

**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: Escalado de un biorreactor para la fermentación de hidrolizados de tallos de yuca residuales destinado a la alimentación animal.**

**Autor:** Roberto Real Reyes

**Tutores:** Ing. Ena de los Ángeles Hernández López, MSc.

Ing. Juventino Herrera Pérez

**Consultante:** Ing. Mario Yll Lavín, Dr.C

**Matanzas, 2018**

## **Declaración de autoridad**

Yo Roberto Real Reyes me declaro como único autor de este trabajo de diploma “Escalado de un biorreactor para la fermentación de hidrolizados de tallos de yuca residuales destinado a la alimentación 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**

## Agradecimientos

A mi tutora Ena, muchas gracias por toda la ayuda, por los momentos buenos y malos que pasamos, por ayudarme en horarios de descanso, por ser una tutora y profesora excepcional, pero sobre todo por ser un ser humano único.

A mi tutor Juventino, muchas gracias por haberme dedicado su tiempo en la realización de este trabajo, por haber venido infinidad de veces hasta Matanzas para ayudar a pesar de estar enfermo.

Al profesor Mario Yll muchísimas gracias por toda su ayuda, por haberlo molestado muchísimas veces, por haber sido otro tutor más.

A Daylilis por ayudarme a sembrar las primeras cuñas de agar. Por estar presente en estos años de carrera, por su ayuda ofrecida en todo momento.

A Eddy, por molestarlo incesantemente para leer en el espectrofotómetro, incluso los días de descanso. Por su ayuda en estos años de estudio.

A Paco por toda su ayuda en los recursos del laboratorio y por estar pendiente de todos los reactivos que necesitamos durante la fase experimental.

A Jonathan por prestarme la libreta de Biorreactores y su Biorreactor.

A Ana Rosa por ofrecer su ayuda en todo momento y la cristalería necesaria para completar los ensayos.

A Lisdeysi por ayudar con la cristalería y los reactivos, además de estar pendiente de nuestras necesidades.

Al profesor Marcelo, por facilitar su espectrofotómetro para concluir los experimentos.

Al profesor Arley muchas gracias por su ayuda con la Microbiología y con las cámaras de Neubauer.

A la profesora Dianne muchas gracias por aclarar las dudas de Microbiología siempre que la consultamos.

A Mariela y Damarys, muchas gracias por enseñarme sus conocimientos prácticos de Microbiología, por aclararme las dudas.

A Camacho por su ayuda con los reactivos para los azúcares reductores.

A Shavely por su ayuda, por todos los momentos que pasamos en el laboratorio durante la realización de nuestras tesis, donde nos convertimos más que compañeros en amigos.

A la profesora Silvia, por haber sido una fuente de referencia en los temas de Análisis Químico y sobre todo por siempre brindar su ayuda en lo que necesitara.

Al profesor Agustín, por dedicarme parte de su valioso tiempo para elaborar e interpretar el diseño de experimentos.

A mis compañeros de aula por haber compartido juntos estos años de estudio.

A TODOS MUCHISIMAS GRACIAS

## Resumen

El presente trabajo se realiza en la Universidad de Matanzas en coordinación con la Unidad Empresarial de Base Biopropósito España Republicana de LABIOFAM. Una vía de aprovechamiento de los tallos de yuca residuales es la hidrólisis enzimática seguida de la fermentación aerobia en la obtención de biomasa proteica. En la presente investigación se valora la fermentación de los hidrolizados de tallos de yuca residuales de la variedad C-74-725. A partir de un diseño factorial a nivel de Erlenmeyer, se obtiene 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. Como criterio fundamental para la aplicación de la técnica de escalado se escoge el del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante, que a nivel de Erlenmeyer es de  $54,14 \text{ h}^{-1}$  y se corresponde en el biorreactor con una velocidad de agitación de 402 rpm ( $6,7 \text{ s}^{-1}$ ) y una aireación de 1vvm (volumen de gas por volumen de líquido por minuto). Se determinan los parámetros cinéticos a nivel de biorreactor (velocidad específica de crecimiento máxima  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , tiempo de latencia 1,15 h y tiempo de generación de 2,07 h). Como resultado del escalado para un biorreactor discontinuo de 200 L se obtienen las dimensiones (altura efectiva de 0,580 m, diámetro de 0,663 m, diámetro del impelente de 0,355 m) y las condiciones operacionales (aireación 1 vvm, velocidad de agitación de 123 rpm ( $2,05 \text{ s}^{-1}$ ) y productividad volumétrica de  $0,472 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ ).

## Abstract

The present work is carried out in the University of Matanzas in coordination with the Business Unit of Base Biopropósito España Republicana of LABIOFAM. One way of using the residual cassava stems is the enzymatic hydrolysis followed by aerobic fermentation in the production of protein biomass. In the present investigation the fermentation of the hydrolysates of residual cassava stems of the variety C-74-725 is evaluated. From a factorial design at the Erlenmeyer level, an optimum of maximum biomass formation is obtained for the agitation speed conditions of 222 rpm ( $3.7 \text{ s}^{-1}$ ) and an initial substrate concentration of 29 g/L. As a fundamental criterion for the application of the scaling technique, the constant oxygen transfer volumetric coefficient is chosen, which at the Erlenmeyer level is  $54.14 \text{ h}^{-1}$  and corresponds in the bioreactor with a stirring speed of 402 rpm ( $6.7 \text{ s}^{-1}$ ) and an aeration of 1vvm (volume of gas per volume of liquid per minute). The kinetic parameters are determined at the bioreactor level (specific speed of maximum growth  $0.33 \text{ h}^{-1}$ , latency time 1.15 h and a generation time of 2.07 h). As a result of the scaling for a discontinuous 200 L bioreactor, the dimensions are obtained (effective height 0.580 m, diameter of 0.663 m, impeller diameter 0.355 m) and operating conditions (aeration of 1vvm, stirring speed of 123 rpm ( $2.05 \text{ s}^{-1}$ ) and volumetric productivity of  $0.472 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ ).

# Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1: Análisis bibliográfico.....	3
1.1 Biomasa vegetal.....	3
1.1.1 Composición .....	3
1.1.2 Tallos de yuca.....	6
1.2 Proteína unicelular .....	7
1.2.1 Ventajas y desventajas .....	8
1.2.2 <i>Candida utilis</i> .....	9
1.3 Proceso de fermentación .....	10
1.3.1 Aireación y agitación en la fermentación aeróbica.....	11
1.3.2 Métodos para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.....	11
1.3.3 Medios de cultivo .....	12
1.3.4 Preparación del inóculo .....	13
1.3.5 Biorreactor .....	13
1.3.6 Curva de crecimiento microbiano en un proceso discontinuo.....	15
1.4 Escalado .....	16
Conclusiones parciales del capítulo.....	17
Capítulo 2: Materiales y métodos .....	18
2.1 Análisis documental .....	19
2.2 Recolección, preparación y muestreo de los tallos de yuca residuales que constituyen la materia prima .....	19
2.3 Caracterización de la materia prima.....	19



2.4 Hidrólisis enzimática de los tallos de yuca residuales y de almidón de yuca .....	22
2.5 Diseño experimental factorial de la fermentación de hidrolizados con <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado .....	23
2.6 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado y a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L.....	28
2.6.1 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado.....	28
2.6.2 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L .....	30
2.7 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado y en biorreactor de capacidad de 1 L.....	31
2.7.1 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado.....	31
2.7.2 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> en biorreactor de capacidad de 1 L .....	32
2.8 Escalado del biorreactor .....	33
Capítulo 3: Análisis de resultados .....	37
3.1 Análisis documental .....	37
3.2 Composición química de la materia prima .....	37
3.3 Diseño experimental factorial a tres niveles de la fermentación de hidrolizados con <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado .....	39
3.4 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado y a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L.....	44
3.5 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado y en biorreactor de capacidad de 1 L.....	46
3.5.1 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> a nivel de Erlenmeyer agitado.....	46

3.5.2 Cinética de crecimiento del microorganismo <i>Candida utilis</i> a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L. ....	50
3.6 Escalado del biorreactor .....	54
Conclusiones parciales del capítulo .....	56
Conclusiones.....	57
Recomendaciones.....	58
Bibliografía .....	59
Anexos .....	67

## Introducción

Actualmente, la producción sostenible de alimentos, energía, químicos y materiales constituye el reto mayor que enfrentan las sociedades modernas y las futuras generaciones. Esto se debe a las décadas de consumo excesivo de los recursos fósiles. Este problema motivó la búsqueda de fuentes renovables para la producción industrial. Dentro de estas fuentes renovables se encuentran los materiales lignocelulósicos, que se caracterizan por su bajo costo y su alta disponibilidad.

Los tallos de yuca constituyen un material lignocelulósico del que solo se aprovecha entre un 10 y un 20% en la propagación del cultivo, y pequeñas cantidades se usan como combustible. El resto, se abandona en los campos o se quema, lo que provoca emisiones gaseosas, erosión en los suelos y problemas medioambientales. Sin embargo, la literatura reporta que tiene un contenido de almidón que puede alcanzar hasta un 30 % de materia seca (Zhu, *et al.*, 2015), el cual puede extraerse o hidrolizarse fácilmente a glucosa. Este contenido de almidón incita la búsqueda de vías para su aprovechamiento.

En Cuba la alimentación animal depende de la importación de soya y Northgold, fundamentalmente para la ganadería. Por este motivo se requieren de fuentes alternativas nacionales, que permitan sustituir ambos renglones importados, por otros más económicos. En la búsqueda de estas fuentes se encuentra la Unidad Empresarial de Base (UEB) España Republicana, perteneciente a LABIOFAM. En la entidad se han obtenido sustratos proteicos para la alimentación animal, a partir del almidón presente en materias primas convencionales (maíz, boniato, yuca) con resultados satisfactorios. También en esta empresa Orosco (2015) investigó la hidrólisis ácida, la auto-hidrólisis y la hidrólisis enzimática, seguidas por fermentación aerobia de los tallos de yuca de la variedad Señorita, para la obtención de un sustrato proteico (base levadura *Torula*). Sin embargo, se desconocen las condiciones óptimas que favorecen el proceso de fermentación de los hidrolizados de tallos de yuca residuales.

**Problema:**

¿Cómo se garantiza la mayor transformación de los hidrolizados de tallos de yuca residuales en biomasa microbiana para su posterior uso en la alimentación animal?

**Hipótesis:**

Mediante la fermentación en condiciones óptimas de los hidrolizados de los tallos de yuca residuales se logrará la formación máxima de biomasa, que será la base para la producción de alimento animal.

**Objetivo general:**

Escalar un biorreactor para la fermentación de hidrolizados de tallos de yuca residuales destinado a la alimentación animal.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la levadura *Candida utilis* en hidrolizados de tallos de yuca residuales.
2. Establecer la cinética de crecimiento de la *Candida utilis* bajo condiciones óptimas.
3. Aplicar las técnicas de escalado para el diseño de un biorreactor.

# Capítulo 1: Análisis bibliográfico

## Introducción

En el presente capítulo se efectúa el análisis bibliográfico de los principales aspectos relacionados con el tema objeto de estudio, con el objetivo de desarrollar la fundamentación teórica de la investigación. Para su realización se consultan revistas, tesis de grado, de maestría y de doctorado. Además de materiales obtenidos mediante buscadores como el Scholar Google y se accede a bases de datos disponibles en Internet como Scielo, Elsevier y Springer-Verlag.

## 1.1 Biomasa vegetal

La biomasa vegetal es un término genérico que hace referencia a todas las plantas o, más específicamente, a todos los materiales que se derivan de las plantas (Sillanpää y Ncibi, 2017).

### 1.1.1 Composición

Se considera que los componentes básicos de la biomasa vegetal son la celulosa, las hemicelulosas y la lignina (formando la biomasa lignocelulósica), así como el almidón, además de lípidos y proteínas (Sillanpää y Ncibi, 2017).

### Celulosa

La celulosa es un polisacárido compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, donde la celobiosa es la unidad repetitiva que conforma las cadenas (Sánchez, 2009). Según Balat (2011), la celulosa representa de un 30 al 60% de la planta. La unión de las moléculas mediante enlaces por puentes de hidrógeno en la celulosa genera una estructura lineal ordenada, conocida como celulosa cristalina, que representa entre un 50 y el 90% de la celulosa total. A su vez, la otra parte, o

celulosa amorfa, tiene un arreglo desordenado (Foyle, *et al.*, 2007). Esta es la razón por la que se considera un polímero semicristalino (Bellido, 2013).

De acuerdo con Kumar, *et al.*, (2009), la celulosa amorfa es la más susceptible a la degradación enzimática, mientras que la forma cristalina, que es la más abundante, se caracteriza por ser insoluble y más resistente.

## **Hemicelulosas**

Las hemicelulosas se caracterizan por ser un polímero heterogéneo que actúa como enlace entre la lignina y las fibras de celulosa. Representan, de forma global, de un 15 a un 35% de la masa de la planta. Las hemicelulosas presentan cadenas cortas y ramificadas de azúcares de cinco carbonos (xilosa y arabinosa), de seis carbonos (galactosa, glucosa y manosa), así como ácidos urónicos (Mood, *et al.*, 2013). Debido a su naturaleza ramificada, las hemicelulosas son amorfas y son relativamente fáciles de hidrolizar los enlaces entre los azúcares que la forman (Girío, *et al.*, 2010).

## **Lignina**

La lignina presenta una estructura amorfa formada por unidades diferentes de fenilpropano (Chico y Sandoval, 2015). Los monómeros que componen la lignina se denominan alcoholes cinamílicos (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico) (Velázquez, 2012). La diferencia estructural entre ellos radica en las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. La función principal de la lignina es ofrecer soporte estructural a la planta, impermeabilidad, resistencia contra el estrés oxidativo y los ataques microbianos. Se caracteriza por ser ópticamente inactiva e insoluble en agua, lo que la hace difícil de degradar (Hendricks y Zeeman, 2009). No posee azúcares, pero encierra a la celulosa y las hemicelulosas que sí los contienen, lo que dificulta su acceso durante el proceso de hidrólisis.

## Almidón

El almidón es la principal reserva de carbohidratos en las plantas (Gerena, 2013) y la fuente más importante de carbohidratos digeribles para la nutrición humana (Sillanpää y Ncibi, 2017).

El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Sharma y Satyanarayana, 2013; Quintero, *et al.*, 2010; El-Fallal, *et al.*, 2012; Dhital, *et al.*, 2014). La amilosa es un (1-4)  $\alpha$ -D glucano lineal que habitualmente tiene un grado de polimerización (número de moléculas de glucosa) de aproximadamente 400 (Okafor y Okeke, 2018). Se puede apreciar la estructura de la amilosa en la figura 1.1.

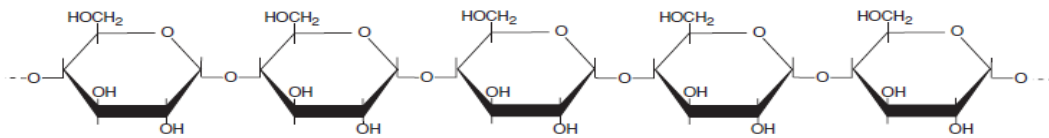


Figura 1.1 Estructura de la amilosa. Fuente: (Leboffe y Pierce, 2011)

La amilopectina es un D glucano ramificado con enlaces predominantemente  $\alpha$ -D (1-4) y con alrededor del 4% del tipo  $\alpha$ -D (1-6) (Cruz, 2009). La amilopectina consiste en cadenas similares a la amilosa pero con un grado de polimerización de 12-50 (Okafor y Okeke, 2018). Su estructura puede observarse en la figura 1.2.

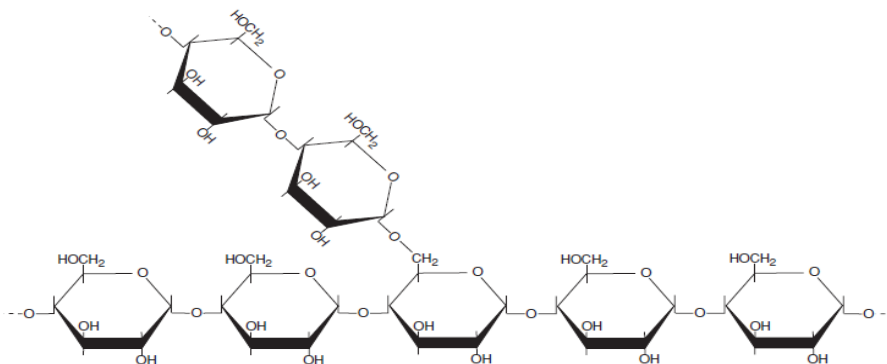


Figura 1.2: Estructura de la amilopectina. Fuente: (Leboffe y Pierce, 2011)

Los almidones de diversas fuentes difieren en su proporción de amilopectina y amilosa. La especie de maíz más comúnmente cultivada, por ejemplo, tiene alrededor del 26% de amilosa y el 74% de amilopectina. Algunos pueden tener 100% de amilopectina, mientras que otros pueden tener de 80 a 85% de amilosa (Okafor y Okeke, 2018).

