

Universidad de Matanzas Sede "Camilo Cienfuegos"

Facultad de Ciencias Técnicas

Dpto. de Química e Ing. Química



Título: Proceso de sacarificación de los tallos de yuca residuales para obtener levadura Torula.

Tesis de grado en opción a Ingeniero Químico.

Autor: Miriam Bárbara Orozco Bravo

Tutores: MSc. Ena Hernández López

Ing. Juventino Herrera Pérez.

Matanzas, 2015

Declaración de autoridad

Declaro ser la única autora de este trabajo de diploma que lleva como título: "**Proceso de sacarificación de los tallos de yuca residuales para obtener levadura Torula**", y autorizo a la Universidad de Matanzas Sede Camilo Cienfuegos a hacer uso del mismo con la finalidad que estime conveniente.

FIRMA

Nota de aceptación

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

Dedicatoria

A mi mamá y a mi papá por educarme y haber logrado en mí el espíritu de superación que inculcaron con su ejemplo, por ser las razones por las cuales hoy estoy en la cima de mi sueño que a la vez, es su sueño.

Agradecimientos

A DIOS por darme la salud y la fuerza para mantenerme firme y hoy poder cumplir mi sueño.

A la Revolución Cubana por brindarme la oportunidad de superarme.

A Ena Hernández López por brindarme su apoyo incondicional y su cariño y ternura, que me dieron fuerzas para seguir adelante, y a José Laucerica por su paciencia y por ayudarme en la experimentación y a Juventino Herrera por el apoyo incondicional brindado para la realización de este trabajo, aún en condiciones difíciles.

.A mi mamá Miriam Bravo Pérez por su dedicación, desvelo y apoyo para mi educación, por estar siempre presente cuando más la necesitaba, por su aliento incondicional y porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A mi papá Antonio Orozco Betancourt que se sacrificó siempre al máximo para que yo pudiera continuar estudiando y cumplir mi sueño, que sin su presencia y apoyo tampoco hubiera sido posible.

A mi hermana Yamilis y mi sobrina Liliana por protegerme y estar siempre conmigo.

A mis primas Yenisleidys y Reglita por ayudarme sin dudar cuando más lo necesitaba.

A mis primas Kirenia y Kenia por brindarme todo su apoyo.

A toda mi familia por la comprensión.

A los trabajadores de LABIOFAM por brindarme todo su cariño y ayudarme siempre, en especial a la China, Greter, Roberto, a todos, muchísimas gracias.

A Arley por la confianza y paciencia y por brindarme los laboratorios para realizar los experimentos.

A los técnicos de los laboratorios por ayudarme siempre en todo y por ser tan buenas personas, en especial a Ivanis, Anita, y Daililys.

A todos los profesores de la Universidad de Matanzas Sede Camilo Cienfuegos por brindarme el conocimiento necesario para vencer las materias y mostrarme el camino a seguir, en especial a Josefina, Orozco, Yoney, Irina y Santiago por apoyarme y guiarme para elevar la calidad de este trabajo.

A Carlos Martín por ayudarme y guiarme en la confección de este trabajo.

A los compañeros de la Sede Universitaria de Jovellanos por ofrecerme las posibilidades para conformar este trabajo, en especial a Dania.

A Dolores por permitirme la comunicación con mi tutora.

A mi grupo Q-51 por apoyarme siempre, por tantos momentos de alegría y por tener a quien contar mis tristezas lejos de mi familia, en especial a Dainerys, Claudia, Elaine, Yirela, Greta, Arianna, Rachel y Leyanet.

A TODOS GRACIAS.

Resumen

En el presente trabajo se caracterizan los tallos de yuca residuales (*Manihot esculenta* Cranz) física y químicamente de la variedad Señorita, se realiza la hidrólisis ácida siguiendo un diseño de experimentos compuesto central, se obtiene a partir del mismo un óptimo de mínimo rendimiento para las condiciones de: relación líquido – sólido de 17.5; tiempo de hidrólisis de 1.5 h y diámetro de partículas menor o igual que 0.7mm. Este resultado es considerado en la sacarificación de los tallos de yuca residuales para producir levadura *Torula*, siguiendo diferentes procedimientos: autohidrólisis, hidrólisis enzimática de almidones, hidrólisis ácida y la combinación de la enzimática seguida de la ácida. Posteriormente los hidrolizados se someten a fermentación aeróbica utilizando la levadura *cándida utilis*. El rendimiento de cada hidrólisis y el análisis de la composición de las corrientes obtenidas permitieron realizar el balance de materiales y cuantificar la recuperación y las pérdidas de los componentes de interés. Se constató que en todos los sustratos obtenidos hubo crecimiento microbiano. La hidrólisis enzimática seguida de la fermentación ofrece los mejores resultados técnica y económicamente. La autohidrólisis y la hidrólisis ácida tuvieron similar comportamiento. La utilización de los tallos de yuca permite sustituir un tercio del maíz utilizado para la producción de levadura *Torula* por lo que puede considerarse como una materia prima alternativa.

Abstract

In this work we are going to characterize the yucca roots, physically and chemically (*Manihot esculenta* Cranz), specifically the Señorita variety, we make the acid hydrolysis following a design experiment based in a central compound, it is obtained from a minimum efficiency for the following conditions: relations solid – liquids 17.5; hydrolysis 1.5h and the diameter of the particles less than 0.7mm, this result is considered in sugar conditions of the roots to produce Torula yeast following these steps: autohydrolysis, enzymatic hydrolysis of starch, acid hydrolysis and the combination of enzymatic following the acid ones. Afterwards the ones that been watered are taking to an aerobic fermentation using yeast. The output of every hydrolysis and the analysis of the composition of the obtained currents allowed us to make a balance of the materials in the recover and the losses of the interest component. We can say that in all the obtained substrates have been a microbial growing. The enzymatic hydrolysis following the fermentation offers better results, even and economical. The autohydrolysis technical and the acid hydrolysis had similar behavior. The use of yucca roots may us to substitute 1/3 per cent of corn to produce yeast, that's why this product may be considered an alternative solution for our problems.

Tabla de contenido

Introducción	1
Capítulo 1: Análisis Bibliográfico	4
1.1. La biomasa lignocelulósica como materia prima para la industria química.	4
1.2. Composición de los materiales lignocelulósicos.....	5
1.3.Tratamientos de los materiales lignocelulósicos.	6
1.3.1. Hidrólisis ácida.....	8
1.3.2. Hidrólisis enzimática	9
1.3.3. Hidrólisis de almidones.....	10
1.3.4. Pretratamientos.....	11
1.4. Características de la yuca	12
1.5. Tallos de yuca como materia prima para la industria química.	13
1.6. Tallos de yuca residuales como materia prima para la obtención de levadura Torula.	14
1.7. <i>Cándida utilis</i> como levadura para la obtención de alimento animal.	16
Conclusiones parciales del capítulo	17
Capítulo II. Materiales y Métodos	18
2.1. Recolección y preparación de la materia prima.....	18
2.2. Caracterización de la materia prima.....	19
2.2.1. Caracterización física de los tallos de yuca.	19
2.2.2. Caracterización química de la materia prima.....	20
2.3. Hidrólisis ácida diluida al 0.5% según diseño de experimentos.....	22
2.4. Autohidrólisis	24
2.5. Sacarificación de los tallos de yuca residuales.....	25
2.5.1. Hidrólisis enzimática de almidones.	26
2.5.2. Hidrólisis ácida y autohidrólisis	27
2.5.3. Hidrólisis enzimática seguida de hidrólisis ácida.	27
2.6. Fermentación de los hidrolizados resultantes.....	28
Capítulo III. Análisis de resultados	30
3.1. Caracterización física de los tallos de yuca.....	30
3.2. Composición química de la materia prima.....	31
3.3 Hidrólisis ácida diluida al 0.5% según diseño de experimentos.....	32
3.4 Autohidrólisisde los tallos de yuca.	34
3.5 Sacarificación de los tallos de yuca.....	35

3.5.1. Balance de masa para hemicelulosas y celulosas en cada hidrólisis de los tallos de yuca.	36
3.6. Fermentación de los hidrolizados resultantes.....	38
3.7. Consideraciones económicas sobre el aprovechamiento de los tallos de yuca.	40
3.7.1. Sustitución de maíz por tallos de yuca para la obtención de levadura Torula.	40
3.7.2. Comparación entre los costos de los procesos de sacarificación.	41
Conclusiones Parciales:	43
Conclusiones.....	44
Recomendaciones.....	45
Bibliografía.....	46
Anexos	53

Introducción

Durante los últimos sesenta años la industria química se desarrolló rápidamente gracias a la disponibilidad de materias primas y recursos energéticos baratos y seguros (hidrocarburos). La dependencia de los recursos materiales y energéticos de origen fósil y el daño ecológico debido al abuso de esos recursos representan una seria amenaza para la industria química moderna y para la prosperidad de la humanidad.

El desarrollo económico sostenible requiere de recursos seguros y renovables para la producción industrial. Para esto se pretende que la industria química cambie su base material de recursos inseguros y no renovables a recursos seguros y renovables. La economía material de sustancias dependerá fundamentalmente de la biomasa vegetal. Se necesita entonces transitar de una economía basada en hidrocarburos a una economía basada en carbohidratos. Esto ha llevado a los investigadores a buscar materias primas alternativas, como los materiales lignocelulósicos.

En la actualidad la biomasa lignocelulósica constituye una de las fuentes de energía más extendidas en el mundo y es la fuente de energía renovable en la que descansan las mayores expectativas de desarrollo en las próximas décadas (Carrasco, 2002).

Los materiales lignocelulósicos son el recurso renovable más abundante en el mundo, representan una materia prima atractiva para la obtención de decenas de productos, entre los cuales se encuentran: combustible, resinas, carbón activado, medicamentos, levadura forrajera, fenoles, pulpa y papel, productos de hidrólisis (etanol, ácido láctico) y sus derivados (Taherzadeh y Karimi, 2007). Estos materiales son atractivos por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa (Gray, *et al*, 2006).

Una vía para aumentar la eficiencia económica de la utilización de los materiales lignocelulósicos es la conversión integral de la materia prima siguiendo una filosofía de biorrefinerías, lo que implica la obtención de distintos productos a partir de los diversos componentes de la biomasa (Huang, *et al*, 2008).

La producción de proteínas en Cuba está drásticamente deprimida, de ahí que la producción de piensos para la alimentación animal tenga una fuerte dependencia de la importación de soya y de Northgold con destino a la ganadería. Por tanto, se necesita buscar alternativas nacionales para sustituir ambos renglones importados como una vía económica para enfrentar la demanda creciente de alimentos para animales cuyo destino final sería la especie humana (Herrera y Pons, 2014).

En Cuba, la agricultura y la agroindustria generan cantidades significativas de residuos lignocelulósicos, los cuales no son usados económicamente y su acumulación constituye un problema para el medio ambiente. Entre los desechos agrícolas de interés se encuentran los tallos de yuca.

La producción anual de yuca en Cuba en 2012 ascendió a unas 465 000 toneladas (FAOSTAT, 2014). Teniendo en cuenta que por cada tonelada de yuca se generan 170 kg de tallos, la producción anual de ese residuo es de alrededor de 80 000 toneladas, de los cuales solamente una pequeña parte recibe utilización. Su principal uso es la siembra de nuevas plantaciones (Oseih y Taah, 2009), para ello solo se utiliza del 10% al 20 % (Wambin, *et al*, 2013). La mayor parte constituye un excedente que no recibe ningún uso de relevancia y generalmente se quema o abandona en los campos (Castaño, *et al*, 2011). Esto a su vez provoca erosión de los suelos y el efecto invernadero causado principalmente por gases como el CO₂ (70%), metano (24%) y óxido nitroso (6%) (López, 2011).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores se formula el siguiente **problema científico**:

¿Cómo garantizar el aprovechamiento de las potencialidades de los tallos de yuca residuales para la alimentación animal?

Se conoce del trabajo realizado en la UEB Biopropósito España Republicana sobre la obtención de concentrados proteicos para la alimentación animal utilizando como materia prima: maíz, boniato, afrecho de trigo y yuca (raíz) con resultados alentadores. A partir de esta experiencia se puede plantear la siguiente **hipótesis**:

Si se someten los tallos de yuca residuales a procesos de sacarificación se obtiene un sustrato que permite su aprovechamiento en la obtención de levadura *Torula*.

Objetivo general

Analizar los procesos de sacarificación de los tallos de yuca residuales en la obtención de levadura *Torula*.

Objetivos específicos

- ✚ Caracterizar física y químicamente los tallos de yuca residuales.
- ✚ Definir el tiempo de contacto, la relación líquido – sólido y el diámetro de partícula apropiados para la hidrólisis ácida diluida según diseño de experimentos.
- ✚ Evaluar el efecto del procedimiento de sacarificación de los tallos de yuca residuales en la fermentación del sustrato.
- ✚ Realizar consideraciones económicas de la propuesta planteada.

Capítulo 1: Análisis Bibliográfico

En el presente capítulo se presentan aspectos relacionados con los materiales lignocelulósicos, su composición, los tratamientos necesarios para su aprovechamiento, se profundiza en los tallos de yuca que es la materia prima objeto de estudio y en el proceso de fermentación.

1.1. La biomasa lignocelulósica como materia prima para la industria química.

Actualmente la Industria Química como parte importante de la economía mundial, enfrenta serios retos que amenazan su desarrollo sostenible. Tiene una economía dependiente del petróleo en gran medida, esta es una materia prima no renovable, y sus reservas, aún de acuerdo a los pronósticos más optimistas, se agotarán en unas décadas, además de las implicaciones negativas hacia el medio ambiente.

Esto ha propiciado el interés en la investigación de fuentes de materias primas alternativas. La biomasa, por su carácter renovable y su abundancia, representa la mejor alternativa para sustituirlo total o parcialmente. Los materiales lignocelulósicos son los más prometedores de entre las distintas formas de biomasa. Constituyen una materia prima no alimenticia, rica en carbohidratos y desempeñan un papel importante en la industria química del futuro (López, 2013).

Las industrias basadas en los materiales lignocelulósicos deben transformar todos los componentes en productos útiles. Una planta de este tipo podría elaborar las materias primas requeridas para la fabricación de casi todos los plásticos, fibras y cauchos sintéticos. También se pueden proyectar otros sistemas integrados que incluyan la producción de energía, alimentos y materiales. Estos sistemas pueden contribuir a satisfacer las necesidades de la población mundial en cuanto a productos químicos. Para seguir desarrollándose la industria química tiene que orientarse hacia la base de biorrecursos.

