rutina			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de materiales en proceso y producto terminado por siembra en placa y filtración por membrana, respectivamente								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en refinería y elaboración								X				X			X				X					
Asignación de la propuesta de trabajo de grado				X																				
Modificación de la propuesta de trabajo de grado asignada inicialmente												X	X	X										
Revisión bibliográfica					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Aislamiento y conservación de bacterias ácido lácticas					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Identificación de bacterias ácido lácticas mediante API																		X	X					

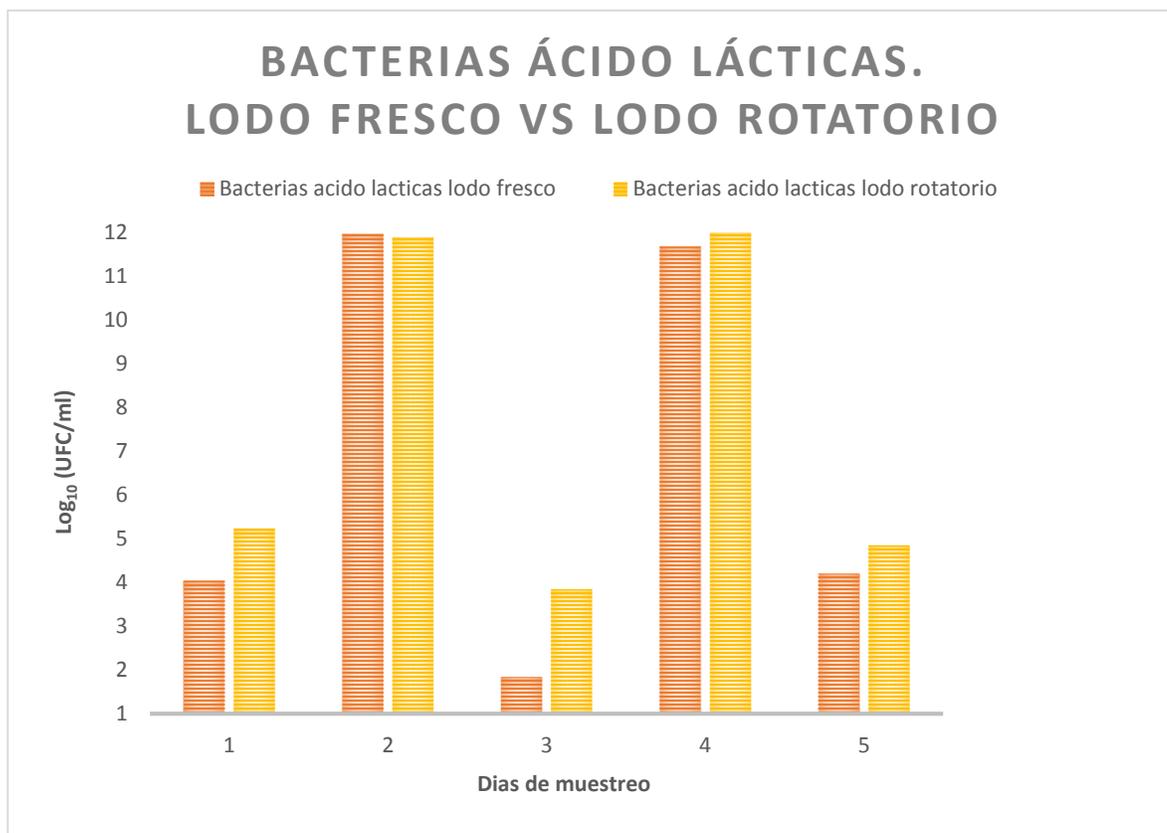
Mes / Semana	Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Identificación de los puntos de muestreo del lodo antes y después de entrar al filtro rotatorio										X	X													
Primera entrega preliminar: título, Introducción, objetivos, metodología, bibliografía											X	X												
Toma de muestra directa de los lodos del clarificador y del filtro rotatorio												X	X	X	X	X								
Análisis microbiológicos, HPLC y pruebas físico-químicas a las muestras de lodos												X	X	X	X	X								
Lectura de los resultados												X	X	X	X	X								
Segunda entrega: Cronograma de actividades, resultados, bibliografía																	X							
Análisis de los resultados																X	X	X	X					
Conclusiones																			X					
Tercera entrega: revisión del trabajo para el visto bueno																			X					
Entrega del trabajo con el visto bueno																				X				
Sustentación del trabajo de grado																					X			

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Para la caracterización de los lodos obtenidos saliendo del clarificador y del filtro rotatorio se realizaron diferentes análisis fisicoquímicos (acidez láctica, acidez volátil, pH, °brix, sacarosa-fructosa-glucosa por HPLC y dextranas) con el fin de determinar el comportamiento de los lodos durante el proceso de filtración por rotatorios, adicionalmente se realizaron análisis microbiológicos para establecer la microbiota presente en estos materiales.

En la gráfica 1 se presentan los resultados del crecimiento diario de BAL, tanto del lodo fresco como del lodo rotatorio. Para facilitar la interpretación de los resultados los recuentos de unidades formadoras de colonias por ml, se expresan en logaritmo base 10 (Log_{10} UFC/ml).



Gráfica 1. Bacterias ácido lácticas en cada día de muestreo.

Como puede verse en la gráfica 1, la microbiota en cada uno de los días de muestreo varía de un día a otro, esto se refleja por los recuentos que aumentan o disminuyen de acuerdo a los procesos llevados a cabo en la planta en cuanto a limpieza y sanitización se refiere ya que esto tiene un efecto notorio en la disminución de la microbiota presente en los lodos que son procesados y filtrados.

En el caso de los lodos frescos, es decir aquellos que han salido del clarificador en dirección al tanque mezclador de cachaza donde serán mezclados con bagacillo y posteriormente filtrados, tuvieron variaciones significativas en la concentración de bacterias ácido lácticas (Gráfica 1), la baja población bacteriana en los días 1, 3 y 5 está relacionada con los lavados de los filtros rotatorios y su encalada, en este proceso drenan los filtros para poder lavarlos por completo tanto adentro donde circulan los lodos con bagacillo, como afuera de los pisteros de tela corta donde se encuentra adherida la cachaza que será enviada a compostaje, posteriormente se adiciona cal, esto tiene un efecto alcalinizante que permite aproximarse a la neutralización del pH de los materiales que circulan en los filtros, además tiene un efecto desinfectante que disminuye la concentración de BAL notoriamente.

En los días 2 y 4 no se presentaron protocolos de limpieza y sanitización de los filtros, por lo tanto la población bacteriana allí presente aumentó considerablemente en ambos lodos, esto probablemente debido a la recirculación del lodo hacia el tanque mezclador de cachaza y de regreso al filtro rotatorio, este tiempo en que el lodo es retenido y recirculado permite la proliferación bacteriana. Las BAL se clasifican según su temperatura de crecimiento en mesófilas (20 - 25°) y termófilas (40 – 45°C) (Parra, 2010), la temperatura de los filtros rotatorios está entre 65 y 70°C y aun así las BAL proliferan allí y en los lodos frescos.

Como medio de recuperación y recuento de BAL, se empleó el agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe), el cual permite un abundante desarrollo de todas las especies de bacterias lácticas gracias a la peptona y glucosa que constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. Por otra parte, el monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Se obtuvieron 4 asilamientos de cada lodo, los cuales fueron caracterizados macroscópicamente en agar MRS con azul de anilina y cuyos resultados son mostrados en la tabla 1. El colorante azul de anilina facilita la identificación de las BAL ya que estas bacterias lo asimilan tomando un color azul que permite

diferenciarlas de otros microorganismos. Por otra parte, a las colonias aisladas se les realizó una caracterización microscópica a nivel de coloración de Gram, la cual se presenta en la tabla 2.

Tabla 1. Caracterización macroscópica de las BAL aisladas en agar MRS con azul de anilina.