### **1.1.2 Tallos de yuca**

La yuca constituye hoy una fuente muy importante de alimento para millones de personas en las áreas tropicales y subtropicales de África, Asia y Latinoamérica (Sanoussi, *et al.*, 2015; Rojas, 2012), siendo usada además como fuente de biocombustibles (Wei, *et al.*, 2015; Schwantes, *et al.*, 2016).

Durante la cosecha de la yuca, frecuentemente después de 8-12 meses de la plantación, el tallo leñoso es separado de la raíz. Se estima que cerca de 116 millones de toneladas de tallos de yuca se producen anualmente a nivel mundial, y que de 32 a 35 millones de toneladas están disponibles en base seca (Wei, *et al.*, 2014; Zhu, *et al.*, 2015). Entre un 10 y un 20% de los tallos se emplean en la propagación del cultivo, y pequeñas cantidades son usadas como combustible o alimento animal. Sin embargo, la mayor parte debe ser eliminada de los campos y es abandonada o quemada, lo que provoca emisiones gaseosas y problemas medioambientales (Zhu, *et al.*, 2015; Zue, *et al.*, 2015).

Los tallos de yuca actualmente se han convertido en el centro de atención para la producción de etanol basado en su potencial para producir una cantidad considerable de azúcares fermentables (Han, *et al.*, 2011; Nuwamanya, *et al.*, 2012; Reales, *et al.*, 2016; Niño, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2017). El contenido de almidón de los tallos de yuca puede alcanzar hasta un 30 % de materia seca (Zhu, *et al.*, 2015) y puede ser fácilmente extraído o hidrolizado a glucosa a partir de un proceso simple y de bajo costo. A diferencia de la extracción de azúcares fermentables a partir de la biomasa lignocelulósica que requiere de un tratamiento previo del material (Castaño, *et al.*,



2015). Este ha sido un factor muy importante en el diseño de procesos industriales para la producción eficiente y sostenible de etanol (Wei, *et al.*, 2015).

También se estudia la aplicación de los tallos de yuca como biocombustible (Hedman, *et al.*, 2015). Aunque debido a su alto contenido de cenizas y elementos como el cloro y el potasio, los que pueden provocar problemas de corrosión y emisión de partículas, es necesario realizar un tratamiento previo para evitar estos inconvenientes. Otra de las aplicaciones de los tallos de yuca 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).

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.

En esta dirección, sirven de base las experiencias desarrolladas por Herrera y Pons (2014) en la obtención de concentrado proteico a partir de materias primas amiláceas (maíz, boniato, yuca amarga, afrecho de trigo y combinaciones de las mismas).

El proceso consta de las siguientes etapas: preparación de la materia prima, hidrólisis enzimática, fermentación, termólisis y concentración. De las mismas, la más importante para el presente trabajo es la de fermentación de los hidrolizados.

El objetivo de la etapa de fermentación es que el microorganismo (*Candida utilis*) se reproduzca y crezca de forma aeróbica, con el correspondiente incremento de la biomasa. Se adicionan el inóculo y los nutrientes al inicio del proceso fermentativo, y se controla el pH.

## **1.2 Proteína unicelular**

El término "Proteína unicelular" (PUC) se refiere a la proteína obtenida a partir de microorganismos (Yunus, *et al.*, 2015; Arteaga y Vázquez, 2012; Carrillo, *et al.*, 2011). Este fue acuñado por el Profesor Wilson del Instituto de Tecnología de Massachusetts

para reemplazar la menos atractiva denominación de proteína 'microbiana' o 'bacteriana'. El término se ha vuelto ampliamente aceptado (Okafor y Okeke, 2018).

Entre 1950 y 1960 creció la preocupación sobre la "brecha de alimentos" entre los países industrializados y los países del tercer mundo, especialmente debido al rápido y continuo crecimiento de la población en los países menos desarrollados. Como resultado de esta preocupación, se buscaron fuentes de alimentos alternativas y no convencionales. Se reconoció que la malnutrición proteica es mucho más severa que la de otros alimentos (Okafor y Okeke, 2018). Una de estas fuentes alternativas fueron los microorganismos. De acuerdo con Okafor y Okeke (2018), la esperanza era que los microorganismos ayudaran a cumplir esta deficiencia proteica mundial, debido a las limitaciones reconocidas que presentan las fuentes convencionales de proteínas, que incluyen:

- Posible destrucción de las cosechas de plantas debido a condiciones climáticas desfavorables.
- La necesidad de permitir un lapso de tiempo para la reposición de las cantidades existentes en el caso de la cría de peces.
- La tierra limitada disponible para la agricultura en el caso de la producción vegetal.

### **1.2.1 Ventajas y desventajas**

La producción de proteína unicelular tiene varias características atractivas:

- No está sujeta a los efectos del clima y se puede producir cada minuto del año.
- Los microorganismos tienen un crecimiento mucho más rápido que las plantas o los animales. Por ejemplo, un buey que pese 10 000 libras sintetizaría menos de 1 libra (o 1 / 10 000 de su peso) de proteínas al día, mientras que 10 000 libras de levaduras producirían más de 50 toneladas (más de 100 veces) de su propio peso de proteína al día.

- Los productos de desecho pueden convertirse en alimentos en la producción de proteína unicelular.

Sin embargo, la proteína unicelular también tiene algunas desventajas. Uno de las más obvias es que muchos de los países en desarrollo donde hay desnutrición proteica carecen de la experiencia y de los recursos financieros necesarios para desarrollar las industrias de fermentación. Otras críticas son que los microorganismos contienen altos niveles de ARN (ácido ribonucleico) y que su consumo podría conducir a la acumulación de ácido úrico, formación de cálculos renales y aparición de la gota (Okafor y Okeke, 2018).

### **1.2.2 *Candida utilis***

Las especies de microorganismos utilizadas para la producción de proteína unicelular pertenecen a las familias de las microalgas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

*Candida utilis* es una levadura que también recibe el nombre de Torula o levadura forrajera (Díaz, 2017; Cajo, *et al.*, 2011; Torres, *et al.*, 2016). De acuerdo con Rodríguez, *et al.*, (2011), es la levadura que tiene mayor empleo como suplemento alimenticio animal debido a su gran contenido de vitamina B, minerales y ser una importante fuente de proteínas (Isaac, *et al.*, 2015).

En Cuba, la proteína unicelular de *C. utilis* ha constituido un renglón exportable y de consumo interno, fundamentalmente para alimento porcino y como componente en la formulación de piensos en la alimentación animal (Lezcano, 2011; Montes de Oca, *et al.*, 2013).

Su ventaja fundamental radica en que se trata de un producto establecido con buena aceptabilidad por su alto contenido proteico y excelente perfil de aminoácidos esenciales. Posee una relación proteína/carbohidratos mayor que la de otros forrajes vegetales. Debido al alto por ciento de lisina que contiene, esta levadura resulta ideal como suplemento de vegetales pobres en este aminoácido esencial, pero no debe

emplearse como única fuente de nitrógeno debido a su deficiencia en aminoácidos sulfurados (cistina y metionina) (Izquierdo, 2011).

Una de las características más importantes de esta levadura es que se multiplica rápidamente y puede ser cultivada sobre una gran diversidad de materiales. Entre estos materiales que se emplean como sustrato para la producción de *Torula* se encuentran el licor de prensa, mieles finales, vinazas de destilería, licor residual de sulfito de la industria papelera, madera sacarificada y residuos de frutos (Rocha, 2006). Además, la especie *C. utilis* se caracteriza por emplear como fuente de carbono, no solo hexosas y pentosas, sino también otros compuestos orgánicos como ácidos, alcoholes y aldehídos (Otero y Almazán, 2012; Rajoka, *et al.*, 2006).

En Cuba, una de las cepas más empleadas es la *C. utilis* NRRL Y-660, que utiliza como sustrato melazas de caña. Esta cepa se caracteriza por un mayor rendimiento biomasa-sustrato en comparación con otras cepas de *C. utilis* y un perfil superior de aminoácidos totales. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4,5 y 5. Además, su rango de temperatura óptimo está entre los 28 y 33°C, donde se logra maximizar el rendimiento biomasa-sustrato. Un aspecto interesante es que un incremento en la concentración inicial de sustrato repercute en una disminución de dicho rendimiento (Otero y Almazán, 2012).

### **1.3 Proceso de fermentación**

La práctica de la fermentación es una de las tecnologías más antiguas del hombre. Las capacidades fermentativas de los microorganismos se han utilizado durante miles de años. Las levaduras se utilizaron para cultivar pan en Egipto desde el año 4000 antes de nuestra era, y los productos lácteos fermentados como el queso y el yogur se desarrollaron temprano en la historia (Hensirisak, 1997).

Según Okafor y Okeke (2018), se define como fermentación al proceso mediante el cual los microorganismos crecen a gran escala tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Por otra parte, Katoh, *et al.* (2015) amplifica el concepto de fermentación

en el sentido industrial, donde lo define como las reacciones microbianas tanto anaeróbicas como aeróbicas usadas en la producción de una gran variedad de sustancias útiles.

### **1.3.1 Aireación y agitación en la fermentación aeróbica**

La aireación y la agitación son elementos esenciales durante el proceso de fermentación. La aireación suministra el oxígeno necesario a los microorganismos y la agitación mantiene condiciones uniformes dentro del fermentador. En conjunto, la aireación y la agitación son importantes ya que promueven la transferencia de masa efectiva al medio líquido en el fermentador. La función principal de un biorreactor diseñado correctamente es proporcionar un entorno controlado con el fin de lograr el crecimiento óptimo y la formación del producto en el sistema celular particular empleado.

En un biorreactor, el transporte de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida está controlado por el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ).

### **1.3.2 Métodos para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno**

La determinación de  $k_L a$  en un biorreactor es esencial para cuantificar los efectos de las variables operativas en el suministro de oxígeno. Los siguientes son los métodos más comunes (García-Ochoa y Gómez, 2009):

1. **Método dinámico:** Se basa en la medida del oxígeno disuelto presente en el medio por absorción o desorción de este gas. Después de una variación de la concentración en el gas de entrada al reactor, se analiza el cambio dinámico en la concentración de oxígeno disuelto.
2. **Método de la oxidación del sulfito de sodio:** Este método se basa en la reacción del sulfito de sodio, que es un agente reductor, con el oxígeno disuelto

para producir sulfato, en la presencia de un catalizador (iones cobre (II) o cobalto(II)).

3. **Método del balance de oxígeno:** Tiene su fundamento en la medición de la cantidad de oxígeno que se transfiere al líquido en un intervalo de tiempo fijo. Este método requiere de medidores de flujo, presión y temperatura precisos, además de analizadores de oxígeno gaseoso (Standbury, *et al.*, 2017).

### 1.3.3 Medios de cultivo

Según Okafor y Okeke (2018), todos los medios microbiológicos, ya sea para fines industriales o de laboratorio, deben satisfacer las necesidades de un microorganismo en términos de carbono, nitrógeno, minerales, factores de crecimiento y agua. Además, no deben contener materiales que sean inhibidores del crecimiento.

Los requisitos de carbono generalmente se satisfacen con carbohidratos, especialmente (en experimentos de laboratorio) de glucosa. Sin embargo, carbohidratos más complejos como el almidón o la celulosa pueden ser utilizados también por algunos organismos. Las fuentes de energía también pueden incluir hidrocarburos, alcoholes o incluso ácidos orgánicos. Al componer un medio industrial, el contenido de carbono debe ser adecuado para lograr la producción de las células requeridas (Okafor y Okeke, 2018). Para la mayoría de los organismos, el peso del organismo producido a partir de un determinado peso de los carbohidratos (conocido como constante de rendimiento) en condiciones aeróbicas es de aproximadamente 0,5 gramos de células secas por gramo de glucosa. Esto significa que los carbohidratos son al menos dos veces el peso esperado de las células y deben ponerse como glucosa o su compuesto equivalente.

El nitrógeno se encuentra en las proteínas, incluidas las enzimas, así como en los ácidos nucleicos, por lo tanto, es un elemento clave para la célula. La mayoría de las células usan amoníaco u otras sales de nitrógeno. Cualquier compuesto de nitrógeno que el organismo no puede sintetizar debe ser agregado (Okafor y Okeke, 2018).

Los minerales forman parte de algunas enzimas en la célula y deben estar presentes en el medio. Los principales elementos minerales necesarios incluyen al fósforo, el azufre y el magnesio. Además se requieren elementos traza como el manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno (Okafor y Okeke, 2018).

Los factores de crecimiento incluyen vitaminas, aminoácidos y nucleótidos y se deben agregar al medio si el organismo no puede fabricarlos (Okafor y Okeke, 2018).

#### **1.3.4 Preparación del inóculo**

La preparación del inóculo es la primera etapa del proceso fermentativo. Este se prepara en varias etapas de aumento de volumen para disminuir el tiempo en que se logre la población microbiana requerida, así como el riesgo de contaminación. La composición química del medio puede diferir en las etapas de inóculo y de producción (Standbury, *et al.*, 2017).

El inóculo generalmente debe ser de un 5-20% del volumen final de la fermentación, de forma tal que el tiempo real de producción se acorte considerablemente. Ya que los organismos utilizados en la mayoría de las fermentaciones son aerobios, el inóculo generalmente debe ser aireado vigorosamente para fomentar el desarrollo celular máximo, aunque pueden necesitar menos aireación en la incubación posterior (Standbury, *et al.*, 2017).

#### **1.3.5 Biorreactor**

La capacidad de cultivar grandes cantidades de microorganismos se logra mediante el uso de un recipiente conocido como fermentador o biorreactor. Un fermentador es un recipiente en el cual un microorganismo se cultiva de manera controlada para producir la masa celular del organismo en sí, o un producto producido por la célula (Hensirisak, 1997).

Hay tres modos principales de operación de un biorreactor: continuo, por lotes alimentado, y discontinuo o por lotes. La elección del modo de operación tiene un

efecto significativo en la conversión del sustrato, la concentración del producto, la susceptibilidad a la contaminación y la confiabilidad del proceso (Doran, 2013).

### **Operación continua**

En este modo de operación se suministran continuamente nutrientes al medio y constantemente salen del reactor parte de los microorganismos. La generación continua de los microorganismos repone a los que salen del reactor. Si el recipiente está bien mezclado, la corriente de producto tiene la misma composición que el líquido en el reactor (Doran, 2013).

### **Operación por lotes con alimentación**

En este caso la operación comienza con una solución de sustrato relativamente diluida y se agregan más nutrientes a medida que la conversión se incrementa, evitando altas velocidades de crecimiento. Esto es importante, por ejemplo, en los cultivos donde la demanda de oxígeno durante el crecimiento rápido es demasiado alta para la capacidad de transferencia de masa del reactor, o cuando las altas concentraciones de sustrato son inhibitorias o promueven vías metabólicas indeseables (Doran, 2013).

### **Operación discontinua o por lotes**

En esta operación no hay entradas ni salidas del reactor, o sea, que se opera en un sistema cerrado. El sustrato se agrega al comienzo del proceso y los productos son extraídos solo al final. La mayoría de los biorreactores comerciales son recipientes mezclados operados por lotes (Doran, 2013). El clásico reactor mixto es el tanque agitado; sin embargo, los reactores también pueden ser de columna de burbujas u otra configuración siempre que las concentraciones de sustrato, producto y catalizador dentro del recipiente sea uniforme. El costo de operar un reactor por lotes depende del tiempo que se tarda en alcanzar la concentración de producto deseada o el nivel de conversión del sustrato. Los costos de operación se reducen si la reacción se completa



rápidamente. Por lo tanto, es muy importante poder predecir el tiempo requerido para las reacciones por lotes.

### 1.3.6 Curva de crecimiento microbiano en un proceso discontinuo

Durante las fermentaciones discontinuas, la población de microorganismos atraviesa varias fases de crecimiento distintas: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Waites, *et al.*, 2001). Cuando se grafica el logaritmo neperiano de la biomasa microbiana con respecto al tiempo se obtiene la curva de crecimiento microbiano que puede apreciarse en la figura 1.3.