Según el origen de los materiales lignocelulósicos se clasifican en seis grupos (Sánchez y Cardona, 2007):

- ✚ Residuos agrícolas (materiales derivados del cultivo, pajas y tallos)

- ✚ Residuos agroindustriales (bagazo de caña, rastrojo de maíz y pulpa de aceituna)
- ✚ Maderas (duras como aserrín, virutas, ramas y las blandas como las coníferas)
- ✚ Biomasa herbácea (pastos, heno y alpiste)
- ✚ Desechos celulósicos (residuos del procesamiento del papel)
- ✚ Residuos sólidos urbanos (papel, cartón, cáscaras de frutas y verduras)

En Cuba, la agricultura y la agroindustria generan cantidades significativas de residuos lignocelulósicos, los cuales no son usados económicamente y su acumulación es un problema para el medio ambiente.

Su explotación correcta, siguiendo una filosofía de biorrefinerías, puede garantizar el desarrollo sostenible de la Industria Química del futuro, en un escenario de baja disponibilidad de hidrocarburos (Cheng y Zu, 2008), evitando la competencia con la producción de alimentos. Para ello es imprescindible conocer su composición.

1.2. Composición de los materiales lignocelulósicos

La biomasa lignocelulósica consta principalmente de tres componentes, celulosa, hemicelulosa y lignina formando una matriz sólida que dependiendo de las proporciones de cada polímero le confiere al material propiedades de dureza y flexibilidad (Bridgewater, 1999). Es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas, *et al*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994).

❖ Celulosa

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Vander Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando y Waliszewski, 2005; Béguin y Aubert, 1994). Las fibras de celulosa son en mayoría independientes y se unen mediante enlaces de hidrógeno (Pérez, *et al*, 2005).

Es el principal componente de los materiales lignocelulósicos (alrededor del 36-51% en materia seca (MS) y el polisacárido más abundante en la naturaleza (Martín, 2002).

❖ **Hemicelulosa**

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez, *et al*, 2002; Sánchez y Cardona, 2007).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. 15-30% MS y el material de soporte en las paredes celulares (Martín, 2002).

Las celulosas y hemicelulosas no hacen parte de la estructura de la pared celular (Barroso, 2010; Caparros, 2009).

❖ **Lignina**

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro, *et al*, 2005).

Es el polímero aromático más abundante en la naturaleza y el principal componente no-carbohidrato (26-32% MS en maderas blandas y 20-25% en maderas duras; >30% en algunas plantas tropicales) (Martín, 2002).

❖ **Extractivos**

Los compuestos extractivos son una amplia variedad de compuestos que incluyen ácidos resínicos, compuestos fenólicos, aceites esenciales, grasas, ceras, taninos, colorantes y carbohidratos (Martín, 2002).

❖ **Cenizas**

El contenido de cenizas en la madera es bajo (~2% MS). Dentro de los principales componentes se encuentran las sales metálicas (carbonatos, silicatos, oxalatos y fosfatos) (Martín, 2002).

1.3.Tratamientos de los materiales lignocelulósicos.

La composición química de los materiales lignocelulósicos, el aislamiento, purificación y caracterización de sus componentes tiene un gran significado

para la evaluación de estos para ser usados como materias primas en diversos procesos.

Para poder convertir estos materiales es necesario hidrolizar los polisacáridos. Sin embargo, debido a la baja reactividad de la celulosa es necesario pretratar las materias primas (Martín, 2007).

El pretratamiento es la etapa más costosa dentro del proceso productivo ya que es la operación encaminada a superar la resistencia natural de la biomasa a su procesamiento biotecnológico. La finalidad del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares y evitando la degradación o pérdida de carbohidratos así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación (Sun & Cheng, 2002).

Entre los factores que afectan esa etapa se encuentran las limitaciones en la concentración de sólidos en la corriente de alimentación, la necesidad de materiales especiales para la construcción del equipamiento, la separación del hidrolizado del sólido pretratado, y los costos de neutralización y de remoción de los inhibidores generados (Wyman, 2007; Wyman, 2008).

Se han desarrollado diversos tipos de pretratamientos, y se clasifican en físicos, químicos, físico – químicos y biológicos (Cuervo, *et al*, 2009; Martín, 2008). Estos requieren de un alto rendimiento de azúcares, la mínima formación de productos de degradación, la producción de fibra reactiva, un bajo consumo energético y costo de inversión y de la utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables.

Como proceso de pretratamiento se han explorado para estos materiales los siguientes métodos:

- ✚ Hidrólisis ácida concentrada (Liao, *et al*, 2006) y diluida (Cara, *et al*, 2008).
- ✚ Tratamiento alcalino (Carrillo, *et al*, 2005).
- ✚ Tratamiento con solventes orgánicos (Xu, *et al*, 2006).
- ✚ Oxidación húmeda (Martín y Thomsen, 2007).
- ✚ Explosión con vapor (Mosier, *et al*, 2005).

La hidrólisis de los polisacáridos contenidos en los materiales lignocelulósicos es la base para la obtención de etanol, ácido láctico, xilitol, furfural, levadura forrajera, etc. La misma no es más que la ruptura de los enlaces glicosídicos

con formación de los monosacáridos componentes, catalizada por ácidos o por enzimas.

La teoría de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos se basa en la cinética química de las transformaciones de los polisacáridos catalizadas por ácidos. La cinética química incluye el mecanismo de reacción, así como las particularidades del transcurso de las mismas.

La cinética de la hidrólisis de los polisacáridos determina:

- ✚ La composición de la mezcla de reacción.
- ✚ El rendimiento de los productos de interés.

La hidrólisis total conduce a la formación de D-glucosa. Esta reacción responde a la siguiente forma:



1.3.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida consiste en la exposición del material lignocelulósico a la acción de un ácido a una temperatura determinada. Para la hidrólisis ácida se han empleado los ácidos clorhídrico, nítrico y fosfórico (Cara, *et al*, 2007). También se puede emplear el ácido acético (Lavarack, *et al*, 2002; Rodríguez-Chong, *et al*, 2004; Gámez, *et al*, 2006; Rocha, *et al*, 2011). Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman & Elander, 2005).

La ventaja del pretratamiento ácido es la solubilización de hemicelulosa y la conversión de hemicelulosa solubilizada en azúcares fermentables (Pedersen & Meyer, 2010).

La hidrólisis catalizada con ácidos diluidos es un método aplicable en la industria, pero la conversión de la celulosa es baja y la descomposición de los monosacáridos es un serio problema. La misma tiene como principal objetivo la

ruptura de los enlaces glicosídicos sin provocar transformaciones secundarias de los monosacáridos formados.

Con el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido se han logrado alta recuperación de azúcares (Cara, *et al*, 2007). Sin embargo, las limitantes de este son la destrucción parcial de la hemicelulosa y la separación incompleta de la lignina y de los carbohidratos, así como la generación de compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en procesos de fermentación (Mackie, *et al*, 1985). Su principal inconveniente es el alto costo de los materiales anticorrosivos requeridos para la construcción de los reactores (Mosier, *et al*, 2005). Gracias al desarrollo continuo de investigaciones se ha logrado identificar que los factores que afectan el pretratamiento son el tiempo de residencia, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad de la biomasa (Duff & Murray, 1996).

Para lograr la hidrólisis completa de la celulosa se deben emplear ácidos concentrados que permitan el hinchamiento necesario y la destrucción parcial de las regiones ordenadas (Martín, 2002). La hidrólisis catalizada con ácidos concentrados permite altas conversiones de los polisacáridos, pero sus inconvenientes dificultan su aplicación.

1.3.2. Hidrólisis enzimática

Debido a los inconvenientes de la hidrólisis ácida, durante los últimos años se le ha dedicado especial atención a la hidrólisis enzimática (Martín, 2002), la cual consiste en el uso de enzimas en lugar de ácidos para catalizar la hidrólisis de los polisacáridos contenidos en los materiales lignocelulósicos. Es un método prometedor para lograr altas conversiones de todos los polisacáridos, aunque la disminución del costo de las enzimas es un reto para los científicos. Presenta como ventajas que es un método selectivo, con un mayor rendimiento, sin el inconveniente de la formación de productos colaterales (Tahezadeh & Karimi, 2007), con ella ocurre la ruptura selectiva de los enlaces glicosídicos, no ocurren degradaciones indeseadas de los carbohidratos. Entre sus limitaciones se encuentra el alto costo de las enzimas y el requerimiento de grandes reactores debido a la lentitud de la reacción (Martín, 2002).

La hidrólisis enzimática está limitada por varios factores, tales como la cristalinidad, grado de polimerización, contenido de humedad, área superficial disponible y contenido de lignina (Cardona & Orrego, 2009).

El tamaño del poro en relación con el tamaño de las enzimas es el principal factor limitante en la hidrólisis (Grous, *et al*, 1986).

Otros fenómenos que afectan el desempeño enzimático son la lignina que limita la velocidad y extensión de la hidrólisis actuando como escudo (Zhang & Lynd, 2004) y que las celulasas queden atrapadas en el poro si el área interna del material es mayor que la externa (Chang & Holtzaple, 2000).

1.3.3. Hidrólisis de almidones.

La hidrólisis del almidón se puede hacer por dos vías: ácida o enzimática. La hidrólisis ácida del almidón a glucosa es una técnica que tiene muchas desventajas: formación de productos no deseables y flexibilidad muy pobre (el producto final sólo se puede modificar cambiando el grado de hidrólisis), por último es necesaria que el equipo resista el ácido y las temperaturas requeridas durante el proceso. La hidrólisis enzimática en los últimos 30 años ha desplazado la hidrólisis ácida, debido a que se dispone de nuevas enzimas. Hoy en día la mayor parte de la hidrólisis de almidón se realiza usando enzimas, ya que esta técnica presenta ventajas como: control de la formación de productos no deseables y mayor flexibilidad del producto.

La hidrólisis enzimática de almidones se realiza con la utilización de dos enzimas, las cuales forman la combinación necesaria para hidrolizar completamente al almidón. La alfa-amilasa (Alfa 1,4-D- GlucanGlucano-hidrolasa) hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa en unión alfa-1,4. El ataque se hace en forma no selectiva (tipo endoenzima) sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5-7 unidades de glucosa, o un número múltiplo. La amiloglucosidasa (Alfa-1,4- D-Glucanglucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y alfa-1,6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (Mera y Carrera, 2005).

1.3.4. Pretratamientos

En los pretratamientos con solventes orgánicos se utilizan el metanol, etanol, acetona y ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 ó HCl) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao, *et al*, 2009).

El método de oxidación húmeda es apropiado solamente para compuestos con bajo contenido de lignina y no es aplicable si se quiere utilizar la lignina como combustible. En el mismo el tratamiento con agua y aire u oxígeno se realiza a temperaturas superiores a $120^{\circ}C$. La combinación de oxidación húmeda con hidrólisis alcalina disminuye la formación de aldehídos furánicos (Mosier, *et al*, 2005).

En el método de explosión con vapor se utiliza vapor a alta presión, seguido de una reducción brusca de la misma, temperaturas altas ($>220^{\circ}C$) y tiempos cortos (~ 1 min). Para la optimización es importante el tipo de material, el tamaño de partícula y el contenido de humedad. La variación provoca distintos grados de degradación de componentes principales, y formación de inhibidores de la fermentación (Mosier, *et al*, 2005).

La hidrólisis alcalina es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, lo que causa la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan, *et al*, 1987). La utilización de bases permite la disolución de la lignina, pero sus costos son altos, haciendo estos métodos no competitivos a gran escala (Sun & Cheng, 2002).

El pretratamiento alcalino tiene efectos similares al de los ácidos sobre la biomasa pero su desventaja es el largo tiempo residencia y las sales formadas no son recuperables.

Existen otros pretratamientos, que tienen una destrucción incompleta de la matriz lignina carbohidratos y los costos son altos, además que algunos como los solventes iónicos se encuentran en fase de experimentación (Menon & Rao, 2012).

La naturaleza y la concentración de compuestos potencialmente tóxicos generados en los pretratamientos pueden variar en gran medida de acuerdo a las condiciones como la temperatura, la presión, el tiempo de residencia, el tipo de materia prima y de la presencia de catalizadores ácidos (García & Aparicio *et al*, 2006).

Cuando se realiza un pretratamiento de los materiales lignocelulósicos es necesario tener en cuenta la factibilidad técnica y/o económica del método utilizado. Así como que la combinación de los métodos puede ser efectiva y que distintos métodos afectan de manera diferente los componentes de los materiales lignocelulósicos (Eggeman & Elander, 2005).

1.4. Características de la yuca

La yuca (*Manihot esculenta*), internacionalmente reconocida como mandioca, tapioca, guacamota, casabe o casava, es un arbusto perenne de la familia de las Euforbiáceas extensamente cultivado en Sudamérica, África y el Pacífico por sus tubérculos con almidones de alto valor alimentario. Alcanza los dos metros de altura. Está adaptada a condiciones de la zona intertropical, por lo que no resiste las heladas. Requiere altos niveles de humedad —aunque no anegamiento— y de sol para crecer.

Es un cultivo con alta producción de raíces reservantes, como fuente de carbohidratos y follajes para la elaboración de harinas con alto porcentaje de proteínas. Las características de este cultivo permiten su total utilización, el tallo para su propagación vegetativa, sus hojas para producir harinas y las raíces para el consumo en la alimentación en la que se emplea en diferentes platos, también para la elaboración de casabe, la agroindustria y la exportación. La yuca es la séptima mayor fuente de alimentos básicos del mundo. Algunos la califican de "base de la vida" tropical, porque es una de las más importantes fuentes de alimentación en extensas áreas de los trópicos. Es un cultivo apreciado por su fácil y amplia adaptabilidad a diversos ambientes ecológicos, el poco trabajo que requiere, la facilidad con que se cultiva y su gran productividad. Puede prosperar en suelos poco fértiles, en condiciones de poca pluviosidad. En condiciones óptimas la yuca puede producir más calorías alimenticias por hectárea que la mayoría de los demás cultivos alimenticios tropicales (Colaboradores de Wikipedia, 2015).

Los clones autorizados para plantar en nuestro país son: 'Señorita', 'CMC-40', 'CEMSA 74-725', 'CEMSA74-6329' e 'INIVIT Y 93-4'. Los cuatro primeros son las variedades más utilizadas en la provincia de Matanzas. A continuación aparecen explicados según (Rodríguez, 2008):

'Señorita'

Tallo carmelita claro, con hojas verdes y peciolo ligeramente rosados en adultas, en hojas jóvenes los peciolo son rojos por la parte superior y verde – rojo por la parte inferior. Presentan porte erecto, muy poco ramificada. El tallo es muy vigoroso y de entrenudos cortos, con raíces cortas y de color blanco.

'CMC-40'

Plantas de 1,5 – 2,5 m de altura, con más de 2 ramificaciones, de porte semi erecto, con tallos de color marrón oscuro y follaje joven verde-rojizo, peciolo rojos e inclinados hacia arriba, de forma irregular, hojas adultas verdes y jóvenes rosadas, de superficie rugosa y crecimiento oblicuo, de color castaño oscuro la película externa, corteza rosada y pulpa blanca.

