

CONTRIBUCION DE LA INGENIERIA DE LAS REACCIONES QUIMICAS AL DESARROLLO DE NUEVOS PROCESOS INDUSTRIALES

Compiladores
Erenio González Suárez
Juan Esteban Miño Valdés
Omar Pérez Navarro

**CONTRIBUCION DE LA INGENIERIA DE LAS
REACCIONES QUIMICAS
AL DESARROLLO DE NUEVOS PROCESOS
INDUSTRIALES**

Colección: Ediciones especiales

Coordinación de la edición: Juan Esteban Miño Valdés

Revisión técnica y corrección: Juan Esteban Miño Valdés

Correo electrónico: minio@fio.unam.edu.ar

Cel. 00 - 54 - 9 - 376 - 4683455

Facultad de Ingeniería (FI) / Universidad Nacional de Misiones (UNaM)

Rosas 325 - 3360 Oberá - Misiones - Argentina

Tel.: 00 - 54 - 3755 - 422170

Primera edición: Septiembre de 2019

Miño Valdés, Juan Esteban, González Suárez Erenio, Omar Pérez Navarro.

Contribución de la ingeniería de las reacciones químicas al desarrollo de nuevos procesos industriales.

1a edición - Posadas, Misiones, Argentina.

21x15 cm.

ISBN 978-987-86-2098-5

Ingeniería Química, Desarrollo industrial, Docencia de postgrado.
CDD 660.2

ISBN Nº 978-987-86-2098-5

Diagramación y diseño de tapa: **Gráfica Libertad**

Todos los derechos reservados - Prohibida su reproducción total o parcial, por cualquier método

Queda hecho el depósito que previene la ley 11.723



EDICIONES **gráficalibertad**
servicios & soluciones de calidad

Impreso en **Gráfica Libertad**, Dutra 3369

3300 Posadas, Misiones, Argentina

serviciosimpresiones@hotmail.com

Septiembre de 2019

ACERCA DE LOS AUTORES

Albernas Carvajal Yaiet // Capítulos: 2 y 3

Ingeniera Química y Dra. en Ciencias Técnicas

Profesor titular e Investigador / Dpto.de Ingeniería Química /
Facultad de Química y Farmacia

Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Cuba
(yaietac@uclv.edu.cu)

Corsano Gabriela // Capítulos: 2 y 3

Licenciada en Matemática Aplicada y Doctora en Ingeniería

Investigadora Adjunta / Instituto de Desarrollo y Diseño INGAR
(CONICET-UTN)

Docente / Dpto de Matemáticas / Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina
(gcorsano@santafe-conicet.gov.ar)

de Armas Martínez Ana Celia // Capítulo: 8

Ingeniera Química, Máster en Ingeniería Química y Tesista aspirante
a Doctor

Docente e Investigadora / Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
(anaceliam@uclv.edu.cu)

Fabelo Falcón José A // Capítulo: 7

Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas

Docente e Investigador / Dpto.de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia

Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Cuba
(fabelo@uclv.edu.cu)

García Rodríguez Agustín // Capítulo: 1
Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas
Profesor titular e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química /
Facultad de Química y Farmacia
Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Cuba
(agarcía@uclv.edu.cu)

González Suárez Erenio // Capítulos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8
Ingeniero Químico, Dr. en Ciencias Técnicas y Dr. en Ciencias
PostDr. en Gestión Ambiental y Seguridad Industrial
Profesor Titular y Emérito / Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas,
Santa Clara, Cuba.
Miembro de Mérito de la Academia de Ciencias de Cuba.
Premio Nacional de Ingeniería Química en 2013 de la Asociación de
Química de Cuba.
(erenio@uclv.edu.cu)

Hase Sandra Liliana // Capítulos: 1 y 9
Ingeniera Química, Especialista en Celulosa y Papel, Máster en
Tecnología de los Alimentos
Dra en Tecnología Aplicadas / Profesor titular regular e Investigador
categoría II
Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de Ciencias Exactas Químicas
y Naturales
Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones, Argentina
(sandra.hase2011@gmail.com)

Ley Chong Néstor // Capítulo: 5

Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas

Profesor Titular e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química /
Facultad de Química y Farmacia Universidad Central “Marta Abreu”
de las Villas, Santa Clara, Cuba.

(nestorl@uclv.edu.cu)

Martí Marcelo César A // Capítulo: 7

Ingeniero Químico y Tesista aspirante a Doctor

Investigador / CubaRon S.A. Empresa estatal, Villa Clara, Cuba

(cesar@ron.vc.co.cu)

Mesa Garriga Layanis // Capítulos: 3 y 4

Licenciada en Química y Dra. en Ciencias Técnicas

Docente e Investigadora / Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

(layanismg@yahoo.es)

Miño Valdés Juan Esteban // Capítulos: 1, 4, 5, 8 y 9

Ingeniero Químico, Laboratorista Químico Industrial, Especialista en
Gestión de Producción y Ambiente, Máster en Tecnología de los
Alimentos y Dr en Ciencias Técnicas

PostDr. en Gerencia de ciencia e innovación en la industria química,
en Política Científica I+D+i para el desarrollo local, en Capital
intangibles en la universidad para desarrollar la industria química y en
Gestión del conocimiento para desarrollar la industria química.

Profesor titular regular e Investigador categoría II / Dpto.de Física /
Facultad de Ingeniería.

Universidad Nacional de Misiones, Oberá, Misiones, Argentina.

(minio@fio.unam.edu.ar)

Pedraza Gárciga Julio // Capítulos: 2 y 6
Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas
Profesor Titular e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química /
Facultad de Química y Farmacia Universidad Central “Marta Abreu”
de las Villas, Santa Clara, Cuba.
(juliop@uclv.edu.cu)

Pérez Navarro Omar // Capítulos: 1, 5 y 9
Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas
Docente e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia
Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
(omarpn@uclv.cu)

Rodríguez Rico Iván Leandro // Capítulo: 6
Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas
Docente e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química / Facultad de
Química y Farmacia
Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
(ivanl@uclv.edu.cu)

Rodríguez Padrón Yedier // Capítulo: 7
Ingeniero Químico y Tesista aspirante a Doctor
Investigador / CubaRon S.A. Empresa estatal, Villa Clara, Cuba
(yedier@ron.vc.co.cu)

Salvador Pinos Carmen Amelia // Capítulo: 4
Licenciada en Biología, Máster en Biología y Dra. en Ciencias Técnicas
Docente e Investigadora / Facultad de Medicina
Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador
(pochassalvador@gmail.com)

Santos Herrero Ronaldo // Capítulo: 3
Ingeniero Químico y Dr. en Ciencias Técnicas
Profesor titular e Investigador / Dpto. de Ingeniería Química /
Facultad de Química y Farmacia
Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba
(ronaldo@uclv.edu.ar)

INDICE

Acerca de los Autores	3
Prólogo	13
CAPITULO I	15
Modelación de la cinética fermentativa en la obtención de biomasa proteica a partir de la diversificación azucarera.	
Las potencialidades de la industria fermentativa y la necesidad de la modelación de la cinética de los procesos biotecnológicos.	15
Modelo cinético para la obtención de biomasa proteica.	16
Selección de modelos cinéticos para la fermentación sumergida en la elaboración de biomasa proteica.	16
Procedimiento Analítico.	22
Procedimiento Experimental.	23
Resultados y discusión.	24
Conclusiones.	29
Bibliografía.	30
CAPITULO II	33
Primera aproximación a la cinética de la obtención de etanol mediante sacarificación y fermentación simultánea del bagazo.	
Resumen.	33
Introducción.	33
Materiales y métodos.	36
Materia prima.	36
Pretratamientos.	36
Sacarificación y fermentación simultánea.	37
Diseño de experimentos.	37
Métodos Analíticos.	38
Descripción del modelo SSF.	38
Formulación del modelo cinético de la SSF.	40
Resultados y discusión.	42
Etanol obtenido experimentalmente.	42
Determinación de los parámetros del modelo cinético.	43
Conclusiones.	47
Agradecimientos.	48
Referencias.	48
CAPITULO III:	53
Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado.	

Resumen.....	53
Introducción.....	54
Materiales y métodos.....	56
Modelo cinético pseudo- homogéneo para la reacción de hidrólisis enzimática del bagazo.	57
Resultados experimentales de la hidrólisis enzimática.	60
Obtención de los parámetros del modelo pseudo-homogéneo de Michaelis Menten.	61
Análisis de la constante de Michaelis-Menten obtenida (KM).	65
Conclusiones.	68
Agradecimientos.....	69
Bibliografía.....	69
 CAPÍTULO IV:	 73
Producción local de cocteles enzimáticos celulolíticos empleados en la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar para la obtención de etanol.	
Introducción.	73
Recolección de material lignocelulósico.	74
Obtención de microorganismos productores de celulasas.	74
Identificación de las especies de Hongos y Bacillus Bal 3.	75
Obtención de crudos enzimáticos celulolíticos en el laboratorio.	76
Evaluación de los crudos enzimáticos en el proceso de hidrólisis enzimática en bagazo de caña de azúcar.	77
Planificación experimental del estudio de hidrólisis enzimática.	77
Cinética del crecimiento de bacillus subtilis para la producción de un crudo enzimático con actividad celulolítica en fermentación discontinua.	79
Determinación de los valores inversionistas para la producción de crudos enzimáticos de Bacillus subtilis.	82
Hidrólisis de las mezclas entre crudos enzimáticos nativos y enzimas comerciales.	84
Diseño de box-hunter para mezcla de enzima comercial y crudos enzimáticos de bacteria.	85
Aplicación del método de optimización directa en el análisis económico de evaluación de las mezclas.	86
Cinética enzimática en bagazo de caña de azúcar.	88
Estrategia para el reciclaje de las enzimas.	88
Referencias bibliográficas.	92
 CAPITULO V:	 99
Cinética y distribución de producto en la acetilación básica acuosa de almidón de Manihot esculenta Crantz (Yuca)	
La acetilación como vía de modificación química de almidones.	99