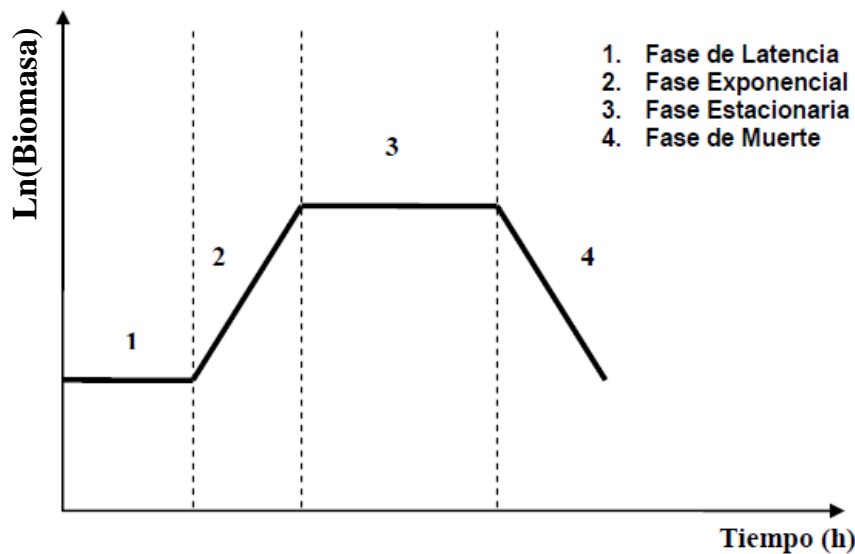


Figura 1.3: Curva de crecimiento microbiano. Fuente: (Martínez, 2008).

#### Fase de latencia

En esta fase prácticamente no hay crecimiento, y la población microbiana permanece relativamente constante. Sin embargo, es un período de intensa actividad metabólica a medida que el inóculo microbiano se adapta al nuevo entorno. Cuando las células son inoculadas en un medio fresco pueden ser deficientes en enzimas esenciales,

vitaminas o cofactores, que deben ser sintetizados para poder utilizar los nutrientes disponibles, antes de la división celular (Waites, *et al.*, 2001).

### **Fase exponencial**

En esta fase, la población microbiana comienza a alcanzar la mayor velocidad de crecimiento posible. Se mantiene esta fase en tanto haya sustrato disponible en exceso (Otero y Almazán, 2012). Existe un consumo constante de los nutrientes (Martínez, 2008).

### **Fase estacionaria**

En este punto, la tasa de crecimiento general ha disminuido a cero y no hay cambio neto en el número de células debido a que el número de muertes iguala al número de células generadas. Sin embargo, los microorganismos todavía son metabólicamente activos, utilizan nutrientes liberados de células lisadas y en algunos casos producen metabolitos secundarios. La duración de la fase estacionaria varía según los microorganismos involucrados y las condiciones ambientales (Waites, *et al.*, 2001).

### **Fase de muerte**

Después de la fase estacionaria le sigue la fase de muerte, donde las células mueren a una velocidad constante y a menudo se someten a lisis (Waites, *et al.*, 2001). Aquí la velocidad de desaparición (muerte) se vuelve más alta que la velocidad de crecimiento, lo que provoca la disminución de la densidad celular (Martínez, 2008).

## **1.4 Escalado**

De acuerdo con Castellanos (2000) el escalado es el proceso mediante el cual, a partir, al menos en parte, de los resultados de investigaciones realizadas a una escala más pequeña, se logra la puesta en marcha exitosa y la operación económica de una unidad a escala comercial.

Sin embargo, la experimentación directa con los procesos de interés en la mayoría de los casos resulta difícil y costoso, e incluso, a veces, imposible. Ante esta situación no

queda otra alternativa que recurrir al empleo de modelos que permitan reproducir, en los laboratorios, los procesos que se quieren investigar (Castellanos, 2000).

En la técnica de escalado se considera que un modelo es un dispositivo o medio, que se concibe de tal manera, que pueda predecir el rendimiento de un prototipo. Mientras que el prototipo, a su vez, constituye el sistema físico a escala completa, que se va a modelar (Castellanos, 2000).

Los criterios de escalado más usados en la industria fermentativa son:

- Potencia por unidad de volumen constante
- Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante ( $k_L a$ )
- Velocidad de agitación tangencial constante
- Concentración de oxígeno disuelto constante

En todas las fases de escalado de los procesos fermentativos aerobios, la aireación debe estar muy controlada, a medida que aumenta la escala la dinámica de la cantidad de oxígeno debe medirse cuidadosamente para determinar cómo el incremento de volumen afecta la demanda de oxígeno. A esto se debe, que los criterios de escalado asociados a la concentración de oxígeno son los más importantes (Madigan, *et al.*, 2015).

### **Conclusiones parciales del capítulo**

1. Los tallos de yuca residuales tienen potencialidades para la producción de alimento animal debido a su alta disponibilidad, alto contenido de carbohidratos y bajo costo.
2. Los aspectos a considerar en la propagación de la *Candida utilis* son: la temperatura, pH, el nivel de oxigenación del medio, los factores de crecimiento y la concentración inicial de sustrato.
3. En el escalado de procesos fermentativos aerobios, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno es de gran interés como mecanismo para asegurar el mismo nivel de oxigenación.

## Capítulo 2: Materiales y métodos

El presente trabajo se realiza 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.

En el presente capítulo se precisa el esquema metodológico seguido en la investigación, se describen los procedimientos aplicados y las técnicas analíticas utilizadas.

### Esquema metodológico de la investigación

Se siguen las siguientes etapas en el trabajo investigativo:

1. Análisis documental.
2. Recolección, preparación y muestreo de los tallos de yuca residuales que constituyen la materia prima.
3. Determinación de la composición química de los tallos de yuca residuales.
4. Hidrólisis enzimática de los tallos de yuca residuales y de almidón de yuca.
5. Diseño experimental factorial de la fermentación de hidrolizados con *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado.
6. Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado y escalado a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L.
7. Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado y escalado en biorreactor de capacidad de 1 L.
8. Escalado del biorreactor.

## **2.1 Análisis documental**

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

Se visita la UEB España Republicana con el propósito de conocer de forma detallada el proceso productivo que sirve de base para la investigación, las variables a controlar en cada etapa, los parámetros de calidad así como el equipamiento existente en la fábrica.

## **2.2 Recolección, preparación y muestreo de los tallos de yuca residuales que constituyen la materia prima**

Los tallos de yuca residuales (*Manihot esculenta* Cranz) pertenecen a la variedad C-74-725 y fueron recolectados en la zona cercana al poblado de Ceiba Mocha.

Los tallos frescos se cortan en trozos de 10 cm de longitud y se secan al sol y al aire por dos semanas, y a continuación se trituran en un molino artesanal hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 2 mm. El material molido se somete a un secado adicional a 60 °C en una estufa (DHG-9146A, China) durante 24 h. Posteriormente, 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.

## **2.3 Caracterización de la materia prima**

Se le determina a los tallos de yuca residuales: humedad, cenizas (componentes minerales), 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:**

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

- **Cenizas:**

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

- **Extractivos en etanol:**

Se colocan aproximadamente 5 g de materia prima en un aparato Soxhlet de 75 ml, y se realiza la extracción con 160 mL de etanol al 95% por 24 h con un baño de agua. Al final de 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):**

La determinación de los polisacáridos fácilmente hidrolizables se realiza mediante análisis gravimétrico del residuo sólido remanente después de la hidrólisis de las hemicelulosas. En un balón de destilación se mezclan 2 g de muestras libres de extractivos con 20 mL de ácido clorhídrico al 5 % en masa. 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. 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.

$m_f$ , 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:

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

donde:

$m_i$ , masa inicial de la muestra, g.

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

$m_{fr}$ , masa final del residuo de este proceso, g.

- **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.

## **2.4 Hidrólisis enzimática de los tallos de yuca residuales y de almidón de yuca**

Para la experimentación de la fermentación, que es el principal propósito del presente trabajo se requiere disponer de hidrolizados que contengan azúcares como fuente de carbono. Se realiza la hidrólisis enzimática a partir del protocolo propuesto por Martín, *et al.*, (2017).

Se considera en la hidrólisis enzimática, los valores de temperatura y pH óptimos para las enzimas que se utilizan:  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa (AMG).

En este protocolo se toma la materia prima que contiene el almidón a hidrolizar, se ajusta el pH a 5,8 con ácido clorhídrico 1M y se calienta a 85 °C en un baño de agua. Posteriormente, se le adiciona la enzima  $\alpha$ -amilasa y la mezcla se incuba a 85 °C por 4 horas en baño de agua, con agitación periódica. Pasado ese tiempo, se enfría a temperatura ambiente (entre 10 y 15 minutos) y se ajusta el pH a 5,0. Entonces se adiciona la enzima amiloglucosidasa y la mezcla se incuba a 65 °C por 24 horas en baño de agua. Al final de la hidrólisis se filtra a vacío para eliminar los sólidos en suspensión.

En el presente trabajo se requiere hidrolizar además de los tallos de yuca, el almidón de yuca para alcanzar la concentración de azúcares reductores necesaria para desarrollar la experimentación. Esto se debe al bajo contenido de almidón de los tallos.

Para la hidrólisis de los tallos de yuca se pesan 100 g de tallos con un diámetro de 1 mm y se le adicionan 1500 mL de agua.

En el caso del almidón de yuca se pesan 60 g de almidón y se le adicionan 650 mL de agua. En ambos casos, se sigue el protocolo propuesto por Martín, *et al.*, (2017).



## 2.5 Diseño experimental factorial de la fermentación de hidrolizados con *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado

Para determinar las condiciones óptimas experimentales de la fermentación se elabora un diseño experimental de superficie de respuesta factorial a tres niveles mediante el software *Statgraphics Plus versión 5.0*.

Se fijan las variables Temperatura ( $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y el pH ( $\text{pH}=4,5$ ).

Se seleccionan como factores para evaluar su influencia:

**Concentración inicial de sustrato:** El rango a evaluar es de 3-53 g/L. Estos valores se seleccionan a partir de datos reportados para la *Candida utilis* (Otero y Almazán, 2012), además se siguen criterios económicos.

**Velocidad de agitación:** El rango seleccionado es de 125-275 rpm ( $2,08\text{-}4,58\text{ s}^{-1}$ ). Se determina a partir de ensayos preliminares a diferentes velocidades de agitación.

Se toma como **variable de respuesta** a la **biomasa generada** en g/L 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 27 experimentos.

Tabla 2.1: Diseño experimental obtenido

Número	Bloque	Velocidad de Agitación (rpm)	Concentración inicial de sustrato (g/L)
1	1	125	3
2	1	200	53
3	1	125	28
4	1	275	3
5	1	125	53
6	1	275	28
7	1	200	28
8	1	275	53
9	1	200	3
10	2	125	3
11	2	200	53
12	2	125	28
13	2	275	3
14	2	125	53
15	2	275	28
16	2	200	28
17	2	275	53
18	2	200	3
19	3	125	3
20	3	200	53
21	3	125	28
22	3	275	3
23	3	125	53
24	3	275	28
25	3	200	28
26	3	275	53
27	3	200	3

Fuente: Elaboración propia

Cuando se selecciona un diseño factorial para optimizar se incluye como una variable del experimento el número de bloques que permite determinar si hay diferencias significativas entre las diferentes réplicas durante el desarrollo del experimento. Esta es la razón por la que se incluye en la tabla 2.1.

En las investigaciones en las que se trabaja con microorganismos se requiere: la esterilización de los medios de cultivo, la preparación del inóculo, la preparación de los medios de fermentación. Estos aspectos se describen a continuación.

### **Esterilización de los medios de cultivo**

Los medios de cultivo se esterilizan para evitar la contaminación por otros microorganismos durante el crecimiento de la *Candida utilis*, para ello se someten a una temperatura de 121 °C por 15 minutos en un autoclave vertical modelo LDZX-50 KAS, con el fin de garantizar las condiciones de asepsia.

### **Preparación del inóculo**

La cepa empleada en todos los estudios fue la *Candida utilis* NRRL Y-660 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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).

### **Preparación de los medios de fermentación**

Los medios de fermentación 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 almidón de yuca

- Fuente de nitrógeno – sulfato de amonio, fosfato de amonio
- Fuente de fósforo –fosfato de amonio
- 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 2.4, 2.5 y 2.6 (Herrera y Pons, 2014):

$$\text{Fosfato diamónico} = \frac{0,03 \cdot \text{g de levadura potencial}}{\frac{0,46 \text{ g de pentóxido de difosforo}}{\text{g de fosfato de amonio}}} \quad (2.4)$$

$$\text{Sulfato de amonio} = \frac{0,08 \cdot \text{g de levadura potencial} - 0,2 \cdot \text{g de fosfato diamónico}}{\frac{0,21 \text{ g de nitrógeno}}{\text{g de sulfato de amonio}}} \quad (2.5)$$

$$\text{Sulfato de magnesio} = \frac{0,0075 \cdot \text{g de levadura potencial}}{\frac{0,1656 \text{ g de magnesio}}{\text{g de sulfato de magnesio}}} \quad (2.6)$$

Estas cantidades de sales aseguran que haya un exceso para lograr que la única fuente limitante del crecimiento sea la del carbono.

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

### **Determinación de la biomasa microbiana mediante el peso seco**

Se toman asépticamente muestras de 5 mL y se transfieren a tubos Falcon previamente pesados. Se centrifugan a 8600 rpm por 10 minutos (centrífuga Heal Force NeoFuge 15R, China), con el objetivo de separar las células del líquido sobrenadante, el cual se preserva para determinar los azúcares reductores totales. Posteriormente, las células son resuspendidas con 10 mL de agua destilada y se vuelve a centrifugar para efectuar un lavado de las mismas. Después, se separa nuevamente el líquido sobrenadante y se repite el procedimiento de lavado. Entonces se escurre el agua residual que queda en el tubo y se pasa a secar en estufa (DHG-9146A, China) a 70 °C por 24 horas.

**Azúcares reductores totales (ART):** Estos azúcares 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).

### **Experimentación según diseño factorial a tres niveles.**

Para desarrollar la experimentación:

1. A los hidrolizados de almidón de yuca y de los tallos de yuca se le ajustan las concentraciones iniciales de sustrato que se requieren según diseño de experimentos.
2. Se comprueba la concentración mediante la determinación de los azúcares reductores presentes.
3. Se dosifican las sales nutrientes necesarias de acuerdo con las indicaciones anteriormente mencionadas (ecuaciones 2.4, 2.5 y 2.6).
4. Se ajusta el pH a 4,5.
5. Se transfiere la solución a Erlenmeyers de 250 mL, se colocan tapones de algodón envuelto en gasa y se esterilizan de acuerdo al procedimiento explicado anteriormente.
6. Se inoculan los Erlenmeyers con 5 mL del inóculo preparado.
7. Se extraen dos muestras de 5 mL a la que se le determinan los azúcares reductores y la biomasa microbiana mediante el método del peso seco ya descrito.
8. Los Erlenmeyers se colocan en la zaranda orbital HDL a la velocidad de agitación según el diseño de experimentos por un período de 24 horas.

9. Se recolectan 2 muestras de 5 mL, se le determinan los azúcares reductores y la biomasa microbiana mediante el método del peso seco, una vez concluido el experimento.

Se determina la biomasa microbiana generada como la diferencia de la biomasa al final de la fermentación menos la biomasa inicial.

## **2.6 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado y a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L.**

Con el objetivo de asegurar que la oxigenación que requieren los microorganismos a nivel de biorreactor sea la misma que se suministra a nivel de Erlenmeyer para las condiciones óptimas, se estima el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer, y posteriormente, se determinan las condiciones de agitación y aireación en el biorreactor que permiten obtener el mismo coeficiente. En los Erlenmeyers agitados la oxigenación del medio solo depende de la velocidad de agitación de la zaranda, mientras que en el biorreactor la oxigenación está en función de la aireación y la velocidad de agitación siempre que se mantenga igual el diseño del impelente (Standbury, *et al.*, 2017).

### **2.6.1 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado**

Para estimar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno se emplea el método del sulfito de sodio, seleccionado por su simplicidad (Rajesh, *et al.*, 2012).

Este método se basa en la reacción del sulfito de sodio con el oxígeno disuelto para producir sulfato de sodio, en presencia de un catalizador (iones cobre (II) o cobalto (II)). Se evalúa en el tiempo el descenso de la concentración de los iones sulfito.