'CEMSA 74-725'

Planta de 1,5 a 2,5m o más, con porte erecto y poco ramificada, presenta tallos de color verde – rojizo, hojas de color verde las adultas y verde rojizo las jóvenes, con peciolo de color rojo, inclinados hacia arriba, de forma irregular. Son lisas, cilíndricas, corteza rosada y pulpa blanca.

'CEMSA 74 – 6329'

Planta de 1,5 a 2,5 m, que presenta porte medianamente ramificado, tallos de color plateado, hojas de color verde oscuro cuando adultas, follaje joven verde-rojizo, peciolo verde-rojo en las hojas jóvenes, y en las hojas adultas, rojo por la parte superior y rojo-verde por la parte inferior. Son lisas, cilíndricas, pedunculadas; la película externa de color castaño claro, corteza de color crema y pulpa blanca.

1.5. Tallos de yuca como materia prima para la industria química.

Hasta ahora se ha investigado poco sobre el fraccionamiento de los tallos de yuca, los cuales serían mucho mejor aprovechados si se procesase en biorrefinerías lignocelulósicas para la producción de diversos productos de alto valor económico y social.

En la literatura revisada para los tallos de yuca se reporta que en la oxidación húmeda se obtuvo peores resultados que para el bagazo de caña (Martín & Thomsen, 2007). No se ha reportado la utilización de explosión con vapor. Sin embargo la prehidrólisis ácida (Martín, *et al*, 2007) y la alcalina (Nuwamanya, *et al*, 2012) son frecuentemente utilizadas.

Actualmente se investigan los tallos de yuca como fuente de materia prima para la obtención de etanol celulósico (Han M, *et al*, 2011, Nuwamanya, 2012 y Liscano, 2014). Se han realizado ensayos a nivel de laboratorio, de pretratamientos con hidrólisis ácida diluida (Han M, *et al*, 2011, Nuwamanya, 2012 y Liscano, 2014), y alcalina (Nuwamanya, 2012), siendo las condiciones óptimas 177°C, que coincide con trabajos realizados (Martínez, 2011), seguido de hidrólisis enzimática.

La literatura reporta la extracción de almidón de los tallos de yuca, donde usando el método de amiloglucosidase con α -amilasa, se demostró que la extracción de almidón varía con el tamaño de partícula ya que para $\geq 2\text{mm}$ de tamaño se obtuvo 5-6% de almidón y para $\leq 0.5\text{mm}$ se obtuvo 18% de este, por tanto se obtuvo tres veces más con menor tamaño de partícula. Además la temperatura tiene un efecto positivo estadísticamente, mientras que el tiempo no muestra valores significativos. Para una altura de 70-100cm de los tallos de yuca existe un mayor contenido de almidón (30%) (Wambin, *et al*, 2013).

Además, se hace una propuesta tecnológica para la producción de biogás a partir de los residuos (sólidos y líquidos) del procesamiento de esta materia prima.

1.6. Tallos de yuca residuales como materia prima para la obtención de levadura *Torula*.

Se consultó el informe de un trabajo presentado a Fórum de Ciencia y Técnica (Herrera y Pons, 2014), en el cual se sustenta la tecnología para obtener concentrados proteicos a partir de diferentes materias primas, tales como maíz, boniato, afrecho de trigo, yuca entre otros, y la combinación de estos, para la obtención de levadura *Torula* a partir de dicho sustrato, obteniéndose buenos resultados en las diferentes pruebas ensayadas. En este proceso se considera como etapas fundamentales: recepción y tratamiento de la materia prima, hidrólisis de almidones, fermentación, termólisis, secado y molido – envase.

La caracterización química de los tallos de yuca, realizada por investigadores de la Universidad de Matanzas, reveló que estos están constituidos en un 46% por carbohidratos (Martín, *et al*, 2006).

Los tallos de yuca presentan entre 20% y 30% de almidón en materia seca (Rattanachomsri, *et al*, 2009), aunque (Wambin, *et al*, 2013) plantea que el contenido de almidón en los tallos de yuca varía de 22-39%. Estos valores presentan pequeñas diferencias debido a que dependen del lugar de crecimiento, variedad, extensión y edad de la planta. No obstante, son comparables con las materias primas utilizadas en estos procesos.

Los gránulos de almidón están formados por una mezcla de dos polisacáridos: Amilasa y Amilopectina. Estos son polímeros de unidades de glucosa conectadas por enlaces glicosídicos α -1, 4. La amilasa contenida en los almidones es de 20-30%, el resto es de amilopectina. Estudios realizados reportan que la *Manihot esculenta* presenta un 23% de amilasa, pero la composición de este polisacárido varía con la variedad de yuca y su rango es de 16-35% (Perez, *et al*, 2013). El almidón en los tallos de yuca es el 20% del que se encuentra presente en la raíz (Wambin, *et al*, 2013), pero la raíz es un alimento para las personas, mientras que los tallos no lo son, por tanto existe competencia para la alimentación humana.

La fermentación es un proceso complejo en el cual el organismo para su crecimiento intercambia materia y energía con el ambiente. El medio ejerce una presión selectiva sobre las células y condiciona la formación de productos.

El organismo intercambia materia y energía con el ambiente, crece y se obtiene un producto de interés; el ambiente para que eso ocurra lo garantiza el biorreactor (Stanbury, *et al*, 2003).

La fermentación es un proceso biológico que a través de una fuente de carbono como lo es la glucosa por vía aeróbica es convertida a levadura forrajera.

A partir de estos elementos la autora del presente trabajo considera oportuno estudiar el aprovechamiento de los tallos de yuca dada su composición química mediante la hidrólisis enzimática de almidones y la hidrólisis ácida en la obtención de un sustrato que pueda ser fermentado para producir levadura *Torula*.

1.7. *Cándida utilis* como levadura para la obtención de alimento animal.

Las levaduras son los microorganismos más ampliamente utilizados en la producción de la proteína unicelular, la cual se refiere al hecho de que la mayoría de los microorganismos usados como productores, crecen como individuos simples o filamentosos más que como complejas estructuras multicelulares como las plantas y los animales (Otero, *et al*, 2012).

Los géneros de mayor aplicación práctica e investigativa han sido la *Cándida*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (Otero, *et al*, 2012; Bekatorou, *et al*, 2006, Al-Eid, *et al*, 2010, Nasser, *et al*, 2011).

De los microorganismos que se pueden utilizar, se ha mostrado favorecido el uso de la especie *Candida utilis*, no solamente por su capacidad en asimilar hexosas y pentosas, sino también otros compuestos orgánicos no azúcares, tales como ácidos, alcoholes y aldehídos (Otero y Almazán, 2012). Este género ha sido empleado principalmente con propósitos forrajeros (Sandrasegarampillai y Arasaratnam, 2011).

Pueden ser cultivadas en una amplia variedad de sustratos, entre los que se encuentran los hidrolizados de la celulosa, (Cruz y Parajo, 1998).

Entre las ventajas de las levaduras se encuentran las siguientes (Otero, *et al*, 2012):

- ✚ Larga historia en el consumo por humanos y animales.
- ✚ Mercado tradicional.
- ✚ Posibilidad de usar sustratos de bajo costo.
- ✚ Contenido de proteínas y perfil de aminoácidos favorable, lo que infiere un alto valor nutricional.

Existen diferentes factores que afectan el rendimiento de la biomasa de levadura, dentro de los cuales se encuentran los siguientes:

1. *Relación Carbono/Nitrógeno*: Para alcanzar el contenido óptimo de proteínas este valor debe estar entre 7:1 y 10:1 (Klibansky, *et al*, 1983).
2. *pH del medio*: El pH óptimo de las levaduras varía entre 3.5 y 5, frecuentemente en la producción de levadura a escala industrial el pH se mantiene por debajo de 4 para evitar contaminaciones con bacterias. Esto permite trabajar con sistemas asépticos, o estériles, lo que reduce los costos (Otero, *et al*, 2002; Otero, *et al*, 2003; Martínez, *et al*, 2004).

3. *Temperatura*: La mayoría de las levaduras crecen entre 28 - 35°C. Algunas especies pueden crecer hasta temperaturas de 42 – 47°C dentro del rango de la termotolerancia (Oprean, 1998; Cimpeanu, *et al*, 2010).
4. *Oxigenación*: Para el crecimiento de sustratos altamente oxigenados como los carbohidratos, se requiere un gramo de oxígeno por gramo de biomasa seca (Viser, *et al*, 1990).

Para seleccionar un microorganismo para la producción de proteína unicelular se analizan los siguientes aspectos (Otero, *et al*, 2012):

- ✚ Altas tasas de crecimiento, productividad y rendimiento de biomasa en el sustrato a emplear.
- ✚ Tolerancia al pH y la temperatura.
- ✚ Requerimiento de aireación y propiedades de formación de espuma del medio de cultivo.
- ✚ Morfología de crecimiento en el fermentador.
- ✚ Seguridad y aceptabilidad – total inocuidad, ausencia de toxinas.
- ✚ Facilidad de recuperación.
- ✚ Contenido de proteínas, ARN y calidad nutricional de la biomasa resultante.
- ✚ Propiedades estructurales adecuadas en el producto final.

Conclusiones parciales del capítulo

1. Los materiales lignocelulósicos son la fuente renovable de energía y materias primas más abundante en la Tierra, pero su utilización actual es inferior a su potencial real.
2. Los tallos de yuca constituyen una materia prima de interés para la producción de diversos bioproductos, entre los cuales se encuentra la levadura forrajera.
3. La hidrólisis enzimática de almidones e hidrólisis ácida diluida son procesos de sacarificación con potencialidades para el aprovechamiento de los tallos de yuca residuales.
4. Los factores influyentes en los tratamientos son: el tiempo de residencia, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad de la biomasa.

Capítulo II. Materiales y Métodos

En el presente capítulo se describen los procedimientos aplicados y equipos fundamentales utilizados en la investigación. El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio del Grupo de Tecnología de Biorrecursos del Departamento de Química e Ingeniería Química de la Universidad de Matanzas Sede “Camilo Cienfuegos” y en la UEB España Republicana de LABIOFAM.

Como primer paso se realizó el análisis documental, se visitó el Ministerio de la Agricultura Provincial, se consultó el reporte estadístico de las siembras de yuca en la provincia (anexo 1) y se entrevistó a personal calificado de la entidad para verificar lo reportado por la literatura (Wambin, *et al*, 2013) con respecto al aprovechamiento en la propagación del cultivo que es entre 10-20% de los tallos, lo cual fue confirmado.

A partir del hecho de que existe disponibilidad de tallos en la provincia se procede al trabajo experimental.

El trabajo experimental consta de las siguientes etapas:

- ✚ Recolección y preparación de la materia prima;
- ✚ Caracterización física y química de la materia prima;
- ✚ Hidrólisis ácida diluida al 0.5% según diseño de experimentos;
- ✚ Autohidrólisis;
- ✚ Sacarificación de los tallos de yuca residuales.
- ✚ Fermentación de los hidrolizados resultantes de la hidrólisis enzimática, ácida, de ambos procesos combinados así como de la autohidrólisis

2.1. Recolección y preparación de la materia prima.

Los tallos de yuca (*Manihot esculenta*) de la variedad Señorita se colectaron en áreas de la finca “Los Mateu” ubicada en el municipio de Jovellanos, Matanzas. Los tallos frescos se secaron al sol y al aire durante una semana, se trituraron en un molino del tipo CREMASCO Brasileño modelo DP – 4 hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 2mm. Posteriormente, el material se tamizó para obtener una fracción de 1mm de tamaño de partícula, la cual fue utilizada consecutivamente para la caracterización química de la materia prima. Las dos fracciones fueron conservadas en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

2.2. Caracterización de la materia prima.

2.2.1. Caracterización física de los tallos de yuca.

Los tallos de yuca analizados una vez separados de la raíz, fueron cortados a partir de 40 – 110cm aproximadamente, teniendo en cuenta que para una altura de 70-100cm de los mismos existe un mayor contenido de almidón (Wambin, *et al*, 2013).

En la caracterización física realizada inicialmente fueron evaluados cada uno de manera individual, para un total de 42 tallos, donde los aspectos analizados se describen a continuación:

- ✚ Nudos: Es importante conocer la cantidad de nudos que tienen los tallos de yuca debido a que en ellos se encuentra menos cantidad de almidón.
- ✚ Longitud: La longitud de los tallos fue medida con cinta métrica
- ✚ Diámetro: El diámetro se midió con pie de rey en ambos extremos y en el centro de los tallos.
- ✚ Peso: El peso de los tallos se obtuvo con balanza técnica
- ✚ Volumen: Se determinó el volumen de los tallos utilizando la ecuación del volumen para un cilindro, la cual se expone a continuación:

$$V = \frac{\pi}{4} * D^2 * L \quad (\text{Ec 2.2.1})$$

- ✚ Densidad: La densidad es un aspecto de gran importancia ya que describe el volumen que se necesita para almacenar una cierta cantidad de materia.
- ✚ Peso por longitud: Este valor fue calculado debido a que describe físicamente los tallos.

Algunas de estas variables fueron procesadas mediante el paquete estadístico *Statgraphics Plus versión 5.0 for Windows*.

Además se realizaron pruebas preliminares de almidón, donde los tallos fueron cortados de manera recta por ambos extremos y posteriormente fue añadida la disolución de Iodo, proporcionando de esta manera una buena visión de la coloración alcanzada en los tallos. Por método gravimétrico se determinó la composición en peso de la presencia de almidón.

También se efectuaron pruebas de absorción para esta materia prima, la cual presenta un 72.16% MS. Esta se realizó con el objetivo de analizar la mínima

relación líquido – sólido que debe emplearse para efectuar la hidrólisis de los tallos de yuca.

2.2.2. Caracterización química de la materia prima.

La determinación del contenido de humedad, componentes minerales, sustancias extractivas, carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosas) y lignina de la materia prima se realizó siguiendo procedimientos analíticos de la Academia Forestal de San Petersburgo, Rusia (Obolenskaja, 1986), actualizados a partir de protocolos del *National Renewable Energy Laboratory* de los EE.UU (Sluiter, *et al*, 1998).

