

**CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN
CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA QUÍMICA

P R E S E N T A

CIRIA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ BERTHELY

México D.F.

marzo 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

JURADO DESIGNADO SEGÚN EL TEMA

Presidente:	MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ
Vocal	ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ
Secretario	LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS
Primer suplente	ALFONSO DURÁN MORENO
Segundo suplente	MARISELA BERNAL GONZÁLEZ

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL PROYECTO

LABORATORIOS 301, 302, 303 DEL CONJUNTO "E" DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y DE QUÍMICA AMBIENTAL, LIQAYQA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

FIDEICOMISO INGENIO SAN CRISTÓBAL 80333

ASESOR DEL TEMA:
PROFA. DRA.-ING. MARÍA DEL CARMEN DURÁN
DOMÍNGUEZ DE BAZÚA

SUSTENTANTE:
CIRIA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ BERTHEL Y

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Índice

	Página
GLOSARIO	9
RESUMEN	13
CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA	14
1.1. Presencia de dextranas	14
1.2. Condiciones del cañaveral y la zafra	16
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo general	18
1.3.2. Objetivos específicos	18
1.4. Metas	19
1.5. Alcances	19
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS	
2.1. Problemas causados por la dextrana	20
2.2. Problemas en la refinería	21
2.3. Métodos de análisis para dextranas	21
2.4. Efectos de las dextranas en análisis de polarización	24
2.5. Control	25
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Método para la cuantificación de microorganismos	26

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

3.2.	Procedimiento	26
3.3.	Preparación del medio de cultivo	27
		Página
3.3.1.	Análisis de dextranas por espectrofotometría UV-Visible	28
3.3.2.	Reactivos	28
3.3.3.	Preparación de reactivos	28
3.4.	Materiales y equipos de medición	29
3.4.1.	Materiales	29
3.4.2.	Equipos de medición	29
3.5.	Procedimiento	29
3.6.	Expresión de los resultados	30
3.6.1.	Cálculos	30
3.7.	Repetibilidad	31
3.8.	Medición de dextranas: Fundamentos para seleccionar la metodología	31
3.8.1.	Equipos	32
3.8.2.	Reactivos	32
3.8.3.	Métodos	32
3.8.4.	Cálculos	33
3.9.	Pruebas en ingenios cooperantes secundarios	33
3.10.	El ingenio azucarero cooperante principal	33
3.10.1.	Fuentes de microorganismos que producen dextranas a partir del jugo de la caña	35
CAPÍTULO 4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.	Cuantificación de microorganismos	38
4.2.	Control de microorganismos en el cañaveral	40
4.3.	Control de microorganismos en el ingenio	40
4.4.	Control en la refinería	41

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

4.5.	Microorganismos en la caña	41
4.6.	Datos de dextranas encontrados	50
4.7	Análisis de dextranas usando anticuerpos monoclonales	52
4.8	Comparación de métodos	55
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y POSIBILIDADES PARA EL FUTURO	
5.1.	Conclusiones	57
5.2.	Posibilidades para el futuro	58
ANEXOS	Metodologías empleadas	60
ANEXO I.	Metodología empleadas	61
	I-A Pruebas para dextranas	61
	I-A.1 Método de determinación de dextrana por medio de anticuerpos monoclonales	62
	I-A.2 Cuantificación de dextranas	64
	I-B. Bibliografía relacionada con las metodologías	68
ANEXO II.	Acervo fotográfico	69
ANEXO III.	Disposición de residuos de esta investigación	71
BIBLIOGRAFÍA		72
 ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS		
Tabla 3.1	Detalle del diagrama de proceso de fabricación de azúcar refinado del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333	36
Tabla 4.1	Población total de bacterias y de la bacteria <i>Leuconostoc</i> en muestras de procesamiento de azúcar (Ingenio A)	38
Tabla 4.2	Población total de bacterias y de la bacteria	38

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

		Página
	<i>Leuconostoc</i> en muestras de procesamiento de azúcar (Ingenio B)	
Tabla 4.3	Distribución de dextrana en la cobertura del jarabe y el cristal	39
Tabla 4.4 a.	Cantidad de microorganismos, NMP/100mL, encontrados en tallos de caña cruda troceada (Delfín 2012)	44
Tabla 4.4 b.	Tipos de microorganismos encontrados en el jugo fresco de caña de azúcar. Especies predominantes (Delfín, 2012)	44
Tabla 4.4 c.	Condiciones de desarrollo de organismos dañinos	44
Tabla 4.5.	Multiplicación de microorganismos en condiciones favorables	45
Tabla 4.6.	Análisis de dextranas obtenidos en las diferentes etapas del proceso de fabricación de azúcar durante la Zafra 2012	53
Tabla 4.7.	Niveles de dextrana (promedio, ppm/°Brix) en tallitos de caña a las 48 horas después de su zafra (caña triturada)	55
Tabla 4.8.	Niveles de dextrana (promedio, ppm/°Brix) en tallitos largos y cortos después de un retraso de 12 a 24 horas	55
Fotografía 4.1	Caña de azúcar cortada de forma manual que sufre menos daño que la caña troceada mecánicamente y, por ende, menos infestación	42
Fotografía 4.2.	Caña de azúcar quemada para facilitar su corte manual	43
Figura 1.1.	Estructura molecular de la dextrana	14
Figura 3.1.	Diagrama de proceso de fabricación de azúcar refinado del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333	37
Figura 4.1.	Análisis de laboratorio del bactericida (LAICA S. A de C. V.,2007)	46
Figura 4.2.	Concentración de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en muestras tratadas (21 ppm de bactericida) y no tratadas.	47
Figura 4.3.	Prueba de preservación del bactericida a concentraciones de 15 y 20 ppm vs un testigo	47
Figura 4.4.	Prueba de preservación con el bactericida, 2 marcas de bactericidas contra un testigo, relacionando el % de azúcares reductores versus tiempo	48
Figura 4.5.	Prueba de preservación con el bactericida relacionando el pH contra tiempo en horas	48
Figura 4.6.	Prueba de preservación con el bactericida que relaciona el % de pureza contra el tiempo en horas	49
Figura 4.7.	Azúcares reductores en jugo desmenuzado o de primera extracción comparando con azúcares	49

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Figura 4.8.	reductores en jugo fresco mezclado con “pachaquil” o jugo que sale de los molinos contra el tiempo en horas Dextrana y frescura de la caña. Cada curva es el promedio de cuatro determinaciones	51
		Página
Figura A.I.	Procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal (Figuras 1, 2, 3, 4)	63
Figura 1.	Producción de respuesta inmune	63
Figura 2.	Aislamiento de la célula del bazo	63
Figura 3.	Selección y aislamiento del hibridoma deseado	63
Figura 4.	Producción del anticuerpo monoclonal (escalado)	63

GLOSARIO

A	Letra asignada a la muestra conocida como LA MUESTRA (ecuación 3-1)
Amberlita	Nombre comercial de una resina de intercambio iónico
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas de los Estados Unidos por sus siglas en inglés (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
Atarjea (<i>tarja</i>)	Del árabe hispánico <i>attašyí'</i> , y este del árabe clásico <i>tašyī'</i> 'acompañamiento' 1. f. Caja de ladrillo con que se visten las cañerías para su defensa. 2. f. Conducto o encañado por donde las aguas de la casa van al sumidero. 3. f. <i>And., Can. y Méx.</i> Canal pequeño de mampostería, a nivel del suelo o sobre arcos, que sirve para conducir agua
B	Letra asignada a la muestra conocida como EL CONTROL (ecuación 3-1)
Batey	Palabra de origen taíno (lengua hablada por los individuos pertenecientes a los pueblos amerindios del gran grupo lingüístico arahuaco que estaban establecidos en la isla La Española -Haití y Santo Domingo- y también en Cuba y Puerto Rico cuando se produjo el descubrimiento de América). Conjunto de maquinaria y equipo que se utiliza para la recepción y descarga de la caña durante la zafra en los ingenios azucareros. Lugar o patio destinado al almacenamiento de la caña que prácticamente está a punto de molerse. Lugar del ingenio donde se hacen los manejos de la caña para el almacenamiento, en el piso y/o camiones-carretas para su molienda
Brix	Contenido porcentual de sólidos (sacarosa, azúcares reductores y otros constituyentes) solubles en agua

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Chaetomium sp.	Hongos macroscópicos de tipo ascomicetos
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CSR Ltd.	Por su siglas en inglés (<i>Colonial Sugar Refining Co. Ltd.</i>) Compañía Colonial de Azúcar Refinado Limitada
Dextrana ¹	Polisacárido ó polímero de la D-glucosa (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n , formado por reacciones bioquímicas a partir de la sacarosa, con la intervención principalmente del organismo <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Grupo de polisacáridos, de elevada masa ² molecular, formados por glucosas unidas por enlaces α-1,6 al menos en el 50%, con ramificaciones enlazadas α-1,3 aunque también puede presentar otras unidas α-1,2 o α-1,4, generalmente de origen bacteriano o también polímero homólogo a las glucanas, formándose por la acción de la enzima dextranasacarasa sobre la sacarosa, especialmente por las bacterias <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Leuconostoc dextranicum</i>
Dextranasa	Enzima que puede hidrolizar a la dextrana
Dextranasacarasa	Enzima que interviene en la formación de la dextrana
<i>Diatraea saccharalis</i>	Insecto barrenador de la caña de azúcar del orden lepidópteras
Enzimas	Biocatalizadores de naturaleza proteica en su mayoría, que realizan en las células reacciones químicas
FC	Factor de corrección (ecuación A-1)
Gomas	Material formado por microorganismos que al ser llevado por el jugo o mieles de la caña de azúcar, les da una textura altamente viscosa y que al estar mezclada con la solución de azúcar hace que presente problemas para la elaboración de la masa cocida (templá). La viscosidad de una templá es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores, no-azúcares y dextrana
Guarapo	Voz quechua (lengua hablada por los indígenas que, al tiempo de la colonización del Perú habitaba la región del Cuzco y, por

¹ Hay todavía problemas en las publicaciones referentes a las gomas o polisacáridos, ya que aunque hay una nomenclatura que define que las gomas deben siempre terminar con el sufijo – ana, algunas de ellas ponen las palabras dextrano o dextrán. En esta tesis se usará la palabra dextrana

² Masa versus peso: El **peso**, en física, es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre la masa de un cuerpo. Normalmente, se considera respecto de la fuerza de gravedad terrestre. El peso depende de la intensidad del campo gravitatorio, de la posición relativa de los cuerpos y de la masa de los mismos. La **masa** es una propiedad característica de los cuerpos: la cantidad de materia, y no depende de la intensidad del campo gravitatorio, ni de su posición en el espacio. Por ejemplo, una persona de 60 kg de **masa**, pesa 60 **kg-fuerza** en la superficie de la Tierra; pero, la misma persona, en la superficie de la Luna pesaría sólo unos 10 kg-fuerza; sin embargo, su masa seguirá siendo de 60 kg. Las unidades de **peso** y **masa** tienen una larga historia compartida, en parte porque su diferencia no fue bien entendida cuando dichas unidades comenzaron a utilizarse. Cotidianamente, el término "peso" se utiliza a menudo **erróneamente** como sinónimo de masa. La unidad de masa del SI es el kilogramo, kg

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

	extensión, de otros indígenas pertenecientes al Imperio incaico). Jugo de la caña dulce exprimida, que por vaporización produce el azúcar. En el ingenio cooperante es el jugo de caña mezclado, producto de la extracción de molinos
ICUMSA	Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar por sus siglas en inglés (<i>International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, an international standards body, founded in 1897</i>)
Ingenio, ingenio azucarero	Nombre dado en México y algunos otros países a las fábricas que procesan la caña de azúcar para producir azúcar granulada, alcohol de caña (etílico) y otros sub- y co-productos de la caña de azúcar
IUPAC	Siglas para la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
Jugo o guarapo	En la jerga azucarera al jugo o guarapo de la caña de azúcar, le dan diferentes denominaciones dependiendo de la parte del proceso de donde se toman las muestras
Jugo desmenuzado	Es el jugo extraído de la caña entre las mazas de la desmenuzadora, la cual constituye la primera unidad extractora de jugo. Este es el jugo al cual no ha sido agregado agua
Jugo mixto	Es el jugo mezclado. Es la mezcla de los jugos primarios y secundarios enviados al departamento de elaboración, a la etapa de clarificación
Jugo sulfitado	Práctica de adicionar dióxido de azufre (SO ₂) a la corriente del jugo del proceso en la fábrica de azúcar. A este proceso se denomina sulfitación
L	Abreviatura de litro según la <i>IUPAC</i> , mL, hL, etc.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Bacteria láctica que fundamentalmente utiliza a la sacarosa de la caña de azúcar como fuente de carbono agrediendo el proceso de la caña con sus productos metabólicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución por sus siglas en inglés (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Maza	Instrumento de madera dura, parecido a la maza antigua de combate, que sirve para machacar el esparto y el lino, y para otros usos, en este caso para “moler” la caña de azúcar y separar el jugo del bagazo
Melasigénico	Elementos minerales como el sodio, asociados a la presencia de altos niveles de potasio, calcio y magnesio, que son comunes en suelos salinos, tiene un marcado efecto melasigénico (producción de mieles) en la etapa de cristalización de la sacarosa y conducen, en consecuencia, a la producción de mieles incristalizables de alta pureza y a una baja recuperación de azúcar comercial. Efecto causado por la pérdida de sacarosa en la melaza, produciendo mieles finales de alta pureza.
N	Sigla para soluciones normales

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

N ₀	Lectura inicial (ecuación A-1)
N ₁	Lectura final (ecuación A-1)
NTU	Unidades de turbidez nefelométrica por sus siglas en inglés (<i>nephelometric turbidity units</i>)
Nucleación	En los procesos de cristalización, es la formación de nuevos núcleos cristalinos a partir de disoluciones sobresaturadas o en fundidos sobreenfriados
<i>Pachaquil</i>	Nombre dado por los proveedores de equipos coladores o tamices para el jugo que sale de los molinos, llamado también “caballito”, “separador de bagacillo” o tamiz ya que originalmente la palabra era dada al sólido separado (Murrieta, 2013, de Crespo, 1988)
Pol	Sacarosa aparente en el jugo caña de azúcar y el azúcar (% en masa) determinado por método polarimétrico
Polisacárido	Cadenas largas de monosacáridos, de varios cientos o miles y que pueden ser ramificados o lineales
<i>psia</i>	Siglas para la unidad de presión en los países anglófonos no incorporados al sistema internacional de unidades, SI. De <i>pounds per square inch, absolute</i> , libras fuerza por pulgada cuadrada, absoluta, 1 <i>psia</i> es equivalente a 6894.75729 pascales y 14.7 <i>psia</i> es igual a 101.3529 kPa o 760 mm Hg o 1.03 kg _f /cm ²
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Poder Ejecutivo Federal, Estados Unidos Mexicanos
SPRI, S.P.R.I.	Siglas en inglés para el Instituto de Investigación y Procesamiento del Azúcar (<i>Sugar Processing Research Institute</i>)
Tándem	Batería o conjunto de molinos, cada uno con 4 mazas metálicas que mediante presión, extrae el jugo de la caña (locución adverbial: Dicho de montar ciertos aparatos: De manera que funcionen simultánea o sucesivamente)
T-40	Dextrana de 40,000 unidades de masa molecular (Cane Sugar Handbook, 1993)
TCA	Siglas en inglés para el ácido tricloroacético (<i>trichloroacetic acid</i>)
U.M.A.	Unidades de Mili-Absorbancia (ecuación 3-1)
UTN	Unidades de turbidez nefelométrica
Zafra	Cosecha de caña dulce. Se aplica también este nombre a la fabricación del azúcar de caña y por extensión a la de remolacha

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Esta tesis usa en punto decimal de acuerdo con la normativa aplicable (DOF, 2009)

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

RESUMEN

En la producción de azúcar, las dextranas son compuestos indeseables, sintetizados a partir de la sacarosa por microorganismos contaminantes, que provocan pérdidas significativas al incrementar la viscosidad en los fluidos y reducir la eficiencia o recobro industrial. En este estudio, se examinaron los problemas causados por dextranas producidas por organismos oportunistas (*Leuconostoc mesenteroides*). Se señalaron las áreas de ocurrencia de las dextranas en el cultivo y cosecha de la caña de azúcar, en el transporte y almacenamiento, en los ingenios y refinerías azucareras. Se analizaron dos métodos de análisis de dextrana con sus respectivas ventajas y desventajas. Se representaron posibles controles en la producción de dextrana en el cañaveral y la caña, enfatizando la coordinación de la cosecha con las entregas y el control del cañaveral. También se analizó el control con bactericidas en el ingenio, los cuales se muestran a través de gráficas durante el proceso de molienda, para el año 2007. Se incluyen especulaciones a futuro sobre las posibilidades del control de dextrana. Con respecto a la fase analítica, se identificaron cepas de bacterias, hongos filamentosos y un pequeño número de levaduras que producen dextranas. El método utilizado para la cuantificación de las dextranas en esta investigación fue la determinación de dextranas por medio de anticuerpos monoclonales, la cual está basada en que el anticuerpo monoclonal ataca a la dextrana y produce una turbidez la cual es directamente proporcional a la cantidad de dextrana presente y se usa un nefelómetro (turbidímetro especialmente diseñado) para medir la turbidez que se forma. Las dextranasas fúngicas manifestaron la mayor velocidad de reacción y encontraron las condiciones más favorables de reacción a bajas concentraciones de sólidos medidos como grados Brix, con valores de pH de 5.0 y temperatura de 50°C. Estas condiciones reales existen en el procesamiento de los jugos de los ingenios azucareros. En estados más avanzados del proceso, en los que ya las dextranas han provocado pérdidas, las condiciones de temperatura y de °Brix son elevadas. Algunas dextranasas de bacterias termotolerantes, identificadas hasta el momento, manifestaron una actividad específica muy reducida, lo cual hace impracticable su uso industrial. Las dextranasas fúngicas de *Chaetomium sp.* han mostrado los mejores resultados en el tratamiento de las dextranas, tanto en los jugos como en la meladura, por lo que se recomienda continuar con esta línea de investigación.

Palabras clave: **Dextranas, falsa sacarosa, caña de azúcar, rezago cronológico**

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1. Presencia de dextranas

Las dextranas son polisacáridos de elevada masa molecular, formados por glucosas unidas por enlaces α -1.6 al menos en el 50%, con ramificaciones enlazadas α -1.3 aunque también puede presentar otras unidas α -1.2 o α -1.4. Las ramificaciones son significativas en las dextranas de baja masa molecular, en las que llegan a alcanzar hasta el 8%. La solubilidad de las dextranas disminuye a medida que en ellas aumenta la proporción de otros enlaces α en relación con los α -1 (Figura 1.1.).

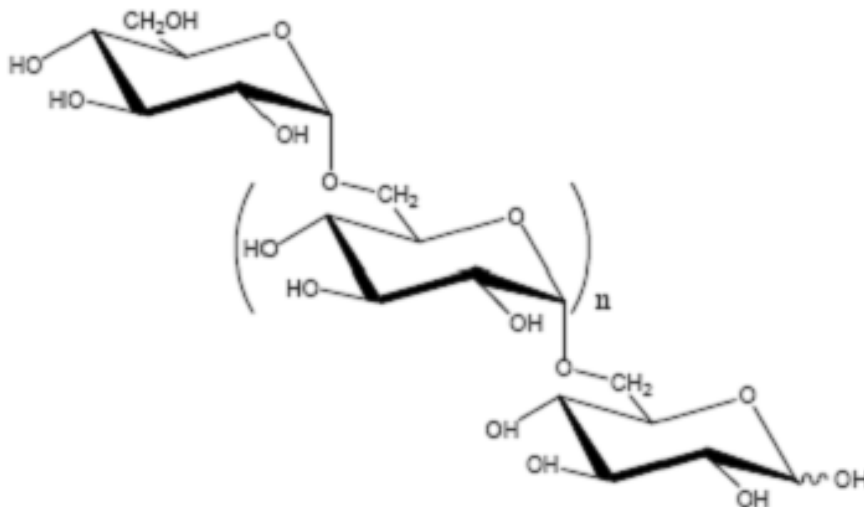


FIG. 1.1. Estructura molecular de la dextrana (Anónimo, 2012)

Las dextranas no son compuestos propios de la caña, el contenido de estos polisacáridos en la caña es muy bajo o casi cero. Su formación ocurre por la enzima dextranasacarasa de microorganismos contaminantes que se alojan en la savia de la planta o la atacan posteriormente al ser dañada su corteza.