Para aplicar el método del sulfito a nivel de Erlenmeyer agitado se sigue el procedimiento siguiente:

1. Se adicionan 55 mL de solución de sulfito de sodio 0,65 N a un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad.
2. Se adiciona sulfato de cobre pentahidratado hasta alcanzar una concentración de  $10^{-3}$  mol/L.
3. Se toma una muestra de 0,5 mL de la disolución inicial. Entonces se inicia la agitación mediante la zaranda HDL apparatus de fabricación China.
4. Cada media hora se toma una muestra de la disolución contenida en el Erlenmeyer.
5. A cada muestra tomada se le adiciona un exceso de solución de yodo. Este exceso se cuantifica mediante la valoración con una disolución estándar de tiosulfato de sodio.
6. Los volúmenes consumidos de tiosulfato de sodio se grafican contra el tiempo y se ajustan los datos a una línea recta a la que se le determina su pendiente.
7. Se calcula el valor de  $k_L a$  mediante la ecuación 2.7

$$k_L a = \frac{1}{C} \cdot \frac{m \cdot c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)}{4 \cdot V(\text{Na}_2\text{SO}_3)} \quad (2.7)$$

donde:

$k_L a$ : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en  $\text{h}^{-1}$

$m$ : pendiente de la recta de ajuste de la gráfica de volúmenes de tiosulfato de sodio consumidos contra el tiempo.

$C$ : Solubilidad del oxígeno a la temperatura de trabajo en mol/L.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ : Concentración de la solución estándar de tiosulfato de sodio.

$V(\text{Na}_2\text{SO}_3)$ : Volumen de la solución de sulfito de sodio tomado periódicamente en L.

Para corroborar la validez del resultado obtenido de  $k_L a$  se emplea la ecuación 2.8 que es una correlación empírica propuesta por Liu, *et al.*, (2006) para determinar el valor de la  $k_L a$  a nivel de Erlenmeyer agitado mediante el método del sulfito.

$$k_L a = 0,141 \cdot N^{0.88} \cdot \left(\frac{V_L}{V_0}\right)^{-0.80} \quad (2.8)$$

donde

$k_L a$ : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en  $h^{-1}$

$N$ : velocidad de agitación en revoluciones por minuto.

$V_L$ : Volumen de líquido contenido en el Erlenmeyer en mL.

$V_0$ : Capacidad del Erlenmeyer en mL.

### 2.6.2 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L

Con el propósito de determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el biorreactor, se requiere fijar la aireación a un valor de 1 vvm que para el volumen de trabajo del reactor de 1 L equivale a un flujo volumétrico de 1 L/min de aire. Se aplica el procedimiento descrito anteriormente para Erlenmeyer, a diferentes valores de velocidad de agitación, solo cambia el punto 3, que considera la agitación (agitador marca IKA RW 20) y la aireación (compresor marca Jenway 8515) simultáneamente. Los valores se reportan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Valores de  $k_L a$  para diferentes velocidades de agitación en el reactor

Velocidad (rpm)	$k_L a$ ( $h^{-1}$ )
350	
400	
450	

Fuente: Elaboración propia

A partir de estos datos se grafica  $k_L a$  contra el valor de la velocidad de agitación y se determina cuál es la velocidad de agitación que permite obtener un valor del coeficiente de transferencia de oxígeno en el biorreactor igual al valor obtenido a nivel de Erlenmeyer para las condiciones óptimas.



## **2.7 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado y en biorreactor de capacidad de 1 L.**

Se realiza la cinética de crecimiento en ambos niveles al unísono, a continuación se describe detalladamente para cada nivel.

### **2.7.1 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado**

Para determinar la cinética de crecimiento de la *Candida utilis* sobre hidrolizados de almidón de yuca a nivel de Erlenmeyer se parte de los hidrolizados de almidón de yuca y de los tallos de yuca. Se sigue el procedimiento que se describe a continuación:

-Se ajusta la concentración inicial de sustrato al valor óptimo, obtenido según el diseño de experimentos mediante la mezcla adecuada de ambas disoluciones.

-Se sigue el mismo procedimiento que para la ejecución del diseño de experimentos, con la diferencia que se coloca en la zaranda orbital a la velocidad de agitación óptima obtenida con la experimentación.

-Se toma una muestra periódicamente, además de la del inicio y la del final del proceso. A cada muestra se le determinan los azúcares reductores y la biomasa microbiana.

-Se concluye con la fermentación cuando se detecte la presencia de la fase estacionaria en el cultivo.

A partir de los datos experimentales se obtienen las curvas de consumo de sustrato y concentración de biomasa con respecto al tiempo, lo que permite además identificar las fases de crecimiento de la *Candida utilis*. Para ajustar el crecimiento del microorganismo se emplea el modelo Gompertz (Gamarra, 2016) ya que los datos se ajustan mejor a este modelo que al de Monod.

El modelo de Gompertz se usó por primera vez en la ciencia para ajustar datos de mortalidad humana. Esta función está basada en una relación exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de la población (Castro, *et al.*, 2008). La ecuación que representa el modelo es la ecuación 2.9

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = a \cdot e^{-e^{(b-c)t}} \quad (2.9)$$

Donde:

a: valor máximo de biomasa

b y c: términos del modelo

t: tiempo en h

A partir de este modelo se obtienen los parámetros velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ), tiempo de latencia ( $\lambda$ ) y tiempo de generación (G) que caracterizan el crecimiento del microorganismo. La velocidad específica de crecimiento máxima se calcula por la ecuación 2.10.

$$\mu_{max} = a \cdot c \quad (2.10)$$

donde  $\mu_{max}$  se obtiene en  $h^{-1}$  y a y c son los términos del modelo. El tiempo de latencia se calcula por la ecuación 2.11

$$\lambda = \frac{(b-1)}{c} \quad (2.11)$$

Donde el tiempo de latencia se da en h. El tiempo de generación también se obtiene en horas y se halla mediante la expresión 2.12.

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (2.12)$$

### **2.7.2 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* en biorreactor de capacidad de 1 L**

Para determinar la cinética de crecimiento de la *Candida utilis* sobre hidrolizados de almidón de yuca a este nivel se sigue el mismo procedimiento que para el caso del nivel de Erlenmeyer, solo que se prepara 1L de medio, del cual se reservan 100 mL para la preparación del inóculo del biorreactor. Estos medios se esterilizan de acuerdo con el procedimiento ya mencionado.

Primero se prepara un inóculo base de acuerdo a las indicaciones del epígrafe 2.5. De este inóculo se toman 10 mL y se adicionan a los 100 mL del medio reservado para la inoculación del biorreactor. Este medio se pasa a la zaranda orbital HDL a la velocidad de agitación óptima según el diseño de experimentos por un período de 11 horas para asegurar que los microorganismos se encuentren en la fase de crecimiento exponencial.

Con el inóculo listo se adiciona con el resto del medio de cultivo al biorreactor en condiciones de asepsia. Luego se comienza la aireación a 1 vvm a una temperatura de 30°C y se fija la velocidad de agitación al valor óptimo obtenido mediante la prueba del sulfito. De manera periódica, se retira una muestra a la que se le determinan los azúcares reductores y la biomasa microbiana mediante el método del peso seco. Se concluye con la fermentación cuando se detecte la presencia de la fase estacionaria. Mediante los datos experimentales se obtienen las curvas de consumo de sustrato y concentración de biomasa con respecto al tiempo. Para ajustar el crecimiento del microorganismo a este nivel también se emplea el modelo Gompertz (Gamarra, 2016) por la razón ya comentada y con el empleo de las ecuaciones que rigen este modelo.

## **2.8 Escalado del biorreactor**

El escalado tiene como fin transportar los resultados obtenidos en equipos de laboratorio o planta piloto a una operación industrial de mayor tamaño con los mismos o mejores niveles de productividad.

Con el objetivo de desarrollar el escalado se toma el biorreactor de 1 L donde se desarrolla la experimentación como modelo y se determinan las relaciones necesarias para el escalado hasta un biorreactor de 200 L.

Se determina el tiempo de fermentación requerido, el tiempo total de trabajo de un ciclo, la productividad volumétrica de biomasa y el rendimiento biomasa-sustrato. El tiempo de fermentación necesario para elevar el contenido de biomasa desde un valor  $X_0$  hasta un valor  $X$  se obtiene mediante la ecuación 2.13

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) \quad (2.13)$$

El tiempo total de trabajo de un ciclo ( $t_{total}$ ) del biorreactor se calcula mediante la ecuación 2.14:

$$t_{total} = \lambda + t_f + t_{op} \quad (2.14)$$

Donde:

$\lambda$  : tiempo de latencia

$t_f$ : tiempo de fermentación

$t_{op}$ : tiempo de operaciones auxiliares

La productividad volumétrica de biomasa ( $Q_X$ ) se determina por la ecuación 2.15:

$$Q_X = \frac{X - X_0}{t_{total}} \quad (2.15)$$

El rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{X/S}$ ) se halla mediante la expresión 2.16:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2.16)$$

En la cual:

$S_0$ : Concentración inicial de sustrato

$S$ : Concentración final de sustrato

Se determinan los parámetros necesarios en el reactor modelo que se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Parámetros del biorreactor modelo

Parámetro	Valor
Diámetro(D)	
Diámetro del impelente(D <sub>i</sub> )	
Altura efectiva (H)	
Velocidad de agitación (N)	
Relación $\frac{D_i}{D}$	
Relación $\frac{H}{D}$	

Fuente: Elaboración propia

Para el escalado de procesos biológicos es necesario emplear dos criterios. Como primer criterio se toma la semejanza geométrica. En este criterio se debe cumplir la relación 2.17:

$$\frac{H_1}{D_1} = \frac{H_2}{D_2} \quad (2.17)$$

Y también debe cumplirse la relación 2.18:

$$\frac{D_{i1}}{D_1} = \frac{D_{i2}}{D_2} \quad (2.18)$$

Donde el subíndice 1 identifica al prototipo y el 2 al modelo.

Con la ayuda de la relación 2.18 es posible calcular el valor del diámetro del impelente en la escala mayor. Para esto se despeja D<sub>i1</sub> y se obtiene la expresión 2.19

$$D_{i1} = \frac{D_{i2}}{D_2} \cdot D_1 \quad (2.19)$$

El otro criterio de escalado es el del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) constante que también se emplea en el escalado de los resultados a nivel de Erlenmeyer al biorreactor de 1 L. Este criterio parte de la ecuación 2.20

$$k_L a = K \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^\alpha \cdot V_g^\beta \quad (2.20)$$

Donde:

K: factor geométrico,

$V_g$ : velocidad superficial del gas,

$P_g$ : potencia consumida por el agitador en presencia de aireación,

V: volumen de líquido del biorreactor.

Los términos  $\alpha$  y  $\beta$  dependen del tamaño del reactor.

De acuerdo con este criterio si se considera que  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes en las diferentes escalas se llega a la ecuación 2.21

$$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{2/3} \quad (2.21)$$

Donde:

$N_1$ : velocidad de agitación para el prototipo.

$N_2$ : velocidad de agitación para el modelo.

A partir de la ecuación 2.21 se obtiene la expresión 2.22 que permite calcular la velocidad de agitación requerida en el prototipo.

$$N_1 = N_2 \cdot \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{2/3} \quad (2.22)$$

## **Capítulo 3: Análisis de resultados**

En el presente capítulo se muestran los resultados que se obtienen después de realizar la experimentación y el escalado del biorreactor, se discuten y se analizan los mismos.

### **3.1 Análisis documental**

Mediante el análisis documental se puede apreciar que la siembra de yuca se realiza en todos los municipios de la provincia de Matanzas, donde predominan cuatro variedades, que representan un total de 1 276,4 ha anuales, lo cual se refleja en el anexo 1, de las cuales las más representativas son C-74-725 y Señorita. La variedad utilizada (C-74-725) representa aproximadamente un tercio del total recolectado en los municipios más próximos al Central España Republicana (Colón, Perico, Martí, Cárdenas y Jovellanos) y viene dado por un valor de 456 ha.

### **3.2 Composición química de la materia prima**

Como etapa previa para establecer la composición de la materia prima, se determina el contenido de humedad y con ella el valor de la materia seca que fija la base para expresar los resultados de la caracterización química. Los tallos de yuca variedad C74-725 presentan un contenido de humedad del 18,83 % expresado como la media de tres réplicas con una desviación estándar y un coeficiente de variación de 0,056 y 0,30 % respectivamente. Este valor de humedad equivale a un contenido de materia seca de 81,17 %.

Posterior a la determinación de la humedad se analizan las sustancias extractivas, polisacáridos (celulosa y hemicelulosas) y lignina, así como el contenido de cenizas. Todas estas determinaciones se expresan en base seca. La celulosa se determina como polisacáridos difícilmente hidrolizables, mientras que las hemicelulosas como polisacáridos fácilmente hidrolizables. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1 y el gráfico se muestra en el anexo 2.

Tabla 3.1: Composición química de los tallos de yuca en base seca

<b>Componentes</b>	<b>Contenido (% en masa)</b>
Celulosa	33,12
Hemicelulosas	37,71
Lignina	13,19
Extractivos	7,87
Cenizas	8,11

Fuente: Elaboración propia

Como se puede apreciar en la tabla 3.1, los principales componentes de los tallos de yuca lo constituyen los carbohidratos estructurales que representan un 70,83 % de la materia seca. Dentro de ellos, la celulosa, que se determina como la fracción de polisacáridos difícilmente hidrolizables, representa el 33,12 % del material. Este valor está cercano al reportado por Castaño, *et al.*, (2011) que es de 38,8 % y también muy próximo al obtenido por Orosco (2015) que es 33,06 % , mientras que está muy por encima del reportado por Sovorawet y Kongkiattikajorn (2012) que es de 21,4 % de celulosa en otras variedades de tallos de yuca.

Las hemicelulosas, que se determinan como polisacáridos fácilmente hidrolizables, constituyen el 37,71 %. El valor obtenido está en acuerdo con el reportado para la variedad de yuca Señorita por Orosco (2015) que es de 35,49 %, mientras que se encuentra muy por encima del obtenido por Castaño, *et al.*, (2011) que es de 7,2 % y del reportado por Liscano (2014) que es de 7,34 % para la variedad Copiblanca.

La lignina representa el 13,19 % de la materia seca. Para la variedad Señorita Orosco (2015) reporta un 21,52 %, mientras que Castaño, *et al.*, (2011) obtiene un 11,8 %. Este último valor muy cercano al de la presente investigación.

Con respecto a los extractivos el valor obtenido de 7,87 % está ligeramente por encima al reportado por Orosco (2015), que es de 5,72 %. El contenido de las cenizas



obtenidas que es 8,11 % está también por encima del 5,12 % reportado por OroSCO (2015), pero es muy similar al obtenido por Martín, *et al.*, (2007) que es del 8,0 %.

Estas diferencias entre los resultados obtenidos con los de otras investigaciones puede deberse a factores como la variedad de yuca, las características del suelo donde se efectúa el cultivo y las condiciones climáticas de la zona de cosecha.

### **3.3 Diseño experimental factorial a tres niveles de la fermentación de hidrolizados con *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado**

En la tabla 3.2 se muestran los resultados del diseño experimental factorial a tres niveles donde se estudia la influencia de la velocidad de agitación y la concentración inicial de sustrato a una temperatura de 30 °C y un pH de 4,5 sobre la biomasa microbiana generada. En el anexo 3 se reflejan fotos del proceso experimental.

Tabla 3.2: Resultados del diseño experimental

<b>Número</b>	<b>Bloque</b>	<b>Velocidad de Agitación (rpm)</b>	<b>Concentración inicial de sustrato (g/L)</b>	<b>Biomasa generada (g/L)</b>
1	1	125	3	2,005
2	1	200	53	2,940
3	1	125	28	3,960
4	1	275	3	2,060
5	1	125	53	1,190
6	1	275	28	5,370
7	1	200	28	5,390
8	1	275	53	2,625
9	1	200	3	2,990
10	2	125	3	2,350
11	2	200	53	3,100
12	2	125	28	4,055
13	2	275	3	2,000

14	2	125	53	1,205
15	2	275	28	5,230
16	2	200	28	5,580
17	2	275	53	2,750
18	2	200	3	2,375
19	3	125	3	2,140
20	3	200	53	2,885
21	3	125	28	3,810
22	3	275	3	1,890
23	3	125	53	1,305
24	3	275	28	5,290
25	3	200	28	5,300
26	3	275	53	3,235
27	3	200	3	3,130

Fuente: Elaboración propia

Mediante el software *Statgraphics* versión 5.0 se procesan estos datos y se obtiene el diagrama de Pareto que se muestra en la figura 3.1.