Determinación de la cinética de la acetilación básica acuosa de almidón de yuca. Selección del mecanismo de reacción.	102
Procedimiento Analítico.	104
Procedimiento Experimental.	105
Determinación de la concentración de acetato de almidón con el GS.	107
Resultados del estudio cinético en la acetilación de almidón nativo.	108
Resultados del estudio cinético en la acetilación de almidón pregelatinizado.	115
Conclusiones.	119
Bibliografía.	120
CAPITULO VI:	125
Comportamiento cinético de la reacción de producción de ácido fosfórico.	
Resumen.	125
Introducción.	125
Estudio cinético. Etapa de reacción química. Estudio sobre la influencia de la temperatura y tamaño de partículas en la conversión de P2O5.	126
Influencia de la temperatura en el proceso de reacción.	126
Influencia del tamaño de partículas.	127
Conclusiones.	128
Bibliografía.	128
CAPITULO VII	131
Metodología para la obtención de los modelos cinéticos de reacciones complejas en añejamientos de bebidas espirituosas.	
Resumen.	131
Introducción.	132
Resultados y discusión.	135
Validación de los modelos de reacción.	140
Conclusiones.	142
Referencias.	143
CAPITULO VIII	145
Crecimiento y cultivo de la chlorella sp. empleando vinazas cubanas como medio de cultivo.	
Resumen.	145
Introducción.	145
Resultados.	155
Discusión.	162
Conclusiones.	164
Bibliografía.	164

CAPÍTULO IX	167
Cinética del Cambio de Color en Snacks de Mandioca Fritos por Inmersión.	
Introducción.	167
Materiales y métodos.	168
Modelos cinéticos.	169
Resultados y discusión.	172
Cinética de pérdida de agua.	172
Luminosidad.	173
Parámetro "a".	174
Parámetro "b".	176
Cinética del cambio de color.	177
Conclusiones.	179
Referencias.	180

Prologo

Hoy resulta innegable que el conocimiento, ajuste y manejo de modelos matemáticos es un área del conocimiento necesario para el diseño, control, operación y optimización de los procesos que se dan en los reactores químicos.

Las operaciones que involucran reacciones químicas resultan de un interés prioritario y han recibido una especial atención en la bibliografía especializada razón por la cual este libro presenta una recopilación interesante desde el punto de vista del área de alimentos principalmente porque los modelados previos constituyen el paso inicial y fundamental para el diseño y la operación de cualquier reactor químico.

En este libro se recopilan trabajos experimentales de laboratorio de alta carta curricular, principalmente basados en productos o matrices alimenticias vegetales naturales de importancia para la agroindustria de Latinoamérica y el Caribe tales como derivados de yuca o bagazo de caña de azúcar.

Resultará esta recopilación de trabajos apropiada y útil para estudiantes de postgrado con perfil de ingenieros en el área de Ciencia y Tecnología de Procesos de la Industria Alimentaria entre otras.

Dra.Ing.Quím.Vannesa Graciela Hartwig
Dpto.de Industrias, Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Misiones, Argentina

CAPÍTULO I

MODELACIÓN DE LA CINÉTICA FERMENTATIVA EN LA OBTENCIÓN DE BIOMASA PROTEICA A PARTIR DE LA DIVERSIFICACIÓN AZUCARERA

Omar Pérez Navarro
Juan E. Miño Valdés
Agustín García Rodríguez
Erenio González Suarez
Sandra Liliana Hase

Las potencialidades de la industria fermentativa y la necesidad de la modelación de la cinética de los procesos biotecnológicos.

La industria fermentativa, desarrollada a partir de subproductos del proceso azucarero, es de vital importancia para el desarrollo de los países del sur, principalmente atendiendo a que no demanda elevados requerimientos energéticos y de seguridad tecnológica, ni enormes importaciones de materias primas y equipos. La misma, puede desarrollarse a partir de subproductos azucareros como la miel final, los jugos diluidos intermedios del proceso azucarero, principalmente el jugo de los filtros y el bagazo hidrolizado (*Mesa, 2010*); (*Albernas, 2013*).

Un ejemplo de dichos productos es la biomasa proteica, obtenida en estado sumergido, a partir de un sustrato conformado por jugo de caña, suplementado con miel final y nutrientes. La misma, es inoculada con cepas de levadura autóctonas, aisladas del propio jugo de la caña (*García y col, 2005*). Este material, rico en contenido proteico, es destinado a la alimentación animal, principalmente porcina, con adecuados índices de conversión y rendimiento en los animales (*García y col, 1999*).

Para aplicar adecuados métodos de diseño y escalado de los biorreactores para este proceso se requiere aplicar la modelación

efectiva del comportamiento de estos equipos. El modelo global del biorreactor implica la obtención de los modelos de transferencia de calor y masa, de la hidrodinámica del equipo y muy especialmente del modelo cinético de la población de microorganismos, en las condiciones de cultivo seleccionadas (Flores y col, 2013). Este modelo cinético permite determinar la velocidad de crecimiento celular y la influencia de los factores externos así como la simulación y optimización del funcionamiento del equipo.

Modelo cinético para la obtención de biomasa proteica.

Selección de modelos cinéticos para la fermentación sumergida en la elaboración de biomasa proteica.

La fermentación es un tipo de reacción catalizada enzimática, sustentada en la biosíntesis multi-enzimática de las proteínas como material constituyente de las células microbianas y de las propias enzimas, con saturación del sustrato (*Lehninger, 1988*). La fermentación genera una cantidad de biomasa (X) y de productos asociados al metabolismo (P), a través del consumo de una cantidad de sustrato (S). Entre los factores influyentes en la velocidad de estos procesos se encuentran la acción de las enzimas, el pH, las radiaciones y los efectos de temperatura y presión (*Melo, 2011*).

Las expresiones cinéticas para los procesos fermentativos tienen su base en la cinética de las reacciones con catálisis enzimática. Uno de los modelos más adecuados, para describir la fermentación enzimática es el modelo de Michaelis-Menten. Dicho modelo describe la cinética de la fermentación como un mecanismo de inhibición enzimática no competitiva (*Lehninger, 1988*).

Durante la fase de crecimiento exponencial, los procesos son balanceados y la velocidad de crecimiento específica (μ) es constante e igual a la máxima alcanzada en toda la curva de crecimiento celular

($\mu = \mu_m$). La velocidad específica de crecimiento es referida a la concentración de biomasa, por lo que se define como: $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$

Integrando en la misma, entre un estado fermentativo (i) y su estado inicial ($i-1$), se obtiene la expresión de cálculo de la velocidad específica como: $\mu = \frac{\ln X_i - \ln X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}$

Sobre la base del modelo de Michaelis-Menten se propuso, como modelo primario y más aceptado para la fermentación, el modelo de Monod, definido como:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

Dónde μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento en unidades de tiempo⁻¹ y K_S es la concentración de sustrato limitante del crecimiento, en unidades de concentración de sustrato, para la cual se alcanza ($\mu = \mu_m/2$). En la figura 1 se representa gráficamente el comportamiento de este modelo.

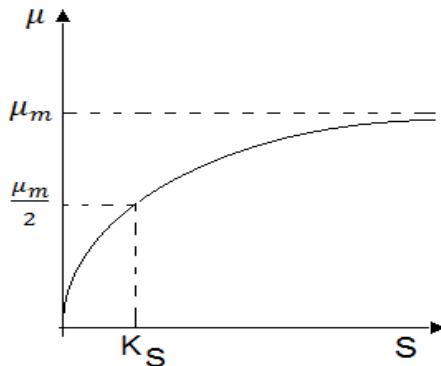


Figura 1. Representación gráfica del modelo de Monod
Linealizando la expresión (1), por el método de Lineweaver-Burk, se obtiene:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (2)$$

Cuya representación linealizada se muestra en la figura 2 y permite determinar los parámetros de Monod: μ_m y K_S .

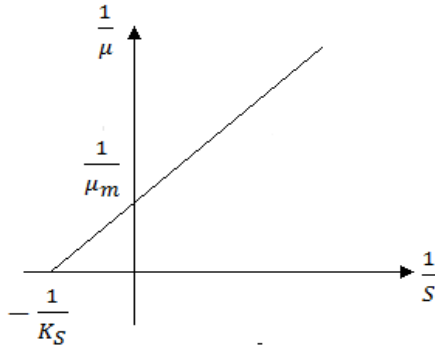


Figura 2. Representación gráfica linealizada del modelo de Monod

Este modelo supone la existencia de condiciones balanceadas para el crecimiento celular y la formación de productos, situación que no siempre es adecuada para describir estos procesos y la respuesta celular ante perturbaciones de diferente índole. Atendiendo a ello, se han propuesto en la literatura científica diferentes variantes de modelos cinéticos fermentativos, considerando la inhibición libre, por sustrato, por producto y combinada.

Cuando la velocidad de crecimiento es alta o predominan los efectos inhibitorios generados por la propia concentración de células, los datos cinéticos se ajustan mejor a modelos que consideran la inhibición libre. En la tabla 1 aparecen los principales modelos de inhibición libre reportados en la literatura.

Tabla 1. Inhibición libre: principales modelos propuestos en la literatura.

Autores	Modelos cinéticos para inhibición libre
Teissier	$\mu = \mu_m \left(1 - e^{-\frac{S}{K}}\right)$
Moser	$\mu = \mu_m \frac{S^n}{K_S + S^n}$
Contois y Fujimoto	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s X + S}$
Powell	$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_s + K_d) + S}$

Fuente: (León, 1999; Ribas, 2006; Trejos y col, 2009)

En el modelo de Teissier, K es la concentración de sustrato a la que se alcanza el 63 % de μ_m . En el modelo de Moser, n es un coeficiente de corrección del modelo de Monod que considera el efecto inhibitorio de las altas concentraciones celulares. En el modelo de Contois y Fujimoto, K_s es la constante de Michaelis aparente que, multiplicada por la concentración celular, conduce a una disminución de la velocidad a medida que aumenta la concentración de biomasa. En el modelo de Powell, K_d es la constante de resistencia difusional.

La inhibición está dada por el efecto de concentraciones inadecuadas de las sustancias que determinan la velocidad de crecimiento, ya sean las que actúan como sustratos o las que producen metabolitos. La elaboración de biomasa proteica es conducida hacia la generación de biomasa, sin embargo es necesario prestar atención a la formación de productos metabólicos, principalmente etanol, a causa de su posible efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Sin embargo, cuando se logra un control adecuado de la fermentación,

es limitado el efecto de la inhibición por producto y combinada. Atendiendo a ello, son importantes los efectos de inhibición por sustrato, producto y su combinación por lo que es necesaria su consideración en el modelo cinético.