Colonia	Color	Elevación	Textura	Brillo	Forma	Borde	Tamaño mm
Lodos frescos saliendo del clarificador							
L1	Azul	Convexa	Dura	Opaca	circular	Definido	2-3
L2	Azul	Convexa	Cremosa	Brillante	circular	Definido	3
L3	Azul	Convexa	Cremosa	Brillante	circular	Definido	2-3
L4	Azul	Convexa	Cremosa	Brillante	circular	Definido	3
Lodos del filtro rotatorio							
M1	Azul	Convexa	Cremosa	Brillante	circular	Definido	2-3
M2	Azul	Convexa	Cremosa	Brillante	circular	Definido	3
M3	Azul	Convexa	Dura	Opaca	circular	Definido	3
M4	Azul	Convexa	Dura	Opaca	circular	Definido	2-3

Fuente: Autor

Los aislados fueron oxidasa y catalasa negativas, y Gram positivos (Tabla 2), las morfologías encontradas fueron cocos y bacilos.

Tabla 2. Caracterización microscópica mediante tinción Gram de las BAL aisladas.

Colonia	Morfología	Gram
Lodos frescos saliendo del clarificador		
L1	Cocos	+
L2	Cocos	+
L3	Bacilos	+
L4	Bacilos	+
Lodos del filtro rotatorio		
M1	Bacilos	+
M2	Bacilos	+
M3	Bacilos	+
M4	Cocos	+

Fuente: Autor

De los aislamientos obtenidos anteriormente se realizaron siembras en agar MRS suplementado con 10% de sacarosa, con la finalidad de determinar si los microorganismos hallados pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (BALPE), estas bacterias emplean la sacarosa para la producción de exopolisacáridos como las dextranas. Como resultado se obtuvo que las colonias identificadas como L1, L2 y M4 producían las dextranas, caracterizadas por su apariencia como gotas de agua, blandas y de forma irregular (Anexo 7), las dextranas se forman extracelularmente por la acción de la enzima dextrano-sucrasa, una glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de residuos glucosídicos obtenidos de la hidrólisis de la sacarosa a un polímero de dextrano, liberando D-fructosa (Serrano, 2006).

El método rápido API empleado para la identificación de las BAL de los lodos, permite obtener un perfil bioquímico para cada microorganismo, el cual es comparado con la base de datos buscando la proximidad relativa a diferentes taxones, de esta forma se determina el porcentaje de identificación (%ID). La proximidad al perfil más típico en cada taxón está dada por el índice T (T). El taxón más típico es el que no tenga pruebas en contra de la identificación, en relación al porcentaje mostrado en la base de datos para el taxón en cuestión. El %ID (o suma de %ID) ≥ 80 se tiene en cuenta para seleccionar él o los taxones propuestos para la identificación. Un comentario seleccionado basado en el %ID (o suma de %ID) y el índice T (o suma de índices T), refleja la fiabilidad de la identificación (Apiweb, 2011).

En la tabla 3 se muestran los microorganismos identificados mediante API, cada uno con su correspondiente %ID y T.

Tabla 3. Resultados de la identificación microbiológica por API.

Colonia	Identificación mediante API	% ID	T
Lodos frescos saliendo del clarificador			
L1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i>	86,9	0,42
L2	<i>Leuconostoc lactis</i>	88,6	0,84
L3	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	76,1	0,91
L4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	98,9	0,85
Lodos del filtro rotatorio			
M1	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	76,1	0,91
M2	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	66,3	0,24
M3	<i>Lactobacillus lindnerii</i>	63,8	0,6
M4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>cremoris</i>	78,4	0,12

Fuente: Autor

En los lodos frescos se obtuvieron: *Leuconostoc lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* con buena identificación de los dos, es decir con perfiles bioquímicos confiables. En los lodos del filtro rotatorio se obtuvieron: *Carnobacterium maltaromaticum* y *Lactobacillus lindnerii*, en este caso ambos perfiles bioquímicos fueron tomados como dudosos debido a que los %ID y T, son bajos para los dos microorganismos, esto supone que la identificación no es certera debido a que los taxones más cercanos al típico presentan varias pruebas en contra que no permiten asociarlos a un taxón definido ni siquiera a nivel de género. Por otra parte, en los dos lodos se encontró coincidencia de dos microorganismos: *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* con un perfil dudoso, por las razones explicadas anteriormente y *Lactobacillus fructivorans* con un perfil que determinó una buena identificación a nivel de género ya que a pesar de tener bajo %ID su índice T es alto, lo que indica que el género hallado es confiable.

6.2 RESULTADOS FISICOQUÍMICOS

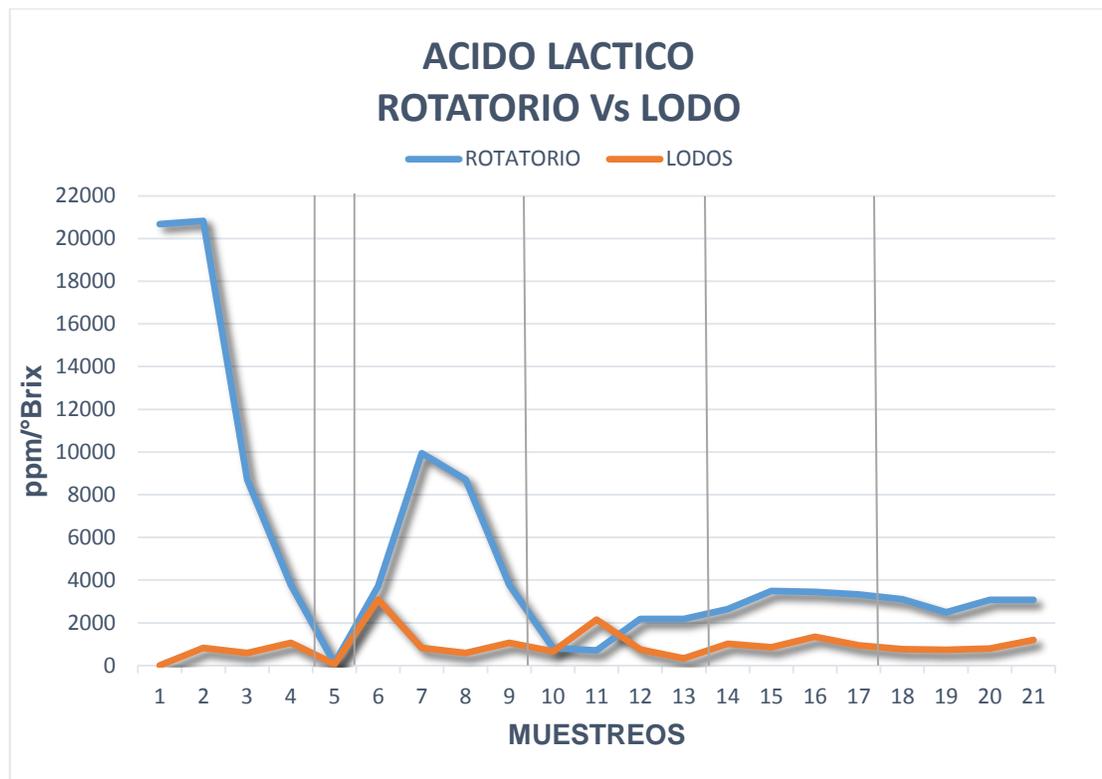
Las tablas de resultados fisicoquímicos obtenidos en cada uno de los tiempos tomados en los días de muestreo de lodos frescos se muestran en el Anexo 5 y del lodo del filtro rotatorio se muestran en el Anexo 6.

A continuación se presentan los resultados mostrados en forma de gráficas, y para aclarar la lectura de los mismos, con excepción de las gráficas 5 y 6, los datos mostrados en las restantes gráficas no se separan por días de muestreo sino que están representados cada uno de los tiempos de muestreo para cada día, de tal forma que facilitara monitorear la evolución de cada parámetro fisicoquímico evaluado. Las horas de muestreo fueron 8 a.m., 10 a.m., 12 m y 2 p.m., de tal forma que los puntos 1, 2, 3 y 4 corresponden a los tiempos del día 1, el punto 5 corresponde a las 8 a.m. del día 2, los puntos 6 al 9 incumben a los tiempos del día 3, los puntos 10 al 13 conciernen a los tiempos del día 4, los puntos 14 al 17 a los tiempos del día 5 y los puntos 18 al 21 hacen alusión a los tiempos del día 6.