Diagrama de Pareto estandarizado para BiomasaGenerada

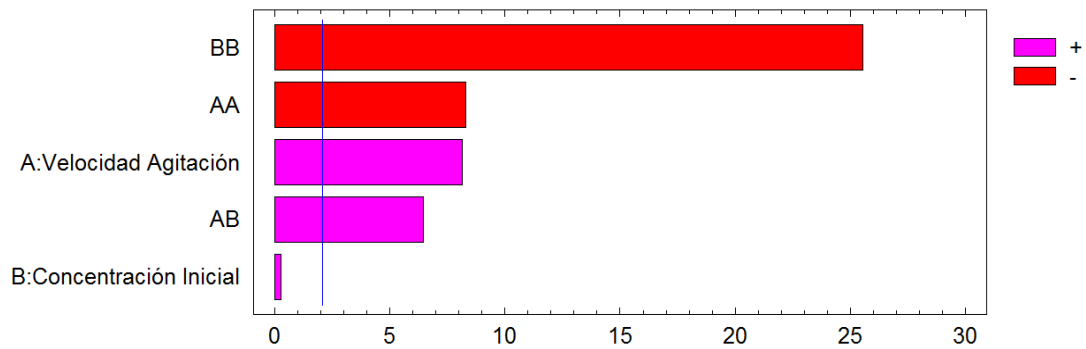


Figura 3.1: Diagrama de Pareto. (A: velocidad de agitación; AA: velocidad de agitación al cuadrado; AB: interrelación entre la velocidad de agitación y la concentración inicial de sustrato; BB: concentración inicial de sustrato al cuadrado; B: concentración inicial de sustrato)

Como puede apreciarse en el mismo casi todos los efectos estudiados se encuentran por encima de la línea de estandarización, lo que indica que son importantes en el diseño con un 95 % de confiabilidad. Dentro de los efectos los términos cuadráticos del modelo (BB y AA) son los de mayor importancia, esto sugiere que es posible que en la región de estudio se encuentre una curvatura. Le siguen en orden de importancia la velocidad de agitación y el efecto combinado de esta con la concentración inicial del sustrato, lo que indica que la combinación de ambas también es significativa para el proceso de fermentación.

Los términos cuadráticos de la concentración inicial y de la velocidad de agitación tienen una influencia negativa sobre el crecimiento de los microorganismos, mientras que la velocidad de agitación y la combinación de esta con la concentración inicial del sustrato tienen un efecto positivo.

A partir de este análisis es posible concluir que ambos factores, tanto la velocidad de agitación como la concentración inicial de sustrato son significativas para el sistema, lo que indica que ejercen influencia sobre el crecimiento de la *Candida utilis* en los hidrolizados investigados.

Mediante la tabla de Análisis de Varianza del diseño de experimentos que aparece en el anexo 4 se puede observar que el efecto de los bloques de las réplicas no es significativo, lo que sugiere que la varianza del sistema es pequeña, y que se van a obtener resultados similares con réplicas sucesivas.

El gráfico de superficie de respuesta obtenida se ilustra en la figura 3.2.

Gráfico de Superficie de Respuesta

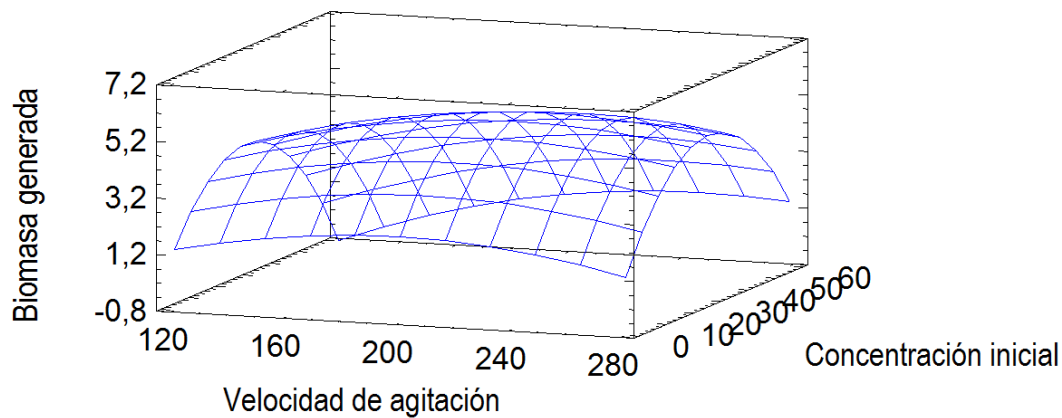


Figura 3.2: Superficie de respuesta obtenida del diseño de experimentos para optimizar la cantidad de biomasa generada. Fuente: Elaboración propia

En el mismo es posible notar que la región de estudio se caracteriza por su curvatura, hecho que ya se sugiere por el diagrama de Pareto, y que en la misma se encuentra un óptimo. Se aprecia que la biomasa generada aumenta con la concentración inicial de sustrato hasta cierto punto y posteriormente disminuye. Este comportamiento puede deberse a que la *Candida utilis* presenta inhibición por sustrato en los hidrolizados de almidón, hecho que reportan Otero y Almazán (2012) durante el crecimiento del microorganismo en melazas de caña.

Con la velocidad de agitación existe un comportamiento similar aunque con una curvatura menor. La velocidad de agitación en la zaranda controla la oxigenación del medio donde se desarrollan los microorganismos, por lo que la oxigenación constituye un factor de importancia para maximizar la biomasa generada. Sin embargo, un exceso puede conducir a la inhibición del crecimiento de la *C. utilis*, lo que puede verse en el desarrollo menor de la cepa a 275 rpm. Un comportamiento similar obtuvieron Rosma y Ooi (2006) con una aireación de 2 vvm para la *C. utilis* en desechos de piña como sustrato.

A partir del diagrama de contorno de la figura 3.3 se puede apreciar que el punto óptimo se localiza a una velocidad de agitación de 222 rpm y una concentración inicial de sustrato de 29 g/L con lo que se obtiene un valor de biomasa generada de 5,5 g/L.

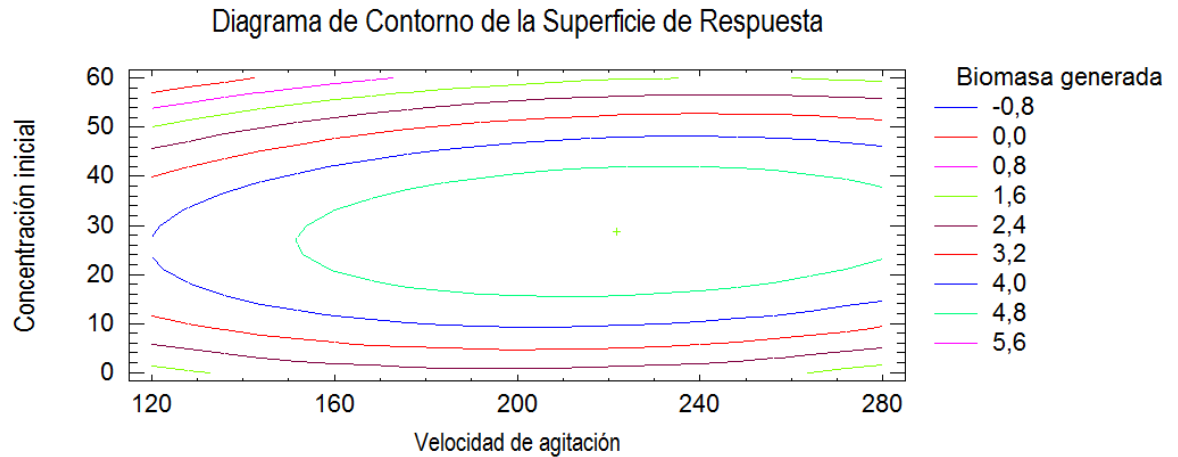


Figura 3.3: Diagrama de Contorno de la superficie de respuesta estimada. Fuente: Elaboración propia

El modelo matemático que se ajusta a los datos con un  $R^2= 97,7633 \%$  se representa por la ecuación 3.1

$$BG = -3,55188 + 0,0583597 \cdot VA + 0,180124 \cdot CI - 0,000147259 \cdot VA^2 + 0,000242444 \cdot VA \cdot CI - 0,00407067 \cdot CI^2 \quad (3.1)$$

Donde BG: biomasa generada (g/L)

VA: velocidad de agitación (rpm)

CI: concentración inicial de sustrato (g/L)

Para corroborar el óptimo que se obtiene se realiza una corrida por duplicado del experimento de crecimiento bajo las condiciones óptimas de velocidad de agitación y concentración inicial de sustrato aportadas por el modelo. Como resultado se obtiene una biomasa generada de 4,94 g/L con una desviación estándar de 0,085 y un coeficiente de variación de 2,00 %. Este valor está cercano al predicho por el modelo.

La diferencia se debe a que se trata de un modelo matemático que se obtiene a partir de datos experimentales que están sujetos a varias fuentes de errores.

### 3.4 Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer agitado y a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L

Como se pudo apreciar en los resultados del diseño experimental la oxigenación del medio es uno de los factores importantes para lograr el crecimiento de la *Candida utilis*. El nivel de oxigenación se caracteriza mediante el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ).

La estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a nivel de Erlenmeyer se realiza mediante el procedimiento explicado en el capítulo 2, con lo cual se obtiene el gráfico de la figura 3.4 de los volúmenes de tiosulfato de sodio consumidos contra el tiempo.

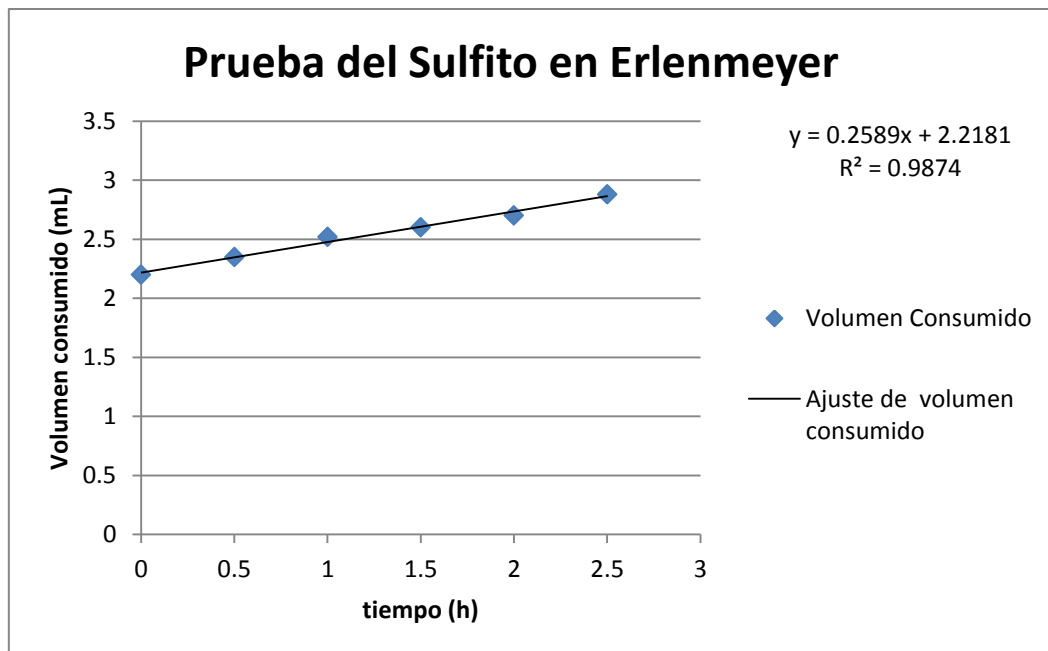


Figura 3.4: Gráfico de consumo de tiosulfato de sodio contra el tiempo durante la prueba del sulfito de sodio a nivel de Erlenmeyer agitado a una velocidad de 222 rpm. Fuente: Elaboración propia

Como puede apreciarse la línea de ajuste tiene una pendiente de 0,2589. Con este valor, con la solubilidad del oxígeno  $C=0,0002344$  mol/L (Liu, 2013),  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0,09804$  mol/L y  $V(\text{Na}_2\text{SO}_3)=0,5$  mL se sustituye en la ecuación 2.7 y se obtiene un valor de  $k_{La}=54,14$  h<sup>-1</sup>.

Para comprobar si este valor obtenido es correcto se calcula mediante la ecuación 2.8 que es una correlación empírica propuesta por Liu, *et al.*, (2006) para determinar el valor de la  $k_{La}$  a nivel de Erlenmeyer agitado mediante el método del sulfito. En esta ecuación se sustituyen los valores  $N=222$  rpm,  $V_L=55$  mL y  $V_0=250$  mL y se obtiene un valor de  $k_{La}=54,96$  h<sup>-1</sup>. Como puede apreciarse este valor está muy próximo al obtenido mediante la prueba experimental de  $54,14$  h<sup>-1</sup>.

Después que se determina el valor del  $k_{La}$  a nivel de erlenmeyer, se procede al nivel de biorreactor, en el cual se fija la aeración a un valor de 1 vvm y se varía la velocidad de agitación como indica la tabla 3.3, con la determinación en cada punto de velocidad del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. Las gráficas de consumo de tiosulfato contra tiempo aparecen en el anexo 5. A partir de las pendientes de las líneas de ajuste de cada una, con  $C=0,0002344$  mol/L,  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0,05037$  mol/L y  $V(\text{Na}_2\text{SO}_3)=0,5$  mL se sustituyen en la ecuación 2.7 y se obtienen los resultados de  $k_{La}$  que aparecen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Valores de  $k_{La}$  para diferentes velocidades de agitación en el biorreactor

<b>Velocidad (rpm)</b>	<b><math>k_{La}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>
350	35,46
400	52,97
450	101,64

Fuente: Elaboración propia

Con estos resultados se elabora el gráfico de la figura 3.5

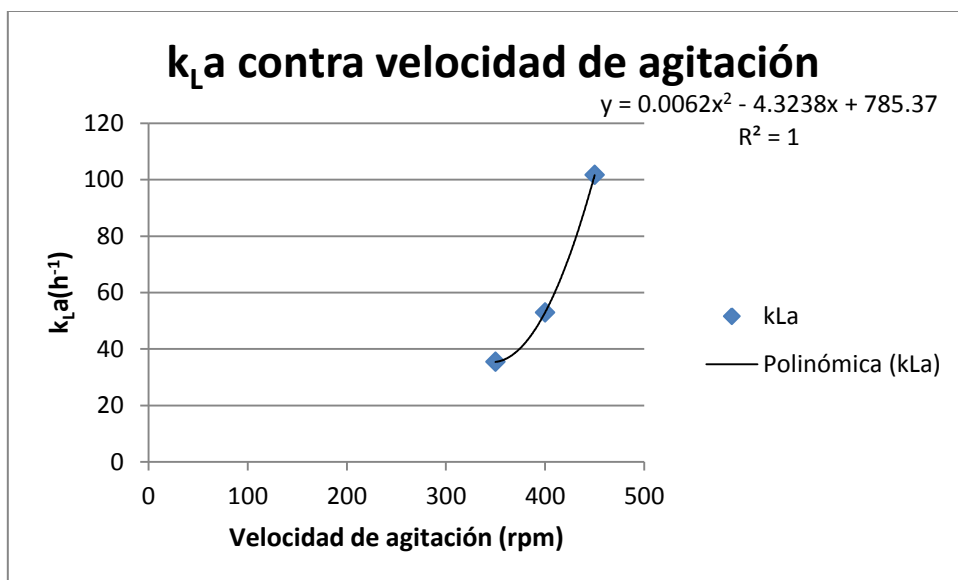


Figura 3.5: Gráfico del comportamiento del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en función de la velocidad de agitación en el biorreactor de 1L. Fuente: Elaboración propia

Con estos resultados a partir del gráfico se determina que la velocidad de agitación que permite obtener un  $k_{La} = 54,14 \text{ h}^{-1}$  es de aproximadamente 402 rpm.

### 3.5 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado y en biorreactor de capacidad de 1 L

En este caso la cinética de crecimiento se hace en ambos niveles y los resultados que se obtienen se muestran a continuación.

#### 3.5.1 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer agitado

Después que se lleva a cabo el proceso de optimización se realiza el estudio del crecimiento del microorganismo para determinar los parámetros cinéticos a escala de Erlenmeyer según se describe en el capítulo 2. Las muestras se toman por duplicado para lograr que sean representativas. A cada muestra recolectada se le determina la cantidad de biomasa y los azúcares reductores presentes.



Con los datos de biomasa se elabora la curva de crecimiento que se muestra en la gráfica de la figura 3.6. Para obtenerla se grafica el logaritmo de la biomasa con respecto al tiempo.

