

Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Técnicas
Departamento de Química e Ingeniería Química



Trabajo de diploma presentado como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Químico.

Título: Propuesta para la obtención de los parámetros de operación de la fermentación en estado sólido de tallos de yuca para alimento animal.

Autor: Dayamí Argüelles García

Tutores: Ing. Roberto Real Reyes

Ing. Ena de los Ángeles Hernández López, MSc.

Matanzas, 2021

Declaración de autoridad

Yo Dayamí Argüelles García me declaro como único autor de este trabajo de diploma “Propuesta para la obtención de los parámetros de operación de la fermentación en estado sólido de tallos de yuca para alimento animal”, realizado en la Universidad de Matanzas sede “Camilo Cienfuegos” como requisito para optar al título de Ingeniero Químico y autorizo que el mismo sea utilizado por la institución para los fines que estime pertinente.

Firma

Nota de aceptación

Miembros del Tribunal:

Presidente

Secretario

Vocal

Pensamiento

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

Dedicatoria

A los tres pilares más importantes de mi vida, mis padres y mi hermana, quienes han hecho de mí la persona que soy hoy, con sus esfuerzos, amor, educación y dedicación. Quienes me enseñaron que las cosas más importantes de la vida son la familia, la felicidad, el cariño y el conocimiento. Los amo muchísimos, agradezco siempre a dios por tenerlos.

Agradecimientos

A mi mamá, mi papá y mi hermana, por creer en mí, por apoyarme siempre y darme fuerza para seguir adelante con sus consejos y experiencias.

A mi novio, por estar siempre a mi lado soportando mis cambios de humor en toda mi trayectoria estudiantil y sobre todo en estos últimos tiempos.

A mis tutores Roberto y Ena, por ayudarme, por su paciencia, dedicación y entrega a pesar de todas las dificultades.

A mi familia, por su preocupación y apoyo constante.

A Claudia Isabel, por su ayuda incondicional, preocupación y consejos en toda esta última etapa de mi vida.

A todos mis compañeros de aula por estos cinco años que compartimos juntos.

A cuatro grandiosas personas que conocí cuando empecé la universidad, Claudia Isabel, Sarahí, Eilyn y Dariel, mis Clasaeraidas. Gracias por todo el tiempo que pasamos juntos, por su apoyo y ayuda incondicional.

A Marinee, por su ayuda y por momentos felices que vivimos.

A todos los profesores que hicieron posible mi formación durante la carrera.

A todas las personas que me apoyaron de una manera u otra en toda mi trayectoria.

A todos muchas gracias.

Resumen

El presente trabajo se realiza en la Universidad de Matanzas sede “Camilo Cienfuegos” y en la UEB Biopropósito España Republicana. En la investigación se propone una metodología para la obtención de los parámetros de operación de la fermentación en estado sólido, de tallos de yuca, para alimento animal. Como primer paso se definen las técnicas analíticas para la determinación de la composición de los tallos de yuca residuales, lo que permite establecer los componentes principales que lo forman, especialmente el contenido de almidón. Luego se propone el procedimiento para la realización de la hidrólisis enzimática de los tallos y la raíz de yuca, que detalla los pasos para lograr la transformación del almidón en los azúcares reductores que se requieren en el proceso de fermentación. Después se plantea, a través de un diseño de experimentos, la determinación de los parámetros óptimos para la obtención del sustrato proteico a partir de la fermentación en estado sólido. Esto permite precisar los valores óptimos de temperatura, agitación y concentración inicial de sustrato con los que se desarrolla la levadura *Candida utilis* durante el proceso. Posteriormente, se proponen los balances de materiales requeridos para obtener las combinaciones de tallo y raíz de yuca que garanticen el indicador de proteína bruta. La aplicación de la propuesta permitirá la producción nacional de alimento animal con parámetros de operación óptimos, lo que contribuye a la soberanía alimentaria en Cuba, al sustituir importaciones.

Abstract

This work is carried out at the University of Matanzas headquarters "Camilo Cienfuegos" and at the UEB Biopropósito España Republicana. The research proposes a methodology to obtain the operating parameters of solid state fermentation of cassava stems for animal feed. As a first step, the analytical techniques for determining the composition of the residual cassava stems are defined, which makes it possible to establish the main components that form it, especially the starch content. Then the procedure is proposed to carry out the enzymatic hydrolysis of the stems and the cassava root, which details the steps to achieve the transformation of starch into reducing sugars that are required in the fermentation process. Then, through a design of experiments, the determination of the optimal parameters for obtaining the protein substrate from solid state fermentation is proposed. This allows to specify the optimal values of temperature, agitation and initial concentration of substrate with which the yeast *Candida utilis* grows during the process. Subsequently, the material balances required to obtain the cassava stem and root combinations that guarantee the crude protein indicator are proposed. The application of the proposal will allow the national production of animal feed with optimal operating parameters, which contributes to food sovereignty in Cuba, by substituting imports.

Tabla de Contenido

Introducción.....	1
Capítulo I: Análisis Bibliográfico	4
1.1 Biomasa Vegetal.....	4
1.1.1 Composición	4
1.1.2 Tallos de yuca	6
1.2 Proteína unicelular.....	8
1.2.1 Composición nutricional.....	9
1.2.2 Ventajas y desventajas de la proteína unicelular	10
1.2.3 <i>Candida utilis</i>	11
1.3 Proceso de fermentación	12
1.3.1 Fermentación líquida	12
1.3.2 Fermentación sólida.....	13
1.3.3 Diferencias entre la fermentación en medio sólido y la fermentación en medio líquido.	19
1.3.4 Tipos de biorreactores para la FMS	21
1.3.5 Aplicaciones de la FES.....	24
1.4 Conclusiones parciales del capítulo	26
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	27
2.1 Análisis documental.....	27
2.2 Preparación y caracterización química de los tallos de yuca residuales.....	28
2.2.1 Preparación	28
1.3.2 Caracterización de la materia prima	28
2.3 Determinación de los insumos necesarios para las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.	31
2.4 Hidrólisis enzimática de tallos y raíz de yuca.	32
2.5 Preparación del inóculo.	33
2.6 Diseño experimental para la obtención de los parámetros de operación en la producción de sustrato proteico como alimento animal.	33
2.6.1 Variables medidas en el diseño experimental.	36
2.7 Balances de materiales en las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.....	37
2.8 Conclusiones parciales del capítulo	38

Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	40
Bibliografía	41
Anexo	51

Introducción

En la actualidad la producción industrial requiere de recursos seguros y renovables, para así disminuir el uso excesivo de los recursos fósiles. Esto motivó a los investigadores a la búsqueda de fuentes renovables, como los materiales lignocelulósicos, que aparecen como la solución por su bajo costo y su disponibilidad.

La yuca como alimento para animales está relacionada directamente con la riqueza energética de sus raíces. La cantidad de caloría que se obtiene de las raíces supera ampliamente la de los cereales utilizados normalmente en programas de alimentación animal.

Los tallos de yuca constituyen un material lignocelulósico, que está formado por un 67,8% de carbohidratos estructurales y un 17,8% de lignina del peso seco (Rodríguez, 2019). La literatura reporta que los tallos de yuca presentan entre 20 y 30% de almidón en materia seca (Rattanachomsri *et al*, 2009), mientras que Zhu *et al.* (2013) refiere que varía entre 22 y 39% másico.

En Cuba la producción de piensos para la alimentación animal tiene una fuerte dependencia de la importación de soya y de *Northgold* con destino a la ganadería. En búsqueda de alternativas nacionales para sustituir ambas importaciones, la UEB España Republicana perteneciente a LABIOFAM, ha obtenido sustratos proteicos para la alimentación animal a partir del almidón presente en materias primas convencionales (maíz, boniato, yuca) con resultados satisfactorios. En el 2015, Orosco investigó la hidrólisis ácida, la auto-hidrólisis y la hidrólisis enzimática seguida de fermentación aerobia y concluyó que para la transformación del almidón de los tallos de yuca en azúcares simples para la obtención de un sustrato proteico (base levadura *Torula*), el método más eficiente y económico es la hidrólisis enzimática seguida de fermentación aerobia.

En el 2018, Real investiga la etapa de fermentación de hidrolizados de tallos de yuca residuales complementados con hidrolizados de raíz de yuca, en donde a partir de un diseño factorial a nivel de Erlenmeyer, obtuvo un óptimo de máxima formación de

biomasa para las condiciones de velocidad de agitación de 222 rpm ($3,7 \text{ s}^{-1}$) y una concentración inicial de sustrato de 29 g/L.

Santana (2018) investigó la hidrólisis enzimática de tallos de yuca residuales y determinó que se obtiene un óptimo de máxima concentración de azúcares reductores para las condiciones de velocidad de agitación de 530 rpm (15 s^{-1}) y relación líquido-sólido de 13. Además, obtuvo a partir de los balances de materiales que no se alcanza el indicador de porcentaje de proteína bruta, cuando se procesan los tallos de yuca residuales como única materia prima para las variedades C74 - 725 y Señorita. Por esta razón se requiere combinar materiales amiláceos.

En el 2019, Rodríguez investigó acerca de la obtención de un sustrato proteico base levadura *Torula* a partir de hidrolizados de raíz - tallos de yuca residuales en donde obtuvo un alimento animal con adecuado valor proteico avalado por el porcentaje de proteína bruta y obtuvo un óptimo de máxima formación de biomasa para una concentración inicial de sustrato de 31,8 g/L sin presencia de fibra.

En los estudios precedentes se ha logrado la obtención de alimento animal con el inconveniente que requiere varias etapas de purificación para obtener el producto final, lo que encarece el proceso.

Problema científico:

¿Cómo producir de forma económica un alimento animal proteico a partir del aprovechamiento de los tallos de yuca?

Hipótesis:

La metodología propuesta para la fermentación en estado sólido de los tallos de yuca residuales permitirá la obtención de un sustrato proteico de *Candida utilis* para la alimentación animal.

Objetivo general:

Proponer una metodología para la obtención de los parámetros de operación de la fermentación en estado sólido de tallos de yuca residuales para la producción de alimento animal proteico.

Objetivos específicos:

1. Definir las técnicas analíticas para la determinación de la composición de los tallos de yuca residuales.
2. Proponer el procedimiento para la realización de la hidrólisis enzimática de los tallos y la raíz de yuca.
3. Proponer a través de un diseño de experimentos la determinación de los parámetros óptimos para la obtención del sustrato proteico, a partir de la fermentación en estado sólido.
4. Proponer los balances de materiales requeridos para obtener las combinaciones de tallo y raíz de yuca que garanticen el indicador de proteína bruta.

