

ZUKER

CONTROL DE LA “CALIDAD REAL DE LA CAÑA Y SUS JUGOS”

METODOS PARA LA DETERMINACION DE POLISACARIDOS Y AIS

Dr. Eduardo L. Ramos

Ing. Susana Ravelo

INTRODUCCIÓN

Producto de las investigaciones que se han desarrollado en el Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras, ICINAZ, dirigidas a determinar los componentes del jugo de caña que están asociados a las pérdidas de eficiencia industrial y a la disminución de la calidad del azúcar que tradicionalmente se observan durante la fabricación de azúcar, fue posible determinar que en gran medida las impurezas vinculadas a estos problemas industriales tienen su origen en los propios procesos fisiológicos de la caña.

Los estudios realizados permitieron esclarecer que los azúcares que interferían en el normal desarrollo de la cristalización de la sacarosa resultaban ser la Lactosacarosa y la D-Xilosa, sustancias que provocan un cambio agudo en la morfología del cristal de sacarosa, propiciando estas la formación de los conocidos “cristales aguja”.

A las anteriores sustancias se agrega las dextranas, formada durante el deterioro de la caña y sus jugos por la acción de los microorganismos. Estas sustancia poliméricas producen una elevación sensible de la viscosidad de las soluciones técnicas de sacarosa, contribuyendo a la disminución del tamaño del cristal de sacarosa, a una sensible pérdida de la capacidad industrial y a la elevación de la pureza de las mieles finales.

El efecto en conjunto de las sustancias mencionadas provoca la aparición de cristales de sacarosa pequeños y alargados que escapan a las mieles finales a través de las telas de las centrifugas, incrementando más aun las pérdidas de sacarosa.

Si bien las dextranas se forman principalmente luego del corte de la caña, la D-Xilosa y la Lactosacarosa se forman junto con otros oligosacáridos, que poseen determinada capacidad de alterar la forma de los cristales de sacarosa (Azúcares que Impurifican la sacarosa, AIS), en función de: las propias características de las variedades de caña, la época del año, la edad de la caña y la acción de agentes externos. Es por ello que la selección de las variedades y de la caña que pueda ser utilizada como materia prima industrialmente para la fabricación de azúcar debe pasar por un control riguroso de su contenido de AIS y de dextranas.

En este folleto aparecen las dos primeras técnicas analíticas que debe manejar el laboratorio de control de una fábrica de azúcar para controlar la calidad de las cañas que procese el ingenio, de manera de poder seleccionar las mejores variedades o rechazar aquella materia prima que evidentemente traerá problemas a la fábrica.

Ambos métodos analíticos se basan en la separación cromatográfica de las sustancias que se deben determinar en los jugos de caña y en el uso de la colorimetría. Las dextranas se separan por filtración por gel usando un gel poroso de celulosa llamado CELEF3, desarrollado producto de la colaboración del ICINAZ y CUBA9, que permite de una manera rápida y sencilla aislar las dextranas presentes en los jugos y otros materiales de la fábrica. Los azúcares de menor peso molecular, (AIS), se aíslan usando otro material cromatográfico desarrollado en el ICINAZ, que permite en pequeñas columnas aislar los AIS de manera confiable y cuantitativa. Las propiedades de estos materiales cromatográficos se describen en:

<http://ramguira.topcities.com>

Ambas técnicas deben ser dominadas por el personal encargado de realizarlas de manera de garantizar la obtención de resultados confiables, por lo que es recomendable que los técnicos reciban entrenamiento en las mismas antes de incluirlas como métodos de control en Laboratorio de la Fábrica.

ZUKER

**CONTROL DE LA “CALIDAD REAL DE LA
CAÑA Y SUS JUGOS”**

METODOS PARA LA DETERMINACION DE POLISACARIDOS Y AIS

DETERMINACIÓN DE POLISACARIDOS

Materiales, Cristalería y Misceláneas necesarias:

- 200 cm³ de CELEF3
- Soporte universal.
- 2 Pinzas de sujeción,
- 2 columnas cromatográficas de vidrio de 2.5 x 25 cm.
- 2 tapones de goma No 5.
- 2 m de manguera plástica transparente de 0.4 mm de diámetro interno.
- 4 llaves de Aleen.
- 2 matraces aforados de 25 cm³.
- Papel de filtro rápido de 15 cm de diámetro.