La infestación de la caña por el insecto *Diatraea saccharalis*, conocido como “borer” y el ataque de roedores favorecen la contaminación microbiana de la gramínea en el campo. *Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria láctica que fundamentalmente agrede a la caña. El nivel de exposición del tejido interno de la caña se incrementa con el corte mecanizado, el troceado o por la quema, lo cual provoca la inactivación de las enzimas fenoloxidasas de acción protectora o bactericida en la planta. Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextranasacarasa hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Junto con el jugo,

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

estas dextranas se extraen en los molinos y contaminan los fluidos del ingenio y su nivel en el jugo llega a exceder las 10000 ppm (1%) en los casos extremos (Cuddihy y col., 1998).

El organismo *Leuconostoc mesenteroides* se alimenta de la sacarosa en soluciones diluidas con pH neutro o ligeramente ácido a temperaturas inferiores a 60°C y, por lo tanto, prolifera libremente en tejidos de caña de azúcar expuesto y en jugo de caña o soluciones de azúcar de bajas concentraciones medidas como grados Brix. Cualquier herida en el tallo de la caña de azúcar, incluyendo cortes por zafra, daño por insectos, corte por tractor o rajaduras por helada que exponga el tejido, ofrece al microorganismo “tierra para cultivar” y convertir los azúcares en dextranas, gomas muy apreciadas en la industria alimentaria pero no en la industria azucarera (Severiano-Pérez, 1997). Mientras mayor sea el tiempo y la temperatura del ambiente disponible, la producción de dextrana será más grande.

Esta relación directa de la producción de dextranas con la exposición del tejido del tallo, es la razón para la diferencia en producción de dextranas en tallo entero y troceado: éste último expone más tejido. A pesar de los exitosos esfuerzos hechos por los técnicos en los ingenios y los cosechadores, continúan los problemas con la cristalización. Muchos de ellos se pueden hallar en el aumento a nivel mundial de las operaciones mecanizadas de la cosecha. En gran parte de los países productores de caña de azúcar, ya no se puede contar con la caña de azúcar fresca, cortada y limpiada a mano, y los gerentes quienes menospreciaban los niveles de paja u hojarasca de alrededor del 3%, aceptan ahora habitualmente un 10% o más, y el mismo incluye una dosis generosa de sales provenientes de la tierra que viene con la caña. El trocear el tallo mecánicamente tiende a magullar o dañar el tallo más que el corte manual y de este modo, puede ocurrir una contaminación creciente cuando se utiliza la recolección de tipo mecánico. No obstante, el corte manual se asocia con una distribución más lenta y un tiempo más largo desde el corte hasta la trituración para recuperar el jugo. También el clima caluroso opera para facilitar la conversión de azúcares a dextranas. Ambos son los factores más importantes en la creciente producción de dextranas en la caña o directamente en el jugo extraído. La tierra del campo es recogida por las alzadoras, las combinadas, los rastrillos de empuje, y las cosechadoras de arrastre conocidas como hawaiianas, tienden a traer más lodo en la caña, el cual como se detalla posteriormente, causa más infección y, por ende, producción de dextranas.

Existen dos factores responsables de los niveles crecientes de dextrana: la población de microorganismos *Leuconostoc mesenteroides*, que producen dextranas y la tasa a la que ésta se produce. Este microorganismo es anaerobio facultativo y se reproduce rápidamente en condiciones anaerobias, como ocurre por ejemplo en el lodo. Por lo tanto, el microorganismo se reproduce velozmente en caña cubierta de lodo y en caña en grandes pilas con poca circulación de aire. Por consiguiente, existirá una gran población disponible de *Leuconostoc* en caña que esté lodosa o almacenada sin mucha circulación de aire, que incita a la

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

producción de dextranas cuando la sacarosa se encuentra a su alcance. La caña que se mantiene limpia y seca en pequeñas pilas o vagones de transporte no desarrolla una población tan alta de microorganismos productores de dextranas. Ésta es la razón para el alto contenido de dextranas en jugos de caña obtenidos de cañas mojadas, sucias o lodosas comparados con caña limpia, aún cuando la temperatura sea más alta para la caña limpia y seca. Las mismas consideraciones explican la situación que frecuentemente se observa en áreas de América del Sur y América Central: la caña cortada manualmente, almacenada en pequeñas pilas o vagones relativamente secos, no desarrolla los niveles de dextranas observados en caña similar pero en condiciones húmedas y lodosas. El efecto ocasionado por el corte mecanizado le provee a los microorganismos áreas de tejido expuesto con mayor sacarosa, para utilizarse como alimento para producir dextranas. El ambiente, la zafra y la transportación influyen en ambos factores de crecimiento (reproducción) y producción (formación de dextrana).

1.2. Condiciones del cañaveral y de la zafra

Los factores de mayor importancia que afectan los niveles de dextrana en azúcar bruto se encuentran relacionados con las condiciones imperantes en el cañaveral y la zafra. Éstos incluyen:

- La variedad de la caña
- El suelo en el cual se cultiva
- Condiciones agroclimáticas que englobarían: la temperatura del ambiente, la humedad del ambiente, la precipitación pluvial y el lodo.
- El grado de quemadura de la caña
- La integridad del tallo de la caña (grado de daño)
- La longitud del tallito o del tallo entero
- El retraso entre quemadura y corte
- El retraso entre cortar y trocear

La variedad de la caña puede tener efecto en la susceptibilidad que presente a la infección de *Leuconostoc*, particularmente en las áreas de cosecha de tallo entero. En la caña troceada, la mayor superficie expuesta genera una rápida producción de dextranas que, siendo factores minoritarios, afectan la tasa de crecimiento y la producción y pueden tornarse excesivamente grandes. El lapso para que ocurran cambios significativos en la composición del jugo, se mide en días. Toda la caña en todas partes, empieza a deteriorarse tan pronto como es quemada o cortada, pero la velocidad de este deterioro, se encuentra influenciada por una amplia variedad de factores, siendo los más importantes el tipo de infección microbiana, el tiempo de almacenamiento, las condiciones climatológicas, el método de cosecha y la variedad de que se trate. Investigaciones recientes han ampliado el conocimiento básico con respecto al deterioro de la caña (Solomon, 2000, Solomon y col., 2003).

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

La influencia de la variedad, y el contenido de fibra y resistencia del tallo al daño, es sin duda tan importante en este punto como la influencia de la variedad en el efecto de la temperatura. El efecto de la edad de la caña en la producción de dextranas no es claro: El jugo de la caña joven contiene altos niveles de almidón y otros polisacáridos pero ningún factor que implique un incremento en la reproducción de *Leuconostoc*. Se tienen reportes de altos niveles de dextranas en caña joven, que son probablemente causados por otros factores de cosecha (y retrasos antes de cosecha), que promovieron la producción de dextrana pero que no fueron originados por la edad de la caña (Solomon, 2000; Solomon y col., 2003).

El efecto de la temperatura del ambiente es bien conocido, aún cuando han sido publicados pocos estudios de investigación con estos objetivos. En general, la caña de azúcar a altas temperaturas (manteniendo los demás factores iguales, especialmente la precipitación pluvial) produce niveles más altos de dextranas que a bajas temperaturas. Hay amplias evidencias para demostrar que el clima es de vital importancia para determinar la tasa de deterioro. Mientras mayor sea la temperatura y el clima más húmedo, mayor será el deterioro. Los efectos indeseados de alta temperatura (alrededor de 40°C) y baja humedad atmosférica (25-35%) en la calidad del jugo han sido reportados en la literatura. Por ejemplo, la zafra en invierno presenta niveles de dextrana menores, que en primavera (Solomon, 2000).

La precipitación pluvial por sí sola no afecta la producción de dextrana pero sí lo hacen las condiciones lodosas del cañaveral originadas por fuertes lluvias. La caña lodosa incrementa la producción de dextrana a comparación de la caña limpia (demás condiciones iguales), por dos razones 1) La bacteria *Leuconostoc* vive en la tierra y, por lo tanto, se mantiene en contacto cercano con el tejido de la caña de azúcar en la caña lodosa y 2) La bacteria prefiere un ambiente anaerobio³ (aunque también puede vivir en el aire), y por ello multiplicarse más rápidamente cuando el aire está bloqueado por el lodo como se describe arriba (Solomon, 2000; Solomon y col., 2003).

Estos mismos factores afectan el grado de deterioro con respecto al daño hecho al tallo de la caña, un tallo troceado, lodoso y sucio producirá más dextrana a mayor velocidad que un tallo limpio y cortado con exactitud. En el tallo troceado hay mayor área disponible y por tanto, mayor sacarosa para el microorganismo. El proceso de deterioro de la caña troceada en verde, muestra diferencias básicas con respecto al de la caña troceada y quemada.

³ Nota de la asesora de tesis: Tristemente, el Diccionario de la lengua española aceptó adjetivos con palabras tan absurdas desde el punto de vista científico como “potásico” y “sódico” cuando, en la química, no hay especies ni “potasoso” ni “sodoso” así como “aeróbico” y “anaeróbico” cuando debieran ser de potasio o de sodio o aerobio y anaerobio, respectivamente

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

El efecto de la tierra en la producción de dextrana aún no se reporta en la literatura que versa al respecto. Se dice que determinadas áreas con alto contenido mineral (K, Mg) en su tierra muestran poca producción de dextrana. Esto puede ser cierto pero no se han reportado evidencias sólidas que soporten la teoría de que estas tierras inhiben el crecimiento de *Leuconostoc*. Eficientes procedimientos de cosecha en estas áreas pueden ser responsables de limitar la producción de dextrana.

Prácticamente de todos los estudios revisados con caña troceada, se llevaron a cabo con caña quemada. Foster y su grupo, de 1969 a 1981 (Foster e Irvin, 1981, Foster y col., 1977) proporcionaron resultados de experimentos comparando caña troceada en verde y quemada y encontraron que, luego de períodos de almacenamiento de dos a tres días, el contenido de dextranas en la caña verde resultó drásticamente más bajo que en el caso de la caña quemada. Numerosas poblaciones de *Leuconostoc* estuvieron presentes en la caña quemada. Foster y sus colaboradores no encontraron microorganismos en caña recientemente cortada pero hallaron un variado número de especies en tallos quemados, siendo *Leuconostoc* la especie dominante. La información de Foster y su grupo muestra que los niveles de dextrana en caña verde y quemada después de 48 horas de su corte (con varios tamaños de tallito) aumentaron.

Con base en esta introducción al problema se plantearon los objetivos y metas para esta investigación.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Montar una metodología analítica para la cuantificación de las dextranas en caña de azúcar cronológicamente rezagada, para que sirva en estudios futuros como base en la ponderación de la estimación de pérdidas en los cálculos azucareros durante el proceso de obtención de azúcar en el ingenio cooperante.

1.3.2. Objetivos específicos

Detectar y controlar las pérdidas por infección e inversión microbiológica, en un mínimo de tiempo.

Reducir los costos ocasionados por las pérdidas por infección e inversión microbiológica, al detectarse éstas en forma inmediata y su control en menos de 24 horas.

Proponer medidas prácticas al ingenio cooperante para reducir la formación de dextranas.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

1.4. Metas

- a) Montar una metodología sencilla y práctica para determinar dextranas en jugo de caña, de una manera rápida y eficiente.
- b) Determinar las pérdidas de sacarosa durante el procesamiento de la caña de azúcar en un ingenio azucarero cooperante.

1.5. Alcances

Esta investigación se circunscribe solamente al ingenio azucarero (ingenio cooperante) donde se realizó este estudio.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS

2.1. Problemas causados por la dextrana

Si bien la influencia del deterioro de la caña en la recuperación de fábrica y en la calidad del azúcar crudo, ha sido reconocida y divulgada por los técnicos durante muchos años, existen dificultades considerables para cuantificar los diversos cambios que van a ocurrir. Un análisis de los trabajos publicados ha dado origen a un material que describe el deterioro y sus efectos en términos de pérdidas al ser recibida la caña en fábrica: los problemas del análisis del jugo, los problemas de clarificación, las reducciones en el coeficiente de transferencia de calor, efectos en la eficiencia de los tachos, separación centrífuga y recuperación de azúcar, se deben principalmente a la producción de dextranas, por la multiplicación del *Leuconostoc* sp (Solomon, 2000).

La mayoría de los problemas en el ingenio son causados por el incremento de viscosidad en el jugo, proveniente de la dextrana. Las dextranas impiden la clarificación al actuar como coloides neutros o sin carga y bloquear la agregación de partículas cargadas. Las dextranas retardan la filtración del lodo.

El incremento de viscosidad retarda el tipo de cambio del calor y, por ello, causa una menor eficiencia del evaporador y una menor tasa de crecimiento del cristal. La baja tasa de crecimiento extiende el tiempo de cocción de la caldera. Las dextranas pueden ocasionar nucleación excesiva y causar cristales alargados. El grado de cocción disminuido puede originar cuellos de botella en el cuarto de calderas. Los cristales alargados entran en las bombas centrífugas e incrementan las pérdidas a melaza. Una mala purga disminuye la calidad del azúcar y aumenta la cantidad de jarabe lavado y reciclable. La masa cocida o templea de alta viscosidad incrementa las llamadas purezas de la melaza y, por ende, la pérdida de sacarosa en la miel final.

La “regla del pulgar” (relaciona niveles de dextrana con pérdida de pureza y significa que por cada 300 ppm de dextrana (medida empleando el llamado método “Haze” (niebla o turbidez, en inglés), basado en su precipitación usando soluciones alcohólicas) en jarabe fuerte se espera una primera pérdida en la miel final. Los controles químicos se distorsionan cuando las dextranas afectan las lecturas de POL en grados variantes del jugo a los jarabes y al azúcar (Singleton y col., 2002).

Niveles altos de fructosa en el jugo distorsionan la POL y reducen las lecturas de azúcar.

En el ingenio, como en cualquier parte, la presencia de dextranas significa pérdida de sacarosa. Considerando los precios bajos del azúcar, es aún más antieconómico cultivar azúcar en el cañaveral solamente para alimentar a un

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

microorganismo para producir dextranas que causan problemas de procesamiento y depresiones posteriores en los precios. La pérdida de tiempo y capacidad en el proceso involucrando una pérdida de “vapor” especialmente importante donde la cogeneración se encuentra en la operación es una pérdida financiera posterior.

2.2. Problemas en la refinería

La lectura de POL errónea en la fábrica de azúcar, debido a la presencia de dextranas, ocasiona que el control químico se distorsione en la medida en que las dextranas afectan a la lectura de pol del jugo en mayor o menor grado, a través de jarabes de azúcar, creando múltiples problemas en la refinería, como lo son la pérdida de refinación y disminución de la filtración, etc., Margaret Clarke del Instituto de Investigación de Procesamiento del Azúcar (SPRI, EEUU), señaló problemas en productos como el azúcar en cristales alargados e incremento en el contenido de gomas que conducen a tener una alta viscosidad de jarabes y de masas cocidas; esto incrementa la cantidad de material para la recuperación del azúcar y el exceso de material de baja calidad enviado a recuperación combinado con la disminución en las tasas de ebullición y de cristalización y los cristales alargados que prevalecen particularmente en el azúcar vuelta a derretir. Todo esto crea el gran incremento en el factor de costo en la situación de la refinería (Solomon, 2000).

Otras áreas problema en la refinería son filtración (ya sea después de carbonatación o fosfatación) la cual se retarda con el aumento de frecuencia de lavado y reciclaje. El incremento de purezas de la miel es un problema tal, como en el ingenio de azúcar bruto.

Problemas del producto, pueden incluir cristales alargados del azúcar morena suave que no podrán empacarse en el contenedor asignado y nebulosidad de licor. El caramelo será distorsionado fuera de su forma por azúcares altas en dextranas y ocasionará la subsecuente ruptura del empaque (caramelo duro). (Solomon, 2000).

2.3. Métodos de análisis para dextranas

Existen varias pruebas analíticas para determinar la presencia de dextranas, algunas son específicas y cuantitativas y otras no muy específicas, pero hasta el momento no se ha encontrado un método que sea rápido y confiable para el empleo en el jugo de caña.

Existen varios métodos para la determinación de dextranas, algunos de ellos obsoletos o en desuso. El libro de la Q. Allene Jeanes, del *Northern Regional Research Center* del *US Department of Agriculture*, presenta una compilación

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

impresionante de bibliografía sobre dextranas (Jeanes, 1978). Se mencionan algunos de ellos como datos históricos (Anexo 1). También el manual escrito por A. N. de Belder, editado por la empresa *Amersham Biosciences* (actualmente absorbida por *General Electric* con su filial sobre salud) da algunos métodos (de Belder, 2013). La mayoría se basan en la precipitación de las dextranas usando soluciones alcohólicas (Severiano-Pérez, 1997). A continuación se citan algunos de ellos

Método de Nicholson y Horsley o método “Haze” (de Belder, 2013)

Objetivo y alcance.- Esta técnica tiene como principal objetivo la determinación de dextranas en los jugos, siempre y cuando los mismos no contengan más de 1% de cenizas.

Fundamento del método.- La dextrana presente en la muestra en una solución alcohólica al 50% desarrolla turbidez, midiéndose la misma en un rango de longitud de onda alrededor de 720nm.

El método *ICUMSA*, aprobado para el análisis de dextrana es una variación del método *HAZE*. El método oficial de la AOAC para analizar dextranas en azúcares brutos es un método desarrollado por Roberts (Saska y col., 2002).

Otros métodos de la literatura se basan en métodos de enzimas combinados con diálisis, *Haze* o medidas de viscosidad y métodos inmunológicos. Todos ellos son bastante largos y ninguno analiza exactamente el total de dextranas.

Método Haze o CSR para la determinación de dextranas en azúcares crudos (Galba e Inkerman, 1993)

Dependiendo del tipo de dextranas, la precipitación se inicia a una concentración alcohólica de alrededor del 35%. Los alcoholes de mayor concentración alcohólica, en particular a más del 60%, a pesar de asegurar la precipitación completa de las dextranas, también propician la precipitación de otros polisacáridos, si no han sido eliminados previamente. La turbiedad de las dextranas se produce diluyendo mediante la adición de etanol una alícuota de la solución tratada de azúcar crudo hasta duplicar el volumen de ésta. La turbiedad producida por las dextranas, se determina comparando mediante un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 720nm, la turbiedad que se analiza con la de una muestra incolora, a la que se le agrega agua en lugar de etanol.

Procedimiento analítico para el jugo de caña

Se determinan los °Brix de un jugo de caña, enseguida, en un vaso de precipitados de 100mL se colocan 10mL del jugo, entre 0.3 y 0.4g de coadyuvante de filtración analítico y 1mL de ácido tricloroacético, se mezcla y se añaden 40mL

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

de alcohol absoluto. A continuación, la turbiedad producida por las dextranas se determina comparando mediante un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 720nm, la turbiedad que se analiza con la de una muestra incolora, (blanco) a la que se le agrega agua en lugar de etanol.