Capítulo I: Análisis Bibliográfico

Introducción

En este capítulo se abordará la fundamentación teórica de los principales aspectos de la investigación. Para su realización se consultaron libros, revistas, artículos, tesis de grado y de maestría. También se consultaron materiales obtenidos mediante buscadores como el Google académico y se accede a bases de datos disponibles en Internet como *Scielo*, *Elsevier* y *Springer-Verlag*.

1.1 Biomasa Vegetal

La biomasa vegetal es el eslabón primario de la cadena trófica, es uno de los atributos más relevantes para caracterizar el estado de un ecosistema. Puede también ser usada como un componente en la dieta. Además, la biomasa en el futuro puede ser también considerada como una fuente complementaria de proteína animal para animales terrestres e incluso para el hombre (Martínez y Leyva, 2014).

1.1.1 Composición

La unidad estructural de todo organismo vegetal es la célula, la cual está compuesta de una pared celular que es una capa resistente, pero generalmente flexible, aunque en ocasiones es rígida y proporciona soporte estructural a las plantas. Además, le da protección ante las tensiones mecánicas y térmicas. Sus principales constituyentes son la lignocelulosa y los componentes extraíbles (Bustamante *et al.*, 2016).

La lignocelulosa es el elemento esencial de la pared celular en la materia vegetal (árboles, arbustos y pastos). Se crea por el proceso fotosintético que abarca el CO₂, el H₂O, y que adicionalmente aprovecha los rayos ultravioleta procedentes del sol como fuente de energía. Como producto de este proceso se genera la savia que está constituida por agua, azúcar y minerales (Chávez, 2019). Este tipo de biomasa se usa para generar productos químicos, biocombustibles y elementos bioquímicos (Garver y Liu, 2014), ya que es una fuente renovable que proporciona alternativas sostenibles a corto y largo plazo (Gómez *et al.*, 2012).

La materia lignocelulósica se constituye principalmente de tres moléculas vegetales:

- **Hemicelulosa:** Es un polímero complejo, compuesto de grupos heterogéneos de polisacáridos como: pentosas (D-xilosa y L- arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), que forman cadenas lineales ramificadas; y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico con enlaces β -1, (Sun y Tomkinson, 2003; Scheller y Ulvskov, 2010). Las hemicelulosas representan una cuarta parte de la biomasa vegetal seca mundial y son la segunda fracción de biomasa más abundante después de la celulosa (Jönsson y Thuvander, 2020), representan 25 – 30% en peso de la biomasa (Velasco, 2020).
- **Celulosa:** Es el principal componente de la biomasa celulósica y lignocelulósica (bagazo, hojas, frutos), y constituye de 30 - 35% en peso de la biomasa. Es un polímero de alto peso molecular que forma las fibras de la biomasa; tiene una estructura de 7 000 a 15 000 moléculas de glucosa (Basu *et al.*, 2013). El polímero de D-glucosa está unido por enlaces glucosídicos β - (1 \rightarrow 4), para formar moléculas de celobiosa (Nhuchhen *et al.*, 2014). Se forma por una estructura de largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno con el oxígeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, que desarrolla una estructura fibrilar cristalina y una amorfa (Cuervo *et al.*, 2009).
- **Lignina:** Es un polímero no cristalino, amorfo, tridimensional y ramificado con base estructural de unidades fenil-propano (C₁₀H₁₅O₃)_n, con un gran número de ciclos aromáticos unidos entre ellos por ciclos de furano o enlaces éter (β -O-4-arilo) (Vanholme *et al.*, 2010). Se forma de la unión de varios ácidos, alcoholes fenilpropílicos y múltiples azúcares en la pared celular de muchas células vegetales (Bustamante *et al.*, 2016). Representa 10 - 20% en peso de la biomasa, el cual está constituido por moléculas vegetales que no son solubles en agua, lo que genera impermeabilización y resistencia a cualquier ataque (biológico y físico) (Achinas y Euverink, 2016).

Los componentes extraíbles se dividen en componentes orgánicos e inorgánicos (minerales). Los inorgánicos presentan algunos iones metálicos, esenciales para el óptimo desarrollo del árbol, su contenido varía de 2,5 a 12,0% del peso de la biomasa.

Altos contenidos de minerales se encuentran en las hojas, ramas, corteza, raíces; su cantidad es influenciada por las condiciones del suelo y edad (Mohan *et al.*, 2006). Los componentes más abundantes son el calcio, potasio y magnesio, en menor proporción fósforo, sodio, hierro, silicio, manganeso, cobre y zinc (Kim *et al.*, 2012).

Los componentes orgánicos son responsables de las características de la biomasa, como el color, olor, sabor, densidad, higroscopicidad e inflamabilidad (Mohan *et al.*, 2006). Son compuestos solubles en diferentes solventes, como la mezcla de alcohol y benceno que solubiliza ceras, grasas y resinas; en agua fría se solubilizan los taninos, gomas, azúcares y colorantes, mientras que en agua tibia los almidones. Se clasifican en ácidos volátiles, aceites esenciales, ácidos resínicos y polifenoles (Lima, 2013).

Entre los componentes extraíbles orgánicos se encuentra el almidón (un polímero de glucosa), el cual es uno de los polisacáridos naturales más abundantes (Li *et al.*, 2021). Químicamente, el almidón consta de dos moléculas distintas: amilosa y amilopectina (Meimoun *et al.*, 2018). La amilosa se compone principalmente de cadenas unitarias de α -1,4-D-glucano lineales, mientras que la amilopectina consta de cadenas unitarias de α -1,4-D-glucano lineales unidas a través de enlaces α -1,6 (Ahmed *et al.*, 2012).

El almidón es una fuente importante de glucosa exógena en los seres humanos, y representa, aproximadamente el 30% en peso o más de la dieta del Reino Unido (Edwards *et al.*, 2021). En la mayoría de las fuentes botánicas de almidón, las proporciones de amilosa y amilopectina se encuentran típicamente en el rango de 20 – 30% y 70 – 80%, respectivamente (Buléon *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2015).

1.1.2 Tallos de yuca

La yuca denominada científicamente *Manihot esculenta* Crantz perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, es conocida según la zona de origen como yuca, mandioca, aipi o *cassava*. Se caracteriza por el desarrollo de sus raíces, las cuales son vasos laticíferos que se encuentran compuestos por células galactocitas o monosacáridos que son fuente de energía de la planta (Fernández, 2015). Es originaria de Sur América y se emplea desde antes de la Colonia como parte de la alimentación de las tribus. Además, se utiliza en la alimentación animal (Suárez y Mederos, 2011).

La yuca es la cuarta fuente de calorías, después del arroz, la caña de azúcar y el maíz. Es una raíz de forma alargada cubierta por una cáscara áspera de color rosado/café; o beige; su densa y fibrosa pulpa es de color blanco, crema o amarillo y constituye la parte comestible en dependencia de la variedad (Pérez y Rodríguez, 2018).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la yuca es uno de los cultivos alimentarios básicos de más rápida expansión en los países consumidores de la misma, y a medida que ha pasado el tiempo ha crecido su importancia entre los agricultores, mientras que la demanda industrial también aumenta constantemente. A nivel mundial, la yuca ha experimentado un crecimiento sostenido muy superior al 3% anual. De acuerdo a la FAO, en el año 2018, la producción mundial alcanzó alrededor de 278 millones de toneladas.

Durante la cosecha de la yuca, que generalmente se realiza entre ocho y doce meses después de la siembra, el tallo leñoso, que representa hasta la mitad del peso de la raíz, se separa de estas. Se estima que cada año se producen alrededor de 116 millones de toneladas de tallos de yuca fresca en todo el mundo, y que hay entre 32 y 35 millones de toneladas disponibles en base a masa seca (Wei *et al.*, 2014). Aproximadamente el 10 - 20% del tallo se utiliza para la propagación, y pequeñas cantidades se utilizan como combustible o alimento para animales, mientras que la mayor parte tiene que retirarse de los campos y se abandona o quema, lo que provoca emisiones y problemas ambientales (Zhu *et al.*, 2015).

Los tallos de yuca tienen una larga historia de no ser útiles en su mayoría, incluso para la alimentación animal, debido a su naturaleza particularmente leñosa. Solo los rumiantes tienen la capacidad de digerir este material. En algunos países, una parte de los tallos de yuca se utiliza como combustible para cocinar (Zhu *et al.*, 2013). Pero su alto contenido y disponibilidad de carbohidratos la convierten en una materia prima potencial para la producción de etanol combustible, sin afectar directamente al sector alimentario (Martín *et al.*, 2016).

Como otros materiales lignocelulósicos, los tallos de yuca requieren un tratamiento previo para obtener rendimientos sustanciales de azúcares fermentables a través de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Entre diferentes métodos de pretratamiento, se ha

prestado atención al uso de ácido sulfúrico diluido para el pretratamiento de los tallos de yuca (Han *et al.*, 2011). Debido a su alto contenido de almidón, los tallos de yuca requieren hidrólisis del almidón antes del pretratamiento para maximizar los rendimientos de glucosa y minimizar la formación de productos inhibidores de la degradación del azúcar (Martín *et al.*, 2017).

Hoy en día se estudia la producción de biocarbón para posibles aplicaciones catalíticas y energéticas a través de la conversión de pirólisis al vacío por microondas del tallo de yuca (Ying *et al.*, 2020).

Otra vertiente en la utilización de los tallos de yuca es la producción de proteína unicelular. Recientemente, Orosco (2015) obtuvo resultados prometedores en la fermentación de hidrolizados de tallos de yuca de la variedad Señorita, por vía enzimática.

Entre otras de las aplicaciones de los tallos de yuca se incluye a la fabricación de tableros, que a su vez pueden ser empleados en la fabricación de pisos, falsos techos, muebles y cubiertas de pared (Aislen, *et al.*, 2015).

1.2 Proteína unicelular

El término proteína unicelular (PUC) se refiere a las células deshidratadas de microorganismos tales como levaduras, hongos, bacterias y microalgas; las cuales son cultivadas en gran escala con el fin de suplir las necesidades proteicas de humanos y animales (González, 2018).

Según Ali *et al.* (2017) la producción de proteína unicelular a gran escala tiene las siguientes características interesantes:

- La amplia gama de métodos, materias primas y fuentes microbianas que se pueden utilizar para este proceso.
- El sustrato se convierte con alta eficiencia.
- La rápida tasa de crecimiento de las células microbianas da como resultado una alta productividad.
- Los factores estacionales no muestran ningún efecto sobre este proceso.

1.2.1 Composición nutricional

La proteína unicelular no se refiere exclusivamente al conjunto de proteínas presentes en la célula, sino que es un concepto que incluye los aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Nasseri *et al.*, 2011; Sisman *et al.*, 2012).

