

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SEDE DE OCCIDENTE**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN LABORATORISTA  
QUÍMICO**

Estandarización de las condiciones óptimas de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso productivo para control de dextranas y almidón en muestras de meladura de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Shelvy María Molina Alvarado

Diciembre, 2022.

**HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA  
OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN LABORATORISTA QUÍMICO**

*"Estandarización de las condiciones óptimas de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso productivo para control de dextranas y almidón en muestras de meladura de caña de azúcar (Saccharum officinarum)."*

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

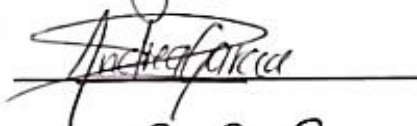
**MBA Fernando Bolaños De Ford.  
Director de Tesis**



**Lic. María José Retana Argüello  
Lectora de Tesis**



**M.Sc. Andrea García Quesada  
Miembro del Tribunal Examinador**



**M.Sc. John Diego Bolaños Alfaro  
Presidente del Tribunal Examinador**



**Lic. Marvin Bogantes Jiménez.  
Lector de Tesis**



  
**Shelvy María Molina Alvarado  
Sustentante**

## **DEDICATORIA**

Primeramente, dedico este proyecto a Dios por ser siempre mi guía y aliento en todas mis actividades diarias. Que siempre siento que sus planes son perfectos con todo lo que ha sucedido en mi vida y con quien siempre puedo contar en los momentos más difíciles

A mis padres, los cuales siempre han celebrado conmigo mis triunfos, pero también han estado conmigo en los momentos no tan felices. A ellos que fueron mi apoyo emocional y económico y de quienes me encuentro muy orgullosa y agradecida de que sean mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Fernando Bolaños de Ford quien fue mi director de tesis, quien me autorizó, guió y me apoyó para poder realizar esta tesis en las instalaciones del laboratorio de LAICA, el Coyol.

A Juan Miguel Fernández y María José Retana, jefe directo y compañera de trabajo respectivamente. Por ser parte del proceso, evacuar mis dudas y apoyarme en todo momento.

A Ericka Chavarría López, compañera de trabajo, con quien compartí muchos momentos agradables a su lado y siempre estuvo ahí para brindarme apoyo moral. Ella siempre procuraba mantener el orden y aseo en todas mis actividades relacionadas con el proyecto y que nunca me faltara ninguna herramienta de trabajo.

A José Manuel Mena Rojas, gerente comercial y técnico de Protech, quien me asistió con el montaje del equipo en el Ingenio el Porvenir y me dio gran asistencia profesional a lo largo de la aplicación. Gracias por su tiempo, dedicación y conocimiento.

A Enrique Bolaños Mata, jefe del laboratorio del Porvenir, quien siempre con mucha disposición y amabilidad me abrió las puertas del laboratorio para realizar todas las pruebas durante la aplicación del enzima y con la verificación y monitoreo del funcionamiento adecuado de los implementos instalados en el ingenio en todos los días de aplicación.

A Marvin Bogantes Jiménez, John Diego Bolaños Alfaro, Luis Jiménez Barboza, Élide Vargas Barrantes, Andrea García Quesada, estimados profesores de la carrera de Laboratorista Químico quienes me han guiado exhaustivamente con todos los puntos importantes y detalles de este presente proyecto, gracias por sus comentarios, correcciones y por su profesionalismo.

A Javier Picado Elizondo, superintendente de calidad de LAICA, quien me orientó con el manejo de los resultados mediante ideas claras del acomodo con el documento y brindándome comentarios y observaciones del proyecto, gracias por su amabilidad y bondad.

## INDICE DE CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIA .....   | ii   |
| AGRADECIMIENTOS.....  | iii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | viii |
| INDICE DE CUADROS.....  | x    |
| INDICE DE ANEXOS.....   | xii  |
| RESUMEN .....   | xiv  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....  | 1    |
| 1.2 ANTECEDENTES.....   | 5    |
| 1.2.1 APLICACIÓN DE ALFA AMILASA Y DEXTRANASA EN EL PROCESO<br>PRODUCTIVO DE INGENIOS AZUCAREROS..... | 5    |
| 1.2.2 ESTIPULACIÓN DE LÍMITE MÁXIMO DE ALMIDÓN EN LAICA. ....   | 8    |
| 1.3 OBJETIVOS .....   | 13   |
| 2. MARCO TEÓRICO.....   | 14   |
| 2.1 BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>LEUCONOSTOC</i><br>PRODUCTORAS DE DEXTRANAS.....            | 14   |
| 2.2 EL ALMIDÓN EN LA CAÑA DE AZÚCAR .....   | 15   |
| 2.3 TIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR EN COSTA RICA .....   | 16   |
| 2.4 PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN DEL AZÚCAR BLANCA....  | 18   |
| 2.5 FORMACIÓN DE FLÓCULOS (POTENCIAL FLOC). ....  | 24   |
| 2.6 LEGISLACIÓN DE AZÚCAR EN COSTA RICA.....  | 25   |
| 2.7 PARÁMETROS INTERNOS DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR LÍQUIDO EN<br>LAICA .....                             | 26   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.8    | PARÁMETROS INTERNOS DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN EN LAICA.....   | 27 |
| 2.9    | DEXTRANASAS Y ALFA AMILASAS .....  | 27 |
| 2.10   | DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....  | 28 |
| 3.     | METODOLOGÍA .....  | 30 |
| 3.1    | CÁLCULO DE DOSIFICACIÓN DE ALFA AMILASA EN MUESTRAS DE MELADURA .....  | 30 |
| 3.2    | DOSIFICACIÓN DE DEXTRANASA EN MUESTRAS DE MELADURA..   | 31 |
| 3.3    | DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EFICACES DE POTENCIAL DE HIDRÓGENO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA Y DEXTRANASA ..... | 31 |
| 3.3.1  | PRUEBAS RELACIONADAS CON LA TEMPERATURA PARA LA ALFA-AMILASA .....   | 31 |
| 3.3.2  | PRUEBAS RELACIONADAS CON EL PH PARA LA ALFA-AMILASA .....  | 31 |
| 3.3.3  | PRUEBAS RELACIONADAS CON EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS PARA LA ALFA-AMILASA.....   | 32 |
| 3.3.4  | DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....  | 32 |
| 3.4    | MÉTODOS ANALÍTICOS.....  | 33 |
| 3.4.1  | DETERMINACIÓN DE DEXTRANAS EN AZÚCARES, MELADURA Y JUGOS MEDIANTE UN MÉTODO MODIFICADO DE TURBIDEZ EN ALCOHOL.....                                 | 33 |
| 3.4.2. | DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN MUESTRAS DE AZÚCAR BLANCA, MELADURA Y JUGO MIXTO.....  | 33 |
| 3.4.3. | MÉTODO DE POTENCIAL FLOC Y FLOC DE 10 DÍAS.....  | 34 |
| 3.4.4. | MÉTODO DE TURBIDEZ EN AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN  | 34 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5. ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO EN EL INGENIO EL PORVENIR,<br>TACARES, GRECIA.....  | 34        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>   | <b>37</b> |
| 4.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EFICACES DE POTENCIAL<br>DE HIDRÓGENO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN DE LA<br>ENZIMA ALFA-AMILASA Y DEXTRANASA ..... | 37        |
| 4.1.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA ALFA<br>AMILASA.....   | 37        |
| 4.1.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN<br>LA ALFA AMILASA.....  | 38        |
| 4.1.3 DETERMINACIÓN DEL PH EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA ALFA<br>AMILASA.....   | 39        |
| 4.1.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE LA ALFA AMILASA.....   | 40        |
| 4.2 ETAPAS DE ADICIÓN DE LAS ENZIMAS ALFA AMILASA Y<br>DEXTRANASA EN EL INGENIO EL PORVENIR, GRECIA.....   | 43        |
| 4.3 RESULTADOS DE ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN MELADURA Y JUGO<br>MIXTO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO DE AZÚCAR<br>BLANCA EN EL INGENIO EL PORVENIR.....  | 45        |
| 4.4 RESULTADOS EN EL AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN<br>(PRODUCTO TERMINADO) TRAS LA ADICIÓN ENZIMÁTICA DE ALFA<br>AMILASA Y DEXTRANASA.....                     | 47        |
| 4.4.1 RESULTADOS DE ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN PRODUCTO<br>TERMINADO.....  | 47        |
| 4.4.2 RESULTADOS DE FLOC ALCOHÓLICO Y FLOC DE 10 DÍAS EN<br>PRODUCTO TERMINADO.....  | 51        |
| 4.4.1 RESULTADOS DE TURBIDEZ EN PRODUCTO TERMINADO .....   | 54        |
| <b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:.....</b>  | <b>56</b> |

|  |    |
|--|----|
| 5.1 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL TIEMPO PARA LA ALFA AMILASA  |    |
| 56   |    |
| 5.2 PRUEBAS RELACIONADAS CON LA TEMPERATURA PARA LA ALFA AMILASA .....   | 56 |
| 5.3 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL PH PARA LA ALFA AMILASA .  | 57 |
| 5.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA ALFA AMILASA .....  | 58 |
| 5.5 ETAPA DE ADICIÓN DE LA ALFA AMILASA EN EL PROCESO PRODUCTIVO DEL INGENIO EL PORVENIR. ....   | 58 |
| 5.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA DEXTRANASA .....  | 60 |
| 5.7 ETAPA DE ADICIÓN DE LA DEXTRANASA EN EL PROCESO PRODUCTIVO DEL INGENIO EL PORVENIR. ....   | 61 |
| 5.8 ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN MELADURA Y JUGO MIXTO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO DE AZÚCAR BLANCA EN EL INGENIO EL PORVENIR. .... | 61 |
| 5.9 ALMIDÓN EN PRODUCTO FINAL .....  | 64 |
| 5.10 DEXTRANAS EN PRODUCTO FINAL .....   | 65 |
| 5.11 POTENCIAL FLOC EN PRODUCTO TERMINADO .....  | 66 |
| 5.13 TURBIDEZ EN PRODUCTO TERMINADO. ....  | 68 |
| 6. PLANES GLOBALES DE ADICIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO PRODUCTIVO .....  | 69 |
| 7. CONCLUSIONES: .....   | 73 |
| 8. RECOMENDACIONES:.....   | 75 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 76 |
| 10. ANEXOS.....  | 83 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Gráfico de cajas de los promedios de concentración de almidón por ingenio, desde enero a mayo, 2021. ....   | 10 |
| Figura 2: Gráfico de cajas de los promedios de concentración de almidón por ingenio, desde enero a abril, 2022. ....  | 11 |
| Figura 3: Gráfico de los promedios de concentración de almidón por ingenio, desde enero a abril, 2022. ....   | 11 |
| Figura 4: Variación de la concentración de almidón en ppm de lotes de producción de azúcar blanca en distintos ingenios costarricenses, desde enero a abril, 2022. .... | 12 |
| Figura 5: Principales variedades de caña de azúcar cultivadas en Costa Rica y sus respectivos años de uso comercial. ....   | 17 |
| Figura 6: Lugar de recepción y descarga de la caña en el Ingenio Porvenir.....  | 18 |
| Figura 7: Etapa de extracción del jugo por medio de molinos en el Ingenio El Porvenir. Fuente propia.....   | 19 |
| Figura 8: Clarificador del Ingenio el Porvenir.....   | 20 |
| Figura 9: Etapa de evaporación en el Ingenio El Porvenir. Fuente propia. ....   | 21 |
| Figura 10: Etapa de clarificación de la meladura en el Ingenio el Porvenir. ....  | 22 |
| Figura 11: Etapa de cristalización en el Ingenio el Porvenir .....  | 23 |
| Figura 12: Etapas del proceso general de elaboración de azúcar blanca de plantación en un ingenio azucarero.....  | 24 |
| Figura 13: Relación entre la concentración y el tiempo de reacción de la alfa amilasa a 65°C en muestras de meladura cruda. ....  | 38 |
| Figura 14: Almidón residual en muestras de meladura tras adición de alfa amilasa a diferente pH, a una temperatura de 65°C y un tiempo de reacción de 20 minutos. ....  | 40 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 15: Influencia de los factores A, B y C en la adición de la dextranasa. Meladura como analito.....  | 43 |
| Figura 16: Puntos en el proceso productivo en donde fueron adicionadas la alfa amilasa y dextranasa. ....  | 44 |
| Figura 17: Gráfica de dispersión de almidón y dextranas con respecto a los lotes de producción de azúcar blanca. ....  | 50 |
| Figura 18: Imagen comparativa de granos de azúcar en forma normal (cuadrada) producidos por un ingenio azucarero costarricense y los granos de azúcar del lote consecutivo 199 del ingenio El Porvenir tratado enzimáticamente donde se puede observar elongación del cristal..... | 51 |
| Figura 19: Potencial floc de los lotes tratados enzimáticamente y lotes sin tratamiento.....   | 52 |
| Figura 20: Resultados del potencial floc del Ingenio el Porvenir, Tacaes, Grecia, desde febrero, 2022 hasta abril, 2022. Realizados en el laboratorio Central de LAICA, Coyol de Alajuela.....   | 53 |
| Figura 21: Diagrama global de adición de alfa amilasa en un proceso productivo general azucarero.....  | 69 |
| Figura 22: Diagrama global de adición de alfa amilasa en un proceso productivo general azucarero.....  | 70 |

## INDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1: Promedio de la cantidad de almidón en azúcar blanca en partes por millón de los ingenios costarricenses en zafra 2020-2021 de enero a mayo. ....   | 9  |
| Cuadro 2: Promedio de la cantidad de almidón en azúcar blanca en partes por millón de los ingenios costarricenses en zafra 2021-2022 de enero a abril. ....  | 9  |
| Cuadro 3: Tipos de floc según su origen. ....  | 25 |
| Cuadro 4: Parámetros máximos del azúcar líquido producido en LAICA, Coyol... 26  |    |
| Cuadro 5: Parámetros máximos en azúcar blanca estipulados en LAICA, El Coyol. ....   | 27 |
| Cuadro 6: Lotes tratados enzimáticamente y fecha de su respectiva producción. 35   |    |
| Cuadro 7: Datos para el cálculo de peso de cada enzima para dosificar 5 ppm... 36  |    |
| Cuadro 8: Resultado del almidón residual según el tiempo de reacción a 65 °C. Según el método Draft N°3 de ICUMSA.....   | 37 |
| Cuadro 9: Resultados de la determinación residual de almidón en partes por millón tras pruebas de temperatura para la alfa amilasa. Concentración inicial de almidón en meladura de 533 ppm .....                                    | 38 |
| Cuadro 10: Datos de las pruebas realizadas en la determinación del pH ideal en muestras de meladura cruda para la enzima alfa amilasa.....   | 39 |
| Cuadro 11: Diseño de experimentos factorial de un bloque pertenecientes a la enzima alfa amilasa. Datos resaltados en negrita equivalen a las combinaciones en donde se obtuvieron resultados más bajos en almidón en ppm. ....      | 40 |
| Cuadro 12: Diseño de experimentos factorial de tres bloques de la enzima dextranasa. Datos resaltados en negrita equivalen a las combinaciones de variables que brindaron menores resultados de dextranas en partes por millón. .... | 42 |
| Cuadro 13: Datos de almidón y dextranas en meladura en partes por millón de diferentes fechas de recolección en el Ingenio El Porvenir, Tacaes, Grecia. ....   | 45 |

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 14: Resultados de los muestreos diarios de la materia prima (jugo mixto) para la elaboración de azúcar blanca de plantación.....  | 46 |
| Cuadro 15: Promedio de almidón y dextranas en partes por millón de los muestreos de meladura con tratamiento, realizadas cada tres horas en el ingenio El Porvenir. ....         | 46 |
| Cuadro 16: Resultados de almidón en ppm en los lotes de producción del ingenio el Porvenir con tratamiento enzimático y últimos 4 lotes sin tratamiento. ....                    | 47 |
| Cuadro 17: Promedio de dextranas en partes por millón en el azúcar blanca de plantación con tratamiento enzimático y últimos 3 lotes sin tratamiento (señalados en negrita)..... | 48 |
| Cuadro 18: Observaciones en días del floc de 10 días de los lotes tratados enzimáticamente y últimos 3 lotes sin tratamiento. ....   | 54 |
| Cuadro 19: Resultado de turbidez en el producto terminado en los lotes tratados enzimáticamente con alfa amilasa y dextranasa. ....  | 55 |
| Cuadro 20: Estimación de adición de dextranasa en el proceso productivo según cantidad de dextranas en azúcar blanca de plantación. ....   | 71 |
| Cuadro 21: Estimación de adición de alfa amilasa en el proceso productivo según cantidad de almidón en azúcar blanca de plantación. ....   | 72 |

## INDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| Anexo 1: Matriz de diseño de experimentos factorial $2^3$ para la alfa amilasa.....  | 83 |
| Anexo 2: Matriz de diseño de experimentos factorial $2^3$ para la dextranasa .....   | 83 |
| Anexo 3: Cálculo utilizado en la dosificación de dextranasa y agua en el Ingenio el Porvenir .....   | 84 |
| Anexo 4 :Cálculo de las cantidades de enzima alfa amilasa y agua a utilizar por día, a un flujo de 1,45 L/h.....   | 85 |
| Anexo 5: Curva de calibración de almidón en ppm empleada para las determinaciones de pruebas laboratoriales, corridas en el Ingenio el Porvenir y producto terminado. ....   | 86 |
| Anexo 6: Curva de dextranas elaborada para las determinaciones en el diseño de experimentos, análisis de muestreos en el ingenio El Porvenir y producto terminado. Fuente: propia.....   | 87 |
| Anexo 7: Curva de calibración de dextranas en jugo de caña en partes por millón .....  | 87 |
| Anexo 8: Resultados de potencial floc en el azúcar blanca de plantación con tratamiento enzimático y últimos tres lotes sin tratamiento.....   | 88 |
| Anexo 9: Resultados de la repetibilidad de dextranas en muestra de meladura..  | 88 |
| Anexo 10: Porcentaje de recuperación obtenido en adición de dextranas a 80, 160 y 240 ppm. ....  | 89 |
| Anexo 11: Rendimientos diarios en el Ingenio El Porvenir en días anteriores, posteriores, y durante la aplicación enzimática. Los rendimientos señalados en negrita equivalen a los días en donde se llevó a cabo la dosificación enzimática en el ingenio. .... | 91 |
| Anexo 12: Datos generados de absorbancia a 420 nm para la obtención de turbidez en Unidades Icumsa (UI) .....  | 92 |

|   |    |
|---|----|
| Anexo 13: Proceso de extracción de jugo en los molinos, el jugo estancado se integra al proceso. .... | 93 |
| Anexo 14: Dosificación de la alfa-amilasa en el jugo de caña extraído .....                           | 93 |
| Anexo 15: Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.....                              | 94 |
| Anexo 16: Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.....                              | 94 |
| Anexo 17: Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.....                              | 95 |
| Anexo 18: Sitio de reacción de la dextranasa, cascada de meladura clarificada. .                      | 96 |
| Anexo 19: Floc de diez días de grado 0, recuperado del lote consecutivo 198. ...                      | 96 |
| Anexo 20: Floc de diez días de grado 1. Recuperado del lote consecutivo 199 ...                       | 97 |
| Anexo 21: Floc de diez días de grado 2. Recuperado del lote consecutivo 204 ...                       | 97 |

## RESUMEN

El almidón y las dextranas en el proceso de elaboración del azúcar blanca ha sido un objeto de estudio desde años atrás debido a las dificultades que generan en el proceso. Las dextranas, son responsables del deterioro de la caña de azúcar, minimizan el rendimiento interno en los ingenios y por ende ocasionar pérdidas económicas. El almidón, por su parte genera viscosidad en el jugo de caña y creando taponamiento en tanques y tuberías en los ingenios.

Dado esto, se dispuso a encontrar experimentalmente las condiciones idóneas de pH, tiempo y temperatura de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa, para lograr hidrolizar la mayor cantidad de estos polisacáridos de la mano de los métodos analíticos descritos en ICUMSA. Tras una serie de evaluaciones a nivel laboratorial, se encontró que las condiciones óptimas de adición de la alfa amilasa corresponden a un pH entre 4 y 7, una temperatura mínima de 55 °C y tiempo mínimo de 10 minutos. Mientras que para la adición de la dextranasa es necesario un tiempo mínimo de 30 minutos, un pH ácido aproximadamente de 5 y una temperatura alrededor de los 55°C.

En el Ingenio el Porvenir, Tacares, Grecia se dosificó la alfa amilasa en el jugo mixto y la dextranasa en el tanque de meladura clarificada. Se logró reducir una cantidad considerable de almidón en un 84,4 % y un 40,5 % de dextranas en la meladura, observando también una mejora en el proceso productivo como la reducción en las obstrucciones y menos tiempo de purga en los tachos.

Todos los lotes de azúcar blanca de plantación que fueron adicionados con alfa amilasa y dextranasa lograron mantenerse abajo del límite máximo de almidón y floc alcohólico estipulado por LAICA bajo la ficha técnica de producción de ingenios B-01 para azúcar blanca de plantación.

Conforme a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se creó un diagrama global de etapas para la adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso de obtención de azúcar blanca que fuese capaz de acoplarse a cualquier ingenio azucarero.

**PALABRAS CLAVE:** Alfa amilasa, dextranasa, meladura, diseño de experimentos, floc alcohólico, turbidez, floc de 10 días, azúcar, almidón, dextranas.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El valor de la caña de azúcar se encuentra ligado a la cosecha, transporte, almacenamiento y composición química del jugo de caña. El deterioro de la caña de azúcar entre la cosecha y su transporte se encuentra asociado a la formación de productos de deterioro, las más comunes son las dextranas y los almidones y estos a su vez repercuten en la calidad de la materia prima (Issa, 2008). El deterioro de la caña trae consigo pérdidas de sacarosa, impurezas insolubles y crecimiento desproporcionado del cristal, trayendo consigo pérdidas de sacarosa y una baja en la eficiencia de los ingenios (Castillo *et al*, 2015).

La dextranasa constituye una enzima capaz de romper enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1,6) que poseen las dextranas. El corte que realiza en el polímero es en forma aleatoria, por lo tanto, forma productos de desecho, como por ejemplo D-glucosa, isomaltotriosa y oligómeros (Khalikova, Susi y Korpela, 2005).

Las enzimas  $\alpha$ -amilasas, por su parte, constituyen un aliado en la solución de los problemas que causan el almidón en la elaboración de azúcar blanca. Su actividad principal es el rompimiento de los enlaces  $\alpha$ (1,4), que contienen la amilosa y amilopectina (moléculas que conforman al almidón). Esto permite producir estructuras de menor tamaño capaces de generar menores viscosidades hasta obtener un jugo bajo en almidones y que provoque menos problemas de taponamiento en los ingenios para obtener el producto final. (Pescador, 2017).

El potencial floc se encuentra estrechamente relacionado con la cantidad de almidón y dextranas presentes en el azúcar. El floc es la capacidad del azúcar de formar flóculos, lo cual es una preocupación de los azucareros como de la industria de bebidas, dado que se presentan coloides en el producto que no son estéticos y a la vez generan desconfianza de quien lo consume, aunque no trae consigo problemas en la salud del

consumidor. En la industria de bebidas el floc se mide mediante el método ácido de 10 días (López, 2014).

Según Drew, Pearson y Kimmerling (1980) el floc se forma cuando se genera una carga positiva en la proteína de la caña de azúcar en pH ácido, seguidamente esta carga positiva atrae al polisacárido con carga negativa (polisacárido nativo de la caña de azúcar) o por sus siglas en inglés, ISP. Los cuales se unen para formar flóculos, otras especies como el almidón, dextranas y compuestos provenientes de la sílica se incluyen en el floc y pueden incrementar la cantidad de este.

Aunado a esto, existe una concentración crítica de la proteína de la caña y del ISP, ya que cuando el número de cargas negativas y positivas existen en iguales cantidades, es en ese momento cuando se da la máxima floculación. Es por esta razón que muchos azúcares, aunque tengan proteína e ISP, no forman flóculos (López, 2014).

Se sabe que experimentalmente, la eliminación de dextranas y almidones por métodos físicos como la ósmosis inversa, ultrafiltración y diálisis brindan resultados positivos, pero solo a pequeña escala. Sin embargo, a gran escala esto no es factible, ya que, debido a las condiciones de operación de los ingenios azucareros, implicaría grandes costos industriales en su aplicación (Rohde, 2017).

Los polisacáridos son estructuras conformadas por moléculas en cadena, que pueden ser ramificados o lineales, todos los polisacáridos por sus propiedades físicas tienden a causar problemas en el procesamiento de la caña de azúcar, como por ejemplo retrasos en la producción y crecimiento desproporcionado del cristal (Ramos, Ravelo, Bordallo y León, 2005). El polisacárido más común asociado con los problemas en el azúcar son las dextranas que son compuestos producidos por microorganismos contaminantes (Issa, 2008).

Las dextranas son producidas en la mayoría de los casos por bacterias lácticas de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*. Cuando se presentan medios

que contengan sacarosa, estas bacterias producen la enzima llamada dextransucrasa la cual convierte el exceso de sacarosa en el medio por medio de una hidrólisis, la cual tiene como productos las dextranas y paralelamente liberan fructosa al medio (Rodríguez & Hanssen, 2007).