Procedimiento rápido para determinar dextranas en jugo (prueba de niebla o Haze)

A 2mL de jugo de caña se añaden 2mL de ácido tricloroacético al 10%, 16mL de agua y 0.5g de tierra filtrante de diatomeas. Se agita y luego se filtra, se descartan los 2mL primeros del filtrado. A los próximos 5mL del filtrado, se añaden 5 mL de etanol absoluto. Se deja que la mezcla se asiente durante 2 minutos. Se lee la absorbancia en el colorímetro o el espectrofotómetro a 720nm. En este procedimiento, el ácido tricloroacético precipitará la proteína en el jugo, la filtración subsecuente removerá los sólidos suspendidos, la precipitación de proteínas y una gran parte del almidón que no es soluble en el jugo frío (Boardman, 1980).

El método “Haze” ha sido criticado por su énfasis en la alta masa molecular de las dextranas: no analiza dextranas de baja masa molecular (menor de 30,000 daltones), únicamente analiza dextranas que son precipitadas en 50% de alcohol. Una respuesta, dada por otras investigaciones a esta crítica es que solamente aquellas dextranas con alta masa molecular son importantes: esto es cierto en el azúcar bruto y su manufactura donde la mayoría de las dextranas son de alta masa molecular, producidas por el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* y no descompuestos en el proceso y no por retrogradación o por enzimas. Se mantiene que los azúcares brutos contienen primordialmente altos contenidos de dextranas de alta masa molecular. No obstante, la evidencia experimental para este enunciado está basado en el análisis de dextranas removidas del azúcar bruto por la precipitación con 47.5% de alcohol, por lo que estos aislamientos no deberían presentar ningún material que no se precipite en un 50% de alcohol. La dextrana de baja masa molecular no se mostró en estos azúcares porque se dejó fuera del análisis (Saska y col., 2002).

No existe ninguna duda de que las dextranas de alta masa molecular causan mayores problemas de procesamiento que las de baja masa molecular. No obstante, las de alta masa molecular son removidas en la manufactura del azúcar bruto en mayor grado que las de baja masa molecular. El azúcar bruto puede ser proporcionalmente alto en dextranas de baja masa molecular y un ejemplo es el jugo de caña. Existe evidencia experimental de que las dextranas de baja masa molecular producen problemas de refinación, incluyendo alguna evidencia de molinos australianos, ya que impiden la filtración. Ciertamente, las dextranas de baja masa molecular tienen las mismas distorsiones de “Pol” que las de altos valores, tal vez más porque tienen menos probabilidad de ser removidos en la clarificación con plomo. La prueba “Haze” discrimina estas dextranas y no mostrará Pol falso por dextranas de baja masa molecular (Saska y col., 2002). La

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

prueba rápida para dextrana, desarrollada por el *S.P.R.I. o Empresa de Investigación del Azúcar* (por sus siglas en inglés *Sugar Processing Research, Inc.*), *Rapid Dextran Assay*, es una versión veloz de la prueba “Haze”. Es ciertamente la prueba más rápida en jugo de caña (cerca de dos minutos), aún cuando está sujeto de muchas interferencias y no puede ser utilizada en soluciones oscuras (ni la prueba “Haze”). Esta prueba *SPRI* puede indicar si los niveles de dextrana son altos o bajos. También puede ser utilizada para indicar calidad buena o deficiente de la caña (Saska y col., 2002).

Existen métodos de análisis que usan enzimas dextranasas y pueden trabajar muy bien, pero todas están sujetas a la pureza de la enzima. Como la mayoría de las enzimas dextranasas contienen residuos amiláceos o glucoamiláceos, cuando se descomponen dan resultados altos. El procedimiento de diálisis por enzimas ofrece gran exactitud pero requiere un tiempo de prueba de 24 horas. El método de viscosidad de la enzima, que puede ser usado con jugo de caña, estima el nivel de dextranas mediante la medición del grado o tasa de flujo del jugo (el cual depende de la viscosidad) antes y después del tratamiento de la enzima dextranasa. Este método es mucho más rápido –cerca de 30 minutos- y ofrece la posibilidad de uso en el ingenio pero no contrasta considerablemente entre diferentes niveles de dextranas.

El procedimiento inmunológico es rápido y puede ser exacto aún cuando responde con mayor fuerza a dextranas de alta masa molecular. Requiere de la producción de un anticuerpo específico a la dextrana. La caña a analizar debe ser tomada cuando la producción de dextrana bajo análisis está en desarrollo (Saska y col., 2002).

El método AOAC para dextrana en azúcar bruto, AOAC 988.12 (AOAC, 1990), que requiere un poco menos tiempo que el método “Haze”, es un método cuantitativo para la dextrana en el que toda las dextranas en una muestra son precipitadas y analizadas. El método “Haze” precipita y analiza solamente a las dextranas de alta masa molecular. El método de Roberts da resultados más altos que el de “Haze” ya que mide las de baja masa molecular. El método AOAC ha sido recientemente verificado por resonancia magnética nuclear (RNM) como un análisis que da resultados más exactos que el método “Haze”.

Aún existe la necesidad de un método rápido, exacto y reproducible para analizar las dextranas que debiera ser estudiado.

2.4. Efectos de las dextranas en análisis de polarización

Estudios en *CSR Ltd. y S.P.R.I., Inc.*, han demostrado que la clarificación del jugo de caña de azúcar bruto por acetato de plomo remueve de un 80 a un 90% de las dextranas de alta masa molecular y que estas dextranas no afectan la lectura. Las dextranas de baja masa molecular, incluyendo el tratamiento de productos de

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

enzimas dextranasas, no son removidas. No obstante, la clarificación por sistemas (como el cloruro de aluminio usado en lugar del acetato de plomo) no remueve significativamente las dextranas.

2.5. Control

Un aspecto importante del control es la coordinación de programas de cosecha con las entregas del ingenio. El gran peligro en la formación de dextranas (largos retrasos entre corte y trituración que causan la caña vieja) se puede minimizar con la coordinación eficiente de los programas de corte y entrega.

Existe una tendencia muy humana en cualquier sistema bipartita, en este caso el campo y la fábrica, a culpar a una de las partes cuando las cosas salen mal y así sucede con la responsabilidad de zafra (campo) y molienda (fábrica) de la caña de azúcar. Exceso de existencias en volquetas y en patios de molinos así como quemadura o cosecha antes de tiempo se pueden minimizar por mutuo acuerdo en cuestión de responsabilidad compartida para el control de programas de corte y trituración. En algunas áreas de cultivo y explotación de la caña, particularmente cuando éstas cuentan con la posesión conjunta, como es el caso de Hawaii o de cooperativas, este acuerdo se ha cumplido pero no puede lograrse sin esfuerzo. Sistemas integrados de cosecha y transporte toman algún tiempo e inversión para ser desarrollados. El acercamiento inicial debe provenir del molino (fábrica o ingenio). Un sistema de pago de caña que incluye penalizaciones en cuestión de caña vieja y un adecuado (pero rara vez acordado) muestreo de caña deben ser prerequisites. La división de la responsabilidad varía de un lugar a otro. En la mayoría de las áreas, los molinos no pueden rechazar caña. Los inspectores de caña son una realidad solamente en Australia. Por lo tanto, la penalización en el pago es el único recurso para obtener la observancia forzosa de lo mencionado anteriormente. Aquellas áreas en las que el pago de caña está basado en la masa de la caña únicamente dificulta el desarrollo de una coordinación razonable entre los agricultores y dueños de ingenios y, por ende, de mejorar la calidad de la caña. Esto se ha demostrado en varias áreas incluyendo los Estados Unidos, Australia, Brasil, Colombia y Filipinas (Solomon, 2000; Solomon y col., 2003).

El jugo de la caña dañada puede ser clarificado más fácilmente con la adición de fosfato y el exceso de cal necesario. Los procesos de clarificación del jarabe y del filtro pueden ayudar a reducir los niveles de dextranas en el jarabe.

A continuación se presenta el capítulo correspondiente a la metodología.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presentan las metodologías usadas a nivel de laboratorio para alcanzar el objetivo propuesto en esta investigación.

3.1. Método para la cuantificación de microorganismos

Material que se requiere:

- Autoclave o en su defecto una olla de presión
- Parrilla que se encuentre en buenas condiciones para que el autoclave alcance la presión deseada, 101kPa (15 *psia*)
- Estufa para cultivo
- Mechero o lámpara de alcohol
- Pipeta graduada de 1mL
- Pipeta graduada de 5mL
- Tubo de ensayo con tapón de rosca de aproximadamente 15mL
- Cajas Petri estériles
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Algodón
- Papel manila
- Frascos con tapa para las muestras

Reactivos

- Agua destilada
- Agar papa dextrosa
- Alcohol

3.2. Procedimiento

1. Tomar una muestra del material a analizar en un frasco perfectamente limpio y seco preferentemente estéril
2. Etiquetar con claves o con el nombre correspondiente cada uno de los frascos
3. Limpiar la mesa, donde se va a realizar la siembra, con jabón, secar bien. Si el lugar de trabajo se encuentra cerca de un sistema de clima automatizado, o cualquier otro equipo que genere corrientes de aire, apagar estos para evitar contaminación

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

4. Encender el mechero o las lámparas de alcohol para mantener la zona de trabajo estéril
5. Colocar las muestras a analizar sobre la mesa de trabajo
6. Tomar una alícuota de 1mL de una de las muestras
7. Agregarla a un tubo de ensayo que contenga 9mL de agua destilada estéril
8. Cerrar perfectamente el tubo y mezclar por inversión
9. Abrir el tubo, tomar una alícuota de 1mL y adicionarlo a otro tubo limpio, seguir el procedimiento del inciso anterior
10. Tomar una alícuota de 1mL de este tubo y colocarlo en una de las cajas Petri previamente marcadas; de este mismo tubo tomar otra alícuota de 1mL y repetir los incisos 9 y 10.

Repetir el procedimiento del inciso 6 al 10, para cada uno de los materiales de los que se requiera hacer análisis microbiológicos.

11. Ya que se ha terminado de colocar la alícuota de las diluciones en sus respectivas cajas, proceder a vaciar el agar en cada una de las cajas.
12. Homogeneizar el contenido de las cajas realizando movimientos circulares sobre la mesa.
13. Sellar las cajas con parafilm, masking-tape o cinta adhesiva transparente.
14. Invertir las cajas y colocar a incubar en una estufa para cultivo a temperatura de 35 a 40°C, por un intervalo de 48 horas.
15. Hacer un recuento de colonias.

NOTA: Como se cuentan únicamente las células capaces de formar colonias, el método se conoce también como cuenta viable; al seleccionar la caja Petri con el desarrollo para el recuento de colonias, el número de microorganismos por mililitro es igual al número de colonias por el factor de dilución.

3.3. Preparación del medio de cultivo

Seguir las indicaciones del frasco del reactivo, en cuanto a la cantidad que se necesita pesar para preparar un determinado volumen. Normalmente, para 7 muestras y trabajando las diluciones de cada una se requiere preparar 200mL de medio de cultivo. Ya una vez disuelto el agar, se colocan en el autoclave, se cierra éste y se deja que alcance la presión de 101kPa (14.7 psia). A partir de este momento se mantiene durante 15 minutos, se apaga y se deja que disminuya la presión.

Nota: No enfriar el autoclave, esto ocasiona que no sea completa la esterilización. Si ya se tienen las cajas con las muestras, se puede enfriar el medio utilizando agua de la llave.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

3.3.1. Análisis de dextranas por espectrofotometría UV-Visible

3.3.1.1. Fundamento

Este método se basa en la medición de la absorbancia, dada por la concentración de dextrana en la muestra, empleando para el efecto un espectrofotómetro Uv-Vis.

3.3.1.2. Reactivos y su preparación

Los reactivos que se mencionan a continuación deben ser grado analítico y cuando se mencione agua debe entenderse agua destilada.

3.3.2. Reactivos

3.3.2.1. Resinas intercambiadoras de iones

3.3.2.2. Filtroayuda

3.3.2.3. Ácido tricloroacético

3.3.2.4. Enzima alfa-amilasa tipo X-A

3.3.2.5. Alcohol etílico absoluto

3.3.3. Preparación de reactivos

3.3.3.1. Resinas intercambiadoras de iones

La amberlita IR - 120 (H+) y la IRA - 45 (OH-) (Ver Anexo A.2) son normalmente aplicadas húmedas, por lo cual deben lavarse con al menos su doble en masa de agua destilada y drenarse. Luego deben lavarse con acetona por un tiempo no mayor de 2 minutos. El solvente debe removerse inmediatamente. Las resinas se secan con aire o en estufa a baja temperatura, aproximadamente 303°K (30°C) y se almacenan en recipiente cerrado.

3.3.3.2. Filtroayuda: 50±5g de filtroayuda se agregan a 1000mL de agua destilada, se agregan 50±5mL de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se agita por 5 minutos. Luego se filtra y la torta de filtroayuda se lava con agua destilada hasta que el pH del lavado sea igual al del agua destilada. El filtroayuda se seca a 373°K (100°C) durante 6 horas y es almacenado en un recipiente hermético.

3.3.3.3. Ácido tricloroacético: 10±0.1g de ácido tricloroacético se disuelven en agua destilada en un matraz aforado y se llevan a 100mL. Este reactivo se conserva por dos semanas.

NOTA: Este reactivo ataca las proteínas y debe evitarse su contacto con la piel. No debe “pipetearse” con la boca y no debe almacenarse en recipientes de plástico.

3.3.3.4. Enzima μ -Amilasa tipo X-A

Enzima removedora de almidón. Se consigue preparada con un proveedor.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

3.3.3.5. Alcohol

Alcohol etílico absoluto. Se consigue preparado o se puede preparar por cualquiera de los métodos conocidos.

3.4. Materiales y equipos de medición

3.4.1. Materiales

- 3.4.1.1. Bureta de vidrio de 50mL
- 3.4.1.2. Cápsula de níquel con capacidad para pesar 23.5g de azúcar crudo
- 3.4.1.3. Embudo para el dispositivo de filtración al vacío
- 3.4.1.4. Matraz de filtración al vacío de 1000mL
- 3.4.1.5. Matraces aforados de 25mL
- 3.4.1.6. Membrana Millipore de 0.45mm
- 3.4.1.7. Membrana absorbente (prefiltro) para dispositivo de filtración
- 3.4.1.8. Pipeta de seguridad para dosificar el ácido tricloracético
- 3.4.1.9. Pipeta graduada de 20mL
- 3.4.1.10. Tubo de Nessler con aforo a 100mL
- 3.4.1.11. Vaso de precipitados de 250mL
- 3.4.1.12. Vidrio de reloj de 12cm de diámetro

3.4.2. Equipos de medición

- 3.4.2.1. Bomba de vacío
- 3.4.2.2. Espectrofotómetro UV - visible, con dos celdas de 5cm y dos celdas de 1cm
- 3.4.2.3. Parrilla térmica con agitador magnético

3.5. Procedimiento

- 3.5.1. Pesar 23.5g de la muestra de azúcar crudo y colocarlos en un vaso de precipitados. Agregar 35mL de agua destilada, insertar la barra magnética, cubrir el vaso de precipitados con el vidrio de reloj y conectar la placa de calentamiento para disolverla.
- 3.5.2. Agregar 0.05g de enzima μ -amilasa tipo X-A e incubar a 328°K (55°C) durante una hora en una estufa o en un baño de agua, agitando cada 15 minutos.
- 3.5.3. Después de la incubación, agregar a la muestra 5 g de Amberlita IR-120 y 5g de Amberlita IRA-45 y agitar durante 30 minutos.
- 3.5.4. Agregar 1g de filtroayuda lavada con ácido, mezclar y filtrar solamente a través de la membrana absorbente. El filtrado se recibe en un tubo de Nessler de 100mL colocado dentro del matraz de filtración al vacío. Las paredes del vaso de precipitados se lavan con una piseta, empleando

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

aproximadamente 10mL de agua destilada. Este líquido se pasa a través del embudo y se recoge en el tubo de Nessler. Se continúa con dos pequeños lavados del embudo, teniendo cuidado de no exceder los 100mL del aforo del tubo de Nessler.

- 3.5.5. La muestra y los lavados, contenidos en el tubo de Nessler, se aforan a 100mL con agua destilada y se agregan 10mL de ácido tricloroacético. Se tapa el tubo y se agita.
- 3.5.6. Filtrar el contenido del tubo a través de la membrana Millipore de 0.45mm cubierta con la membrana absorbente recibiendo el filtrado en un tubo de Nessler limpio, colocado dentro de un matraz de filtración de 1000mL. Colectar por lo menos 30mL de filtrado.
- 3.5.7. Con una pipeta poner 12.5mL del filtrado en cada uno de dos matraces aforados de 25mL, designando al primero como EL CONTROL y al segundo como LA MUESTRA.

NOTA: Usar propipeta

- 3.5.8. Agregar al primer matraz (El control), agua destilada moviéndolo, hasta la marca de 25 mL, tapar y agitar. Al segundo matraz (la muestra) agregar alcohol absoluto moviéndolo, con una bureta de 50mL hasta la marca de 25mL. Tapar y mezclar invirtiendo el matraz suavemente de tres a cinco veces.
- 3.5.9. Dejar en reposo la muestra por 60 ± 2 minutos contando este tiempo desde el momento en que se termina de mezclar.
- 3.5.10. Durante el período de reposo, llenar dos celdas de 5cm, una con agua destilada y la otra con El Control. Después de poner en cero el espectrofotómetro UV-Vis a 720nm con el blanco (la celda que contiene agua destilada); leer la absorbancia de El Control la cual se designa como B.
- 3.5.11. Después de realizada la lectura, El Control se guarda en un matraz de 25mL para un posible uso futuro. La celda vacía se lava varias veces con agua destilada y se seca rociándola con acetona.
- 3.5.12. Al terminar los 60 minutos de reposo, llenar la celda limpia de 5cm con La Muestra. Después de poner en cero el espectrofotómetro a 720nm con la celda que contiene agua destilada, leer la absorbancia de La Muestra la cual se designa como A.

3.6. Expresión de los resultados

- 3.6.1. **Cálculos:** El contenido de dextrana se expresa en Unidades de Mili-Absorbancia: (U.M.A.)

$$\text{U.M.A.} = (A - B) 1000 \quad (3-1)$$

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

donde:

A = Absorbancia de LA MUESTRA

B = Absorbancia de EL CONTROL

3.7. Repetibilidad

3.7.1. Cuando la absorbancia de la muestra excede de 0.7 el valor del control y la muestra, debe releerse inmediatamente en celdas de 1cm, después de poner el espectrofotómetro en cero a 720nm con agua destilada. Los resultados entonces se expresan así:

$$U.M.A. = (A - B) 5000 \quad (3-2)$$

donde

U.M.A = Unidades de Mili-Absorbancia

A = Absorbancia de LA MUESTRA

B = Absorbancia de EL CONTROL

3.8. Medición de dextranas: Fundamentos para seleccionar la metodología

La calidad de la caña en el campo tiende a mejorar con la edad, llega a un máximo y luego declina. Cualquiera que sea la calidad en el momento del corte, se inicia un rápido deterioro desde el momento en que se corta la caña. Los agricultores (campo) pierden tonelaje y los procesadores (fábrica, molino, ingenio), azúcar. El deterioro antes de la recolección puede deberse a los daños causados por las enfermedades, las plagas y el clima; por lo general, el deterioro tiene lugar mediante procesos enzimáticos, químicos y microbianos. El deterioro microbiano es causado por bacterias especialmente por las del género *Leuconostoc*, aunque existen muchos otros tipos de bacterias que pueden invadir a la caña cortada. Los organismos del género *Leuconostoc* consumen sacarosa, produciendo largas cadenas de glucosa (polímeros con enlace en su mayor parte 1,6) y biodegradando⁴ la fructosa a ácidos orgánicos como productos secundarios. Cantidades relativamente pequeñas de dextrana presentes en el jugo de la caña (del orden de 10 ppm) aumentan la viscosidad, retardan la cristalización y la filtración y disminuyen el rendimiento de sacarosa. El daño causado por el fuego, el corte, el viento o las heladas, las enfermedades y los insectos, además de los

⁴ Nota de la asesora: La fermentación fue un término acuñado por Louis Pasteur al estudiar la degradación anaerobia de la glucosa por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produciendo alcohol etílico y dióxido de carbono, un proceso ampliamente usado en la industria cañera. Desafortunadamente, todavía hay libros que, de forma errónea denominan a cualquier biorreacción fermentación, cuando el término debe aplicarse exclusivamente a la señalada por Pasteur (en este caso, la fructosa se biodegrada no se fermenta)

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

daños mecánicos, son causas de heridas en los tallos que permiten la entrada de *Leuconostoc* y otros organismos y propician la formación de las dextranas. El intervalo entre el corte y la molienda es el periodo en el que los niveles de dextranas alcanzan sus valores más altos. Las dextranas y las gomas son polisacáridos que, a diferencia del almidón, son solubles en el guarapo frío.