Dada su composición nutricional, la biomasa microbiana es una materia prima apta para el desarrollo de gran variedad de productos aprovechables para alimentación humana o animal. El aporte proteico de la biomasa unicelular es la principal razón para su producción a nivel industrial. La composición general de diferentes familias de microorganismos empleados como proteína unicelular se presenta en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Composición porcentual promedio en base seca de los principales tipos de microorganismos empleados como fuente de proteína unicelular.

Componente	Hongos Filamentosos	Algas	Levaduras	Bacterias
Proteína	30-50%	40-63%	45-56%	50 - 83%
Grasa	2-8%	7-20%	2-6%	1,5 - 3,0%
Cenizas	9-14%	8-10%	5- 9,5%	3 - 7%
Ácidos Nucleicos	7-10%	3-8%	6-12%	8 - 16%
Aminoácidos	--	--	54%	65%
Humedad	13,00%	6%	4,50%	2,80%

Fuente: Chacón (2004).

En la **Tabla 1.1** se exponen los porcentajes de los componentes de los diferentes microorganismos; donde se puede observar que tienen muy buena proporción de proteína y grasa. En el caso de las levaduras y bacterias sus perfiles de aminoácidos son favorables, aunque difieren en los sulfurados como cisteína.

Si se analiza la variabilidad del ácido nucleico en los microorganismos y en especial en las levaduras, se puede observar que tienen un contenido ácido nucleico muy elevado. La ingesta excesiva de ácidos nucleicos produce la precipitación de ácido úrico, lo que provoca problemas de salud como la formación de cálculos renales y gota (Ali *et al.*,

2017).

1.2.2 Ventajas y desventajas de la proteína unicelular

Según Chacón (2004) entre las ventajas que ofrece la proteína unicelular pueden mencionarse:

1. Requerimientos de crecimiento fáciles de implementar y que originan rápidas tasas de crecimiento y alta productividad: el tiempo de duplicación puede ser de 0,3 a 2 h en bacterias, 1 - 3 h en levaduras, 2 - 6 h en algas y 4 - 12 h para hongos filamentosos celulolíticos. Es posible producir y seleccionar fácilmente cepas con alta productividad y buena composición.
2. Los microorganismos son más fáciles de manipular genéticamente que los animales y plantas superiores, lo cual los hace más susceptibles al mejoramiento y transferencia genética.
3. Poseen un elevado contenido vitamínico, y especialmente proteico de apreciable valor nutricional: entre 44 a 88% de proteína en peso seco y hasta un 15% de ácidos nucleicos, también en base seca.

No obstante, la gran cantidad de ventajas que presenta la PUC, hay desventajas inherentes a las mismas (Chacón, 2004):

1. El alto contenido de ácidos nucleicos (4 - 6% en algas; 10 - 16% en bacteria; 6-10% en levadura y 2,5 - 6% en hongos), puede ser un riesgo para la salud de los animales monogástricos y para el hombre.
2. La digestión lenta o nula de la pared celular en el tracto digestivo del ser humano y otros animales, especialmente en cuanto a las algas, puede ser causa de indigestión y reacciones alérgicas.
3. A pesar de la alta productividad, en un proceso de producción de PUC efectuado en un medio de fermentación líquido, la proteína se obtiene en concentraciones muy diluidas (menos del 5% de sólidos), por lo que se requiere de procesos de concentración.

1.2.3 *Candida utilis*

Las levaduras se consideran importantes fuentes de proteína, vitaminas, minerales y factores no identificados que favorecen el crecimiento. Entre las que se utilizan para la alimentación animal, se encuentra la *Candida utilis* (levadura torula o forrajera), que se obtiene a partir de la fermentación aeróbica de la melaza o de la vinaza de destilerías. Su composición puede variar en dependencia del sustrato que se utilice para su crecimiento y del proceso industrial al que se somete (Rodríguez, Mora, Canela *et al.*, 2011). La levadura *Candida utilis* pertenece a la clase de *Ascomycetes*. Sus colonias tienen una coloración amarillenta y un sutil olor a éster (Ferreira *et al.*, 2019).

La levadura *Candida utilis* es una excelente plataforma para la producción de PUC para alimentación animal y humana (Buerth *et al.*, 2016). Esta levadura tiene un importante valor nutricional, posee un alto contenido proteico (55%) y un interesante perfil de aminoácidos, que incluye lisina (4,5%), treonina (3,0%), histidina (2,0%) y arginina (4,9%), así como vitaminas del complejo B (Lucca *et al.*, 1995; Buitrago *et al.*, 2019). Es más, *C. utilis* tiene compuestos bioactivos endógenos como glutatión, glucomanano, biotina y l-fenilacetilcabinol (Buerth *et al.*, 2011; Tomita *et al.*, 2012), convirtiéndose así en una interesante fuente natural tanto de proteínas como de compuestos bioactivos.

La ventaja de la *Candida utilis* que se utiliza con frecuencia, para la producción de biomasa, es su capacidad para utilizar una variedad de fuentes de carbono rápidamente y con un alto rendimiento de proteínas (Ferreira *et al.*, 2019).

La mayoría de las especies de levaduras se propagan en diferentes medios. Sin embargo, la especie *Candida utilis* se caracteriza por su gran poder de adaptación ante los cambios en las condiciones de crecimiento y multiplicación. A partir de estas bondades, en Cuba se desarrolló una tecnología de producción de levadura torula, que utiliza como sustrato base la vinaza de destilería. La reducción de la carga orgánica de este residual y al mismo tiempo, la obtención de un producto valioso y escaso (fuente proteica), es la gran ventaja que ofrece (Otero *et al.*, 2007; Rodríguez, Mora, Oliveira *et al.*, 2011). Este proceso se basa en la sustitución de la miel final de caña por la vinaza de destilería. La vinaza es el residual líquido que se obtiene de la operación de

destilación en el proceso de producción de alcohol (Guevara y Suárez, 2016).

Una de las cepas más empleadas en Cuba es la *Candida utilis* NRRL Y-660. Se caracteriza por un perfil superior de aminoácidos totales y por un mayor rendimiento biomasa-sustrato. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4,5 y 5. Su rango de temperatura óptimo está entre los 28 y 33°C. Un aspecto de interés es que un incremento en la concentración inicial de sustrato repercute en una disminución del rendimiento biomasa-sustrato (Otero y Almazán, 2012).

1.3 Proceso de fermentación

La palabra fermentación se deriva del verbo latino fervoroso, que significa hervir, ya que describe la apariencia burbujeante y espumosa de las bebidas de fermentación temprana (Shokri *et al.*, 2021). En su acepción estricta, la fermentación, se refiere a la obtención de energía en ausencia de oxígeno y generalmente lleva agregado el nombre del producto final de la reacción (Ramírez, 2013). Denominada "*la vie sans l'air*" o "la vida sin aire" por Pasteur, sirve, de acuerdo con Ramírez (2013), para cinco propósitos generales:

- 1) Diversificación de sabores, aromas y texturas.
- 2) Preservación de cantidades substanciales de alimentos a través de ácido láctico, etanol, ácido acético y fermentaciones alcalinas.
- 3) Enriquecimiento de sustratos alimenticios con proteína, aminoácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- 4) Detoxificación durante el proceso de fermentación alimenticia.
- 5) Disminución de los tiempos de cocinado y de los requerimientos de combustible.

1.3.1 Fermentación líquida

La fermentación en medio líquido (FML) o sumergida (en inglés como *SmF*) se define como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede ser o no aireado por medios mecánicos (Vásquez, 2013).

Según Vásquez (2013) la forma de fermentación líquida más utilizada en los

laboratorios es en matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, siendo éstos los más utilizados industrialmente, donde se pueden ver fermentadores con volúmenes de 10 litros o más, en los cuales se producen compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite mezclar el cultivo de forma homogénea y aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas:

- 1) Dispersa el gas en burbujas muy pequeñas incrementando el área de interfase gas-líquido.
- 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas.
- 3) Disminuye el grosor de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia.

1.3.2 Fermentación sólida

El cultivo sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos porosos y humedecidos con niveles de actividad de agua de 0,4 a 0,9, el material sólido puede ser natural o inerte, siendo el primero, el más usado como sustrato para el crecimiento de los microorganismos (Vásquez, 2013). Los sustratos más utilizados incluyen los subproductos generados por las prácticas agrícolas y forestales como granos de semillas, fibras de rastrojos y residuos de madera (Rodríguez y Sanromán, 2005).

Esta tecnología ofrece algunas ventajas frente al cultivo líquido para la formación del producto destacándose el uso de sustratos baratos como fuentes de carbono, rendimiento del producto más alto, represión por carbono baja, volúmenes de operación pequeños, baja demanda de agua y energía, productividad volumétrica alta, fácil aireación y simulación del medio de crecimiento natural de los microorganismos (Viniestra *et al.*, 2003; Hölker *et al.*, 2004). A pesar de ello, existen algunas desventajas del cultivo sólido, por ejemplo, puede ser necesario el pretratamiento mecánico y químico del sustrato (molido, hidrólisis con solventes), la determinación de biomasa y la

reproducibilidad de los experimentos es difícil por la heterogeneidad de los sustratos empleados, los gradientes de temperatura, oxígeno y pH no pueden ser controlados a gran escala (Hölker *et al.*, 2004).

1.3.2.1 Fenómenos de transporte involucrados en la FMS

Los principales fenómenos de transporte involucrados en los procesos de FMS son la transferencia de calor y masa. Se produce tanto un gradiente de temperatura producto del calor metabólico generado por el crecimiento del microorganismo, como un gradiente de agua entre el lecho y el aire que ingresa al sistema.

- **Transferencia de calor**

Entre los principales mecanismos de transferencia de calor se encuentran la conducción entre partículas del lecho sólido, la convección generada por el flujo de aire, y el enfriamiento evaporativo, producto de la transferencia de agua desde el lecho hacia el aire. De los tres mecanismos mencionados, la conducción es el menos eficiente y la mayor cantidad de calor es removida del sistema debido a los fenómenos de convección y enfriamiento evaporativo. En ocasiones la convección de calor hacia el aire, presenta dificultades producto de las resistencias internas del lecho. Por ello, se requiere una corriente de aire con una temperatura y saturación tal que se favorezca el enfriamiento evaporativo del sistema y a su vez se eviten pérdidas significativas de la humedad del lecho (Cano, 2019).

- **Transferencia de masa**

En cuanto a la transferencia de masa en el proceso de FMS, los componentes del aire y del lecho (oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua), se difunden dentro de los espacios entre partículas producto de cualquier gradiente de concentración. El efecto de la difusión en el fenómeno de transferencia de masa es mayor en biorreactores de tipo bandeja, que aprovechan dicho principio para procesos de secado. Cuando se trabaja bajo régimen turbulento, el caudal de aire provoca el arrastre de los componentes del lecho, dicho fenómeno se conoce como transferencia de masa por convección (Cano, 2019).