Fundamento del método: Este se basa en la separación por medio de la filtración por gel de todos los polisacáridos presentes en los jugos que poseen un peso molecular mayor de 10 000 ua. Las fracciones eludías que contienen los polisacáridos se colectan en un frasco volumétrico y el contenido de azúcares se mide colorimétricamente usando el método de ANTRONA-SULFURICO.

Detalles experimentales: Emplee una columna de 2,5 cm de diámetro y 25 cm de altura rellena con unos 100 cm³ de gel Sephadex G-50 o CELEF3 previamente hinchado en el mismo eluente. Use como eluente una solución 0,2 M de NaCl y regule el flujo de trabajo en la columna a 1 cm³/ minuto, colocando el recipiente con el eluente a 1 metro sobre el nivel de la salida de la columna y regulando la llave de salida de la columna.

Calibración de la columna:

Determine el volumen de exclusión de los polisacáridos y la efectividad de la separación de la mezcla de carbohidratos, aplicando a la columna 2 cm³ de una solución de sacarosa al 15% que contiene de 1000 ppm de dextranas nativa y detectando colorimétricamente con el método de ANTRONA-SULFURICO la presencia de azúcares en fracciones de 2 cm³ seleccionadas al correr la columna con el eluente. Ejemplo, las dextranas pueden eluir de la columna entre los 35 y 50 cm³ y la sacarosa entre 70 y 90 cm³.

Tenga el cuidado al aplicar la solución de hacerlo con cuidado (no debe agitar la superficie del gel sedimentado en la columna) y por las paredes interiores de la columna, luego de haber drenado previamente el eluente dejando correr el eluente en la columna. Adicione seguidamente, en dos ocasiones al menos, dos alícuotas de 2 cm³ de eluente, drenando cada vez. Finalmente añada suficiente eluente de manera que quede un excedente de 1 cm de altura sobre la superficie del gel. Cierre entonces la columna y establezca un flujo de 1 cm³ /minuto.

Análisis de la muestra:

La muestra debe filtrarse y ajustársele el Bx a 10-15°. Dada la inestabilidad de las soluciones azucaradas, estas deben analizarse inmediatamente. Aplique a la columna 2 cm³ de la solución obtenida al ajustar el Bx. Corra la columna a 1 cm³/minuto y colecte todas las fracciones que previamente se detectaron que podían contener dextranas en un frasco de 25 cm³. Enrase y determine usando el método de ANTRONA-SULFURICO el contenido de dextranas en el matraz.

Para usar de nuevo la columna lávela, al menos, con 150 cm³ del eluente.

CÁLCULOS:

Concentración de dextranas en el matraz colector:

$$D(\text{ppm}) = m \times \text{Abs} + b$$

Donde “m” es la pendiente y “b” el intercepto de la línea recta de calibración obtenida por el método colorimétrico ANTRONA-SULFURICO.

$$\text{Polisacáridos \% Bx} = ((D \times V_v) / (d \times B_x \times V_a)) \times 10^{-2}$$

donde:

V_v = Volumen del frasco usado para recoger las fracciones que contienen a los polisacáridos, cm^3 .

d = Densidad de la muestra aplicada g/cm^3

B_x = Sólidos solubles de la muestra aplicada p/p, %

V_a = Volumen de muestra aplicada a la columna cm^3

DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES QUE IMPURIFICAN LA SACAROSA EN LOS JUGOS DE CAÑA (AIS)

Hoy día conocemos que hay azúcares que impurifican a la sacarosa (AIS) en los jugos de caña frescas o deterioradas, como la Lactosacarosa, la D-Xilosa y la 1-Kestosa que son los principales agentes que provocan las deformaciones del cristal de sacarosa. Ellos no sólo causan pérdidas considerables de la calidad del azúcar sino también un sensible decrecimiento de la eficiencia industrial. Los AIS impiden el crecimiento del cristal por algunas de sus caras y disminuyen la velocidad de cristalización, aumentando así la

posibilidad de producirse pérdidas de cristales pequeños y alargados a través de las telas de las centrífugas, elevándose las purezas de las mieles.