3.8.1. Equipos

- a) Espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 720nm (ya ajustado a cero con el blanco*)
- b) Matraz Kolrausch de 100mL
- c) Balanza analítica de + 0.1mg de precisión
- d) Jeringa de 20mL
- e) Filtro con membrana de 0.45 micras o micrómetros de diámetro de poro
- f) Dos tubos de ensayo de 5mL
- g) Soporte universal
- h) Bureta de 25 ó 50mL
- i) Vaso de precipitado de 250mL
- j) Probeta de 15mL
- k) Pipeta de 5mL
- l) Bombilla de succión para pipetas

3.8.2. Reactivos

- a) Agua destilada
- b) Ácido tricloroacético (*TCA*) (concentración de 10g en 100mL de agua destilada), preparar cada 2 semanas
- c) Alcohol isopropílico grado analítico
- d) Filtro ayuda

* El blanco para esta prueba es la mezcla de 5mL de agua, 1 mL de *TCA* y 5 mL de alcohol isopropílico

3.8.3. Métodos

En el Anexo I se presentan los métodos seguidos descritos de manera detallada.

- a) Pesar 26g (0.1mg) de azúcar en la balanza
- b) Colocar la muestra en el matraz Kolraush y agregar 50mL de agua grado cromatográfico (*HPLC*, en inglés)
- c) Diluir completamente la muestra y aforar a 100mL
- d) Colocar la bureta con alcohol isopropílico en su interior en el soporte universal
- e) Verter en el vaso de precipitados 10mL de solución azucarada
- f) Agregar 2mL de solución de *TCA* y un gramo de filtro ayuda. Mezcle adecuadamente
- g) Succionar con la jeringa la solución del paso anterior

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

- h) Poner el filtro en la jeringa en posición horizontal
- i) Obtener 5mL de filtrado en la probeta y añadir 5mL de alcohol isopropílico de la bureta
- j) Verter la solución en la celda de 10mm del espectrofotómetro
- k) Si se derrama solución a los lados de la celda, secarla con un trapo limpio y seco (que no suelte pelusa)
- l) Poner la celda en el espectrofotómetro (si es de doble celda, colocarla en la posición de la celda de muestra)
- m) Realizar la lectura de absorbancia, anotarla y buscar en la tabla anexa su valor correspondiente en ppm de dextranas

3.8.4. Cálculos

ppm dextranas = resultado de la tabla / 0.237

Para una mayor rapidez, este procedimiento fue adaptado para llevarse a cabo con una jeringa de 20mL y un filtro anexado, con membrana de 0.45 micras o micrómetros de diámetro de poro. La mezcla se puede realizar directamente en la jeringa. En este procedimiento el ácido tricloroacético precipitará la proteína en el jugo; la filtración remueve los sólidos suspendidos, la proteína precipitada y una gran parte del almidón que no es soluble en el jugo frío, así como otros polisacáridos y materia inorgánica que produce neblina de alcohol, no son removidos. Esta prueba dará resultados más altos comparados con la prueba exacta de dextranas. Por lo que se puede elaborar una curva de calibración con cantidades conocidas (de 100 a 1500ppm) de dextranas (se recomienda el T-2000) en jugo fresco y de bajo contenido de dextranas.

3.9. Pruebas en ingenios cooperantes secundarios

Esta prueba se llevó a cabo en dos ingenios en que se comercializa azúcar mascabado, una durante la zafra de 1986, en el laboratorio principal, de un ingenio cooperante "I". En muestras de jugo no se realizó ninguna prueba de dextranas. El nivel de turbidez fue de 200ppm en el jugo o el equivalente en miliunidades de absorbancia en la curva de calibración.

Cuando el clima en la temporada de las pruebas era templado, aproximadamente entre el 70 a 80% de las muestras de jugo eran aceptables y no requerían más análisis de dextranas. Por ello, el número de muestras a analizar se redujo a un 20 o 30%. La prueba rápidamente indicaba al ingenio si la caña podría presentar un problema de procesamiento o el azúcar bruto por la presencia de dextranas.

Aún cuando la prueba no es específica para dextranas es lo suficientemente selectiva para indicar los jugos que están altos en dextranas u otros polisacáridos, sales orgánicas, como el sulfato de calcio, que pueden interferir con la prueba de

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

niebla en el azúcar bruto y que rara vez se presenta en los jugos en cantidades significativas.

3.10. El ingenio azucarero cooperante principal

Antecedentes históricos del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333 (Historia Sucinta del Ingenio San Cristóbal y Manual Azucarero Mexicano 2012). Tomado del Manual Azucarero Mexicano (2012).

“El ingenio San Cristóbal fue fundado en el año 1896, por la “Sociedad Pérez Río y Compañía”, constituida por los españoles Julián Chinchurreta, Nicolás Pérez y Manuel Fernández del Río, en la comunidad llamada San Cristóbal, situada sobre la margen izquierda del Río Papaloapan, a 8 km de la entonces Villa de Cosamaloapan; en el centro de un área de 3,511 hectáreas que la empresa compró al residente tlacotalpeño Don José Luis Pérez, en \$20,000.00.

En 1901, la empresa poseedora de San Cristóbal, cambió de denominación por la de “Ingenio San Cristóbal, S.A.”, hasta el 31 de diciembre de 1908, que una nueva negociación cambió a “Ingenio San Cristóbal y Anexas, S.A.”, título que conservó hasta 1970, fecha en que la empresa pasó a manos del Gobierno Federal con el nombre de I.C.P. (Impulsora de la Cuenca del Papaloapan, S.A. de C.V.).

En 1917 Don Roberto García Loera y socios se hicieron cargo de dicha factoría cuando molía 500 Ton de caña por día, ampliándola en los años 1921, 1924 y 1925 en el que el propio Don Roberto formó el sindicato de empleados, obreros y campesinos, creando conciencia de clases y responsabilidad entre sí. En 1926 se incrementó la molienda a 800 Ton/día. En 1947 se instaló el Tándem “B”, con todos los equipos necesarios para realizar moliendas de 9000 Ton/día, convirtiéndose así en el ingenio de mayor molienda en el estado de Veracruz.

En 1952, el Ingenio San Cristóbal molió 1,444,000 Ton y produjo 97,860 Ton de azúcar, convirtiéndose en el ingenio más grande del México. En 1960 superó la cifra anterior procesando 2,084,000 Ton, produciendo 176,756 Ton de azúcar, transformándose en el ingenio más grande del mundo, posición que reafirma en la zafra 1966 – 1967 al superar su propia meta por la de 2,885,000 Ton de caña y 247,900 Ton de azúcar. El Ingenio contaba, en esa fecha, con cuatro tándems de molinos y todos los equipos inherentes que le permitieron alcanzar su máxima capacidad diaria de molienda de 23,000 Ton de caña y 2,500 Ton de azúcar refinada.

Este ingenio redujo su capacidad de molienda, en relación con su propia meta, dejando de producir azúcar, situación que originó la desviación a otros ingenios de 1,500,000 Ton de caña con el mayor contenido de sacarosa, todas de su zona alta de abastecimiento.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Al no haber conservado el equilibrio de las zonas productoras que promediaran siempre 44% zona alta y 66% zona baja, a la vez que se reducía la capacidad de ingenio, provocó que las zafras subsecuentes fueran solamente de cañas de zonas bajas, reduciendo el ciclo de zafra en un 20% e incrementándose las pérdidas por materia extraña y lodos, aunado a las inundaciones.

Actualmente el ingenio se encuentra registrado bajo el nombre de “Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333” y es propiedad del Gobierno Federal administrado por el Grupo Sagarpa-Ingenios FEESA, el cual durante la Zafra 2011, molió 1,692,561.420 Ton de caña, con una capacidad de molienda diaria de 20,000 Ton de caña/24 h y la producción de azúcar refinada fue de 179,935.650 ton, con un rendimiento en fábrica de 10.631%.

El domicilio del mismo es Nicolás Bravo No. 5 en Carlos A. Carrillo, 95330 Ver.,

3.10.1. Fuentes de microorganismos que producen dextranas a partir del jugo de la caña

El patio del ingenio es una de las áreas con mayores problemas provocados por la presencia de dextranas. El muestreo de caña, que no se discutirá en esta investigación, prueba que es de primordial importancia en el control de todo el material que ingresa al ingenio, siendo esto una posible área de oportunidad para la continuación de esta investigación.

En áreas donde se practica el lavado de caña, el agua de lavado (la cual limpia el azúcar de la caña lastimada) es reciclada y provee una fuente de *Leuconostoc* y otros microorganismos y dextrana. Generalmente, es necesario reciclar esta agua por intereses ecológicos, pero debe ser evaluada como una fuente de infección.

A lo largo de los molinos, los tanques de recolección de jugo abajo del molino son áreas para el crecimiento de *Leuconostoc* y extremadamente propensas a guardar los organismos productores de dextranas. Son una importante fuente de infección ya que grandes concentraciones de bacterias que forman las dextranas se pueden observar detrás de las pantallas que no se limpian frecuentemente. El tanque de jugo diluido es otra fuente de contaminación pues recibe jugo contaminado y rara vez está completamente vacío. Cualquier tanque, tubería o válvula que contenga jugos sin cal durante el paro de los molinos, está proveyendo otra fuente de contaminación. El agua de imbibición a baja temperatura acrecienta la producción de dextranas; el agua caliente disminuye la producción de dextranas pero presenta otros problemas, como la disolución de gomas y ceras de la caña, entre otros.

El aumento de pH en el agua con cal (defecación) puede retardar el crecimiento del microorganismo *Leuconostoc*, pero en el agua fría su proliferación puede continuar por las condiciones que son adecuadas para el desarrollo del organismo

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

(no necesariamente producción de dextranas) que son próximas a pH=7. No obstante, el calor mata al organismo y después de los evaporadores existe poca probabilidad de encontrarlo. Más que en agua de lavado de centrifugas o de recolección de polvos o en cualquier otro material bajo en °Brix.

La clarificación remueve algunas dextranas, particularmente aquellas de alta masa molecular y, ofrece la mejor posibilidad para remover dextranas de los jugos antes de su efecto en la viscosidad causante del retardo en la evaporación. A pesar de ello, las dextranas que salen fuera en el lodo pueden ser redisueltas fuera de los filtros, particularmente aquellos del rango removido, cuya masa molecular sea baja para entrar nuevamente en los jugos mezclados con lodo y agua de lavado. Sin embargo, altos niveles de moléculas neutras de dextranas recicladas pueden impedir la operación floculante en los clarificadores.

A continuación, en la Figura 3.1 se presenta el diagrama de proceso del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333, donde los puntos señalados con numerales se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Detalles que complementan el diagrama de proceso de fabricación de azúcar refinado del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333

Clave	Descripción	Observaciones
1	Azúcar "A"	A fundición de azúcar "A"
2	Azúcar húmeda	Continuación del proceso a la recepción de azúcar húmeda para su secado
3	Azúcar seca que ya se pesó	Envío a envasado
4	Granza + materias extrañas en el azúcar seco	Se recicla a colado de licor
5	Producto no conforme (PNC) envasado	Se reciclan para su uso como semilla de cristalización crudo
6	Producto no intencionado (PNI)	Se recicla para su uso como semilla de cristalización crudo
7	Azúcar que se cae del embarque a camiones a bodegas externas y/o clientes	Se recicla para su uso como semilla de cristalización

En el Anexo II se presentan algunos de los microorganismos encontrados en estas partes de los ingenios azucareros-alcoholeros.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

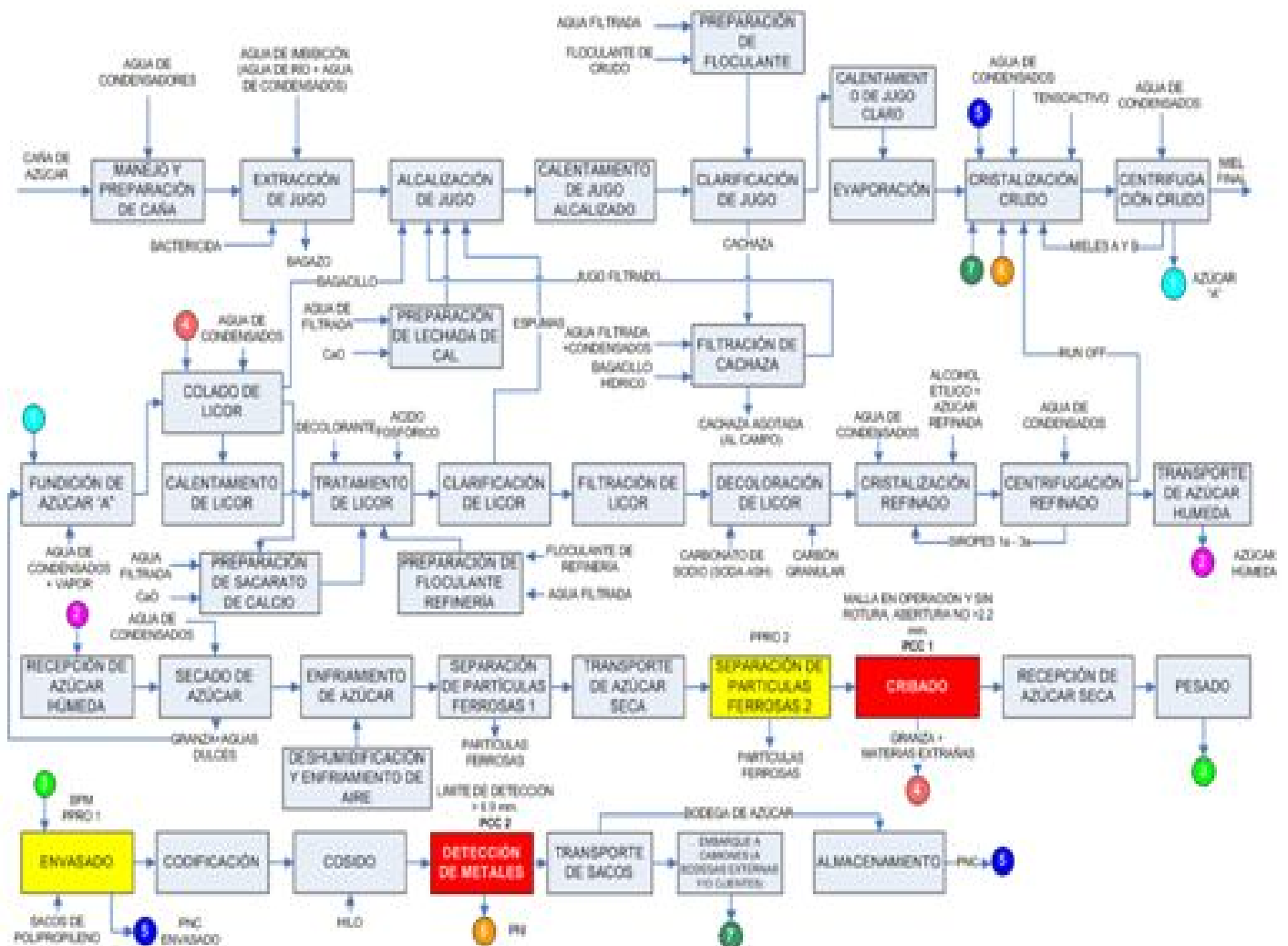


FIGURA 3.1. Diagrama de proceso de fabricación de azúcar refinado del Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados experimentales, así como las condiciones que ocasionan estos resultados negativos en cuanto a la presencia de dextranas y las posibles propuestas a comentar.

4.1. Cuantificación de microorganismos

En las Tablas 4.1 y 4.2 se muestran las poblaciones totales de bacterias en muestras de procesamiento de azúcar en dos ingenios cooperantes, el A y el B.

Tabla 4.1. Población total de bacterias y de la bacteria *Leuconostoc* en muestras de procesamiento de azúcar (Ingenio A)

INGENIO A			
MUESTRA	Total de bacterias x 10/mL	Bacteria <i>Leuconostoc</i> x 10/mL	% <i>Leuconostoc</i> en el total de bacterias
Primer jugo extraído	243	135	56
Último jugo extraído	80	25	32
Jugo diluido	290	114	39
Jugo después de la separación	182	145	80
Jugo con cal	-	282	-
Jugo fuera de filtro	44	.003	-
Costra de filtro	28	-	-
Bagazo	103	7	1

Tabla 4.2. Población total de bacterias y de la bacteria *Leuconostoc* en muestras de procesamiento de azúcar (Ingenio B)

INGENIO B			
MUESTRA	Total de bacterias x 10/mL	Bacteria <i>Leuconostoc</i> x 10/mL	% <i>Leuconostoc</i> en el total de bacterias
Primer jugo extraído	237	163	69
Último jugo extraído	84	26	31
Jugo diluido	258	206	80
Jugo después de la separación	192	109	57
Jugo con cal	470	240	51
Jugo fuera de filtro	181	1.8	1
Costra de filtro	263	-	-
Bagazo	53	3.21	6

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Estos resultados sobre los niveles totales de bacterias, en los dos ingenios azucareros, muestran que la mayoría de las bacterias vienen con la caña y están en el primer jugo extraído. Es evidente que aunque del total de bacterias x 10mL es mayor en el primer jugo extraído, en el ingenio "A" que en el ingenio "B", se aprecia en la Tabla 4.2, un incremento de la bacteria *Leuconostoc*, después de la separación en el jugo con cal en el ingenio "B", que en el ingenio "A". Lo que es visible, dado que en el ingenio "B" la población de bacterias del género *Leuconostoc* es mayor en el primer jugo extraído.

En una fábrica típica de azúcar de caña, el jugo se extrae de los tallos por trituración en una serie de tres o cinco molinos de rodillos. El jugo recogido es entonces encalado a pH 8 y calentado a ebullición en el proceso de clarificación, que efectivamente mata todas las células vegetativas. El intervalo de tiempo entre la trituración y la clarificación es de aproximadamente 15-20 minutos, pero el nivel de contaminación microbiana del jugo es por lo general muy alta (Solomon, 2000).

Con respecto al contenido de dextranas en la cristalización, no es probable que se forme en esta parte del ingenio, pero la dextrana en el jarabe tenderá a permanecer en el cristal del azúcar más que la mayoría de las impurezas como se muestra en la Tabla 4.3. Si ocurre una condensación en la superficie de los jarabes o hay presencia de melaza en tanques, la infección puede presentarse en superficies diluidas.