1.3.2.2 Condiciones de la fermentación en estado sólido

Es fundamental para el éxito de la FES los parámetros de humedad, temperatura, pH, inóculo, actividad de agua, aireación, agitación, tamaño de partícula y diseño del reactor; debido a que de ellos va a depender tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final. Por este motivo, se describe la influencia que cada uno de ellos tiene en el proceso.

- **Humedad**

El exceso de humedad en un sustrato podría alterar el crecimiento del microorganismo y al presentarse la disminución del mismo se anulará el crecimiento enzimático por la baja solubilidad de los nutrientes (Reinoso, 2015). Las condiciones de humedad para la mayoría de las células se encuentran entre el 70 y 80%. Para el desarrollo de bacterias la humedad del material debe presentar un 70%, en el caso de las levaduras un 60 y 70%, y para los hongos en un rango de 20 y 70% de humedad (Bustamante, 2015).

- **Temperatura**

La temperatura es considerada uno de los factores más limitantes ya que esta se encuentra ligada al tipo de proceso que se haya diseñado, en este aspecto Zhu *et al.*, (2020) habla sobre la producción de etanol a una elevada temperatura y presenta variaciones de acuerdo a las necesidades del microorganismo. Según Pastrana, (2009) la actividad metabólica de los microorganismos en un fermentador produce una elevada temperatura en las zonas internas del sustrato, afectando directamente al crecimiento y fermentación de las esporas, es necesario e importante que la temperatura en el interior de un reactor sea controlada de acuerdo a las especificaciones del sustrato utilizado.

- **pH**

Al igual que la temperatura es uno de los parámetros más difíciles a controlar ya que el pH en la capa de líquido que rodea el sólido va cambiando por la presencia de ácidos orgánicos (acético y láctico) durante la fermentación. (Leon *et al.*, 2017). La FES presenta una estabilidad frente al pH debido a la elevada capacidad tampón de los sustratos utilizados por lo que es necesario un ajuste inicial del pH para eliminar la necesidad de control del mismo durante el proceso de fermentación (Pastrana, 2009).

Con respecto a los microorganismos asociados a la FES, el crecimiento de los hongos filamentosos debe presentar valores de pH 2 - 9 con un valor óptimo de 3,8 - 6. Para las levaduras deben estar en un rango de 2,5 – 8,5 y un óptimo de 4 – 5 y las bacterias entre 4,5 – 5,5 y un óptimo de 6,5 - 7,5 (Mateos, 2013).

- **Inóculo**

En la FES es importante el tipo de inóculo (micelio o esporas) y la forma de inoculación, en este caso el uso de micelio presenta una mejor competitividad del hongo eliminando la colonización del sustrato por microorganismos contaminantes (El-Gammal *et al.*, 2017). Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo es que representa una mejor competitividad del hongo, reducción de microorganismos contaminantes y una rápida colonización por los tiempos reducidos de incubación (fase de latencia) (León, 2008). Con respecto a la cuantificación de esporas viables que se encuentran presentes en un inóculo a muy bajas concentraciones promueven el crecimiento de bacterias indeseables, mientras que a altas concentraciones provocarían un agotamiento rápido de los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Delgado y Barbosa, 2014).

- **Actividad de agua (*aw*)**

Cada uno de los microorganismos que intervienen en la FES necesitan un valor mínimo, máximo y óptimo de actividad de agua para sobrevivir en un medio de cultivo. Para el caso de los hongos filamentosos estos están conformados por una actividad de agua de 0,7 y para el caso de las bacterias se consideran valores superiores a la de los hongos. Con respecto a las enzimas estas deben encontrarse en un rango de 0,25 y 0,7 (Delgado y Barbosa, 2014).

- **Aireación**

La aireación tiene diferentes funciones en la FES: la oxigenación de los microorganismos, la eliminación del CO₂ generado durante la fermentación, la disipación del calor (regulando la temperatura del medio), la distribución del vapor de agua (regulando la humedad) y la distribución de los compuestos volátiles producidos durante el metabolismo (Díaz, 2009). La tasa de aireación depende de la porosidad del medio, debiéndose optimizar los parámetros de presión parcial de oxígeno (pO₂) y presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂) para cada tipo de sustrato,

microorganismo y proceso (Díaz, 2009). Por lo que, la aireación es un parámetro muy importante en la FES, ya que el ambiente gaseoso puede afectar significativamente a los niveles relativos de biomasa y a la producción enzimática.

- **Agitación**

La agitación y la rotación se utilizan en FES normalmente con dos fines; establecer un contacto homogéneo entre las partículas y el aire y, por otro lado, acelerar la transferencia de calor y materia. Los procesos de aireación y agitación convierten la difusión molecular de la fase gaseosa en una difusión convectiva. Sin embargo, en contrapartida, plantean inconvenientes como daños ocasionados al micelio, reducción de la porosidad de los sustratos o posibles desnaturalizaciones de las enzimas producidas. Con algunos sustratos (como el heno) ocurre que, cuando las partículas de sólido están húmedas se agrupan de forma que las partes internas no se ven afectadas por la agitación, siendo muy limitada la efectividad del proceso.

- **Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula también es un factor importante a tener en cuenta. Sustratos de partículas pequeñas proporcionan una gran área específica, lo que afecta de manera positiva al desarrollo del microorganismo; sin embargo, un tamaño de partícula demasiado pequeño, que genere a su vez un espacio interpartícula reducido, disminuye la eficiencia de la respiración/aireación dificultando el crecimiento microbiano (Díaz, 2009). Debido a esto es necesario alcanzar un compromiso para el tamaño de partícula según el proceso del que se trate.

- **Diseño del reactor**

Un aspecto muy importante de la fermentación en estado sólido es la búsqueda del diseño más conveniente de biorreactor para solventar problemas como la transferencia de calor y materia. Es muy importante que el diseño del reactor sea tal que haga posible mantener constantes la temperatura y el contenido en humedad del sólido simultáneamente, lo cual resulta complicado en procesos de gran escala (Díaz, 2009).

1.3.2.3 Componentes de FES

Los principales componentes de la fermentación en estado sólido son el microorganismo, ser vivo que lleva a cabo el proceso, y el sustrato, medio sobre el cual

se va a desarrollar el proceso fermentativo.

- **Microorganismo**

Los microorganismos utilizados en los procesos de FMS son en su mayoría hongos filamentosos, aunque también se ha experimentado con bacterias y levaduras. Las bacterias requieren una actividad de agua entre 0,9 y 1 (medio líquido) para su crecimiento, mientras que las levaduras se desarrollan adecuadamente en medios con actividades de agua superiores a 0,75; por lo que se utilizan con mayor frecuencia que las bacterias. Aunque se prefiere el uso de hongos filamentosos debido a que se desarrollan de mejor manera sobre sustratos con bajo contenido de agua libre (humedades entre 50% y 60%) y son capaces de fraccionar polisacáridos y utilizarlos como fuente de carbono. El proceso de FMS se puede desarrollar a partir de cultivos puros del microorganismo o de cultivos de varias cepas inoculadas simultánea o secuencialmente (Cano, 2013). Dentro de los usos de las levaduras se encuentran la producción de etanol y alimentos, mientras que las bacterias están involucradas generalmente en el compostaje, en el ensilado y en algunos procesos alimentarios (Díaz, 2009).

- **Sustrato**

La selección de un soporte adecuado para el cultivo en estado sólido es esencial ya que de ello depende el éxito del proceso. Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de seleccionar un soporte son el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química. Además de estos factores, también es de gran importancia su disponibilidad y precio (Díaz, 2009). Según Díaz (2009) gran variedad de materiales sólidos utilizados en la FES puede clasificarse en dos grandes grupos:

- ✓ Materiales inertes: Aquellos que únicamente actúan como soporte físico para el anclaje de los microorganismos.
- ✓ Materiales no inertes: Aquellos que no sólo actúan como soporte, sino que además proporcionan algunos nutrientes a los microorganismos. Estos sustratos son típicamente abonos y productos heterogéneos de agricultura o subproductos de la industria agraria. Los materiales no inertes se dividen en:
 - Residuos con fibra:
 - Con alta digestibilidad: Como la pulpa de cítricos, el salvado de

- gluten de maíz, el residuo de cebada, etc.
- Con baja digestibilidad: Como el bagazo de caña de azúcar, los cereales, el maíz, la paja de soja y algodón, la cáscara de algodón, la cáscara de soja, la cáscara de cacahuate, el orujo de uva, etc.
- Salvados, a los que pertenecen el arroz, los cacahuetes, la soja y el algodón, etc.

En algunas ocasiones, este tipo de sustratos tienen que ser sometidos a pretratamientos antes del proceso de fermentación para que sean más asimilables por los microorganismos. Según Raimbault, M. (1998) los pretratamientos más habituales son:

- Reducción de tamaño mediante molido, rallado o picado.
- Hidrólisis de los polímeros vía física, química o enzimática para aumentar su disponibilidad para el hongo.
- Suplementación externa con nutrientes: adición de fósforo, nitrógeno, sales, etc.
- Ajuste del pH y de la humedad utilizando una solución mineral. Este pretratamiento es muy habitual, ya que puede ocurrir que los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos se encuentren disponibles en los sustratos en concentraciones por debajo de las óptimas, o incluso pueden no estar presentes en los mismos.
- Cocido y tratamiento de vapor para conseguir una degradación previa de las macromoléculas y la eliminación de los principales contaminantes.

1.3.3 Diferencias entre la fermentación en medio sólido y la fermentación en medio líquido.

En comparación con la fermentación líquida, la principal ventaja de la fermentación en estado sólido es un suministro suficiente de oxígeno. Hay menos aguas residuales orgánicas y mayor rendimiento de producto en la fermentación en estado sólido. Se podrían producir productos de alto valor agregado mediante fermentación en estado sólido utilizando residuos industriales y agrícolas de bajo costo como sustrato. En consecuencia, la fermentación en estado sólido es la tecnología más prometedora que

puede utilizar de manera integral los recursos renovables.

A partir del conocimiento de las diferencias físicas existentes entre ambos sistemas de fermentación, se puede definir algunas diferencias entre ambos tipos de cultivo (tabla 1.2).

Tabla 1.2 Comparación entre la fermentación sumergida y la fermentación en soporte sólido.