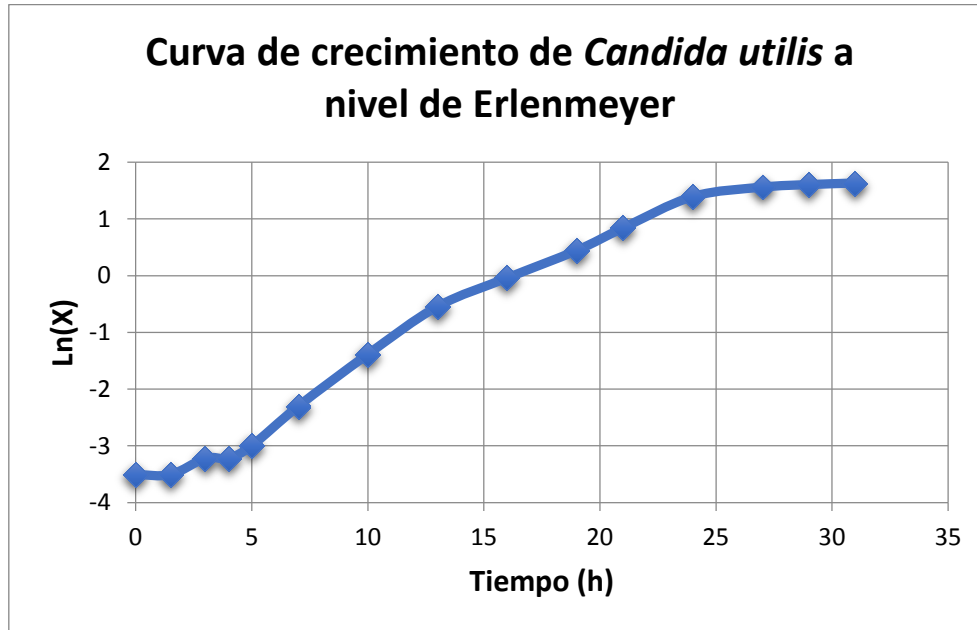


Figura 3.6: Curva de crecimiento de la *Candida utilis* a nivel de Erlenmeyer. Fuente: Elaboración propia

Como se puede apreciar al inicio de la curva de crecimiento apenas existe un incremento de la biomasa. Esta etapa corresponde a la fase de latencia, donde las células se adaptan a su nuevo entorno. En esta etapa ocurren profundos cambios a nivel celular, pero no hay reproducción. Es donde se sintetizan las enzimas necesarias para metabolizar los nutrientes suministrados y se reprimen otras que no son necesarias. La duración de esta fase depende de factores como la edad del inóculo y de la baja concentración de algunos nutrientes y factores de crecimiento (Liu, 2013). La fase de latencia en este caso se acaba antes de las 5 horas. Luego se aprecia una fase de crecimiento del microorganismo donde aprovecha los nutrientes del medio para su reproducción, que se corresponde con la fase de crecimiento exponencial. Por último se observa la fase estacionaria a partir de aproximadamente las 25 h donde no existe

variación en el número total de microorganismos, ya que el número de nuevas células iguala al número de muertes.

Con los datos de cantidad de biomasa y los azúcares reductores presentes se elabora la gráfica de la figura 3.7 donde se aprecia el comportamiento combinado de ambos parámetros.

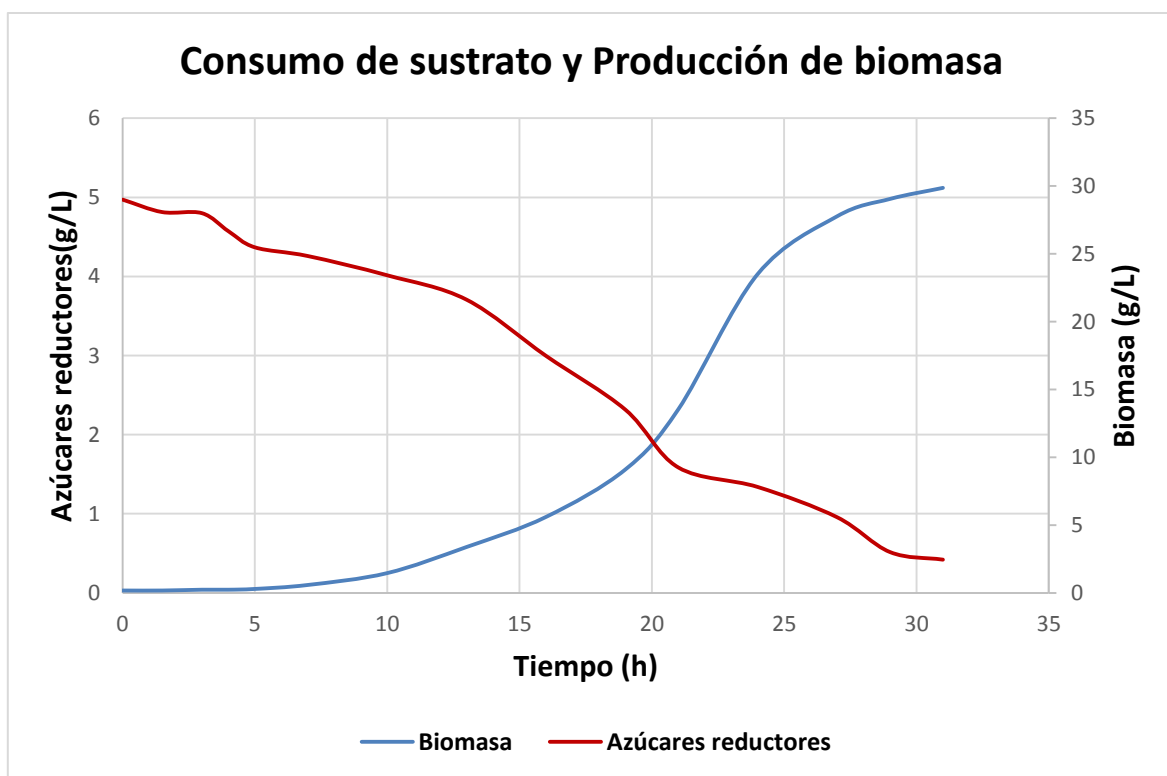


Figura 3.7: Comportamiento del consumo de sustrato y de la producción de biomasa contra el tiempo a nivel de Erlenmeyer. Fuente: Elaboración propia

A partir de la gráfica es posible observar como la concentración de azúcares reductores disminuye en el tiempo a la vez que se incrementa la biomasa en el sistema. El proceso de crecimiento transcurre hasta que se alcanza la fase estacionaria donde se aprecia que no existe variación en la biomasa generada.

Para obtener un modelo de la curva de crecimiento de la *Candida utilis* en hidrolizados de tallos de yuca se utiliza el modelo de Gompertz. Con los datos experimentales, mediante la herramienta Solver de Microsoft Excel 2010 se ajusta el crecimiento de la

*C.utilis* al Modelo de Gompertz por mínimos cuadrados. La gráfica del modelo ajustado aparece en la figura 3.8.

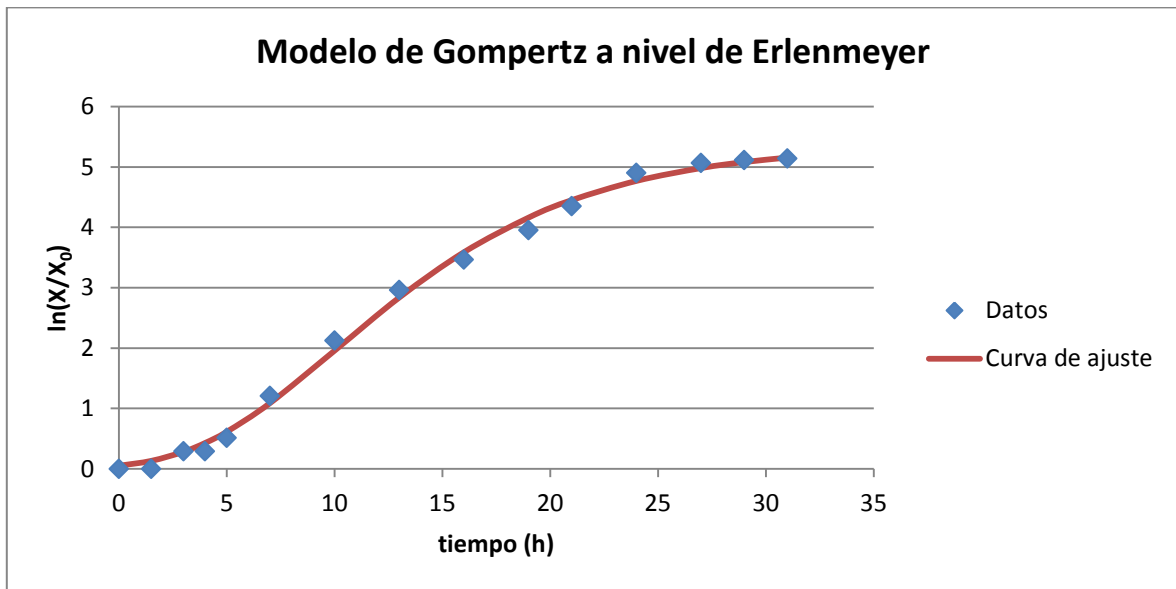


Figura 3.8: Gráfico del modelo de Gompertz obtenido para la cinética de crecimiento a nivel de Erlenmeyer. Fuente: Elaboración propia

Como resultado del ajuste se obtienen los términos  $a=5,3693$ ;  $b=1,5377$  y  $c=0,1529$ . A partir de estos términos y con la expresión 2.9 se llega a la ecuación 3.2 que representa el modelo con un  $R^2=0,9968$ :

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = 5,3693 \cdot e^{-e^{(1,5377-0,1529 \cdot t)}} \quad (3.2)$$

Los parámetros del modelo: velocidad específica de crecimiento máxima, tiempo de latencia y el tiempo de generación o duplicación se calculan a partir de los términos a, b y c con ayuda de las ecuaciones 2.10, 2.11, 2.12. Los resultados se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4: Parámetros del modelo de Gompertz obtenidos a partir del estudio cinético a nivel de Erlenmeyer.

Parámetro	Valor
Velocidad específica de crecimiento máxima ( $h^{-1}$ )	0,82
tiempo de latencia (h)	3,52
tiempo de generación (h)	0,84

Fuente: Elaboración propia

A partir de este modelo se obtiene que la velocidad específica de crecimiento máxima es de  $0,82 h^{-1}$ , que el tiempo que dura la fase de latencia es de 3,52 h, y que se requiere de 0,84 h para que se duplique la población de microorganismos a nivel de Erlenmeyer. Un similar comportamiento aunque con valores más bajos se reporta en Gamarra (2016).

### 3.5.2 Cinética de crecimiento del microorganismo *Candida utilis* a nivel de biorreactor de capacidad de 1 L.

Con el propósito de determinar los parámetros cinéticos a nivel de biorreactor de 1 L se sigue el procedimiento explicado en el capítulo 2. Este procedimiento difiere del que se realiza a nivel de Erlenmeyer agitado en la preparación del inóculo. Esta diferencia radica en que a nivel de biorreactor el autor de este trabajo asume el criterio de autores como Doran (2013) y Standbury, *et al.* (2017) de tratar de reducir a un tiempo mínimo la fase de latencia, ya que representa un aumento de los costos de producción debido al incremento del tiempo de fermentación. Para cumplir con este objetivo es necesario que el inóculo crezca en un medio de cultivo igual al medio del biorreactor.

Después que el biorreactor inicia su operación se extraen muestras por duplicado a las que se les determina la masa microbiana y los azúcares reductores presentes.

Con los datos de biomasa se elabora la curva de crecimiento que se muestra en la gráfica de la figura 3.9. Se obtiene mediante la representación del comportamiento del logaritmo de la biomasa con respecto al tiempo.

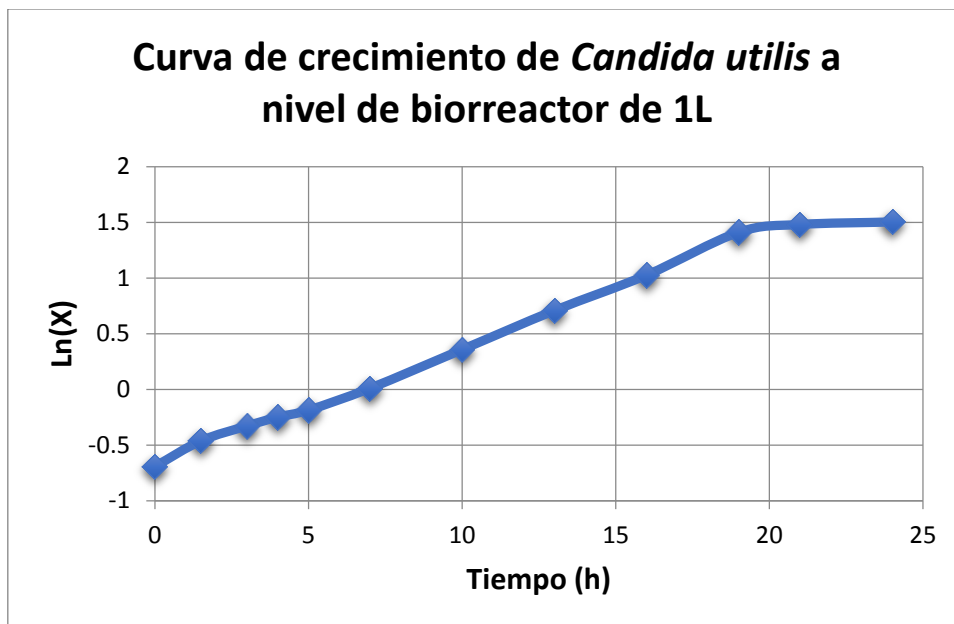


Figura 3.9: Curva de crecimiento de la *Candida utilis* a nivel de biorreactor de 1L. Fuente: Elaboración propia.

Como se puede apreciar en la curva de crecimiento se reduce la duración de la fase de latencia debido a que el inóculo crece en un medio de cultivo igual al medio del biorreactor. La *Candida utilis* comienza su reproducción casi desde el inicio de la fermentación. Además se observan las fases de crecimiento exponencial y la fase estacionaria, la cual se alcanza a partir de casi las 20 h. En este caso el estudio se detiene a las 24 h por detectarse la presencia de la fase estacionaria.

También se grafican conjuntamente la masa microbiana y los azúcares reductores, lo que se aprecia en la gráfica de la figura 3.1. El comportamiento es el mismo que el de nivel de Erlenmeyer. La biomasa se incrementa con el tiempo a la par que se consumen los azúcares reductores. Sin embargo la masa microbiana producida es menor. Se alcanza un valor máximo de 4,5 g/L, lo que representa un 12 % menor que el que se alcanza a nivel de Erlenmeyer agitado.

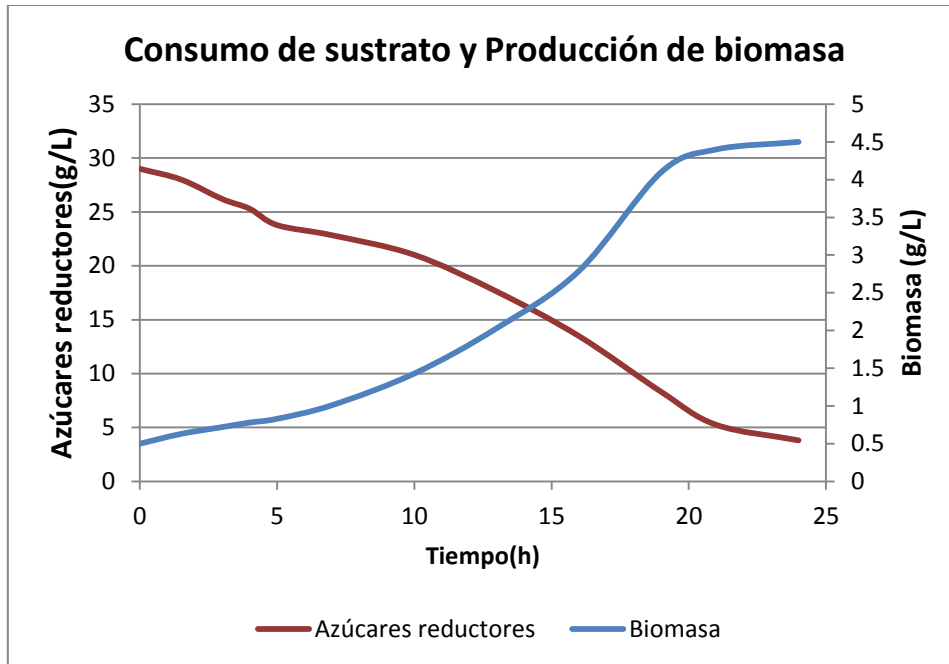


Figura 3.10: Comportamiento del consumo de sustrato y de la producción de biomasa contra el tiempo a nivel de biorreactor de 1L. Fuente: Elaboración propia.

También a nivel de biorreactor se ajusta la curva de crecimiento al modelo de Gompertz. La gráfica del modelo ajustado aparece en la figura 3.11.