Tabla 4.3. Distribución de dextrana en la cobertura del jarabe y el cristal

Dextrana en azúcar bruto entero (cristal + cobertura jarabe), ppm	Dextrana en azúcar bruto lavado (en cristal), ppm	Porcentaje de dextrana en cristal
556	486	79
663	597	81
550	495	81
578	550	86

Las dextranas pueden ser producidas durante el almacenamiento de azúcar bruto bajo condiciones de alta humedad, especialmente donde la capa exterior de la pila de almacenamiento de azúcar desarrolla una capa lo suficientemente baja en °Brix para permitir que el organismo *Leuconostoc* y otros oportunistas se mantengan. No obstante, las levaduras son microorganismos más fáciles de encontrar bajo esas condiciones.

A continuación se detallan dos puntos que pueden haber influenciado en la obtención de estos datos.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

4.2. Control de microorganismos en el cañaveral

La importancia de mantener los tiempos de quema y corte y de corte y triturado al mínimo no debe ser sobre-enfatizada, pero ciertos retrasos son frecuentemente necesarios. En climas cálidos, especialmente con la caña cosechada y troceada, hasta la entrega más rápida puede dejar tiempo para desarrollar dextranas. Trabajos recientes muestran que los bactericidas aplicados en el cañaveral pueden eliminar hasta el 40% de la dextrana en el jugo (Solomon, 2000).

El almacenamiento de la caña, debe ser conducido con precaución, ya que temperaturas templadas y una amplia circulación del aire inhibirán la contaminación por *Leuconostoc*. La temperatura no puede ser controlada frecuentemente, pero si se mantienen altas temperaturas de almacenamiento, la caña podrá ser manejada de tal manera que se minimicen otros factores adversos (ejemplo: mutilación de la caña, cepas de lodo y condiciones anaerobias).

La caña en el cañaveral deberá apilarse de forma limpia con un mínimo contacto con la tierra ya que altos niveles de lodo y basura impulsan al desarrollo de *Leuconostoc* así como el agua que se queda en la pila de caña.

La inclusión del factor del deterioro en los sistemas de pago de caña da un excelente aliciente para un buen trato en el cañaveral y una entrega rápida. Es difícil incluir el factor de dextranas en este momento ya que no existe una prueba rápida disponible. Las pruebas de acidez y pH se utilizan en algunas áreas, pero estos varían tanto como otros factores, como la vejez y solamente la determinación de la dextrana permanece como el mejor factor para indicar el deterioro.

4.3. Control de microorganismos en el ingenio

El control de dextranas en el ingenio puede ser considerado en dos partes: la primera, el control de *Leuconostoc* y la producción de dextranas en el ingenio y como segundo punto, el control de dextranas que entran al ingenio en el jugo y su remisión antes de la etapa de azúcar bruto.

Es muy común y extenso el uso de bactericidas en el molino. Los bactericidas se aplican bajo el primer molino. Los carbamatos se adicionan a una tasa cercana a 20 ppm y han mostrado éxito, como lo han hecho compuestos cuaternarios de amonio (Solomon, 2000). Es importante que el uso de bactericidas sea evaluado considerando la efectividad relacionada con los costos y los residuos. Lavar de manera frecuente con manguera y agua caliente los molinos y la recolecta de jugos de los tanques es tan efectivo como la maceración caliente (agua a una temperatura superior a los 90°C).

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

4.4. Control en la refinería

El control en la refinería consiste principalmente en mantener buenas prácticas de higiene. Las aguas dulces compuestas por agua de lavado de diversas fuentes son el material bajo en °Brix en una refinería y el mayor foco de contaminación por *Leuconostoc* y, obviamente, la producción de dextranas. Las fuentes de producción de agua dulce deberán ser evaluadas a causa de la contaminación. Los tanques de almacenamiento de jarabes deberán ser evaluados constantemente o mantenerse totalmente llenos para evitar que se forme una capa de condensación que pueda contaminarse con *Leuconostoc*.

4.5. Microorganismos en la caña

Se aislaron aproximadamente 50 microorganismos diferentes de la caña verde y 17 de la superficie de la caña quemada. Además de la bien conocida especie productora de polisacáridos, *Leuconostoc mesenteroides*, hay géneros de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torula* y *Pichia*), de bacterias (*Pseudomonas*) y de bacilos del suelo (*Bacillus cereus*); así como *Penicillium* y otros hongos, *Actinomyces* y el hongo productor de ácidos *Streptomyces*. Todos estos microorganismos son muy activos (Ver Anexo II).

El microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* entra a la caña de azúcar antes de la cosecha cuando ciertas variedades de caña desarrollan grietas por el crecimiento, mientras que la caña en pie no dañada queda libre de contaminación del este microorganismo. La quema excesiva de la caña elimina de la superficie de la caña la capa de cera protectora, causando hendiduras en la corteza dañando el tejido de almacenamiento debajo de ésta; lo que provoca que se debiliten los tallos y esto ocasiona que el jugo se fugue y sea fuente de alimento para *Leuconostoc* y otros organismos.

Después de 24 horas de la quema, en la caña en pie se encuentran otros organismos tales como: los hongos *Rhizopus* y *Aspergillus* y las levaduras coloreadas *Rhodotorula* y *Candida* (Ver Anexo II).

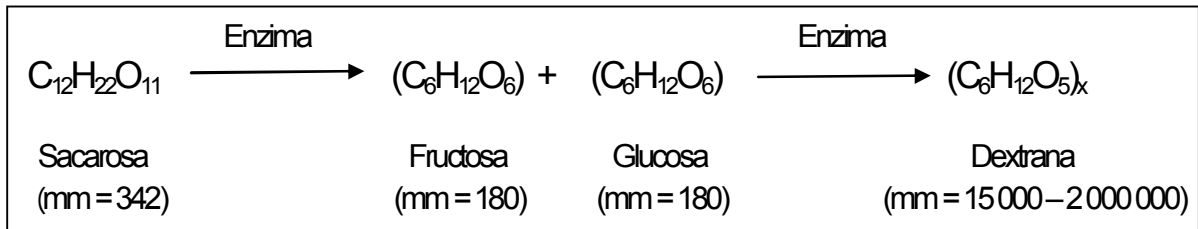
Leuconostoc mesenteroides es un microorganismo muy común en la caña quemada y su número aumenta considerablemente después del quemado.

Los organismos productores de material muciforme, como *Leuconostoc*, *Xanthomonas* y *Aerobacter*, predominan y producen ácidos y materiales semejantes a las dextranas (Ver Anexo II).

Aún en condiciones de cosecha y almacenamiento favorable ocurre un deterioro importante en tan poco tiempo como 24 horas. Solamente *Leuconostoc* y *Lactobacillus* producen dextranas. Como ya se mencionó, es posible detectarla con etanol del 50% (v/v). La característica dextrorrotatoria de la dextrana afecta la

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

polarización de jugo, dando como resultado un error en el contenido de azúcar y, por ende, una medición falsa del contenido de sacarosa.



Las superficies cortadas de la caña son la “puerta de entrada” a estas infestaciones de organismos que transforman a la sacarosa en dextrana (Fotografía 4.1).



Fotografía 4.1. Caña de azúcar cortada de forma manual que sufre menos daño que la caña troceada mecánicamente y, por ende, menos infestación

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Las bacterias de la familia *Leuconostoc sp.*, se encuentran asociadas frecuentemente con caña de azúcar deteriorada y contaminada, primordialmente porque los procesos requieren trozos pequeños de caña de azúcar para separar físicamente el azúcar de manera más sencilla. Las enzimas que poseen estas bacterias tienen la capacidad de sintetizar alfa-glucan-polisacáridos (dextranas), a partir de la sacarosa soltada por la caña después de daños por maniobras, procesos de cortes y/o demoras en los procesos de cosecha, transporte, almacenamiento y heladas. Como ya se mencionó, el contenido de dextranas sintetizadas varía con la localización geográfica y clima del área de cultivo, variedad de caña, calidad de caña, tiempo de quema a cosecha, método de cosecha y tiempo de corte a cosecha. Las dextranas interfieren con la unión y asentamiento de las partículas insolubles, con las velocidades de filtración, con la relación ebullición:evaporación, y durante todo el control del proceso. La quema afecta seriamente la calidad (Fotografía 4.2)



Fotografía 4.2. Caña de azúcar quemada para facilitar su corte manual

Durante la evaporación, la concentración de dextranas aumenta, lo que interfiere con la formación y la separación de los cristales de azúcar, incrementando la pérdida de sacarosa que se va a las melazas o mieles finales.

La capacidad de proceso y los rendimientos disminuyen y, en algunos casos, se puede hacer necesario el paro de la planta para realizar limpieza de todo el equipo, siendo el daño económico alto (Solomon, 2000).

La formación de dextrana se incrementa con el tiempo. El aumento durante las primeras 24 horas es bajo comparado con el aumento en las siguientes 24 horas (Solomon, 2000; Solomon y col., 2003).

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

La ocurrencia común de microorganismos en el jugo recién extraído y la capacidad de los mismos para producir pérdidas en la sacarosa recuperable han originado una gran cantidad de estudios para disminuir estas pérdidas, por medio de agentes bacteriostáticos (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010). Tal como se entrega a los molinos, la caña de azúcar contiene una gran cantidad de bacterias, según lo muestran las Tablas 4.4a,b,c.

Tabla 4.4a. Cantidad de microorganismos, NMP/100mL, encontrados en tallos de caña cruda troceada (Delfín, 2012)

Tallo de caña	Total	Bacterias	Hongos	Levaduras
1	440,000	430,000	1,100	200
2	194,000	193,000	590	110
3	98,000	73,000	7,700	13,000
4	180,000	170,000	8,500	50,000

Tabla 4.4b. Tipos de microorganismos encontrados en el jugo fresco de caña de azúcar. Especies predominantes (Delfín, 2012)

<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Saccharmyces cerevisiae</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia membranafaciens</i>
<i>Torilopsis stellata</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>P. fermentans</i>	<i>C. intermedia</i>

Tabla 4.4c. Condiciones de desarrollo de organismos dañinos

Grupo	Temperatura óptima para el desarrollo	
	°C	°F
Leuconostoc mesenteriodes	20-25	68-77
Aerobacter aerogenes	30	86
Bacillus mesentericus	37	99

La caña de azúcar lleva a los molinos un gran contenido de microorganismos viables quedando la mayoría en el jugo extraído, donde si la temperatura es apropiada para su desarrollo, la proliferación microbiana se presenta inmediatamente.

Otros factores que determinan el deterioro que los jugos de caña experimentan son: El pH de los jugos y la cantidad y la clase de material contaminante que está en contacto con el jugo. El rendimiento óptimo de dextranas ocurre en el intervalo de pH de 7 a 8.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Las bajas temperaturas y el pH alto favorecen a *Leuconostoc*, mientras que una acidez ligera (pH 6.5) y una temperatura alta (más de 65°C) son las condiciones menos favorables para su desarrollo. La Tabla 4.5 muestra su multiplicación en condiciones favorables.

Tabla 4.5. Multiplicación de microorganismos en condiciones favorables

Tiempo	Número de microorganismos /100mL
08:00 horas	64
10:00 horas	4,000
12:00 horas	260,000
14:00 horas	12,000,000
16:00 horas	1,000,000,000
18:00 horas	69,000,000,000

Por lo que para el buen funcionamiento de los molinos, la aplicación de chorros de vapor en las juntas y en las uniones de los transportadores resulta efectiva en un 60%, el resto debe tratarse por medios químicos. Se hace hincapié en la necesidad de la limpieza en los molinos para eliminar organismos contaminantes.

Un bactericida comúnmente usado en el ingenio cooperante tiene, según los proveedores, la composición siguiente:

Ingredientes activos

Di-cianoditiomidocarbamato de sodio	12.7%
Etilendiamina	4.8%
N-metilditiocarbamato de potasio	17.5%
Ingredientes inertes	65.0%

Se anexa el análisis de laboratorio del bactericida, realizado por LAICA, S. A. de C.V., con el contenido real de ditiocarbamatos, que es de 34.41% (Figura 4.1).

La diferencia entre los jugos tratados y los no tratados se observa incluso en un periodo de cinco horas (Figura 4.2).

Unos de los métodos más usados para evaluar la efectividad de un bactericida es correlacionando las dextranas contra el tiempo, pero como los análisis son tardados y en algunos casos costosos, se pueden emplear otras alternativas como son la medición del azúcar invertido, tomando en cuenta que no son tan confiables

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

como el de las dextranas debido a que el contenido medido como grados Brix, se reduce cuando la sacarosa o el azúcar invertido es utilizado por los microorganismos (Figuras 4.3 a 4.5).

En estas cuatro figuras se aprecian (Figs. 4.3 a 4.6) el uso o la aplicación de bactericidas, en diferentes concentraciones. En la Fig. 4.3 se observa que, a mayor concentración (20 ppm), disminuyen los azúcares reductores en las primeras cuatro o cinco horas. También se hicieron pruebas con dos diferentes bactericidas, concluyendo que tienden a mantener el pH y los azúcares reductores en el lapso de una hora (Figuras 4.4 y 4.5). Después de este tiempo, el pH tiende a bajar y los azúcares reductores a aumentar. Esto es indicativo de que la preservación con bactericidas funciona en las primeras horas y que los jugos de las primeras extracciones al mezclarse tienden a elevar los azúcares reductores y a disminuir la pureza de los mismos.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Laboratorios
LAICA, S.A. de C.V.

FECHA: MARZO 30 DE 2007	No. LAB 66010	PAGINA 1 DE 1
NOMBRE DE LA EMPRESA FIDEICOMISO INGENIO SAN CRISTÓBAL 80333		
NOMBRE DEL CLIENTE: ING. JOSÉ MARTÍN DELFÍN (Supte Control de Calidad)		
DIRECCIÓN: NICOLAS BRAVO #5 CARLOS A. CARRILLO VERACRUZ		

MUESTRA:

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA:	BACTERICIDA
FECHA Y HORA DE MUESTREO:	NO ESPECIFICO
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN:	MARZO 21 DE 2007 18:10 h
RESPONSABLE DEL MUESTREO:	REM: TIDA POR EL INTERESADO
DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO:	NO ESPECIFICO

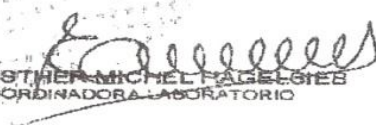
INFORME DE ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO

PARÁMETROS	RESULTADOS	FECHA DE ANÁLISIS	ANALISTA
DITIOCARBAMATOS	34.41 %	27/03/07	TQF. ESTHER MICHEL

NOTA No.1 LA DIRECCIÓN LE AGRADECE NOS COMUNIQUE CUALQUIER SUGERENCIA, OPINIÓN o QUEJA QUE NOS AYUDE A AUMENTAR LA SATISFACCIÓN DEL CLIENTE.

NOTA No.2 ESTE REPORTE AMPARA EXCLUSIVAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA POR NOSOTROS Y NO PODRÁ SER REPRODUCIDO EN FORMA PARCIAL SIN LA AUTORIZACIÓN PREVIA DE LABORATORIOS LAICA, S.A. DE C.V.


Q.F.B. CRISTINA TORRES JUAREZ
 RESPONSABLE AUTORIZADO


TQF. ESTHER MICHEL FAGELGIEB
 COORDINADORA LABORATORIO


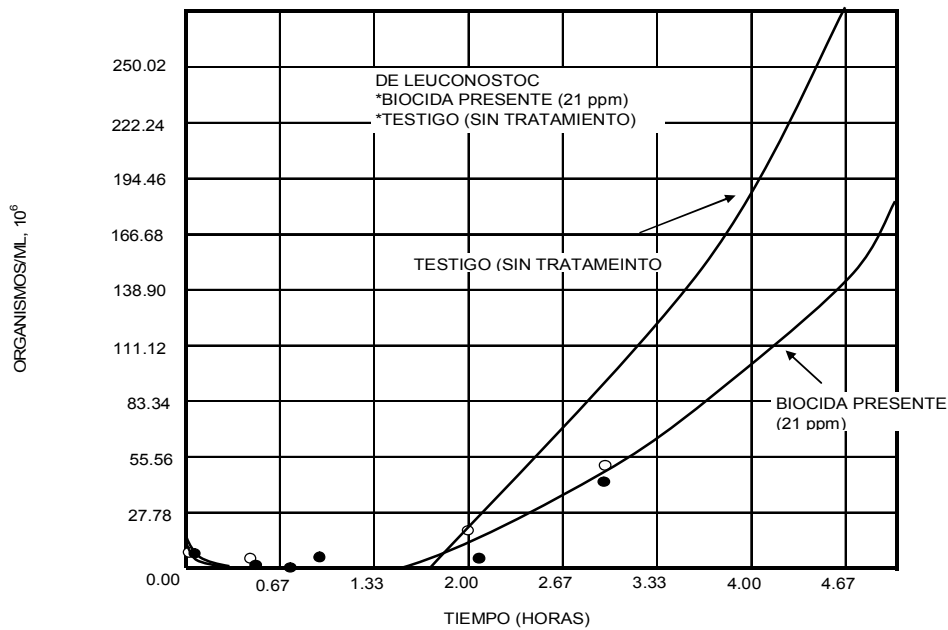


Figura 4.1. Análisis de laboratorio del bactericida (LAICA S. A. de C.V., 2007)

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA



Concentración de *Leuconostoc* en muestras tratadas (21 ppm de antibiótico) y no tratadas

Figura 4.2. Concentración de *Leuconostoc mesenteroides* en muestras tratadas (21 ppm de bactericida) y no tratadas

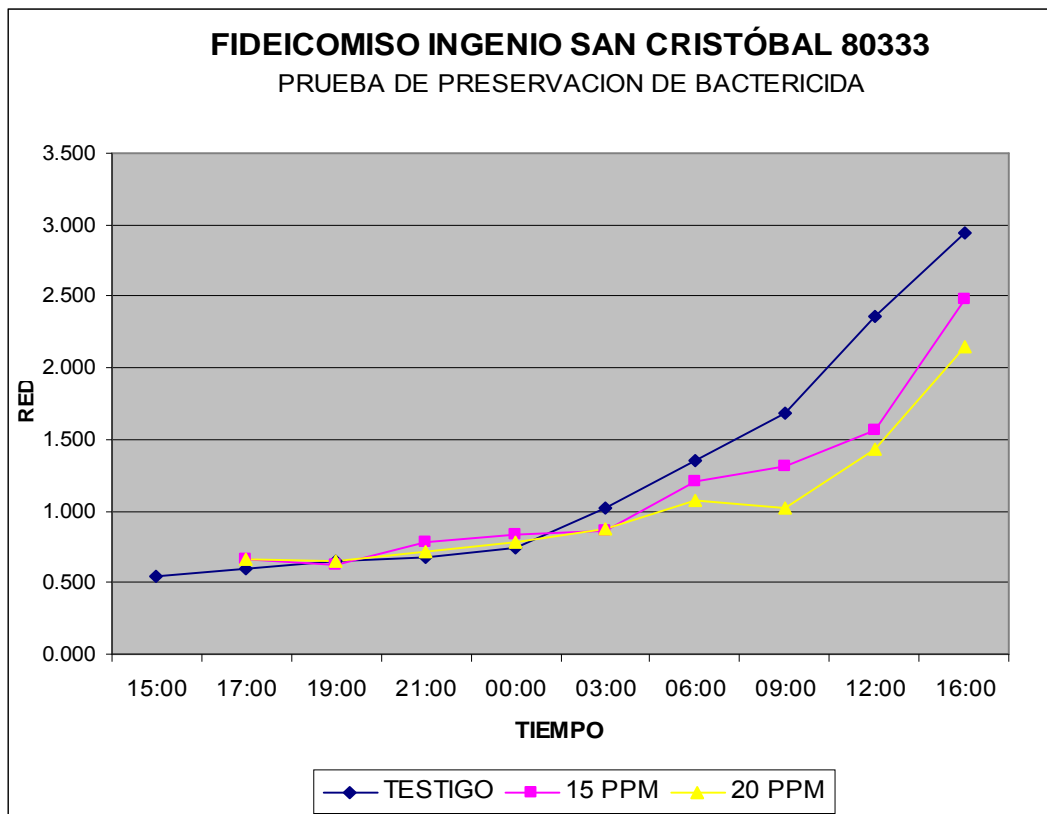


Figura 4.3. Prueba de preservación del bactericida a concentraciones de 15 y 20 ppm vs un testigo