Fermentación sumergida	Fermentación sólida
El agua es el componente principal de la cultura.	No hay agua libre y el contenido de agua de sustrato es bajo.
Los microorganismos absorben nutrientes de la cultivo líquido; no hay gradiente de concentración de nutrientes.	Los microorganismos absorben nutrientes de la sustrato sólido húmedo; existe un gradiente de concentración de nutrientes.
El sistema de cultivo se compone principalmente de líquido; el líquido es la fase continua.	El sistema de cultivo consta de tres fases (gas, líquido, sólido) y gas es la fase continua.
El tamaño de la inoculación es pequeño, menos del 10%.	El tamaño de la inoculación es grande, más del 10%.
El oxígeno requerido proviene del oxígeno disuelto; hay una mayor cantidad de oxígeno disuelto.	El oxígeno requerido proviene de la fase gaseosa; bajo consumo de energía.
Los microorganismos se distribuyen uniformemente en el sistema de cultivo.	Los microorganismos se adsorben o penetran en el sustrato sólido.
Al final de la fermentación, el medio es líquido, y las concentraciones de productos son bajas.	Al final de la fermentación, el medio es un sustrato en estado húmedo, y las concentraciones de productos son altas.
Baja tasa de producción y bajo rendimiento del producto.	Alta tasa de producción y alto rendimiento del producto.

La mezcla es fácil y el crecimiento de los microorganismos no están restringidos por la difusión de nutrientes.	La mezcla es difícil y el crecimiento de los microorganismos están restringidos por la difusión de nutrientes.
El control de temperatura es fácil Homogeneidad.	La eliminación del calor metabólico es difícil Heterogeneidad.
El proceso de fermentación se puede detectar y controlado en línea.	El proceso de fermentación es difícil de detectar. y control en línea.
El proceso de extracción suele ser complejo; allí es una gran cantidad de aguas residuales orgánicas.	El proceso de extracción es simple y controlable; poca agua orgánica residual.
Alta actividad de agua.	Actividad de agua baja.
Recipiente de fermentación sellado.	Recipiente de fermentación simple.
Cepas puras.	Enriquecimiento natural o cepas de reproducción artificial.
Consumo de energía y equipamiento la inversión es baja.	Consumo de energía e inversión en equipos son altos.
Alto costo de materia prima.	Bajo costo de materia prima.

Fuente: Chen, 2013

1.3.4 Tipos de biorreactores para la FMS

Los biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure la homogeneidad entre los componentes del sistema, las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruíz *et al.*, 2007).

Un biorreactor o fermentador se define como “aquel dispositivo que proporciona un medio ambiente controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto”. El medio ambiente adecuado que proporciona un biorreactor, tiene que tener niveles óptimos de temperatura, pH, sustrato, sales, y

oxígeno, para así convertir las materias primas en productos específicos (metabolitos) de interés (Rodríguez *et al.*, 2003).

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas (Tabla 1.3). En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados, solo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles (Ruíz *et al.*, 2007).

Tabla 1.3 Clasificación y diferencias en biorreactores a nivel laboratorio, piloto e industrial.

BIORREACTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Escala laboratorio		
Columna	Económico, fácil montaje, monitoreo y control humedad, temperatura, biomasa y CO ₂ . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O ₂ , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
Columna Estéril	Control de humedad y temperatura. Sistema de esterilización previo inoculación y toma de muestra.	Formación de gradientes de concentración de O ₂ y nutrientes.
Tambor horizontal	Mayor aireación y mezclado del	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de

	<p>sustrato. Existen varios diseños con modificaciones que mejoran la remoción del calor.</p>	<p>temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor.</p>
Zymotis	<p>Mejor transferencia de calor.</p>	<p>Problemas de asepsia en el proceso. Mayor compactación de la cama de sustrato.</p>
Growtek	<p>Facilidad en la toma de muestra. Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido. Menor acumulación de calor en la cama de sustrato.</p>	<p>No cuenta con un sistema de aireación. Solo se pueden manejar una sola carga de 400 mL de medio líquido por fermentación.</p>
Proceso continuo	<p>Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.</p>	<p>Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial.</p>
Columna-Charola	<p>Económico. Alta transferencia de O₂ y aireación. Mayor transferencia de nutrientes. Fácil remoción de temperaturas elevadas.</p>	<p>Primer Prototipo. Optimizar la cantidad y tamaño de charolas en el volumen del cilindro.</p>
Escala piloto y/o industrial		

Biocon	Automatizado en el control de las variables de estudio del crecimiento microbiano. Altos niveles de asepsia. Equipo compacto.	Dificultad en la toma de muestra. Rápida generación de calor exotérmico por crecimiento microbiano.
Lecho fluidizado	Operación de forma continua. Menor aglomeración del sustrato. Incremento en la transferencia de O ₂ y humedad. Variedad de configuraciones de soportes.	Formación de altos esfuerzos cortantes que pueden afectar al microorganismos y rendimiento del producto.

Fuente: Ruíz *et al.*, 2007

1.3.5 Aplicaciones de la FES

La fermentación en estado sólido se originó en el campo de la producción de alimentos tradicionales y a medida que pasaron los años se realizaron innovaciones tecnológicas, y alcanzó gran importancia en el campo farmacéutico y químico, al igual en el campo energético y medioambiental.

- **Aplicaciones en el campo de la industria alimentaria**

- ✓ El pan es un producto que se fermenta con levadura.
- ✓ El queso se produce a partir de fermentación mixta utilizando *Lactococcus lactis* y Estreptococo.
- ✓ La salsa de soja y el miso implican el cultivo de *Aspergillus oryzae* en soja y harina de trigo.

- ✓ El cultivo de bacterias del ácido láctico que transfieren el alcohol al ácido acético crea vinagre. Las etapas tradicionales de elaboración de vinagre y fermentación con ácido acético utilizan tecnología de fermentación en estado sólido.
- ✓ El "arroz rojo" se produce mediante el cultivo de *Monascus purpureus* sobre arroz cocido, que produce un pigmento rojo oscuro. Al final de la fermentación, el arroz rojo fermentado se seca y se muele, y el polvo se utiliza como colorante para cocinar.
- **En los campos farmacéuticos y químicos**
 - ✓ La producción de ácido láctico y cítrico se había logrado previamente mediante fermentación en estado sólido. La producción de ácido láctico implica el cultivo de hongos filamentosos o bacterias utilizando mandioca, remolacha azucarera, bagazo y otros desechos agrícolas como sustrato.
 - ✓ La producción de ácido fumárico, oxálico y linolénico.
 - ✓ Los metabolitos secundarios microbianos, como los aminoácidos, las vitaminas y otras sustancias biológicamente activas, tienen un buen valor para aplicaciones médicas e industriales.
 - ✓ La producción de metabolitos secundarios como antibióticos, toxinas bacterianas, auxinas, fármacos inmunes y alcaloides.
 - ✓ La fermentación en estado sólido también se ha aplicado en una variedad de otros campos, como los de producción de biosurfactantes, ácido glutámico, aminos, pigmentos, vitaminas, carotenoides, goma xantana y más.
- **En los campos de la energía y la protección del medio ambiente**
 - ✓ La fermentación en estado sólido se ha aplicado con éxito para biocombustibles, bioplaguicidas, biotransformación, desintoxicación

biológica y biorremediación.

- ✓ La producción de etanol combustible a partir de la fermentación en estado sólido.
- ✓ La producción industrial de plaguicidas mediante el cultivo de *Bacilo turingiensis* y la virulencia (Chen y He, 2012).
- ✓ La biotransformación de cultivos y desechos para mejorar su valor nutricional. Las cepas para la biotransformación son comúnmente hongos de pudrición blanca.

1.4 Conclusiones parciales del capítulo

1. Los tallos de yuca son factibles para la alimentación animal debido a que poseen un alto contenido de carbohidratos y bajo costo.
2. La levadura *Candida utilis* posee un alto contenido proteico y vitamínico, además posee gran poder de adaptación ante los cambios en las condiciones de crecimiento y productividad por lo que es muy factible para la producción de alimento animal.
3. Los aspectos a considerar en la propagación de la *Candida utilis* son: la temperatura, pH, el nivel de oxigenación del medio, y la concentración inicial de sustrato.
4. En el proceso de fermentación en estado sólido es importante el control de los parámetros de humedad, temperatura, pH, inóculo, actividad de agua, aireación, y agitación ya que de ellos dependerá el crecimiento de los microorganismos para la formación del producto final.

Capítulo II: Materiales y Métodos

En el presente capítulo se describe la metodología propuesta en la realización del trabajo, los procedimientos aplicados y equipos fundamentales utilizados en la investigación.

El trabajo experimental se desarrolla en los laboratorios del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Técnicas de la Universidad de Matanzas, sede “Camilo Cienfuegos” en coordinación con la Unidad Empresarial de Base (UEB) Biopropósito España Republicana de LABIOFAM.

Esquema metodológico de la investigación

El proceso de investigación presenta las siguientes etapas:

1. Análisis documental.
2. Preparación y caracterización de la materia prima.
3. Determinación de los insumos necesarios para las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.
4. Hidrólisis enzimática de tallos y raíz de yuca.
5. Preparación del inóculo.
6. Diseño experimental para la obtención de los parámetros de operación en la producción de sustrato proteico como alimento animal.
7. Balances de materiales en las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.

2.1 Análisis documental

Se actualizan los datos de disponibilidad de tallos de yuca residuales en la provincia, se indaga sobre las variedades más cosechadas en el territorio, lo cual se muestran en el anexo 1.

Con el objetivo de conocer detalladamente el proceso productivo que sirve de base para la investigación, las variables a controlar en cada etapa y los parámetros de calidad, se visitó la UEB España Republicana.

2.2 Preparación y caracterización química de los tallos de yuca residuales

2.2.1 Preparación

Los tallos de yuca a utilizar para la investigación pertenecen a la variedad CMC-40, los cuales se recolectan en el municipio Cárdenas.

Los tallos frescos se cortan en trozos de 10 cm de longitud y se secan al sol y al aire por 12 días, y después se trituran en un molino artesanal hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 2 mm. Luego el material molido se somete a un secado adicional a 60 °C en una estufa (DHG-9146A, China) durante 24 h. Una vez obtenido el material seco se tamiza para obtener una fracción con un tamaño de partícula de 1 mm, que se utiliza posteriormente para la determinación de la composición química de la materia prima y para la hidrólisis enzimática. El material seco tamizado se conserva en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

1.3.2 Caracterización de la materia prima

Una vez terminado el proceso de preparación se les determina a los tallos de yuca residuales: humedad, cenizas (componentes minerales), almidón, sustancias extractivas, carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y la lignina a partir de los procedimientos analíticos reflejados en los protocolos del *National Renewable Energy Laboratory* de los EE.UU. (Sluiter *et al.*, 2008).

- **Humedad:**

Se seca durante 24 h el material a una temperatura de 105 °C en una estufa (DHG-9146A, China), y el contenido de humedad se determina gravimétricamente mediante el empleo de una balanza analítica digital (Sartorius BS 124S, China).