Los modelos cinéticos para inhibición por sustrato y producto se han desarrollado modificando las expresiones para la inhibición de las reacciones enzimáticas y consideran constantes de inhibición por sustrato (K_{IS}) y de inhibición por producto (K_{IP} o K'_p).

En la tabla 2 aparecen los principales modelos de inhibición por sustrato y en la tabla 3 los modelos de inhibición por producto.

Tabla 2. Inhibición por sustrato: principales modelos propuestos en la literatura

Autores	Modelos cinéticos para inhibición por sustrato
Andrews	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + \left[\frac{S^2}{K_{IS}} \right]}$
Haldane	$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_S + K_d) \left[1 + \frac{S}{K_{IS}} \right]}$
Webb	$\mu = \mu_m \frac{S \left[1 + \left(\frac{S}{K_{IS}} \right) \right]}{K_S + S + \left[\frac{S^2}{K_{IS}} \right]}$
Yano y colaboradores	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + \left[\frac{S^2}{K_{IS}} \right] \left[1 + \left(\frac{S}{K} \right) \right]}$
Powell	$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_S + K_d) + S}$

Fuente: (León, 1999; Ribas, 2006; Trejos y col, 2009)

Tabla 3. Inhibición por producto: principales modelos propuestos en la literatura

Autores	Modelos cinéticos para inhibición por producto
Dagley y Hinshelwood	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} (1 - K'_P P)$
Aiba y Shoda	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} e^{-K'_P P}$
Yarovenko	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{K_{IP}}{K_{IP} + P}$

Fuente: (Edwards, 1968; León, 1999; Ribas, 2006; Trejos y col, 2009)

El crecimiento celular para procesos discontinuos, en la fase logarítmica y cuando no existe efecto apreciable de la concentración de productos metabólicos, puede expresarse a través del modelo de Malthos como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3)$$

Otras expresiones describen adecuadamente las tres fases del crecimiento celular, se adaptan mejor a la inhibición por producto y se reflejan en la tabla 4. En ellos el factor α permite la evaluación de la fase de curva de crecimiento celular en que se encuentra el cultivo, siendo cero su valor en la fase logarítmica.

Tabla 4. Principales modelos del crecimiento celular propuestos en la literatura.

Autor	Modelos para el crecimiento celular
Verhst	$\frac{dX}{dt} = \mu X [1 - \alpha X]$
Teissier	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - e^{\alpha(X-X_f)} \right]$
Edwards y Wilne	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \left(\frac{X}{X_f} \right) \right]$
Ley Polinomial	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \left(\frac{X}{X_f} \right)^\alpha \right]$

Fuente: (León, 1999; Ribas, 2006; Trejos y col, 2009)

Procedimiento Analítico

Se determinó la expresión de velocidad y la ecuación del crecimiento celular mejor adaptada a datos experimentales de fermentación discontinua para biomasa proteica. Para ello se consideró como expresión del crecimiento celular el modelo de Malthos, reflejado en la ecuación (3) y se ajustaron, el modelo de Monod, reflejado en la ecuación (1), los modelos de inhibición libre de Teissier y Mosser, que aparecen en la tabla 1, el modelo de inhibición por sustrato de Andrews, que aparece en la tabla 2 y el modelo de inhibición por producto de Dagley, que aparece en la tabla 3. Adicionalmente, considerando como expresión del crecimiento celular el modelo de Verhst, que aparece en la tabla 4, se ajustaron los modelos cinéticos de Monod y Teisiser. Finalmente, considerando como expresión del crecimiento celular la Ley Polinomial, que aparece en la tabla 4, se ajustó el modelo cinético de Monod.

Para el ajuste, se aplicó la simulación interactiva de procesos (PSI) usando el método de Hooke y Jeeves en la optimización de los resultados de la integración de las sumas de las diferencias entre los

valores calculados por el modelo y los datos experimentales. El procedimiento minimiza la integral del error, definida como:

$$Int_e = \int_0^{X_f} (X - X_{exp})^2 dt \quad (4)$$

La solución de las ecuaciones diferenciales se efectuó mediante integración numérica de Runge - Kutta de cuarto orden a paso fijo.

Procedimiento Experimental

Se efectuaron experiencias cinéticas a escala de laboratorio con la finalidad de determinar el comportamiento dinámico de X, S y P a valores fijos de pH y temperatura, durante el crecimiento celular de biomasa proteica en cultivo discontinuo.

Se utilizó un sustrato formado por jugo de caña suplementado con miel final y un inóculo de una cepa de levadura autóctona del jugo de caña, previamente aislada de él. Los parámetros de la fermentación considerados fueron 45 y 62 g/L de concentración inicial de sustrato (S_0) como azúcares reductores totales (ART), con relación de ART Jugo/Miel final de 80/20 % a aireación de 1 $L_{aire}/L_{medio} \cdot min.$, con regulación de temperatura a 36 °C. Como nutrientes se añadió 1,27 g/L de fosfato de amonio y 2,36 g/L de urea. Se comprobó que el pH se mantiene entre 4,4 y 5,2 en dichas condiciones.

La concentración celular, de sustrato y de producto (etanol) se determinó cada una hora durante 10 horas de fermentación discontinua. La concentración celular se determinó por cuantificación del peso seco de material celular proveniente de centrifugación de volúmenes conocidos de cultivo. La concentración de producto se determinó como % volumen de etanol. La concentración de ART se determinó por el método Eynon-Lane modificado por el Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar.

Los datos experimentales se ajustaron, para facilidad de la simulación, a través de modelos estadísticos polinomiales del promedio de dos experiencias, a cada concentración de ART.

Resultados y discusión

Los resultados del comportamiento dinámico experimental y el ajuste de los datos a un polinomio de alto orden se muestran en la figura 3, para $S_0=45$ g/L y en la figura 4, para $S_0=62$ g/L.

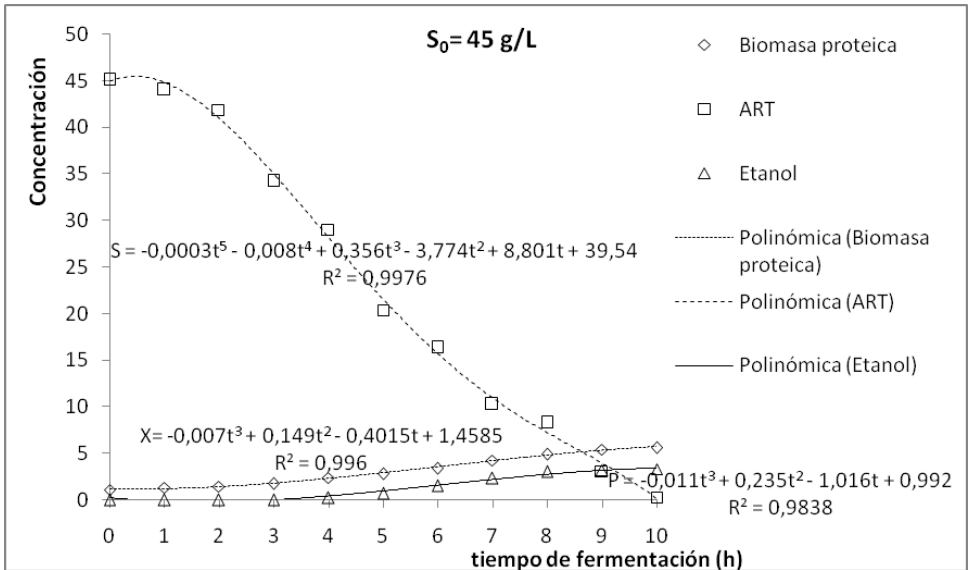


Figura 3. Comportamiento dinámico experimental para biomasa proteica, ART y etanol a $S_0=45$ g/L de ART

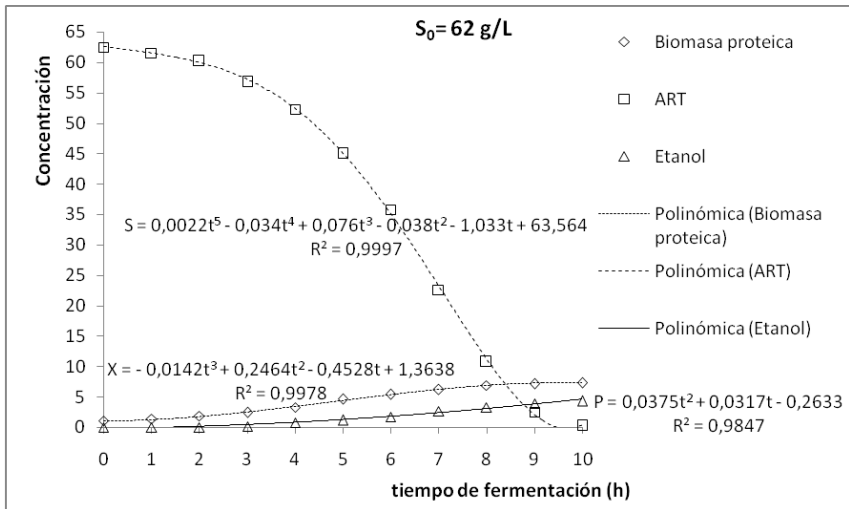


Figura 4. Comportamiento dinámico experimental para biomasa proteica, ART y etanol a $S_0 = 62 \text{ g/L}$ de ART

Se aprecia un ajuste adecuado para los tres parámetros, a ambas concentraciones iniciales de ART logrando, en todos los casos, valores de coeficiente de regresión (R^2) por encima del 98 %. Se observa que en condiciones controladas es limitada la formación de etanol y que el punto de cultivo, donde se igualan la concentración celular y la concentración de sustrato, se alcanza por encima de las 8 horas en ambos casos.

Con dichos resultados se determinaron los parámetros del modelo linealizado de Monod a partir de la ecuación (2) y el procedimiento mostrado en la figura 2. Se obtuvo que a $S_0 = 45 \text{ g/L}$, $\mu_m = 0,18 \text{ h}^{-1}$ con $K_s = 4,1 \text{ g/L}$ y coeficiente de regresión $R^2 = 0,92$; mientras que a $S_0 = 62 \text{ g/L}$, $\mu_m = 0,29 \text{ h}^{-1}$ con $K_s = 10,4 \text{ g/L}$, alcanzando $R^2 = 0,89$. Los coeficientes de regresión indican que el modelo no logra describir con total precisión la dinámica de producción de biomasa proteica por lo que se requiere la consideración de modelos más específicos.