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

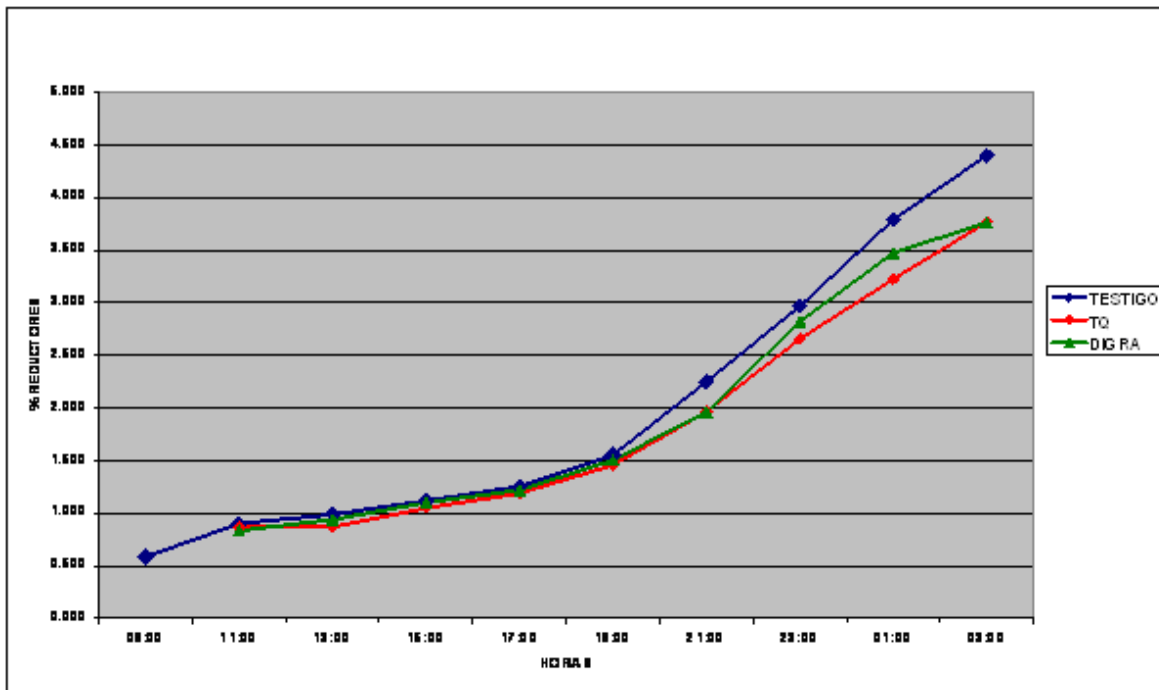


Figura 4.4. Prueba de preservación con el bactericida, 2 marcas de bactericidas contra un testigo, relacionando el % de azúcares reductores versus tiempo

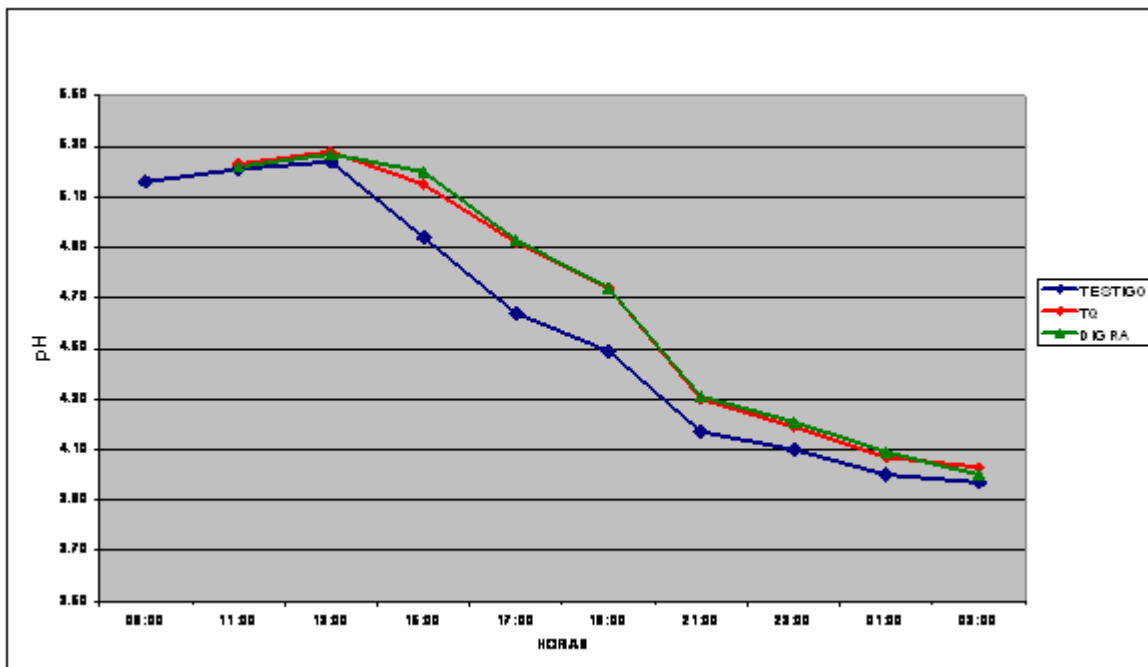


Figura 4.5. Prueba de preservación con el bactericida relacionando el pH contra tiempo en horas

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

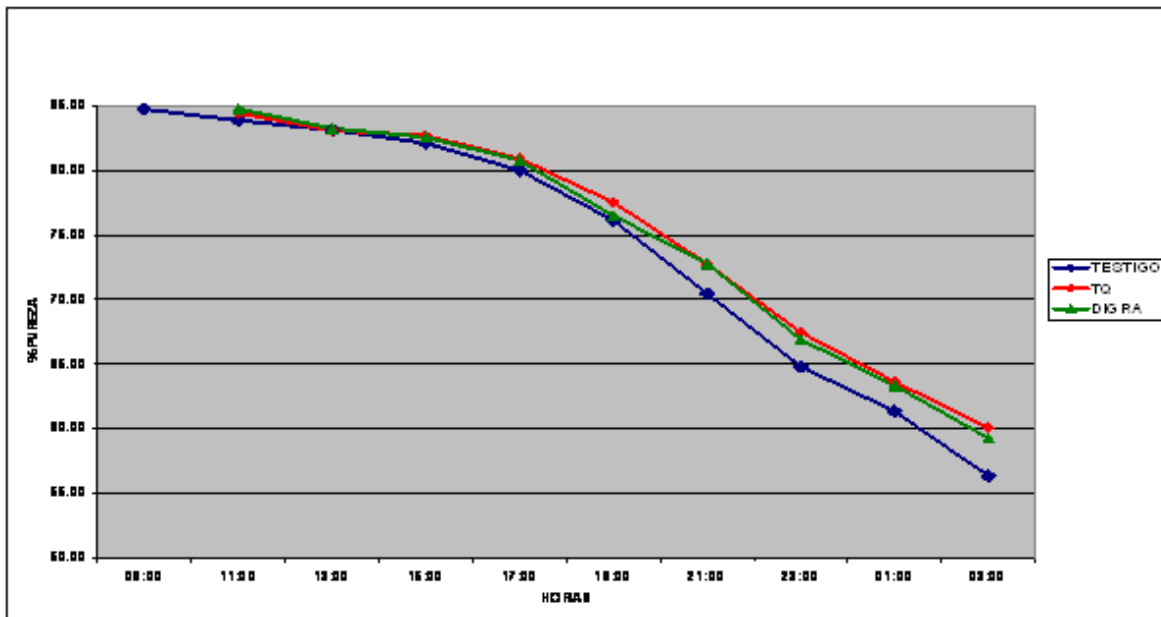


Figura 4.6. Prueba de preservación con el bactericida que relaciona el % de pureza contra el tiempo en horas

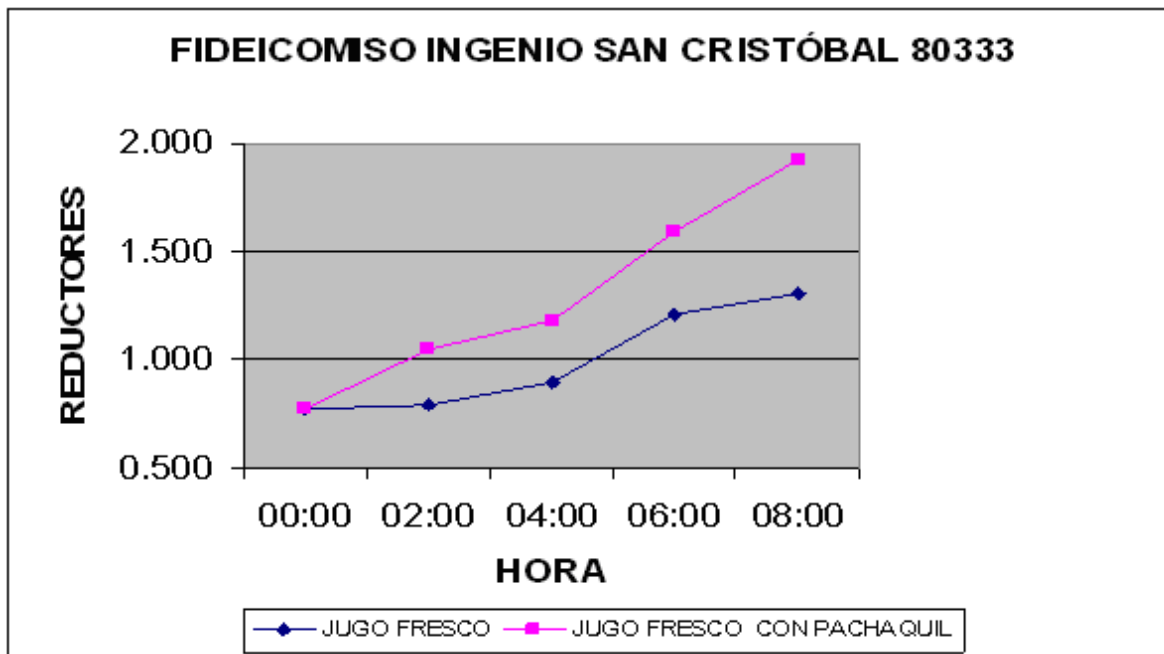


Figura 4.7. Azúcares reductores en jugo desmenuzado o de primera extracción comparando con azúcares reductores en jugo fresco mezclado con “pachaquil” o jugo que sale de los molinos contra el tiempo en horas

Se debe prestar un especial cuidado a la higiene de los tanques de colecta de jugo, especialmente a los de jugos diluido o combinado con cualquier otra área en que se retenga este jugo. Los sistemas de adición de cal y ácido fosfórico (si se

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

usan) y el control de pH debe mantenerse en buen orden de trabajo con circulación eficiente inmediata después de su adición.

Todas las cortinas o pantallas (*screens* en inglés), son un foco de infección: El crecimiento de *Leuconostoc* se concentra detrás o arriba de ellas por lo que deben ser lavadas frecuentemente con bactericidas, agua caliente o vapor.

Los filtros de lodo y agua de lavado de lodo deben ser evaluados como una fuente de posible infección por *Leuconostoc*. Los tratamientos con bactericidas son necesarios: Por ejemplo, el agua de lavado caliente y el rápido reciclaje del enjuague del lodo pueden ayudar a limitar el desarrollo del organismo. La clarificación en filtros pueden remover las dextranas.

La literatura no reporta el efecto de la operación unitaria de sulfitación en el desarrollo del *Leuconostoc*. Teóricamente, la adición de SO₂ reacciona tan rápidamente que no queda el suficiente para actuar como bactericida. Mientras se mantengan altas temperaturas, el microorganismo *Leuconostoc* no se incrementa pero sí puede infectar las áreas y crecer en jugo sulfitado más templado.

4.6. Datos de dextranas encontrados

En la Figura 4.8 se presentan los datos de dextrana encontrados en esta investigación.

Estos se determinaron con el método de anticuerpos monoclonales mencionado en el ANEXO I.

En la Figura 4.8 se muestra cómo se aumentó la concentración de dextranas en caña cortada y quemada en canutos cortos en comparación con los canutos largos. A medida que se aumentó el tiempo de almacenamiento, transcurridas 24 horas, se observó que en los canutos cortos, la superficie expuesta fue mucho mayor la concentración que en los canutos largos y, por lo tanto, el ataque de los microorganismos se duplicó o triplicó. Estos resultados determinaron, que la molienda debe efectuarse dentro de las 24 horas después del corte, ya que después de este tiempo el deterioro de la caña es inminente. Según Foster e Irvin (1981), la quema previa a la cosecha de la caña de azúcar que se practica en algunos países productores de caña, provoca importantes cambios físico-bioquímicos en las plantas de caña.

Los informes disponibles indican que la caña picada y quemada, se deteriora más rápido en comparación con la caña verde picada. Estos cambios metabólicos a lo largo del proceso con la infestación microbiana y otros factores tales como la destrucción térmica de la sacarosa, con alta tasa de inversión, con la pérdida de agua y con la pérdida de azúcar por la exudación en la superficie de caña son

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

razones adicionales para la reducción del valor de "CCS" (*Commercial Cane Sugar* o Azúcar de Caña Comercial) de la cosecha de caña quemada.

Un estudio realizado en Taiwan (Hsia, 1972) mostró que la caña quemada cortada resultó altamente susceptible a la contaminación microbiana y a la inversión en comparación con la caña madura sin quemar.

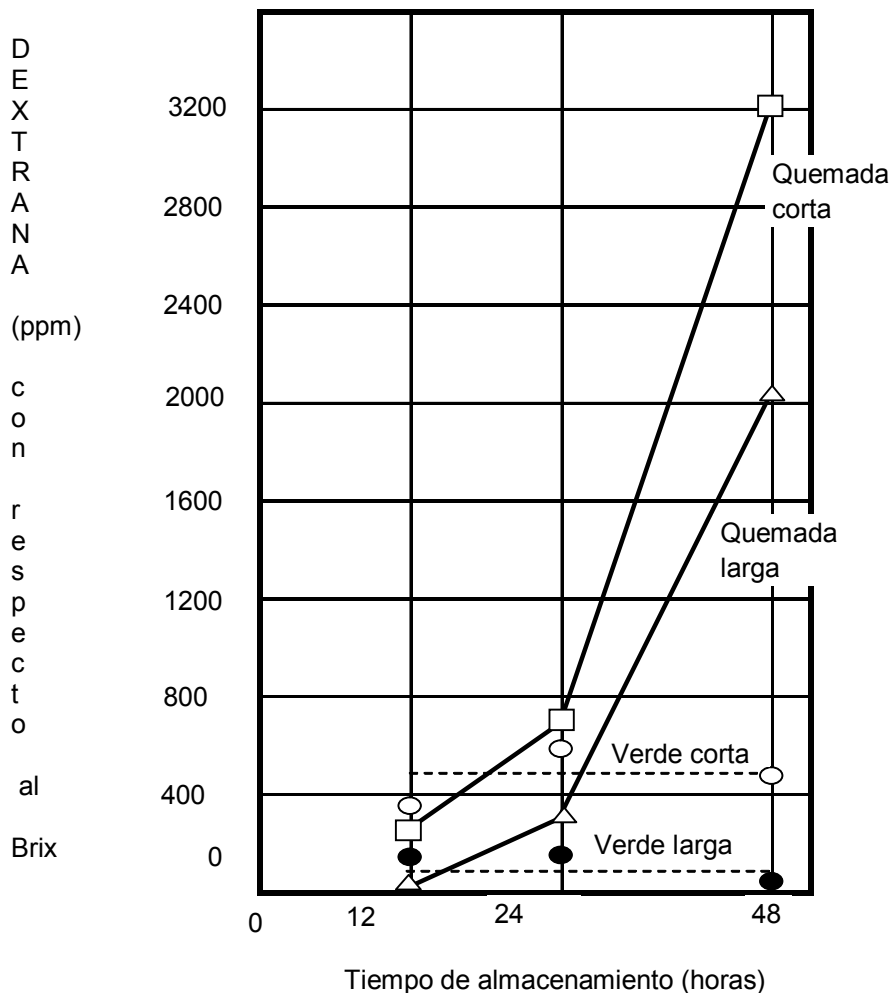


Figura 4.8. Dextrana y frescura de la caña.
Cada curva es el promedio de cuatro determinaciones

El efecto más dañino de las dextranas, como previamente se mencionó, es el alargamiento de los cristales de sacarosa. Esto es más notable en la templa de bajo grado. La formación de dextrana y el alargamiento de los cristales no solamente reducen el crecimiento de los cristales, sino que también aumenta la formación de grano falso. Las masas cocidas de bajo grado son más difíciles de

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

centrifugar, aún con máquinas intermitentes; además, el magma hecho con el azúcar purgado es un mal pie de templa para templas de pureza alta.

El control de dextranas aún presentes en el jugo proveniente de la caña infectada puede lograrse en dos formas: 1) Tratamiento con la enzima dextranasa y 2) La remoción por clarificación del jarabe.

La enzima dextranasa descompone a la dextrana en moléculas más pequeñas y glúcidos más complejos (oligosacáridos). No reduce a la dextrana a sus unidades de glucosa pero, como se utiliza en los ingenios, descompone a las dextranas de alta masa molecular en moléculas más pequeñas y con menor masa, los cuales tienen menos efecto en la viscosidad y son más fácilmente procesadas con el azúcar.

El Instituto de Investigaciones de Molinos de Azúcar (S.P.R.I., por sus siglas en inglés, ubicado en Durban, Sudáfrica) ha mostrado que pequeños oligosacáridos (conteniendo de 3 a 4 unidades de glucosa o fructosa), pueden causar alargamiento del cristal y los problemas resultantes del bloqueo de las pantallas de las centrifugas y purgas deficientes (Covacevich y col., 1977).

En Australia se utiliza la enzima para el 3% de su caña y se adiciona en el tanque de jugo mixto con un pH de 5.5 a 30°C por aproximadamente 15 min. Inkerman y James (1976) e Inkerman y Riddell (1977) dan un excelente estudio del uso de esta enzima en Australia. Estos autores han sido pioneros en desarrollar el uso de las dextranasas en ingenios azucareros. El grupo de Inkerman (1976) usa el pH como un indicador del uso de la dextranasa: Si el pH del jugo baja a 5, el uso de dextranasa es indicado. En una publicación relativamente reciente de Inkerman y colaboradores (1983), se indica que las variaciones del pH junto con otros factores (basura y lodo) hacen que pueda no ser suficiente la aplicación de las enzimas para los propósitos de control de las dextranas. Una enzima dextranasa producida por *Chaetomiun gracile* fue aprobada para su uso en EEUU y se encuentra disponible, a diferencia de la enzima obtenida de *Penicillium spp.* (Edye y col., 1996, 1997).

4.7. ANÁLISIS DE DEXTRANAS USANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES

El nuevo método de determinación de dextranas por medio de anticuerpos monoclonales y su versatilidad, desarrollado por *Midland Research Laboratories, Inc.*, fue presentada durante el XIV Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centro América se presenta en el Anexo I.

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos, en las diferentes etapas del proceso de fabricación de azúcar, durante la zafra 2011-2012.