- **Cenizas:**

Las cenizas se determinan después de la incineración de una muestra del material a 550 °C en horno mufla analógica con control térmico (SX2 Series, China).

- **Almidón:**

La técnica aplicada es una modificación de la referida en Sluiter *et al.* (2008). Se hidroliza enzimáticamente la muestra para lograr la transformación del almidón en azúcares reductores. Lo que se sustituye es la utilización de la cromatografía por la determinación de azúcares reductores totales (ART), que se realiza como se explica posteriormente.

- **Extractivos en etanol:**

En un aparato Soxhlet de 75 ml se colocan aproximadamente 5 g de materia prima, y se realiza la extracción con 160 mL de etanol al 95% por 24 h con un baño de agua. Al finalizar la extracción, el dedal con los sólidos residuales se lava con etanol y se seca al aire por dos días y luego a 40°C por 24 h. El etanol se separa del material extraído por rotoevaporación (IKA RV 05 Basic, Alemania). El balón con el extracto se seca a 40°C por 24 h, y posteriormente se cuantifica por gravimetría.

- **Polisacáridos fácilmente hidrolizables (PFH):**

Se determina los polisacáridos fácilmente hidrolizables mediante un análisis gravimétrico del residuo sólido remanente después de la hidrólisis de las hemicelulosas. Se mezclan 2 g de muestras libres de extractivos con 20 mL de ácido clorhídrico al 5 % en masa en un balón de destilación. La mezcla se mantiene a ebullición durante 3 h en un equipo de reflujo colocado en un baño de agua. Al finalizar, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se filtra a vacío. Los residuos sólidos de la filtración se secan a 105°C durante 24 h, se enfrían y pesan. Finalmente se determina el contenido de polisacáridos fácilmente hidrolizables mediante la ecuación 2.1.

$$PFH = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (2.1)$$

Donde:

m_i , masa inicial de la muestra, g.

m_r , masa del residuo, g.

Polisacáridos difícilmente hidrolizables (PDH):

Los residuos de la determinación de los PFH se pesan y se colocan en vasos de precipitado de 100 mL. A cada vaso se le adiciona 15 mL de ácido sulfúrico al 72% en masa, y la mezcla se mantiene por 2 h a temperatura ambiente, con agitación periódica. Posteriormente, la mezcla se transfiere a un balón de 500 mL, se le adiciona 135 mL de agua destilada y se coloca en reflujo durante 2 h en un baño de agua. Finalmente, la mezcla se enfría y se filtra a vacío. El residuo de la filtración se seca a 105°C durante 24 h, se enfría y pesa. El contenido de PDH se calcula mediante la ecuación 2.2:

$$PDH = \frac{(m_{ir} - m_r)}{m_i} \cdot 100 \quad (2.2)$$

donde:

m_i , masa inicial de la muestra, g.

m_{ir} , masa inicial del residuo de la determinación de PFH, g.

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

- **Lignina:**

La lignina se determina por la cuantificación gravimétrica del residuo obtenido en la determinación de PDH. El contenido de lignina se calcula con la expresión 2.3:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{m_{dr}}{m_i} \times 100 \quad (2.3)$$

donde:

m_i , masa inicial de la muestra, g.

m_{dr} , masa final del residuo de la determinación de PDH, g.

2.3 Determinación de los insumos necesarios para las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.

En la etapa de hidrólisis se añaden dos enzimas, en primer lugar, la alfa-amilasa y posteriormente la amiloglucosidasa, pero es necesario establecer la cantidad de enzima a emplear, por lo que se usa la relación de 0.8 mg de enzima/g almidón a hidrolizar.

Entonces:

$$m_{enz} = 0,8 \cdot m_{almidón} \quad (2.4)$$

Donde:

m_{enz} : masa de enzima a agregar (mg).

$m_{almidón}$: masa de almidón a hidrolizar (g).

En las investigaciones en las que se trabaja con microorganismos se requiere de la preparación de los medios de fermentación. Estos medios se preparan a partir de los hidrolizados obtenidos durante la hidrólisis enzimática. Para lo cual se añaden los nutrientes que requiere la *Candida utilis* para su crecimiento a través de sales. Las fuentes de cada nutriente son las siguientes:

- Fuente de carbono: hidrolizados de tallo-raíz de yuca
- Fuente de nitrógeno: sulfato de amonio, fosfato diamónico
- Fuente de fósforo: fosfato diamónico
- Fuente de magnesio: sulfato de magnesio

Para el cálculo de las dosis de sales añadidas para el medio de cultivo se parte de la levadura potencial que puede desarrollarse en el medio en función de los azúcares presentes. De acuerdo con Herrera y Pons (2014) la masa de levadura potencial es la mitad de la masa de la glucosa presente. Las dosis de sales añadidas (en gramos) para crear el medio de cultivo se determinan por las ecuaciones 2.5, 2.6 y 2.7 (Herrera y Pons, 2014).

$$\text{Fosfato diamónico} = \frac{0,03 \cdot \text{g de levadura potencial}}{\frac{0,46 \text{ g de pentóxido de difosforo}}{\text{g de fosfato de amonio}}} \quad (2.5)$$

$$\text{Sulfato de amonio} = \frac{0,08 \cdot \text{g de levadura potencial} - 0,2 \cdot \text{g de fosfato diamónico}}{\frac{0,21 \text{ g de nitrógeno}}{\text{g de sulfato de amonio}}} \quad (2.6)$$

$$\text{Sulfato de magnesio} = \frac{0,0075 \cdot \text{g de levadura potencial}}{\frac{0,1656 \text{ g de magnesio}}{\text{g de sulfato de magnesio}}} \quad (2.7)$$

Estas cantidades de sales aseguran que la única fuente limitante del crecimiento sea la del carbono.

2.4 Hidrólisis enzimática de tallos y raíz de yuca.

Para realizar la fermentación, es necesario disponer de hidrolizados que contengan azúcares reductores como fuente de carbono. La hidrólisis enzimática se efectúa según el protocolo propuesto por Martín, *et al.* (2017).

A partir del protocolo a la materia prima que contiene el almidón a hidrolizar, se le ajusta el pH a 5,8 utilizando ácido clorhídrico 1M y se calienta hasta 85 °C en un baño de agua. Luego se le adiciona la enzima α -amilasa y se incuba la mezcla durante 4 h en baño de agua a 85 °C. Después se enfría a temperatura ambiente, se ajusta el pH hasta 4,5 y se adiciona la enzima amiloglucosidasa. Posteriormente se incuba la mezcla a 60 °C durante 48 h en una incubadora (Memmert, Tv40b, Alemania). Una vez terminado el proceso, el hidrolizado se filtra al vacío para separar las partículas sólidas en suspensión.

Además de la hidrólisis los tallos de yuca se necesita hidrolizar raíz de yuca para alcanzar la concentración de azúcares reductores requerida en la experimentación.

Para la hidrólisis de los tallos de yuca se pesan 100 g de tallos con un diámetro de 1 mm y se adiciona 1400 mL de agua. Para el caso de la hidrólisis de raíz de yuca se pesan 80 g y se le añade 780 mL de agua. En ambos casos se sigue el protocolo referido.

2.5 Preparación del inóculo.

La *Candida utilis* NRRL Y-660 fue la cepa utilizada para todos los estudios obtenida de la Colección de Cultivos Microbianos del ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar) y mantenida a 4°C en cuñas de agar extracto de levadura-peptona-glucosa.

La biomasa obtenida a partir de las cuñas de agar se transfiere a un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad con 120 ml del medio de propagación esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. Este medio se formula con un contenido de glucosa de 30 g/L, fosfato diamónico 2 g/L, sulfato de amonio 8 g/L, sulfato de magnesio 0,25 g/L y 0,3 g de extracto de levadura. El pH se ajusta a 4,5 con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M y ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N. Este inóculo se incuba durante 24 horas a 30 °C en zaranda orbital marca HDL con una agitación de 200 rpm (Liang, *et al.*, 2009).

2.6 Diseño experimental para la obtención de los parámetros de operación en la producción de sustrato proteico como alimento animal.

Para determinar las condiciones óptimas experimentales de la fermentación en estado sólido se elabora un diseño experimental de compuesto central, con la estrella de tipo rotacional, mediante el software *Statgraphics Plus versión 5.0*.

Se fijan las variables humedad en 70%, el pH en 4,5 y el tamaño de inóculo en $4 \cdot 10^7$ células/g de masa seca inicial.

Se seleccionan como factores para evaluar su influencia:

Concentración inicial de sustrato: El rango a evaluar es de 20-40 g/L. Estos valores se seleccionan a partir de datos reportados para la *Candida utilis* (Otero y Almazán, 2012), además se siguen criterios económicos.

Temperatura: Se selecciona entre 28 y 33 °C, ya que es el rango óptimo de crecimiento de la levadura *Candida utilis*.

Velocidad de agitación: El rango seleccionado es de 200-400 rpm (3,33-6,67 s⁻¹). Se obtiene a partir de ensayos preliminares a diferentes velocidades de agitación.

Se toma como **variable de respuesta** a la **proteína bruta** en % y se determina además la concentración de azúcares reductores totales (ART).

Los experimentos se realizan por triplicado, además se incluye la aleatoriedad de los mismos. En la tabla 2.1 se puede observar el diseño experimental con la combinación de los factores a evaluar. Se diseñan un total de 48 experimentos.

Tabla 2.1: Diseño experimental obtenido

Número	Bloque	Concentración inicial de sustrato (g/L)	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)
1	1	30	30,5	131,8
2	1	40	28	400
3	1	20	33	400
4	1	30	30,5	468,2
5	1	30	30,5	300
6	1	30	26,3	300
7	1	40	33	200
8	1	20	33	200
9	1	46,8	30,5	300
10	1	13,2	30,5	300
11	1	30	34,7	300
12	1	20	28	400
13	1	40	28	200
14	1	40	33	400
15	1	20	28	200
16	1	30	30,5	300
17	2	30	30,5	131,8
18	2	40	28	400

19	2	20	33	400
20	2	30	30,5	468,2
21	2	30	30,5	300
22	2	30	26,3	300
23	2	40	33	200
24	2	20	33	200
25	2	46,8	30,5	300
26	2	13,2	30,5	300
27	2	30	34,7	300
28	2	20	28	400
29	2	40	28	200
30	2	40	33	400
31	2	20	28	200
32	2	30	30,5	300
33	3	30	30,5	131,8
34	3	40	28	400
35	3	20	33	400
36	3	30	30,5	468,2
37	3	30	30,5	300
38	3	30	26,3	300
39	3	40	33	200
40	3	20	33	200
41	3	46,8	30,5	300
42	3	13,2	30,5	300
43	3	30	34,7	300
44	3	20	28	400
45	3	40	28	200
46	3	40	33	400
47	3	20	28	200
48	3	30	30,5	300

Fuente: Elaboración propia

Para la realización del diseño de experimentos se pesan 20 g de tallos de yuca que se han hidrolizado y secado y se introducen en un Erlenmeyer de 500 mL. Aparte, se prepara el medio de fermentación con las sales nutrientes que se requieren en función de la levadura potencial, la cantidad necesaria de hidrolizados de tallos-raíz de yuca para alcanzar la concentración inicial de sustrato, el inóculo y la cantidad de agua que asegura la humedad del 70 %. La mezcla se homogeniza bien y se introduce en el Erlenmeyer. Nuevamente se realiza la homogenización del medio de fermentación con los tallos de yuca y se coloca en la zaranda orbital marca HDL con una agitación y temperatura en dependencia del diseño de experimentos. De esta manera se procede para ejecutar los 48 experimentos.