La especie que más interviene en la formación de dextranas es el *Leuconostoc mesenteroides* y se encuentran en cuatro etapas; cosecha, transporte, tiempo de espera al llegar al molino y por último la molienda (Issa, 2008). Desde el punto de vista industrial, estudios han demostrado que *L. mesenteroides* es capaz de utilizar altos porcentajes de azúcar en un corto tiempo (Bukhari et al, 2015).

A lo largo de los años, las dextranas y los almidones en las industrias azucareras tanto ingenios como refinerías han sido un problema a la vista de muchos investigadores (Rodríguez, 2005). Para Rohde (2017), el peso promedio de azúcar perdido para un jugo de caña contaminado con dextranas a un nivel de 5000 ppm, puede alcanzar los 40 kg por tonelada de azúcar producido. Desde este punto de vista, las dextranas constituyen un problema grave en cuanto a las pérdidas que pueden generar a las industrias azucareras.

Según Eggleston *et al.* (2008) las dextranas son los principales contaminantes extracelulares que se derivan a través de la exposición de la caña de azúcar. Dextranas mayores a 1000 ppm por cada grado brix se ven relacionados con bajo rendimiento en las etapas de la evaporación y la cristalización, por último, pueden afectar el valor en la polarización.

Por otro lado, desde los primeros tiempos de la fabricación del azúcar, se ha venido estudiando la formación de depósitos insolubles de goma, las cuales causan bloqueo en tanques, tuberías y filtros. Gracias a diversos estudios, se ha concluido que dichas obstrucciones son debidas al almidón presente durante el proceso de obtención del azúcar; además, el almidón está directamente relacionado con el crecimiento de bacterias en proceso, además de la formación constante de dextranas (Penados, 2004).

El problema no solamente puede ocurrir a nivel de ingenio azucarero, también es posible observar bloqueos ocasionales en filtros #330 y #335 en la planta de azúcar líquido. En las figuras 1 y 2 se aprecia una pequeña parte del proceso de elaboración de azúcar líquido, la función de estos filtros es capturar todo tipo de impurezas suspendidas que puedan interferir en el proceso y que afecten la calidad organoléptica del producto terminado.

Los bloqueos se producen porque la planta se alimenta con azúcar blanca de plantación con una concentración alta en almidón. Lo cual consiste en un problema ya que la obstrucción de los filtros equivale a pérdidas de tiempo en el proceso debido a que los filtros deben limpiarse para su posterior uso.

Para la eliminación de polisacáridos en los ingenios productores de azúcar, la aplicación correcta de las enzimas dextranasas y  $\alpha$ -amilasa corresponden al método más favorable; sin embargo, no existe información con suficiente peso que indique dónde, cuándo, bajo qué condiciones de temperatura, pH y tiempo específicos, o si se deben aplicar por separado o en conjunto, ya que se debe realizar experimentalmente (Protech, 2018), es por esta razón que la presente propuesta busca encontrar una solución a la aplicación de enzimas a nivel industrial.

Según el jefe de aseguramiento de la calidad de CoopeAgri; no existe una estandarización, ni validación a nivel nacional de las condiciones óptimas para añadir las enzimas alfa amilasa y dextranasa en el Ingenio el General ni tampoco en el resto de los ingenios azucareros de Costa Rica que se encuentran activos en la época de zafra. Si no, solo se han realizado pruebas piloto a nivel de ingenio. (E. Alpízar, comunicación personal, 30 de octubre del 2020).

De este modo, se buscará una solución a la incertidumbre de cuál debe ser la etapa de adición idónea en el proceso, además de contar con un documento escrito que sirva como guía en los siguientes lotes de producción que se desee utilizar enzimas con el fin

de reducir sustancialmente los porcentajes de almidón y dextranas durante la producción de azúcar blanco.

## 1.2 ANTECEDENTES

### 1.2.1 APLICACIÓN DE ALFA AMILASA Y DEXTRANASA EN EL PROCESO PRODUCTIVO DE INGENIOS AZUCAREROS.

En Lousiana, en las zafras de 1996 y 1997, se aplicó *Dextranex* (nombre comercial de la enzima dextranasa) en el jugo de caña, en una concentración de 6 g/ tonelada de jugo. Con un tiempo, entre los 12 y 15 minutos de reacción; se observó que las dextranas se redujeron de 50 % a un 85 %, a la vez se redujo la viscosidad y el contenido de dextranas en el producto terminado (Clarke, 1997).

En Cuba, orientaron la aplicación de la alfa-amilasa en el proceso del azúcar crudo, con una dosificación de la enzima de 2 a 5 g por tonelada de caña molida en el tanque de jugo clarificado, logrando eliminar más del 65 % la concentración de almidón. De la mano de esta información, señalaron que también obtuvieron buenos resultados utilizando la enzima en la etapa de meladura, añadiendo 5 gramos de alfa-amilasa por cada tonelada de caña (Namer y Dávila, 1988).

Morel y Wienese (2002) en Durban, Sudáfrica, realizaron una serie de pruebas con tres enzimas comerciales (*Dextranex L-4000*, *Novo 50 L* y *Novo Plus L*) en diferentes partes del proceso industrial de la elaboración del azúcar, simulando estos procesos a nivel de escala en el laboratorio. Encontraron que la aplicación de la enzima dextranasa en el difusor del jugo de caña no es factible, además, la enzima es menos activa a la temperatura por arriba de los 100 °C y brix entre los 60 y 65° encontrados en los evaporadores, pero sí más estable, especialmente en las dextranas de cepa *Chaetomiun sp.*

Eggleston y Monge (2004) realizaron una investigación de dextranasas concentradas y diluidas, encontraron que la aplicación de la dextranasa diluída y concentrada en los jugos fue rentable económicamente, mientras que la adición de dextranasas diluidas en las melazas no lo es. Sin embargo, se encontraron problemas al utilizar la dextranasa diluida tras someterlas a altas concentraciones de dextranas. Realizado el estudio se concluyó que se deben utilizar las dextranasas concentradas en el último evaporador y así poder alcanzar una reducción alrededor del 37 %.

Las dextranasas más aplicadas en los Estados Unidos constituyen a las extraídas del hongo *Chaetomium gracile* (Eggleston & Monge, 2004). Aunque este tipo de dextranasas cumplen con la misma función en la industria, se ha demostrado que hidrolizan más rápido que las cepas de *Penicillium* y *Bacillus* (Taylor *et al.*, 1990).

En Guatemala, en el año 2004, se habló de la utilización de la alfa amilasa en la etapa de evaporación, ya que se presentan condiciones idóneas para el correcto mecanismo de acción de la enzima. El rango de temperatura debe estar entre los 71 a los 90 °C. Técnicamente de 1,27 a 6,20 gramos de enzima por cada tonelada de caña molida serían suficientes para el proceso (Penados, 2004).

En México, utilizando un diseño de experimentos (Box-Behnken), se encontraron las condiciones óptimas operativas: concentración de la enzima dextranasa debe estar entre 15 y 25 mg/kg, temperatura entre 45 y 60 °C y tiempo de espera entre 10 y 15 minutos. Además, la etapa de la evaporación es la etapa que más coincide con dichas características, por lo tanto, es en dicha etapa donde se debe utilizar la dextranasa *L-650* (nombre comercial) (Figueroa *et al.*, 2006).

Loyola y Díaz (2013) y Figueroa *et al.* (2006), concluyeron tras una serie de análisis laboratoriales que el tiempo de hidrólisis para la enzima dextranasa deber

rondar los 15 minutos para que fuese óptimo. Además, el rango del pH para la adición de la enzima debe estar en un rango de  $6 \pm 0,5$ .

Bashari *et al.* (2019), estudiaron la relación entre la cristalización y las dextranas. Los autores observaron por medio de un microscopio de barrido electrónico cómo un cristal de sacarosa posee una estructura y figura normales, mientras que un cristal en presencia de dextranas presenta forma elongada. Aunado a esto, se comprobó un aumento en la velocidad de cristalización, después de la hidrólisis de las dextranas.

En Costa Rica; La Liga Agrícola de la Caña de Azúcar (LAICA) involucra la unión de 13 ingenios en la actualidad. Estos se encuentran distribuidos en todo el país (LAICA, 2020). Entre estos ingenios se encuentra el del General Milton Fonseca, ubicado en Pérez Zeledón que nació en 1974 (CoopeAgri, 2020).

En este ingenio, se realizó la aplicación de enzimas dextranasa y alfa-amilasa entre el 4 y 7 de febrero del 2020 bajo instrucciones descritas en las fichas técnicas de las enzimas brindadas por el proveedor, en las cuales se describe una temperatura entre 65 a 75°C y pH entre 5 y 9 para la alfa amilasa. Y para la dextranasa, una temperatura entre 65 y 85°C y pH 4 a 8 (F. Bolaños, comunicación personal, 5 de julio, 2020).

La adición de las enzimas se realizó en la entrada del tercer evaporador para aprovechar al máximo el tiempo de contacto de las enzimas con una temperatura aproximada a los 70°C, el tiempo aproximado de la operación es de una hora. Se observó, la reducción de la prueba de floc alcohólico (indicador de turbidez producido por los polímeros). También se reportó una leve mejora en la recuperación de la sacarosa y pérdida de miel. Este último conlleva a un beneficio adicional para el ingenio y es producido por una reducción de la viscosidad de la masa tercera que permite una mayor facilidad para la cristalización de sacarosa. (Bolaños, 2020).

Según el comunicado recibido por Fernando Bolaños, gerente de calidad en LAICA, el azúcar producido en ese período se analizó para determinar almidón. Se observó una reducción de almidón de entre el 25 % y 50 % con respecto al azúcar sin aplicación de enzimas (F. Bolaños, comunicación personal, 5 de julio, 2020).

Para la producción de azúcar líquido se requiere optimizar la hidrólisis ya que el azúcar líquido, el cual se obtuvo mediante la alimentación con los lotes de azúcar blanca tratados enzimáticamente se obtuvieron niveles de turbidez entre 18 y 25 UI, lo que significa que el producto está muy cerca o, en algunos casos, incumplió el límite máximo de 20 UI según parámetros establecidos en LAICA (ver Cuadro II) para la producción de azúcar líquido. No fue posible cuantificar el nivel de dextranas ya que el método no estaba implementado en el laboratorio de LAICA. (F. Bolaños, comunicación personal, 5 de julio, 2020).

Se logra observar que, según las investigaciones anteriormente mencionadas, los autores coinciden en añadir las dextranasas y alfa-amilasas en la etapa de evaporación. Sin embargo, los rangos de concentración son amplios, con tiempos de reacción y sitios de control variables. Lo que provoca cierta incertidumbre y vacío para encontrar las condiciones aptas de adición de enzimas ya sea en la etapa de extracción, clarificación, evaporación o cristalización del proceso de obtención de azúcar.

### **1.2.2 ESTIPULACIÓN DE LÍMITE MÁXIMO DE ALMIDÓN EN LAICA.**

Internamente en LAICA, en el año 2021, la gerencia de Calidad, estipuló un límite máximo de 100 ppm de almidón en azúcar blanca para alimentación de la planta de azúcar líquido, tras una serie de determinaciones de almidón en azúcar blanca de los ingenios Catsa, Taboga, El Viejo, El Palmar, Porvenir, Victoria, Quebrada Azul, Juan Viñas, Cutris y El General por un periodo de cuatro meses (enero-mayo del 2021). Este estudio se llevó a cabo por la presente tesimal y no fue publicado en ningún oficio o documento interno ni externo de la empresa.



El promedio de almidón por ingenio se observa en el Cuadro I. Para el año 2022 se realizó esta determinación en los ingenios antes descritos exceptuando el ingenio Juan Viñas, en el periodo de enero a abril, detallando los resultados en el Cuadro 2.

**Cuadro 1:** Promedio de la cantidad de almidón en azúcar blanca en partes por millón de los ingenios costarricenses en zafra 2020-2021 de enero a mayo.

| Ingenio       | Promedio de almidón (ppm) |
|---------------|---------------------------|
| Catsa         | 167                       |
| Cutris        | 179                       |
| El General    | 189                       |
| Juan Viñas    | 151                       |
| Palmar        | 81                        |
| El Porvenir   | 236                       |
| Quebrada Azul | 131                       |
| Taboga        | 71                        |
| CoopeVictoria | 135                       |
| El Viejo      | 97                        |

**Fuente:** Elaboración propia.

**Cuadro 2:** Promedio de la cantidad de almidón en azúcar blanca en partes por millón de los ingenios costarricenses en zafra 2021-2022 de enero a abril.

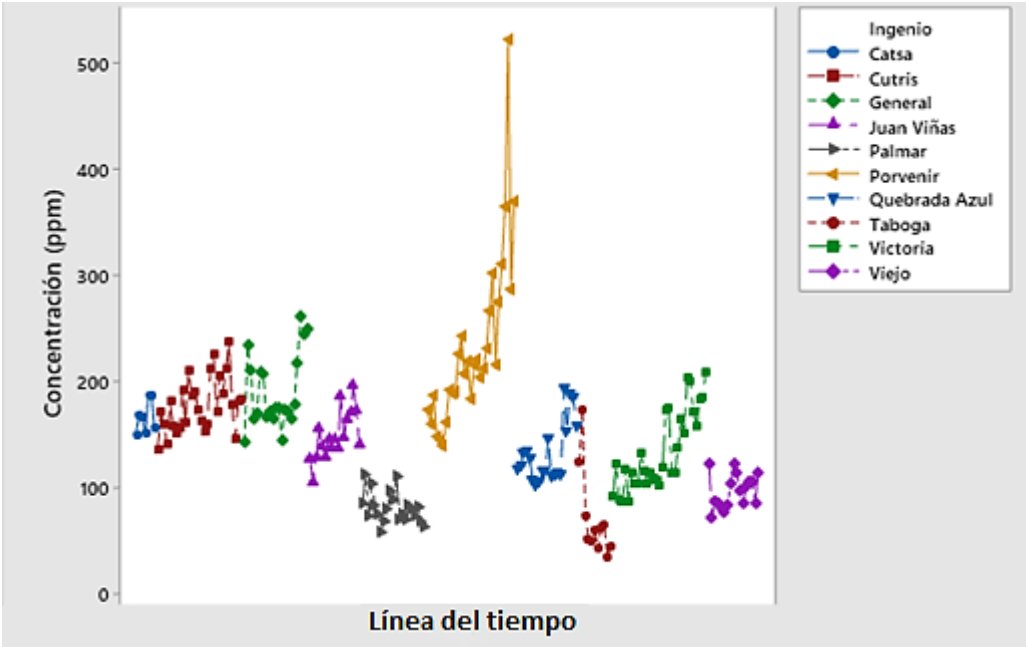
| Ingenio       | Promedio de almidón (ppm) |
|---------------|---------------------------|
| Catsa         | 144                       |
| Cutris        | 178                       |
| El General    | 163                       |
| El Palmar     | 108                       |
| El Viejo      | 92                        |
| El Porvenir   | 217                       |
| Quebrada Azul | 136                       |
| Taboga        | 109                       |
| CoopeVictoria | 148                       |

**Fuente:** Elaboración propia.

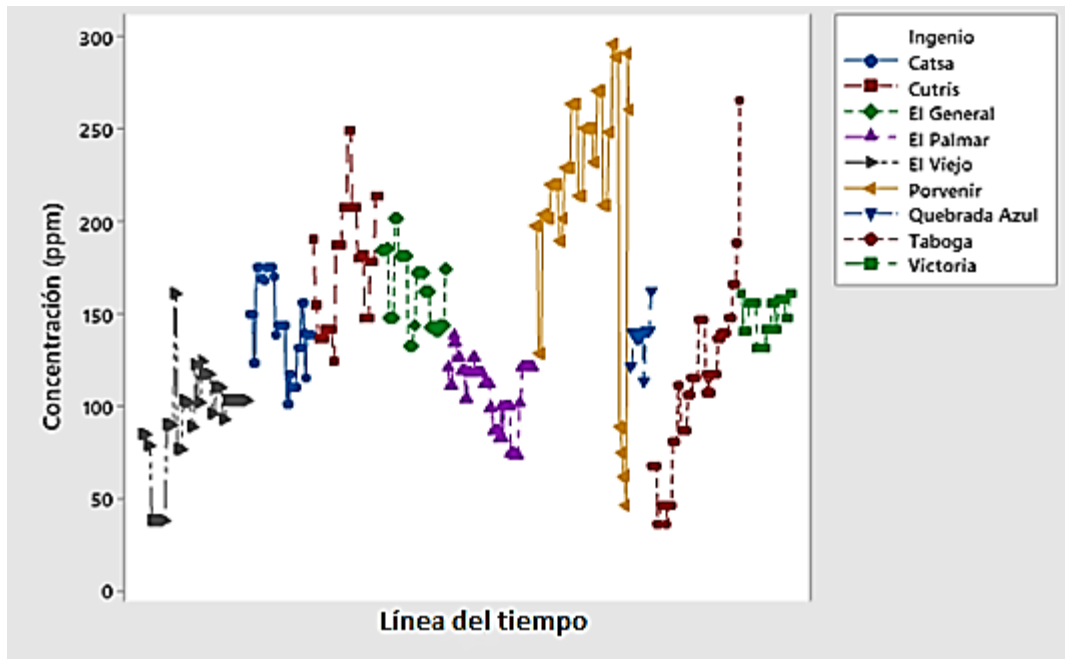


**Figura 2:** Gráfico de cajas de los promedios de concentración de almidón por ingenio, desde enero a abril, 2022. Resultados demarcados con “\*” significan datos dispersos alrededor del promedio. Fuente: propia.

Se observan la figura 3 y 4, las cuales hacen referencia al cambio de concentración de almidón por ingenio en una línea de tiempo (eje x), esta línea del tiempo es la misma para cada ingenio, que corresponde de enero a mayo del año 2021 y de enero a abril del 2022 de la figura 3 y 4 respectivamente.



**Figura 3:** Gráfico de los promedios de concentración de almidón por ingenio, desde enero a abril, 2022. Fuente: propia



**Figura 4:** Variación de la concentración de almidón en ppm de lotes de producción de azúcar blanca en distintos ingenios costarricenses, desde enero a abril, 2022. Fuente: propia

## **1.3 OBJETIVOS**

**1.3.1 OBJETIVO GENERAL:** Estandarizar las condiciones de adición de las enzimas dextranasa y alfa-amilasa en el proceso de elaboración de azúcar blanco de plantación tras pruebas laboratoriales para alcanzar un producto final con un bajo porcentaje en dextranas y almidón.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar las condiciones óptimas de potencial de hidrógeno, temperatura y tiempo de hidrólisis de las enzimas dextranasa y alfa-amilasa a través de una serie de pruebas a nivel de laboratorio con muestras de meladura.
- Elaborar lotes piloto de azúcar blanca de plantación en el ingenio El Porvenir una vez encontradas las condiciones eficaces de adición de las enzimas. Asimismo, realizar análisis fisicoquímicos de almidón, dextranas, floc alcohólico, turbidez y floc de 10 días en el producto terminado.
- Disminuir el potencial floc del producto terminado, de este modo contar con una materia prima que cumpla con el parámetro establecido internamente en LAICA para la producción de azúcar líquido.
- Establecer un plan global de adición de enzimas dextranasa y alfa-amilasa en el proceso de elaboración de azúcar blanca que se adecuen a las necesidades de los ingenios azucareros en Costa Rica.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *LEUCONOSTOC* PRODUCTORAS DE DEXTRANAS

El género *Leuconostoc* está conformado por la familia *Streptococcaceae*, son bacterias gran positivas, difíciles de aislar, catalasa-negativa, oxidasa negativa (Ballesteros, De Alegría, Fernández y Gutiérrez, 2010; Carvajal, 2018). Su hábitat se encuentra en la naturaleza, en raíces de vegetales verdes, no se encuentra en la microbiota del ser humano, pero sí pueden estar presentes en la microbiota del ganado y de ciertos insectos.

Este género tiene protagonismo en procesos de fermentación como en la elaboración de vino, azúcares y lácteos (Carvajal, 2018). Aunado a esto, el género *Leuconostoc* se conforma de especies como *Leuconostoc mesenteroides*, *L. mesenteroides sp*, *L. carnosum*, *L. gelidum*, *L. lactis*, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. fallax*, entre otros (Jofré et al, 2006).

Las dextranas son polímeros de la glucosa originados bacteriamente por *Leuconostoc mesenteroides* luego de la recolección de caña o durante el daño de su corteza. Las dextranas se acercan a una concentración de cero o un nivel muy bajo antes de la cosecha de la caña. La bacteria *L. mesenteroides* es una bacteria ácido-láctica, capaz de producir la enzima dextranasacarasa (Arya, Pathak, Gupta y Madan, 2018). En ciertas condiciones de temperatura y humedad favorables, la enzima hidroliza la sacarosa y se convierten en dextranas, además se incorporan metabolitos como etanol, ácido acético, ácido láctico y manitol (Cuervo, Ledesma, Durán y Argote, 2010).

Las dextranas son extraídas de los ingenios de azúcar en ciertos casos en concentraciones de hasta 10 000 ppm e inclusive más en casos extremos. Las dextranas están conformadas por enlaces  $\alpha$ -(1-4),  $\alpha$ -(1-3) y algunos  $\alpha$ -(1-2), siendo polisacáridos de alto peso molecular y la mayoría del tiempo son polisacáridos

lineales, pero también se le pueden encontrar con ramificaciones. Las dextranas en la industria azucarera generalmente son lineales, pero se ha encontrado que las ramificaciones pueden ser significantes, más que todo en dextranas de bajo peso molecular donde existe de 5 a 8% de ramificaciones (Edey *et al.* 1998).

El efecto negativo de este tipo de polímeros es el consumo de sacarosa, de hecho, por cada gramo de dextranas, se consumen 4 gramos de sacarosa. (Arya *et al.* 2018). Además de todo lo que conlleva el proceso de obtención de azúcar blanca; cosecha, tiempos de espera, molienda, entre otros ya mencionados, la formación de dextranas también es formado por una mala higiene del ingenio azucarero. (Morel y Weinese, 2002).

## **2.2 EL ALMIDÓN EN LA CAÑA DE AZÚCAR**

El almidón es uno de los principales productos de la fotosíntesis, que se almacena en los cloroplastos de las plantas en forma de gránulos, esto en forma de energía almacenada, cuando la fotosíntesis no está ocurriendo (Bello-Pérez, Montealvo, y Acevedo, 2006).

En el jugo de caña de azúcar, se puede encontrar una concentración entre 1,6 a 2,6 g/kg de almidón (Figueira, Car-valho, y Sato, 2011), pero esto se encuentra estrechamente relacionado con la época del año, la madurez y variedad de plantas, las condiciones climáticas tipo de suelo y método de análisis. En años anteriores, se ha observado un incremento de concentración de almidón, esto producido mayoritariamente por el procesamiento de la caña sin quemar, condiciones ambientales y usos de otros tipos de caña que puedan contener más almidón (Eggleston *et al.*, 2008).

El almidón está compuesto de dos macromoléculas; amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal conformada por unidades de glucosa unidos a enlaces  $\alpha$ -1,4, la amilopectina se describe como una molécula con estructura ramificada, conformada por moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-

6). Los gránulos de almidón son semicristalinos con un diámetro de 1 a 10  $\mu\text{m}$  en los tejidos de la caña de azúcar, en el maíz los gránulos son un poco más grandes (5 a 25  $\mu\text{m}$ ), y en la papa son aún mayores (15 a 100  $\mu\text{m}$ ) (Imrie y Tilbury, 1972). El almidón en la caña de azúcar está compuesto alrededor de un 19 % de amilosa y un 81 % de amilopectina (Vignes, 1974; Zhou *et al.* 2008).

El problema que ocasiona el almidón en la caña de azúcar recae en el comportamiento de los gránulos durante la hidratación y calentamiento (Viginotti *et al.* 2014). A través de la hidratación y calentamiento ocurre la gelatinización que es la causante de los taponamientos de las tuberías, conductos y tanques en la producción azucarera, en la gelatinización ocurren cambios irreversibles que generan hinchamiento y disrupción de los gránulos de almidón (Pineda *et al.* 2010).

### **2.3 TIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR EN COSTA RICA**

La presencia de almidón como se mencionó anteriormente se encuentra relacionado con el tipo de caña de azúcar. La variedad de caña de azúcar es muy variada, una estimación realizada en el año 2002 menciona las principales 60 variedades de caña de azúcar cultivadas en Costa Rica, cuyos resultados muestran un promedio de 14,9 años por clon de caña, un máximo de 66 años y un mínimo de 3 años en el cultivo comercial con un coeficiente de variación del 79,3 % (Figura 5) (Chávez, Rodríguez, Villalobos, Alvarado, Calderón, Alfaro, y Rodríguez, 2002).



| CLON       | AÑOS | CLON         | AÑOS | CLON       | AÑOS |
|------------|------|--------------|------|------------|------|
| B 43-62    | 20   | H 32-8560    | 30   | MEX 57-473 | 25   |
| B 47-44    | 36   | H 37-1933    | 27   | NA 56-42   | 9    |
| B 50-135   | 27   | H 44-3098    | 27   | NCo 310    | 30   |
| B 50-377   | 30   | H 49-5       | 5    | NCo 376    | 19   |
| B 54-142   | 27   | H 49-104     | 5    | PINDAR     | 39   |
| B 55-227   | 11   | H 50-7209    | 12   | POJ 2714   | 30   |
| B 60-125   | 25   | H 54-775     | 10   | POJ 2878   | 66   |
| B 60-267   | 13   | H 56-4848    | 6    | Q 68       | 19   |
| B 61-208   | 9    | H 57-5174    | 25   | Q 75       | 10   |
| B 74-132   | 9    | H 59-3775    | 5    | Q 96       | 9    |
| B 76-259   | 9    | H 60-8521    | 9    | Q 99       | 7    |
| BT 65-152  | 9    | H 61-1721    | 6    | Q 102      | 3    |
| Co 419     | 23   | H 62-4671    | 6    | RB 72-1012 | 7    |
| Co 421     | 39   | H 68-1158    | 9    | RB 73-9735 | 7    |
| CP 50-28   | 14   | H 70-0144    | 7    | SP 70-1143 | 9    |
| CP 57-603  | 9    | H 71-4441    | 7    | SP 70-1284 | 9    |
| CP 72-1210 | 9    | Ja 60-5      | 9    | SP 71-5574 | 9    |
| CP 72-1312 | 9    | L 60-14      | 6    | SP 71-6180 | 4    |
| CP 72-2086 | 9    | LAICA 82-135 | 4    | TROJAN     | 5    |
| CR 61-01   | 10   | LAICA 85-653 | 9    | VESTA      | 9    |

**Figura 5:** Principales variedades de caña de azúcar cultivadas en Costa Rica y sus respectivos años de uso comercial. Fuente: Chávez et al. (2002).