De otra forma, los datos están dados en partes por millón / °Brix (ppm/°Brix), esto permite determinar la concentración del metabolito teniendo en cuenta la concentración de sólidos disueltos en una solución de sacarosa, que en este caso son las muestras de los lodos, las cuales son filtradas antes de realizar la medición de los °Brix permitiendo eliminar los sólidos solubles en la muestra que puedan causar interferencia en la medición.

6.2.1 Acidez láctica.

La medida de acidez láctica consiste en la oxidación del ácido láctico (lactato) a piruvato mediante nicotinamida-adenina – dinucleotido (NAD) bajo la acción catalítica de la enzima lactato deshidrogenasa. La NADH aquí formada, en presencia de diaforasa, reduce una sal de tetrazolio a un forzano azul que se determina reflectométricamente (Reflectómetro EMD Millipore Corporation 2013). Los resultados de la acidez láctica en los lodos frescos y del filtro rotatorio son mostrados en la gráfica 2.



Gráfica 2. Acidez láctica en los lodos frescos y del filtro rotatorio.

Como puede verse en la anterior gráfica, durante los muestreos realizados se obtuvo que la acidez láctica del filtro rotatorio es elevada al inicio (puntos 1 – 4 que corresponden al primer día de muestreo), y es debido a que no se habían realizado procesos de limpieza y sanitización, por ende la microbiota ácido láctica podía desarrollarse en estos materiales, por otra parte se tiene que en ese día la molienda de caña fue bastante alta (14.323 Ton) de modo que el caudal de los lodos aumentó y a su vez la sacarosa presente en ellos dando paso a una mayor producción de ácido láctico por parte de las BAL en el tiempo que el lodo permanece recirculando, esto explica por que en el lodo fresco el ácido láctico no

fue tan elevado ya que no tiene ningun tiempo de retención que permita el aumento de la microbiota ácido láctica.

En los días 2 y 3, se muestra una concentración de ácido láctico más baja que el primer día, sobre todo en el punto 5 (día 2), en ese día solo se realizó un muestreo al iniciar la jornada de trabajo y no pudo seguir el proceso debido a que se paró la producción. En la semana anterior a los días de muestreos 2 y 3 se habían realizado lavados y encalado de los filtros rotatorios, además en el día 2 se realizó aseo de los pisteros de tela corta, es decir de la parte externa de los filtros, esto contribuyó a la disminución de la microbiota ácido láctica en los lodos del filtro rotatorio en el día 2 y por ende a la cantidad de ácido láctico producido.

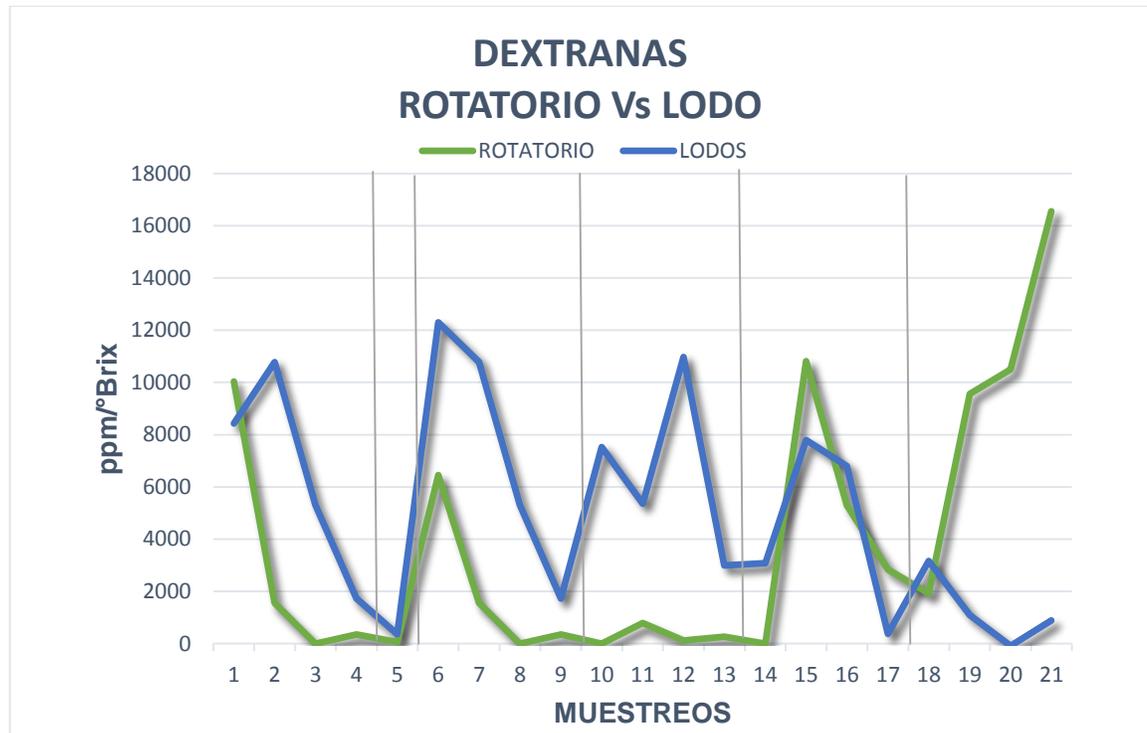
Para el día 3 la concentración aumentó un poco posiblemente debido a un paro en la molienda que duró máximo 4 horas y media, tiempo en el que las BAL pudieron proliferar libremente y producir sus metabolitos, mientras que en los lodos frescos la concentración fue baja ya que el flujo de lodo no era representativo. En los días 4, 5 y 6 las concentraciones de ácido láctico no variaron mucho, permaneciendo casi constantes hasta el último día, esto se atribuye a varios factores, principalmente al lavado y encalado de los filtros realizado 24 horas antes del día 3, también se presentó baja cantidad de caña para la molienda en esos días (7,6 Ton en promedio), por lo tanto hubo bajo flujo de lodos frescos y baja población de BAL proveniente de procesos previos a la clarificación en el proceso de elaboración de azúcar lo que permitió un comportamiento menos variable del ácido láctico en ambos lodos.

6.2.2 Cuantificación de Dextranas

Las dextranas son solubles en agua pero insolubles en etanol, es por esto que al cuantificarlas mediante espectrofotometría los blancos llevan agua destilada, y la muestra lleva etanol, esto permite que las moléculas de dextranas presentes en la muestra se disocien y ocasionen una difracción del haz de luz que se hace incidir sobre la muestra.

Los resultados de las Dextranas de los lodos frescos del clarificador y del filtro rotatorio se presentan en la gráfica 3. En los muestreos realizados se observó que en general, las dextranas contenidas en el filtro rotatorio son menores que las contenidas en los lodos frescos, a excepción del último día donde la concentración de dextranas aumentó paulatinamente demostrando la presencia de microbiota ácido láctica productora de exopolisacáridos BALPE, en este caso corresponde al género *Leuconostoc* spp., que gracias a su capacidad de formar biopelículas,

puede sobrevivir más tiempo en las paredes del clarificador y aumentar su población, la producción de dextranas en los lodos del filtro rotatorio no fue muy elevada debido a que los filtros rotatorios son constantemente lavados y sanitizados eliminando los contaminantes que puedan allí encontrarse.