Los resultados de la simulación para los modelos de Monod y Teissier, con crecimiento celular de Maltos, aparecen en la figura 5 para $S_0=45$ g/L y en la figura 6 para $S_0=62$ g/L.

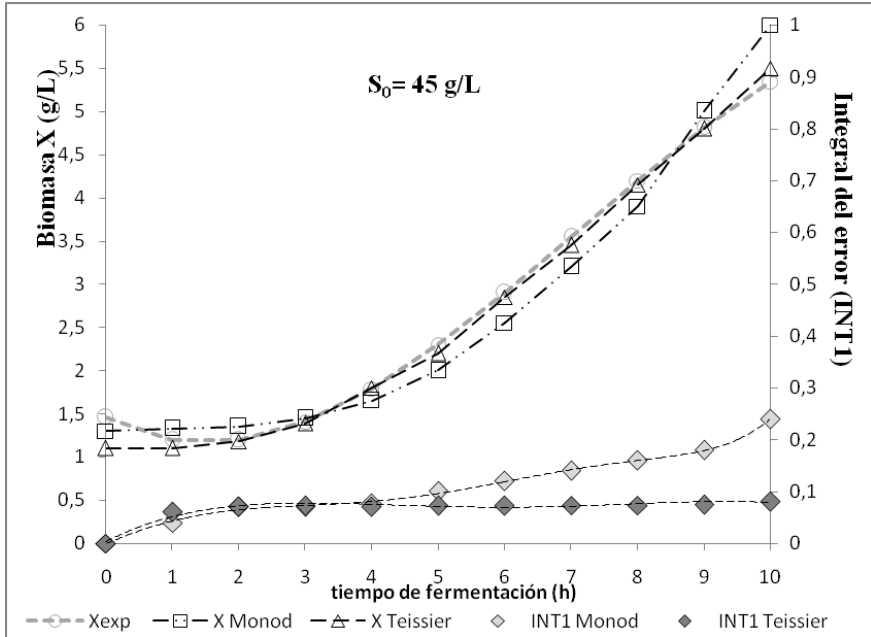


Figura 5. Resultados de la simulación a $S_0= 45$ g/L para los modelos de Monod y Teissier con expresión del crecimiento celular de Maltos.

Los resultados de la simulación interactiva con criterio de mínimo valor de la integral del error, definida en la ecuación (4), muestran que el modelo de Monod, con expresión de Maltos para el crecimiento celular, se ajusta aceptablemente a los valores experimentales, en la primera parte de la fase logarítmica, pero presenta limitaciones en la etapa de adaptación y en la última parte de la fase logarítmica.

De los modelos de inhibición libre, el mejor ajuste se logra con el modelo de Teissier, también considerando crecimiento celular por el

modelo de Malthos. El modelo de Teissier logra mejor ajuste que el modelo de Monod y alcanza los menores valores de INT1 entre los modelos considerados, aunque también presenta una ligera dificultad en la zona de adaptación. El modelo de Moser no mejora el modelo de Monod, con resultados de INT1 por encima de Teissier y cercanía del valor de n a la unidad.

En la tabla 5 se resumen los parámetros y resultados del ajuste a los datos experimentales a ambas S_0 . Se aprecia que los parámetros de Monod, μ_m y K_s , para todas las expresiones del crecimiento celular consideradas, presentan ligeras diferencias con los obtenidos por linealización. Ello es debido a las deficiencias de ajuste de los datos de producción de biomasa proteica al modelo de Monod, antes referidos y que sugieren el uso preferente del modelo de inhibición libre de Teissier para describir la cinética de este proceso.

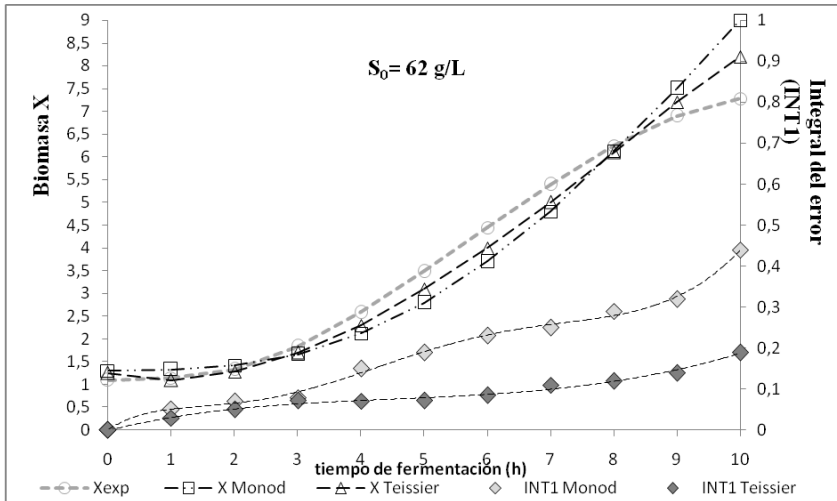


Figura 6. Resultados de la simulación a $S_0=62$ g/L para modelos de Monod y Teissier con la expresión del crecimiento celular de Malthos

El modelo de Andrews no mejora INT1 respecto a Teissier, mientras que el orden del valor de K_s indica la poca influencia de la inhibición

por sustrato. Ello es debido a que se consideraron experimentalmente concentraciones que ya habían sido seleccionadas como adecuadas para este proceso en trabajos previos.

Tabla 5: Parámetros de los modelos considerados y efectividad de la simulación a las concentraciones iniciales de ART consideradas.

Crecimiento celular	Modelo cinético	Parámetro	S ₀ = 45 (g/L)	INT 1	S ₀ = 62 (g/L)	INT 1	
Malthos	Monod	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,25		
		K _S (g/L)	2,46	0,24	9,26	0,44	
	Teissier	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,25		
		K (g/L)	11,21	0,08	23,2	0,19	
	Moser	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,26		
		K _S (g/L)	2,57	0,21	11,53	0,46	
		n	0,98		0,99		
	Andrews	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,25		
		K _S (g/L)	2,62	0,1	9,27	0,44	
		K _{IS} (g/L)	-3,4·10 ⁻⁴		-1·10 ⁻⁴		
	Dagley	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,25		
		K _S (g/L)	11	0,09	23	0,23	
		K' _P	4,3·10 ⁻³		7,7·10 ⁻⁴		
	Verhlist	Monod	μ_m (h ⁻¹)	0,22		0,25	
			K _S (g/L)	3,6	0,24	9,26	0,43
a			1,2·10 ⁻³		5,3·10 ⁻⁴		
Teissier		μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,26		
		K (g/L)	10,98	0,11	24,3	0,25	
		a	1,1·10 ⁻³		8,9·10 ⁻⁴		
Ley Polinomial	Monod	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,26		
		K _S (g/L)	1,18	0,06	9,16	0,22	
		a	14,5		17,2		
	Teissier	μ_m (h ⁻¹)	0,21		0,25		
		K (g/L)	10,73	0,05	22,1	0,23	
		a	73,33		98,2		

El modelo de inhibición por producto de Dagley muestra buen ajuste, pero muy pequeños valores de las constantes de inhibición por producto K'_p . Respecto a las expresiones del crecimiento celular, el modelo de Malthos alcanza resultados similares que los modelos de solución más compleja, como Verhlt y Ley Polinomial, ello se debe a que no existen mecanismos importantes de inhibición en este proceso y la fase logarítmica predomina en las condiciones estudiadas.

Conclusiones

Atendiendo a los resultados alcanzados, la cinética fermentativa en la obtención de biomasa proteica a partir de un sustrato conformado por jugo de caña suplementado con miel final y nutrientes, cuando se utilizan microorganismos autóctonos del medio, se describe adecuadamente a través de un modelo de Teissier, para la velocidad específica de crecimiento y un modelo de Malthos del crecimiento celular, resultando el mismo en: $\frac{dX}{dt} = \left[\mu_m \left(1 - e^{-\frac{S}{K}} \right) \right] X$

Los parámetros del modelo de Teissier en las concentraciones iniciales de ART consideradas son los siguientes:

Para $S_0 = 45 \text{ g/L}$ $\mu_m = 0,21 \text{ h}^{-1}$, con $K = 11,21 \text{ g/L}$

Por lo que: $\mu = 0,21 \left(1 - e^{-\frac{S}{11,21}} \right)$ y $\frac{dX}{dt} = \left[0,21 \left(1 - e^{-\frac{S}{11,21}} \right) \right] X$

Para $S_0 = 62 \text{ g/L}$ $\mu_m = 0,25 \text{ h}^{-1}$, con $K = 23,2 \text{ g/L}$

Por lo que: $\mu = 0,25 \left(1 - e^{-\frac{S}{23,2}} \right)$ y $\frac{dX}{dt} = \left[0,25 \left(1 - e^{-\frac{S}{23,2}} \right) \right] X$

En las condiciones anteriores no actúan, de forma apreciable, los efectos de inhibición del crecimiento celular por sustrato, productos del metabolismo o su combinación. Las expresiones del crecimiento celular, diferentes a la de Malthus, generarían mayor complejidad de solución de las ecuaciones diferenciales, sin lograr mejoras significativas en el ajuste de los modelos.

Bibliografía

- Albernas, Y. (2013) *"Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar"*. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara.
- Mesa, L. (2010) *"Estrategia investigativa para la tecnología de obtención de etanol y coproductos del bagazo de la caña de azúcar"*. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara.
- Lehninger, H. L. Bioquímica. La Habana. Ed.Revolucionaria.Tomo I.1988.192-222.
- García R., A.; Herrera C., N.; Marín C., A.; Gómez R.,L. (2005) "Tecnología simplificada de producción de biomasa proteica". Centro Azúcar 32(1), p.p 57-61.
- García R., A.; Herrera C., N.; Marín C., A.; Días, R, I. (1999) "Producción de biomasa proteica a partir de jugo de caña". Respuestas. UFPS, p.p 32-34.Internet. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/5555275.pdf>
- Flores H., A., M.; Flores M. , M.; Reyes R. ,J.; Astorga Z., C.M. Diseño y modelado de un bioreactor tipo batch y continuo para aplicaciones de control automático. Congreso Nacional de Control Automático 2013. Ensenada, Baja California, Mexico, Octubre 16-18, 2013. Internet. Disponible en :

https://www.researchgate.net/publication/277312156_Disenio_y_modelado_de_un_bioreactor_tipo_batch_y_contínuo_para_aplicaciones_de_control_automático

Melo V, L. A. (2011). Dinámica de un Biorreactor con Modelo de Crecimiento de Bacterias Lineal por Tramos. Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias — Matemática Aplicada. Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Departamento Matemáticas y Estadística. Manizales, Colombia. Internet. Disponible en:

<http://bdigital.unal.edu.co/4753/1/8308507.2011.pdf>

León, M., A. (1999). Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano. MEMORIA para optar al GRADO de DOCTOR. Madrid. Internet. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/3549/1/T23512.pdf>

Trejos, V. M.; Fontalvo, A. J.; Gómez G., M. A (2009). "DESCRIPCIÓN MATEMÁTICA Y ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE PROCESOS FERMENTATIVOS" DYNA, Vol76, N°158, p.111-121.