La caña de azúcar no es la misma para todas las zonas del país, por ejemplo, para la serie CP (provenientes de *Canal Point, Florida, EEUU*) el 26 % se siembra en el cantón de Cañas, 24,9 % en Carrillo, un 21,1 % en Liberia y por último un 12,6 % en Puntarenas.

La serie Q, la cual es proveniente de Queensland, Australia, se siembra en tres cantones; San Carlos (22,9 %), Carrillo (22,8 %) y Turrialba (16,2 %). De igual forma pasa con la serie SP (proveniente de São Pablo, Brasil), en Cañas se cultiva un 9,1 %, en Puntarenas un 26 % y en Liberia un 24,7 %.

En la región Sur del país se cultiva en gran cantidad de variedad SP 71-5574 (híbrido), la cual, a lo largo de los años, demuestra una buena capacidad de las condiciones de la zona (Chávez et al. 2002).

No existe una variedad ideal de caña, esto es un fin utópico y teórico, como lo menciona Chávez *et al.* es difícil encontrar una variedad que reúna las características de poco deterioro, no presencia de plagas, enfermedades ni poca presencia de polisacáridos problema (Chávez et al. 2002).

## 2.4 PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN DEL AZÚCAR BLANCA

**Recepción, descarga y alimentación de la caña:** El departamento de maquinaria recibe el nombre de Batey, la caña se transporta por medio de camiones, vagonetas, carretas, entre otros para luego ser pesada en básculas (Ramírez, Muñoz, Vásquez y Pérez (2017). En la Figura 6 se observa el lugar de recepción de la caña de azúcar en el Ingenio el Porvenir. En este punto, la caña cortada se entrega al ingenio para luego ser pesada y contabilizada.



**Figura 6:** Lugar de recepción y descarga de la caña en el Ingenio Porvenir. Fuente propia.

**Molienda:** La caña llega al molino en donde posteriormente se extrae el jugo para elaborar el azúcar. La caña es cortada por medio de cuchillas rotatorias para que la extracción del jugo sea más eficaz, esta se muele en molinos (4 a 7) de cuatro mazas, movilizadas gracias a motores eléctricos con varias velocidades, por medio de bandas, la caña preparada es llevada a cada molino donde se extrae el jugo, para alcanzar una cantidad mayor de sacarosa, el material que es expulsado de cada molino se le agrega jugo o agua (Ingenio Providencia, 2016).

Seguidamente el jugo se pasa a través de dos tamices, uno grueso y otro más fino, esto para eliminar la mayor cantidad de bagacillo, el cual es la fibra muy fina de la caña (Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente, 2009). En la Figura 7 se aprecian los molinos que presenta el Ingenio el Porvenir.



**Figura 7:** Etapa de extracción del jugo por medio de molinos en el Ingenio El Porvenir. Fuente propia.

**Clarificación del jugo:** Durante esta fase, se purifica el jugo extraído. Este debe estar exento de impurezas y materias extrañas. Dado esto el jugo será calentado, tratado con cal para posteriormente ser decantado, en este proceso los objetivos principales que se desean alcanzar son obtener un jugo limpio, separar materias como bagazo y tierra y mantener un pH básico para impedir pérdidas por la inversión de la sacarosa. Si se trata de azúcar blanca, para alcanzar un color óptimo, se debe pasar esta por el proceso de sulfitación antes de clarificar el jugo (ECN Automation, 2018). El clarificador que se observa en la Figura 8 es perteneciente al Ingenio el Porvenir, el cual tiene una capacidad de 176 458 litros.

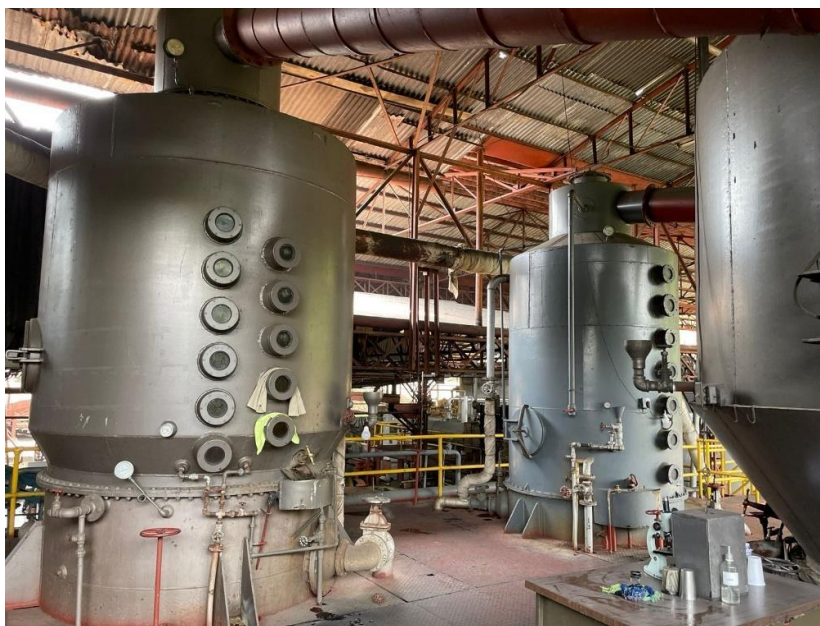
Luego de que el jugo pasa a través de los calentadores y por el paso de sulfitación, este llega hasta este clarificador para eliminar impurezas como el bagazo.



**Figura 8:** Clarificador del Ingenio el Porvenir. Fuente propia

**Evaporación:** El jugo que ya pasó por el proceso de clarificación, contiene un alto contenido de agua, la cual debe ser retirada con ayuda de la evaporación. El jugo que posee aproximadamente un Brix de 15°, por medio de una serie de evaporadores (llamados también efectos) se logra conseguir una meladura de aproximadamente 65° Brix (Ingenio Providencia, 2016). En la figura 9 se logra apreciar dos de los tres evaporadores que posee el Ingenio el Porvenir.





**Figura 9:** Etapa de evaporación en el Ingenio El Porvenir. Fuente propia.

**Clarificación de la meladura:** Se le añade al jarabe restante de la etapa de evaporación ácido fosfórico, luego se airea de la mano con la adición de un floculante (polímero) esto para disminuir el color de la meladura resultante (Ramírez *et al.* 2017). Las bancas horizontales que se aprecian en la Figura 10, se hacen pasar por debajo de la meladura cruda (sin clarificar) para airearla.



**Figura 10:** Etapa de clarificación de la meladura en el Ingenio el Porvenir. Fuente propia.

**Cristalización:** Para obtener el azúcar en cristales, a la meladura clarificada de la etapa anterior, se le hace pasar por una serie de tachos. Un tacho, se asemeja a una olla de presión, salvo que en lugar de presión se utiliza vacío para que la temperatura siempre se mantenga óptima y así lograr el cambio de líquido a sólido del azúcar, mediante el proceso de llamado cristalización (Gonzáles, 2013).

La cristalización comienza desde la concentración en el tacho hasta que se obtenga el desarrollo del cristal, se logra observar la creación de cristales por medio de la técnica conocida como semillamiento o siembra de cristales en una solución de sacarosa supersaturada. Se deben mantener las condiciones óptimas del tacho o evaporador como densidad, temperatura y humedad para lograr un producto de calidad. (Gonzáles, 2013).

En la Figura 11 se logra observar uno de los dos tachos (color café) que posee el ingenio El Porvenir, en donde por medio de vacío se logra obtener cristales de azúcar.

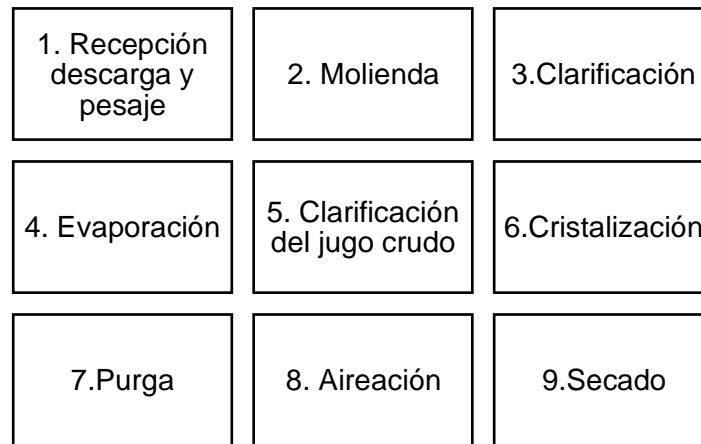


**Figura 11:** Etapa de cristalización en el Ingenio el Porvenir. Fuente propia.

**Purga:** En los tachos se obtiene una masa cocida, que se deriva de cristales de azúcar y miel, la separación del azúcar se hace por medio de centrífugas, de estas centrífugas sale azúcar cruda y miel (Ramírez *et al.* 2017).

En esta etapa se obtienen tres tipos de azúcar: azúcar comercial o de primera, azúcar de segunda, la cual se utiliza para cocimiento de la primera, y el azúcar de tercera, es utilizada para la cristalización de la segunda cocción. El azúcar de tercera que se extrae se llama melaza. Luego de esto, el azúcar de primera es fundida y aireada, el licor obtenido pasa por filtros de carbón donde luego es entregado a los tachos, se centrifuga, se seca y se envasa (Centro Nacional de Producción más Limpia de Honduras, 2009).

La Figura 12 reúne un esquema general de los pasos que conlleva un ingenio azucarero para la obtención de azúcar blanca de plantación.



**Figura 12:** Etapas del proceso general de elaboración de azúcar blanca de plantación en un ingenio azucarero. Fuente: Elaboración propia

## 2.5 FORMACIÓN DE FLÓCULOS (POTENCIAL FLOC).

Existen penalidades si los niveles de dextranas exceden los límites establecidos, de la misma forma sucede cuando se provee azúcar blanca en la industria de bebidas y se observa la presencia de nubosidad en una solución de sacarosa conocida como potencial floc (Protech, 2018). De acuerdo con Clarke (1997), el floc ácido en bebidas (floc de 10 días), ABF en inglés se forma en soluciones de sacarosa a un pH entre 3 y 4 o menor, generalmente a los 10 días de elaborada la solución y su posterior almacenamiento.

Este evento también es común en soluciones de azúcar muy concentradas, pero en ocasiones no es visible a la vista. La metodología a grandes rasgos consiste en una solución de azúcar acidificada con ácido fosfórico hasta llegar a un pH de 1.5, se deja reposar a una temperatura ambiente durante 10 días y luego se examina visualmente la turbidez o formación de flóculos posiblemente existentes en la solución (López, 2014).

Liuzzo y Hsu (1973), evaluaron el floc alcohólico de la caña de azúcar y concluyeron que el floc estaba relacionado con la amilosa, el cual forma complejos



con otros compuestos para producir partículas que componen el floc, por otra parte, Roberts y Carpenter (1974) relatan que el floc de azúcar de caña refinada contenía almidón, lípidos, ceras, proteínas, dextranas y otros polisacáridos de la caña. Debido a lo mencionado anteriormente, se debe realizar una diferenciación entre los diferentes tipos de floc y su respectivo origen (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Tipos de floc según su origen.

| <b>Origen</b>         | <b>Características</b>  |
|-----------------------|---|
| Microbiológico        | Nuboso/ glóbulos gelatinosos.   |
| Almidón               | Nubosidad y/o turbio  |
| Dextranas             | Glóbulos gelatinosos o trazas   |
| Floc alcohólico       | Aparece en la adición de etanol   |
| Silicatos             | Nubosidad/ precipitado flotante   |
| Floc ácido en bebidas | Bolsas algodonosas o trazas granulares a pH ácido después de un tiempo en reposo. |

Fuente: Clarke, (1977). *Beverage floc and cane sugar*.

## 2.6 LEGISLACIÓN DE AZÚCAR EN COSTA RICA

En Costa Rica, existe la Norma Oficial para el azúcar, decreto N° 17584-MEC. En donde se establecen las características y normas de calidad que deben obedecer los diferentes tipos de azúcar. En esta Norma de 1973, establece que el límite de dextranas para un azúcar crudo debe ser menor a 250 uma o 400 ppm, sin embargo, la ley no establece ningún parámetro en el contenido de almidón ni tampoco establece el alcance para el azúcar blanca de plantación.

## 2.7 PARÁMETROS INTERNOS DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR LÍQUIDO EN LAICA

El azúcar líquido producido en LAICA, se encuentra controlado bajo las especificaciones de *The Coca Company BP-SP-124 27*, declaradas en junio del 2014 y decisiones tomadas por la gerencia de Calidad. A continuación, se detallan los parámetros máximos de cada análisis realizado al producto terminado.

**Cuadro 4:** Parámetros máximos del azúcar líquido producido en LAICA, Coyoil.

| <b>Análisis</b>                 | <b>Especificación</b>  | <b>Unidad</b>  |
|---------------------------------|------------------------|--|
| <b>Pureza</b>                   | Min. 99.9              | %  |
| <b>Cenizas</b>                  | Max. 0.050             | %  |
| <b>Materia Insoluble</b>        | Max. 7                 | mg/kg  |
| <b>Turbidez</b>                 | Máx. 20                | UI (Unidades Icumsa)                                       |
| <b>Color</b>                    | Máx. 35                | UI   |
| <b>Cloruros (base seca)</b>     | Máx. 180               | mg/kg  |
| <b>pH</b>                       | Rango 5.0 – 8.6        | n/a  |
| <b>°Brix</b>                    | Rango 66.5-67.5        | %  |
| <b>Potencial floc (10 días)</b> | sin formación de Floc. | Expresión de resultado en números del 0 al 4. <sup>1</sup> |
| <b>Floc alcohólico</b>          | Máximo 110             | Absorbancia  |
| <b>Hongos y levaduras</b>       | <10                    | UFC/10g  |
| <b>Recuento total aerobio</b>   | <200                   | UFC/10g  |

**Fuente:** Elaboración propia, tomado del machote de elaboración de certificados de despacho de azúcar líquido producido en LAICA.

<sup>1</sup> en donde:

0: Negativo, completa ausencia de partículas. También puede considerarse turbio pero sin partículas visibles.

1: Preciso, partículas muy pequeñas pero visibles a la luz

2: Ligero, partículas que se reunieron para formar pequeñas partículas algodonosas.

3: Medio, partículas de tamaño aproximadamente de 0,8 mm

4: Fuerte, aglomerado de partículas coloidales visibles a la luz, tamaño aproximado de 3 mm.

## 2.8 PARÁMETROS INTERNOS DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN EN LAICA

Se muestra en el Cuadro 5, los parámetros máximos de calidad de la azúcar blanca estipulados en la ficha técnica B-01, versión 2, estipulada por LAICA para el recibo del azúcar en periodo de zafra de todos los ingenios azucareros del país.

**Cuadro 5:** Parámetros máximos en azúcar blanca estipulados en LAICA, El Coyol.

| Parámetro         | Especificación máxima | Unidades             |
|-------------------|-----------------------|----------------------|
| Polarización      | 99,5                  | Z°                   |
| Color             | 250                   | Unidades Icumsa (UI) |
| Humedad           | 0,10                  | %                    |
| Cenizas           | 0,030                 | %                    |
| Materia Insoluble | 150                   | mg/kg                |
| Floc Alcohólico   | 0,110                 | absorbancia          |
| Dextranas         | 100                   | mg/kg                |
| Almidón           | 100                   | mg/kg                |

## 2.9 DEXTRANASAS Y ALFA AMILASAS

Hasta el día de hoy, el único método para eliminar las dextranas constituye la aplicación de las dextranasas para provocar una hidrólisis enzimática. Las dextranasas  $\alpha$ -D-1.6-glucano-6-glucanohidrolasa son las encargadas de dicha tarea, ya que actúa rompiendo enlaces  $\alpha$ -1,6, que son los más presentes en el polisacárido y originando moléculas de menor tamaño. Las dextranasas pueden extraerse de diferentes organismos como por ejemplo *Penicillium lilacinum*, *Penicillium funiculosum* y *Chaetomium gracile*. El empleo de dextranasas mejora el costo de producción del azúcar alrededor de 3 dólares por tonelada de caña. (Rodríguez, 2005).

La reducción de almidón en el azúcar se logra a través de la hidrólisis enzimática, en donde se transforman los almidones en compuestos más livianos como los azúcares (Reyna, Robles, Reyes, Mendoza y Romero, 2004). La hidrólisis del almidón se da por una reacción en cadena de pasos múltiples, el cual se realiza en un sistema heterogéneo, en donde la celulosa insoluble se fracciona en la interface sólido-líquido (Salcedo, Galán y Pardo, 2012). Reyna et al. (2004) mencionan que en la hidrólisis de los almidones las enzimas más comunes correspondan a la alfa y beta amilasa y que los azúcares que se producen como glucosa, maltosa y dextrina pueden ser utilizados para otros microorganismos vivientes o ser utilizados en la fabricación por ejemplo de etanol.

## **2.10 DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

Un diseño de experimentos (DOE) es un proceso que plantea los pasos necesarios y orden que se deben seguir para recolectar datos y analizar la información que estudia un problema de investigación, consta de una serie de corridas, las cuales son el número de experimentos con los cuales se trabajarán dispuestas en distintas combinaciones de factores (Fernández, 2020).

El objetivo de un DOE es obtener información que permita comprender de una mejor manera un proceso y así, poder optimizarlo; para poder tomar decisiones que mejoren la calidad. Las variables que serán analizadas, conocidas también como factores son los puntos en los cuales un proceso o sistema puede tener resultados distintos si alguno de estos es modificado (Fernández, 2020).

Un diseño factorial  $2^k$  mediante el programa Minitab comprende una excelente herramienta para determinar las mejores combinaciones de variables tanto para la alfa amilasa como para la dextranasa. La matriz del diseño experimental consta de las variables (o factores) de temperatura, tiempo y pH, con un total de 8 corridas y 1 réplica. Se realiza una estadística cuantitativa de  $2^3$  ya que se trabaja con tres factores los cuales cada uno posee dos niveles a los que trabajar; nivel alto y nivel bajo denominados arbitrariamente. (Fernández, 2020).

En el Anexo 1 se detalla la matriz de diseño factorial de  $2^3$  en donde un factor se denota con letra mayúscula y los niveles alto y bajo con (-) y (+) respectivamente para un diseño de experimentos con una sola réplica (también llamados de un solo bloque). Los signos se trabajan de la siguiente manera: en la primera columna se alternan los signos, comenzando por el -, en la segunda columna, se alternan los signos de dos en dos y en la tercera de cuatro en cuatro. Por otro lado, cuando se trabaja un DOE con tres bloques, se realiza cada corrida por triplicado y los signos se mantienen de igual manera para cada corrida (Fernández, 2020).

El DOE factorial se realiza mediante el cálculo de los efectos principales de cada factor; primeramente, se promedia los niveles (extremos) con los cuales se trabaja el factor A para ambos niveles de B, posteriormente se compara entre ambos para calcular el efecto principal. Esto se realiza con cada uno de los factores, obteniendo también los resultados entre BC, AC y ABC. Estos cálculos se llevan a cabo por medio de la herramienta de Minitab, la cual utiliza un ANOVA para determinar la variabilidad del proceso y clasificarla en varios grupos, desarrollando pruebas con validez estadística y así determinar los efectos que influyen en la respuesta (Tanco, 2008).

### **3. METODOLOGÍA**

Los espacios geográficos donde se trabajó la presente investigación corresponden al laboratorio de control de calidad de LAICA, en el Coyol de Alajuela, Costa Rica y en el Ingenio el Porvenir, Tacaes, Grecia. Entre los periodos de enero a marzo del 2021 y de enero a marzo 2022 se realizaron las pruebas específicas en el laboratorio. El tratamiento enzimático en el ingenio se realizó desde el 31 de marzo al 7 de abril, 2022.

Las determinaciones de dosificación de enzimas en las pruebas laboratoriales se realizaron en meladura, la cual es el producto de la evaporación del jugo de caña, en forma de jarabe, con un brix entre 60 y 65° y un pH alrededor de seis. Para ambas enzimas, se contó con 25 kilogramos para realizar todos los análisis.

#### **3.1 CÁLCULO DE DOSIFICACIÓN DE ALFA AMILASA EN MUESTRAS DE MELADURA**

La muestra de meladura cruda fue otorgada por el ingenio el Porvenir (Tacaes, Grecia, Costa Rica). Tras la información dada por el gerente de Calidad Fernando Bolaños y el jefe de calidad del ingenio, Enrique Bolaños, aproximadamente por cada tonelada de caña molida, se obtienen 250 kg de meladura salida del tercer evaporador. Por cada tonelada de caña según la ficha técnica de la enzima se debe añadir de 1 a 2 g, por lo tanto, para determinar las condiciones óptimas de pH, tiempo y temperatura se añadió 0,005 g de enzima por cada kilogramo de meladura ya que se trabajó con la mínima cantidad descrita en la ficha técnica y de este modo asegurar eficacia con poca cantidad de enzima y no elevar los costos que implican este proceso en el ingenio.

## **3.2 DOSIFICACIÓN DE DEXTRANASA EN MUESTRAS DE MELADURA**

A nivel productivo, no es económicamente factible adicionar la cantidad de dextranasa que indica la ficha técnica (Protech, 2018), ya que esta última señala que se debe añadir enzima proporcionalmente a la cantidad inicial de dextranas en jugo y/o meladura para así poder eliminar por medio de hidrólisis un considerable porcentaje de las dextranas. Es por esta razón que a nivel laboratorio se trató la meladura con la misma cantidad de enzima dextranasa como se dosificó la amilasa.

## **3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EFICACES DE POTENCIAL DE HIDRÓGENO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA Y DEXTRANASA**

### **3.3.1 PRUEBAS RELACIONADAS CON LA TEMPERATURA PARA LA ALFA-AMILASA**

A la meladura se le determinó la cantidad de almidón inicial presentes por medio del método ICUMSA Draft n°3 del 2007. Se realizó un control a temperatura ambiente (alrededor de los 25 °C) y pruebas de adición a las siguientes temperaturas: 50, 55, 60, 65, 70 y 75 °C de la siguiente manera: A 1 kg de meladura se añadió por medio de una balanza analítica 0,005 g de enzima alfa amilasa, se homogenizó, se dividió en *beakers* de 250 mL y se colocaron por 20 minutos en baño maría a la temperatura de prueba correspondiente. Luego de esto se llevó a ebullición la muestra para desnaturalizar la proteína y se procedió a cuantificar el almidón residual en cada determinación por medio del método *ICUMSA draft Method No. 3* (2007).

### **3.3.2 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL PH PARA LA ALFA-AMILASA**

Se cuantificó la cantidad de almidón inicial presente en muestra de meladura. Seguidamente, en 4 *beakers* de 1 L, se pesó 500 g de meladura y se reguló el pH de para obtener muestras de pH de 3, 5, 7 y 10 con ácido clorhídrico (15 mL en 20

de agua) y NaOH (5 g en 20 mL de agua destilada). Luego de esto, se añadió a cada muestra 0,005 g de alfa amilasa, se colocaron en baño maría a 65°C y se procedió a cuantificar el almidón residual.

### **3.3.3 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS PARA LA ALFA-AMILASA**

Se cuantificó la cantidad de almidón inicial presentes en la meladura. En 1,5 kilogramos de meladura se le añadió 0,015 g de enzima alfa amilasa. Se separaron cantidades en igual proporción de 250 mL *en beakers* de vidrio y seguidamente se colocaron en un baño maría a 65°C. Las muestras se fueron extrayendo en el siguiente orden: a los 10, 20, 30, 60 y 90 minutos respectivamente. Luego de esto se enfriaron las muestras y se procedió a cuantificar el almidón residual.

### **3.3.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

Mediante una serie de corridas aleatorias, ordenados por bloques, se dispuso a realizar dos diseños de experimentos factoriales para cada enzima por medio del programa Minitab. Tomando como factores la temperatura, el pH y el tiempo de hidrólisis.

Para el diseño de experimentos de la alfa amilasa se trabajó con los extremos de las variables: pH: de 4 a 9, tiempo de 10 a 40 minutos y temperatura de 55 a 70 °C. Para la dextranasa se trabajó con rangos de pH de 5 a 8, tiempo de 30 a 120 minutos y a una temperatura de 55 a 75°C.