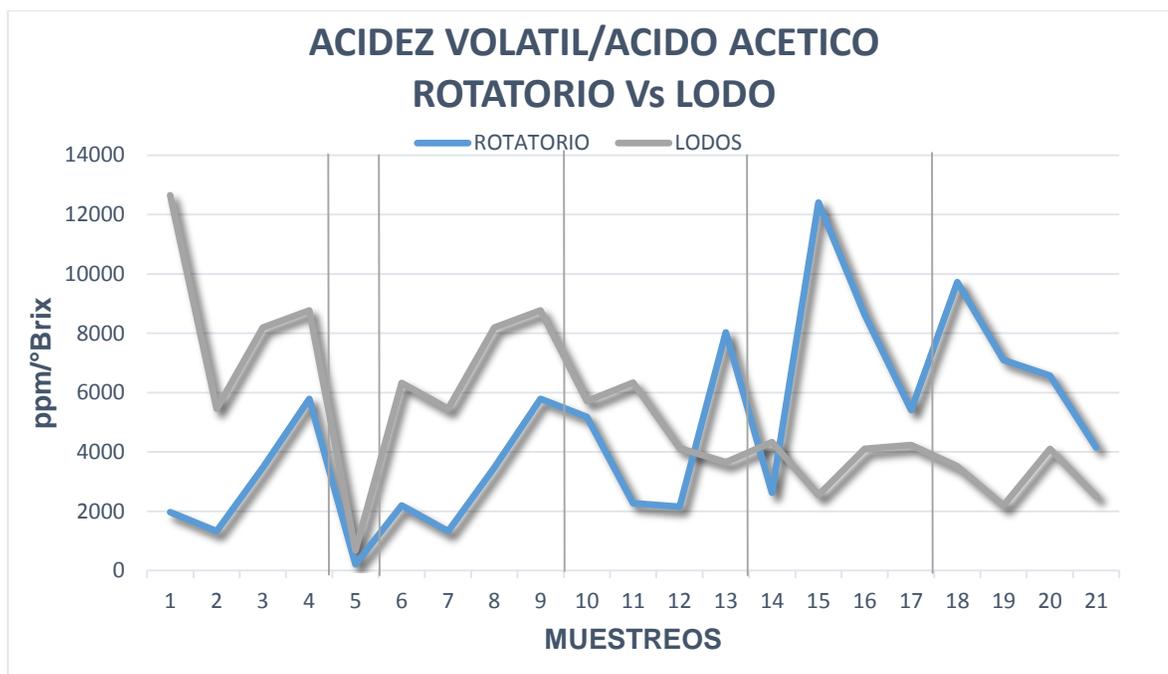
Gráfica 3. Dextranas de los lodos frescos del clarificador y del filtro rotatorio.

La dextrana es el polisacárido más estudiado por ser causante de problemas de fabricación de azúcar debido a las pérdidas de sacarosa que representan, además, obstruyen tuberías y bombas, afectan la polarización de la sacarosa resultando en lecturas falsas de pureza, aumentan la viscosidad de los materiales causando una cristalización defectuosa, forman alargamiento en los cristales, también forman biopelículas que albergan gran cantidad de microorganismos indeseados en el proceso del azúcar (Serrano, 2006).

6.2.3 Acidez volátil.

La acidez volátil se basa en la destilación directa para separar los ácidos volátiles de la muestra, que se cuantifican por valoración ácido-base con una solución patrón de hidróxido sódico. A la muestra se adiciona previamente ácido sulfúrico para evitar que el SO₂ pase al destilado y se valore como ácido sulfúrico.

En la gráfica 4 se presenta la acidez volátil / ácido acético obtenido de los lodos. Como puede verse los días 1 – 4 la concentración fue mayor en los lodos frescos que en el filtro rotatorio debido al lavado y encalado de los filtros, lo que impidió la proliferación elevada de microorganismos productores de ácido acético, entre ellos las BAL heterofermentativas, mientras que en los días 5 y 6 fue mayor en los lodos del filtro rotatorio, esto se debe a bajas en la cantidad de caña molida (7,4 Ton) lo que impidió la llegada de lodos frescos al clarificador y por ende los filtros rotatorios mantuvieron retenidos los lodos permitiendo la producción de metabolitos en ellos.



Gráfica 4. Acidez volátil en los lodos frescos y del filtro rotatorio.

6.2.4 Cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa.

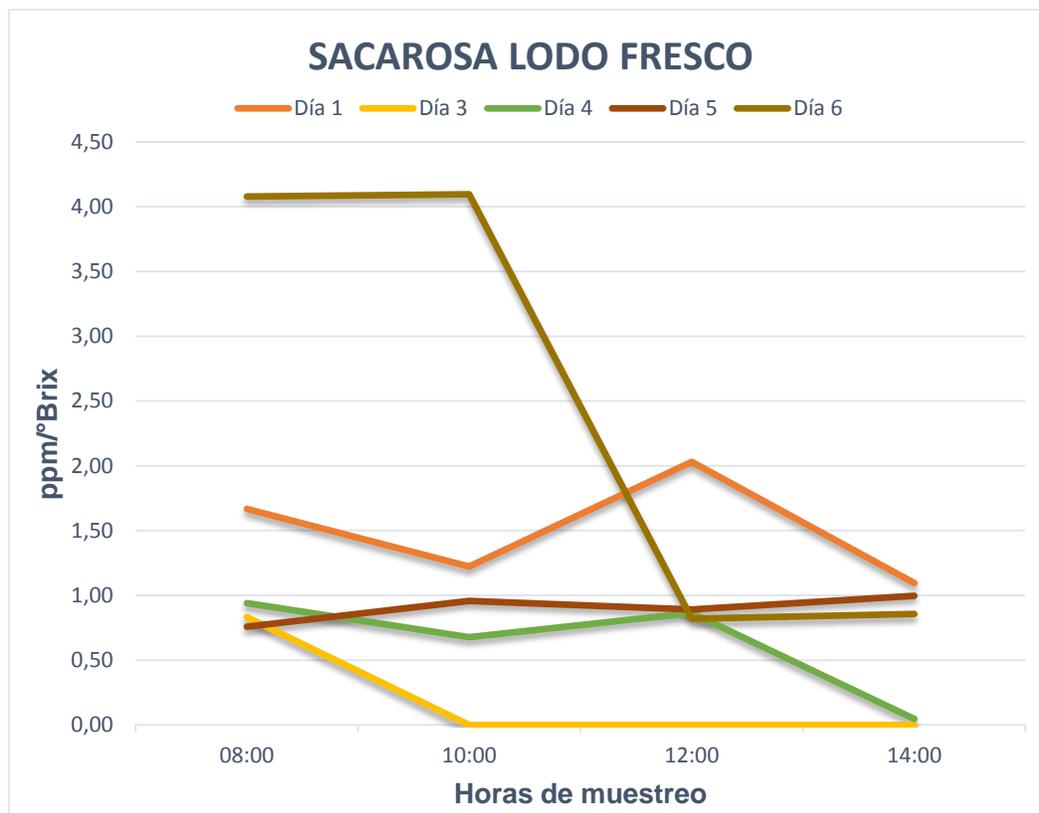
La cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se basa en la separación de los azúcares de acuerdo a su tamaño, estos son transportados (fase móvil) a lo largo de un tubo-columna (fase estacionaria), las moléculas más largas que no entran fácilmente en los poros y las que no son retenidas se eluyen con más rapidez, siendo detectadas por el cambio en el índice de refracción de la fase móvil al salir de la columna, que genera una señal que es registrada para su cuantificación (Herrera, 2011).

En las gráficas 5 al 8 se presentan los resultados de la sacarosa (gráficas 5 y 6), glucosa (gráfica 7) y fructosa (gráfica 8).

En los resultados obtenidos de HPLC se tiene que la sacarosa (disacárido formado por una molécula de glucosa y una de fructosa) es el azúcar predominante en las muestras de lodos tanto frescos como del filtro rotatorio, las gráficas 5 y 6, se realizaron en función de los días de muestreo con el fin de diferenciar mejor las pérdidas originadas en cada día y no se tuvo en cuenta el día 2 debido a que solo había un dato cuyo valor es cero, por lo tanto no se puede determinar el deterioro de sacarosa en ese día.