2.6.1 Variables medidas en el diseño experimental.

Las variables que se miden en la experimentación se describen a continuación.

- Azúcares reductores totales (ART)

Se determinan mediante el método colorimétrico usando el ácido 3,5-dinitrosalicílico como desarrollador de color (Miller, 1959), y se lee la absorbancia a 542 nm en un espectrofotómetro (Rayleigh VIS 723G, China).

- Porcentaje de proteína bruta

Se determina mediante análisis volumétrico mediante el método de Kjeldahl.

Se toma una muestra de 1 g del producto obtenido, se añade 10 g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 1 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) y 25 mL de ácido sulfúrico al 98%. Se añaden a un balón Kjeldahl y se quema con mechero de gas hasta que la muestra tome un color verde. A esta muestra verde se le añade 250 mL de agua destilada y 70 mL de hidróxido de sodio al 50% y posteriormente se destila mezclando el destilado con 50 mL de ácido sulfúrico al 0,1 N. Al destilado se le añade el indicador rojo de metilo y se valora con hidróxido de sodio 0,1 N.

- Conteo en cámara de Neubauer

Se realiza para ajustar el tamaño de inóculo. Para contabilizar las levaduras totales se calcula la media aritmética de levaduras contenidas en varios grupos de cuadros y para determinar la cantidad de levaduras que hay por cada mL de muestra se emplea la ecuación 2.8.

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} * \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} * \frac{1000 \text{mm}^3}{1 \text{mL}} = x \text{ millones de levaduras/mL} \quad (2.8)$$

2.7 Balances de materiales en las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación en estado sólido.

El balance permite contabilizar las necesidades de cada materia prima, la fibra resultante del proceso de hidrólisis y la necesaria para que cumpla con el requisito de proteína bruta, por lo que se realizan balances de materiales en las etapas de hidrólisis y fermentación para diferentes combinaciones de materia prima, sobre la base de producir 100 kg de biomasa. Las combinaciones raíz- tallo de yuca son:

- 90% de tallos de yuca residuales; 10% de raíz
- 80% de tallos de yuca residuales; 20% de raíz
- 66% de tallos de yuca residuales; 34% de raíz
- 50% de tallos de yuca residuales; 50% de raíz

La masa de almidón se determina mediante la ecuación 2.9.

$$m_{alm} = MS * \%alm \quad (2.9)$$

Donde:

m_{alm} : masa de almidón

MS : materia seca

$\%alm$: porciento de almidón

La masa de glucosa se determina mediante la ecuación 2.10.

$$m_{gluc} = m_{alm} * 1,11 \quad (2.10)$$

Donde:

m_{gluc} : masa de glucosa

La masa de biomasa se determina mediante la ecuación 2.11.

$$m_{biom} = m_{gluc} * 0,5 \quad (2.11)$$

Para determinar el porcentaje de proteína bruta se emplea la ecuación 2.12.

$$\%PB = \frac{P}{ST} \quad (2.12)$$

Donde:

$\%PB$: porcentaje de proteína bruta

P : proteína

ST : masa de sólidos totales

La proteína se determina mediante la ecuación 2.13.

$$P = 0,5 * m_{biom} \quad (2.13)$$

2.8 Conclusiones parciales del capítulo

Se propone como estrategia a seguir para la obtención de los parámetros de operación de la fermentación en estado sólido de tallos de yuca, la siguiente:

1. Determinación de la composición de los tallos de yuca residuales.
2. Realización de la hidrólisis enzimática de los tallos y la raíz de yuca.
3. Determinación de los parámetros óptimos para la obtención del sustrato proteico, a partir de la fermentación en estado sólido, mediante un diseño de experimentos.
4. Realización de los balances de materiales requeridos para obtener las combinaciones de tallo y raíz de yuca que garanticen el indicador de proteína bruta.

Conclusiones

1. Se definen las técnicas para la determinación de la composición de los tallos de yuca residuales, lo que permite establecer los componentes principales que lo forman, especialmente el contenido de almidón, que es el punto de partida para obtener alimento animal proteico.
2. El procedimiento para la hidrólisis enzimática de la raíz y de los tallos de yuca detalla los pasos para lograr la transformación del almidón en los azúcares reductores que se requieren en el proceso de fermentación.
3. El diseño de experimentos central compuesto determina los valores óptimos de temperatura, agitación y concentración inicial de sustrato con los que se desarrolla la levadura *Candida utilis* durante la fermentación en estado sólido.
4. Los balances de materiales propuestos permiten establecer las combinaciones de tallos y raíz de yuca que aseguran el cumplimiento del indicador de proteína bruta en el alimento animal, y las cantidades de materia prima que se requieren.

Recomendaciones

1. Desarrollar experimentalmente la investigación para así demostrar los resultados esperados.
2. Evaluar el efecto del producto en la nutrición animal.

Bibliografía

- Achinas, S. y Euverink, G. J. W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.006>
- Ahmed, J., Tiwari, B. K., Imam, S. H., y Rao, M. A. (2012). Starch Based Polymeric Materials and Nanocomposites, CRC Press, New York.
- Aislen, F., Amenaghawon, A., y Bienose, K. (2015). Particle boards produced from cassava stalks: Evaluation of physical and mechanical properties. *South African Journal of Science*, 111, 5-6.
- Ali, S., Mushtaq, J., Nazir, F. y Sarfraz, H. (2017). PRODUCTION AND PROCESSING OF SINGLE CELL PROTEIN (SCP) - A REVIEW. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(7), 86-94.
- Basu, P., Roo, S., y Dhungana, A. (2013). An investigation into the effect of biomass particle size on its torrefaction. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 9(3), 466-474.
- Buerth, C., Heilmann, C. J., Klis, F. M., Koster, C. G., Ernst, J. F., y D. Tielker. (2011). Growth-dependent secretome of *Candida utilis*. *Microbiology*, 157, 2493-2503. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049320-0>
- Buerth, C., Tielker, D., y Ernst, J. F. (2016). *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: Yeast relatives with expanding applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 100, 6981–6990. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7700-8>
- Buitrago, S. M., Piñeros, M. A., Espinosa, M. D., Restrepo R. S, Cardona, J. E., Álvarez, S. O., Fernández, N. M., y González, B. A. (2019). Multiscale design of a dairy beverage model composed of *Candida utilis* single cell protein supplemented with oleic acid. *Journal of Dairy Science*, 102, 9749-9762. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16729>
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, Y., y Ball, S. (1998). Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85–112.

- Bustamante, G. V., Carrillo, P. A., Prieto, R. J., Corral, R. J., y Hernández, D. J. (2016). Química de la biomasa vegetal y su efecto en el rendimiento durante la torrefacción: revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(38), 5-24. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63450027007>
- Bustamante, J. (2015). Producción de proteína microbiana con gabazo de manzana. 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Cano, S. (2019). *Simulación del proceso de fermentación en medio sólido con Aspergillus niger para el diseño de un biorreactor tipo lecho empacado de 200 litros*. [Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional]. Repositorio Digital. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/20516>
- Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana*. 15(1), 93-10.
- Chávez, S. M. (2019). La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. *Anales de Química - RSEQ*, 115(5), 399–407. <http://analesdequimica.com/115-5/1155-chavez.pdf>
- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation*. Springer Science + Business Media Dordrecht 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Chen, H. y He, Q. (2012) Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*, 87(12), 161-925. <https://doi.org/10.1002/jctb.3901>
- Cuervo, L., Folch, J. L., y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, 13(3), 11-35.
- Delgado, J. y Barbosa, A. (2014). Transport Phenomena and Drying of Solids and Particulate Materials. *In Advanced Structured Materials*, 48. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-04054-74>

- Díaz, A. B. (2009). *Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial*. [Tesis doctoral, Universidad de Cádiz]. <http://hdl.handle.net/10498/15774>
- Edwards, H. C., Veerabahu, S. A., Mason, A. J., Butterworth, J. P., y Peter, R. E. (2021). α -Amylase action on starch in chickpea flour following hydrothermal processing and different drying, cooling and storage conditions. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117738>
- El-Gammal, M., Abou-Shanab, R., Angelidaki, I., Omar, B., Sveding, P. V., Karakashev, D. B., y Zhang, Y. (2017). High efficient ethanol and VFA production from gas fermentation: Effect of acetate, gas and inoculum microbial composition. *Biomass and Bioenergy*, 105, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.020>
- FAO. (2018). Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets – November 2018. Rome, p. 104. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/ca2320en/CA2320EN.pdf>
- Fernández, O. (2015). *Hidrólisis enzimática de tallos de Quinoa (Chenopodium quinoa wild), para la obtención de una plataforma de azúcares fermentables*. [Tesis de licenciatura, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/17342>
- Ferreira, S. J., Vieira, C. E., Souza, S. M. A., Rodríguez, R. C., y Acosta, M. E. (2019). Treatment of sugarcane vinasse from cachaça production for the obtainment of *Candida utilis* CCT 3469 biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 148, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.04.009>
- Garver, M. P. y Liu, S. (2014). Development of Thermochemical and Biochemical Technologies for Biorefineries. In *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 457–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00027-9>
- Gómez, E. A., Ríos, L. A., y Peña, J. D. (2012). Madera, un potencial material lignocelulósico para la producción de biocombustibles en Colombia. *Información Tecnológica*, 23(6), 73-86. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000600009>