Se tomó en cuenta para la propuesta experimental, los Anexos 1 para la alfa amilasa y el Anexo para la dextranasa. Para el DOE de la alfa amilasa se utilizó el diseño 2<sup>3</sup> factorial sin réplica, mientras que para la dextranasa se utilizó el diseño 2<sup>3</sup> factorial con tres réplicas (bloques).



### **3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.4.1 DETERMINACIÓN DE DEXTRANAS EN AZÚCARES, MELADURA Y JUGOS MEDIANTE UN MÉTODO MODIFICADO DE TURBIDEZ EN ALCOHOL.**

El método utilizado para la cuantificación de dextranas consiste en el método ICUMSA, en donde se determinaron las dextranas en meladura y azúcar blanca por método turbimétrico en donde su principio fisicoquímico se basa en la poca solubilidad de las dextranas en la solución hidro-etanólica y medición en espectrofotómetro a 720 nm de la turbidez que se ha producido en la muestra (Método GS 1/2/9-15, 2011). La curva de calibración se elaboró a partir de un estándar de dextranas extraído de *Leuconostoc mesenteroides* de peso molecular de 150 000 Dalton (Da).

Por otro lado, la cuantificación de dextranas en jugo mixto se llevó a cabo bajo el ensayo GS8-19 (2007) con el mismo principio fisicoquímico, sin embargo, la única diferencia del método GS 1/2/9-15, 2011 es que la curva de calibración de trabajo se elabora a partir de jugo mixto filtrado.

#### **3.4.2. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN MUESTRAS DE AZÚCAR BLANCA, MELADURA Y JUGO MIXTO.**

La determinación de almidón en meladura, azúcar blanca y jugo se realizó por el método Draft n°3 (2007) de ICUMSA ya que dicho método abarca todas las matrices mencionadas anteriormente. Se llevan a cabo por una curva de calibración en partes por millón de almidón grado reactivo de papa, del fabricante Sigma Aldrich. El principio fisicoquímico del método se basa en la reacción del almidón en un medio ácido con una solución de yodo-yodato, dando como resultado un complejo color azulado, el cual es medido a una longitud de onda de 570 nm usando espectrofotometría de ultravioleta visible.

- **Expresión de resultados:** La concentración de almidón de la solución bajo análisis se estimó con base en la regresión lineal de la curva de calibración y multiplicando por el factor de dilución según el tipo de muestra.

### **3.4.3. MÉTODO DE POTENCIAL FLOC Y FLOC DE 10 DÍAS.**

El método del potencial floc alcohólico se basó en el método IT-MN-2.2.6 Potencial Floc, Compañía FEMSA. Los resultados del potencial floc se obtienen directamente del resultado de la absorbancia, mientras que el método del floc de 10 días se basó en el Procedimiento N°23 ICUMSA, 2002, también llamado test Coca-Cola de 10 días, aceptado por ICUMSA, en este último, se realiza una solución de la azúcar blanca a un °Brix de alrededor del 54°, se acidifica con ácido fosfórico y se realizan observaciones a los 3,7 y 10 días.

### **3.4.4. MÉTODO DE TURBIDEZ EN AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN**

La turbidez del producto final se determinó por medio del método ICUMSA GS2/ 3-18 (2007). En donde la turbidez se cuantificó mediante la resta del resultado del color sin filtrar menos el resultado del color filtrado a una longitud de onda de 420 nm.

## **3.5. ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO EN EL INGENIO EL PORVENIR, TACARES, GRECIA.**

Se adicionaron alrededor de 19 kg de cada enzima en total en lotes de producción del ingenio El Porvenir señalados en el Cuadro 6.

Los lotes de cualquier tipo de azúcar en Costa Rica en los ingenios se encuentran conformados de la siguiente manera: año (22), fecha juliana (91), código del ingenio (en este caso El Porvenir corresponde al 04), tipo de azúcar (0002 para

azúcar blanca en presentación de *big bag* lo cual equivale a una tonelada) y por último el consecutivo (00195).

**Cuadro 6:** Lotes tratados enzimáticamente y fecha de su respectiva producción.

| <b>Lote</b>      | <b>Día Juliano</b> | <b>Fecha de producción</b> |
|------------------|--------------------|----------------------------|
| 2291040000200195 | 91                 | 1/04/2022                  |
| 2291040000200196 |                    |                            |
| 2292040000200197 | 92                 | 2/04/2022                  |
| 2294040000200198 | 94                 | 4/04/2022                  |
| 2294040000200199 |                    |                            |
| 2295040000200200 | 95                 | 5/04/2022                  |
| 2295040000200201 |                    |                            |
| 2295040000200202 |                    |                            |
| 2295040000200203 |                    |                            |
| 2296040000200204 | 96                 | 6/04/2022                  |
| 2296040000200205 |                    |                            |
| 2296040000200206 |                    |                            |
| 2297040000200207 | 97                 | 7/04/2022                  |
| 2297040000200208 |                    |                            |
| 2297040000200209 |                    |                            |

Se trabajó ambas enzimas a una concentración de cinco partes por millón. La enzima alfa amilasa se dosificó en un flujo de 1,45 L/ h y la dextranasa a un flujo de 1,8 L/ h, los datos para realizar los cálculos de preparación de las enzimas por día se contemplan en el Cuadro 7.

**Cuadro 7:** Datos para el cálculo de peso de cada enzima para dosificar 5 ppm.

| <b>Puntos para tomar en cuenta</b>                             | <b>Dato</b>   |
|--|---------------|
| Caña molida al día   | 650 toneladas |
| Porcentaje de trabajo de la bomba dosificadora de dextranasa   | 30 %          |
| Equivalente del 30 % de la dosificación de la bomba            | 1,8 L/h       |
| Porcentaje de trabajo de la bomba dosificadora de alfa amilasa | 20 %          |
| Equivalente del 20 % de la dosificación de la bomba            | 1,45 (L/h)    |

Ver cálculo de las cantidades de enzima dextranasa, alfa amilasa y agua por utilizar por día en Anexos 3 y 4. Antes de proceder con la aplicación se aseguró de que el flujo en ambas bombas fuese el correcto con ayuda de una probeta de 100 mL y cronómetro de 1 minuto.

En la azúcar blanca de plantación (producto final) se procedió a cuantificar los polisacáridos, problema por medio de los métodos antes descritos, además de determinar el potencial floc ácido de 10 días, potencial floc alcohólico y turbidez.

## 4. RESULTADOS

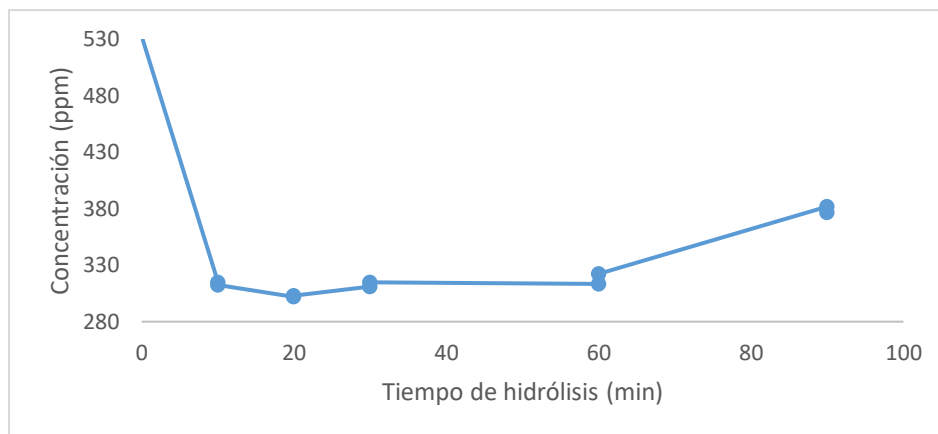
### 4.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EFICACES DE POTENCIAL DE HIDRÓGENO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA Y DEXTRANASA

#### 4.1.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA ALFA AMILASA

La concentración inicial de almidón en la meladura para determinar el tiempo óptimo de reacción resultó ser de 533 ppm. Se aprecia en la Figura 13 y Cuadro 8, cómo a los 10 minutos de reacción, se mantiene la concentración entre 302,6 a 318 y una concentración mínima a los 20 minutos.

**Cuadro 8:** Resultado del almidón residual según el tiempo de reacción a 65 °C. Según el método Draft N°3 de ICUMSA.

| Tiempo (min) | Concentración promedio (ppm) |
|--------------|------------------------------|
| 0            | 533                          |
| 10           | 313                          |
| 20           | 303                          |
| 30           | 313                          |
| 60           | 318                          |
| 90           | 379                          |



**Figura 13:** Relación entre la concentración de almidón y el tiempo de reacción de la alfa amilasa a 65°C en muestras de meladura cruda. Elaboración propia.

#### 4.1.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA ALFA AMILASA

Al realizarse las pruebas sobre la temperatura, se observa cómo a una temperatura ambiente la hidrólisis sí se lleva a cabo, sin embargo, la hidrólisis incrementa a medida que la temperatura es aumentada. Según el Cuadro 9

**Cuadro 9:** Resultados de la determinación residual de almidón en partes por millón tras pruebas de temperatura para la alfa amilasa. Concentración inicial de almidón en meladura de 533 ppm

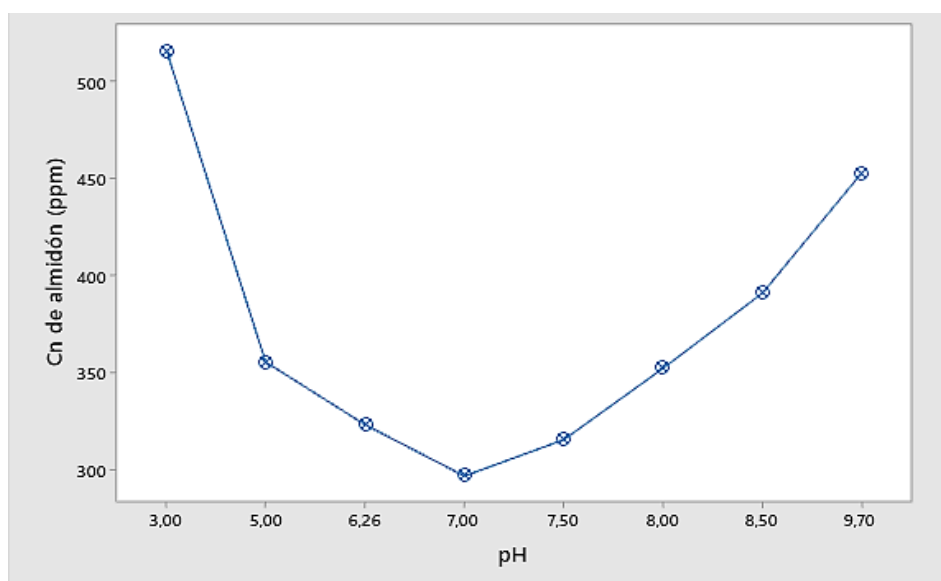
| Temperatura (°C) | Concentración promedio de almidón (ppm) |
|------------------|---|
| 25               | 441                                     |
| 50               | 337                                     |
| 55               | 312                                     |
| 60               | 349                                     |
| 65               | 355                                     |
| 70               | 335                                     |
| 75               | 397                                     |

#### 4.1.3 DETERMINACIÓN DEL PH EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA ALFA AMILASA

Las muestras de meladura que se trataron con un rango de pH desde 3 hasta 9,74, presentaron grados Brix fluctuados gracias a la adición de NaOH o HCl utilizados para regular el pH de la muestra, se observa en el Cuadro 10 cómo a un pH alrededor de su pH normal sin adición de base o ácido de 6,26 y alrededor de pH 7 la concentración de almidón entre °Brix resultó menor (ver Figura 14).

**Cuadro 10:** Datos de las pruebas realizadas en la determinación del pH ideal en muestras de meladura cruda para la enzima alfa amilasa.

| pH muestras de meladura | Cn de almidón promedio (ppm) | °Brix final | Cn de almidón (ppm/°Brix) |
|-------------------------|------------------------------|-------------|---------------------------|
| 3,00                    | 543                          | 59,2        | 9,2                       |
| 5,00                    | 356                          | 60,7        | 5,9                       |
| 6,26                    | 323                          | 61,4        | 5,3                       |
| 7,00                    | 297                          | 60,9        | 4,9                       |
| 7,50                    | 315                          | 62,0        | 5,1                       |
| 8,00                    | 352                          | 62,0        | 5,7                       |
| 8,50                    | 391                          | 61,7        | 6,3                       |
| 9,74                    | 453                          | 59,4        | 7,6                       |



**Figura 14:** Almidón residual en muestras de meladura tras adición de alfa amilasa a diferente pH, a una temperatura de 65°C y un tiempo de reacción de 20 minutos. Elaboración propia

#### 4.1.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE LA ALFA AMILASA

Como se observa en el Cuadro 11, los resultados más bajos de almidón en meladura con las diferentes combinaciones son los señalados en negrita. Se realiza el diseño de experimentos (DOE) de un solo bloque, o sea, que solamente se realiza una réplica por cada combinación de variables, se trabajó con la temperatura, tiempo y pH en los extremos, exceptuando el orden de corrida 5, el cual corresponde al promedio de cada factor.

**Cuadro 11:** Diseño de experimentos factorial de un bloque pertenecientes a la enzima alfa amilasa. Datos resaltados en negrita equivalen a las combinaciones en donde se obtuvieron resultados más bajos en almidón en ppm.

| Condiciones experimentales | Tiempo (min) | Temperatura (°C) | pH         | Almidón residual (ppm) |
|----------------------------|--------------|------------------|------------|------------------------|
| 1                          | 40           | 55,0             | 9,0        | 149                    |
| 2                          | 40           | 55,0             | 4,0        | 139                    |
| 3                          | <b>40</b>    | <b>70,0</b>      | <b>4,0</b> | <b>95</b>              |
| 4                          | 10           | 55,0             | 9,0        | 153                    |
| 5                          | <b>25</b>    | <b>62,5</b>      | <b>6,5</b> | <b>119</b>             |
| 6                          | 10           | 55,0             | 4,0        | 149                    |
| 7                          | 40           | 70,0             | 9,0        | 149                    |
| 8                          | 10           | 70,0             | 9,0        | 129                    |
| 9                          | 10           | 70,0             | 4,0        | 138                    |



#### 4.1.5 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO, TEMPERATURA Y PH EFICAZ DE HIDRÓLISIS EN LA DEXTRANASA POR MEDIO DE UN DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Una vez realizada la curva de calibración de dextranas en partes por millón, se obtuvo la ecuación que permite despejar la concentración de dextranas en la meladura. Se observa en la ecuación 1, una regresión alusiva a una curva de calibración exponencial (consultar Anexo 6) ya que es la regresión que mejor se le ajustó.

**Ecuación 1:** Ecuación obtenida de la regresión para el cálculo de la concentración de dextranas.

$$y = 0,005092 + 0,000245x + 0,000001x^2$$

Donde:

**y:** es absorbancia de la muestra

**x:** corresponde a la concentración que se debe despejar.

Dado que corresponde a una ecuación cuadrática, se obtiene la variable relacionada con la concentración (x) mediante la Ecuación 2

**Ecuación 2:** Ecuación para el despeje de la concentración de dextranas en ppm

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

En donde, según la ecuación 1:

**a:** 0,000001

**b:** 0,000245

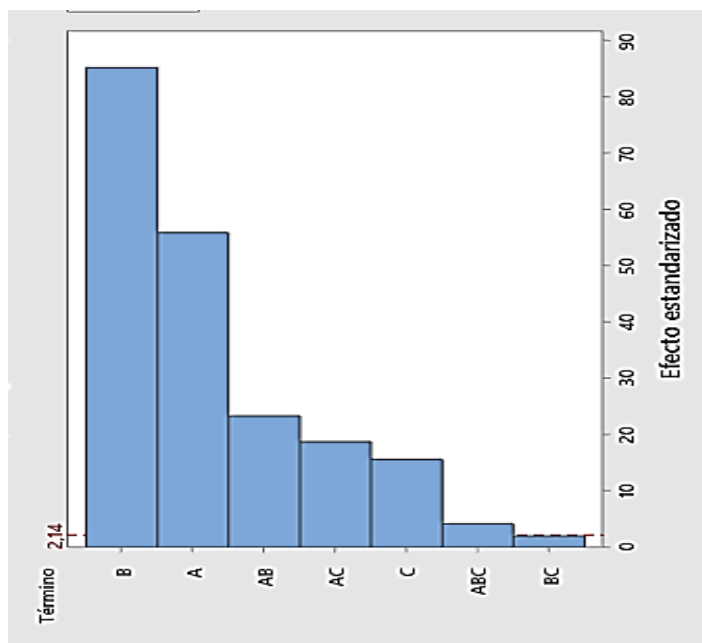
**c:** 0,005092

Un DOE diseñado con los factores de tiempo, pH y temperatura para la dextranasa, mostró un buen resultado con las órdenes de corrida 2, 9 y 16 señalados en negrita. Se observa en el Cuadro 12, cómo esas combinaciones tienen como puntos en común un pH ácido y una temperatura en el extremo inferior de 55 °C.

**Cuadro 12:** Diseño de experimentos factorial de tres bloques de la enzima dextranasa. Datos resaltados en negrita equivalen a las combinaciones de variables que brindaron menores resultados de dextranas en partes por millón.

| Condiciones experimentales | Bloques | Temperatura (°C) | pH       | Tiempo (min) | Dextranas residuales (ppm) |
|----------------------------|---------|------------------|----------|--------------|----------------------------|
| 1                          | 1       | 75               | 8        | 120          | 1359                       |
| 2                          | 1       | <b>55</b>        | <b>5</b> | <b>30</b>    | <b>1012</b>                |
| 3                          | 1       | 75               | 8        | 30           | 1345                       |
| 4                          | 1       | 55               | 8        | 30           | 1321                       |
| 5                          | 1       | 55               | 5        | 120          | 940                        |
| 6                          | 1       | 55               | 8        | 120          | 1211                       |
| 7                          | 1       | 75               | 5        | 30           | 1196                       |
| 8                          | 1       | 75               | 5        | 120          | 1182                       |
| 9                          | 3       | <b>55</b>        | <b>5</b> | <b>120</b>   | <b>938</b>                 |
| 10                         | 3       | 75               | 8        | 120          | 1361                       |
| 11                         | 3       | 55               | 8        | 30           | 1321                       |
| 12                         | 3       | 75               | 5        | 120          | 1193                       |
| 13                         | 3       | 55               | 8        | 120          | 1212                       |
| 14                         | 3       | 75               | 5        | 30           | 1168                       |
| 15                         | 3       | 75               | 8        | 30           | 1346                       |
| 16                         | 3       | <b>55</b>        | <b>5</b> | <b>30</b>    | <b>1015</b>                |
| 17                         | 2       | 55               | 5        | 30           | 1015                       |
| 18                         | 2       | 75               | 8        | 120          | 1359                       |
| 19                         | 2       | 55               | 8        | 120          | 1211                       |
| 20                         | 2       | 75               | 5        | 30           | 1196                       |
| 21                         | 2       | 75               | 5        | 120          | 1191                       |
| 22                         | 2       | 55               | 8        | 30           | 1318                       |
| 23                         | 2       | 55               | 5        | 120          | 938                        |
| 24                         | 2       | 75               | 8        | 30           | 1345                       |

En la Figura 15, la cual fue obtenida seguidamente de la elaboración del DOE, se aprecia una gráfica de barras donde se ilustran las variables de temperatura (A), pH (B) y tiempo (C).



**Figura 15:** Influencia de los factores A, B y C en la adición de la dextranasa. Meladura como analito. Fuente: propia.

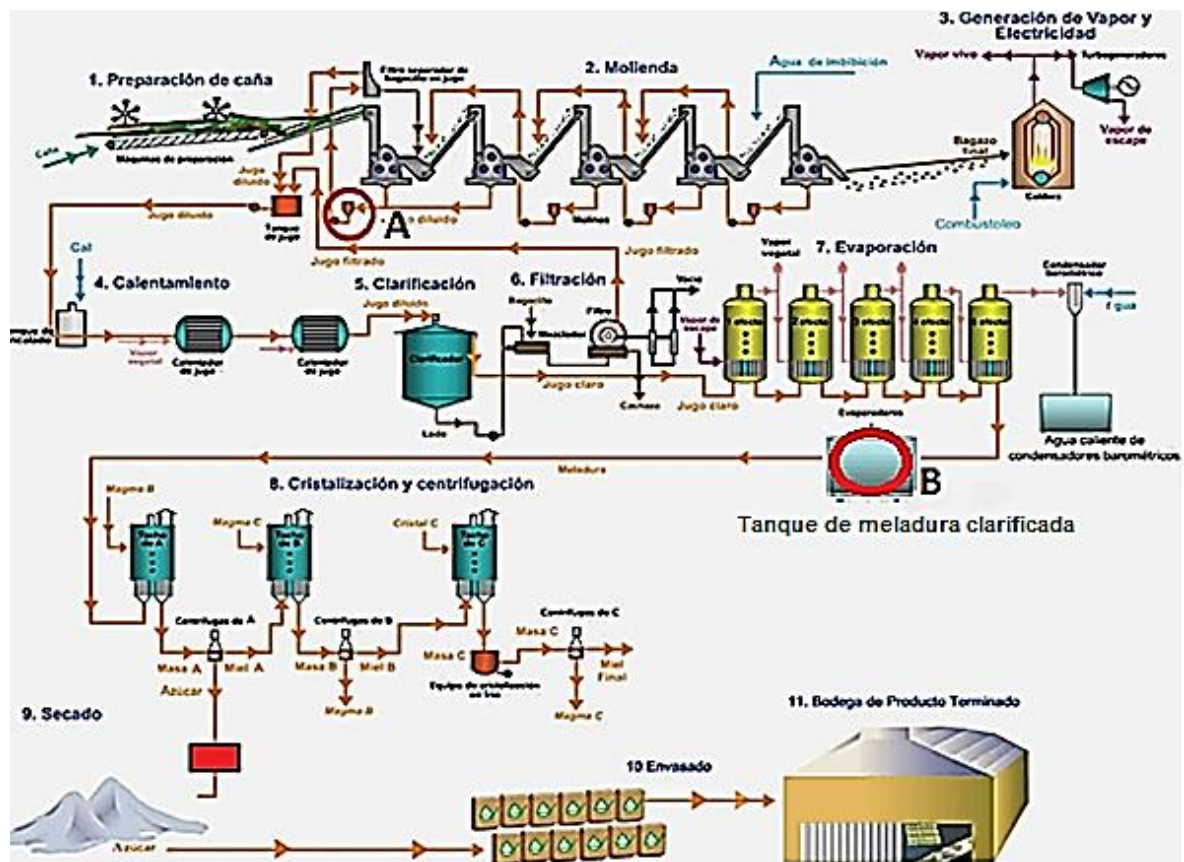
#### 4.2 ETAPAS DE ADICIÓN DE LAS ENZIMAS ALFA AMILASA Y DEXTRANASA EN EL INGENIO EL PORVENIR, GRECIA.

Una vez encontradas las condiciones de pH, tiempo y temperatura para ambas enzimas, los puntos donde fueron adicionadas ambas enzimas se encuentran señalados en la Figura 16. El punto A el cual hace referencia al jugo mixto después de ser extraído de los molinos fue el punto de adición de la enzima alfa amilasa, mientras que en el punto B, el cual se ubica en el tanque de meladura clarificada, se añadió la dextranasa.

Las concentraciones iniciales de almidón y dextranas en jugo mixto y meladura anterior al tratamiento enzimático en el ingenio fueron determinados. Una

vez que se procedió con la aplicación de ambas enzimas el día 30/03/2022 a las 1:00 pm, se estipuló un muestreo de meladura cada tres horas (7 am-10 am-1 pm-4 pm) por 3 días.

El muestreo de la meladura se realizó 30 minutos luego de que la dextranasa fue añadida, en el sitio en cascada (ver Anexo 18), esta meladura contiene tanto alfa amilasa como dextranasa. Este muestro cada tres horas se realizó para monitorear las concentraciones de almidón y dextranas, mientras que el jugo mixto fue extraído diariamente para determinar la variación de polisacáridos problema en la materia prima.



**Figura 16:** Puntos en el proceso productivo en donde fueron adicionadas la alfa amilasa y dextranasa. Fuente: Ortega, K, Manyoma. J. P (2013). *Implementación de un Sistema de Auditoría Ambiental en el Proceso de Producción del Azúcar en el Ingenio Carmelita.*

### 4.3 RESULTADOS DE ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN MELADURA Y JUGO MIXTO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO DE AZÚCAR BLANCA EN EL INGENIO EL PORVENIR.

En el Cuadro 13 se detallan los datos iniciales de almidón y/o dextranas de cada muestreo de meladura. Se aprecia variabilidad en los resultados con respecto a los días de muestreo.