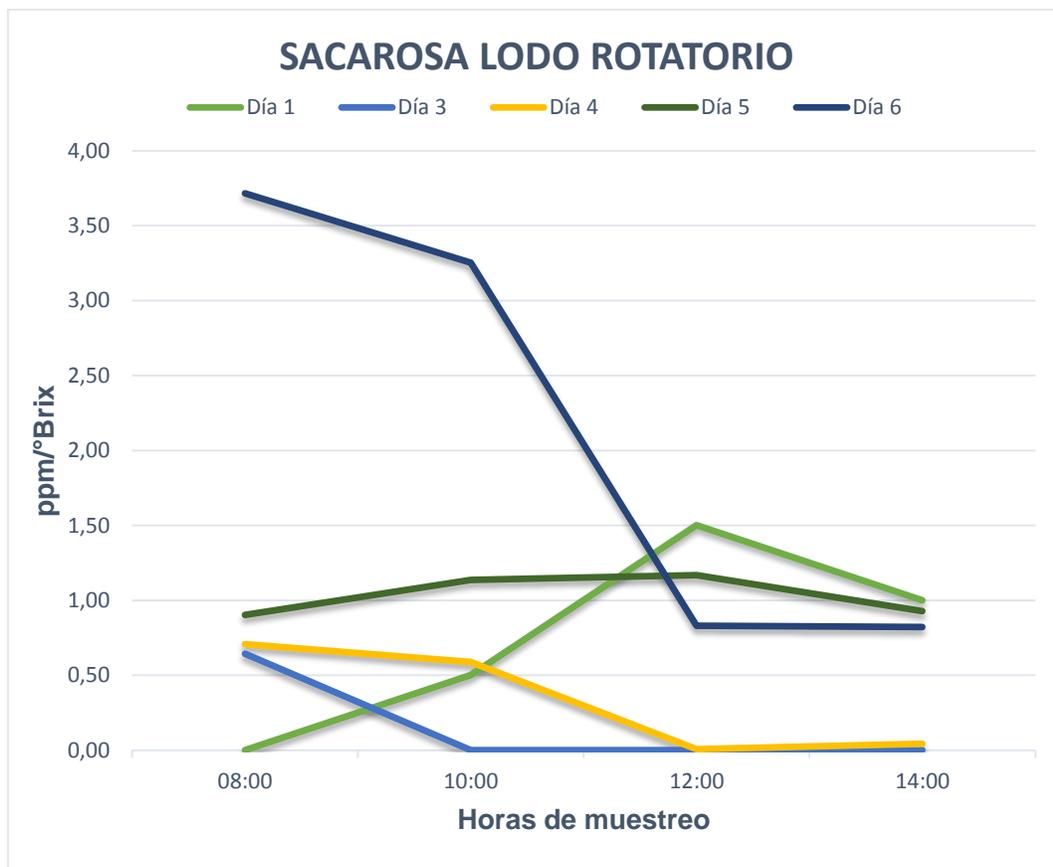
Para cuantificar la cantidad de sacarosa perdida en los lodos se halló la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales, y mediante una regla de tres simple se determinó el porcentaje de sacarosa perdido, tomando la concentración inicial del día como 100% y el resultado de la diferencia de concentraciones como el % a hallar.

En la gráfica 5 se muestra el comportamiento de la sacarosa en los lodos frescos, en cada tiempo de muestreo, comenzando a las 8:00 horas y finalizando a las 14:00 horas. En el día 1 la cantidad de sacarosa perdida fue el 34,13% del total de sacarosa contenida a las 8:00 H, pudo haber influido el hecho de que hubiese mayor cantidad de caña molida en ese día (14.323 Ton) produciendo un caudal de lodos mayor que no dio paso al deterioro por retención o bajo flujo, en el día 3 la pérdida fue del 100% debido a que solo se tuvo sacarosa al iniciar el día y en los demás muestreos (10:00, 12:00, 14:00 H) no hubo sacarosa detectada por el HPLC, esto probablemente debido a que la molienda paro por más de 4 horas causando una disminución del flujo de los lodos y de la sacarosa contenida en ellos, en el día 4 la sacarosa fue disminuyendo hasta tener una pérdida del 91,48%, para el día 5 esto cambio obteniéndose un % de perdida igual a cero ya que en este día la sacarosa varió mostrando mayor cantidad al final del día, y el día 6 la perdida fue del 78%, al igual que en el día 4, la perdida fue significativa debido a que el lodo de las primeras horas era muy rico en sacarosa en comparación con los lodos que llegaron en las horas posteriores, por lo tanto la disminución de la sacarosa se hizo muy evidente.



Gráfica 5. Sacarosa en el lodo fresco saliendo del clarificador.

En la gráfica 6 se muestra el comportamiento de la sacarosa en los lodos del filtro rotatorio, en cada tiempo de muestreo, comenzando a las 08:00 horas y finalizando a las 14:00 horas. En el día 1 no hubo pérdida de sacarosa debido a que a las 08:00 no había sacarosa en la muestra mientras que a las 14:00 si se detectó, por ello se muestra un incremento en su concentración en vez de una pérdida, en el día 3 el deterioro fue total ya que solo hubo sacarosa en la muestra de las 08:00 y en las demás no, por bajo caudal de lodos debido a un paro de 4 horas en la molienda, por lo tanto la sacarosa inicial fue extraída o empleada por los microorganismos, en el día 4 el deterioro fue del 94,36%, en el día 5 fue de cero debido a que la concentración de sacarosa se mantuvo en niveles casi constantes a lo largo del día impidiendo observar disminución significativa, en el día 6 fue de 77,95%, al igual que en el día 4, la pérdida fue significativa debido a que el lodo de las primeras horas era rico en sacarosa en comparación con los lodos que llegaron en las horas posteriores, esto hizo notar la disminución de sacarosa de forma más significativa que en los otros días.

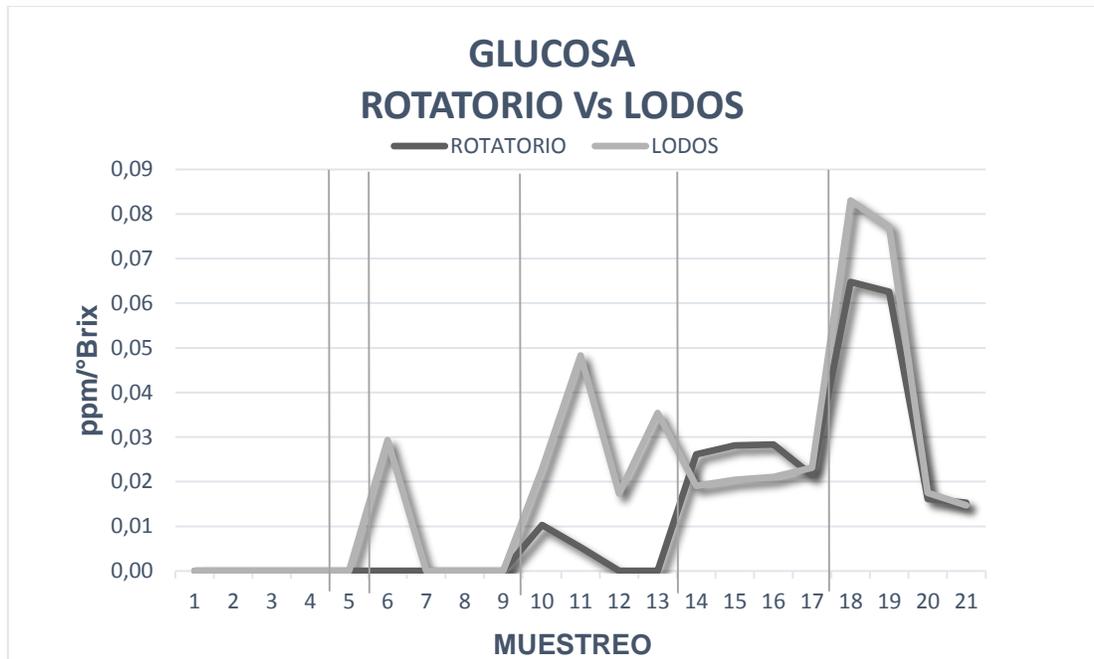


Gráfica 6. Sacarosa en el lodo del filtro rotatorio.