El nivel de concentración de los AIS en los jugos de caña está relacionado con factores como la variedad, edad, grado de troceado y atraso de la caña, así como la época del año. Los oligosacáridos se aíslan generalmente a partir de los productos de la caña de azúcar por fraccionamiento en carbón activado, cromatografía de papel o filtración por gel. A partir de estas técnicas, se han propuesto varios métodos analíticos para determinar oligosacáridos en los productos azucarados, que resultan excesivamente lentas para poder ejercer un control de la presencia de AIS en el ámbito de la fábrica de azúcar.

En este manual les brindamos una técnica simple y rápida para la determinación de los AIS en los laboratorios de los ingenios, la que se basa en el aislamiento de estos azúcares por cromatografía a baja presión en una columna del adsorbente.

El adsorbente HYDROMAG se prepara en nuestros laboratorios con un diámetro de partículas entre 10 y 100 μm . En el método analítico desarrollado se usan partículas de 50-60 micrones de tamaño. En las separaciones se usan columnas de vidrio de 1x10 cm las que se llenan hasta los 6 cm de altura empleando una dispersión del material en alcohol al 85 %. Seguidamente se ajusta un flujo de 5 cm^3 por minuto del alcohol al 85 % con la ayuda de una bomba peristáltica. El material no se compacta dentro de la columna permitiendo su empleo por al menos 100 determinaciones sin tener que renovarla o eliminar finos.

Materiales, Cristalería y Misceláneas necesarias:

- 15 cm^3 del sorbente HYDROMAG (aproximadamente para llenar dos columnas)
- Alcohol absoluto (> 99 % de alcohol etílico), químicamente puro.
- Alcohol etílico al 95.5 %, químicamente puro.
- 2 columnas cromatográficas de vidrio de 1 x 10 cm con frita No 1.
- Papel de filtro rápido.
- 2 tapones de goma No 4.
- 1 m de manguera plástica transparente resistente al alcohol con un diámetro interno de 0.4 mm.

- 25 cm de un tubo de vidrio de 0.4 mm de diámetro externo y 0.3 interno.
- 2 matraces aforados de 25 cm³.

EQUIPOS

- BOMBA PERISTÁLTICA, con características técnicas que permitan regular el flujo en la columna a 5 cm³/minuto de manera estable.

Determinación del contenido de AIS totales:

Filtre a través de papel de filtro rápido una solución diluida de alrededor de 15° Bx (unos 25 cm³) de cualquiera de los productos industriales. Ajuste el Bx de la solución a alrededor de 10° y seguidamente diluya 1.5 cm³ de la solución a 10 cm³ usando alcohol absoluto. Agite para homogenizar y deje reposar por al menos 15 minutos. Centrifugue la suspensión por al menos 15 minutos a 3000 rpm. Aplique 2 cm³ del sobrenadante a la columna(*), y lávela seguidamente a un flujo de 5 cm³/min con 200 cm³ de alcohol al 85 % p/p. Seguidamente, eluya los AIS retenidos en la columna con agua destilada neutralizada y recoja las fracciones en un frasco graduado de 25 cm³. Antes de realizar una nueva separación lave la columna con unos 30 cm³ de alcohol al 85 %. El contenido de AIS en la muestra se estima determinando colorimétricamente el contenido de azúcares (base sacarosa) en el frasco colector.

() Tenga el cuidado de drenar el alcohol de la superficie de la columna antes de aplicar la muestra, con cuidado y por las paredes. Seguidamente lave las paredes y superficie del adsorbente en dos ocasiones consecutivas con 2 cm³ del eluyente, añada otros 2 cm³, de forma de cubrir la superficie, cierre la columna y establezca el flujo de eluyente.*

CALCULOS:

$$\text{AIS \% Bx} = (\text{F} \times \text{Abs} \times \text{V} / \text{Bx} \times \text{d} \times \text{Vi}) \times 10^{-2}$$

Donde:

F- Factor de calibración de la curva obtenida con el método de ANTRONA-SULFURICO, usando como azúcar de referencia la sacarosa.