**Cuadro 13:** Datos de almidón y dextranas en meladura en partes por millón de diferentes fechas de recolección en el Ingenio El Porvenir, Tacares, Grecia.

| <b>Fecha de recolección</b> | <b>Almidón (ppm)</b> | <b>Dextranas (ppm)</b> |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|
| 19/01/2021                  | 480                  | No determinado         |
| 26/01/2021                  | 533                  | No determinado         |
| 02/02/2021                  | 448                  | No determinado         |
| 18/03/2021                  | 428                  | 547                    |
| 11/01/2022                  | No determinado       | 1361                   |
| 30/03/2022                  | 658                  | 295                    |
| <b>Promedio</b>             | 525                  | 735                    |

Los resultados de los muestreos diarios de jugo mixto se detallan en el Cuadro 14. Los resultados de las dextranas son proporcionados por la ecuación extraída de la curva de calibración de dextranas en jugo (consultar Anexo 7)

**Cuadro 14:** Resultados de los muestreos diarios de la materia prima (jugo mixto) para la elaboración de azúcar blanca de plantación.

| <b>Fecha</b> | <b>Hora</b> | <b>Promedio de almidón (ppm)</b> | <b>Promedio de dextranas (ppm)</b> |
|--------------|-------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 30/3/2022    | 12:00 p. m. | 164                              | 95                                 |
| 31/3/2022    | 7:00 a. m.  | 40                               | 0                                  |
| 1/4/2022     | 10:00 a. m. | 143                              | 0                                  |
| 4/4/2022     | 7:00 a. m.  | 73                               | 0                                  |

Se muestran resultados promedio de almidón y dextranas en meladura en los muestreos diarios cada tres horas en el sitio en “cascada” en el cuadro 15. Se observa mucha variabilidad de los polisacáridos en cuestión en cada muestreo.

**Cuadro 15:** Promedio de almidón y dextranas en partes por millón de los muestreos de meladura con tratamiento, realizadas cada tres horas en el ingenio El Porvenir.

| <b>Fecha</b> | <b>Hora</b> | <b>Almidón (ppm)</b> | <b>Dextranas (ppm)</b> |
|--------------|-------------|----------------------|------------------------|
| 31/03/2022   | 7:00 a. m.  | 66                   | 505                    |
|              | 10:00 a. m. | 48                   | 493                    |
|              | 1:00 p. m.  | 71                   | 252                    |
|              | 4:00 p. m.  | 102                  | 599                    |
| 01/04/2022   | 10:00 a. m. | 24                   | 224                    |
|              | 1:00 p. m.  | 45                   | 654                    |
|              |             |                      |                        |

|            |             |     |     |
|------------|-------------|-----|-----|
|            | 4:00 p. m.  | 57  | 391 |
| 04/04/2022 | 7:00 a. m.  | 244 | 603 |
|            | 10:00 a. m. | 86  | 352 |
|            | 1:00 p. m.  | 50  | 426 |
|            | 4:00 p. m.  | 120 | 310 |

#### 4.4 RESULTADOS EN EL AZÚCAR BLANCA DE PLANTACIÓN (PRODUCTO TERMINADO) TRAS LA ADICIÓN ENZIMÁTICA DE ALFA AMILASA Y DEXTRANASA.

##### 4.4.1 RESULTADOS DE ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN PRODUCTO TERMINADO

El promedio de almidón en ppm en el producto terminado se muestra en el Cuadro 16, los lotes señalados en negrita corresponden a los lotes sin tratamiento enzimático, elaborados después del 7 de abril, 2022. El promedio de los resultados es basado en tres réplicas por lote, obtenidas de las respectivas absorbancias.

Además, el promedio global de almidón en los lotes tratados con alfa amilasa corresponde a 67 ppm.

**Cuadro 16:** Resultados de almidón en ppm en los lotes de producción del ingenio el Porvenir con tratamiento enzimático y últimos 4 lotes sin tratamiento.

| <b>Lote</b>        | <b>Promedio Almidón(ppm)</b> | <b>Desviación estándar (ppm)</b> |
|--------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 212291040000200195 | 94                           | 1,2                              |
|                    |                              | 0,0                              |

|                    |            |     |
|--------------------|------------|-----|
| 212291040000200196 | 85         |     |
| 212292040000200197 | 88         | 1,2 |
| 212294040000200198 | 69         | 1,5 |
| 212294040000200199 | 65         | 1,0 |
| 212294040000200200 | 87         | 0,0 |
| 212295040000200201 | 56         | 0,6 |
| 212295040000200203 | 66         | 1,7 |
| 212296040000200204 | 48         | 4,5 |
| 212296040000200205 | 68         | 1,0 |
| 212296040000200206 | 70         | 2,1 |
| 212297040000200207 | 44         | 1,0 |
| 212297040000200208 | 44         | 1,2 |
| 212297040000200209 | 48         | 1,2 |
| 212298040000200210 | <b>278</b> | 0,6 |
| 212298040000200211 | <b>302</b> | 2,3 |
| 212299040000200212 | <b>326</b> | 4,0 |

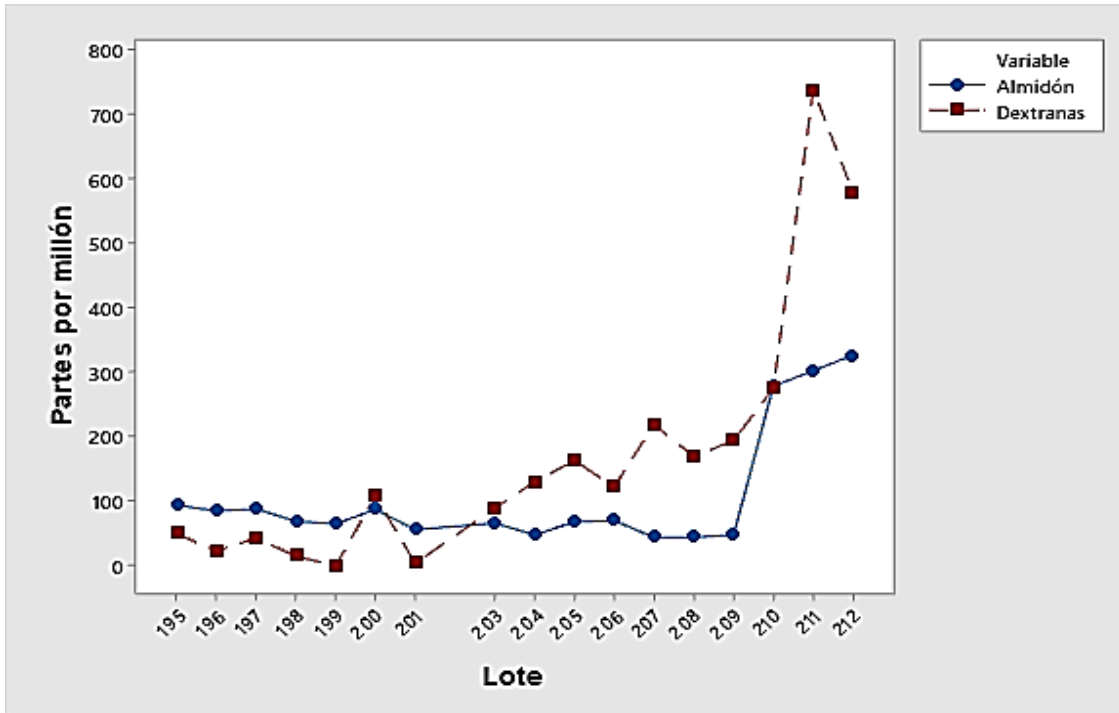
Utilizando el método GS 1/2/9-15 (2011), se logra obtener un promedio de dextranas en ppm por lote de azúcar blanca según las absorbancias obtenidas. Los resultados se aprecian en el Cuadro 17. El promedio global de dextranas de todos los lotes de azúcar blanca tratados corresponde a 95 ppm

**Cuadro 17:** Promedio de dextranas en partes por millón en el azúcar blanca de plantación con tratamiento enzimático y últimos 3 lotes sin tratamiento (señalados en negrita).



| Lote               | Promedio dextranas (ppm) | Desviación estándar (ppm) |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| 212291040000200195 | 50                       | 0,0                       |
| 212291040000200196 | 23                       | 2,0                       |
| 212292040000200197 | 43                       | 1,7                       |
| 212294040000200198 | 15                       | 0,0                       |
| 212294040000200199 | 0                        | 0,0                       |
| 212294040000200200 | 108                      | 3,3                       |
| 212295040000200201 | 4                        | 0,0                       |
| 212295040000200203 | 89                       | 0,0                       |
| 212296040000200204 | 130                      | 0,0                       |
| 212296040000200205 | 163                      | 2,0                       |
| 212296040000200206 | 122                      | 1,2                       |
| 212297040000200207 | 219                      | 1,5                       |
| 212297040000200208 | 169                      | 1,0                       |
| 212297040000200209 | 194                      | 0,9                       |
| 212298040000200210 | <b>275</b>               | 5,5                       |
| 212298040000200211 | <b>737</b>               | 0,9                       |
| 212299040000200212 | <b>578</b>               | 0,8                       |

La Figura 17 muestra un gráfico en donde se observa el comportamiento en partes por millón del almidón en color azul y de dextranas en color rojo de los lotes de azúcar blanca de plantación. Los últimos tres lotes que muestran un comportamiento ascendente corresponden a lotes sin ningún tratamiento enzimático.



**Figura 17:** Gráfica de dispersión de almidón y dextranas con respecto a los lotes de producción de azúcar blanca. Fuente propia.

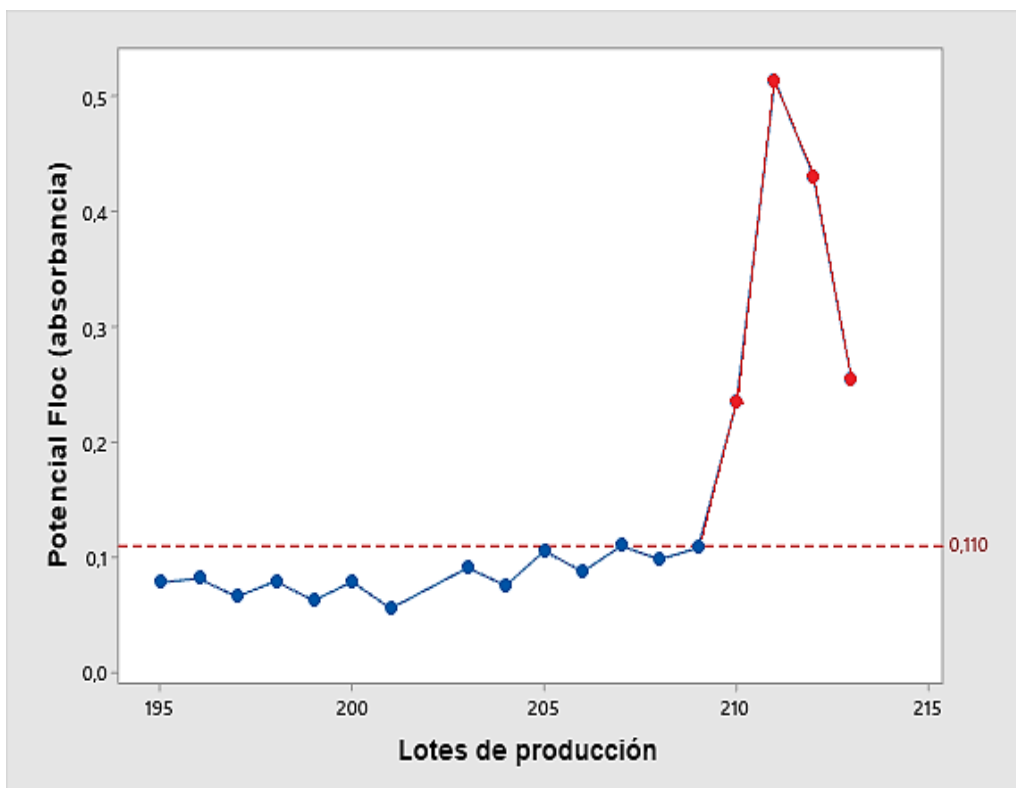
Se observaron los granos de todos los lotes de azúcar blanca por medio de un microscopio, todos los granos observados presentaron amorfismo del cristal ya que se detallaban de forma elongada. En la Figura 18 se aprecia una imagen comparativa entre cristales producidos por otro ingenio azucarero costarricense que poseen forma cuadrada caracterizados como la forma normal del cristal (lado izquierdo) y del lado derecho se observa el lote consecutivo 199 del Ingenio El Porvenir el cual presentó 0 ppm de dextranas.



**Figura 18:** Imagen comparativa de granos de azúcar en forma normal (cuadrada) producidos por un ingenio azucarero costarricense y los granos de azúcar del lote consecutivo 199 del ingenio El Porvenir tratado enzimáticamente donde se puede observar elongación del cristal. Fuente: propia.

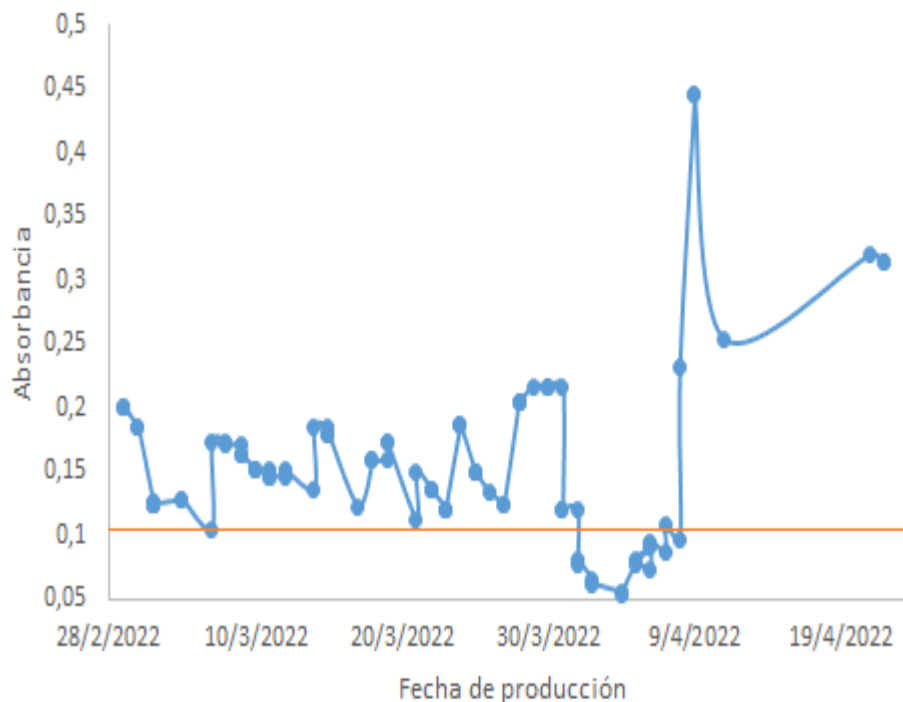
#### **4.4.2 RESULTADOS DE FLOC ALCOHÓLICO Y FLOC DE 10 DÍAS EN PRODUCTO TERMINADO**

Tras la medición del floc alcohólico mediante el método IT-MN-2.2.6 de FEMSA, se logra obtener el promedio de los resultados tras tres réplicas de cada lote (ver Anexo 8). Los resultados se reportaron en absorbancias, ya que este es el dato final del floc alcohólico. En la Figura 19 se observa el comportamiento del potencial floc de los lotes con tratamiento (color azul) y los lotes sin tratamiento en color rojo.



**Figura 19:** Potencial floc de los lotes tratados enzimáticamente y lotes sin tratamiento. Fuente propia

En la Figura 20 se muestra un gráfico con los resultados del potencial floc del Ingenio El Porvenir, desde febrero del 2022 hasta abril del 2022, los cuales se realizaron como control anual en la zafra correspondiente 2021-2022. Los resultados abajo del límite superior en la finalización de marzo, 2022 y principios del mes de abril corresponden a los resultados del potencial floc de la azúcar blanca de plantación, la cual fue elaborada con adición enzimática en el Ingenio.



**Figura 20:** Resultados del potencial floc del Ingenio el Porvenir, Tacaes, Grecia, desde febrero, 2022 hasta abril, 2022. Realizados en el laboratorio Central de LAICA, Coyoil de Alajuela.

El Cuadro 18 muestra los resultados de las observaciones en los días 3, 7 y 10 con respecto a la formación de flóculos, a una solución de 54° Brix, acidificada hasta un pH de 1,5 con ácido fosfórico. (Consultar apartado 2.7 acerca de la expresión de resultados del potencial floc de 10 días para la producción de azúcar líquido)

**Cuadro 18:** Observaciones en días del floc de 10 días de los lotes tratados enzimáticamente y últimos 3 lotes sin tratamiento.

| <b>Lote</b>      | <b>Día 3</b>                 | <b>Día 7</b> | <b>Día 10</b> |
|------------------|------------------------------|--------------|---------------|
|                  | <b>Formación de flóculos</b> |              |               |
| 2291040000200195 | 0                            | 0            | 0             |
| 2291040000200196 | 0                            | 0            | 0             |
| 2292040000200197 | 0                            | 0            | 0             |
| 2294040000200198 | 0                            | 0            | 0             |
| 2294040000200199 | 0                            | 1            | 1             |
| 2294040000200200 | 0                            | 1            | 1             |
| 2295040000200201 | 0                            | 1            | 1             |
| 2295040000200203 | 0                            | 1            | 1             |
| 2296040000200204 | 0                            | 1            | 2             |
| 2296040000200205 | 0                            | 1            | 1             |
| 2296040000200206 | 0                            | 1            | 2             |
| 2297040000200207 | 0                            | 1            | 1             |
| 2297040000200208 | 0                            | 1            | 1             |
| 2297040000200209 | 0                            | 1            | 1             |
| 2298040000200210 | 0                            | 1            | 1             |
| 2298040000200211 | 0                            | 0            | 1             |
| 2299040000200212 | 0                            | 1            | 1             |

#### **4.4.1 RESULTADOS DE TURBIDEZ EN PRODUCTO TERMINADO**

La turbidez de la azúcar blanca de plantación con tratamiento se observa en el Cuadro 19, donde los resultados son descritos en Unidades ICUMSA (UI).

**Cuadro 19:** Resultado de turbidez en el producto terminado en los lotes tratados enzimáticamente con alfa amilasa y dextranasa.

| <b>Lote</b>        | <b>Turbidez (UI)</b> |
|--------------------|----------------------|
| 212291040000200195 | 128                  |
| 212291040000200196 | 117                  |
| 212292040000200197 | 107                  |
| 212294040000200198 | 178                  |
| 212294040000200199 | 151                  |
| 212295040000200200 | 152                  |
| 212295040000200201 | 162                  |
| 212295040000200203 | 148                  |
| 212296040000200204 | 100                  |
| 212296040000200205 | 138                  |
| 212296040000200206 | 98                   |
| 212297040000200207 | 96                   |
| 212297040000200208 | 93                   |
| 212297040000200209 | 105                  |
| 212298040000200210 | 114                  |
| 212298040000200211 | 103                  |
| 212299040000200212 | 114                  |

## **5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

### **5.1 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL TIEMPO PARA LA ALFA AMILASA**

Tras realizada la curva de calibración y puesto en marcha el procedimiento de ensayo se logró determinar que la concentración inicial de almidón en una muestra de meladura para esta prueba es de 533 ppm en promedio (ver Cuadro 8)

El tiempo de reacción para la alfa amilasa se mantiene en un rango de 10 a 60 minutos, luego de este tiempo la concentración de almidón tuvo un ascenso de concentración, esto último puede ser debido al aumento del grado Brix debido a la evaporación que fue causada en la muestra tras ser sometida a un incremento de temperatura a baño maría.

Como se aprecia en la Figura 13, la concentración de almidón residual se mantiene constante desde los 10 a los 60 minutos. Sin embargo, para el tiempo de operación en un ingenio azucarero, un lapso de reacción de 10 a 15 minutos sería suficiente para hidrolizar alrededor de un 43 % del almidón presente, según los datos obtenidos entre la diferencia de la concentración de almidón en la meladura sin alfa amilasa y con tratamiento a los 10 minutos.

### **5.2 PRUEBAS RELACIONADAS CON LA TEMPERATURA PARA LA ALFA AMILASA**

Para las pruebas relacionadas con la temperatura, se recolectó una nueva meladura del ingenio el Porvenir. El almidón inicial para esta determinación fue de 553 ppm. Los resultados a diferentes temperaturas tras la adición de la enzima se detallan en el Cuadro 9. En esta investigación, se limitó a trabajar a temperaturas más allá de los 75°C dado que no se contó con un equipo especializado para alcanzar mayores temperaturas.

Las enzimas tendrán mayor o menor reacción según la temperatura a las cuales se someten. Con una baja temperatura hay poca actividad dado que no hay



suficiente energía para que se dé lugar la reacción como se logra observar el resultado a 25 °C en el Cuadro 9. A temperaturas más altas, la reacción catalítica se aumenta ya que existe un aumento de movimiento de las moléculas y esto ocasiona un aumento de colisiones con las enzimas (Timberlake, 2013)

A temperatura ambiente (alrededor de los 25 °C) el cambio de concentración de almidón es pequeño. Es bien conocido que la aplicación enzimática en jugo de caña de azúcar o en meladura debe estar ligada a un incremento de temperatura adecuada para cada enzima (Protech, 2018)

La alfa amilasa con la cual se trabajó es proveniente de *Bacillus licheniformis*, es capaz de soportar temperaturas de hasta 110 °C sin ocasionar desnaturalización. Generalmente, un incremento en la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones químicas y las reacciones enzimáticas poseen el mismo comportamiento. Sin embargo, existe un punto en donde la actividad catalítica es máxima y si se rompe dicha barrera de temperatura provocará la desnaturalización de la enzima (Serrate, 2020). Esto ocurre con la alfa amilasa que no proviene de *Bacillus licheniformis* luego de someter la enzima a una temperatura por encima de los 75 °C.

### **5.3 PRUEBAS RELACIONADAS CON EL PH PARA LA ALFA AMILASA**

Dado que se utilizó HCl o NaOH para lograr al pH deseado en cada muestra, las muestras de meladura se encontraron diluidas por lo tanto se procedió a medir el °Brix final en cada muestra para determinar las partes por millón de almidón entre cada grado Brix. Como se detalla en el Cuadro 10, la concentración de almidón residual más baja se encuentra entre un pH natural de la muestra (6,26) y un pH de 7,5. Se detalla que, según los resultados del cuadro los valores residuales de almidón de la muestra potencial de hidrógeno 5 y 8 se comportaron de una manera muy similar, brindando resultados de 356 y 352 respectivamente.

#### **5.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA ALFA AMILASA**

Una serie de corridas aleatorias tomando en cuenta los rangos de tiempo, temperatura y pH estipulados muestran resultados contemplados en el Cuadro 11, en donde se determinó la cantidad de almidón residual contenido en meladura cruda.

Se trabajaron 9 corridas de 1 bloque con los rangos más altos y bajos de las variables: para observar la mejor combinación posible entre estos y obtener la menor concentración de almidón posible. Tomando en cuenta que la concentración inicial de la muestra en cuestión fue de 428 ppm, las mejores combinaciones de estas variables según los resultados obtenidos son el orden de corrida 3 y orden de corrida 5, en donde se alcanza una baja en la concentración residual de almidón de 95 partes por millón y de 119 partes por millón respectivamente.

#### **5.5 ETAPA DE ADICIÓN DE LA ALFA AMILASA EN EL PROCESO PRODUCTIVO DEL INGENIO EL PORVENIR.**

Como segundo objetivo específico de la investigación, se dispuso encontrar el lugar adecuado en el proceso para la adición de las enzimas que proporcione el tiempo, temperatura y pH más cercanos a las condiciones óptimas encontradas en los resultados. Ya que el proceso productivo azucarero en cada ingenio se encuentra estandarizado, las condiciones de pH en el proceso son difíciles de cambiar. Por ejemplo, se deberían realizar pruebas a gran escala en el ingenio si se desea añadir sustancias que modifiquen el pH en ciertos puntos del proceso con el objetivo de que no existan modificaciones que afecten en sí el producto final.

De este modo el proceso productivo debería ser validado, sin embargo, este paso no se encuentra dentro del alcance del presente trabajo de investigación ya que, como objetivo, se trata de encontrar el o los sitios adecuados de adición enzimática sin afectar o modificar el proceso de fabricación de azúcar en el ingenio azucarero.

Tomando en cuenta el orden de corrida tres del DOE de alfa amilasa; con un pH ácido, un tiempo en el límite superior de 40 minutos y una temperatura también en el límite superior de 70 °C, se decide adicionar la alfa amilasa en el punto A (ver Figura 16). Este sitio de adición corresponde a la salida del jugo mixto del último molino, el cual es transportado por medio de la corriente provocada por el movimiento de los molinos.

Luego de este paso, el jugo pasa a un pequeño tanque de reacción, donde es posible la homogeneización de la enzima con el jugo, para luego pasar a los calentadores, los cuales calientan el jugo progresivamente hasta llegar a 105°C para su posterior clarificación. El pH de adición de la alfa amilasa en el jugo es de aproximadamente 5,0. El tiempo de reacción consta desde que la enzima fue adicionada hasta el paso por los calentadores y por último al clarificador, aproximadamente durante media hora. Sin embargo, la enzima sigue su trayecto desde su adición hasta la última etapa, en otras palabras, pasa por todo el trayecto del proceso productivo.

En el año 2013, se creía que el almidón que entraba al proceso se eliminaba en gran parte tras la clarificación y posterior evaporación gracias a los largos tiempos y la elevada temperatura que ayudaban en la solubilización (Eggleston, Wartelle, Cole, Montes, y Pontif, 2016) Sin embargo, es demostrable que este proceso es dificultoso dado que tanto el tiempo, la temperatura como el grado Brix y la cantidad de almidón tienen influencia en la solubilización en el proceso (Cole et al., 2013).