- ✚ **Humedad:** El material se secó a 105°C en una estufa (AISET® YLD-6000, R.P. China) durante 24h, y el contenido de humedad se determinó gravimétricamente utilizando una balanza analítica digital (Sartorius BS 124S, China).
- ✚ **Cenizas:** Se determinó después de la incineración de una alícuota del material a 750°C en horno mufla analógica con control térmico (AISET YLD-6000, Alemania) durante 24 h.
- ✚ **Extractivos totales:** Se suspendieron aproximadamente 4g de la materia prima con 160mL de etanol y se calentaron a temperatura de ebullición con reflujo durante 12 horas en un baño de María (Midingen / Sitz Freital, Alemania). El dedal utilizado para añadir la materia prima se dejó escurrir a temperatura ambiente y luego se secó en la estufa (AISET® YLD-6000, R.P. China) a 50°C durante 24 horas. El contenido de extractivos totales se cuantificó gravimétricamente utilizando una balanza analítica digital (Sartorius BS 124S, China).
- ✚ **pH:** Se realizó por el método potenciométrico directo con pH metro MV 88 con electrodo de vidrio combinado.
- ✚ **Azúcares reductores totales (ART):** Se realizó colorimétricamente por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959) como desarrollador de color, y se leyó la absorbancia a 546nm en un espectrofotómetro UV (Zuzi UV-4200, España).
- ✚ **Polisacáridos fácilmente hidrolizables (PFH):** La determinación de los polisacáridos fácilmente hidrolizables se realiza mediante análisis gravimétrico del residuo sólido remanente después de la hidrólisis de las

hemicelulosas. En un balón de destilación de 100mL de capacidad se mezclaron 2g de muestra libres de extractivos con 20mL de ácido clorhídrico al 5% en masa. La mezcla agitó por 30 minutos y después se mantuvo a ebullición durante 3 horas en un equipo de reflujo colocado en un baño de maría. Al finalizar, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se filtró a vacío. Los residuos sólidos de la filtración fueron secados a 60°C durante 24h, enfriados y pesados.

$$PFH = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2.2})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_1 , masa del residuo, g.

Polisacáridos difícilmente hidrolizables (PDH):

Los residuos de la determinación de los PFH fueron pesados e introducidos en vasos de precipitado de 100mL. A cada vaso se adicionó 15mL de ácido sulfúrico al 72% en masa, y la mezcla se mantuvo durante 2h a temperatura ambiente con agitación cada 20 minutos. Posteriormente, la mezcla fue transferida a un balón de destilación de 500mL, se le adicionó 135mL de agua destilada y se reflujo durante 2h en un baño de agua. Finalmente, la mezcla se enfrió y se filtró a vacío. El residuo de la filtración se secó a 60°C durante 24h, se enfrió y pesó. El contenido de PDH se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$PDH = \frac{(m_2 - m_3)}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2.3})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_2 , masa inicial del residuo de la determinación de PFH, g.

m_3 , masa final del residuo de este proceso, g.

Lignina de Klason:

Se determinó a partir de realizar la hidrólisis ácida analítica de los tallos por triplicado, donde se pesan 0.3g de muestras y se añaden en tubos de ensayo, donde se mezclan con 3mL de ácido sulfúrico al 72% y se calienta a 30°C por 2h, agitando ocasionalmente. Una vez transcurrido este tiempo se añade esta mezcla en un frasco de 250mL con 84mL de agua destilada, se pesa y se

realiza un tratamiento en la autoclave a 121°C por 1h. Posteriormente se filtra a vacío y el sólido resultante se enjuaga con bastante agua destilada, se seca a 60°C por 24h, se enfría y se pesa, la lignina se determina por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{m_{fhaa}}{m_{os}} * 100 \quad (\text{Ec.2.2.4})$$

Donde:

m_{fhaa} , masa final de sólido resultante de hidrólisis ácida analítica.

m_{os} , masa inicial de la muestra seca.

Además se determinó mediante la cuantificación gravimétrica del residuo obtenido en la determinación de polisacáridos difícilmente hidrolizables. El contenido de lignina se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{m_3}{m_0} * 100 \quad (\text{Ec. 2.2.5})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_3 , masa final del residuo de la determinación de PDH, g.

2.3. Hidrólisis ácida diluida al 0.5% según diseño de experimentos.

El diseño de experimentos se planificó utilizando el paquete *Statgraphics Plus versión 5.0 for Windows*, se utilizó el método de compuesto central, el cual está representado por la siguiente ecuación:

$$N = 2^k + 2 * k + c \quad (\text{Ec. 2.3.1})$$

Donde:

N: número de experimentos a realizar.

K: número de variables presentes (3).

C: Experimentos a condiciones centrales (2); por lo que la estrella es rotacional.

2*k: Experimentos a condiciones superiores e inferiores a los respectivos extremos, llamados estrellas.

Las variables fijadas que se utilizaron fueron:

Temperatura = 85°C.

Concentración de ácido = 0.5%.

Las variables que se modifican son:

1. El tiempo: Se selecciona a partir de los resultados reportados para este material, 0.5h (Martínez, 2011) y es entre 0.67h - 1.33h (40 - 80 minutos).
2. Relación líquido – sólido (másica): A partir de ensayos preliminares se decide trabajar entre 15 y 20.
3. El tamaño de partícula: Teniendo en cuenta lo reportado en la literatura (Wambin, *et al*, 2013) se decide trabajar entre 0.5mm y 2mm.

A continuación se muestran las condiciones a las que se realizaron los experimentos.

Tabla 2.3.1. Condiciones de las hidrólisis ácidas diluidas al 0.5%.

Hidrólisis ácida diluida (0.5%)	Relación líquido/sólido	Tiempo de contacto (minutos)	Diámetro de partícula (mm)
Ha ₂	15	80	2
Ha ₃	15	40	2
Ha ₄	20	40	2
Ha ₅	20	80	2
Ha ₆	15	40	1
Ha ₇	15	80	1
Ha ₈	20	40	1
Ha ₉	20	80	1
Ha ₁₀	21.7	60	1.5
Ha ₁₁	17.5	26.4	1.5
Ha ₁₂	17.5	60	1.5
Ha ₁₃	13.3	60	1.5
Ha ₁₄	17.5	60	2.3

Ha ₁₅	17.5	93.6	1.5
Ha ₁₆	17.5	60	0.64
Ha ₁₇	17.5	60	1.5

Fuente: Elaboración propia.

En este diseño la variable respuesta es el rendimiento de sólidos.

Para realizar estas hidrólisis se tomaron 10g de muestras tallos de yuca según las condiciones de tamaño de partícula se mezclaron en un beaker de 0.5L con una solución de ácido fosfórico a la concentración de trabajo hasta alcanzar los gramos de mezcla correspondientes a cada relación líquido - sólido. Las suspensiones obtenidas se trataron a 85°C en un termostato durante el tiempo de hidrólisis previamente seleccionado. Al concluir, se dejó enfriar, se retiraron los frascos, y su contenido fue filtrado a vacío. El residuo sólido fue lavado primero con abundante agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. El filtrado se conservó a 4°C luego de tomar muestras para análisis de pH y de azúcares reductores totales. Los sólidos lavados fueron secados a temperatura ambiente durante dos días. Luego se pesaron los sólidos y se determinó su contenido de humedad para poder cuantificar el rendimiento de sólidos pretratados mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \left[\frac{\text{Peso}_{\text{final}} \cdot (1 - H_2)}{\text{Peso}_{\text{inicial}} \cdot (1 - H_1)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.3.2})$$

Donde:

H₂, humedad del sólido pretratado, %.

H₁, humedad del sólido antes de tratar, %.

Para procesar los resultados se utiliza el paquete *Statgraphics Plus versión 5.0 for Window*.

2.4. Autohidrólisis

Se realizaron autohidrólisis de los tallos de yuca a dos condiciones aleatorias de hidrólisis ácidas con el objetivo de comparar su rendimiento, ya que este representa un procedimiento más noble, el procedimiento seguido es similar al descrito en el epígrafe 2.3 pero en ausencia de ácido.

En la siguiente tabla se muestran las condiciones utilizadas:

Tabla 2.4.1. Condiciones de las autohidrólisis.

Hidrólisis	Tiempo (minutos)	Relación Líquido/Sólido	Tamaño de partículas (mm)
Auto Hidrólisis ₁	40	15	1
Auto Hidrólisis ₂	60	17.5	1.5

Fuente: Elaboración propia.

2.5. Sacarificación de los tallos de yuca residuales

Una vez seleccionados y caracterizados físicamente los tallos de yuca, estos fueron secados a 70°C durante 24h para facilitar su trituración, posteriormente se molieron utilizando un molino del tipo CREMASCO Brasileño modelo DP – 4, con motor eléctrico de 10 – 12 caballos de vapor, con sentido de rotación antihorario, 3535 r.p.m., 320 revoluciones en el eje de la picadora y un rendimiento de 87.5%.

Posteriormente se determinó la potencia consumida por la molienda de los tallos de yuca (4035g de tallos húmedos). Este cálculo se realizó por la siguiente ecuación:

$$Pot = \frac{I * Vol * 1.73 * \cos \phi}{1000} \quad (\text{Ec. 2.5.1})$$

Donde:

I: Corriente real consumida [A]

Vol: Voltaje [Volt]

Pot: Potencia consumida en la molienda [kW]

Los tallos de yuca molidos fueron tamizados, se utilizan los de tamaño de partículas menor e iguales que 0.84mm, se utiliza el menor diámetro de partículas considerando los mejores resultados de la hidrólisis ácida.

Se determinó el contenido de materia seca presente en estos tallos con pruebas de humedad realizadas en una estufa (AISET® YLD-6000, R.P. China) a 105°C durante 24 horas.

El proceso de sacarificación de los tallos de yuca se realizó a partir de cuatro procedimientos diferentes con el objetivo de valorar el comportamiento y establecer comparaciones entre ellos:

✚ Hidrólisis enzimática,

- ✚ Hidrólisis ácida,
- ✚ Hidrólisis enzimática y a continuación la ácida (hidrólisis mixta),
- ✚ Autohidrólisis.

Estos procedimientos permiten la sacarificación de los tallos de yuca para obtener un sustrato para posteriormente fermentar. La experimentación tuvo dos réplicas. Para evaluar el aprovechamiento de los mismos se consideran como indicadores: el rendimiento de sólido, la remoción de hemicelulosa y celulosa y finalmente el crecimiento microbiano.

A continuación se muestra en la figura 2.5.1 el diagrama de flujo del proceso experimental seguido que permite la mejor comprensión del trabajo realizado.

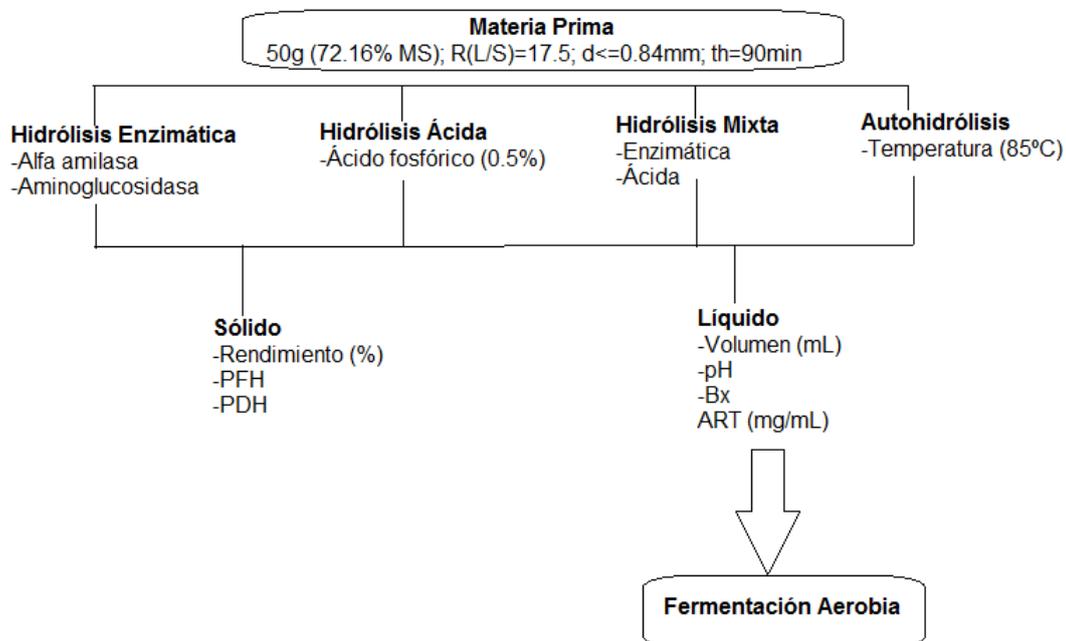


Figura 2.5.1. Diagrama de flujo del proceso experimental.

Fuente: Elaboración propia.

2.5.1. Hidrólisis enzimática de almidones.

Para hidrolizar los almidones se sigue el protocolo que se muestra en el (anexo 2), la dosificación de las enzimas se realiza según 0.01-0.02% másico que recomienda el fabricante, se añade la misma proporción de cada enzima (α -amilasa y AMG).

Se añade sal común para favorecer la actividad de las enzimas (0.1% másico por peso total de la mezcla).

2.5.2. Hidrólisis ácida y autohidrólisis

Se siguió la metodología ya descrita en el epígrafe 2.3 a las condiciones de los mejores resultados del diseño resultante del procesamiento estadístico y lo descrito en 2.4 respectivamente.

2.5.3. Hidrólisis enzimática seguida de hidrólisis ácida.

Se sigue el procedimiento descrito para hidrólisis enzimática, sólo que el sólido resultante de la misma, se separa por filtración a vacío, se enjuaga con abundante agua, se pesa y se toma una muestra para determinar rendimiento de sólidos alcanzado en esta etapa de la hidrólisis. Posteriormente, se somete a la hidrólisis ácida a las condiciones fijadas para la misma, ya mencionadas. Una vez concluida la hidrólisis se separa por filtración a vacío el sólido del líquido, siendo el sólido lavado, secado y finalmente pesado.

El sólido se enjuaga, se seca y se le determina hemicelulosas (PFH), celulosa (PDH) y rendimiento de sólidos. Al líquido se le determina volumen, pH y ART siguiendo los procedimientos y técnicas ya descritas.

A partir de la composición química se calculó la recuperación de la celulosa y las hemicelulosas, así como la solubilización de las mismas.

La recuperación de las hemicelulosas se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$R_{PFH} = \frac{m(PFH_{final})}{m(PFH_{MP})} * 100 \quad (\text{Ec. 2.5.2})$$

Donde:

$m(PFH)_{final}$, masa de hemicelulosas en la celulignina, g.

$m(PFH)_{MP}$, masa de hemicelulosas en la materia prima, g.

R, recuperación de hemicelulosas en la celulignina, %.

El cálculo de la recuperación de la celulosa se hizo de manera similar al de la recuperación de las hemicelulosas. Para calcular la solubilización de las hemicelulosas (S_{PFH}) se utilizó la siguiente expresión:

$$S_{PFH} = 100 - R_{PFH} \quad (\text{Ec. 2.5.3})$$

2.6. Fermentación de los hidrolizados resultantes

Se prepara para la fermentación cada uno de los hidrolizados resultantes de los procesos descritos en el epígrafe anterior.