Tabla 4.6. ANÁLISIS DE DEXTRANAS, ppm
FIDEICOMISO INGENIO SAN CRISTÓBAL 80333
LABORATORIO DE FÁBRICA

FECHA	J DESM.	J MEZ	J C	J F	MEL	M A	M B	M F	LF	LC	LP	AZÚCAR
13/03/2012	571	315	236	687	3,673	4,420	4,791	14,871	2,259	2,489	2,797	52
14/03/2012	1,626	1,084	1,440	575	6,191	4,130	5,720	S.M	3,760	4,074	3,417	180
15/03/2012	825	396.00	1,205	471	4,820	3,789	8,225	18,327	4,899	4,099	3,617	156
16/03/2012	1,849	1,536	938	343	3,840	2,551	3,191	17,297	2,279	3,431	3,456	150
17/03/2012	SIN ANTICUERPO											
18/03/2012	1,500	1,275	1,420	SM	5,022	6,758	8,225	22,136	3,385	2,160	SM	150
19/03/2012	820	572	1,291	439	6,624	5,862	8,764	9,892	1,907	3,768	4,530	200
20/03/2012	398	310	467	402	4,038	SM	SM	SM	2,754	4,075	3,666	112
21/03/2012	537	455	449	SM	3,064	3,707	6,044	SM	2,466	SM	SM	150
22/03/2012	724	426	695	536	3,886	4,571	SM	16,133	4,012	SM	SM	200
23/03/2012	383	372	419	SM	SM	3,043	4,543	SM	SM	SM	SM	131
24/03/2012	1,145	400	SM	SM	2,865	2,291	2,278	18,435	SM	SM	SM	157
25/03/2012	796	779	664	459	4,095	3,894	5,407	14,820	3,713	3,922	4,098	158
26/03/2012	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
27/03/2012	708	1,031	1,323	SM	3,955	8,079	6,029	9,790	2,528	2,272	5,252	63
28/03/2012	1,963	1,539	3,194	SM	6,786	16,976	9,594	12,309	SM	SM	SM	324
29/03/2012	524	423	SM	SM	6,356	SM	SM	8,952	3,324	SM	1,860	126
30/03/2012	303	476	429	473	3,154	4,200	7,710	SM	2,977	SM	SM	184
31/03/2012	577	793	511	SM	3,358	SM	SM	15,034	4,728	1,513	1,897	252
01/04/2012	812	840	1,224	466	4,617	8,287	7,185	12,181	3,454	2,569	3,277	185
02/04/2012	EP											
03/04/2012	2,084	1,548	SM	SM	SM	10,230	19,764	SM	5,614	SM	2,808	59
04/04/2012	649	1,210	2,030	SM	11,742	15,233	20,056	SM	SM	SM	SM	297C

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Continúa Tabla 4.6

05/04/2012	2,064	1,168	1,284	1,095	6,724	SM	SM	SM	SM	8,213	7,629	290
06/04/2012	741	673	1,284	1,095	6,724	SM	SM	SM	SM	8,213	7,629	290
07/04/2012	1,060	672	652	989	3,911	SM	SM	22,767	SM	SM	SM	300
08/04/2012	1,674	1,141	1,295	911	6,744	11,250	15,668	17,474	4,534	6,332	5,334	237
09/04/2012	517	373	1,253	SM	2,807	14,137	SM	16,738	2,493	2,265	2,928	203
10/04/2012	543	466	1,011	1,005.00	6,183	SM	13,802	15,244	3,931	4,124	3,659	238
11/04/2012	2,338	1,443	1,045	311.00	4,901	SM	17,204	SM	6,404	5,664	8,392	285
12/04/2012	896	748	482	507.00	7,869	12,354	SM	18,014	7,580	5,472	7,415	292
13/04/2012	1,277	348	600	SM	4,470	6,243	8,997	24,469	3,596	2,494	4,470	296
14/04/2012	1,863	2,891	1,016	SM	2,403	8,332	12,294	SM	4,182	3,444	4,185	303
15/04/2012	1,301	1,059	957	684.00	5,054	10,463	13,593	18,388	4,674	4,256	5,198	265
16/04/2012	425	382	300	SM	612	2,518	SM	SM	2,733	2,146	2,625	154
17/04/2012	899	466	831	SM	1,607	9,589	13,374	32,765	2,347	4,282	4,642	70
18/04/2012	815	805	257	SM	4,332	SM	SM	24,546	3,291	4,818	2,304	203
19/04/2012	4,304	3,187	908	SM	5,454	6,440	9,671	13,047	2,853	2,208	31,560	337
20/04/2012	1,610	1,210	746	SM	5,560	SM	SM	10,136	3,481	4,181	2,377	70
21/04/2012	2,290	983	1,005	723.00	7,842	9,899	12,398	23,265	4,929	4,809	SM	332
22/04/2012	1,723	1,172	675	723.00	4,235	7,112	11,814	17,293	3,272	3,741	3,021	195
23/04/2012	670	259	594	241	1,953	4,394	9,076	SM	1,558	2,501	970	103
24/04/2012	645	296	247	172	934	SM	7,329	11,043	854	SM	1,977	108
25/04/2012	FALTA DE VIALES											

L C	LICOR CLARIFICADO	J F	JUGO FILTRADO
L P	LICOR PULIDO	MEL	MELADURA
AZÚCAR	AZÚCAR	M A	MIEL "A"
EP	EQUIPO PARADO	M B	MIEL "B"
SM	SIN MUESTRA	M F	MIEL FINAL
J DESM.	JUGO DESMENUZADO	L F	LICOR FUNDIDO
J MEZ	JUGO MEZCLADO		
J C	JUGO CLARO		

4.8. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Los únicos análisis de cuantificación de dextranas llevados a cabo en el Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333, fueron realizados con el método de “Anticuerpos Monoclonales”.

Este método es de utilidad para analizar dextranas con alta masa molecular. Además, el tiempo en que se lleva a cabo el análisis es mínimo comparado con el método por espectrofotometría UV Vis.

El método por espectrofotometría UV Vis que utiliza el Método Haze, sólo se emplea para dextranas de alta masa molecular, ya que no analiza dextranas con baja masa molecular.

Estudios no publicados de B. L. Legendre, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en Houma, Luisiana, (comunicación personal, 1999), referentes a tallo entero de caña, también mostraron tener mayor producción de dextrana de la caña que había sido picada con ruedas de vehículo que la caña sin cortar (Tablas 4.7 y 4.8).

Tabla 4.7. Niveles de dextrana (promedio, ppm / °Brix) en tallitos de caña a las 48 horas después de su zafra (caña triturada)

CAÑA	TALLO DE PEQUEÑO A MEDIANO, mm	TALLO LARGO (>250mm), mm
VERDE	770	630
QUEMADA	2952	1442

Tabla 4.8. Niveles de dextrana (promedio, ppm/°Brix) en tallitos largos y cortos después de un retraso de 12 a 24 horas

HORAS CORTE A TRITURACIÓN	12 horas	24 horas
TALLITOS SANOS Y LARGOS (>250 mm)	0	740
TALLITOS CORTOS O MUTILADOS (<250 mm)	170	1740

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Estos hallazgos se encuentran relacionados con la cantidad de tejido del tallo expuesto al aire y a la tierra para la entrada de *Leuconostoc*. Éste es el mismo factor que se tiene para caña dañada en tiempo de helada. Otros resultados (Foster y col., 1977) enfatizan la relación existente entre el tejido del tallo expuesto y la producción de dextrana (como se muestra en la Tabla 4.8, donde la influencia del retraso en cortar ó triturar se ve incrementada. El trabajo realizado por Foster y col. (1977) mostró claramente que, manteniendo iguales las demás condiciones, en los tallitos cortos se desarrollaron más dextranas en 24 horas que en los tallitos largos.

Existe una corriente actual en la cosecha mecanizada para la implementación de tallitos cortos (9 o 25cm), ya que este tamaño permite llevar un máximo de tallitos en una carreta de caña. Por tanto, los agricultores y administradores del cañaveral y del ingenio, respectivamente, deberán decidir dónde se encuentra la mayor pérdida de los ingresos: (1) en el jugo, que es el % de azúcar en la caña o (2) si hay un deterioro adicional de la caña por tallos cortos que permiten mayor inclusión de los microorganismos. Evidentemente, en una u otra se implican mayores costos de transportación.

Los mismos factores son importantes en el lugar de almacenamiento, temperatura, condición de la caña y tamaño de la pila de caña. Es bien sabido que la limpieza e higiene del lugar, tanto como sea posible, son importantes y que la primera caña en entrar deberá ser la primera en salir.

Muy frecuentemente una pila de caña no es procesada hasta la siguiente tarde por causa de otras entregas o descomposturas de los molinos. Las dificultades en la coordinación de entregas de la caña son un problema que se presenta a nivel mundial. Existe la elección de almacenar en pequeñas pilas en el cañaveral (con el mínimo contacto con la tierra) o almacenar grandes pilas en el cañaveral. Las pilas pequeñas son la elección más segura manteniendo los otros factores iguales. No obstante, el tipo y tiempo de muestreo y prueba de la caña para sistemas de pago de caña afectarán esta decisión. El tiempo de almacenamiento transcurrido, cuando se vuelve necesario, también debería ser considerado en vista de la temperatura ambiental (particularmente las temperaturas nocturnas cuando la caña se guarda durante la noche como regularmente se hace). Si existe la posibilidad de almacenamiento en camiones, sería preferible (por la aeración) a guardar la caña en grandes pilas.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y POSIBILIDADES PARA EL FUTURO

5.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo de esta investigación, que era el de montar la metodología para la cuantificación de las dextranas en caña de azúcar cronológicamente rezagada, para que sirva de base en la ponderación de la estimación de pérdidas en los cálculos azucareros durante el proceso de obtención de azúcar en un ingenio cooperante a continuación se dan las siguientes conclusiones:

El método de anticuerpos monoclonales resultó ser una herramienta apropiada y práctica para emplearse en el ingenio de crudo y en la refinería, independientemente del analista o del laboratorio donde se realicen.

El nuevo método de ensayo a través de anticuerpos monoclonales resultó ser más sensible, además de permitir evaluar el análisis en varias partes del sistema.

El tiempo de análisis es de 3 a 4 minutos, lo cual lo hace un método atractivo.

Gracias a la portabilidad del equipo es posible realizar los ensayos “in situ” en los lugares donde existe un problema, obteniendo resultados inmediatos.

Dado que no se tiene acceso al precio directo, pero por comentarios personales de la Superintendencia de Investigación y Desarrollo del Fideicomiso, el costo del anticuerpo es elevado (sin especificar dato), lo anterior genera que el importe por análisis sea aproximadamente de \$1500.00 pesos por corrida, lo que da como resultado un promedio de \$250,000.00 pesos/Zafra. Haciendo un análisis y comparándolo con las pérdidas por infección e inversión microbiológica, que si no se detectan y controlan, se elevan en un lapso de dos a tres días y pueden generar pérdidas en promedio de hasta \$5,000,000.00 de pesos en 8 días, lo que determina que la inversión del método a través de anticuerpos monoclonales, sea redituable.

Respecto del objetivo específico de proponer medidas prácticas al ingenio cooperante para reducir la formación de dextranas, es importante mencionar que en los ingenios azucareros donde se manejan grandes volúmenes de caña, como es el caso del ingenio cooperante, una planeación eficaz “en fábrica”, coordinada con “campo”, acortaría los tiempos entre corte y molienda, minimizando el tiempo de exposición de la caña troceada y/o con corte manual, tanto al sol como a la humedad, evitando con ello la formación de dextranas y, por ende, las pérdidas de sacarosa en caña.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

5.2. Posibilidades para el futuro

Sobre el control de dextranas a futuro se incluye la posibilidad de cultivar caña resistente al *Leuconostoc* empleando un bactericida efectivo, económico y en las concentraciones adecuadas para el cañaveral que, además, no deje residuos tóxicos en los productos de la caña (azúcar, mieles incristalizables) (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010).

Otra medida sería la aplicación de la enzima dextranasa, cuando se detecten infecciones por altos niveles de dextranas.

Los mayores esfuerzos para controlar la producción de dextranas permanecen en la inhibición de la formación de dextrana minimizando los tiempos de quemadura al corte y de corte a molienda, manteniendo óptima la calidad de la caña e integridad del tallo.

El control más importante deberá tenerse en los sistemas para coordinar la cosecha. El transporte y la entrega para obtener un máximo de producción de azúcar de buena calidad y mayores ingresos tanto para agricultores así como para los grupos y compañías que controlan los ingenios azucareros, deberá ser el objetivo que guíen estos estudios.

A N E X O S

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

ANEXO I

METODOLOGÍAS EMPLEADAS

I-A. PRUEBAS PARA DEXTRANAS

Se sabe que el contenido de dextranas en el azúcar bruto se encuentran directamente relacionadas con el contenido de dextranas del jugo de caña. Aún cuando las dextranas pueden ya venir en la caña, también puede formarse en el ingenio. La mayor parte de éstas entra al ingenio por medio del jugo de caña. Las dextranas son polisacáridos de cadena lineal formada por unidades de alfa D glucosa, unida por enlaces alfa 1,6. No son verdaderos productos naturales; se descubrieron en la fabricación del azúcar al observar “masas” que obturaban los filtros, conocidas coloquialmente como tibicos. Se forman por biodegradación de la sacarosa en presencia de bacterias, que tienen un contenido de enzima específico: *Leuconostoc mesenteroides* y organismos similares. Estos organismos rompen el enlace entre la glucosa y la fructosa de la sacarosa, uniéndose las unidades de glucosa, polimerizándolas y produciendo las dextranas. Las dextranas que se obtienen por biodegradación de la sacarosa son de masa molecular mayor de 75000, 40000 y 100000 Daltons.

La dextrana exhibe un poder rotatorio mucho mayor que la sacarosa.

La dextrana en el jugo de caña puede venir de la caña tal como es entregada en el patio del molino o desarrollarse en la caña mientras está almacenada. Para mantener los niveles de dextranas bajos, se ha hecho un esfuerzo considerable para asegurar que la caña se entregue en el molino lo más fresca posible y que su tiempo de almacenamiento sea mínimo.

La habilidad para detectar la caña aceptable de la no aceptable es el próximo paso en la eliminación progresiva de la dextrana del azúcar y, para ello, se necesita una prueba selectiva que sea rápida.

Las pruebas existentes (La Amstar, Haze test o la prueba de Roberts en los acuerdos de compra de azúcar bruto), están diseñadas para medidas exactas de dextranas.

Estas pruebas (*CSR Haze test*, la prueba del Instituto Azucarero Authon y otras pruebas relacionadas con enzimas) requieren de varias horas para llevarse a cabo. Se tiene el inconveniente de que consumen demasiado tiempo para usarse en la rutina diaria en todas las muestras de caña para un análisis de jugos en el laboratorio.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

I.A.1. Método de determinación de dextranas por medio de anticuerpos monoclonales

El nuevo método de determinación de dextranas por medio de anticuerpos monoclonales es muy versátil; fue desarrollado por *Midland Research Laboratories, Inc.* y presentado durante el XIV Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centro América (26 al 30 de agosto de 2002) en la Ciudad de Guatemala, Guatemala, C.A (Porro y Rauh, 2002).

Bases para los métodos inmunológicos

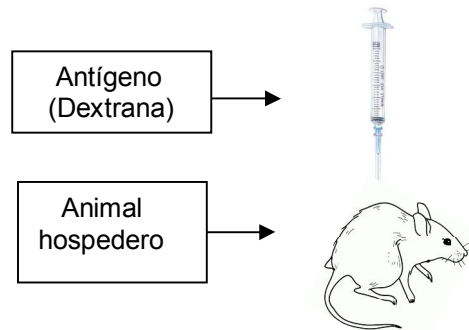
Los anticuerpos son glicoproteínas específicas complementarias a moléculas extrañas específicas (antígenos) producidos por el flujo sanguíneo de los animales. Los anticuerpos se enlazan específicamente con el antígeno el cual provocó su producción. Sin embargo, sólo áreas específicas localizadas en la superficie molecular del antígeno llamadas epítotes reaccionan como gatillo para la producción de anticuerpos. Puede haber muchos epítotes para un antígeno dado. Un anticuerpo específico para un solo epítote es producido por un clon de las células del plasma. Un anticuerpo específico para un epítote es llamado anticuerpo monoclonal. Debido a que cada antígeno puede tener muchos epítotes, el suero entero derivado por un estímulo de un antígeno es llamado antisuero, (Day y Plha, 1998).

La fácil producción tanto como la heterogeneidad de estructuras de suero policlonal permiten que sea utilizado en ciertas aplicaciones de diagnóstico. Sin embargo el anticuerpo monoclonal debido a su especificidad y a su origen único, tiene más aplicaciones específicas. Esto es virtualmente imposible de lograr con una célula plasmática normal porque morirá después de pocas divisiones celulares. Los anticuerpos monoclonales son producidos naturalmente en enfermedades como es el mieloma múltiple, donde una simple célula plasmática se convierte en maligna y se multiplica incontrolablemente.

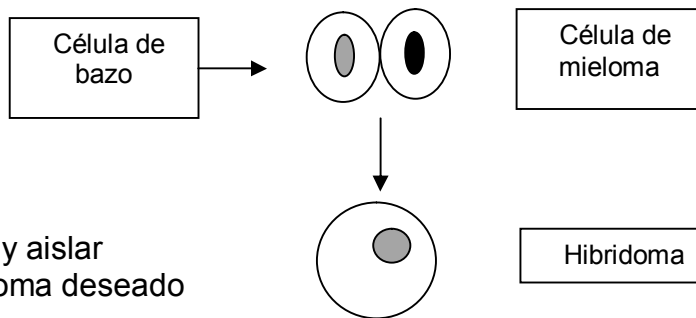
En la actualidad es posible fusionar una célula de mieloma con una célula plasmática para producir una célula híbrida llamada hibridoma, la cual tiene la capacidad de producir un anticuerpo monoclonal así como la capacidad de dividirse indefinidamente. Esto permite hacer una producción a gran escala de un anticuerpo específico. La siguiente ilustración muestra los pasos necesarios para la producción de un anticuerpo monoclonal para la detección de dextranas. Este proceso se muestra en la Figura A-I. (Day y Plha, 1998).

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

1. Producir respuesta inmune

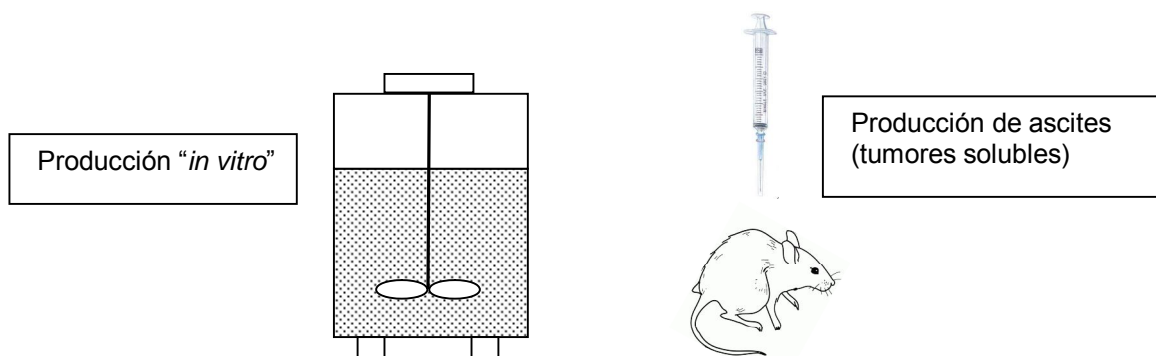


2. Aislar célula del bazo Fusión celular con célula de mieloma



3. Seleccionar y aislar el hibridoma deseado

4. Producción del anticuerpo monoclonal (escalado)



CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

El hibridoma puede ser cultivado por una de dos técnicas generales. La más simple es por la formación de un tumor soluble o ascite en el peritoneo de un ratón. El tumor es inyectado por el hibridoma para formar un tumor de mieloma el cual produce altas concentraciones del anticuerpo monoclonal en el ratón. Éste, sin embargo, está limitado por la cantidad de material que puede ser producido por un animal tan pequeño. El segundo método es el cultivo de células “*in vitro*” en biorreactores. El cultivo celular es un fluido conteniendo anticuerpos monoclonales. El método “*in vitro*” es más confiable para la producción de anticuerpos monoclonales en la industria azucarera (Day y Plha, 1998).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

A 10 mL de jugo de caña se le agregan 2 mL de 10% de ácido tricloroacético y medio gramo de filtro de ayuda analítica. Filtrar, descargar los primeros 2mL del filtrado. A los siguientes 5mL de filtrado se agregan 5mL de etanol absoluto. Permitir que la mezcla se asiente durante 2 min para formar la neblina (“haze” en inglés). Leer la neblina en el colorímetro a 720nm o comparar la turbiedad de la neblina con estándares visuales.