Dicho esto, el almidón que no fue solubilizado completamente luego de someterse al proceso de clarificación será direccionado hasta la meladura, masas, melazas, azúcar crudo y si fuese el caso hasta al azúcar refinado (Dávila, Figeroa y Cortés, 2019). Esto también puede observarse en los Cuadros 13 y 15 en donde se observa cómo después de añadir la alfa amilasa el día 30 de marzo del 2022 en el jugo se logra reducir gran cantidad de almidón en la meladura según el resultado del muestreo de meladura el día 31 de marzo a las 7 am.

Por las razones anteriormente mencionadas, se decide adicionar la enzima en dicho punto, con el fin de que haya una hidrólisis del almidón temprana y que el almidón no complete su trayectoria a lo largo de todo el proceso, dificultando el cocimiento de las masas, saturando tuberías, incrustándose en los tanques e impregnándose en el producto final.

## **5.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA DEXTRANASA**

Tras realizada la curva de calibración en partes por millón, esta se ajustó al modelo exponencial obteniendo un  $R^2$  ajustado de 99,96 % para luego realizar un diseño de experimentos factorial de tres bloques para encontrar la mejor combinación de variables. No se llevó a cabo determinaciones por separado de las variables dado que el tiempo no fue el suficiente, sin embargo, un diseño de experimentos es suficiente para analizar el máximo número de factores con el mínimo de datos (Díaz, 2009).

En general, es conocido que la obtención de datos experimentales genera un alto costo monetario a nivel industrial, por lo tanto, se ha decidido minimizar costes de tiempo y dinero. Y un plan estratégico equivale a realizar los experimentos bajo dos extremos para cada factor (Fernández, 2020).

De acuerdo con la Figura 15 de los efectos estandarizados, el factor que más afecta en la adición de la dextranasa es la variable del pH. Según el Cuadro 12, ninguna de las combinaciones que contienen un pH de 8 brindaron los valores más bajos de dextranas, por el contrario, cuando se somete la muestra a un pH cercano a 5, la tendencia observada es que el nivel de dextranas descienda. Las combinaciones que mejor se ajustan para obtener una mejor hidrólisis corresponden al orden de corrida número 2, 5 y 16.

## **5.7 ETAPA DE ADICIÓN DE LA DEXTRANASA EN EL PROCESO PRODUCTIVO DEL INGENIO EL PORVENIR.**

Gracias a los resultados del DOE para la dextranasa, se procedió a añadir la dextranasa en el punto B (ver Figura 16 y anexo 17) el cual corresponde al tanque de meladura clarificada, en donde posteriormente la meladura junto con la enzima disuelta, son homogeneizados tras caer por una corriente en cascada (ver Anexo 18). El tiempo de reacción fue de aproximadamente 30 minutos, el pH de la meladura de 5,7 y la temperatura aproximada de 52 °C

## **5.8 ALMIDÓN Y DEXTRANAS EN MELADURA Y JUGO MIXTO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LOTES PILOTO DE AZÚCAR BLANCA EN EL INGENIO EL PORVENIR.**

En cinco ocasiones, se procedió a cuantificar la cantidad de almidón en meladura en días diferentes en el ingenio El Porvenir (ver Cuadro 13) y en tres ocasiones se determinó la cantidad de dextranas en meladura. El día 30/03/2022 corresponde al primer día de aplicación de las enzimas en el ingenio, la muestra de meladura se recolectó justo antes de la aplicación enzimática.

Durante los días de la aplicación enzimática, diariamente se recolectó jugo mixto fresco directamente de los molinos, sin presentar ningún tipo de tratamiento, con el fin de observar la variabilidad de la materia prima. Como se logra apreciar en el Cuadro 14, la extracción del jugo mixto (el cual es el punto inicial del proceso productivo de la obtención del azúcar) posee mucha variabilidad en cuanto a almidón y dextranas.

El día 30/03/22 se aprecia una concentración promedio de dextranas de 95 ppm, mientras que los otros días posteriores se observa un gran descenso que alcanza 0 ppm. Aunado a esto el día 04/05/22 se procedió a recolectar jugo mixto

en el mismo punto de muestreo y se obtuvo una concentración de dextranas de 1949 ppm, un aumento muy significativo.

Con esto se logra verificar que la materia prima muestra siempre variabilidad en los polisacáridos en cuestión. Según Soto, Figeroa y Cortés (2019), un aumento de dextranas con respecto al tiempo se encuentra estrechamente relacionado con las condiciones de higiene del ingenio, el tiempo de espera entre el corte de la caña y el ingreso a los molinos, el corte mecanizado o manual de la caña en sí, y las condiciones climáticas que se presentan en un momento determinado.

Los días 31 de marzo, 1 y 4 de abril los cuales corresponden a los días de control de polisacáridos en jugo mixto y la meladura tras el tratamiento (ver Cuadro 14) se recolectó la caña en los patios correspondientes (ubicados en los alrededores del ingenio) y se procedió a moler la caña inmediatamente, dando como resultado un jugo con bajo contenido de dextranas, dado el poco tiempo de espera.

Del mismo modo los días 1° y 2 de abril el ingenio fue forzado a detenerse desde la madrugada hasta las 9 am. ya que no hubo caña para continuar con el proceso. Igualmente, el día 3 de abril el ingenio se detuvo totalmente en todo el día, dado que es el día libre estipulado.

Se debe hacer hincapié que, el jugo mixto que se recolecta como control, es extraído directamente del último molino y es analizado el almidón y dextranas inmediatamente después de recolectado, sin tiempos de espera. De ser el caso que la muestra se recolecte y analice con un tiempo de espera amplio, es muy probable que haya un crecimiento de dextranas en el jugo dado a la exposición de *Leuconostoc mesenteroides*.

Las pausas en el proceso se observan reflejados en el Cuadro 15 en donde se puede observar un incremento de dextranas en partes por millón en la meladura en los días antes mencionados, mayoritariamente en las muestras extraídas en horas de la mañana, cuando el proceso no conllevaba un flujo continuo. Un estancamiento de los flujos de las tuberías, tanques y reflujos causarían potencialmente un incremento exponencial de la bacteria *Leuconostoc*

*mesenteroides*, por ende, un incremento en las dextranas (Pérez, Navarro y Garrido, 2014).

Gracias a la aplicación de la alfa amilasa se logró reducir de 658 ppm de almidón (tomado del Cuadro 13) el día 30/03 a las 12 pm a 66 ppm en promedio a las 7 am. del 31/03 en la meladura señalado en el Cuadro 15, manteniéndose bajos los niveles de almidón, excluyendo el día 04/04 a las 7 am. Del mismo modo, se logró observar un incremento de dextranas en el mismo muestreo. La razón mayoritaria de este aumento fue debido a que el ingenio fue detenido desde las 7 pm del 2/04 hasta las 12 am del 04/04.

Cuando ocurre una parada de los procesos en un ingenio azucarero (o en otras palabras, cuando el proceso de extracción de jugo de caña se encuentra detenido, y no existe ningún tipo de flujo en tanques ni tuberías), la formación de polisacáridos y oligosacáridos aumentan y favorecen su inversión, disminuyendo la cantidad de miel y su pureza como tal (Pérez, Navarro y Garrido, 2014)

La higiene en los ingenios azucareros debería ser un punto fundamental en lo que la detención de la formación de las dextranas respecta. Como se logra observar en el Anexo 13 existen puntos del ingenio en donde podría controlarse de una mejor manera el aseo. En este punto del proceso que se visualiza en la imagen, se extrae el jugo mixto, este por desborde cae en una pileta la cual por arrastre posterior permite que pase este jugo estancado al proceso, esto para evitar desperdicios de materia prima, pero a su vez contaminando el jugo extraído limpio y por ende todo el proceso.

El crecimiento bacteriano en los ingenios se encuentra limitado en la etapa de la extracción en donde el jugo extraído de los molinos presenta condiciones físicas y químicas que convierten este jugo en un buen sustrato para que una gran variedad de microorganismos pueda crecer en este. Para poder mejorar los problemas ocasionados por el género *Leuconostoc*, existen diferentes medidas de acción como por ejemplo el empleo de biocidas y las limpiezas más frecuentes en las fases de transformación (Sánchez, 2019).

Los rendimientos de los procesos de la evaporación y cristalización se pueden ver afectados cuando hay una alta concentración de dextranas, del mismo modo es posible una modificación del producto final como el valor de la polarización y la forma de los cristales (Eggleston *et al* 2008).

Según el comunicado oral del jefe de aseguramiento de calidad del ingenio el Porvenir, Manuel Enrique Bolaños Mata, la aplicación enzimática propia en el ingenio ha dado muy buen resultado, en lo que respecta al rendimiento interno. En los evaporadores se observó un cambio positivo en el empañamiento de los espejos, manteniéndose limpios en todos los días de la aplicación.

Normalmente estos espejos se observan opacos y esta opacidad puede estar relacionada con el almidón presente en el evaporador, sin embargo, se debe ampliar con una investigación que causa directamente este empañamiento. En la zona de la centrifugación, la miel presentó una mejora en cuanto a la purga, del mismo modo el tacho presentó menos problemas con el lavado de miel restante, mejorando así el tiempo de lavado de los cristales de 12 segundos con anterioridad a 8 segundos. (M. Bolaños, comunicado personal, 7 de abril, 2022).

## **5.9 ALMIDÓN EN PRODUCTO FINAL**

Como se observa en el Cuadro 16, todos los lotes de azúcar blanca que recibieron tratamiento se encuentran abajo del límite máximo de almidón que estipuló LAICA para la fabricación de azúcar líquido, esto implica una notable mejora en la concentración de almidón en el producto final, ya que según los Cuadro 1 y 2 el promedio de almidón en la azúcar blanca de plantación en el Ingenio Porvenir sobrepasa los 200 ppm en los estudios realizados en las zafra 2020-2021 y 2021-2022.

Según Dobrevá *et al.* (1994); Bosse y Das (1996), las alfa-amilasas bacterianas, pero especialmente del género *Bacillus* han sido utilizados en muchos procesos industriales por sus rangos de temperatura y a pH extremos (1 a 11,5).



(Quintero, Montoya y Gutiérrez, 2009). Razón por la cual añadir la alfa amilasa al inicio del proceso, sin importar los cambios de temperatura y/o de pH trajo consigo una mejora en la concentración de almidón en ppm del producto final, según el Cuadro 16.

Aunado a esto, los lotes posteriores al consecutivo 209, según los resultados en el Cuadro 16, mostraron un notable ascenso en la cantidad de almidón presente, dichos lotes corresponden a los que no fueron tratados enzimáticamente con alfa amilasa ni con dextranasa. En este punto se puede señalar un cambio totalmente positivo en la adición de alfa amilasa en el proceso de extracción del jugo.

## **5.10 DEXTRANAS EN PRODUCTO FINAL**

Los lotes que se encuentran por debajo del límite máximo estipulado de dextranas de 100 ppm, corresponden con los lotes con los consecutivos del 195 al 199, 201 y 203. Mientras que los lotes consecutivos 200, 204 y 209 no cumplen con el nivel máximo permitido. La disminución de los niveles de dextranas en la azúcar blanca se pudo haber alcanzado si la dosificación de la dextranasa fuese mayor, por ejemplo, la dosificación a 6 ppm y no a 5 ppm pudo haber mejorado notoriamente las dextranas presentes en el producto terminado, sin embargo, las detenciones obligatorias no contempladas anteriormente antes de iniciar con el tratamiento en el ingenio afectaron directamente el nivel en dextranas.

Se logra apreciar una variación en los resultados de las dextranas, como antes fue descrito, esta variabilidad entre un lote y otro se encuentra estrechamente ligado al crecimiento bacteriano, debido al paro obligatorio del ingenio tras no tener alimentación alguna. Gracias a que las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano en los ingenios están garantizadas, este crecimiento estará relacionado con la concentración que existe en el medio, con una temperatura adecuada y lo más importante: al tiempo que exista para que el microbiota se pueda multiplicar (Nuñez, 2017).

Dicho esto, cuanto más perdure un ingenio en detención, se incrementa la posibilidad de que existan problemas relacionados con un aumento de dextranas tanto en los jugos, la meladura y, sobre todo, en el producto final.

Por otro lado, a partir del lote consecutivo 210, se aprecia un incremento notable de dextranas. Estos lotes no poseen tratamiento de ningún tipo de enzima y se procesaron para realizar un control y así poder comparar entre los lotes tratados y sin tratar. De esta manera se pudo verificar una hidrólisis parcial de las dextranas a partir de la aplicación en la meladura tras definir las condiciones óptimas de la aplicación a nivel de ingenio azucarero. Comparado con los lotes consecutivos 210, 211 y 212 donde no ocurrió ninguna hidrólisis, brindando como resultado un producto terminado alto en dextranas.

Como es posible observar en la Figura 18, una fotografía tomada con microscopio marca Yvelines (lado derecho); todos los lotes que fueron tratados con dextranas presentan elongación, inclusive en los lotes en donde el nivel de dextranas corresponden a 0 ppm. Las dextranas de bajo peso molecular, se presumen que son las causantes de la elongación de los cristales, sin embargo, la elongación no solamente es causada por dicho polisacárido.

El proceso de cristalización es afectado por otros azúcares llamados oligosacáridos que se encuentran naturalmente en los jugos. Estos carbohidratos se constituyen por más de dos y menos de 10 monosacáridos y pueden causar también alargamiento en el eje C del cristal, entre estos se encuentran la theanderosa, erlosan gentianosa, cestosa y leucrosa (Larrahondo, 1995).

## **5.11 POTENCIAL FLOC EN PRODUCTO TERMINADO**

En el año 2020 se estableció el valor máximo de potencial floc en azúcar blanca de 0,110 de absorbancia. (Ver cuadro 4) comparado con el límite máximo de 0,120 en el 2019. Esto con el fin de establecer un parámetro más exigente para la colocación del producto en la planta de azúcar líquido.

Según los datos enmarcados en la Figura 19, los lotes adicionados con alfa amilasa y dextranasa brindaron buenos resultados en cuanto a potencial floc ya que ninguno de estos sobrepasó el límite estipulado internamente en LAICA. De igual modo, los lotes consecutivos 210 al 212, al no ser incluidos dentro del tratamiento enzimático, no cumplen con el estándar de calidad para el floc alcohólico.

## **5.12 FLOC DE 10 DÍAS EN PRODUCTO TERMINADO.**

Por otro lado, según datos del floc de 10 días los primeros cuatro lotes de producción de azúcar blanca de plantación no presentaron formación de flóculos finales en 10 días en medio ácido. A partir del lote consecutivo 199 hasta el lote 212 si existe presencia alguna de flóculos.

Los primeros cuatro lotes según los resultados obtenidos se encuentran bajos en almidón y bajos en contenido de dextranas, sin embargo, los lotes consecutivos, por ejemplo, 199, 201 y 203 con bajos niveles de dextranas y almidón presentan una formación de flóculos de 1 grado. Los investigadores han llegado a la conclusión de que el floc ácido de 10 días en azúcar de caña y en bebidas con azúcar adicionada es debido a una mezcla de sílica, polisacáridos, proteínas, ceras y otros compuestos orgánicos. Muchos de estos compuestos solo están presentes en la caña de azúcar en forma de impurezas (Koong, Doherty y Edye, 2022).

Por lo tanto, el floc de 10 días no debería ser un indicador directo de almidón ni dextranas ya que los resultados de almidón y dextranas en azúcar blanca realizados por los respectivos métodos analíticos señalan resultados bajos en comparación con los resultados del floc de 10 días.

### **5.13 TURBIDEZ EN PRODUCTO TERMINADO.**

La turbidez en la azúcar blanca de plantación es medida tras la diferencia del resultado de color entre la solución filtrada a pH 7 y la solución no filtrada. Las dextranas, durante el procesamiento del azúcar causan problemas que pueden influir en producto final como por ejemplo viscosidad en la solución de sacarosa lo cual afecta directamente en la filtración.

Las dextranas con alto peso molecular son las que aportan en un porcentaje mayor al aumento de viscosidad, por otro lado, las dextranas con bajo peso molecular, se presume que contribuyen en una mayor proporción a la modificación amorfa de los cristales, causando principalmente alargamiento (Abraham, Schlumbach, Rohde y Floter, 2016).

Aunado a esto, el almidón y otros polisacáridos que conforman el azúcar, pueden producir problemas con la viscosidad y filtrabilidad. Alrededor del 80 % de estos polisacáridos sobreviven a la etapa de clarificación y el 30 % queda en el cristal. Los polisacáridos solubles son eliminados parcialmente en la clarificación y pueden adherirse al producto final, los polisacáridos insolubles se eliminan en la clarificación e igual manera pueden pasar al cristal como materia insoluble (Castro, 2015).

Parte del almidón, sólidos en suspensión, dextranas y polisacáridos residuales en el producto terminado quedan atrapados en el filtro utilizado de 0,45 micrómetros de diámetro del poro, brindando así absorbancias no mayores a 0,365 en la solución filtrada, mientras que en las soluciones sin filtrar se logran observar absorbancias mayores a 0,500. Sin embargo, según los datos recolectados, no es posible observar una diferencia entre la turbidez de los lotes tratados enzimáticamente y los lotes sin tratamiento, ya que la turbidez como anteriormente fue mencionado no depende solamente del almidón y dextranas.

LAICA, como organización, no ha estipulado un parámetro máximo de turbidez para azúcar blanca de alimentación en la planta de azúcar líquido, por otra parte, solo se ha establecido un límite máximo de turbidez en el azúcar líquido para poder ser despachado.

## 6. PLANES GLOBALES DE ADICIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO PRODUCTIVO

El siguiente diagrama, constituye una guía donde se dispone una serie de pasos generales para la adición de alfa amilasa en un proceso productivo

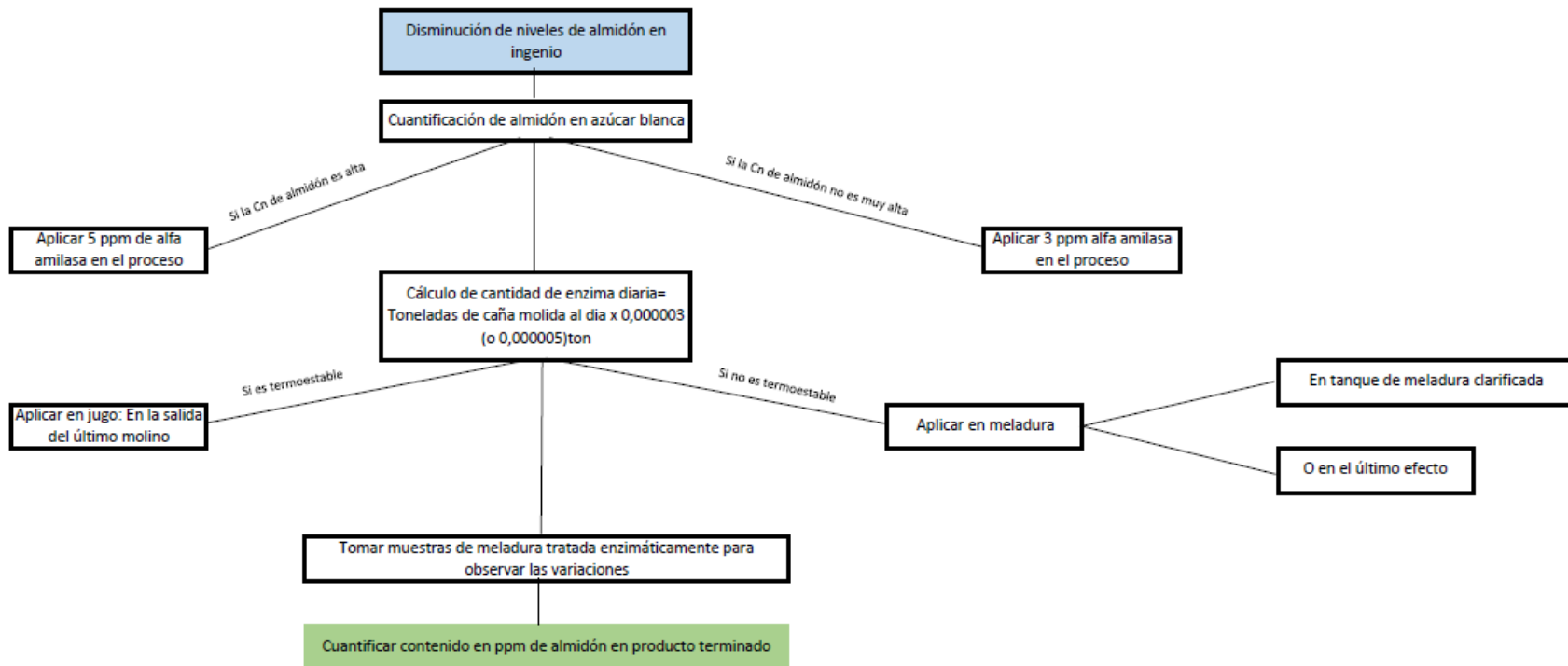
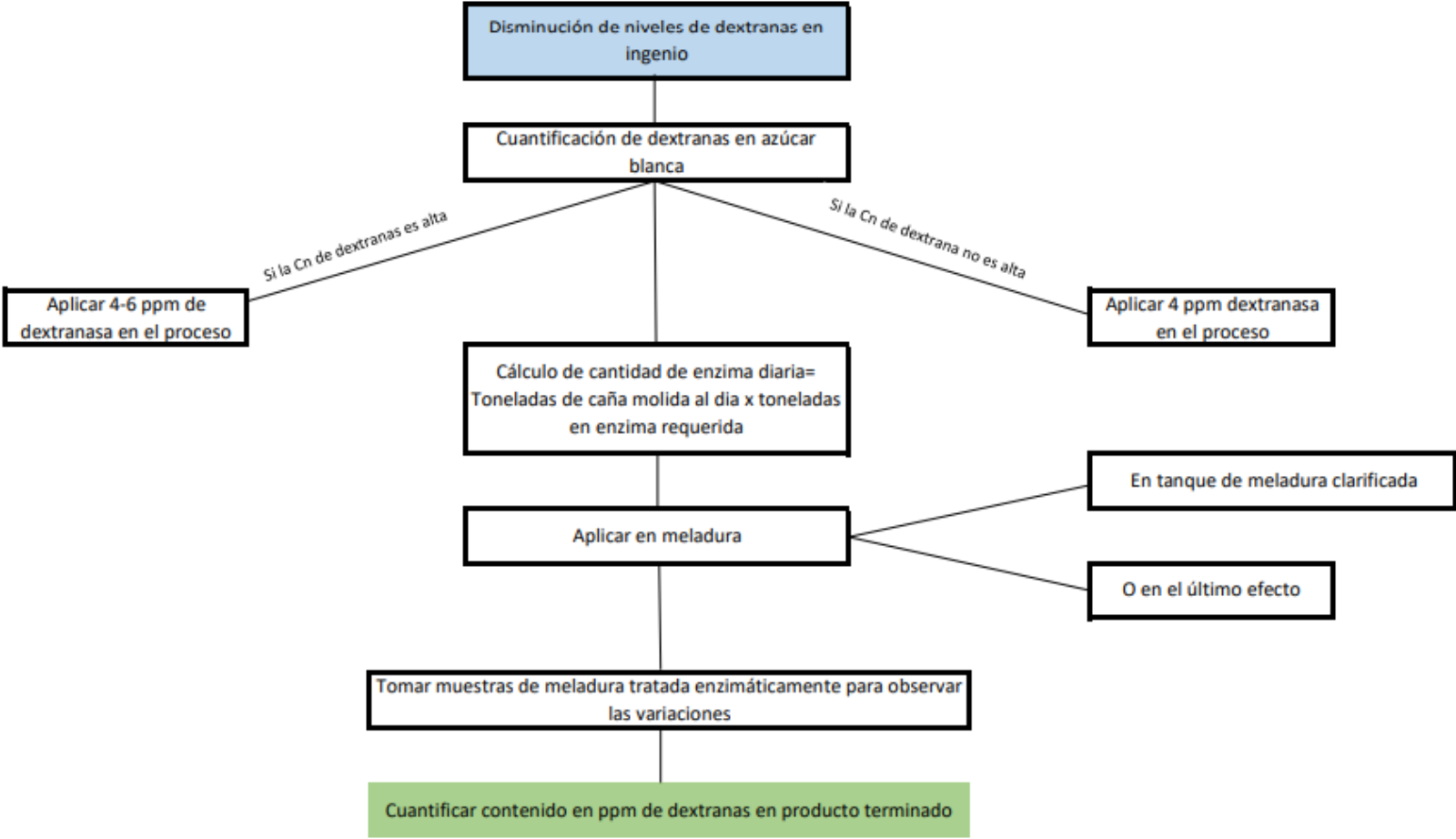


Figura 21: Diagrama global de adición de alfa amilasa en un proceso productivo general azucarero.

La figura 22, de igual manera muestra un plan general de adición de dextranasa en escala de ingenio azucarero.



**Figura 22:** Diagrama global de adición de alfa amilasa en un proceso productivo general azucarero.

Como cuarto objetivo específico de este trabajo de investigación, se dispuso a realizar un plan general de adición enzimática, según los resultados obtenidos. Este plan pretende servir como una guía para los ingenios azucareros costarricenses que presenten problemas con dextranas y/o almidón en el proceso de elaboración de azúcar blanca de plantación.

Primeramente, para determinar cuánta cantidad de alfa amilasa se debe añadir en el proceso, se debe determinar la cantidad de almidón en el producto terminado según el método Draft N°3 (2007), de este modo se puede observar si existen problemas leves o severos en el ingenio. Del mismo modo, para determinar si existen problemas severos en dextranas, se debe realizar la cuantificación de dextranas en el producto terminado según el método GS 1/2/9-15, (2011).