Para el comienzo de la fermentación después de inocular se realiza un conteo de levadura inicial siguiendo el método de cámara de Neubauer (se explicará posteriormente) y se añaden sales para crear el medio de cultivo ideal para el crecimiento de la cándida *utilis*, el cual está dado por las siguientes sustancias:

- ✚ Fuente de carbono – carbohidratos del almidón presente en los tallos de yuca
- ✚ Fuente de azufre – sulfato de amonio
- ✚ Fuente de fósforo – fosfato di amónico
- ✚ Fuente de potasio – fosfato de potasio
- ✚ Fuente de magnesio – sulfato de magnesio

Para el cálculo de las dosis de sales añadidas para el medio de cultivo se parte de la cantidad de materia seca inicial que será hidrolizada y posteriormente fermentada. La misma presenta entre 20 – 39% de almidón (Wambin, *et al*, 2013), por lo que se toma un valor medio de 28%, el cual se multiplica por la masa seca inicial de tallos y se obtiene la cantidad en gramos de almidón que existe en este material. La transformación de almidón a biomasa se considera un rendimiento de 55%. Los cálculos de las cantidades de sales se realizan para esta biomasa teórica obtenida (g) (Herrera y Pons, 2014), y las proporciones empleadas se plantean a continuación:

- ✚ Nitrógeno: 8% de gramos de biomasa
- ✚ Fósforo: 3% de gramos de biomasa
- ✚ Magnesio: 0.75% de gramos de biomasa
- ✚ Potasio: 0.75% de gramos de biomasa
- ✚ Azufre: 0.75% de gramos de biomasa

Las dosis de sales añadidas (g) para crear el medio de cultivo ideal para el crecimiento de la cándida se determinan por las siguientes ecuaciones respectivamente:

$$\text{Sulfato de amonio} = \frac{0,08 * g \text{ de levadura potencial}}{\frac{0,21 g \text{ de nitrogeno}}{g \text{ de sulfato de amonio}}} \quad (\text{Ec 2.6.1})$$

$$\text{Sulfato de magnesio} = \frac{0,0075 * g \text{ de levadura potencial}}{\frac{0,1656 \text{ g de magnesio}}{g \text{ de sulfato de magnesio}}} \quad (\text{Ec 2.6.2})$$

$$\text{Fosfato de amonio} = \frac{0,03 * g \text{ de levadura potencial}}{\frac{0,46 \text{ g de pentoxido de difosforo}}{g \text{ de fosfato de amonio}}} \quad (\text{Ec 2.6.3})$$

$$\text{Fosfato de potasio} = \frac{0,0075 * g \text{ de levadura potencial}}{\frac{0,408 \text{ g de potasio}}{g \text{ de fosfato de potasio}}} \quad (\text{Ec 2.6.4})$$

Se añaden estos componentes en suficiencia y exceso para que no influyan en el crecimiento y que solo dependa de la fuente de carbono.

El pH y el Brix son factores que se controlaron en todos los casos, al igual que la temperatura. Para hacer aeróbica la fermentación los recipientes fueron colocados todos al mismo tiempo en una zaranda a una velocidad intermedia.

El cálculo de los gramos de levadura presente en la solución se realizó por el método por cámara de Neubauer, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$Lev = \frac{\sum \text{levaduras} * 5 * 10^4 * 5 * 10}{64 * 10^6} \quad (\text{Ec 2.6.5})$$

Donde:

\sum levaduras : Levaduras totales detectadas en el conteo

$5 * 10^4$: Factor de cámara

$5 * 10$: Factor de dilución (puede variar).

$64 * 10^6$: Número de conversión de $\frac{\text{células}}{\text{mL}}$ a $\frac{\text{gramos}}{\text{Litros}}$.

Capítulo III. Análisis de resultados

En el presente capítulo se realiza un análisis de los resultados obtenidos siguiendo la estrategia presentada en el capítulo II.

En el análisis documental puede constatarse que se siembra yuca en todos los municipios de la provincia de Matanzas, predominan cuatro variedades y el total sembrado de las mismas es de 1568ha, por tanto existe disponibilidad de este material (anexo 1). La cuantificación de estos residuos en el campo asciende a 7464t anuales, para este estimado se parte de datos ya reportados, considerando un rendimiento de 35t/ha y para un estimado de 170kg de tallos/t de yuca (Koopmans y Koppejan, 1997), de los cuales sólo se aprovecha el 10 - 20% en la propagación del cultivo (Wambin, *et al*, 2013).

3.1. Caracterización física de los tallos de yuca

Se realiza la caracterización física de los tallos muestreados, teniendo en cuenta la cantidad de nudos, diámetros en extremos y centro de cada uno, peso, volumen, longitud y la relación peso por unidad de volumen y peso por unidad de longitud (anexo 3). Algunas de las variables medidas se procesaron estadísticamente y los resultados alcanzados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3.1.1. Resumen de la caracterización estadística

Parámetros estadísticos	Diámetro de los tallos (mm)	Peso/Volumen (kg/m ³)	Peso/Longitud (g/cm)
Media	19.64	535.38	1,66
Desviación estándar	2.37	90.39	0,55
Varianza	5.65	8171.83	0,31
Rango	10.33 (15-25)	415.72 (321.08-736.80)	2,41 (0.66-3.07)
Coefficiente de curtosis	0.01	0.07	-0,29
Coefficiente de asimetría	1.01	-0.75	1,32
Coefficiente de variación (%)	12.10	16.88	33.42

Fuente: Elaboración propia.

Como puede observarse las tres variables presentan una distribución normal pues cumplen con el coeficiente de asimetría y de curtosis (entre -2 y 2), además el histograma de frecuencia en cada caso tiene forma de curva Gaussiana (anexos 4, 5 y 6).

El valor de probabilidad debe ser mayor que el nivel de significación, el cual es de un 10%. Esta condición se cumple para todas las variables.

Los coeficientes de variación en todos los casos son mayores de 12%, lo que significa que el grado de dispersión es alto. Este resultado es lógico ya que los tallos de yuca fueron escogidos de manera aleatoria y tienen características físicas diferentes.

La caracterización brinda información acerca del rango en que se encuentra cada variable y esto es muy importante pues en el caso de la densidad de la materia prima permite estimar área para almacenaje, tamaño de los equipos en función de lo que se desee procesar.

Las pruebas de almidón, permiten precisar que no hay presencia del mismo en la parte central del tallo. Se verificó que los tallos de yuca presentan almidón solo en la parte fibrosa, la cual representa el 97% en peso de los tallos, lo cual concuerda con (Wambin, *et al*, 2013) que plantea que el 95% del almidón está localizado en el tejido leñoso, 4% en la corteza y 1% en el centro.

Las pruebas de absorción realizadas a los tallos de yuca con 72.16% MS, evidencian que los mismos absorben 6 veces su peso por tanto la relación líquido sólido debe superar este valor.

3.2. Composición química de la materia prima

Con el fin de determinar la composición química de los tallos de yuca, se llevó a cabo una rigurosa secuencia analítica, que incluyó la determinación consecutiva de las sustancias extractivas, polisacáridos y lignina, así como el análisis en paralelo del contenido de componentes minerales. Los resultados experimentales, aunque son algo menos precisos debido al no uso de técnicas cromatográficas, brindan una panorámica general bastante atinada, por lo que pueden ser considerados adecuados para el tipo de estudio realizado en el presente trabajo.

Los principales componentes de los tallos de yuca son los carbohidratos estructurales, los cuales constituyen dos terceras partes de la masa seca de la

materia prima. La celulosa, determinada como la fracción de polisacáridos difícilmente hidrolizables, representa el 33.06% del material, mientras que las hemicelulosas, determinadas como polisacáridos fácilmente hidrolizables, constituyen el 35.49%.

Tabla 3.2.1. Composición química de los tallos de yuca.

Componentes	Contenido (% en masa)
Celulosa	33.06
Hemicelulosas	35.49
Lignina	22.76
Extractos totales	6.05
Cenizas	2.40

Fuente: Elaboración propia.

En el siguiente gráfico se muestra la composición química de los tallos de yuca tomados para diferentes estudios, en distintos lugares. En el mismo se puede observar que esta es muy variable. Las diferencias pueden ser atribuidas a diferentes procedencias y variedades de tallos de yuca, así como a diferentes condiciones meteorológicas y particularidades del suelo en las zonas donde fueron colectadas las muestras.

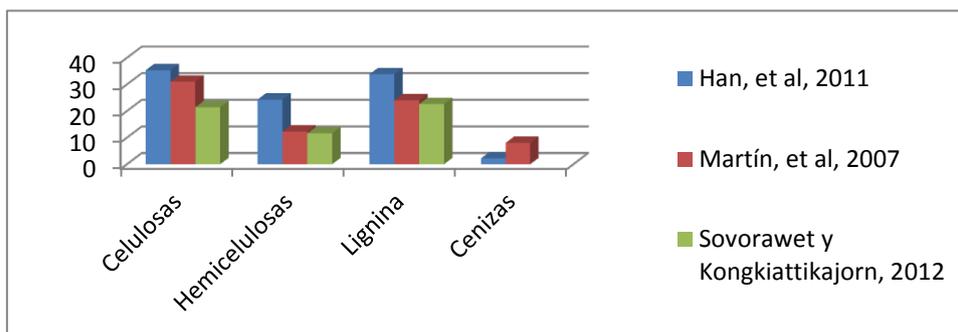


Figura 3.2.1. Composición química variable de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

3.3 Hidrólisis ácida diluida al 0.5% según diseño de experimentos.

A partir de la programación en una hoja de cálculo del software Microsoft Office Excel, se determinaron los coeficientes de variación obtenidos para el

rendimiento de sólidos en las hidrólisis ácidas diluidas realizadas en el diseño de experimentos. Estos resultados demuestran que la dispersión es buena, ya que para todos los casos el coeficiente de variación es menor que 4%, por lo que la media es representativa de los datos y no existe dispersión entre los experimentos para esta variable de respuesta (Anexo 7).

A continuación se muestra el diagrama de Pareto, en el cual se observa la influencia de las variables analizadas, así como su interrelación, sobre el rendimiento de sólidos en las hidrólisis ácidas diluidas.

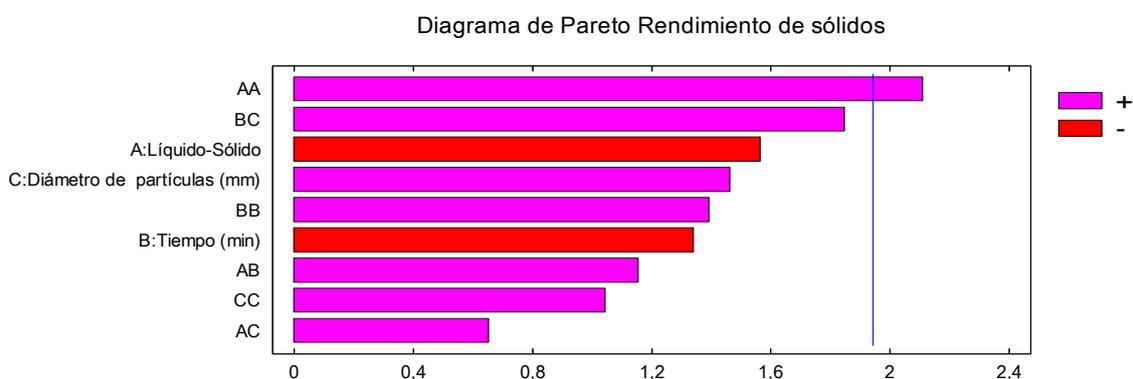


Figura 3.3.1. Diagrama de Pareto para rendimiento de sólidos.

Fuente: Elaboración propia.

En el diagrama de Pareto se puede observar que la variable que presenta influencia estadística es la relación de líquido – sólido al cuadrado, el valor de la probabilidad en cada caso es mayor que 0.05, lo cual está correcto ya que se trabaja para un 95% de confianza. En este diagrama tiene relación directa con el rendimiento el diámetro de partículas, ya que mientras mayor es su valor mayor es el rendimiento de sólidos, tiene relación inversamente proporcional el tiempo y la relación líquido – sólido, ya que mientras mayores son estas variables, menor es el rendimiento.

En el análisis estadístico de estos datos se obtiene un óptimo, con un mínimo de rendimiento de sólidos para una relación líquido – sólido de 17.5; 90 minutos de tiempo de hidrólisis y 0.7mm de diámetro de partículas. Este óptimo se observa en el diagrama de superficie de respuesta que aparece a continuación:

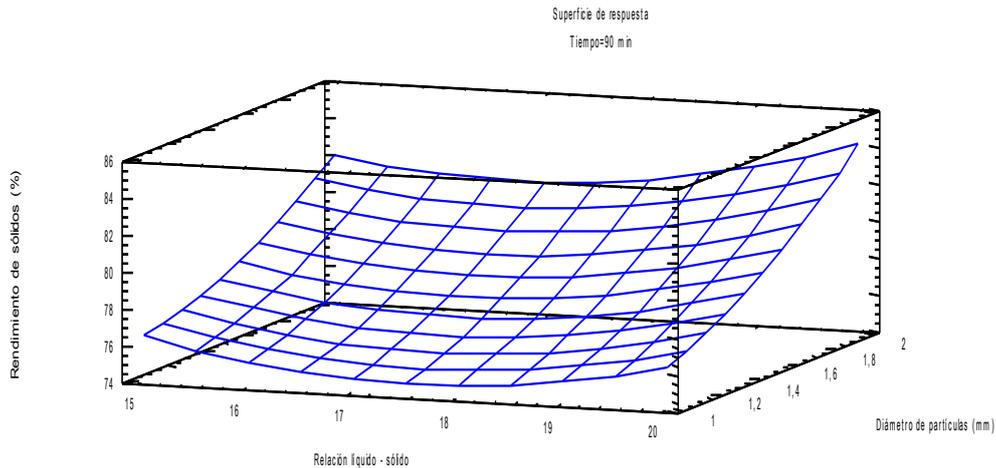


Figura 3.3.2. Diagrama de superficie de respuesta para rendimiento de sólidos.
Fuente: Elaboración propia.

3.4 Autohidrólisis de los tallos de yuca.

En la figura 3.4.1 se muestran los resultados de la autohidrólisis (AH) para dos condiciones de hidrólisis ácidas diluidas (HA), puede observarse que el resultado es lógico en ambas condiciones porque el rendimiento es mayor para la autohidrólisis que en la hidrólisis ácida pero la diferencia no es marcada, es decir, oscila entre 5 y 7 %.

Este resultado es alentador porque da una medida de la hidrólisis de la materia prima sin necesidad del consumo de ácido ni de enzimas, esta hidrólisis está implícita en cualquiera de las dos variantes que se analizan, ácida o enzimática.