Como resultado del ajuste se obtienen los términos  $a= 2,6630$ ;  $b= 1,1438$  y  $c= 0,1255$ . A partir de estos términos se llega a la ecuación 3.3 que representa el modelo con un  $R^2=0,9938$ :

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = 2,6630 \cdot e^{-e^{(1,1438-0,1255 \cdot t)}} \quad (3.3)$$

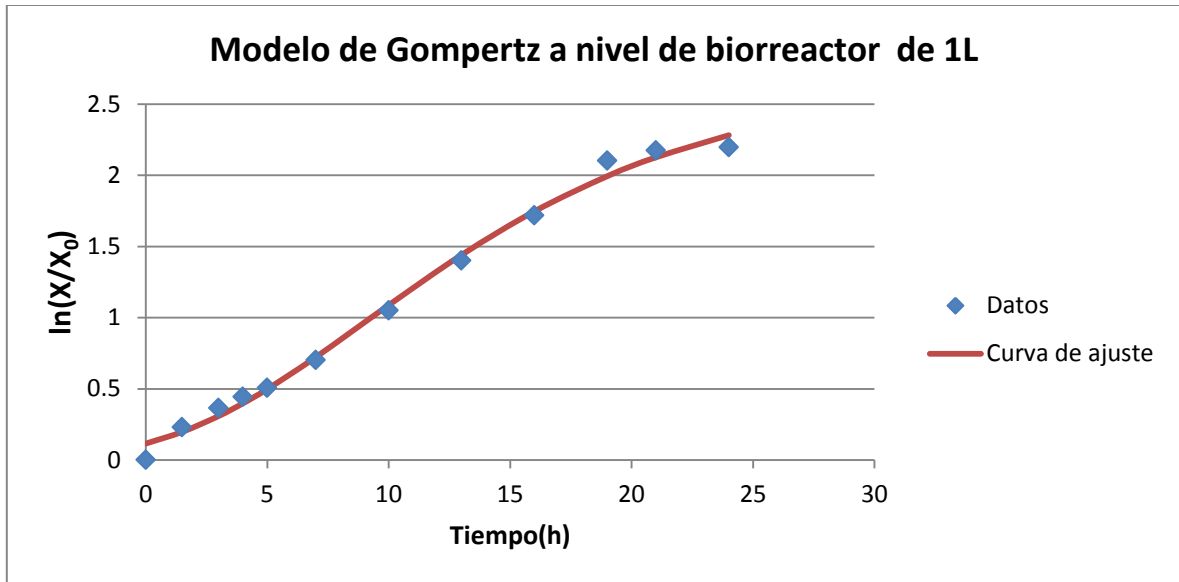


Figura 3.11: Gráfico del modelo de Gompertz obtenido para la cinética de crecimiento a nivel de biorreactor de 1L. Fuente: Elaboración propia

La velocidad específica de crecimiento máxima, tiempo de latencia y el tiempo de generación que son los parámetros del modelo, se calculan a partir de los términos a, b y c con ayuda de las ecuaciones 2.10, 2.11, 2.12. Los resultados se reportan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Parámetros del modelo de Gompertz obtenidos a partir del estudio cinético a nivel de biorreactor.

Parámetro	Valor
Velocidad específica de crecimiento máxima (h <sup>-1</sup> )	0,33
tiempo de latencia (h)	1,15
tiempo de generación (h)	2,07

Fuente: Elaboración Propia

En este caso la velocidad específica de crecimiento máxima es menor al resultado obtenido a escala de Erlenmeyer y el tiempo de generación es mayor. Esto puede deberse al cambio en las condiciones de oxigenación en el biorreactor. Sin embargo, el

tiempo de latencia es menor e igual a 1,15 h, lo que demuestra que se logra reducir la fase de latencia.

### 3.6 Escalado del biorreactor

En los cálculos para el diseño mediante escalado se comienza con la determinación del tiempo de fermentación necesario para alcanzar la biomasa que se obtuvo durante la experimentación en el biorreactor de 1L.

En este caso con la ecuación 2.13, donde se sustituyen los valores de concentración final de biomasa ( $X=4,5$  g/L) y de biomasa inicial ( $X_0=0,5$  g/L),  $\mu_{\max}= 0,33$  h<sup>-1</sup> con lo que se obtiene un tiempo de fermentación igual a 6,66 h.

Mediante la ecuación 2.14 se determina el tiempo total de operación de un ciclo del biorreactor. A partir de un tiempo de latencia de 1,15 h (obtenido con el modelo de Gompertz), un tiempo de fermentación de 6,66 h y un tiempo de operaciones auxiliares de 0,66 h (se considera el 10 % del tiempo de fermentación) se obtiene un valor de 8,47 h.

Con la ecuación 2.15 se halla la productividad volumétrica de biomasa con los valores de concentración final de biomasa ( $X=4,5$  g/L), de biomasa inicial ( $X_0=0,5$  g/L), además del tiempo total calculado. Se obtiene como resultado  $0,472 \frac{g}{L \cdot h}$ .

Con los datos de la biomasa inicial y final ya mencionados, la concentración inicial de sustrato ( $S_0$ ) de 29 g/L , la concentración final de sustrato ( $S$ ) de 3,81 g/L, y con la ecuación 2.16 se determina el rendimiento biomasa-sustrato, el cual tiene un valor de 0,16 g de biomasa/ g de sustrato.

Los parámetros medidos del reactor modelo se reflejan en la tabla 3.6. El tipo de agitador empleado en el modelo es de turbina.



Tabla 3.6: Parámetros del biorreactor modelo

Parámetro	Valor
Diámetro(D)	0,112 m
Diámetro del impelente(D <sub>i</sub> )	0,06 m
Altura efectiva (H)	0,098 m
Velocidad de agitación (N)	402 rpm
Relación $\frac{D_i}{D}$	0,536
Relación $\frac{H}{D}$	0,875

Fuente: Elaboración Propia

Entonces se aplica el criterio de semejanza geométrica a partir de la ecuación 2.17 con el objetivo de determinar la altura y el diámetro del prototipo. Como resultado de esta ecuación se obtiene que la relación  $H/D=0,875$  también para el prototipo y se puede calcular la altura a partir del diámetro. Este se despeja de la ecuación del volumen de un cilindro, con la cual se obtiene  $D=0,663$  m y se requiere de una altura de trabajo de 0,580 m para el prototipo.

Para calcular el diámetro del impelente se emplea la ecuación 2.19 y se obtiene un valor de 0,355 m. Con la ecuación 2.22 se determina el valor de la velocidad de agitación que es de 123 rpm. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.7.

Tabla 3.7: Parámetros obtenidos para el biorreactor prototipo de 200 L

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Diámetro(D)	0,663 m
Diámetro del impelente(D <sub>i</sub> )	0,355 m
Altura efectiva (H)	0,580 m
Velocidad de agitación (N)	123 rpm

Fuente: Elaboración Propia

### **Conclusiones parciales del capítulo**

1. La composición química de los tallos de yuca refleja que contienen de celulosa 33,12 %, de hemicelulosas 37,71 %, de lignina 13,19 %, extractivos 7,87 % y de cenizas 8,11 %.
2. El análisis estadístico demuestra que las variables investigadas tienen incidencia significativa en el crecimiento de la masa microbiana, obteniéndose un óptimo para las condiciones de máxima formación de biomasa.
3. La velocidad específica de crecimiento máxima a nivel de biorreactor es menor al resultado obtenido a escala de Erlenmeyer y el tiempo de generación es mayor.

## Conclusiones

1. Se logra la formación máxima de biomasa mediante la fermentación de los hidrolizados de tallos de yuca en condiciones óptimas, lo que verifica la hipótesis de la investigación.
2. Se obtiene 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.
3. Como criterio fundamental para la aplicación de la técnica de escalado se escoge el del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante, que a nivel de Erlenmeyer es de  $54,14 \text{ h}^{-1}$  y se corresponde en el biorreactor con una velocidad de agitación de 402 rpm ( $6,7 \text{ s}^{-1}$ ) y una aireación de 1vvm (volumen de gas por volumen de líquido por minuto)
4. La determinación de los parámetros cinéticos a nivel de biorreactor resulta en: valor de velocidad específica de crecimiento máxima de  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , tiempo de latencia 1,15 h y un tiempo de generación de 2,07 h.
5. El escalado para un biorreactor de 200 L responde a las dimensiones y condiciones operacionales siguientes: reactor discontinuo, aireación: 1vvm, altura efectiva: 0,580 m, diámetro: 0,663 m, diámetro del impelente: 0,355 m, velocidad de agitación: 123 rpm ( $2,05 \text{ s}^{-1}$ ) y una productividad volumétrica de  $0,472 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ .

## **Recomendaciones**

1. Desarrollar la investigación con otras variedades de yuca que aporten mayor protagonismo en el contenido de almidón para la fermentación.
2. Evaluar la influencia del material lignocelulósico en el proceso de fermentación.
3. Analizar la calidad nutricional del producto obtenido en la fermentación.

## Bibliografía

1. 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.
2. Arteaga, H., Vázquez, V.(2012). Control difuso del oxígeno disuelto, pH y temperatura de un biorreactor columna de burbujas en la producción de biomasa de *Candida utilis*. *Scientia Agropecuaria*, 2, 139 – 148.
3. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management.*, 52, 858–875.
4. Bellido, C. (2013). Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. España. 222 h. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Valladolid.
5. Cajo, L., Nizama, L., Carreño, C.(2011). Efecto de la concentración del inóculo y la melaza como suplemento de la vinaza de destilería para la producción de biomasa de *Candida utilis* nativa. *Scientia Agropecuaria*, 2 ,65 – 72.
6. Carrillo M., Zavala, D., Alvarado, B., Morales, K. y Bautista, P.(2011). Obtención de biomasa a partir de cáscara de café. *Tlatemoani*, 6.
7. Castaño, H., Reales, J. y Zapata, J. (2011). Sacarificación y fermentación simultánea de tallos de yuca. *Dyna*, 180. p. 97-104.
8. Castaño, H., Reales, J. y Zapata, J. (2015). Enzymatic hydrolysis of cassava stalks pretreated with the alkaline method. *Agronomía Colombiana*, 33(2), 238-243.
9. Castro, G., Valbuena, E. y Sanchez, E. (2008). Comparación de Modelos Sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis*. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVIII, 5, 582 - 588.*

10. Chico, H. y Sandoval, D. (2015). Determinación de la concentración de enzimas celulasa y  $\beta$ -glucosidasa para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz. Perú. Trabajo de diploma para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Santa.
11. Cruz, M. (2009). Evaluación técnico-económica de la obtención de etanol a partir de la yuca. Trabajo de diploma para optar por el título de Ingeniera Industrial. Universidad Autónoma de Occidente. Colombia.
12. Dhital, S., Dolan, G., Stokes, J. R., y Gidley, M. J. (2014). Enzymatic hydrolysis of starch in the presence of cereal soluble fibre polysaccharides. *Food and Function*, 5, 579-586.
13. Díaz, M. (2017). Consideraciones sobre la interrelación etanol–Levadura torula en un complejo agroindustrial. *Centro Azúcar*, Vol.44., No. 4., pp.33-43.
14. Doran, P. (2013). *Bioprocess engineering principles*. 2da ed. Reino Unido: Academic Press. 903 p.
15. El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A. y Omar, N. (2012). *Starch and Microbial  $\alpha$ -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications*. Intech 2012.
16. Foyle, T., Jennings, L., y Mulcahy, P. (2007). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, 98, 3026-3036
17. Gamarra, N. (2016). Optimización de la cinética de crecimiento de *Candida utilis* y evaluación de la calidad nutricional de la biomasa deshidratada por ventana refractante. Perú. 126 h. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Microbiología. Universidad de Trujillo.
18. García-Ochoa, F., Gómez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 153–176.
19. Gerena, F. (2013). Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* var. valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Trabajo de diploma para optar

por el título de Ingeniera en Alimentos. Escuela de ciencias básicas tecnología e ingeniería DUITAMA.

20. Gírio, F., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L., Marques, S., y Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* , 101, 4775–4800.
21. González, R. (2000). Principios básicos de escalado. Universidad de Matanzas. Centro de estudios de Combustión y Energía.
22. Han, M., Kim, Y., Kim, Y., Chung, B. y Choi, G. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem, *Korean J. Chem. Eng.* 28, 119-125.
23. Hedman, B., Boström, D., Zhu, W., Örberg, H. y Xiong, S. (2015). Enhancing fuel qualities of cassava crop residues by washing. *Fuel Processing Technology* 139 ,127–134.
24. Hendricks, A., y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* , 100, 10-18.
25. Hensirisak, P. (1997). Scale-up the use of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in aerobic fermentation of baker's yeast. Virginia. 97 h. Tesis en opción al título de Master en Ingeniería de Sistemas Biológicos. Instituto Politécnico de Virginia.
26. Herrera, J. y Pons, J. (2014). Sustratos Proteicos (SUSPROTEL). Aspectos Tecnológicos. Fórum Ciencia y Técnica, Matanzas, Cuba.
27. Isaac, E., González, V., Miño, J., González, E. (2015) Diseño óptimo económico de la etapa de concentración de crema para la obtención de levadura *Torula* en una destilería de etanol. *Centro Azúcar*, Vol 42, No.3, pp. 10-22.
28. Izquierdo, Y. (2011). Levadura *Torula*. Impacto económico de las sales nutrientes en el costo de producción. La Habana. Trabajo de diploma para optar por el título de ingeniero químico. Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”.
29. Katoh, S., Horiuchi, J. y Yoshida, F. (2015). *Biochemical Engineering: A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. 2da ed. Alemania: Wiley-VCH. 327 p.

30. Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J., y Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* , 48, 3713-3729.
31. Leboffe, M y Pierce, B.(2011). *A photographic Atlas of Microbiology Laboratory*. 4ta ed. Estados Unidos: Morton Publishing Company. 266 p.
32. Lezcano, P. (2011). Composición mineral de levadura *Torula (Candida utilis)*, desarrollada a partir de vinaza de destilería., *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Vol. 39, pp. 459-468.
33. Li, X., Deng, Y., Yang Y. y Wei, Z.(2017). Fermentation Process and Metabolic Flux of Ethanol Production from the Detoxified Hydrolyzate of Cassava Residue. *Frontiers in Microbiology*. Vol 8.
34. Liang, G., Liao, Du, G. y Chen, J. (2009). A new strategy to enhance glutathione production by multiple H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology*, 100 , 350–355.
35. Liscano, Y. (2014). Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca. Colombia. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Master en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
36. Liu, S.(2013). *Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*. 1ra ed. Estados Unidos: Elsevier. 990 p.
37. Liu, Y.,Wu J. y Ho, K. (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J*, 27, 331–335.
38. Madigan, T. M, Martinko, J. M, Bender, K. S, Buckley, D. H y Stahl, D.A. (2015). *Biology of microorganisms (BROCK)*. 14 ed.: Prentice Hall Hispanoamericana.
39. Martín, C., Wei, M.,Xiong, S. y Jönsson, L.(2017). Enhancing saccharification of cassava stems by starch hydrolysis prior to pretreatment. *Industrial Crops and Products* 97, 21–31.
40. Martínez, E. (2008). Evaluación de la cinética del proceso de producción microbológica de la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) por medio de la acción metabólica



de la *Candida utilis*. San Salvador. Trabajo de diploma para optar por el título de Licenciado en Química y Farmacia. Universidad del Salvador.

41. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31, 420-428.
42. Montes de Oca, A., Bermúdez, R. y Serrat, M. (2013). Evaluación del boniato tetuanado como sustrato para la obtención de proteína microbiana. *TECNOLOGÍA QUÍMICA*, Vol. XXXIII, No. 3.
43. Mood, S., Hossein, A., Tabatabaei, M., Salehi, G., Hassan, G., Gholami, M. y Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, pp.77–93.
44. Niño, L., Acosta, A. y Gelves, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 69, pp. 317-326.
45. Okafor, N. y Okeke, B. (2018). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2da ed. Estados Unidos: CRC Press. 463 p.
46. Orosco, M. (2015). Proceso de sacarificación de los tallos de yucas residuales para obtener levadura *Torula*. Matanzas. Trabajo de diploma en opción al título de ingeniero químico. Universidad de Matanzas.
47. Otero, M., Almazán, O. (2012). *La Levadura como Base de una Industria*. Editorial Académica Española.
48. Quintero, M., Montoya, O. y Gutiérrez, P. (2010). Purificación y caracterización de una  $\alpha$ -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna*, 77, 162, pp. 3138.
49. Rajesh G., Roshan M. y Shridhar S. (2012). Mass transfer coefficient evaluation for lab scale fermenter using sodium sulphite oxidation method. *Chemical and Process Engineering Research* Vol 2
50. Rajoka, I., Hassan I. y Jabbar, M. (2006). Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*, 97, 1934–1941.