Ribas, M.; Hurtado, R. ; N. Díaz de los Ríos, M. Doménech, F. Sabadí, R; García, T. Rodríguez, D. 2006" Modelación matemática y simulación de procesos fermentativos" Ingeniería química N°. 438 ,págs. 118-125

CAPITULO II

PRIMERA APROXIMACIÓN A LA CINÉTICA DE LA OBTENCIÓN DE ETANOL MEDIANTE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA DEL BAGAZO

Yaillet Albernas-Carvajal
Julio Pedraza Gárciga
Gabriela Corsano
Erenio González Suárez

RESUMEN

El incremento de la disponibilidad de residuos y los costos energéticos han incentivado la descomposición de la biomasa lignocelulósica en azúcares y estas a combustible. Un empleo efectivo de los residuales azucarados puede ser la conversión por hidrólisis enzimática de los residuos en azúcares simples y la fermentación de estos azúcares para obtener etanol. El etanol para combustible puede ser obtenido mediante el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF). En el presente trabajo se analiza el modelo matemático desarrollado por Phillippidis et al. (1992) empleando los datos experimentales obtenidos por Albernas-Carvajal et al. (2014). Para la solución del sistema de ecuaciones diferenciales obtenido se empleó el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF). El valor del etanol obtenido experimentalmente y determinado por método cromatográfico es similar al valor del etanol obtenido por el algoritmo matemático de (RKF).

Palabras clave: Sacarificación y fermentación simultánea; cinética; bagazo; etanol.

INTRODUCCIÓN

Durante el siglo pasado la generación y emisión de dióxido de carbono se incrementó exponencialmente debido a las demandas de combustibles fósiles (Kádár et al. 2004), por lo que el etanol es uno

de los combustibles alternativos como sustituto de los combustibles fósiles (Magesh et al.,2011; Nguyen et al. 2014). El alcohol etílico es efectivo en las máquinas de combustión interna y su quemado es relativamente limpio, especialmente cuando las cantidades de gasolina con las que se mezclan disminuyen. Además las emisiones tóxicas al aire son menores para el etanol que para la gasolina tal como lo afirma Lynd (1996).

Uno de los materiales lignocelulósicos a ser considerados en los países tropicales es el bagazo de caña de azúcar (SCB), residuo fibroso obtenido después de la extracción del jugo de la caña (*Saccharum officinarum*) en el proceso de producción de azúcar (Pandey et al. 2000). El bagazo es un paradigma por su bajo costo y abundancia, además de no competir con alimentos (Mesa et al., 2011; Albernas-Carvajal, 2013). De acuerdo con Hofsetz & Silva (2012), y Dantas et al. (2013) por cada tonelada de caña de azúcar se obtienen aproximadamente de 0,27 a 0,3 toneladas de bagazo (Albernas-Carvajal et al. 2014 a); una porción de ese bagazo es quemada en las calderas de vapor, pero queda un excedente que puede ser empleado en la obtención del etanol de segunda generación (Mesa et al. 2011a).

El bagazo de caña de azúcar de manera general tiene una composición aproximada de 50 % de celulosa, 25 % de hemicelulosa y 25 % de lignina (Haagensen & Ahring, 2002). A pesar de ser rica en carbohidratos (celulosa, hemicelulosa), la biomasa lignocelulósica es un sustrato insoluble con una estructura compleja, por lo que se necesita lograr una eficiente conversión de la celulosa en azúcares fermentables para luego obtener el etanol. La lignina forma una barrera protectora alrededor de la celulosa y la hemicelulosa, protegiendo los polisacáridos de la degradación enzimática. Para la conversión de la biomasa en etanol, la celulosa debe estar disponible a la acción de las enzimas. La conversión a etanol a partir de biomasa

lignocelulósica incluye dos procesos: la hidrólisis de la celulosa a celobiosa y otros productos solubles por la acción de enzimas exoglucanasas y endoglucanasas presentes en la preparación de la celulosa, conversión de la celobiosa a glucosa por la acción de la enzima β -glucosidasa y conversión de la glucosa a etanol por fermentación empleando levaduras (Lynd et al. 2001). El proceso de hidrólisis enzimática puede ser combinado con el de fermentación microbiana en una sola unidad llevando a cabo el llamado el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) (South et al. 1993).

La SSF es un proceso de bioconversión incluyendo la hidrólisis de los polisacáridos en monosacáridos en presencia de organismos fermentativos que consumen los azúcares simples (Takagi *et al.* 1976; Philippidis *et al.* 1992; Sasikumar & Viruthagiri, 2010). Comparado con la sacarificación y fermentación secuencial, la SSF reduce la inhibición por producto de la enzima hidrolítica mientras reduce la inhibición por sustrato de los organismos fermentativos. Junto con la cinética enzimática y parámetros de crecimiento microbiano que son intrínsecos de las enzimas y microorganismos en el proceso de SSF, la carga inicial de polisacáridos, la concentración inicial de enzimas y de inóculo microbiano gobiernan la dinámica de los procesos batch de SSF (Raman & Anex, 2012). Investigaciones han demostrado que la sacarificación simultánea de la celulosa a glucosa y fermentación de la glucosa a etanol mejoran la cinética (Takagi *et al.* 1977) así como la economía de la conversión de biomasa por productos de la inhibición enzimática en la hidrólisis, minimización de los riesgos de contaminación por la presencia de etanol y reducción de los requerimientos de capital invertido (Wright *et al.* 1988). El objetivo del presente trabajo es identificar y analizar los pasos del proceso de SSF aplicado a la conversión del bagazo de caña de azúcar y demostrar que el modelo cinético desarrollado por Philippidis *et al.* (1992) puede ser empleado para el estudio

aproximado y simulación adecuada del proceso de SSF empleando bagazo de caña de azúcar pretratado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de la SSF para la determinación del mejor experimento en la obtención de etanol se realizó empleando los siguientes materiales y métodos:

Materia prima

Bagazo de caña de azúcar (60 % w/w humedad) recogido de una fábrica de azúcar cubana. La composición de este bagazo en términos de sus principales componentes en % peso base seca es: glucosa 44,94±0,23%; xilosa, 28,24±0,6%; lignina, 18,93±0,19%; extractivos, 5,6±0,12%; cenizas, 2,29±0,09% (valores promedios de tres réplicas) (Albernas-Carvajal, 2013). Esta composición es similar a la reportada por Sasikumar & Viruthagiri (2010).

Pretratamientos

El bagazo de caña de azúcar fue pretratado en dos etapas, la primera incluye cualquiera de los dos propósitos, producción de furfural o de xilosa. Para la producción de furfural las condiciones operacionales son temperatura (175°C), tiempo (40 min), relación sólido líquido (1:1 w/v) base fibra seca, y concentración de SO₄H₂ (1% w/v) base fibra seca (Morales et al. 2010).

Para la producción de xilosa las condiciones son: temperatura 120 °C, tiempo 40 min, relación sólido líquido (1:4 w/v), concentración de SO₄H₂ (1 % w/v) base fibra seca y 24 horas de impregnación antes del pretratamiento.

Esta etapa fue desarrollada en un reactor semipiloto inyectado con vapor directo (Mesa et al. 2011). El segundo pretratamiento va dirigido a la separación de la lignina por organosolvólisis con etanol.

Las condiciones de operacionales fueron: temperatura 185 °C, tiempo 60 min, concentración de etanol 30 (% v/v), relación sólido líquido (1:7 w/v) y concentración de NaOH 3 (% w/w) basado en fibra seca (Mesa et al. 2010). Esta segunda etapa se llevó a cabo en un reactor Parr de 1 L.

Posteriormente al pretratamiento el sólido residual es separado del hidrolizado, lavado con agua y almacenado a 4°C antes de las determinaciones analíticas y los experimentos de sacarificación y fermentación simultánea (Albernas-Carvajal et al. 2014).

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

El sólido producto de los pretratamientos previos, lavado, es sometido al proceso SSF. Para el proceso de SSF se emplea la mezcla de enzimas compuestas por el complejo celulolítico Cellic[®] CTec2 y β -glucosidasa (NS50010),

proporcionada por Novozymes A/S (Dinamarca), que ha sido profundamente estudiada de acuerdo con Bansal et al. (2009). La fermentación se lleva a cabo por la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* No. 1701 (Colección del cultivo DER CIEMAT, España). Las corridas de SSF fueron llevadas a cabo en frascos Erlenmeyer de 100 mL, cada uno contiene 25 mL de medio en 0,05 M tampón citrato de sodio a pH 4,8 a 30-35 °C en zaranda rotatoria (Certomat-R, B-Braun, Alemania) a 150 rpm por 50 h con 10 o 15 % (w/v) en dependencia del diseño experimental. El límite superior fue escogido tan alto como era posible para lograr una solución de glucosa concentrada manteniendo el medio bien mezclado.

Diseño de experimentos

Los experimentos de SSF fueron desarrollados empleando un diseño factorial completo 2^3 , se desarrollaron 8 experimentos. Los niveles de las variables seleccionados fueron basados en los reportes de

Mesa et al. (2010); (2011). Las variables y sus niveles fueron: X1, temperatura (°C) con nivel bajo de 30 y nivel alto de 35; X2, carga enzimática (Unidades de papel de filtro UPF/g materia seca), los niveles son 10 y 20 y X3, concentración de sólidos, (% w/v), variando entre 10 y 15. Todos los experimentos se desarrollaron en duplicado.