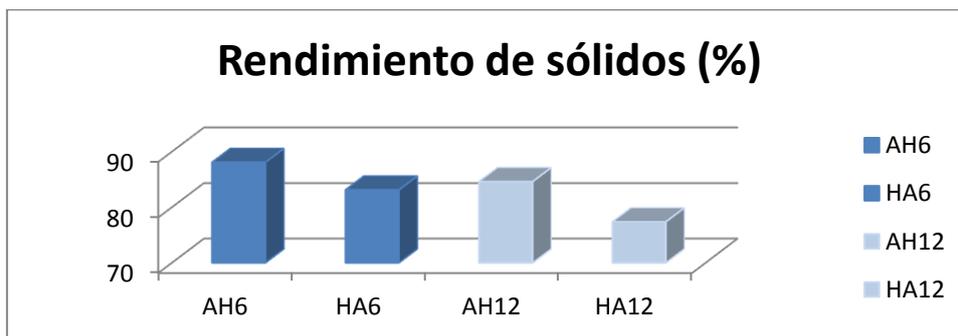


Figura 3.4.1. Comparación entre rendimientos de sólidos de hidrólisis ácida y autohidrólisis.

Fuente: Elaboración propia.

3.5 Sacarificación de los tallos de yuca.

En el siguiente gráfico de barras se muestran los resultados de los rendimientos de las hidrólisis realizadas a los tallos de yuca.

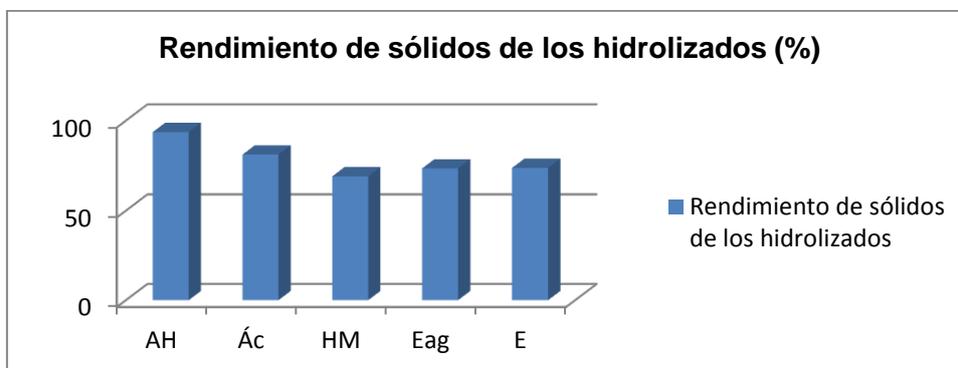


Figura 3.5.1. Rendimiento de sólidos de los hidrolizados.

Fuente: Elaboración propia.

En este gráfico se puede observar que el menor rendimiento corresponde a la hidrólisis mixta (HM), lo cual es lógico ya que el material se sometió a dos procesos de hidrólisis por lo que se agota más, durante la hidrólisis enzimática de almidones (E) se disuelven además de estos una pequeña cantidad de hemicelulosas y durante la posterior hidrólisis ácida se disuelve otra parte de hemicelulosas y celulosas.

El mayor rendimiento de sólidos corresponde a la autohidrólisis, lo cual es lógico ya que para la misma no se usan ácidos ni enzimas, solo temperatura, la cual está implícita en todas las hidrólisis. En el trabajo de Martínez, 2011 para esta materia prima se logró elucidar la presencia de un contenido de extractos solubles en agua caliente ascendente a 7,5% de la masa de la misma y que el contenido real de carbohidratos en la fracción de extractos hidrosolubles puede ser aún mayor, ya que el método analítico empleado no permitió cuantificar los oligo- y polisacáridos.

En el caso de la hidrólisis ácida el rendimiento es superior al obtenido por Martínez, 2011, lo cual se atribuye a que esta hidrólisis se realizó en condiciones más severas.

3.5.1. Balance de masa para hemicelulosas y celulosas en cada hidrólisis de los tallos de yuca.

Los resultados reflejados en las figuras que se muestran a continuación se obtuvieron, a partir de la programación en hoja de cálculo del software Microsoft Office Excel, del procesamiento de los datos obtenidos en la experimentación realizada por método gravimétrico de los PFH, PDH, además de los ART.

Autohidrólisis

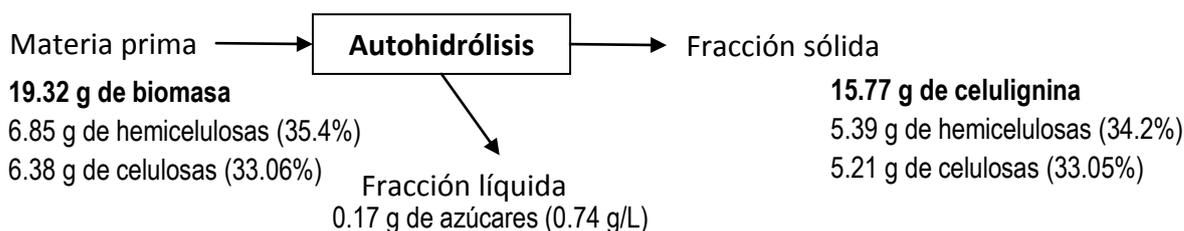


Figura 3.5.2. Balance de las hemicelulosas y celulosas en la autohidrólisis de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

Hidrólisis ácida

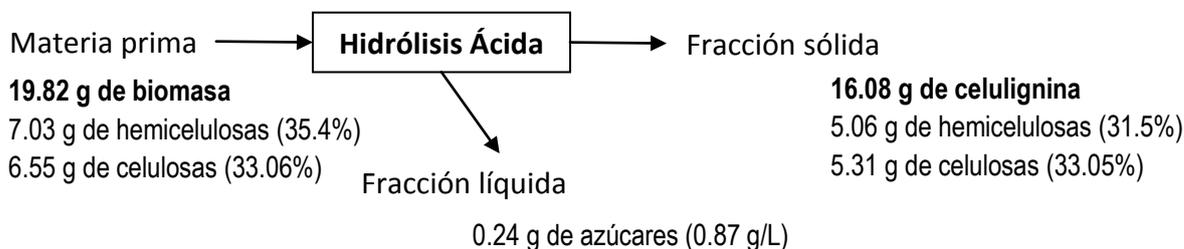


Figura 3.5.3. Balance de las hemicelulosas y celulosas en la hidrólisis ácida de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

Hidrólisis Mixta

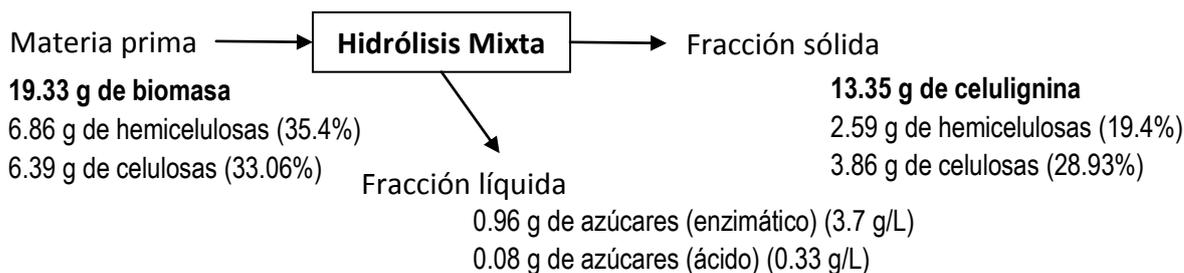


Figura 3.5.4. Balance de las hemicelulosas y celulosas en la hidrólisis mixta de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

✚ Hidrólisis Enzimática con agitación

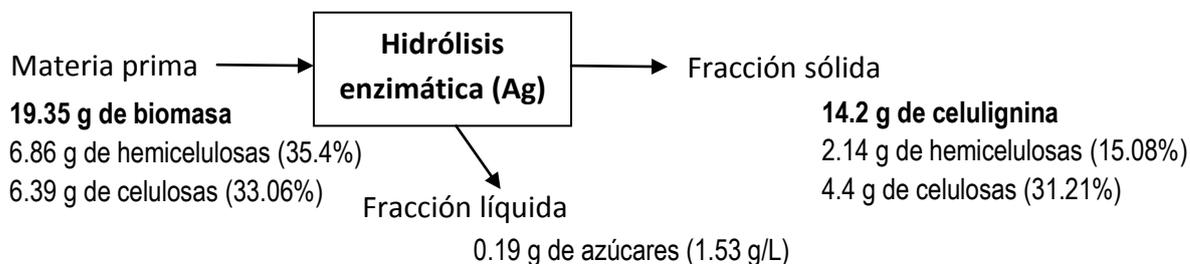


Figura 3.5.5. Balance de las hemicelulosas y celulosas en la hidrólisis enzimática con agitación de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

✚ Hidrólisis Enzimática sin agitación

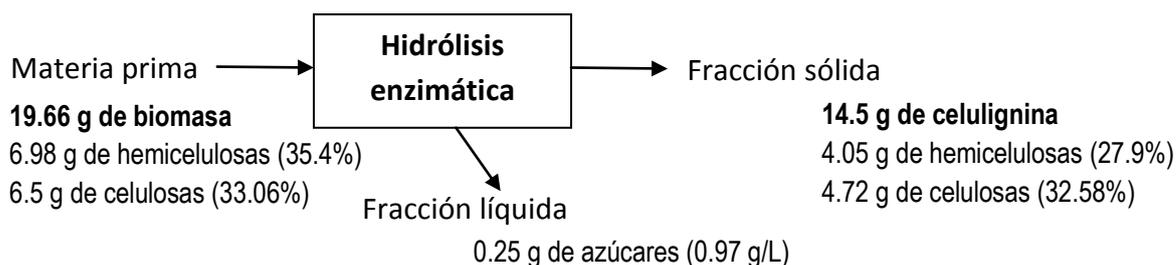


Figura 3.5.6. Balance de las hemicelulosas y celulosas en la hidrólisis enzimática sin agitación de los tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

En el siguiente gráfico se muestra el porcentaje de solubilización de celulosas y hemicelulosas para cada hidrólisis. En el mismo se ratifica que en todos los casos se solubiliza una mayor cantidad de hemicelulosas que de celulosas, debido a que estos últimos son polisacáridos difícilmente hidrolizables.

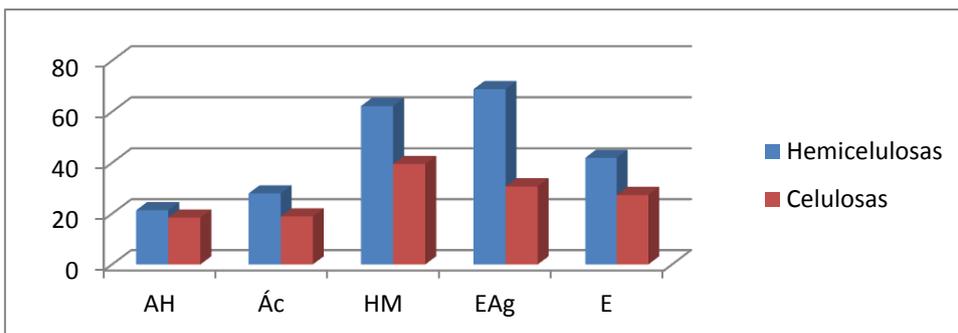


Figura 3.5.7. Porcentaje de solubilización en las hidrólisis.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 3.5.7 se demuestra que el efecto de la agitación influye en la solubilización de los diversos componentes, en el caso de la hidrólisis enzimática con agitación se disuelve mayor cantidad de hemicelulosas que en la mixta y mayor cantidad de celulosas que en la enzimática sin agitación, realizadas en igualdad de condiciones. El mayor porcentaje de solubilización de celulosas corresponde a la hidrólisis mixta, esto es debido a la acción del ácido sobre el residuo pretratado por enzimas.

3.6. Fermentación de los hidrolizados resultantes

En la figura 3.6.1 se muestra el crecimiento de biomasa y el contenido de ART para cada hidrolizado de tallos de yuca (para una prueba).

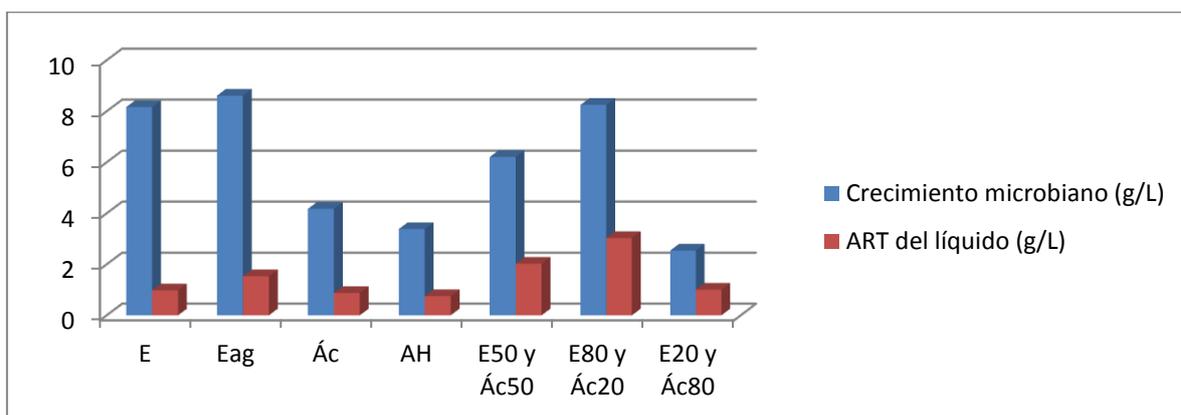


Figura 3.6.1. ART y crecimiento microbiano en los hidrolizados de tallos de yuca.

Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que en todos los casos hubo crecimiento microbiano dado por la presencia de fuente de carbono aportada por los tallos de yuca residuales.

En las pruebas realizadas sigue el mismo comportamiento de crecimiento de levadura para los hidrolizados en cada una de las hidrólisis, es decir, la enzimática mayor, similar crecimiento autohidrólisis y ácida, siendo los menores.

Se puede constatar que los resultados más favorables de crecimiento microbiano corresponden a hidrolizados provenientes de la hidrólisis enzimática, lo que se confirma con los resultados de la hidrólisis mixta, que el crecimiento es más favorecido cuando presenta mayor proporción del sustrato resultante de la hidrólisis enzimática (E80 y A20).

En la figura 3.6.1 la autohidrólisis (mayor rendimiento de sólidos) tiene un comportamiento similar a la hidrólisis ácida. Esto se atribuye a que durante la hidrólisis ácida una parte de la glucosa que se forma en este proceso se polimeriza y se obtienen sacáridos con mayor peso molecular, este proceso se conoce como reversión. Los productos de la reversión no fermentan con levaduras y cuando la concentración de glucosa es mayor se incrementa la reversión (Herrera y Pons, 2014). Además, esta hidrólisis presenta como desventajas: formación de productos no deseables y flexibilidad muy pobre (Mera y Carrera, 2005).