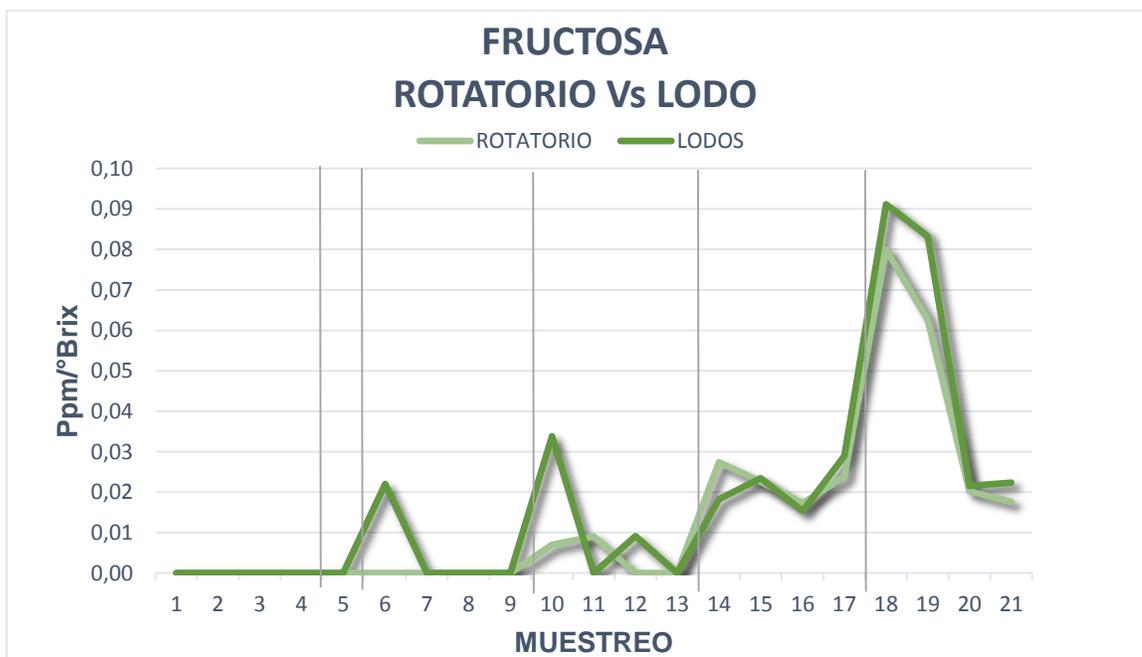
Al realizar un promedio entre los % de deterioro de sacarosa en cada día se tiene que en el lodo fresco se dio la mayor pérdida correspondiente al 60,72% frente a 54,46% en el lodo del filtro rotatorio, esto es congruente con el proceso de elaboración del azúcar desde varios aspectos, comenzando porque es de esperarse que haya mayor concentración de sacarosa en el lodo fresco (aprox. 1,14 ppm/°Brix) que el lodo de los filtros rotatorios (aprox. 0,886 ppm/°Brix) ya que esa es la finalidad de la filtración, extraer la mayor cantidad posible de sacarosa del lodo para ser llevada a los evaporadores y ser procesada hasta convertirse en el azúcar comercial, por otra parte se tiene el lavado y encalado de los filtros que reducen la microbiota de los lodos y por ende disminuye el deterioro de la sacarosa.

La cantidad de glucosa (Gráfica 7) y fructosa (Gráfica 8) obtenidas fueron casi nulas debido a que sus concentraciones no fueron representativas ya que no alcanzaron más de 0,1 ppm/°brix, aun así se dio un aumento en el día 6 de

muestreo respecto al día 1 donde la concentración fue cero debido a que ese día hubo mayor deterioro de sacarosa asociado a la microbiota presente en los lodos, dejando monosacáridos libres de glucosa y sacarosa.



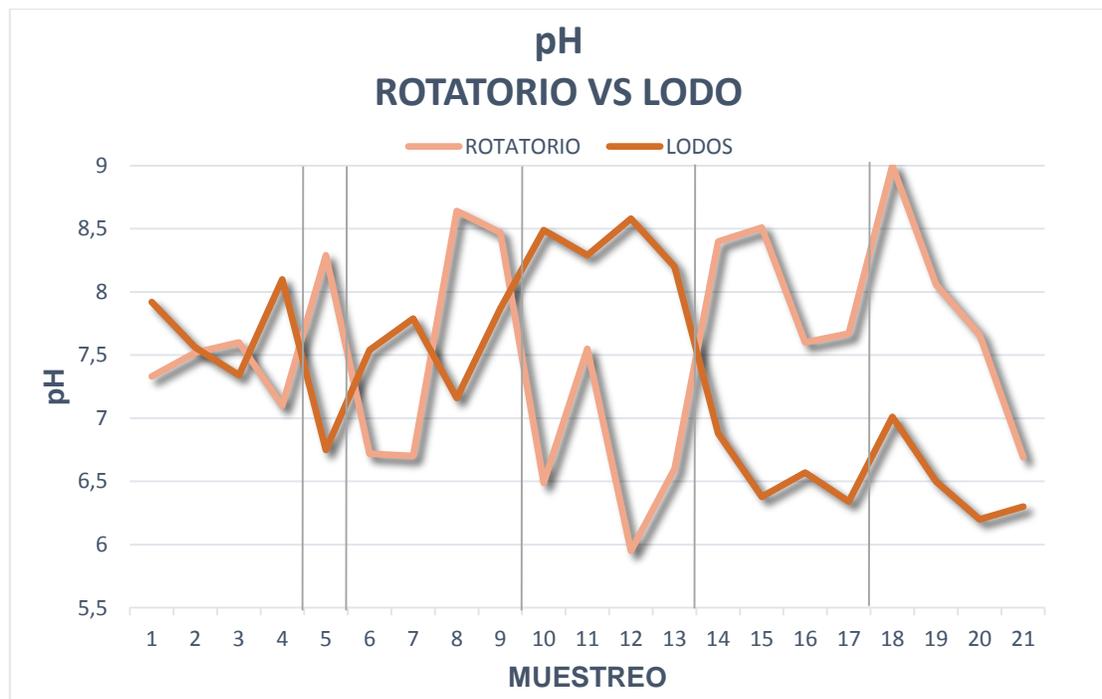
Gráfica 7. Glucosa en los lodos del clarificador y del filtro rotatorio.



Gráfica 8. Fructosa de los lodos del clarificador y del filtro rotatorio.

6.2.5 Evolución del pH.

En la gráfica 9 se muestra el comportamiento del pH en los lodos, debido a que variaban mucho los datos en cada día de muestreo, no se toma el pH como referencia de la producción de acidez láctica ni volátil, ya que el pH se ve alterado por la acción del encalado que lo alcaliniza a pesar de que en los lodos se demuestre la presencia de ácidos, por ello no se tiene como una característica representativa de los lodos en este trabajo.



Gráfica 9. pH de los lodos del clarificador y del filtro rotatorio.

7. CONCLUSIONES

Al caracterizar fisicoquímicamente los lodos frescos obtenidos saliendo del clarificador y los lodos provenientes del filtro rotatorio se evidenció que estos lodos contienen metabolitos como el ácido láctico, ácido acético y dextranas, además de microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp. *Leuconostoc* spp y *Carnobacterium* spp.

Se monitoreó la producción de metabolitos microbianos en los lodos frescos obtenidos saliendo del clarificador y los lodos provenientes del filtro rotatorio encontrando que los metabolitos más representativos encontrados son el ácido láctico, ácido acético y dextranas cuyas concentraciones varían de acuerdo a los procesos de limpieza y sanitización, además de otros factores como las toneladas de caña molida y los tiempos de paro de los molinos y/o del proceso.

Se cuantificaron las pérdidas de sacarosa en los lodos frescos obtenidos saliendo del clarificador y los lodos provenientes del filtro rotatorio estimando un deterioro del 60,72% y 54,46% respectivamente, correspondientes a un mes de análisis realizando un muestreo completo (8 a.m., 10 a.m., 12 m y 2 p.m.,) un día semanal durante 5 semanas.