Métodos Analíticos

La composición química de los materiales pretratados se determinó acorde con los métodos NREL (NREL, 2004). La concentración de etanol fue determinada en un cromatógrafo de gases 7890A, Agilent, con inyector split/splitless, detector de ionización por llama, acoplado a él, un generador de hidrógeno H2PEM-100 AWF 100, Parker. Se emplea una columna DB-ALC2, J & W Scientific de 30 cm de longitud, 0,32 mm de diámetro interior, y 1,20 µm de capa interior.

Detector de ionización por llama, gas portador: hidrógeno a 3 mL/min, gases en el detector de ionización por llama: Hidrógeno, 30 mL/min; Aire, 400 mL/min. Temperatura del inyector 210°C y temperatura del detector 240°C.

Descripción del modelo SSF

De acuerdo con Philippidis et al. (1992), la cinética SSF depende de cuatro factores fundamentales:

1. Calidad y concentración del sustrato celulósico.
2. Calidad y concentración del sistema enzimático celulasa y β-glucosidasa
3. Modo de interacción entre el sustrato y la enzima
4. Modo de interacción entre la enzima y el organismo fermentativo

El mecanismo cinético de la SSF se presenta en la figura 1.

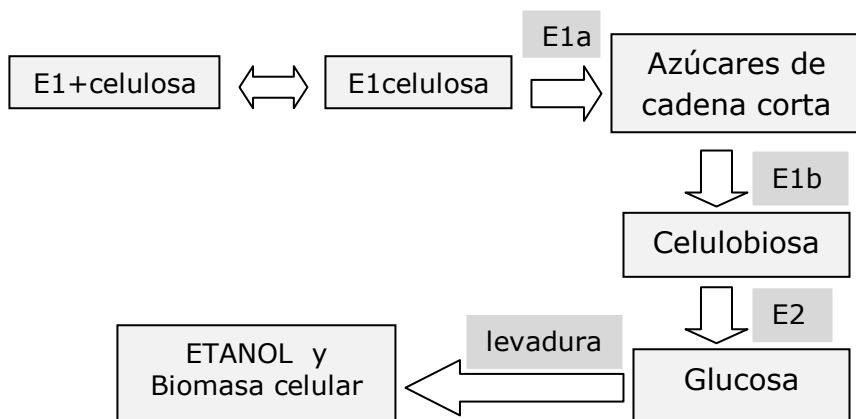


Figura 1. Representación del mecanismo cinético de la SSF.

E1: Celulasa; E1a: endoglucanasa; E1b: exoglucanasa; E2: β -glucosidasa. **Fuente:** Philippidis et al., (1992).

Para facilitar el desarrollo del modelo y la estimación de los parámetros se asume que: la celulasa (E1), consiste solo en endoglucanasa y exoglucanasa, se absorbe hacia el sustrato sólido lignocelulósico y se adhiere la celulosa [C] a las cadenas de polisacáridos a través de la acción de la endoglucanasa (E1a); simultáneamente, se desarrolla la hidrólisis de esas cadenas hacia la celobiosa [B] por la exoglucanasa (E1b). Sin embargo debido a que la concentración de las macromoléculas intermedias insolubles no puede ser determinada experimentalmente, el esquema de reacción se simplifica más allá a la conversión directa de la celulosa a celobiosa.

La celobiosa se difunde en la fase acuosa, donde la β -glucosidasa (E2) cataliza esta hidrólisis hacia la glucosa [G], que es fuente de energía y carbono y conduce hacia la producción del etanol [E], como producto metabólico principal, y la biomasa celular [X]. El modelo también considera que:

1. La celulosa consiste en endoglucanasa y exoglucanasa, pero no se hace distinción entre ellas, ya que no se distinguen las actividades de los dos componentes de la celulosa durante la SSF.
2. La celulosa y la β -glucosidasa son componentes exógenos añadidos al sistema de SSF.
3. La celulosa es hidrolizada hacia la celobiosa por la celulasa con la formación de cantidades despreciables de glucosa.
4. El pH durante la SSF no varía considerablemente, por lo tanto no tiene un efecto significativo en la actividad enzimática y el crecimiento celular.
5. El etanol y el dióxido de carbono son los principales productos metabólicos.
6. El medio de crecimiento provee un exceso de nutrientes excepto fuente de carbono (glucosa), que se deriva de la celulosa.

El modelo no se restringe a cualquier sistema particular de SSF o juego de condiciones, y se refiere a ambas operaciones, anaerobia y aerobia.

Formulación del modelo cinético de la SSF

Basados en el modelo desarrollado por Philippidis et al. (1992), la variación de las concentraciones de masas en función del tiempo para la: celulosa, celobiosa, glucosa, celulas y etanol durante la SSF desarrollada a batch son descritas por las siguientes ecuaciones diferenciales para la:

$$(C): \text{Celulosa} \quad d(C)/dt = -r_1 \quad (1)$$

$$(B): \text{Celobiosa} \quad d(B)/dt = 1,06.r_1 - r_2 \quad (2)$$

$$(G): \text{Glucosa} \quad d(G)/dt = 1,05.r_2 - r_3 \quad (3)$$

$$(X): \text{ Celulas, } d(X)/dt = \mu_m \left[\frac{(G)}{K_3 + (G)} + \frac{(G)^2}{K_i} \left[\frac{K_{3E}}{K_{3E} + (E)} \right] \right] (X) - K_d (X) \quad (4)$$

$$(E): \text{ Etanol} \quad d(E)/dt = [a \cdot d(X)/dt + b (X)] \left[\frac{(G)}{K_4 + (G)} \right] \quad (5)$$

Donde:

a = constante de crecimiento asociada a la formación de etanol, g/g

b = velocidad específica de producción de etanol, g/(g/h)

(B) = concentración de celobiosa, g/L

(C) = concentración de celulosa, g/L

(G) = concentración de glucosa, g/L

(E) = concentración de etanol, g/L

(X) = concentración de masa celular, g/L

K_d = velocidad específica de muerte celular, h⁻¹

μ_m = velocidad específica de crecimiento del microorganismo, h⁻¹

K_i = constante de inhibición del crecimiento celular por sustrato (glucosa), g/L

K_{3E} = constante de inhibición del crecimiento celular por etanol, g/L

K₃ = constante de Monod de la glucosa para el crecimiento celular, g/L

K₄ = constante de Monod de la glucosa para la síntesis de etanol, g/L.

De esta forma el modelo matemático de SSF está compuesto por cinco ecuaciones diferenciales involucrando cinco variables dependientes, (C), (B), (G), (X) y (E) y una independiente: el tiempo (t).

En la formulación del modelo se asume que la desactivación de la enzima es despreciable, la concentración de lignina se considera constante, la lignina es químicamente inerte durante la SSF. El modelo puede ser fácilmente modificado en diferentes condiciones de SSF y modos de operación, tales como múltiples productos metabólicos, SSF y síntesis enzimática simultánea, fermentación

aeróbica y operaciones fed-batch y continuas, (Albernas-Carvajal et al. 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etanol obtenido experimentalmente.

En la tabla 1 se muestran los resultados del etanol obtenido experimentalmente y determinado por cromatografía gaseosa antes descrita según lo desarrollado por Albernas-Carvajal et al. (2014). Todas las determinaciones analíticas se desarrollaron en réplica y los resultados promedios del etanol máximo son:

Tabla 1. Promedios del etanol obtenido en la SSF

Experiencia	X ₁	X ₂	X ₃	Etanol máximo (g/L)
1	+	+	+	22,0
2	+	+	-	14,6
3	+	-	+	14,2
4	+	-	-	11,2
5	-	+	+	18,3
6	-	+	-	17,52
7	-	-	+	15,27
8	-	-	-	9,26

Como se puede apreciar el nivel de etanol obtenido para las condiciones de experimentación ensayadas, se encuentra entre 9,26

y 22,0 g/L, valores que corresponden a los niveles inferior y superior de las variables empleadas respectivamente. Atendiendo a esto se decide, para el estudio cinético, utilizar el valor máximo de concentración de etanol obtenido, es decir, 22,0 g/L. Es importante resaltar que este valor es prometedor si se compara con lo obtenido por Lu et al. (2013), 24,0 g/L sin suplemento de nutrientes y 22,0 g/L con suplemento de nutrientes. Por otra parte Sánchez et al. (2005) logran también bajo la tecnología SSF 18,0 g/L, valor muy cercano a lo obtenido en el presente trabajo. En un trabajo posterior se presentará un estudio completo y detallado del efecto de todos los factores involucrados en este experimento y sus interacciones.

Muy brevemente se puede anunciar el compromiso a establecer con la temperatura de trabajo, que para la levadura empleada la óptima reportada es de 30°C, como lo apunta Mesa (2010), pero para la hidrólisis enzimática la enzima empleada tiene reportado por el fabricante como óptima 50°C (Albernas-Carvajal, 2013); es decir, que en el proceso SSF se presenta una complicada combinación donde la hidrólisis enzimática y la fermentación están fuera de sus óptimos y se debe lograr un compromiso para el trabajo, lo cual se analizará en el trabajo posterior.

Determinación de los parámetros del modelo cinético

Para la solución del sistema de ecuaciones se emplea el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF). Este algoritmo controla el estimado del error de integración y altera los pasos de la solución del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias con el objetivo de mantener el error por debajo de un cierto valor prefijado. Los valores empleados para los errores relativos y absolutos son menores que 10^{-10} que garantizan una solución apropiada del sistema de ecuaciones diferenciales. Sin embargo este nivel de error es prácticamente

imposible de alcanzar, por lo que se usa como criterio de parada un error de 10^{-7} , para el error absoluto y de 10^{-4} para el error relativo.

Los cálculos del tipo Runge-Kutta tienen gran popularidad debido a que tienen una gran estabilidad, son métodos de un solo paso donde es suficiente solo con la información de la función en el paso previo para predecir la solución en el paso siguiente. En el modelo matemático que describe el proceso de fermentación de la glucosa, ecuación (3) a la (5), $r_2 = 0$ (no hay formación de glucosa). Donde la velocidad de hidrólisis de la celulosa, r_1 , depende de la concentración de celulosa absorbida en la celulosa:

$$r_1 = k_1 (E_1^*) \quad (6)$$

Donde:

k_1 = velocidad específica de hidrólisis y

(E_1^*) = concentración de celulosa absorbida, que no se considera en el presente trabajo. La velocidad de utilización de la glucosa por el microorganismo, r_3 , es:

$$r_3 = (1/Y_{XG}) d(X)/dt + m(X) \quad (7)$$

Donde Y_{XG} es el coeficiente de rendimiento promedio de masa celular en el sustrato (glucosa), y m es la velocidad específica de consumo del sustrato por requerimientos de mantenimiento.