Posteriormente para la adición de dextranasa y alfa amilasa, se procede con el cálculo de enzima dependiendo de la cantidad de caña molida diaria y la cantidad promedio de dextranas en azúcar blanca, descritos en los Cuadros 20 y 21 y tomando en cuenta el cálculo que se describe en el Anexo 1 y 2.

Esta información plasmada en estos cuadros fue obtenida gracias a las conclusiones en los resultados obtenidos y aprobación del gerente técnico de Protech; Sr. Manuel Mena Rojas. Como se observa en los Cuadros 1 y 2, el promedio de almidón en el Ingenio El Porvenir en los dos estudios realizados superaron los 200 ppm, dado esto, se decidió dosificar 5 ppm de alfa amilasa, logrando reducir gran cantidad de almidón en la azúcar blanca de plantación.

**Cuadro 20:** Estimación de adición de dextranasa en el proceso productivo según cantidad de dextranas en azúcar blanca de plantación.

| <b>Cantidad promedio de dextranas en azúcar blanca (ppm)</b> | <b>Aplicación</b>              |
|--|--------------------------------|
| Menos de 100   | Aplicar igual o menos de 4 ppm |
| Entre 100-300  | Aplicar 4-6 ppm                |
| Más de 300   | Aplicar superior a 6 ppm       |

**Cuadro 21:** Estimación de adición de alfa amilasa en el proceso productivo según cantidad de almidón en azúcar blanca de plantación.

| <b>Cantidad promedio de almidón en azúcar blanca (ppm)</b> | <b>Aplicación</b> |
|--|-------------------|
| Menos de 100   | Aplicar 3 ppm     |
| Entre 100-300  | Aplicar 3 a 5 ppm |
| Más de 300   | Aplicar 5 ppm     |

Para un ingenio en donde la cantidad de dextranas en azúcar blanca no supera en promedio 100 ppm y se desea controlar el proceso con adición de dextranasa, es preferible aplicar de 4 ppm o inclusive una menor cantidad y de este modo se puede reducir los costos monetarios en el proceso. Si, por el contrario, la cantidad de dextranas en el producto terminado sobrepasa los 300 ppm, se debe aplicar una cantidad superior a los 6 ppm.

Se debe hacer hincapié que, dependiendo de las características de la alfa amilasa con la cual se vaya a trabajar, esta se puede aplicar en el jugo mixto si esta es termoestable y poder hidrolizar el almidón desde el inicio del proceso. De no ser termoestable, esta se puede colocar en el tanque de meladura clarificada

Si el ingenio no posee un tanque de meladura clarificada en donde haya al menos 20 minutos de tiempo de reacción, se puede optar por acoplar un tanque auxiliar en el proceso de otro modo, se puede adicionar la enzima en el último efecto (evaporador) sin embargo, de hacerse de este modo, el almidón solamente se hidrolizaría desde la última etapa de evaporación y no desde la extracción, lo cual no minimizaría los problemas que conlleva el almidón a lo largo del proceso.



## 7. CONCLUSIONES:

1. La alfa amilasa trabajó óptimamente durante un tiempo mínimo de 10 minutos, con un amplio rango de pH desde 4 a 7 y con una temperatura mínima de 55 °C; por otra parte, la dextranasa trabaja con un tiempo mínimo de 30 minutos, una temperatura alrededor de los 55 °C y con tendencia a un pH ácido alrededor de 5.
2. La alfa amilasa fue aplicada en cinco partes por millón en la etapa de extracción del jugo de caña dado que cumple con el tiempo mínimo y pH requerido en la etapa de extracción. Hidrolizando así el almidón desde el inicio del proceso productivo.
3. La dextranasa fue añadida en la etapa de clarificación de la meladura cruda a una concentración de 5 ppm, dado que esta etapa se adecuó a los resultados brindados en el diseño de experimentos (DOE), los cuales señalan que la etapa de clarificación de la meladura se encuentran condiciones de temperatura y tiempo idóneas.
4. Aplicando la alfa amilasa en la fase de la extracción, se logró reducir hasta en un 84,4 % del promedio de la cantidad de almidón en la meladura clarificada extraída en diferentes días, minimizando así los problemas como obstrucción, y dificultad de la purga de la miel en los tachos, mejorando porcentualmente el rendimiento del producto terminado en los días de aplicación. Por otro lado, las dextranas en meladura clarificada se redujeron en un 40,5 %.
5. Todos los lotes de azúcar blanca de plantación del Ingenio El Porvenir tratados enzimáticamente con alfa amilasa cumplieron con los parámetros establecidos de almidón según resultados y el límite estipulado por LAICA en el 2021 de 100 ppm de almidón.
6. Con respecto a las dextranas, el 50 % de los lotes del producto terminado sobrepasó el límite máximo de la ficha técnica B-01. Según los datos esto fue

debido a las detenciones obligatorias de todas las operaciones que el ingenio tuvo que realizar por falta de materia prima.

7. El floc alcohólico en todos los 14 lotes de producción de azúcar blanca de plantación tratados con alfa amilasa y dextranasa en los puntos de aplicación de extracción y clarificación de la meladura respectivamente para cada enzima, cumplieron con la ficha técnica B-01 de mantener un nivel de absorbancia menor de 0,110.
8. Se estipularon dosificaciones de dextranasa y alfa amilasa y las etapas en las cuales se deben añadir en el plan global de adición enzimática según las necesidades de cada ingenio azucarero, gracias a los resultados presentados en el producto final en floc alcohólico, almidón y dextranas.
9. Según los resultados bajos en dextranas en el producto terminado y las imágenes de los granos de azúcar vistos al microscopio, la elongación de los granos de azúcar no es otorgada solamente a una alta concentración de dextranas, también puede estar relacionada con oligosacáridos que intervienen naturalmente en el proceso de cristalización.
10. Los resultados del floc de 10 días de las muestras de azúcar blanca de plantación no representaron indicadores directos de dextranas y almidón, ya que los resultados de estos polisacáridos por medio de los métodos analíticos de ICUMSA señalaron resultados bajos en comparación con los resultados obtenidos del floc de 10 días en donde se observan formaciones de flóculos de grado 1 y 2.

## **8. RECOMENDACIONES:**

- 1.** Aumentar la concentración en partes por millón de dextranasa posterior a una detención operacional en un ingenio; esto para no sobrepasar el límite superior de 100 ppm de dextranas en el producto final.
- 2.** Incluir los parámetros de validación tales como robustez, precisión intermedia e incertidumbre del método de dextranas en meladura, siguiendo la guía Eurochem de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Se observa buena recuperación y precisión del método, sin embargo, es recomendable validar el método en el laboratorio en el cual se llevará a cabo las futuras determinaciones.
- 3.** Ampliar el estudio de la relación que tienen las dextranas y almidón entre la turbidez y filtrabilidad de una solución de azúcar, la cual se trabaja normalmente para la determinación de turbidez y color en condiciones de °Brix de 50°.
- 4.** Realizar más estudios acerca de cómo dosificar la dextranasa y alfa amilasa en condiciones de una detención operacional, ya que esto equivale a un problema que es inevitable en ciertos lapsos de las zafras en los ingenios debido a escasez de materia prima o por condiciones ambientales.
- 5.** Planificar la aplicación enzimática en ingenios donde los flujos de materia prima en la etapa de extracción, clarificación, evaporación y cristalización sean mayores y se elaboren mayor cantidad de bultos diarios finales de azúcar blanca.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, K; Schlumbach, K; Rohde; A; Floter, E (2016). *Análisis y Ventajas de la Hidrolisis Enzimática del Dextrano en el Proceso del Azúcar*. pp 1-10
- Arya, JS; Pathak, DP; Gupta, T; Madan, M (2018). *Application of Enzydex During Sugar Process for Improving Sugar Yield*. International Journal of Advance Research and Innovation. (3).156-157.
- ucatoma, B (2009). *Las dextranas y sus efectos en la industria azucarera*. (1) 9-12
- Bashari, M L, Camel, A, Al-farga, H. Abdalhai, M, Mustafa, A. (2019). *Impact of Dextran Biodegradation Catalyzed by Dextranase Enzyme on the Crystallization Rate of Sucrose during Sugar Manufacturing*. Journal of Food and Nutrition Research. (7). 402-408.
- Bello-Pérez, L. A., Montealvo, M. G. M., & Acevedo, E. A. (2006). *Almidón: Definición, estructura y propiedades*. In F. M. Lajolo, & E. W. Menezes (Eds.), *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*. São Paulo: Edusp.17–46
- Bukhari, M. Khaseh, S., Abdalmoneim, H., Salah, E. (2015). *Investigations of the influence of dextran on sugar cane quality and sugar cane processing in Kenana sugar factory*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. (7) 381-392.
- Carvajal. O (2018). *Infección Por Bacterias Del Género Leuconostoc: Un Patógeno Infrecuente*. Crónicas Científicas. (11).14-21.
- Castillo, A. Alarcón, L.A. Rodríguez, D.A. Milanés, N. Pantaleón, G. Aguilar, N (2015). *Deterioro Poscosecha en Caña de Azúcar (Saccharum Spp. Híbrido) en el Área de Abasto de Central Motzorongo, S. A. De C. V.* Universidad Veracruzana.
- Castro, P (2015). *Determinación de la Concentración de Almidón por Caracterización Espectrofotométrica En El Jugo De Caña De Azúcar de las*

*Variedades: cp72-2086, cp88-1165 y cp73-1547 Utilizadas en el Ingenio Trinidad Guatemala.* Universidad de Guatemala. p 8

Chávez, M; Rodríguez, M; Villalobos, C; Angulo, A; Calderón, G, Alfaro, R; Rodríguez, J.M (2000). *Censo De Variedades De Caña De Azúcar De Costa Rica* .Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar.

Clarke, M.A. Roberts, E.J. Godshall, M.A. (1996). *Acid Beverage floc from sugar beets*. Journal of sugar beet research. (3).15-27

Clarke, Margaret. *Beverage floc and cane sugar* (1977). Cane Sugar Refining Research Project Inc, (6) 5 p.

CoopeAgri. (2020). Ingenio CoopeAgri. <http://www.coopeagri.co.cr/agroindustria/cana/ingenio/>

Cuervo-Mulet R. A., J. Ángel-Ledesma, Durán-Vanegas J. A., F. E. Argote-Vega. (2010). *Aislamiento y Control Microbiológico de Leuconostoc mesenteroides, en un Ingenio para Optimizar el Rendimiento de Azúcar y Etanol*. Rev. Bio.Agro (8). 7 p.

Dávila, J; Figeroa, K; Cortés, O. (2019) *Biotecnología: Una alternativa natural para mejorar la eficiencia en la producción y la calidad del azúcar*.

Díaz, A (2009) *Diseño estadístico de experimentos*. Editorial Universidad de Anqioquia. 2º Edición.

Dobrevá, E., V. Ivanova, and E. Emanuilova. (1994). *Effect of Termostable on some characteristics of the Termostable alphaamylase from Bacillus licheniformis*. World J. Microbiol. Biotech. Vol 10: pp.547-550

Drew, B. Pearson, A. Kimmerling, J (1980). *Attempt to relate floc with some components of natal formation very with high pol some sugars*. Souhtafrican sugar technologist Association 1980. (18) p. 66-71

ECNA Automation (2018). *Proceso de clarificación del jugo de caña*. <https://ecnaautomation.com/proceso-de-clarificacion-del-jugo-de-cana/>

- Edye, L.A, Clarke, M.A, Roberts, E.J, Blanco, R. (1995). *Dextran analysis by NMR. Proc Sug Ind Technol (54): 55-64.*
- Eggleston, G, Monge, A. (2004). *Optimization of Sugar Cane Factory Application of Comercial Dextranases in the US.* Conference on Sugar Processing Research.
- Eggleston, G., Montes, B., Monge, A., & Guidry, D. (2007). *Optimization of alpha-amylase application in U.S. factories* (abstract). Sugar Journal, (70). 31 p.
- Eggleston, G; Karr J; Parris, A; Legendre, B. (2008). FoodChem. pp 476-486.
- Fernández, S. (2020). *Diseño de Experimentos Factorial.* Universidad Politécnica de Catalunya. pp 7-23
- Figueira, J. A., Carvalho, P. H., & Sato, H. H. (2011). *Sugarcane starch: Quantitative determination and characterization.* Ciência e Tecnologia de Alimentos, (31) 806–815.
- Figueira, J. Carvalho, Priscila Hoffmann. Sato, H. (2011). *Sugarcane starch: quantitative determination and characterization.* (33). 805-815.
- Figuroa, K. Dávila, JD. Zaragoza, E. Álvarez, A. (2006) *Evaluación A Nivel Laboratorio De La Enzima Comercial Dextranase L-650 En Jugo Mezclado.*
- González, J,L. (2013). *Diseño de la Investigación del Aumento en Producción de Azúcar Refino, Aplicando Metodología de Semillamiento en un Tacho Tipo Batch.* Universidad San Carlos de Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0326\\_EO.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0326_EO.pdf)
- ICUMSA (2007). *Método Draft N°3. Determinación de Almidón en Productos de Caña de Azúcar y Jugos de Remolacha (Método VS1).*
- ICUMSA (2007). *The Determination of Dextran in Beet Raw Juice and Thick Juice by a Modified Alcohol Haze Method-Accepted.* Determinación de
- ICUMSA (2011). *Método GS1/2/9-15. Determinación de Dextranas en Azúcar por el Método Modificado de Turbidez en Alcohol-Oficial.*
- Imrie, F; Tibury; R (1972). *Sugar Technology Rev. (1).* 291-361.

- Ingenio Providencia (2020). *Procesos*. [https://www.ingprovidencia.com/wp-content/uploads/2016/05/Procesos\\_de\\_Ingenio\\_Providencia.pdf](https://www.ingprovidencia.com/wp-content/uploads/2016/05/Procesos_de_Ingenio_Providencia.pdf).
- Issa, A. (2008). *Presence of Dextran and It's Negative Effects on Cane Sugar Production in Sudan*. University of Khartoum.
- Jofré, L; Sakurada, A; Ulloa, T; Hormázabal, C; Godoy, V; Fernández, J; Guitérrez, M; Monteverde, P; Castillo; M; Canales; A. (2006). *Infección por Leucnostonoc en pacientes con síndrome de intestino corto, nutrición parenteral y alimentación enteral continua*. Rev. Chil Infect, 23(4): 340-345.
- Khalikova, E. Susi, P Korpela, T. (2005). *Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzyme Fundamentals and Applications*. (69).306-325.
- Koong, K; Doherty, W; Edey, L (2002). *A review on beverage floc*. Zuckerindustrie. Sugar industry 127(5):382-388
- Larrahondo, J.E (1995). *Calidad de la caña de Azúcar en CEÑICANA. El cultivo de la caña en zona azucarera de Colombia*. Colombia. p 339
- Liuzzo, M.; Hsu, R. (1973). *Identification of floc components*. *Proceedings of the Society of Soft Drink Technologists*. (15) 93-102.
- Loyola, L. Díaz, T (2013). *Ruptura de Enlaces  $\alpha$  (1,6) de la dextrana mediante la enzima dextranasa para la obtención de moléculas de glucosa y su aprovechamiento posterior en etanol en la empresa CasaGrande S.A.A*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Morel du Boil, P . Wienese, S. (2002). *Enzymic Reduction Of Dextran In Process - Laboratory Evaluation Of Dextranases*. University Of Natal. Proceedings of South African Sugar Technologist Association. 435-443
- Namer I, Pérez JR, Dávila H. (1988). *Análisis de los beneficios económicos del empleo de las enzimas en la producción del azúcar de exportación cubana*. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile.
- Núñez, O. (2017). *Actividad Microbiológica en Filtros de Cachaza. Cuantificación e Identificación de Causas*. p 2

Ortega, K, Manyoma. J. P (2013). *Implementación de un Sistema de Auditoría Ambiental en el Proceso de Producción del Azúcar en el Ingenio Carmelita*. Universidad del Valle. pág. 49

Oscar, J.C. (s.f). *Proceso de Producción del Azúcar*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Página Oficial de LAICA (2020). *Ingenios*. <https://laica.cr/ingenios/>

Penados, F (2004). *Evaluación Del Impacto De Adicionar La Enzima Alfa Amilasa Durante El Proceso De Evaporación En Los Niveles De Almidón De Azúcar Crudo Producido En Un Ingenio Azucarero*. Universidad San Carlos de Guatemala.

Pérez-Bérmudez, I; Navarro-Hernández, H; Garrido-Carralero, N. (2014) *Influencia del tiempo perdido industrial sobre la economía de los ingenios azucareros ICIDCA*. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 48 (2). pp. 56-59. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba.

Pescador, J (2017). *Dextranasa y Amilasa en la Industria Azucarera*. <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/12-F%C3%A1brica.pdf>

Pineda–Gómez, P. Coral, D. Arciniegas, M, L. Rorales–Rivera, A. Rodríguez, M (2010). *Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido*. Ingeniería y Ciencia. Vol 6 (11). pp 129-141. <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v6n11/v6n11a08.pdf>

Protech. Ficha Técnica *Magna Zyme Dex*. (2018). Magna Zyme; *Enzima Dextranasa*. (6).

Quintero, M; Montoya, O.I; Guitérrez, P. (2009). *Purificación y Caracterización de una  $\alpha$ -Amilasa producida por la cepa Nativa Bacillus Sp. Bbm1*. Universidad Nacional de Colombia. Vol 77(162).



- Ramírez, C; Muñoz, M; Vásquez, O; Pérez, H (2017). *Proceso De Producción Del Azúcar*. Universidad Tecnológica de Puebla.
- Ramos, E.L. Ravelo, S. Bordallo, E, León, V. (2005). Determinación de Polisacáridos por filtración por gel de celulosa. *Revista ICIDCA* 39 (3). 35-39.
- República de Costa Rica (1973). *Norma Oficial para el azúcar*, decreto N° 17584-MEC.
- Reyna M., Robles, R, Reyes, M, Mendoza, Romero, R. (2004). *Hidrólisis Enzimática Del Almidón*. *Revista de Investigación*. (7).129-140.
- Roberts, E; Carpenter; F (1974). *Composition of the Acid Beverage Floc*. Tech Session Cane Sugar Refining Research. 39-50
- Rodríguez, E (2005). *La dextranasa a lo largo de la industria azucarera*. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología en Cuba*. (22) 11-19.
- Rodríguez, O. Hanssen, H. (2007). *Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa leuconostoc mesenteroides NRRL B512-F*. *Revista EIA*. (7).
- Rohde (2017). *Dextranasa y Amilasa En La Industria Azucarera*. Recuperado de <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/11.-F%C3%81BRICA-I.pdf>.
- Rojo-Rubio, R; Mendoza- Martínez, G.D; Crosby-Galván, M.M (2001). *Uso de la amilasa termoestable de Bacillus licheniformis en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz*. *Revista Agrociencia*, Vol 35. (4). pp. 423-427 Colegio de Postgraduados Texcoco.
- Salcedo M, Galán J, Pardo, J. (2012). *Hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar*. *Revista Colombiana de Biotecnología* (14): 171-181.
- Sánchez, L.J (2019). *Determinación de las Pérdidas de Sacarosa por Acción de Leuconostoc spp para la Implementación de Controles que Favorezcan su*

- Disminución en un Ingenio Azucarero*. Universidad Católica de Manizales. pp 66 -70.
- Serrate, F (2020). *Los enzimas. Introducción a la enzimología*. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/146362>
- Tanco, P.M (2008). *Metodología para la aplicación del Diseño de Experimentos (DoE) en la industria*. Universidad de Navarra. España. pp 45-50.
- Taylor C, Cheetham N.W, Slodki M.E, Walker G.J (1990). *Action of endo-(1-6)- $\alpha$ -D-glucanases on the soluble dextrans produced by three extracellular  $\alpha$ -D-glucosyltransferases of Streptococcus sobrinus*. Carbohydr. Polym., (13): 423-436.
- Timberlake, K (2010). *Química (General, Orgánica y Biológica Estructuras de la Vida)* 4ta Edición. México. pp 716-723
- Viginotti, F, Polesib, L; Lima, C; Aguiara, Silveira, S (2014). *Structural and physicochemical characteristics of starch from sugarcane and sweet sorghum stalks*. Carbohydrate Polymers. Elsevier. (111): 592- 597.
- Zhou, M; Kimbeng, C.A; Eggleston, G; Viator; R; Hale, A; Gravois, K (2008). *Issues starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content in sugarcane*. Sugar Cane International. (3): 3-17.
- Zossi, S. Sorol, N (2016). *Comparación de dos metodologías de determinación de almidón en azúcar*. Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán. (85): 9-16.
- Zossi, S. Sorol, N. Sastre, M. Ruiz, M. (2011). *Validación de la metodología ICUMSA "Draft Method N° 3" para determinar la concentración de almidón en jugos de caña de azúcar*. Rev. ind. agric. Tucumán (88)-1

## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Matriz de diseño de experimentos factorial  $2^3$  para la alfa amilasa. La corrida 9 equivale al punto central, en donde en cada factor se utiliza el punto central y no los extremos.

| Corrida | Factor A | Factor B | Factor C |
|---------|----------|----------|----------|
| 1       | -        | -        | -        |
| 2       | +        | -        | -        |
| 3       | -        | +        | -        |
| 4       | +        | +        | -        |
| 5       | -        | -        | +        |
| 6       | +        | -        | +        |
| 7       | -        | +        | +        |
| 8       | +        | +        | +        |
| 9       | central  | central  | central  |

**Anexo 2:** Matriz de diseño de experimentos factorial  $2^3$  para la dextranasa

| Corrida | Bloques | Factor A | Factor B | Factor C |
|---------|---------|----------|----------|----------|
| 1       | 1       | -        | -        | -        |
| 2       | 1       | +        | -        | -        |
| 3       | 1       | -        | +        | -        |
| 4       | 1       | +        | +        | -        |
| 5       | 1       | -        | -        | +        |
| 6       | 1       | +        | -        | +        |
| 7       | 1       | -        | +        | +        |
| 8       | 1       | +        | +        | +        |
| 9       | 2       | -        | -        | -        |
| 10      | 2       | +        | -        | -        |
| 11      | 2       | -        | +        | -        |
| 12      | 2       | +        | +        | -        |
| 13      | 2       | -        | -        | +        |
| 14      | 2       | +        | -        | +        |
| 15      | 2       | -        | +        | +        |
| 16      | 2       | +        | +        | +        |
| 17      | 3       | -        | -        | -        |
| 18      | 3       | +        | -        | -        |
| 19      | 3       | -        | +        | -        |
| 20      | 3       | +        | +        | -        |
| 21      | 3       | -        | -        | +        |
| 22      | 3       | +        | -        | +        |
| 23      | 3       | -        | +        | +        |
| 24      | 3       | +        | +        | +        |

**Nota:** El programa Minitab aleatoriza las corridas

**Anexo 3:** Cálculo utilizado en la dosificación de dextranasa y agua en el Ingenio el Porvenir

$$650 \frac{\text{toneladas}}{\text{día}} \text{ caña al día} \times 0,000005 \text{ toneladas de dextranasa} \\ = 0,00325 \frac{\text{toneladas}}{\text{día}} \text{ de enzima}$$

$$0,00325 \text{ toneladas} \times 1000 \frac{\text{kg}}{\text{tonelada}} = 3,25 \text{ kg de dextranasa}$$

$$1,8 \frac{\text{L}}{\text{h}} \times \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} = 0,03 \frac{\text{L}}{\text{min}} * 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}} = 30 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

$$1,8 \frac{\text{L}}{\text{h}} \times 24 \text{ h} = 43,2 \text{ L totales por día}$$

Tomando en cuenta que, la gravedad específica de ambas enzimas es muy cercana a 1 g/ml;

$$43,2 \text{ L totales} = 43,2 \text{ kg totales}$$

$$43,2 \text{ kg} = \text{agua} + \text{enzima}$$

$$43,2 \text{ kg totales} - 3,25 \text{ kg de dextranasa} = 40 \text{ kg de agua}$$

**Anexo 4** :Cálculo de las cantidades de enzima alfa amilasa y agua a utilizar por día, a un flujo de 1,45 L/h.

$$650 \frac{\text{toneladas}}{\text{día}} \text{caña al día} \times 0,000005 \text{ toneladas de amilasa} = 0,00325 \frac{\text{toneladas de enzima}}{\text{día}}$$

$$0,00325 \text{ toneladas} \times 1000 \frac{\text{kg}}{\text{tonelada}} = 3,25 \text{ kg de amilasa}$$