Bx- Contenido de sólidos solubles en la solución de la muestra, que es usada en la precipitación alcohólica, aproximadamente 10^0 Bx.

d- densidad de la solución.

V- Volumen del frasco donde se recogen las fracciones que contienen los AIS eluidos de la columna (25 cm^3)

Vi- Volumen de la solución a 10^0 Bx aplicados a la columna, (0.3 cm^3)

El tiempo necesario para la separación y determinación de los AIS totales usando esta metodología no rebasa la hora, pudiéndose determinar con un coeficiente de variación de 3-4 % y un recobrado de un 98-99 % (relativo a Rafinosa) hasta una concentración de un 8 % de AIS % Bx.

MÉTODO ANTRONA-SULFÚRICO

Cristalería y Misceláneas necesarias:

- 20 tubos de vidrio de 2 x 15 cm de paredes gruesas y resistente a los cambios de temperatura.
- Gradilla para los tubos de ensayos descritos.
- Bureta graduada con llave vidrio de 50 cm^3 .
- Embudo pequeño (5 cm^3 de diámetro).
- Pipeta graduada de 1 cm^3 .
- Pipeta graduada de 10 cm^3 .
- Pesa filtro de 5 cm^3
- Espátula metálica fina, para pesar unos pocos mg.
- Erlenmeyer de 250 cm^3
- Matraz aforado de 100 cm^3

Reactivos

- Antrona (pura para análisis).
- Acido Sulfúrico Concentrado (puro para análisis).
- Glucosa.
- Dextrana nativa o T2000 (10^6 unidades atómicas).

PREPARACIÓN DEL REACTIVO: Prepare una solución de antrona de 1 mg por mililitro de ácido sulfúrico concentrado. La solución debe prepararse en la cantidad necesaria para poder realizar los análisis diarios. No es estable.

PROCEDIMIENTO

A un mililitro de la solución de azúcares contenida en tubos de ensayos de paredes resistentes al calor añada 3.5 cm^3 de la solución de antrona-sulfúrico. Tenga cuidado de añadir el reactivo (preferiblemente desde una bureta graduada con llave de vidrio) rápidamente y en forma de chorro sobre la solución acuosa de dextrosa. Agite fuertemente para lograr la mezcla homogénea.

Seguidamente caliente los tubos con las mezclas de reacción en un baño de agua hirviendo por 10 minutos. Enfríe inmediatamente y determine la absorbancia de las soluciones en una cubeta de 1 cm a una longitud de onda de 625 nm.

Con los datos obtenidos construya una curva de calibración y halle la ecuación correspondiente para la línea recta obtenida. Utilice la ecuación o el gráfico para determinar la concentración de dextranas o AIS.

Curva de calibración.

Puede preparar una curva de calibración partiendo de una solución de 0.1 g de glucosa en 100 cm^3 de agua. Diluya 10 cm^3 de esta solución añadiéndola a un matraz de 100 cm^3 y enrasando con agua destilada de manera de tener una solución de dextrosa a 100 ppm de concentración. Prepare soluciones en el rango de concentración de 10 a 100 ppm simplemente mezclado de 1 a 10 cm^3 de la última solución con agua de manera de

mantener el volumen final constante de 10 cm^3 , ejemplo: 4 cm^3 de la solución y 6 cm^3 de agua daría una solución de 40 ppm.

EQUIPOS DEL LABORATORIO DE LA FABRICA QUE SE UTILIZARAN

- **HORNILLA ELÉCTRICA.**
 - **ESPECTROFOTÓMETRO O COLORÍMETRO (filtro de λ_{max} 625 nm).**
 - **REFRACTÓMETRO AZUCARERO**
 - **CENTRÍFUGA CLINICA**
-