Si es posible el almacenamiento de aguas dulces deberán mantenerse a altas temperaturas (90 °C) y nivel de pH=7. El problema de almacenamiento de aguas azucaradas se ve agravado por la prohibición de bactericidas en la refinería, el calor se perfila como una respuesta pero aumenta la pérdida de sacarosa.

I.A.2. Cuantificación de dextranas

1. Objetivo

Determinar la presencia de dextranas usando cuerpos monoclonales.

2. ALCANCE

Aplica al laboratorio de control de calidad del Ingenio San Cristóbal.

3. DEFINICIONES (TERMINOLOGÍA)

Dextrana.- Es un polisacárido polímero de la D. glucosa ($C_2H_{10}O_5$), formado por reacciones bioquímicas a partir de la sacarosa, con intervención principalmente del organismo *Leuconostoc mesenteroides*.

Anticuerpos monoclonales.- Son sustancias producidas en los laboratorios, que reconocen y se unen a células blanco específicas (tal como una proteína).

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

4. DESARROLLO

4.1. Fundamentos del procedimiento

Este método se basa en que el anticuerpo monoclonal ataca a la dextrana y produce una turbidez que es directamente proporcional a la cantidad de dextrana presente. Un nefelómetro (turbidímetro especialmente diseñado) es usado para medir la turbidez que se forma.

4.2. Equipos, materiales y reactivos (Anexo II)

Equipos

1. Balanza electrónica con sensibilidad ± 0.1 g
2. Agitador magnético
3. Balanza analítica
4. Nefelómetro
5. Equipo *MCA Sucrotest*

Materiales

1. Vasos de precipitados
2. Piseta
3. "Kit" marca "sucro test"
4. Frasco tipo ampolleta

Reactivos

1. Solución amortiguadora (*buffer*) a partir del reactivo en polvo (M9008)
2. Estándar de 500 ppm de dextrana a partir del reactivo (M9008)
3. Preparación del anticuerpo
4. Agua destilada
5. Solución amortiguadora (*buffer*) a partir de reactivos
6. Solución de 50 NTU
7. Sosa 0.1 N

NOTA: Los materiales a utilizar deberán estar perfectamente limpios y secos.

4.3. Descripción de operaciones

Preparación de reactivos

1. Preparación de la solución *buffer* a partir del reactivo en polvo (M9008)
El contenido de 1.28 gramos se disuelve en 100mL de agua
2. Preparación de la solución *buffer* cuando no se cuenta con el reactivo (M9008)

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

- a) Pesar 2.62 gramos de fosfato de sodio monohidratado (monobásico) y 11.5 gramos de fosfato de sodio dibásico anhidro, disolver en 200 mL de agua destilada y aforar a un litro
 - b) De esta mezcla se toman 100mL, verter en un vaso de precipitados de 1000mL, adicionar 8.75 gramos de cloruro de sodio y 600mL de agua destilada
 - c) Ajustar el pH a 7.5 con sosa y aforar con agua destilada a un litro
3. Hidratar el anticuerpo con 12mL de solución amortiguadora (*buffer*, en inglés), dividir en 4 partes para mejor lavado. Esto se hace en un frasco ámbar. Dejar reposar 30 minutos, a intervalos de 6 minutos, agitar 12 segundos Reactivo Dextran T 2000. Pesar 0.25 gramos, aforar a 250mL con agua destilada
4. Reactivo para factor de corrección
- a) Del reactivo Dextran T 2000 tomar 1mL y transferirlo a un vaso de precipitado de 100mL, adicionar 1mL de agua destilada y disolver
 - b) Con ayuda de una jeringa recoger del vaso 2mL
 - c) Colocar a la jeringa el filtro de 0.45µm y depositar en un frasco

Procedimiento

1. Tomar el Brix a la muestra a analizar y diluir a 5°Bx±1, filtrar con membranas de 0.45µm
2. Poner el equipo *MCA-Sucrotest* en el modo "Standard" y calibrar con la solución de 50 NTU
3. Para obtener el factor de corrección, poner en una celda 1mL de anticuerpo, introducir en el *MCA-Sucrotest* y tomar la lectura (N₀)
4. Sacar del equipo y agregar 10µL del reactivo Dextran T 2000 diluido (que ya se tiene filtrado).
5. Tapar la celda con papel tipo "parafilm" y agitar suavemente 10 veces para homogeneizar
6. Desde el momento en que se le adiciona la muestra al anticuerpo, se toma el tiempo con cronómetro (3 minutos)
7. Introducir al equipo se esperando 3 minutos y tomando la lectura N₁

Para cada muestra proceder como en los pasos 3 y 4

4.4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Cálculos:

$$\text{ppm de dextranas} = N_1 - N_0 = \text{Diferencial NTU} \times \text{FC} = \frac{\text{ppm} \times 100}{\text{°Bx diluido}} \times \frac{\text{°Bx (original)}}{\text{°Bx diluido}} \quad (\text{A-1})$$

donde:

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

N_0 - Lectura inicial
 N_1 - Lectura final
FC - Factor de corrección

Ejemplo:
Para el factor de corrección:

N_0 - 7.32
 N_1 - 96.2

$$FC = \frac{500}{96.2 - 7.32} = \frac{500}{88.88} = 5.63 \text{ UMA}$$

Para la muestra:

N_0 - 7.16
 N_1 - 8.11
°Bx original - 14.35
°Bx diluído - 4.96

$$(8.11 - 7.16) \times 5.63 = \frac{5.349 \times 100}{4.96} = 107.833 \times 14.35 = \frac{1547.361}{4.96} = 312 \text{ ppm}$$

5. MEDIDAS OBLIGATORIAS DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL LUGAR DE TRABAJO

1. El químico debe usar bata y el equipo de protección necesario. (Guantes, lentes de seguridad y cubreboca)
2. La mesa, material y equipo deben permanecer limpios antes y después del análisis de dextranas.
3. Los residuos químicos de las determinaciones analíticas, se deberán colocar en recipientes ex profeso para cada uno de los residuos, para posteriormente ser retirados por una compañía autorizada ante la SEMARNAT.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

ANEXO I-B. Bibliografía relacionada con las metodologías

de Belder, A.N. 2013. Dextran. Pub. Amersham Biosciences. Handbook 18-1166-12. P. 43. Piscataway, NJ. EEUU. Redes internacionales. Dirección electrónica: <http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%20move/18116612AA.pdf>

Porro M. E., Rauh J. S. 2002. Nuevo método de determinación de dextrana por medio de anticuerpos monoclonales y su versatilidad. Memorias del XIV Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centroamérica. Midland Research Laboratories, Inc. Guatemala. Guatemala, C.A. Agosto 26-30, 2002.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

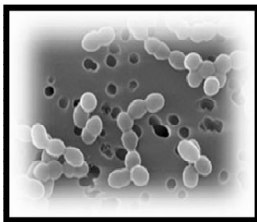
ANEXO II

ACERVO FOTOGRÁFICO

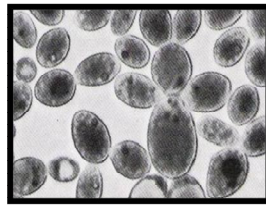
Características de los microorganismos (Acervo fotográfico)

Los microorganismos proliferan o “crecen” rápidamente en la superficie de la caña quemada, incluso tan pronto a los 10 minutos después de la quema. Estas son predominantemente las *Xanthomonas*, *Coryne bacteria* y *Bacillus*. Otros organismos se encuentran en la caña en pie incluso después de la quema, como hongos *Rhizopus* y *Aspergillus* y levaduras de colores, *Rhodotorula* y *Candida*. En caña picada infecciones masivas se encuentran hasta 6 pulgadas de los extremos cortados después de almacenar durante 2 h. Los organismos *Leuconostoc*, *Xanthomonas* y *Aerobacter* que producen mucosas son frecuentes, la producción de ácidos y dextranas como materiales. Incluso en condiciones de cosecha y almacenamiento de caña favorables el deterioro significativo se produce en periodos de tiempo cortos después de cortar, incluso con 24 horas.

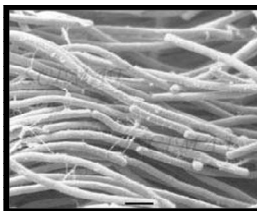
Todos estos microorganismos predominantes llegan a los molinos en el jugo extraído y junto con las altas temperaturas favorecen la multiplicación de estos, causando contaminación microbiana en las diferentes etapas del proceso y la destrucción de la sacarosa.



Leuconostoc



Pichia



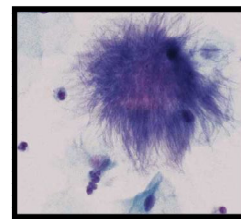
Cereus



Pseudomonas

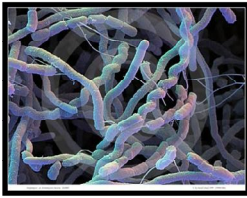


Penicillium



Actinomyces

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA



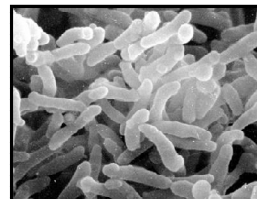
Streptomyces



Xanthomonas



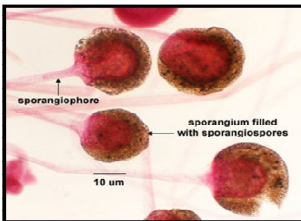
Bacterium



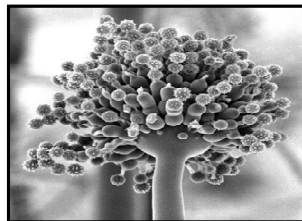
Corynebacterium



Bacillus



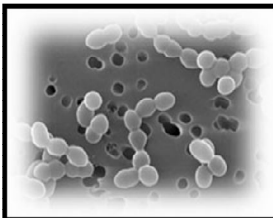
Rhizopus



Aspergillus



Rhodotorula



Leuconostoc



Xanthomonas



Aerobacter



Material y equipo de laboratorio para la determinación de dextranas por el método de anticuerpos monoclonales en el laboratorio químico de la Superintendencia de Investigación y Desarrollo en el Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

ANEXO III

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

La disposición de los residuos químicos de la investigación, en el Fideicomiso Ingenio San Cristóbal 80333, se llevó a cabo mediante el depósito en recipientes *ex profeso* para cada uno de los residuos y posteriormente, fueron retirados mediante una compañía autorizada ante la SEMARNAT de acuerdo con la legislación vigente (DOF, 2005). En ella no aparecen los ingenios azucareros como tales, pero las sustancias y residuos clasificados como peligrosos (CRETIB) sí están en esa norma y se disponen apropiadamente.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 2012. Estructura de la dextrana. Redes internacionales. Dirección electrónica: <http://www.enterpriseeuropenetwork.at/marktplatz/index.php?file=bbs-show.php&bbsref=09%20FR%2036M1%203DCK>

AOAC. 1990. Official Method 988.12. Dextran in Raw Cane Sugar. Roberts Copper Method. En Official Methods of Analysis. W. Horwitz, Ed. Pub. AOAC International. Gaithersburg, Maryland, EEUU.

Amstar. 1984. Corporation - American Sugar Division - 1251 Avenue of the Americas, 10020 (212) 489.9000 - Form 2021 - July 1, Nueva York. NY, EEUU.

Arvizu-Bernal, D.I., Ramos-Medina, J.C. 2010. Degradación del ditiocarbamato de sodio usado como plaguicida en el proceso de elaboración de azúcar en México mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Directora de tesis: Dra. Marisela Bernal González. Asesora Técnica: Dra.-Ing. María del Carmen Durán Domínguez. Títulos de Químicos de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

Boardman, N.K. 1980. Energy from the biological conversion of solar energy. Phil. Trans. R. Soc. London A. 295:477-489.

Clarke, M.A. 1997. Dextran in Sugar Factories. Causes and control (Part I and II). Sugar y Azúcar. Oct/Nov. 28-40.

Coll, E. E., Clarke, M. A., Roberts, E.J. 1979. Dextran problems in sugar production. Actas Ces. Tec. Res. Refin. Azúcar de Caña 1978, pp. 92-106.

Covacevich, M.T., Richards, G.N., Stokie, G. 1977. Studies on the effect of dextran structure on cane sugar crystal elongation and methods of analysis. In ISSCT Proceedings of the XVI Congress, pp. 2493-2508. Sao Paulo, Brazil.

Crespo, H. 1988. Historia del azúcar en México. FCE-Azúcar, S.A. de C.V. Dos Volúmenes. México D.F. México

Cuddihy, J.A., Rauh, J.S., Porro, M.E. 1998. Improving sugar recovery with sugar process chemicals. Midland Research Laboratories, Inc. [Publicación periódica en línea] Available from URL: <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/sugrcvry.pdf>.

Day, D.F., Piha, L. 1998. En 28th Annual Meeting American Society of Sugar Cane Technologists. EEUU.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

De Belder, A.N. 2013. Dextran. Pub. Amersham Biosciences. Handbook 18-1166-12. P. 43. Piscataway, NJ. EEUU. Redes internacionales. Dirección electrónica: <http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%20move/18116612AA.pdf>

Delfín, J.M. 2012. Información personal. Superintendencia de Investigación y Desarrollo. Fideicomiso San Cristóbal 80333. Veracruz, México.

DOF. 2009. Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Jueves 24 de septiembre de 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.

DOF. 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Edge, L.A., Clarke, M.A., Kitcher, J.L. 1996. Effect of treatment of syrups with a new dextranase (*Chaetomium gracile*). Pres. Amer. Soc. Sugar Cane Technol. St. Petersburg. Florida. EEUU.

Edge, L.A., Cole, A.F., Clarke, M.A., Kitcher, J.L. 1997. Trials of dextranase (*Chaetomium gracile*) treatment of sugarcane syrups. Proc. Sugar Ind. Technol. Pp. 359 - 362. St. Petersburg. Florida. EEUU.

Foster, D.H., Irvin, P.C., King, J.H. 1977. Measurements of the deterioration of green and burnt mechanically harvested cane. In Proceedings of the Conference of the Queensland Society of Sugar Cane Technologists. 44th Conf. Pp. 37-41. Queensland, Australia.

Foster, D.H., Irvin, P.C. 1981. Losses of sugar and water from cane in fires. Proc. Australian Soc. Sugar Cane Technol. Bundberg (Australia).

Galba, C. F., Inkerman, P. 1993. Dextran analysis of raw sugar, Part I. A specific method for total dextran. International Sugar Journal. 95(1136):309-313.

García-Espinosa, A. 1999. Glosario de términos de campo y fábrica de la industria azucarera. Compañía Editora del Manual Azucarero. México D.F. México.

Hsia, F.Y. 1972. Effect of burning and storage on cane deterioration. Rept. Taiwan Sugarcane Expt. Station. 56:23-36.

Inkerman, P.A., James, G.P. 1976. Dextranase. II. Practical application of the enzyme to sugar mills. In Procs. Queens Soc. Sugar Cane Technol. 43:307-315. Queensland, Australia.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Inkerman, P.A., Riddell, L. 1977. Dextranase III. Refinements to the enzymatic process for the treatment of deteriorated cane. In Procs. Queens Soc. Sugar Cane Technol., 43:215-223. Queensland, Australia.

Inkerman, P.A., Riddell, J.W., Riddell, L.J. 1983. The application of juice pH to the automatic control of dextran addition. In Proc. Queensl. Soc. Sugar Cane Tech. 17:205-208. Queensland, Australia.

Jeanes, A. 1978. Dextran bibliography. Extensive coverage of research literature (exclusive or clinical) and patents (1861-1976). Miscellaneous Publication No. 1355. Science and Education Administration. United States Department of Agriculture. Washington, D.C. EEUU. Redes internacionales. Dirección electrónica: http://books.google.com.mx/books?id=bpI5qvBEFW0C&pg=PA98&lpg=PA98&dq=Nicholson+and+Horsley+dextran+method&source=bl&ots=JZVToa9m1s&sig=VRzXfIRCLEeJyzIPO6RIMejEAQQ&hl=es&sa=X&ei=LhXCUCtXE66GyQHRmlHIBQ&redir_esc=y#v=onepage&q=Nicholson%20and%20Horsley%20dextran%20method&f=false

Koenig, D., Day, D. 1989. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur. J. Biochem. 183:161-167.

Legendre, B.L. 1999. Comunicación personal.

Manual Azucarero Mexicano. 2012. 55a Ed. Río Niágara No. 11, Col. Cauhémoc. Pp. 342-350. 06500 México D.F. México.

Nicholson, R.I., M. Horsley, 1959. Impurities in sugar processing: Determination of dextran and stark in cane juices and sugar products. J. Agric. Food Chem. 7(9):640-643.

Murrieta, P. 2013. La exploración arqueológica de las haciendas azucareras: El caso de la Hacienda de Tecoyutla, Guerrero. Redes internacionales (Internet). Dirección electrónica: <http://www.ilustrados.com/documentos/exparquehaciendasazucareras2.pdf>. Coordinación Nacional de Arqueología. Instituto Nacional de Antropología e Historia, INAH. 23 páginas. México D.F. México.

Porro, M. E., Rauh, J. S. 2002. Nuevo método de determinación de dextrana por medio de anticuerpos monoclonales y su versatilidad. En Memorias del XIV Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centroamérica. Midland Research Laboratories, Inc. Guatemala. Guatemala, C.A. Agosto 26-30, 2002.

Rodríguez-Jiménez, E. 2005. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. Biotecnología aplicada (División Química-Física, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB (La Habana, Cuba). 22:11-19.

CUANTIFICACIÓN DE DEXTRANAS (FALSA SACAROSA) EN CAÑA DE AZÚCAR CRONOLÓGICAMENTE REZAGADA

Saska, M., Godshall, M. A., Day, D. F. 2002. Dextran analysis with polarimetric, immunological, Roberts and Haze methods. In SPRI Annual Conference. March 10-13. New Orleans, LA, EEUU.

Severiano-Pérez, P. 1997. Dextranas: Extracción e identificación a partir de mieles incristalizables. Tesis profesional. Química de Alimentos. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

Singleton, V., Horn, J., Bucke, C., Adlard, M. 2002. A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. J. Am. Soc. Sugarcane Technol. 22:112-119.

Solomon, S. 2000. Post-harvest cane deterioration and its milling consequences. Sugar Tech. 2(1&2):1-18. Indian Institute of Sugarcane Research, India.

Solomon, S., Ramaduari, R., Shanmugathan, S., Shrivastava, A.K., Deb, S., Singh, I. 2003. Management of biological losses in milling tandem to improve sugar recovery. Sugar Tech. 5(3):137-142.