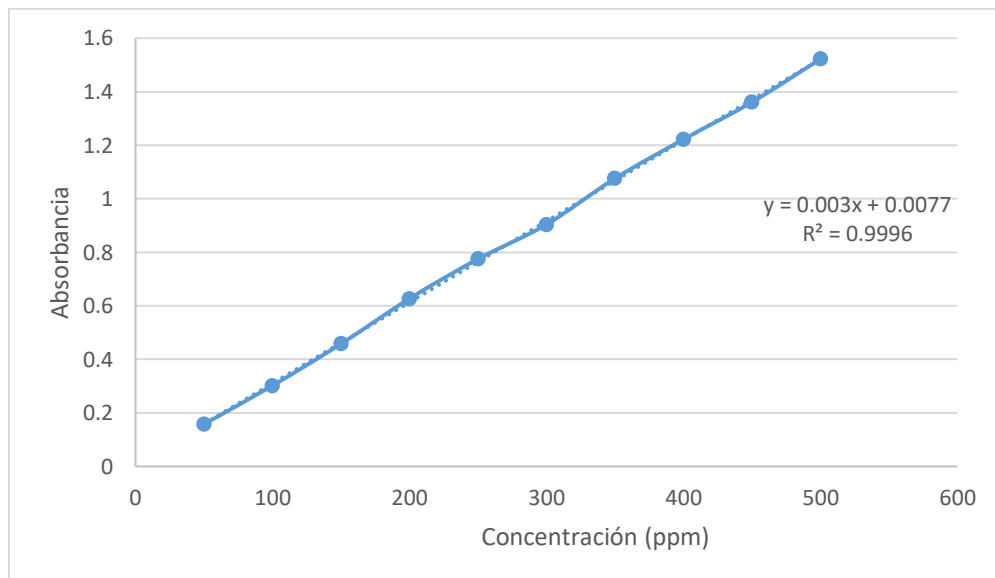
$$1,45 \frac{\text{L}}{\text{h}} \times \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} = 0,024 \frac{\text{L}}{\text{min}} * 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}} = 24,2 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

$$1,45 \frac{\text{L}}{\text{h}} \times 24 \text{ h} = 34,8 \text{ L totales por día}$$

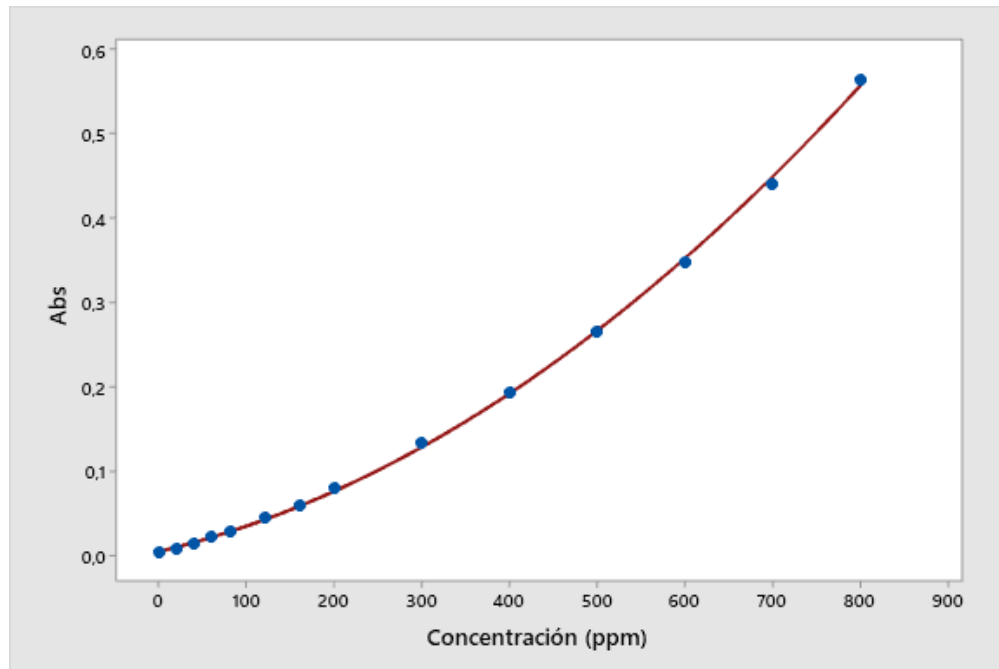
$$34,8 \text{ L totales} = 34,8 \text{ kg totales}$$

$$34,8 \text{ kg} = \text{agua} + \text{enzima amilasa}$$

$$34,8 \text{ kg totales} - 3,25 \text{ kg de amilasa} = 31,5 \text{ kg de agua}$$

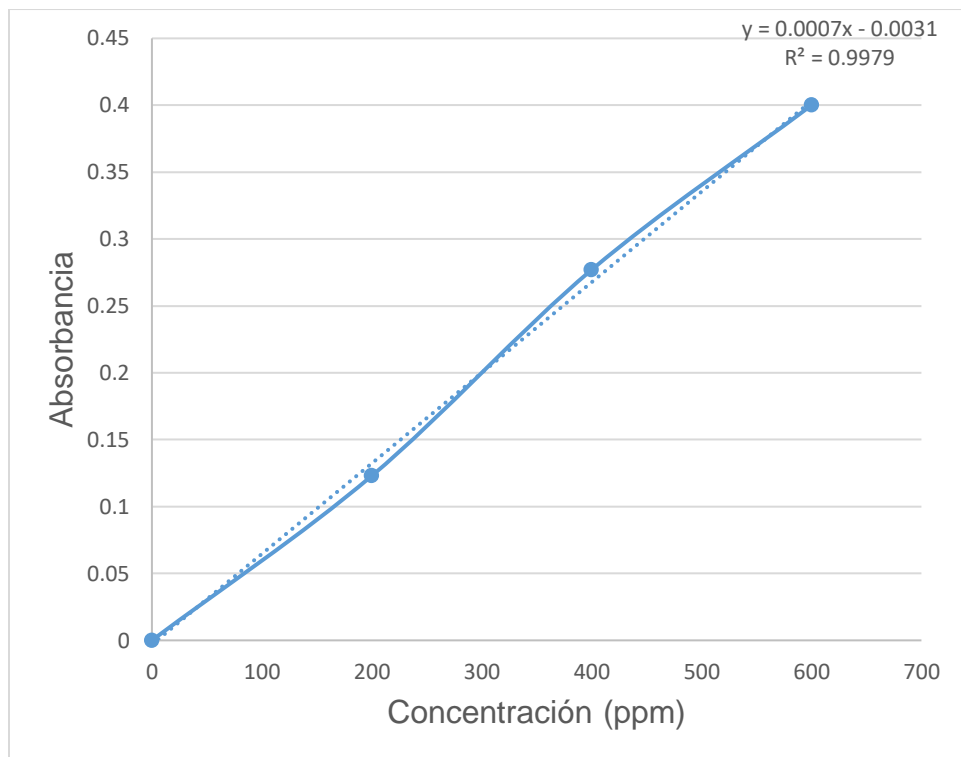


**Anexo 5:** Curva de calibración de almidón en ppm empleada para las determinaciones de pruebas laboratoriales, corridas en el Ingenio el Porvenir y producto terminado.



**Anexo 6:** Curva de dextranas elaborada para las determinaciones en el diseño de experimentos, análisis de muestreos en el Ingenio El Porvenir y producto terminado.

Fuente: propia



**Anexo 7:** Curva de calibración de dextranas en jugo de caña en partes por millón

**Anexo 8:** Resultados de potencial floc en el azúcar blanca de plantación con tratamiento enzimático y últimos 3 lotes sin tratamiento.

| <b>Lote</b>        | <b>Absorbancia (<math>\pm 0,003</math>)</b> |
|--------------------|---|
| 212291040000200195 | 0,078                                       |
| 212291040000200196 | 0,081                                       |
| 212292040000200197 | 0,065                                       |
| 212294040000200198 | 0,079                                       |
| 212294040000200199 | 0,062                                       |
| 212294040000200200 | 0,078                                       |
| 212295040000200201 | 0,055                                       |
| 212295040000200203 | 0,090                                       |
| 212296040000200204 | 0,075                                       |
| 212296040000200205 | 0,105                                       |
| 212296040000200206 | 0,087                                       |
| 212297040000200207 | 0,109                                       |
| 212297040000200208 | 0,098                                       |
| 212297040000200209 | 0,108                                       |
| 212298040000200210 | 0,234                                       |
| 212298040000200211 | 0,514                                       |
| 212299040000200212 | 0,431                                       |

**Anexo 9:** Resultados de la repetibilidad de dextranas en muestra de meladura

| <b>Muestra</b> | <b>Absorbancia</b> | <b>Resultado (ppm)</b> |
|----------------|--------------------|------------------------|
| 1              | 0,520              | 1211                   |
| 2              | 0,515              | 1204                   |
| 3              | 0,530              | 1225                   |
| 4              | 0,525              | 1218                   |
| 5              | 0,532              | 1227                   |
| 6              | 0,514              | 1203                   |



|    |       |      |
|----|-------|------|
| 7  | 0,529 | 1223 |
| 8  | 0,527 | 1220 |
| 9  | 0,520 | 1211 |
| 10 | 0,520 | 1211 |

El método GS 1/2/9 (2011) determina la turbidez debido a las dextranas en muestras de azúcar blanca de plantación y en azúcar crudo, sin embargo, el alcance del método no involucra la determinación en meladura. Para ello se llevó a cabo una verificación de la repetibilidad y veracidad del método, cambiando de analito la meladura.

**Desviación estándar:** 8,6%

Según el método GS1/2/9-15 la diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad no deberá ser mayor que 40 mg/kg para el azúcar crudo. Se logra observar que, según los datos recolectados, la diferencia entre uno y otro no excede este valor, lo cual se puede verificar que la repetibilidad para la muestra de meladura cumple con el criterio de aceptación.

**Anexo 10:** Porcentaje de recuperación obtenido en adición de dextranas a 80, 160 y 240 ppm.

| Muestra | Concentración inicial de la muestra en ppm (Xi) | Concentración añadida del patrón ppm (Xa) | Concentración de la muestra + patrón añadido en ppm (Y) | % de recuperación |
|---------|---|---|---|-------------------|
| 1       | 607,5   | 80  | 683,67  | 95,2              |
| 2       | 607,5   | 160                                       | 796,69  | 118,2             |

|                                  |       |     |        |        |
|----------------------------------|-------|-----|--------|--------|
| 3                                | 607,5 | 240 | 881,94 | 114,35 |
| % de recuperación global: 109,3% |       |     |        |        |

$$\%R = \frac{Y - X_i}{X_a} \times 100$$

Donde: y

**Y**= concentración en ppm de la muestra más el patrón añadido

**X<sub>i</sub>**= concentración inicial de la muestra bajo repetibilidad

**X<sub>a</sub>**= concentración del patrón añadido

La recuperación promedio para las muestras fortificadas en niveles altos y bajos se encuentra dentro de los rangos por la Organización Mundial de la Salud y por la *Food and Agriculture (OMS/ FAO, 2003)*. Los cuales indican que para mayores a 1 mg/kg, la recuperación debe estar entre un 70 % a un 110 %.

**Anexo 11:** Rendimientos diarios en el Ingenio El Porvenir en días anteriores, posteriores, y durante la aplicación enzimática. Los rendimientos señalados en negrita equivalen a los días en donde se llevó a cabo la dosificación enzimática en el ingenio.

| DIA MOLIENDA | FECHA     | CAÑA MOLIDA DIA | BULTOS AZUCAR BLANCO | RENDIMIENTO MIEL FINAL | REND. AZUCAR ADEL. | REND. MIEL ADEL. | BULTOS BLANCO DIA | RENDIMIENTO DIARIO |
|--------------|-----------|-----------------|----------------------|------------------------|--------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| 68           | 24/3/2022 | 542 810         | 83 480               | 42,28                  | 116,99             | 34,87            | 0                 | 0,00               |
| 69           | 25/3/2022 | 610 460         | 84 880               | 42,27                  | 116,99             | 34,79            | 1 400             | 114,09             |
| 70           | 26/3/2022 | 596 160         | 86 200               | 42,38                  | 116,91             | 34,70            | 1 320             | 110,15             |
| 71           | 28/3/2022 | 644 740         | 87 680               | 42,51                  | 116,91             | 34,70            | 1 480             | 114,20             |
| 72           | 29/3/2022 | 666 530         | 89 200               | 42,46                  | 116,88             | 34,57            | 1 520             | 113,45             |
| 73           | 30/3/2022 | 668 270         | 90 600               | 42,46                  | 116,88             | 34,57            | 1 400             | 104,22             |
| 74           | 31/3/2022 | 642 940         | 92 160               | 42,62                  | 116,94             | 34,47            | 1 560             | <b>120,71</b>      |
| 75           | 1/4/2022  | 324 810         | 93 140               | 42,69                  | 116,88             | 34,42            | 980               | <b>150,10</b>      |
| 76           | 2/4/2022  | 369 400         | 93 920               | 42,86                  | 116,80             | 34,37            | 780               | <b>105,05</b>      |
| 77           | 4/4/2022  | 610 960         | 95 260               | 42,87                  | 116,68             | 34,29            | 1 340             | <b>109,12</b>      |
| 78           | 5/4/2022  | 551 220         | 96 480               | 42,86                  | 116,61             | 34,25            | 1 220             | <b>110,11</b>      |
| 79           | 6/4/2022  | 491 590         | 97 640               | 43,05                  | 116,52             | 34,18            | 1 160             | <b>117,39</b>      |
| 80           | 7/4/2022  | 598 760         | 98 920               | 43,17                  | 116,42             | 34,14            | 1 280             | 106,35             |
| 81           | 8/4/2022  | 494 850         | 99 640               | 43,06                  | 116,31             | 34,07            | 720               | 79,37              |
| 82           | 9/4/2022  | 521 800         | 100 680              | 42,93                  | 116,23             | 34,04            | 1 040             | 108,62             |
| 83           | 11/4/2022 | 530 740         | 100 800              | 42,96                  | 116,10             | 34,05            | 120               | 91,27              |

**Anexo 12:** Datos generados de absorbancia a 420 nm para la obtención de turbidez en Unidades Icumsa (UI)

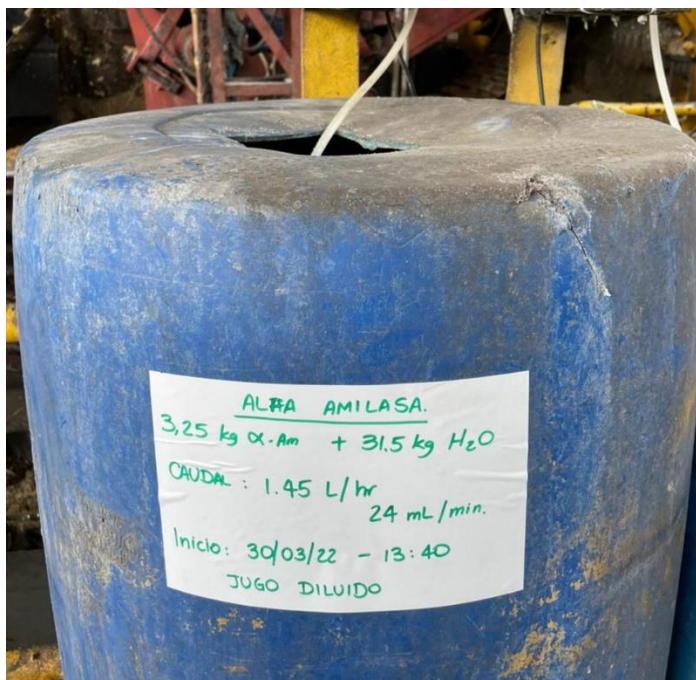
| <b>Lote</b>      | <b>Absorbancia sin filtrar a 420 nm</b> | <b>Absorbancia filtrada a 420 nm</b> | <b>Turbidez (UI)</b> |
|------------------|---|--------------------------------------|----------------------|
| 2291040000200195 | 0,444                                   | 0,288                                | 128                  |
| 2291040000200196 | 0,448                                   | 0,305                                | 117                  |
| 2292040000200197 | 0,380                                   | 0,250                                | 107                  |
| 2294040000200198 | 0,549                                   | 0,333                                | 178                  |
| 2294040000200199 | 0,474                                   | 0,288                                | 151                  |
| 2294040000200200 | 0,455                                   | 0,269                                | 152                  |
| 2295040000200201 | 0,455                                   | 0,257                                | 162                  |
| 2295040000200203 | 0,540                                   | 0,360                                | 148                  |
| 2296040000200204 | 0,409                                   | 0,286                                | 100                  |
| 2296040000200205 | 0,534                                   | 0,365                                | 138                  |
| 2296040000200206 | 0,387                                   | 0,266                                | 98                   |
| 2297040000200207 | 0,414                                   | 0,296                                | 96                   |
| 2297040000200208 | 0,380                                   | 0,266                                | 93                   |
| 2297040000200209 | 0,407                                   | 0,278                                | 105                  |
| 2298040000200210 | 0,422                                   | 0,282                                | 114                  |
| 2298040000200211 | 0,431                                   | 0,305                                | 103                  |
| 2299040000200212 | 0,485                                   | 0,348                                | 114                  |



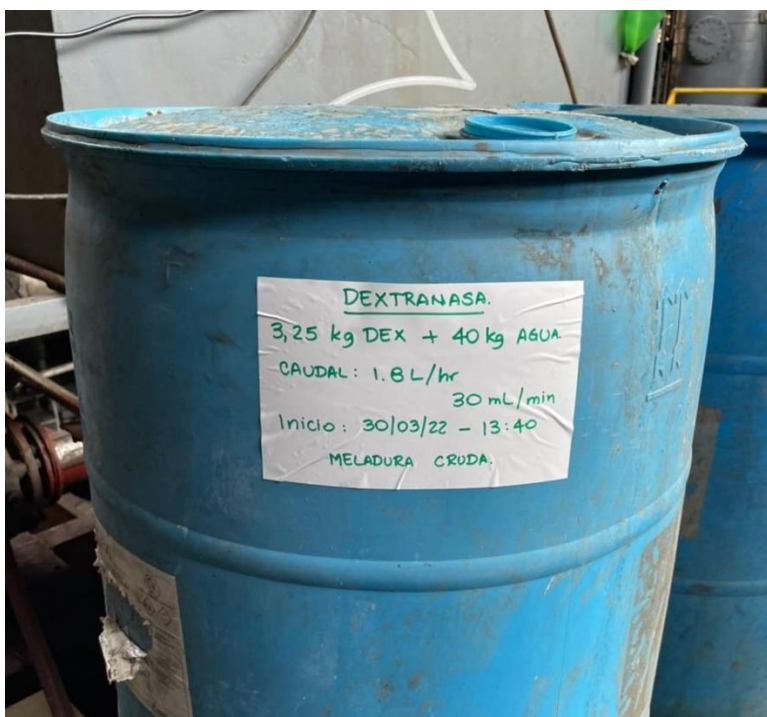
**Anexo 13:** Proceso de extracción de jugo en los molinos, el jugo estancado se integra al proceso.



**Anexo 14:** Dosificación de la alfa-amilasa en el jugo de caña extraído



**Anexo 15:** Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.



**Anexo 16:** Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.

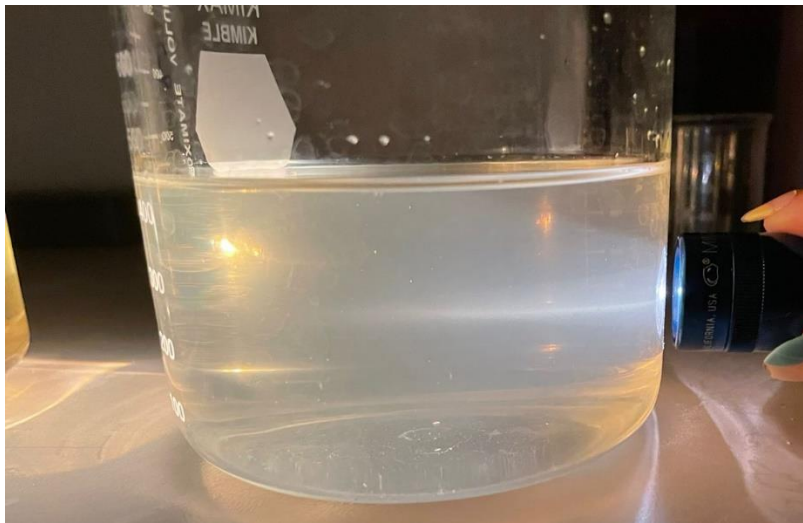




**Anexo 17:** Estañón con la solución preparada a 5 ppm de alfa amilasa.

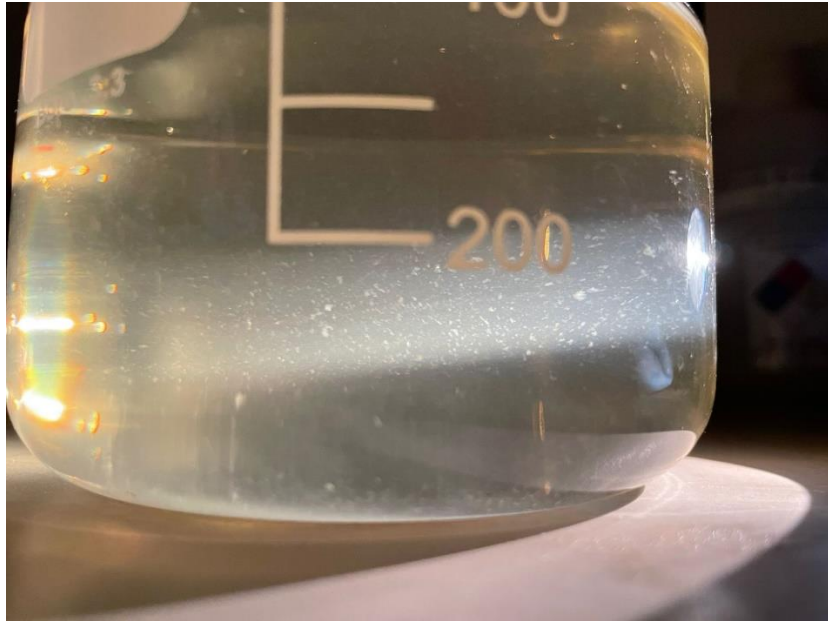


**Anexo 18:** Sitio de reacción de la dextranasa, cascada de meladura clarificada.



**Anexo 19:** Floc de 10 días de grado 0, recuperado del lote consecutivo 198.





**Anexo 20:** Floc de 10 días de grado 1. Recuperado del lote consecutivo 199



**Anexo 21:** Floc de 10 días de grado 2. Recuperado del lote consecutivo 204

San Ramón, 13 de enero de 2023

Constancia de revisión del Filólogo

Sres:

Miembros de la Comisión de Trabajos finales de Graduación  
Universidad de Costa Rica  
Sede de Occidente

Estimados señores:

Yo, MSc. Carlos María Palma Zúñiga, Cédula N°202260865, Filólogo y Curriculista, carné 3367, hago constar que leí y corregí el Trabajo Final de Graduación, denominado “Estandarización de las condiciones óptimas de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso productivo para control de dextranas y almidón en muestras de meladura de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)”, realizado por **Shelvy María Molina Alvarado**, cédula número 207430575 como requisito para que la citada estudiante pueda optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Se consideraron los siguientes aspectos: construcción de párrafos, vicios del lenguaje que se trasladan a lo escrito, ortografía, puntuación y otros relacionados con el campo filológico, y desde ese punto de vista considero que está listo para ser presentado como Trabajo Final de Graduación; por cuanto cumple con los requisitos establecidos por la Universidad.

Suscribe cordialmente,

CARLOS  
MARIA  
PALMA  
ZUÑIGA  
(FIRMA)

Firmado digitalmente por  
CARLOS MARIA  
PALMA ZUÑIGA  
(FIRMA)  
Fecha:  
2023.01.13  
10:25:55 -06'00'

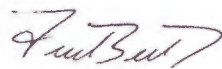
13 de enero de 2023

**M.Ed. Maynor Dadilla Vargas**  
**Director**  
**Sede Occidente**  
**Universidad de Costa Rica**

Estimado Señor, reciba un saludo cordial.

Mediante el presente documento, yo, Fernando Bolaños De Ford, cédula 1-0828-0210, en mi condición de director del trabajo final de graduación titulado: *Estandarización de las condiciones óptimas de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso productivo para control de dextranas y almidón en muestras de meladura de caña de azúcar (Saccharum officinarum)*, desarrollado por la estudiante de la carrera Bach. y Lic. en Laboratorista Químico, Shelvy María Molina Alvarado, cédula 2-0 743-0575, carné B34309, hago constatar que se han incorporado las correcciones indicadas el día de la defensa pública modo virtual el día 15 de diciembre del 2022.

Se despide;



FERNANDO ENRIQUE  
BOLAÑOS DE FORD  
(FIRMA)  
2023.01.23 13:11:55  
-06'00'

---

MBA. Fernando Bolaños De Ford  
Director de TFG  
Gerente de Calidad de LAICA  
fbolanos@laica.co.cr

San Ramón, 13 de enero de 2023

Constancia de revisión del Filólogo

Sres:

Miembros de la Comisión de Trabajos finales de Graduación  
Universidad de Costa Rica  
Sede de Occidente

Estimados señores:

Yo, MSc. Carlos María Palma Zúñiga, Cédula N°202260865, Filólogo y Curriculista, carné 3367, hago constar que leí y corregí el Trabajo Final de Graduación, denominado “Estandarización de las condiciones óptimas de adición de enzimas dextranasa y alfa amilasa en el proceso productivo para control de dextranas y almidón en muestras de meladura de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)”, realizado por **Shelvy María Molina Alvarado**, cédula número 207430575 como requisito para que la citada estudiante pueda optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Se consideraron los siguientes aspectos: construcción de párrafos, vicios del lenguaje que se trasladan a lo escrito, ortografía, puntuación y otros relacionados con el campo filológico, y desde ese punto de vista considero que está listo para ser presentado como Trabajo Final de Graduación; por cuanto cumple con los requisitos establecidos por la Universidad.

Suscribe cordialmente,

CARLOS  
MARIA  
PALMA  
ZUÑIGA  
(FIRMA)

Firmado digitalmente por  
CARLOS MARIA  
PALMA ZUÑIGA  
(FIRMA)  
Fecha:  
2023.01.13  
10:25:55 -06'00'