Se puede observar que para las hidrólisis mixtas que contienen 80% y 50% de hidrolizado enzimático respectivamente existe al inicio de realizada la mezcla mayor cantidad de ART que en las enzimáticas, sin embargo, se produce menor crecimiento microbiano para estos casos, lo cual ratifica el proceso de reversión que ocurre por la acción del ácido.

Los peores resultados de la mixta corresponden a la mezcla de 20% de enzimática y 80% de ácida.

En el caso de la hidrólisis enzimática con agitación existe mayor crecimiento de biomasa y mayor contenido de ART en el hidrolizado, lo que corrobora que el factor agitación influye positivamente sobre la velocidad de reacción química.

3.7. Consideraciones económicas sobre el aprovechamiento de los tallos de yuca.

3.7.1. Sustitución de maíz por tallos de yuca para la obtención de levadura Torula.

Los tallos de yuca presentan entre 22% y 39% de almidón (Wambin, *et al*, 2013). Suponiendo que los tallos tengan un mínimo, un valor medio y un máximo de almidón se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 3.7.1. Sustitución de maíz por tallos de yuca residuales.

% de almidón en los tallos	Sustitución de maíz por tallos (%)	Sustitución de maíz por tallos (\$)
22	28.57	85.71
28	36.36	109.09
39	50.65	151.94

Fuente: Elaboración propia.

Los cálculos fueron realizados en hoja de cálculo del software Microsoft Office Excel, teniendo en cuenta el rendimiento de producción de levadura a partir de almidón es de un 55% y que el maíz presenta un 77% de almidón (Herrera y Pons, 2014). Estos resultados se obtienen para una tonelada de materia prima, teniendo en cuenta que el precio actual del maíz es 300\$/tonelada.

Los valores reportados en la tabla 3.7.1 son el resultado de cálculos considerando la levadura potencial en función de lo que reporta la literatura con respecto al almidón, los experimentos realizados demuestran que la levadura Torula obtenida es superior al pronóstico, lo cual se debe a la hidrólisis de la glucosa presente en las hemicelulosas y en la celulosa amorfa, por lo que los valores obtenidos en experimentación exceden estas cifras.

Este resultado tiene una gran importancia ya que es necesario resolver la situación actual existente en nuestro país con la alimentación animal y el maíz se utiliza como fuente de alimentación humana, mientras que los tallos de yuca no, además están siendo desechados un gran porcentaje de los mismos.

3.7.2. Comparación entre los costos de los procesos de sacarificación.

Los datos que aparecen en la siguiente tabla fueron obtenidos para una tonelada de tallos de yuca. Se realizó a partir de las cantidades consumidas en las pruebas realizadas de cada sustancia según el tipo de hidrólisis. En esta tabla se muestran solo los costos que difieren en cada tipo de hidrólisis, teniendo en cuenta que se realizan para las mismas condiciones, con el objetivo de establecer una comparación económica entre los tipos de hidrólisis estudiados en este trabajo.

Tabla 3.7.2. Costos de las hidrólisis de los tallos de yuca.

Aspectos	Costo (\$/ton)	Hidrólisis enzimática (costos-\$)	Hidrólisis ácida (costos-\$)	Autohidrólisis (costos-\$)
Alfa amilasa	23250	2.32	--	--
Amiloglucosidasa	23570	2.35	--	--
Sal común	61.5	0.06	--	--
Ácido fosfórico concentrado	1025	--	89.68	45.92
Hidróxido de sodio al 50%	208	--	11.31	--
Total		4.74	101	45.92

Fuente: Elaboración propia.

Es evidente que la hidrólisis enzimática de almidones es la menos costosa, además de reportar el mejor resultado técnico.

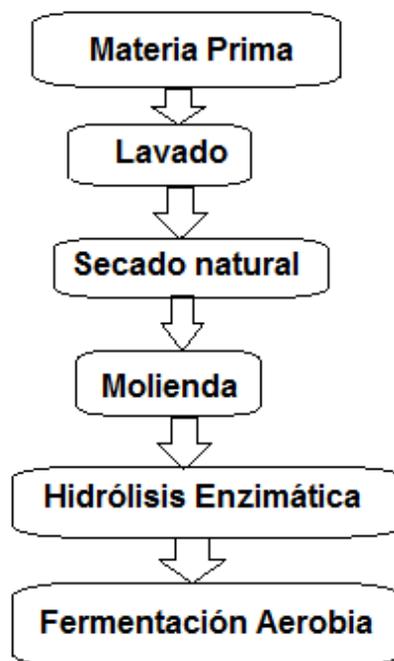
A continuación se plantean otros aspectos a tener en cuenta para conocer el costo total de producción de levadura *Torula* a partir de tallos de yuca residuales. Estos factores representan igual costo para cada tipo de hidrólisis:

- ✚ Transportación de la materia prima
- ✚ Electricidad (molienda gruesa y fina, calentamiento, agitación, aireación durante la fermentación)
- ✚ Agua consumida (lavado de tallos, hidrólisis)

- ✚ Sales añadidas para crear el medio de cultivo ideal para el crecimiento de la levadura.

La desventaja que presenta la hidrólisis enzimática de almidones es el elevado tiempo de reacción que necesita, es decir, se realizan 4 hidrólisis ácida o autohidrólisis a una cantidad determinada de materia prima en el mismo tiempo que se realiza una vez hidrólisis enzimática de almidones. Debe señalarse que este tiempo puede reducirse.

Teniendo en cuenta los análisis realizados en este capítulo, la secuencia lógica del proceso de obtención de levadura *Torula* a partir de los tallos de yuca residuales, se muestra en la siguiente figura:



*Figura 3.7.1. Secuencia lógica del proceso de obtención de levadura *Torula* a partir de tallos de yuca.*

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones Parciales:

1. En el análisis estadístico de las variables analizadas en la caracterización física de la materia prima se evidencia que todas presentan un comportamiento normal.
2. La caracterización de los tallos de yuca reveló que los carbohidratos estructurales y la lignina representan, respectivamente, el 68.55% y el 21.52% del peso seco de los tallos de yuca, por lo que ese material es apropiado como materia prima para biorrefinerías lignocelulósicas.
3. Se demostró que estadísticamente la variable que más influye en el rendimiento de sólidos alcanzado en las hidrólisis ácidas diluidas para las condiciones del diseño de experimentos es la relación de líquido – sólido, además se obtuvo un óptimo de condiciones para un mínimo de rendimiento de sólidos.
4. Los hidrolizados resultantes de la autohidrólisis e hidrólisis ácida tienen similar comportamiento en la fermentación, siendo los que proporcionan el más bajo crecimiento.
5. Se demostró que se puede sustituir como mínimo un tercio del maíz utilizado para alimentación animal por tallos de yuca residuales, y de esta forma aprovechar sus potencialidades teniendo en cuenta su composición química.
6. El proceso de obtención de levadura *Torula* teniendo en cuenta el estudio realizado conlleva a considerar en su implementación como principales etapas: Lavado de los tallos; secado natural; molienda; hidrólisis enzimática y fermentación, lo cual no difiere del tratamiento requerido por otras materias primas (por ejemplo el boniato).

Conclusiones

1. Se confirma que el proceso de sacarificación de los tallos de yuca residuales permite la obtención de levadura *Torula* por lo que queda validada la hipótesis.
2. La caracterización física de los tallos de yuca residuales de la variedad Señorita arroja:
 - ✚ Presentan almidón solo en la parte fibrosa, la cual representa el 97% en peso de los mismos.
 - ✚ Absorben 6 veces su peso.
 - ✚ La densidad se encuentra en el rango de $321.08 - 736.8\text{kg/m}^3$.
3. El análisis estadístico realizado mediante *Statgraphics Plus versión 5.0 for Windows* permitió comprobar la significación de los resultados experimentales.
4. En el análisis estadístico para el diseño experimental de la hidrólisis ácida se obtiene un óptimo de mínimo rendimiento para las condiciones de relación líquido – sólido de 17.5; tiempo de hidrólisis de 1.5h y diámetro de partículas menor o igual que 0.7mm.
5. El resultado más favorable para la obtención de levadura *Torula* se obtiene mediante la hidrólisis enzimática seguida de fermentación.
6. El estudio realizado permite hacer las siguientes consideraciones económicas:
 - ✚ La hidrólisis enzimática es la más económica.
 - ✚ El ahorro por concepto de sustitución del maíz por tallos de yuca residuales para una tonelada de materia prima es de 85.7 pesos (moneda total) como mínimo.

Recomendaciones

1. Continuar el estudio de la etapa de autohidrólisis con vistas a mejorar el proceso de fermentación.
2. Profundizar en el estudio de la hidrólisis ácida considerando la variable de respuesta ART.
3. Valorar la combinación de los hidrolizados de esta materia prima con otras utilizadas con este fin para compensar bondades y carencias de las distintas materias primas.

Bibliografía

1. Al-Eid, S.M., Al-jasass, F.M., Hamad S.H. (2010). Performance of baker's yeast produced using date syrup substrate on Arabic bread quality *African J Biotechnol* 9 (21): 3167-3174.
2. Aro N, Pakula T & Penttila M (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 719–739.
3. Barroso, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Universidad politécnica de Madrid. 25- 55.
4. Béguin P & Aubert JP (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 25-58.
5. Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A. (2006). Production of food grade yeasts *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3): 407–415.
6. Bertoft, E., in: Eliasson, A. C. (2004). (Ed.), *Starch in Food*, Woodhead Publishing Limited Cambridge, England 2004, pp. 57–96.
7. Bridgewater, A. (1999) Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids. *Journal anal Appl Pyrolysis* vol 51. 3-22.
8. Caparros, S. (2009). Fraccionamiento integral de vegetales no alimentarios para la obtención de pasta celulósica y subproductos. Tesis de grado Universidad de Huelva, España. ISBN: 978-84-92679-92-8 D.L.: H 38-2009. 1-127.
9. Cara, C., Ruiz, E., Oliva, M., Sáez, F. & Castro, E. (2007). Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, 99(6), 1869-76.
10. Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel* 87: 692–700.
11. Cardona, C. & Orrego, C. (2009). Avances investigativos en la producción de combustibles. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. 172-176.
12. Carrasco. J. (2002) La biomasa como fuente de energía y productos para la agricultura y la industria. Ministerio de Industria y Energía. 1-50

13. Carrillo, F., Lis, M., Colom, X., Valldeperas, M. & Valldeperas, J. (2005). Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat Straw: Kinetic study. *ProcBiochem*. Vol 40. 3360 – 3364.
14. Castaño, Hl., Reales, J. & Zapata, J. (2011). Sacarificación y fermentación simultánea de Tallos de Yuca. *Dyna*, 180. p. 97-104.
15. Chang V, Holtzaple T. (2000). Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 5 -37.
16. Cimpeanu, C., Campeanu G., Begea, M., Vladescu, M., Cornea, C.P. (2010) Bioethanol production by new thermotolerant Romanian yeast strains *Romanian Biotechnol Letters* 15 (3): 5310-5316
17. Colaboradores de Wikipedia, (2015). *Manihot esculenta* [en línea]. Disponible en http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Manihot_esculenta&oldid=79280449. Consultado el 30 de enero del 2015.
18. Cruz, J.M., Parajo, J.C. (1998) Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose *Food Chem* 63 (4): 479-484.
19. Cuervo, I., Folch, J.L. & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 13. p. 11-25.
20. Duff, S.J.B. & Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55. p. 1–33.
21. Eggeman T & Elander RT (2005) Process and economic analysis of pre-treatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96: 2019-2025.
22. Fan LT, Gharpuray MM & Lee YH (1987) In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Editor (ed). Springer, Berlin, p. 57.
23. FAOSTAT (2014) Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado el 7 de junio de 2014.
24. Gámez, S., González, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2006) Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering* 74, 78-88.
25. García-Aparicio, P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J., (2006). "Effect of inhibitors released during steam-explosion

- pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129, 278-288.
26. Gray KS, Zhao L & Emptage M (2006) *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
 27. Grous, W., Converse, A. & Grethlein, H. W. (1986). Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 8. 274-280.
 28. Han M, Kim Y, Kim Yo, Chung B, Choi and Gi-Wook, (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean J. Chem. Eng.*, 28(1), 119-125.
 29. Herrera J y Pons J. (2014). *Sustratos Proteicos (SUSPROTEL) Aspectos Tecnológicos. Fórum Ciencia y Técnica, Matanzas, Cuba.*
 30. Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W., Ramarao, B.V. (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62, 1–21.
 31. Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 233–277.
 32. Klibansky, M.M., Gonzalez, L.F., Otero, M.A. (1983) A new function for overall optimization of yeast production *Biotechnol Bioeng* 25: 2493-2500
 33. Lavarack, B.P., Griffin, G.J. (2002) The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* 23, 367-380.
 34. Liao, W., Liu, Y., Liu, C., Wen, Z. & Chen, S. (2006). Acid hydrolysis of fibers from dairy manure. *Bioresour. Technol.* Vol. 97. 1687 – 1695.
 35. Liscano Martínez, Yamil, (2014). *Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Área de biotecnología, Medellín, Colombia.*
 36. López, J. (2011). *La química verde. Editorial catarata. España: 20-36.*
 37. López Hervis, Yoney, (2013). *Propuesta del caso base en un proceso de sacarificación de cáscara de arroz para la producción de etanol. Universidad de Matanzas Sede Camilo Cienfuegos, Matanzas, Cuba.*

38. Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L. & Saddler, J.N. (1985). Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chem. Technol.* 5. p. 405–425.
39. Martín, C. (2002). “Estudio de la inhibición de la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol”. p. 149.
40. Martín, C., López, Y., Plasencia, Y., Hernández, E. (2006). Characterisation of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **20**, 443-446.
41. Martín, C., Thomsen, A.B. (2007) Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82** (2), 174-181.
42. Martín, C., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., Sjöde, A., Jonson, L.J. (2007) Dilute-sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **136/140**, 339-352.
43. Martín, A., Martín, C. (2008) Un enfoque ético a la polémica sobre los biocombustibles. *Memorias del X Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la Caña- Diversificación'2008*. La Habana, Cuba. p. 176-181. ISBN 97 8-959-7 165-16-3.
44. Martínez, J.A.; Almazán, O.A.; Saura, G.; Otero, M.A. (2004) Production of fodder yeast from stillage in Cuba: an environmental approach *Zuckerindustrie* **129** (2):92-95.
45. Menon, V. & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals. *Progress in Energy and Combustion Science*. 38(4): 522-550.
46. Mera, I y Carrera Cataño, J (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol 3.
47. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 420-428.

48. Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M.A., Ladisch, M.R. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 96, 1986-1993.
49. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y., Holtzapple M., Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**, 673-686
50. Nasser, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H., Ghasemi, Y. (2011) Single Cell Protein: production and process *Amer J Food Technol* **6**: 103-116.
51. Nuwamanya E, Chiwona-Karlton L, Kawuki R, Baguma Y, (2012). Bio-Ethanol Production from Non-Food Parts of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *AMBIO* 2012, 41:262–270. Published online: 11 October 2011.
52. Obolenskaja, A.V. (1986) *Laboratornye raboty po Khimii Drevesiny*. Leningradskaja Lesotekhnicheskaja Akademija. Leningrad. 72 pp.
53. Oprean, L. (1998) Osmosensitivity, thermoresistance and preservatives resistance of some isolated yeasts strains, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technol* **2** (2): 41-46.
54. Oseih, M.K., Taah, K.J. (2009) A survey of cassava planting materials. *Journal of Agronomy*, 1-4.
55. Otero, M.A.; Saura, G.; Valdés, I.F.; Peña, M.A.; Martínez, J.A.; Pascual, A. (2002) Análisis operacional del complejo destilería-planta de levadura del CAI Antonio Guiteras. Parte II *ICIDCA Sobre los deriv* **36** (2):7-10
56. Otero, M.A.; Saura, G.; Martínez, J.A.; Fundora, N.; Reyes, E.; Vasallo, M.C.; Almazán, O.A. (2003) Propagation of yeast biomass from distillery wastes. Process and product evaluation *Int Sugar J* **105** (1249):36-39
57. Otero Rambla, Miguel Ángel; Almazán, Oscar. A, (2012). *Las Levaduras como Base de una Industria. Diferentes aplicaciones*. Editorial Académica Española. ISBN: 978-3-659-02736-9.
58. Otero Rambla, Miguel Ángel; Almazán, Oscar. A; Alvares, Amaury, (2012). *La Proteína Unicelular. Microorganismos, Sustratos y Fermentadores*. Editorial Académica Española. ISBN: 978-3-8484-7077-8.
59. Ovando-Chacón SL & Waliszewski KN (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, **21**: 111-120.

60. Pedersen, M. & Meyer, A. (2010). Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. Article in Press, *New Biotechnology.*, 27(6): 739-750.
61. Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T & Martínez, E (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.
62. Pérez I, Teymouri H, Alizadeh H., & Dale B. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *ApplBiochem. Biotechnol.* 1081 – 1099.
63. Perez-Rea D, Rojas C, Carballo S, Aguilar W, Bergensta B, and Nilsson L, (2013). Enzymatic hydrolysis of *Canna indica*, *Manihot esculenta* and *anthosomasagittifolium* native starches below the gelatinization temperature. *Starch/Starke* 2013, 65, 151–161. DOI 10.1002/star.201200103.
64. Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer, R & Tschaplinski T (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science.* 311: 484-489.
65. Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., Champreda, V., (2009). Simultaneous non-thermal sac-charification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107(5):488-493. [doi:10.1016/j.jbiosc.2008.12.024].
66. Rocha, G.J.M., Martín, C., Soares, I.B., Souto-Maior, A.M., Baudel, H., Abreu, C.A.M. (2011). Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* **35**, 663-670.
67. Rodríguez-Chong, A., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2004) Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering* 61, 143-152.
68. Rodríguez S, (2008). Instructivo Técnico del Cultivo de la Yuca. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales.
69. Sánchez J., & Cardona C. (2007). Producción de alcohol carburante, una alternativa para el desarrollo agroindustrial. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.

70. Sandrasegarampillai, B., Arasaratnam, V. (2011) Palmyrah distillery spent wash for ethanol production by a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* S1 at 40°C *J. Inst. Brew.* 117 (3), 451– 455.
71. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., (1998). "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass." Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
72. Sovorawet, B. & Kongkiattikajorn, J. (2012). Bioproduction of Ethanol in SHF and SSF from Cassava Stalks. *KKU Res. J.* 17(4):565-572.
73. Stanbury, P. F; Whitaker, A and Hall, S. J (2003). Principles of Fermentation Technology. Second Edition.
74. Sun Y & Cheng J (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1–11.
75. Taherzadeh M.J., Karimi K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*2, 707-738.
76. Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., van Dijken, J.P. (1990) Oxygen requirements of yeasts *Appl Environ Microbiol.* 1990 December; 56(12): 3785–3792.
77. Wambin Z, Torbjorn A, Lestander, Hakan O, Maogui W, Bjorn H, Jiwei R, Guanghui X, Shaojun X, (2013). Cassava stems: a new resource to increase food and fuel production. *GCB Bioenergy* (2013), doi: 10.1111/gcbb.12112.
78. Wyman, C. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* 25, 153-157.
79. Wyman, C. (2008). Cellulosic ethanol: a unique sustainable liquid transportation fuel. *MRS Bulletin* 33, 381-383.
80. Xu, F., Sun, J., Liu, F. & Sun, R. (2006). Comparative study of alkali and acidic organic solvent soluble hemicellulosic poly saccharides from sugarcane bagasse. *Carbohydr. Res.* Vol. 341. 253 -261.
81. Zhao X, Cheng K & Liu D (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 815–827.
82. Zhang Y & Lynd L. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 88. 797-824.

Anexos

Anexo 1. Áreas con plantaciones de yuca en la provincia de Matanzas

Municipios	Total	Variedades	de	yuca	
		C-6329	CMC-40	C-74-725	Señorita
Matanzas	280.9	24.8	31.6	142.7	81.8
Cárdenas	74.3	8.7	10.6	34.9	20.1
Martí	231.6	71.3	26.2	65.2	68.9
Colón	48.3	9.8	11.2	5.6	21.7
Perico	57.8	7.6	8.8	15.9	26.3
Jovellanos	110.2	16.2	26.6	29.8	37.6
P. Betancourt	1.2	-	-	-	1.2
Limonar	113.9	20.2	14.7	37.3	41.7
Unión de Reyes	414.7	41.8	73.6	174.4	124.9
Ciénaga	10.0	2.1	-	3.6	4.3
Jagüey Grande	174.6	28.6	20.9	63.8	61.3
Calimete	41.0	8.2	6.1	21.6	5.1
Los Arabos	9.4	1.6	-	5.1	2.7
Total	1567.9	240.9	230.3	599.1	497.6

Anexo 2. Protocolo de Hidrólisis Enzimática de Almidones para tallos de yuca residuales.

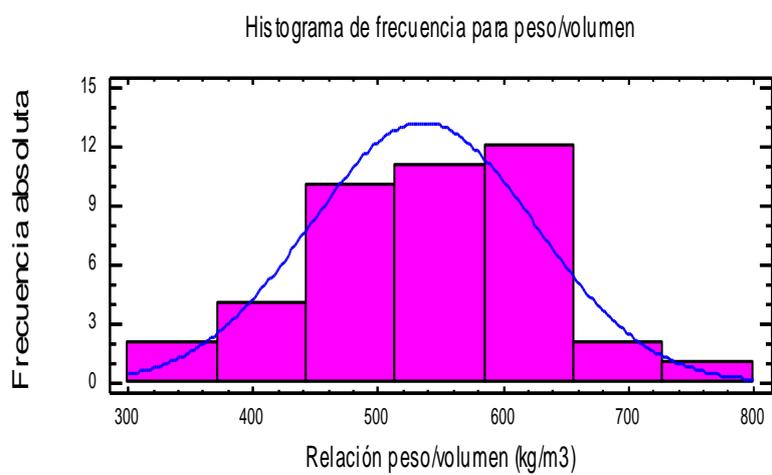
1. Mezclar los tallos pesados previamente con agua destilada
2. Ajustar pH a 5.8
3. Encubar por 2h a 85°C
4. Añadir la enzima alfa amilasa
5. Mantener 4h con esta enzima
6. Refrescar la mezcla hasta 60°C
7. Ajustar pH a 4.5
8. Transcurrido 15 minutos añadir la amiloglucosidasa y mantener 48h
9. Filtrar
10. El líquido se conserva en frío para determinar el contenido de ART
11. El sólido se seca, se pesa para determinar el rendimiento de sólidos.

Anexo 3. Caracterización física de los tallos de yuca residuales.

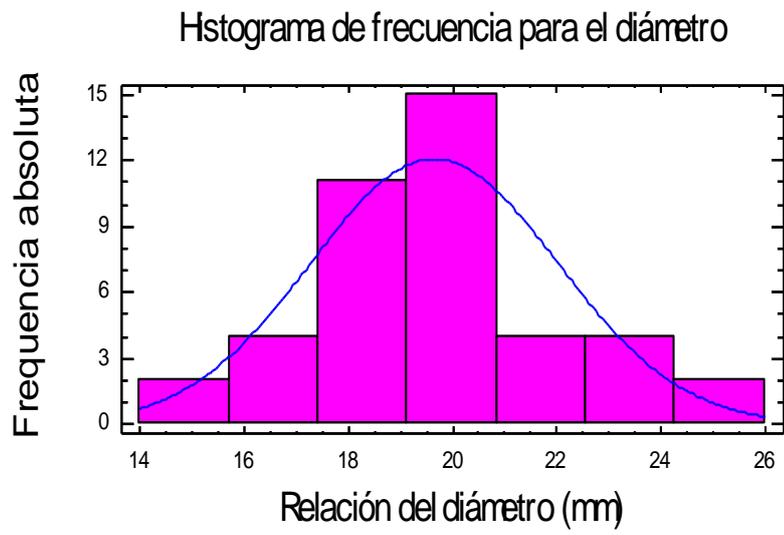
Tallos	Nudos	Diámetro		Peso (g)	Volumen (m3)	Peso/Vol (kg/m3)	Peso/Longitud (g/cm)
		Longitud (cm)	promedio (mm)				
1	46	64,5	21,67	150	0,0002	6310,70	2,33
2	17	52	20,67	118	0,0001	6768,12	2,27
3	20	43	25,00	132	0,0002	6256,85	3,07
4	20	51	20,33	100	0,0001	6041,48	1,96
5	19	44,5	21,67	100	0,0001	6097,98	2,25
6	10	42	23,00	90	0,0001	5160,22	2,14
7	11	33	25,33	94	0,0001	5654,05	2,85
8	15	55	20,00	100	0,0001	5790,39	1,82
9	14	48	16,33	46	0,0001	4576,12	0,96
10	13	34	19,50	52	0,0001	5123,72	1,53
11	11	36	19,33	72	0,0001	6816,27	2,00
12	11	42	23,00	100	0,0001	5733,57	2,38
13	33	46	20,33	110	0,0001	7367,97	2,39
14	8	42	20,00	78	0,0001	5914,47	1,86
15	16	57	23,00	76	0,0002	3210,80	1,33
16	16	60	18,33	82	0,0001	5179,77	1,37
17	17	57	20,67	112	0,0001	5860,47	1,96
18	25	51	22,00	109	0,0001	5625,24	2,14
19	17	43	19,33	76	0,0001	6023,68	1,77
20	9	39	19,67	64	0,0001	5404,86	1,64
21	13	36	17,67	46	8,82E-05	5215,27	1,28
22	22	56	18,00	60	0,00014	4212,58	1,07
23	23	55	18,67	73	0,00015	4852,40	1,33

24	24	61,5	17,67	56	0,00015	3716,50	0,91
25	11	33	17,00	44	7,45E-05	5877,21	1,33
26	23	44	16,67	42	9,59E-05	4377,53	0,95
27	12	34,5	22,00	62	0,00013	4729,96	1,80
28	11	43	20,00	86	0,0001	6369,43	2,00
29	13	35	18,00	44	0,000089	4942,77	1,26
30	10	36	18,67	50	9,84E-05	5077,67	1,39
31	10	38	18,67	50	0,00010	4810,42	1,32
32	18	36	20,67	58	0,0001	4805,24	1,61
33	22	39,5	15,00	26	6,97E-05	3726,70	0,66
34	21	38	19,33	58	0,00011	5201,89	1,53
35	8	39	15,67	36	7,51E-05	4790,88	0,92
36	6	38,5	19,33	68	0,00011	6019,56	1,77
37	16	51,5	18,67	74	0,0001	5253,17	1,44
38	20	37,5	18,00	46	9,53E-05	4822,94	1,23
39	14	41,5	18,00	56	0,00010	5305,49	1,35
40	9	48	16,00	58	9,64E-05	6012,81	1,21
41	31	43,5	19,33	46	0,0001	3604,01	1,06
42	14	39,5	23,00	102	0,000164	6218,39	2,58

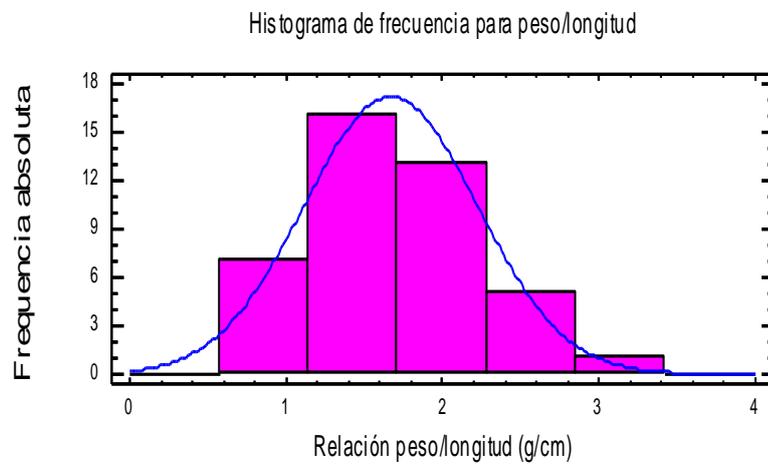
Anexo 4. Histograma de frecuencia para el peso por volumen de los tallos de yuca.



Anexo 5. Histograma de frecuencia para el diámetro de los tallos de yuca.



Anexo 6. Histograma de frecuencia para el peso por longitud de los tallos de yuca.



Anexo 7. Determinación de los coeficientes de variación para el rendimiento de sólidos en las hidrólisis ácidas del diseño de experimentos.

Hidrólisis ácida diluida	Rendimiento medio (%)	Desviación estándar	Coeficientes de variación
Ha ₂	79,5156547	0,552627298	0,694991823
Ha ₃	80,5594391	2,716809233	3,372428187
Ha ₄	77,971846	0,325490358	0,417446008
Ha ₅	83,546719	1,94269722	2,325282479
Ha ₆	83,1228307	0,821275218	0,988026046
Ha ₇	78,1755895	2,247442341	2,87486459
Ha ₈	80,807788	2,665183229	3,298176199
Ha ₉	77,3547189	2,142151526	2,769257721
Ha ₁₀	76,5013213	1,766935578	2,309679818
Ha ₁₁	81,0989099	1,861389486	2,295209009
Ha ₁₂	77,3479553	0,912212582	1,179362244
Ha ₁₃	84,003603	0,879227569	1,046654593
Ha ₁₄	81,1421807	2,131995204	2,627480781
Ha ₁₅	76,0988439	2,656975908	3,491479991
Ha ₁₆	74,4499184	1,77212855	2,380296162
Ha ₁₇	74,8593163	1,165996338	1,557583473