La identificación de la microbiota ácido láctica reveló que los lodos frescos obtenidos saliendo del clarificador y los lodos provenientes del filtro rotatorio están compuestos en su mayor parte por los géneros *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp., siendo este último un microorganismo productor de exopolisacáridos.

8. RECOMENDACIONES

Realizar el seguimiento fisicoquímico de los lodos obtenidos saliendo del clarificador y los provenientes del filtro rotatorio acompañado de un seguimiento microbiológico que permita correlacionar los datos y llegar a una caracterización más profunda.

9. GLOSARIO

Azúcares invertidos: Mezcla equimolecular de glucosa y fructosa, como resultado de la hidrólisis o inversión de la sacarosa.

Bacterias mesofílicas de ácido láctico: bacterias que forman colonias a 30 °C en un medio selectivo sólido (MRS a pH 5,7) bajo las condiciones de ensayo especificadas en la presente norma.

Diaforasa: pertenece al grupo de las deshidrogenasas, enzimas capaces de eliminar hidrógeno de los sustratos y transferirlo a otra sustancia aceptora.

10. REFERENCIAS

- ACEVEDO, A.C.; LLANO, F.; OCHOA, J.C.; PARRA, J.A.; CABALLERO, M.R.; FIGUEROA, M.; MARRIAGA, N.; VALLEJO, R.; SALAZAR, S. 2005. Producción de alcohol carburante: Informe Técnico. 101p. Citada por GALLEGO, C. 2007.
- Apiweb. BioMérieux. 2010. Disponible en: www.biomerieux.com
- Apiweb. BioMérieux. 2011. Expresión de resultado. Disponible en: apiweb.biomerieux.com
- BAI F, ANDERSON W, MOO-YOUNG M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*; 26(1): 89-105. Citado por Mariscal, J. 2011.
- BioMérieux® S.A. api® 50 CHL Medium 07486G - es - 2006/09.
- CABEZA, E. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla – Colombia. 15 y 16 de septiembre.
- CUERVO, R., LEDESMA, J., VANEGAS, J., ARGOTE, F. 2010. Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. Universidad de San Buenaventura, Facultad de ciencias Agropecuarias. Vol. 8. N°2. Julio – Diciembre.
- GALLEGO, C. 2007. Influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A. Universidad tecnológica de Pereira. Escuela de tecnología química. Programa de química industrial. Pereira.
- HERRERA, A. 2011. Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio pichichi. Pereira. Trabajo de grado de tecnóloga en química, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología Química.
- International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. 2002. Determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC. ICUMSA. Método GS7/4/8-23.
- INCAUCA S.A. a. Análisis de materiales en proceso. Análisis de jugos. pH.
- INCAUCA S.A. b. Análisis de materiales en proceso. Análisis de jugos. °Brix.

- INCAUCA S.A. c. Análisis de materiales en proceso. Análisis de jugos. Determinación de dextranas.
- INCAUCA S.A. d. Análisis de materiales en proceso. Análisis de jugos Determinación de acidez volátil / ácido acético
- INCAUCA S.A. 2010 – 2011. Informe de sostenibilidad.
- INCAUCA S.A. 2011a. Proceso de obtención de azúcar. Cosecha (en línea). Fecha de consulta: agosto de 2015. Disponible en: <http://www.incauca.com/content/Cosecha>
- INCAUCA S.A. Proceso de obtención de azúcar. Fábrica. (en línea). 2011b. Fecha de consulta: agosto de 2015. Disponible en: <http://www.incauca.com/content/Calentamiento-y-Clarificaci-n#menu-878>
- LARRAHONDO, J. E. 1995. Calidad de la caña de azúcar. En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, CENICAÑA. p. 337-354.
- LUCENA, B., DOS SANTOS., MOREIRA, J., MOREIRA, A., NUNES, A., AZEVEDO, V.,... MORAIS, M. 2010. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. BMC Microbiology, 10:298. doi:10.1186/1471-2180-10-298.
- LYHS, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. ISBN 952-91-4642-6. citado por CABEZA, E. 2006.
- MARISCAL, J. 2011. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Grupo de investigación en procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Manizales, Colombia.
- MOSQUERA, H., GARZÓN, G., & RUBIO, J. 2012. Evaluación, análisis y cuantificación de pérdidas de sacarosa de miel final en los procesos de cristalización, agotamiento y centrifugación del Ingenio María Luisa. Ingenium, 6(12), 69-75
- Norma Técnica Colombiana NTC 5034 de 2002: microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico.
- NOVA, A. 2015. Cuantificación de pérdidas de sacarosa en el jugo diluido de un ingenio de azúcar en el Departamento de Cauca, Colombia. Trabajo de pregrado en Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Universidad de Pamplona, Colombia. Pp. 57.

- OLIVA-NETO, P., DORTA, C., AZEVEDO, A., GOMES, V., FERNANDES, D. 2013. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments. Ed. A. Méndez-Vilas. p.371-379.
- PARRA, R. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Rev.Bio.Agro vol.8 no.1 Popayán Jan./June
- RAVELO S. Y RAMOS E. L. 2003. La Calidad del Azúcar Crudo y los Azúcares que Impurifican la Sacarosa en los Jugos de Caña. Azúcar XXXII, 2, 39-41. Cuba.
- 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. Bogotá D.C., 173 p. Trabajo de grado de pregrado en Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- TOBÍA, C., URIBE, L., VILLALOBOS, E., SOTO, H. FERRIS, I. 2003. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias Ácido lácticas en ensilajes de soya. Agronomía Costarricense 27(2): 21-27.

11. ANEXOS

Anexo 1. API® 50 – CHL.

Se muestra el API utilizado para la identificación de bacterias ácido lácticas. Es una galería conformada por 50 microtubos (Apiweb®. 2010)



Anexo 2. Curva patrón para dextranas.

Para la determinación de dextranas es necesaria la preparación de una curva patrón, estos estándares se preparan a partir de la solución estándar de dextrana, adicionando en orden ácido tricloroacético, solución de sacarosa 50%, solución estándar de dextrana y agua destilada a diferentes volúmenes. Para un volumen total en los estándares de 10 mL y en el blanco de 10 mL.

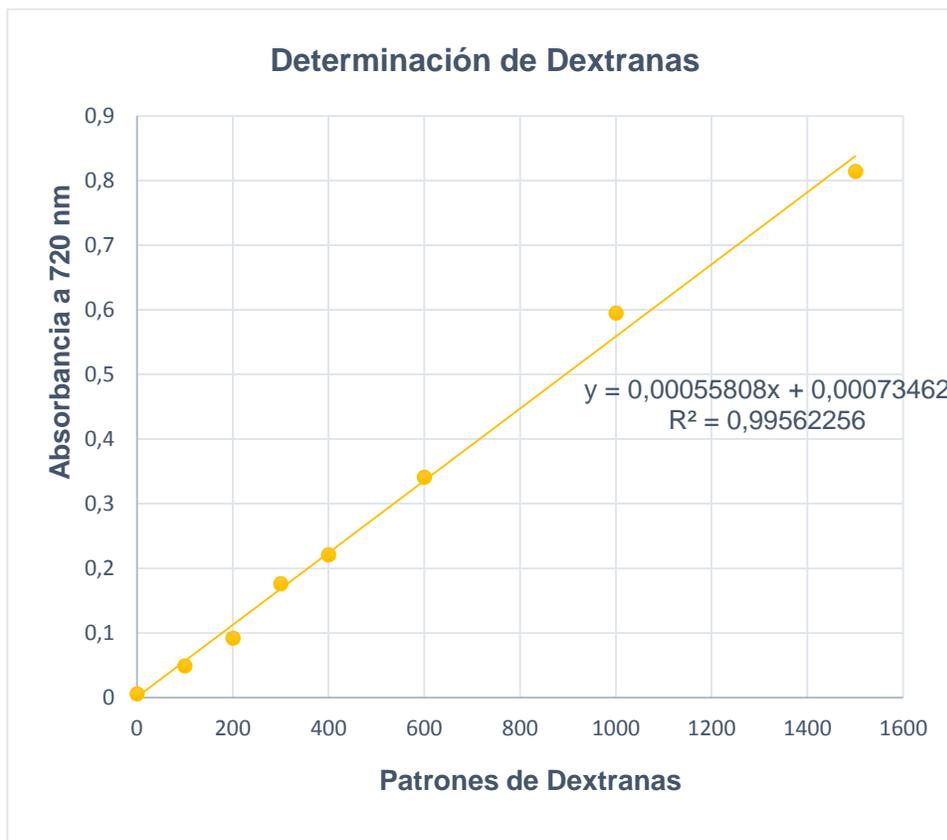
Estándares a diferentes concentraciones de sacarosa y dextranas para la curva patrón:

Estándar	Ácido tricloroacético 10% (mL)	Solución de sacarosa 50% (mL)	Solución estándar de dextrana 2000 ppm (mL)	Agua destilada (mL)
S1	0,5	4,0	0,0	5,5
S2	0,5	4,0	0,5	5,0
S3	0,5	4,0	1,0	4,5
S4	0,5	4,0	1,5	4,0
S5	0,5	4,0	2,0	3,5,
S6	0,5	4,0	3,0	2,5
S7	0,5	4,0	4,0	1,5
S8	0,5	4,0	5,0	0,5
Blanco	0,5	4,0	0,0	15,5

- Adicionar 10 mL de etanol absoluto al primer patrón de dextrana. Agitar suavemente el erlenmeyer durante la adición de alcohol.
- Inmediatamente después de terminar la adición de etanol, empezar a contar el tiempo con cronómetro (20 min).
- De la misma manera descrita, adicionar etanol a cada uno de los patrones con intervalos de dos minutos, exceptuando el blanco.
- Después de veinte minutos, leer la absorbancia de cada uno de los patrones en el espectrofotómetro a longitud de onda igual a 720 nm.
- Elaborar la curva de calibración colocando mg de dextrana / mL en la abscisa y lecturas de absorbancia en la ordenada. Debe elaborarse una

nueva curva patrón cada que se use un nuevo frasco de alcohol. (INCAUCA S.A.)

ppm Dextranas	Absorbancia 720 nm
0	0,006
100	0,049
200	0,092
300	0,176
400	0,221
600	0,341
1000	0,595
1500	0,814



$$\text{ppm de Dextranas} = \frac{\text{Absorbancia} - 0,00073462}{0,00055808}$$

Anexo 3. Preparación de los patrones de azúcar para la determinación de Sacarosa, Glucosa y Fructosa mediante HPLC

- Se inicia preparando los patrones de calibración, se disuelve las muestras de azúcar seco pesadas con una precisión de $\pm 0,0000$ g en matraces aforados con agua destilada a las distintas concentraciones en porcentaje mostradas en el siguiente cuadro:

Azúcar	Concentración (expresado % p/p)		
	0,25	0,31	0,37
Sacarosa	0,25	0,31	0,37
Fructosa	0,04	0,08	0,11
Glucosa	0,03	0,06	0,09

- Se filtra cada uno de los patrones con un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ antes de inyectarlos en el equipo HPLC.

Anexo 4. Recuento de BAL de los lodos en cada día de muestreo

Día de muestreo	Bacterias ácido-lácticas (Log_{10} UFC/ml)	
	Lodos frescos	Lodos rotatorios
1	4,041392685	5,23044892
2	11,95424251	11,8750613
3	1,84509804	3,84509804
4	11,66275783	11,9777236
5	4,204119983	4,84509804

Anexo 5. Resultados fisicoquímicos de los lodos frescos saliendo del clarificador

Lodos frescos									
Hora	Muestreo	pH	°Brix	Acido lactico (ppm/Brix)	Acido volatil (ppm/Brix)	Dextranas (ppm/Brix)	Sacarosa/Brix	Glucosa/Brix	Fructosa/Brix
08:00	1	7,92	0,16	0	12649	8429	1,67	0,00	0,00
10:00		7,56	0,2	825	5457	10775	1,22	0,00	0,00
12:00		7,34	0,2	590	8186	5310	2,03	0,00	0,00
14:00		8,1	0,21	1057	8771	1729	1,10	0,00	0,00
08:00	2	6,75	2,24	68	680	362	0	0	0
08:00	3	7,54	1,33	3083	6326	12296	0,83	0,03	0,02
10:00		7,79	0,25	825	5457	10775	0,00	0,00	0,00
12:00		7,16	1,87	590	8186	5310	0,00	0,00	0,00
14:00		7,87	0,22	1057	8771	1729	0,00	0,00	0,00
08:00	4	8,49	2,03	660	5713	7526	0,94	0,02	0,03
10:00		8,29	1,58	2152	6333	5360	0,68	0,05	0,00
12:00		8,58	1,49	745	4121	10975	0,86	0,02	0,01
14:00		8,2	1,87	337	3648	2996	0,05	0,04	0,00
08:00	5	6,88	2,05	1010	4326	3082	0,76	0,02	0,02
10:00		6,38	1,34	851	2545	7791	0,96	0,02	0,02
12:00		6,57	1,22	1344	4101	6795	0,89	0,02	0,02
14:00		6,34	1,56	936	4227	375	1,00	0,02	0,03
08:00	6	7,01	1,94	763	3516	3165	4,08	0,08	0,09
10:00		6,5	2,18	729	2191	1090	4,10	0,08	0,08
12:00		6,2	1,44	792	4106	-91	0,82	0,02	0,02
14:00		6,3	1,27	1197	2507	884	0,86	0,01	0,02

Casilla resaltada en amarillo indica valor = 0.

Anexo 6. Resultados fisicoquímicos de los lodos obtenidos del filtro rotatorio

Lodos del Filtro Rotatorio										
Hora	Muestreo	pH	°Brix	Acido lactico (ppm/Brix)	Acido volátil (ppm/Brix)	Dextranas (ppm/Brix)	Sacarosa/ Brix	Glucosa/ Brix	Fructosa/ Brix	
08:00	1	7,33	0,22	20682	1964	10040	0,00	0,00	0,00	
10:00		7,52	0,18	20833	1326	1556	0,50	0,00	0,00	
12:00		7,6	0,21	8714	3465	0	1,50	0,00	0,00	
14:00		7,1	0,22	3773	5788	347	1,00	0,00	0,00	
08:00	2	8,29	3,5	111	214	53	0	0	0	
08:00	3	6,72	0,27	3707	2190	6455	0,64	0,00	0,00	
10:00		6,7	0,21	9952	1326	1556	0,00	0,00	0,00	
12:00		8,64	0,28	8714	3465	0	0,00	0,00	0,00	
14:00		8,47	1,83	3773	5788	347	0,00	0,00	0,00	
08:00	4	6,49	0,29	817	5175	0	0,71	0,01	0,01	
10:00		7,55	0,56	700	2274	785	0,59	0,01	0,01	
12:00		5,95	0,19	2174	2154	119	0,01	0,00	0,00	
14:00		6,6	0,85	2176	8026	267	0,04	0,00	0,00	
08:00	5	8,4	1,82	2643	2624	0	0,90	0,03	0,03	
10:00		8,51	1,43	3497	12403	10809	1,14	0,03	0,02	
12:00		7,6	1,16	3448	8625	5293	1,17	0,03	0,02	
14:00		7,67	1,47	3320	5414	2836	0,93	0,02	0,02	
08:00	6	9	1,24	3097	9719	1917	3,72	0,06	0,08	
10:00		8,06	1,73	2497	7098	9556	3,25	0,06	0,06	
12:00		7,66	1,66	3066	6575	10499	0,83	0,02	0,02	
14:00		6,69	1,81	3077	4146	16559	0,82	0,02	0,02	

Anexo 7. Dextranas producidas por BALPE en agar MRS suplementado con 10% de sacarosa