51. Reales, G., Castaño, H. y Zapata, J. (2016). Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca. *Información Tecnológica*, Vol. 27(3), pp. 11-22.
52. Rocha, R. (2006). Evaluación del rendimiento celular de tres especies de levaduras en hidrolizado ácido de cascara de coco para la producción de proteína unicelular. México. Trabajo de diploma para optar por el título de ingeniero biotecnólogo. Instituto tecnológico de Sonora.
53. Rodríguez, B., Canela, A., Mora, L.M., Motta, W.F., y Lezcano, P.(2011). Composición mineral de levadura *Torula (Candida utilis)*, desarrollada a partir de vinaza de destilería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Instituto de Ciencia Animal Cuba, 45, pp. 151-153.
54. Rojas, M.(2012). Estudio de las características fisicoquímicas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y sus efectos en la calidad de hojuelas fritas para su procesamiento en la empresa PRONAL S.A. México. Trabajo de diploma para optar por el título de Tecnólogo Químico. Universidad Tecnológica de Pereira.
55. Rosma, A., Ooi, K.(2006). Production of *Candida utilis* Biomass and Intracellular Protein Content: Effect of Agitation Speed and Aeration Rate. *Malasian Journal of Microbioloy*, Vol 2(2) , 15-18.
56. Sánchez, C.(2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, pp. 185–194.
57. Sanoussi, A., Yéyinou L., Ahissou, H., Koubourath A., Orobiyi, A., Paterne, A., Azokpota, P., Dansi, A., Sanni, A.(2015). Diversity, Physicochemical and Technological Characterization of Elite Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivars of Bantè, a District of Central Benin. *The Scientific World Journal*, Vol. 2015, Article ID 674201, pp. 8.
58. Schwantes, D., Gonçalves, A., Ferreira, G., Campagnolo, M., Cardoso, D., Teixeira, C., Junior, A. y Völz, E.(2016). Chemical Modifications of Cassava Peel as Adsorbent Material for Metals Ions from Wastewater. *Journal of Chemistry*, Vol. 2016, pp. 15.

59. Sharma, A. y Satyanarayana, T.(2013). Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochem*, 2013.
60. Sillanpää, M. y Ncibi, C. (2017). *A Sustainable Bioeconomy: The Green Industrial Revolution*. 1ra ed. Suiza: Springer. 348 p.
61. 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.
62. Sovorawet, B. y Kongkiattikajorn, J. (2012). Bioproduction of Ethanol in SHF and SSF from Cassava Stalks. *KKU Res. J.* , 17(4), 565-572.
63. Standbury, P., Whitaker, A. y Hall, S. (2017). *Principles of fermentation technology*. 3ra ed. Reino Unido: Elsevier.
64. Torres, A., Díaz, M., Saura, G. (2016). Factibilidad económica de alternativas de inversión para reducir el costo de producción de la levadura *Torula*. *Revista Centro Azúcar*, 43, 1, pp. 10-17.
65. Velázquez, A.(2012). Sacarificación y fermentación de la cáscara de tuna para producir bioetanol. México. Trabajo de diploma para optar por el título de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria.
66. Waites, M., Morgan, N., Rockey, J. y Higton, G.(2001). *Industrial Microbiology: An introduction*. 1ra ed. Reino Unido: Blackwell Science Ltd.
67. Wei, M.G., Zhu, W.B., Xie, G.H., Lestander, T.A. y Xiong, S.J., (2015). Cassava stem wastes as potential feedstock for fuel ethanol production: a basic parameter study. *Renew. Energy* 83, 970–978.
68. 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 times. *Energy Fuels* 28, 5086–5094.
69. Xue, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Li, C. y Chen, S.(2015). Test and analysis on the mechanical properties of cassava stalks. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25, 59-67.

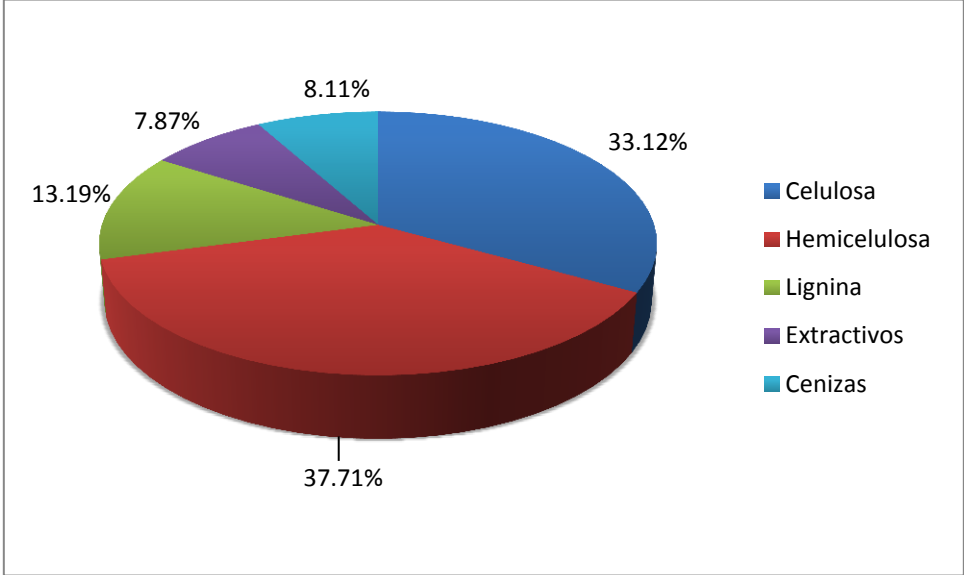
70. Yunus, F., Nadeem, M. y Rashid, F.(2015). Single-cell protein production through microbial conversion of lignocellulosic residue (wheat bran) for animal feed. Institute of Brewing & Distilling. , 2, pp. 20-25.
71. Zhu, B., Lestander, A., Örberg, H., Wei, G., Hedman, B., Ren, J.W., Xie, G.H. y Xiong, S.J. (2015). Cassava stems: a new resource to increase food and fuel production. GCBBioenergy 7, 72–83.

## Anexos

### 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
<b>Matanzas</b>	34,3	6,8	7,7	8,6	11,2
<b>Cárdenas</b>	47,9	17,1	10,6	9,7	10,5
<b>Martí</b>	59,5	11,3	-	28,2	20,0
<b>Colón</b>	68,4	14,8	9,8	19,5	24,3
<b>Perico</b>	108,7	21,5	14,7	29,6	42,9
<b>Jovellanos</b>	171,5	16,6	21,3	78,4	55,2
<b>Pedro Betancourt</b>	51,6	8,7	10,5	16,3	16,1
<b>Limonar</b>	72,0	10,3	-	41,7	20,0
<b>Unión de Reyes</b>	473,0	71,8	31,7	173,4	196,1
<b>Ciénaga de Zapata</b>	11,5	2,7	-	5,8	3,0
<b>Jagüey Grande</b>	127,1	31,7	20,5	23,3	51,6
<b>Calimete</b>	31,6	6,9	3,3	11,8	9,6
<b>Los Arabos</b>	19,3	4,6	1,8	4,9	8,0
<b>Total</b>	1 276,4	224,8	131,9	451,2	468,5

**Anexo 2: Gráfico de la composición química de la materia prima**



Fuente: Elaboración propia

### Anexo 3: Fotos de la fase experimental



**Foto de los experimentos del diseño antes de inocular.**

Fuente: Elaboración propia.



**Foto de los experimentos al final del proceso fermentativo.**

Fuente: Elaboración propia.

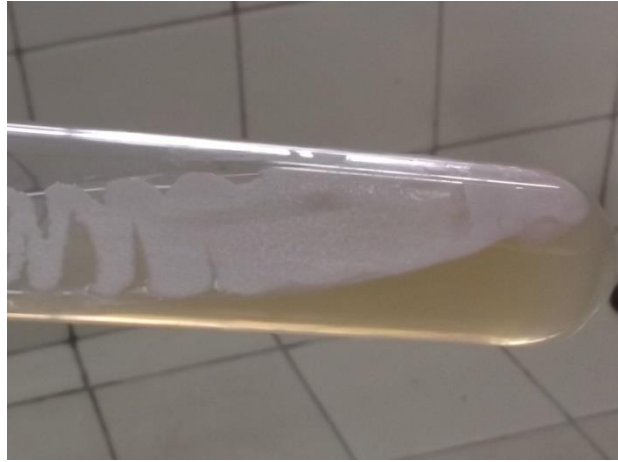


Foto de la *Candida utilis* en cuñas de agar extracto de malta.

Fuente: Elaboración propia.

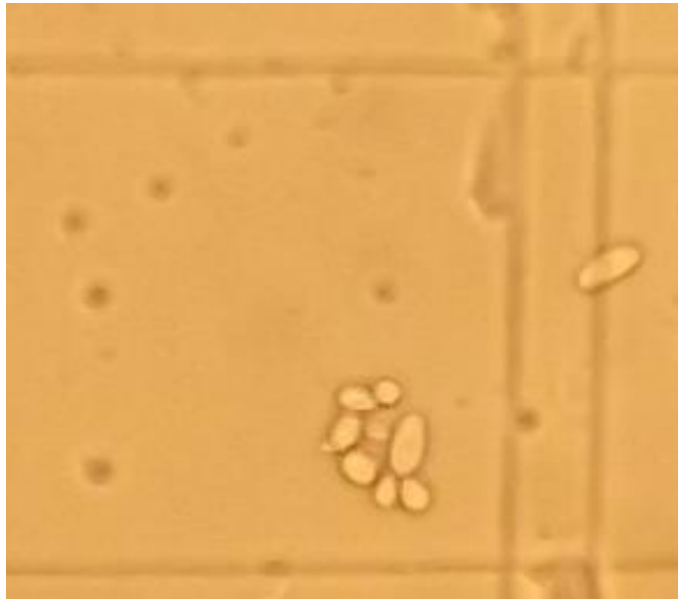


Foto de la levadura *Candida utilis* vista al microscopio. Aumento: 400x

Fuente: Elaboración propia.



#### Anexo 4: Análisis de Varianza del diseño de experimentos

<b>Efecto</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-Fisher</b>	<b>Valor de probabilidad</b>
A:Velocidad Agitación	3,94805	1	3,94805	66,37	0,0000
B:Concentración Inicial	0,00483472	1	0,00483472	0,08	0,7787
AA	4,11682	1	4,11682	69,21	0,0000
AB	2,47975	1	2,47975	41,69	0,0000
BB	38,8367	1	38,8367	652,91	0,0000
Blocks	0,0124389	2	0,00621944	0,10	0,9012
Total error	1,13017	19	0,0594826		
Total corregido	50,5288	26			

**Anexo 5: Gráficos obtenidos durante la prueba del sulfito a diferentes velocidades de agitación en el biorreactor.**

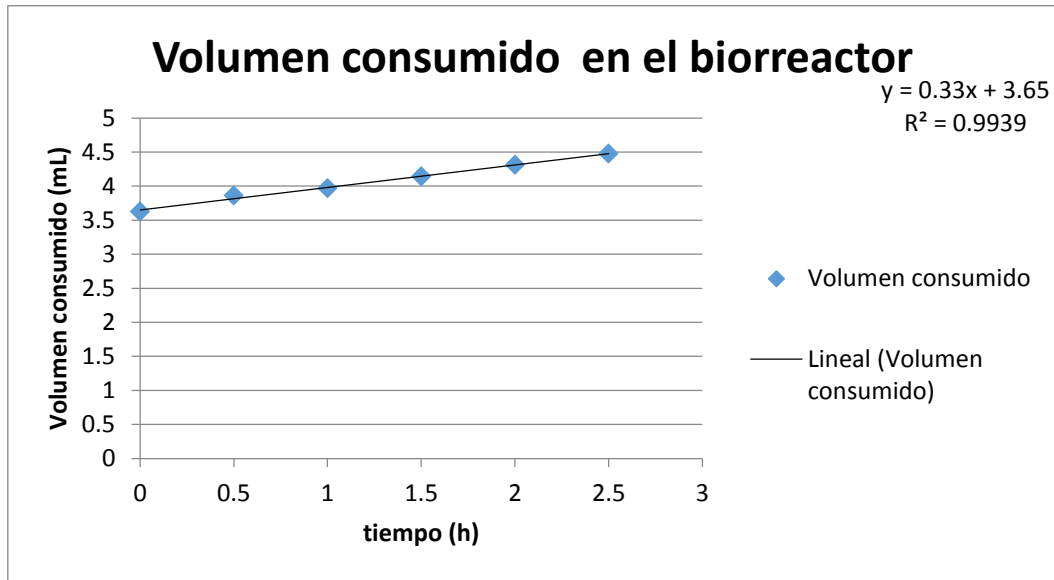


Gráfico de consumo de tiosulfato de sodio contra el tiempo durante la prueba del sulfito de sodio a nivel de biorreactor a una velocidad de 350 rpm.

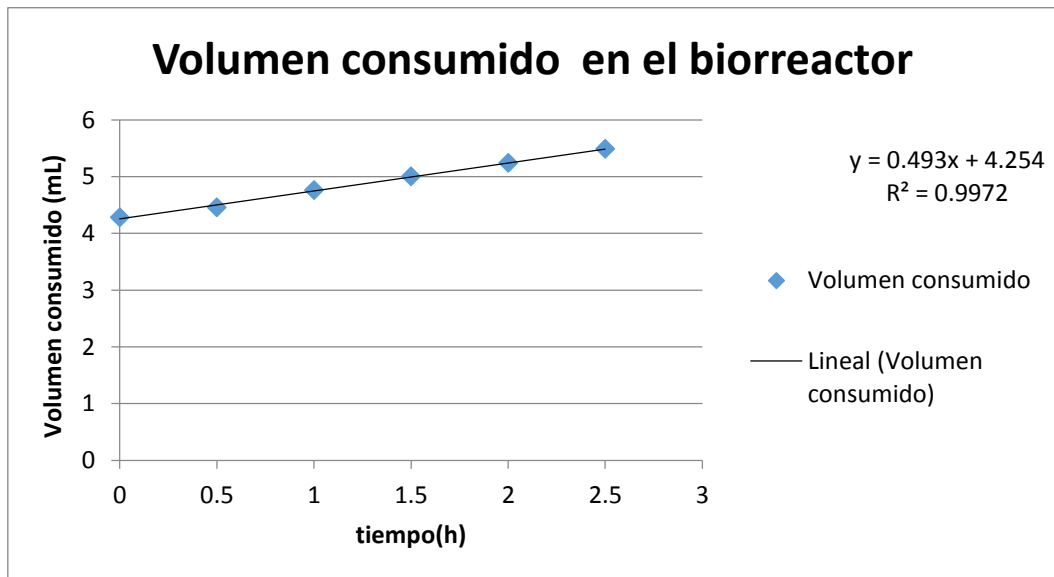


Gráfico de consumo de tiosulfato de sodio contra el tiempo durante la prueba del sulfito de sodio a nivel de biorreactor a una velocidad de 400 rpm.

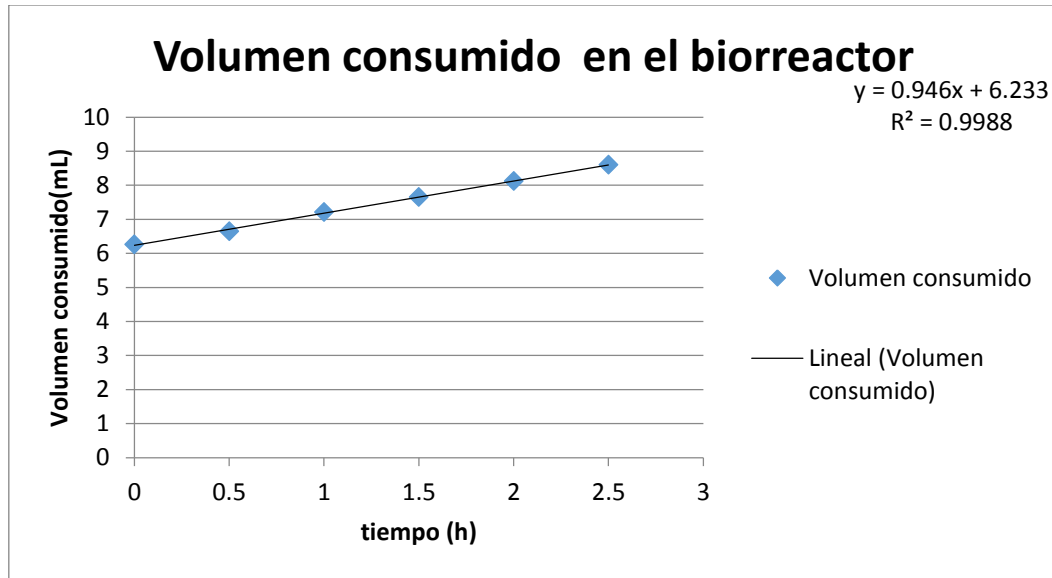


Gráfico de consumo de tiosulfato de sodio contra el tiempo durante la prueba del sulfito de sodio a nivel de biorreactor a una velocidad de 450 rpm.