- González, S. S. (2018). *Evaluación de las condiciones de proceso para la obtención de proteína unicelular de Candida utilis a partir de un subproducto de la piña por fermentación en lote alimentado*. [Tesis de grado]. Universidad de Costa Rica.
- Guevara, R. C. y Suárez, M. C. (2016). La levadura torula (*Candida utilis* NRRL Y-660) en la alimentación de terneros. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(3), 43-49. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223152661007>
- Han, M., Kim, Y., Kim, Y., Chung, B., y Choil, G.-W. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Kor. J. Chem. Eng.* 28, 119-125.
- Herrera, J. y Pons, J. (2014). Sustratos Proteicos (SUSPROTEL). Aspectos Tecnológicos. *Fórum Ciencia y Técnica, Matanzas, Cuba*.
- Hölker, U., Höfer, M., y Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 175-186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Kim, Y. H., Lee, S. M., Lee, H. W., y Lee, J. W. (2012). Physical and chemical characteristics of products from the torrefaction of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Bioresource Technology*, 116, 120–125.
- León, C. (2008). Producción y cuantificación de un antibiótico por electroforesis capilar. 1–51.
- Leon, R. G., Cujilema-quitio, M. C., González, L. B., Delgado, E. R., y Córdova, J. (2017). Efecto del pH en la producción de celulasas de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. 44, 27–38. <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v44n2/caz04217.pdf>
- Li, W., Zhang, Z., Wu, L., Zhu, Z., y Xu, Z. (2021). Improving the adhesion-to-fibers and film properties of corn starch by starch sulfoitaconation for a better application in warp sizing. *Polymer Testing*. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107194>
- Liang, G., Liao, Du, G., y Chen, J. (2009). A new strategy to enhance glutathione

- production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology*, 100 , 350–355.
- Lima, L. (2013). *Evaluación de la composición química y propiedades físicas de madera y corteza de cuatro coníferas para la producción de bioenergía*. [Tesis Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Lucca, M. E., Romero, M. E., y Callieri, D. A. S. (1995). Continuous culture of *Candida utilis*: Influence of medium nitrogen concentration. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 11, 515–518. <https://doi.org/10.1007/BF00286365>
- Martín, C., Jönsson, L. J., Wei, M., y Xiong, S. (2016) Enhancing saccharification of cassava stems by starch hydrolysis prior to pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 97, 21-31. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
- Martín, C., Wei, M., Xiong, S., y Jönsson, L. J. (2017). Enhancing saccharification of cassava stems by starch hydrolysis prior to pretreatment. *Ind. Crop. Prod.* 97, 21 - 31.
- Martínez, A. y Leyva, A. (2014). La biomasa de los cultivos en el agroecosistema. Sus beneficios agroecológicos. *Cultivos Tropicales*, 35(1), 11-20. <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Mateos, E. (2013). *Caracterización De La Actividad Lipasa De Aspergillus Ochraceus Producida Por Fermentación Sólida Y Ensayos De Su Purificación*. [Tesis de maestría, Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco]. Repositorio Institucional. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/438/1/EduardoMateosDíaz.pdf>
- Meimoun, J., Wiatz, V., Saint-Loup, R., Parcq, J., Favrelle, A., Bonnet, F., y Zinck, P. (2018). Modification of starch by graft copolymerization. *Starch-Stärke*, 70, 1600351.
- Mohan, D., Pittman, C. U., y Steele, P. H. (2006). Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & Fuels*, 20(3), 848–889.

- Nasseri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H., y Ghasemi, Y. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, 6 (2), 103-116.
- Nhuchhen, D. R, Basu, P., y Acharya, B. (2014). A comprehensive review on biomass torrefaction. *International Journal of Renewable Energy & Biofuels*. <https://doi.org/105171/2014506376>
- Orozco, B. M. (2015). *Proceso de sacarificación de los tallos de yuca residuales para obtener levadura Torula* [Tesis de posgrado]. Universidad de Matanzas Sede “Camilo Cienfuegos”.
- Otero, M. A., Saura, G., Martínez, J. A., y Almazán, O. A. (2007). Fodder yeast production: a new approach for distillery vinasses treatment. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Tech.* 26, 11-27.
- Otero, M. y Almazán, O. (2012). *La Levadura como Base de una Industria*. Editorial Académica Española.
- Pastrana, L. (2009). Fundamentos De La Fermentación En Estado Sólido Y Aplicación a La Industria Alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(3), 4-12. <https://doi.org/10.1080/11358129609487556>
- Pérez, I. H. y Rodríguez, D. I. (2018). *Cultivos tropicales de importancia económica en Ecuador (arroz, yuca, caña de azúcar y maíz)*. (1.^a ed.). UTMACH.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1, p-3.
- Ramírez-Navas, J. S. (2013). Uso de la fermentación para el aprovechamiento del lactosuero. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 77, 52-61. <http://www.academia.edu>
- Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., y Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5), 488-493. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.024>

- Real, R. R. (2018). *Escalado de un biorreactor para la fermentación de hidrolizados de tallos de yuca residuales destinado a la alimentación animal*. [Tesis de grado no publicada]. Universidad de Matanzas.
- Reinoso, B. (2015). Diseño de un fermentador de bandeja a escala piloto para la producción de enzimas con actividad ligninolítica y celulolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido con aserrín de eucalipto. *Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial EPN*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/10587/1/CD-6265.pdf>
- Rodríguez, A. C., Cabrera, A. I., y Valencia, J. I. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 24 (1), 55-70. <http://rmib.com.mx/index.php/rmib/article/view/281>
- Rodríguez, B., Mora, M., Canela, A., Motta, F., Lezcano, P., y Euler, A. (2011). Composición mineral de levadura torula (*Candida utilis*), desarrollada a partir de vinaza de destilería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(2), 151-153. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=19302224500>
- Rodríguez, B., Mora, M., Oliveira, D., Euler, A., Larav, L., y Lezcano, P. (2011). Composición química y valor nutritivo de la levadura torula (*Candida utilis*), desarrollada sobre vinaza de destilería, en la alimentación de aves. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(3), 261-265. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=19302227000>
- Rodríguez, C. S. y Sanromán, A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211–219.
- Rodríguez, G. I. (2019). *Obtención de un sustrato proteico base levadura Torula a partir de hidrolizados de raíz - tallos de yuca residuales*. [Tesis de grado no publicada]. Universidad de Matanzas.

- Ruíz, H.A., Rodríguez, R.M., y Rodríguez, R. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 33-40. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060105>
- Santana, T. S. (2018). *Valoración de la hidrólisis enzimática en la obtención de un concentrado proteico a partir de tallos de yuca residuales*. [Tesis de grado no publicada]. Universidad de Matanzas.
- Scheller, H. V. y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.
- Shokri, S., Shiferaw, N., y Manzari, M. (2021). Advances in Food Fermentation: Potential Application of Novel Processing Technologies for Enhancing Fermentation Kinetics and Product Yield. *Innovative Food Processing Technologies*, 3, 151-164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815781-7.00022-6>
- Sisman, T., Gur, O., Dogan, N., Ozdal, M., Faruk, O., y ERGON, T. (2012). Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. *Toxicology and Industrial Health*. 29 (9), 792–799.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., y Crocker, D., (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado*.
- Suárez, L. y Mederos, V. (2011). Revisión bibliográfica. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. *Cultivos Tropicales*, 32(3), 27-35. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193222357004>
- Sun, R. y J. Tomkinson. (2003). Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. *European polymer journal* 39(4), 751-759.
- Thuvander, J. y Jönsson, A. (2020). Techno-economic impact of air sparging prior to purification of alkaline extracted wheat bran hemicelluloses by membrane

- filtration. *Separation and Purification Technology*, 253, 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117498>
- Tomita, Y., Ikeo, K., Tamakawa, H., Gojobori, T., y Ikushima, S. (2012). Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*. *PLoS One*, 7, 137-226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037226>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., y Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895-905.
- Vásquez, V. A. (2013). *Producción de xilanasas por Aspergillus sp en fermentación en medio sólido*. [Tesis de maestría]. Universidad Iberoamericana.
- Velasco, A. (2020). *Una revisión general de los procesos para la producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulosa*. [Tesis de posgrado, Universidad Santo Tomás]. <http://hdl.handle.net/11634/30358>
- Viniegra, G. G., Favela, T. E., Aguilar, C. N., Romero, G. J., Díaz, G. J., y Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solidstate over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J*, 13, 157-167.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., y Wang, S. (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568–585.
- Wei, M. G., Zhu, W. B., Xie, G. H., Lestander, T. A., Wang, J. S., y Xiong, S. J. (2014). Ash composition in cassava stems originating from different locations, varieties and harvest time. *Energy Fuels*, 28, 5086–5094.
<http://dx.doi.org/10.1021/ef5009693>
- Ying, S., Abdul, N., Keey, R., Yuh, P., y Shiung, S. (2020). Production of biochar for potential catalytic and energy applications via microwave vacuum pyrolysis conversion of cassava stem. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 728-733. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.08.002>

Zhu, B., Lestander, A., Örberg, H., Wei, G., Hedman, B., Ren, JW., Xie, GH., y Xiong, SJ. (2015). Cassava stems: a new resource to increase food and fuel production. *GCB Bioenergy* 7, 72–83.

Zhu, J. Q., Zong, Q. J., Li, W. C., Chai, M. Z., Xu, T., Liu, H., Fan, H., Li, B. Z., y Yuan, Y. J. (2020). Temperature profiled simultaneous saccharification and cofermentation of corn stover increases ethanol production at high solid loading. *Energy Conversion and Management*, 205, 112-344. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112344>

Zhu, W., Lestander, T., Orberg, H., Wei, M., Hedman, B., Ren, J., Xie, G., y Xiong, S. (2013). Cassava stems: a new resource to increase food and fuel production. *Global Change Biology Bioenergy*, 7, 72–83. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12112>

Anexo

Anexo 1: Disponibilidad de los tallos de yuca en Matanzas (Campaña 2016-2017)

Municipio	Total (ha/a)	Variedad de yuca			
		C-6329	CMC-40	C-74-725	Señorita
Matanzas	34,3	6,8	7,7	8,6	11,2
Cárdenas	47,9	17,1	10,6	9,7	10,5
Martí	59,5	11,3	-	28,2	20,0
Colón	68,4	14,8	9,8	19,5	24,3
Perico	108,7	21,5	14,7	29,6	42,9
Jovellanos	171,5	16,6	21,3	78,4	55,2
Pedro Betancourt	51,6	8,7	10,5	16,3	16,1
Limonar	72,0	10,3	-	41,7	20,0
Unión de Reyes	473,0	71,8	31,7	173,4	196,1
Ciénaga de Zapata	11,5	2,7	-	5,8	3,0
Jagüey Grande	127,1	31,7	20,5	23,3	51,6
Calimete	31,6	6,9	3,3	11,8	9,6
Los Arabos	19,3	4,6	1,8	4,9	8,0
Total	1 276,4	224,8	131,9	451,2	468,5

Fuente: Ministerio de Agricultura Provincial