El modelo de fermentación consiste en tres ecuaciones diferenciales ordinarias (ecuaciones 3, 4 y 5), incluyendo una variable independiente (t), tres variables dependientes X , G , E , y diez parámetros (μ_m , K_3 , K_{3E} , K_i , K_d , Y_{XG} , m , a , b , K_4). Para el cálculo de los parámetros se usó una regresión no lineal (a partir de experimentos realizados, cuyos resultados se muestran en la tabla 2, para estudiar la cinética del crecimiento celular y la síntesis del etanol) con el objetivo de estimar aquellos valores de los parámetros que

minimizaran la suma de los cuadrados de los residuos. Se utilizó para ello el método de la minimización de los mínimos cuadrados de Levenberg–Marquardt, que es un híbrido de los métodos de Gauss-Newton y de paso descendente.

Tabla 2. Concentraciones medias experimentales empleadas para el cálculo de los parámetros del modelo SSF

Tiempo (h)	Etanol (g/L)	Glucosa (g/L)	Masa Celular (g/L)
0	0,00	7,50	1,15
5	7,05	1,04	2,20
12	15,25	0,40	1,60
22	18,79	0,00	1,10
29,5	19,88	0,00	0,50
45,5	22,00	0,00	0,45

Los valores de los parámetros obtenidos son los siguientes:

$$\mu_m = 0,17 \text{ h}^{-1}$$

$$K_3 = 0,171 \text{ g/L}$$

$$K_i = 33,8 \text{ g/L}$$

$$K_d = 0,0505 \text{ h}^{-1}$$

$$Y_{XG} = 0,24 \text{ g/g}$$

$$m = 0,211 \text{ h}^{-1}$$

$$a = 0,00269 \text{ g/g}$$

$$b = 0,198 \text{ h}^{-1}$$

$$K_4 = 0,65 \text{ g/L}$$

$$K_{3E} = 0,18 \text{ g/L}$$

El etanol obtenido por el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF) es 20,84 g/L y el etanol determinado por el método cromatográfico para el mejor experimento abordado por Albernas-Carvajal et al. (2014) fue de 22,0 g/L, lo cual demuestra la eficiencia del algoritmo RKF empleado. Como se puede apreciar en la figura 2 los valores experimentales tienen una tendencia similar a los valores obtenidos por los modelos.

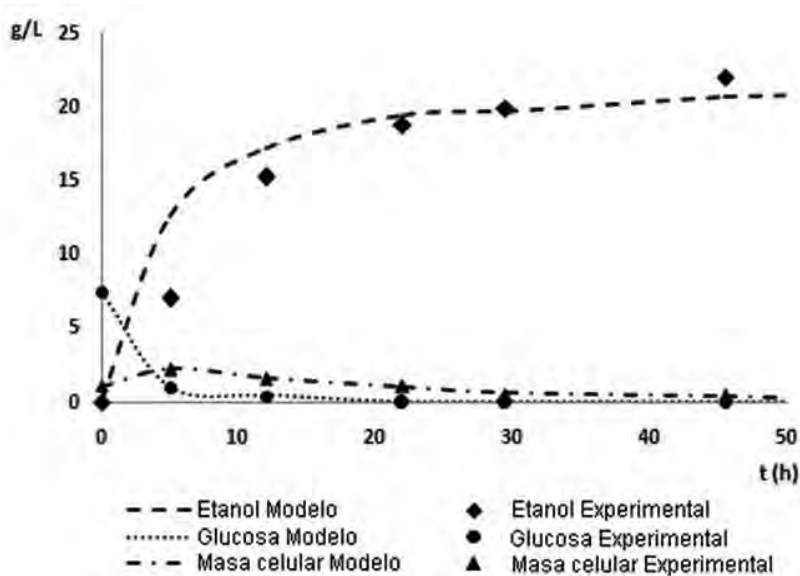


Figura 2. Perfiles obtenidos en el modelo y experimental de consumo de glucosa, formación de etanol y masa celular

El etanol obtenido se encuentran en el orden de los valores reportados por Sánchez et al. (2005), que empleando otra materia prima lignocelulósica, como ya se apuntó previamente, logran 18,0 g/L de etanol a las 70 h de experimento mientras que en el presente se logran los 22,0 g/L experimentales y 20,84 g/L por el algoritmo RKF a las 50 h. Los mencionados autores reportan 0 g/L de glucosa a las 5 h, presentando un comportamiento muy similar al presente con 2,0 g/L a las 5 h, disminuyendo progresivamente hasta llegar a valores cercanos a 0 g/L a las 18 h.

Por otra parte Lu et al. (2013), haciendo el pretratamiento con agua líquida caliente empleando el material lignocelulósico insoluble en el agua a 210 °C y la misma levadura *Saccharomyces cerevisiae*, logra hasta 24,0 g/L de etanol sin suplemento de nutrientes y 22,0 g/L con suplemento de nutrientes. Para el caso de la glucosa a las 24 h

obtuvieron 2,0 g/L sin suplemento de nutrientes y 1,0 g/L con suplemento de nutrientes, decayendo progresivamente hasta llegar a niveles de 0 g/L pasadas las 36 h de experimento. Phillippidis et al. (1992) en los compuestos mencionados se comporta de manera similar, visto como tendencia general, pero al tratarse de otro material y otro pretratamiento diferente los valores logrados son inferiores al presente, 4,0 g/L de etanol a partir de las 20 h y glucosa con valores cercanos a 0 g/L a partir de las 16 h.

Todo este análisis da una medida de la eficiencia y adecuación del modelo empleado, el cual proporciona una valiosa visión de las interacciones más importantes y las limitaciones de la velocidad en la SSF, y puede ser empleado en un futuro como herramienta para desarrollar el escalado del proceso de bioconversión.

El hecho de haber podido demostrar en el presente el método de resolución numérica aplicado a la SSF del bagazo de caña de azúcar pretratado es una herramienta importante que puede emplearse como guía para procesos similares de SSF empleando otras materias primas, siempre y cuando se ajusten los parámetros del modelo a las nuevas condiciones de la nueva materia prima empleada.

CONCLUSIONES

La expresión cinética propuesta por Phillippidis et al. (1992) para la obtención de etanol, masa celular y consumo de glucosa fue analizada y probada en el presente trabajo.

Este modelo describe satisfactoriamente el proceso de obtención de etanol a partir de bagazo pretratado mediante el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF).

La concentración de etanol obtenida experimentalmente y determinada por métodos cromatográficos por Albernas-Carvajal et al. (2014) presenta valores similares a los obtenidos en el proceso

de modelación y simulación por el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF), lo cual demuestra la efectividad de este algoritmo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba (CITMA).

REFERENCIAS

1. Albernas-Carvajal, Y., Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar., a *PhD thesis presented in the Central University "Marta Abreu" of Las Villas, Santa Clara, Cuba, 2013.*
2. Albernas-Carvajal, Y., Pedraza, J., Rodríguez, L., Mesa, L., Martínez, Y, and González, E., Modelación matemática y aproximación cinética de la conversión del bagazo pretratado en etanol mediante Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF)., *Memoirs from VI International Congress of Biofuels Science and Technology (CIBSCOL 2014), Cartagena de Indias, Colombia 2014, pp. 28-29.*
3. Albernas-Carvajal, Y, Corsano, G., Morales, M., González, M., Santos, R., and González, E., Optimal desing for an ethanol plant combining first and second-generation technologies., *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro, Vol. 5 No. 5 December 2014 a, pp.97 – 120.*
4. Bansal, P., Hall, M., Realff, M.J., Lee, J.L., Bommarius, A.S., Modeling cellulose kinetics on lignocellulosic substrates., *Biotechnology Advances, Vol. 27, 2009, pp. 833-848.*

5. Dantas, G.A., Legey, L.F.L. & Mazzone, A., Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.21, 2013, pp. 356–364.
6. Haagensen, F., and Ahring, B.K., Enzymatic hydrolysis and glucose fermentation of wet oxidized sugarcane bagasse and rice straw for bioethanol production., *Ri- so-R-1517 (EN)*, Vol. 1, 2002, pp.184 -195.
7. Hofsetz, K. & Silva, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and nonenergy consumption. *Biomass and Bioenergy*, 46: 2012, pp. 564-573.
8. Kádár, Zs., Szengyel, Zs., Réczey, K., Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Industrial Wastes for the Production of Ethanol. *Ind. Crops and Prod.*, Vol. 20, 2004, pp. 103-110.
9. Lu, J., Li, X., Yang, R., Yang, L., Zhao, J., Liu, Y., Qu, Y., Fedbatch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*., *Bioresource Technology*, Vol 144, 2013, pp. 539-547.
10. Lynd, L.R., Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and Policy. *Annu. Rev. Energy Eviron.*, Vol. 21, 1996, pp. 403.
11. Lynd, L.R., Lyford, K., South, C .R. and Walsum, P., Levenson, K., Evaluation of paper sludges for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol., *Tappi J.* Peer Reviewed Paper, 2001.
12. Magesh, A., Preetha, B., Viruthagiri, T., Simultaneous Saccharification and Fermentation of Tapioca Stem var. 226 WhiteRose to Ethanol by Cellulase Enzyme and *Saccharomyces*

- cerevisiae., *Int.J. ChemTech Res.*, Vol. 3, No. 4, 2011, pp. 1821-1829.
13. Mesa L., Estrategia investigativa para la tecnología de obtención de etanol y coproductos del bagazo de la caña de azúcar., a *PhD thesis* presented in the Central University "Marta Abreu" of Las Villas, Santa Clara, Cuba, 2010.
 14. Mesa L., González E., Cara C., Ruiz E, Castro E., Mussatto S.I., An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment., *J. Chem. Technol. Biotechnol*, Vol. 85, 2010, pp. 1092-1098.
 15. Mesa, L., González, E., Cara, C., González, M., Castro, E., Mussatto, S.I., The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse., *Chemical Engineering Journal*, Vol.168, 2011, pp. 1157-1162.
 16. Mesa, L., González, E., Romero, I., Ruiz, E., Cara, C. & Castro, E. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugar-cane bagasse. *Chem. Eng. J.*, 175: 2011a, pp. 185-191.
 17. Morales, M., Verelst, H., Mesa, L., and González, E., Simulation of furfural production process for revamping with ethanol technology from lignocellulosic residuals., *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 21,2010, pp. 967-972.
 18. Nguyen, C.N., Le, T.M., Chu-Ky, S., Pilot scale simultaneous saccharification and fermentation at very high gravity of cassava flour for ethanol production., *Industrial Crops and Products*, Vol.56,2014,pp.160-165.
 19. NREL, Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass., *National Renewable Energy Laboratory*, Golden, Co. LAP002, 2004.
 20. Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., and Soccol, V.T., Biotechnological potential of agro-industrial residues I:

- sugarcane bagasse., *Bioresource Technol.*, Vol.74,2000, pp. 69-81.
21. Philippidis, G.P., Spindler, D.D., Wyman C.E., Mathematical modeling of cellulose conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 34/35, 1992, pp. 543 – 556.
 22. Raman, D.R, Anex, R.P., Conceptual and mathematical models of batch simultaneous saccharification and fermentation: dimensionless groups for predicting process dynamics. *Agricultural and Biosystems Engineering.*, 2012, pp. 1-20.
 23. Sánchez, O.J., Cardona, C.A., Cubides, D.C., Modeling of Simultaneous Saccharification and Fermentation process coupled with pervaporation for fuel Ethanol., *2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering*, Costa Verde, Brasil, August 2005, pp.1-10.
 24. Sasikumar, E., Viruthagiri, T., Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Sugarcane Bagasse Kinetics and Modeling., *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, Vol.3, Nº 3, 2010, pp.57-64.
 25. South, C.R., Hogsett , D.A.L., Lynd, L.R., Continuous Fermentation of Cellulosic Biomass to Ethanol., *Applied Bioch. and Biot.*, Vol. 39/40, 1993, pp. 587-600.
 26. Takagi, M., Suzuki, S., Gauss, W.F., Manufacture of Alcohol from Cellulosic Materials Using Plural Ferments., *United States Patent*, 3,990,944., 1976.
 27. Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Emert, G. H. and Yata, N., *Bioconversion Symposium Preceedings*, IIT, Delhi, 1977, pp. 551-571.
 28. Wright, J.D., Wyman, C.E., and Grogmann, K., *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 18, 1988, pp. 75-90.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO PRETRATADO

Yaillet Albornas-Carvajal

Gabriela Corsano

Layanis Mesa Garriga

Ronaldo Santos Herrero

Erenio González Suárez

RESUMEN

En el estudio se determinan los parámetros fundamentales de la cinética enzimática a partir de un modelo cinético pseudo-homogéneo de Michaelis Menten, previamente estudiado con otros materiales lignocelulósicos, para determinar la velocidad de producción de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo. Para ello se emplearon los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, en el cual se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del bagazo previamente pretratado de forma ácida y básica. Se emplearon las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic^RCTec2 y β -glucosidasa con código NS50010, en un experimento con un diseño factorial 23 haciendo réplicas al azar. Los valores de la constante de Michaelis Menten y constante de inhibición determinados (K_M y K_I) son intrínsecos al sistema de celulosa y celulasa dado, y son independientes de las variables de operación empleadas.

Palabras clave: Bagazo; hidrólisis enzimática; Michaelis Menten; modelo cinético.

INTRODUCCIÓN

Los modelos para la reacción de la hidrólisis enzimática se pueden clasificar dentro de dos categorías: tipo de modelo (empírico o mecanístico) y tipo de sustrato (puro o impuro). La mayoría de los modelos mecanísticos para esta reacción son o modelos MichaelisMenten con algún tipo de inhibición o modelos más detallados con múltiples reacciones. Esos modelos generalmente consideran múltiples reacciones debido a la acción de diferentes tipos de enzimas o diferentes sustratos (cristalino y amorfo) o una combinación de los dos. Los modelos más simplificados incluyen una sola expresión de velocidad de reacción para la hidrólisis, mientras que los modelos que consideran múltiples reacciones usan varias expresiones de velocidad y muchos parámetros.

En la tabla siguiente se relacionan las características básicas de la cinética, lo asumido, y la aproximación modelada de varios modelos establecidos en las diferentes etapas de la comprensión del complejo de reacciones de la hidrólisis de la celulosa.

Tabla 1. Características básicas de la cinética, lo asumido, y la aproximación modelada de varios modelos establecidos en las reac.de la hidrólisis de la celulosa

Estado del sustrato	Sistema enzimático	Aproximación cinética	Inhibición	Referencia
Material homogéneo	E_{12}	QSS	Competitiva	<i>(Howell and Stuck, 1975)</i>
Material homogéneo	E_{123}	MM	Competitiva	<i>(Huang, 1975)</i>
Grado de polimerización	E_1, E_2, E_3	MM	No Competitiva	<i>(Okazaki and Moo-Young, 1978)</i>

Material homogéneo	E_{123}	QSS	Competitiva	<i>(Howell and Mangat, 1978)</i>
Cristalino y amorfo	E_{123}	MM	-	<i>(Peitersen and Ross, 1979)</i>
Cristalino y amorfo	E_{123}	QSS	Competitiva	<i>Ryu et al. (1982)</i>
Material homogéneo	E_{12}, E_3	-	No Competitiva	<i>(Fan and Lee, 1983)</i>

E_1 , endo-glucanasa; E_2 , celobiohidrolasas; E_3 , celobiosa; E_{12} , combina E_1 y E_2 ; E_{123} , combina E_1 , E_2 y E_3 , QSS, estado cuasi estacionario; MM, Michaelis Menten

Posteriormente se hicieron otros estudios en este sentido; en 1999, Ljunggren (1999) desarrolló un modelo cinético que incluye características o factores como inhibición de producto final de celobiosa y glucosa, desactivación de enzima y un nuevo parámetro de sustrato. El modelo se basa en reacciones homogéneas y heterogéneas, las cuales son influenciadas por el producto final y la desactivación de la enzima. En el 2003 Gan et al. (2003) presentan la cinética enzimática de la hidrólisis de la celulosa considerando un sistema de reacción heterogéneo sólido líquido. En el 2004, Li et al. (2004) desarrollan un modelo pseudo homogéneo de Michaelis Menten con inhibición competitiva, considerando sustrato soluble hipotético, empleando un método gráfico y en el 2007 González (2007) emplea un algoritmo de optimizaciones sucesivas a partir de valores iniciales de K_M , V_m y K_i , mediante Runge Kutta de cuarto orden. Demuestra que el modelo de inhibición no competitiva se descarta para este caso.

Entre las ventajas de considerar Michaelis-Menten para este tipo de reacciones de hidrólisis enzimática, se encuentran:

- La aparente analogía entre la cinética enzimática y la cinética celular que ha sido ampliamente empleada para sugerir una estructura de la expresión cinética
- para la conversión de sustratos por células vivientes.
- Permite analizar diversos factores ambientales que influyen en la actividad enzimática como la temperatura, el pH, etc.
- Permite derivar expresiones una vez conocido el mecanismo de inhibición.
- Toma en consideración elementos relacionados con el mecanismo de hidrólisis enzimática.
- La expresión de Michaelis - Menten es mucho más robusta que el modelo de Monod de cinética celular, Villadsen et al. (2011).

El objetivo fundamental del presente trabajo es obtener el modelo cinético de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar pretratado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado

La reacción de hidrólisis enzimática de la celulosa es catalizada por las enzimas celulasas, las cuales son altamente específicas. Los productos de la hidrólisis son usualmente azúcares reductores, incluyendo la glucosa. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH: 4,8, T: 45-50°C). Al contrario de los catalizadores comunes, las enzimas presentan una elevada especificidad con respecto al sustrato, y su uso reduce la obtención de subproductos indeseables González (2007). La reacción de hidrólisis enzimática se caracteriza por un sustrato insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (enzimas). Existen fundamentalmente tres tipos de celulasas en los sistemas completos: endoglucanasa, exoglucanasa o celobiohidrolasa y β -glucosidasa o celobiasa tal como lo aborda González (2007).

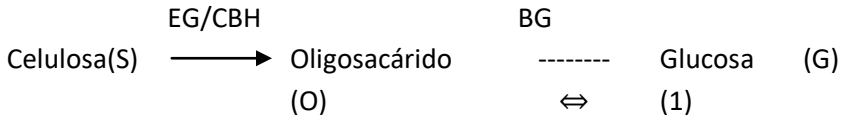
Para obtener las mejores condiciones en la obtención del hidrolizado se realizó un diseño factorial de experimentos 23 con réplicas al azar, empleando el bagazo pretratado anteriormente en las etapas de hidrólisis ácida y básica, Granado et al. (2013) y las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic^RCTec2 y β -glucosidasa con código NS50010, el volumen de la segunda enzima fue del 10% del volumen total de enzima a utilizar. El experimento se realizó en beakers con un volumen de 25 mL de solución tampón HAC-acetato de sodio de pH 4,8 en zaranda a 2,5 rps (150 rpm). Para la determinación de los ART se aplicó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a partir de la elaboración previa de la curva de calibración en un Espectrofotómetro Genesys 20 a 540 nm. Por el método de diferencia de pesada se determinó la lignina presente en el bagazo pretratado.

En el desarrollo de la hidrólisis enzimática las variables independientes estudiadas fueron la temperatura, en la cual el nivel inferior se corresponde con los mejores resultados de Mesa (2010) y el nivel superior 50°C que es la óptima reportada por el fabricante de la enzima empleada. Las otras dos variables estudiadas fueron la concentración de enzima y de sustrato tomando los niveles de las mismas a partir de los estudios de Mesa (2010).

Modelo cinético pseudo- homogéneo para la reacción de hidrólisis enzimática del bagazo

El mecanismo simplificado pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten para determinar la velocidad de producción de ART en el tiempo, parte de que el azúcar se produce de un sustrato soluble hipotético cuya concentración inicial correspondería a la concentración de ART producida finalmente según lo planteado en las referencias González (2007) y Li et al. (2004).

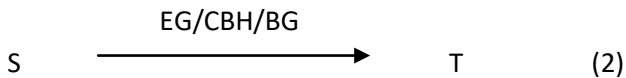
Un esquema simplificado del mecanismo de reacción se muestra a continuación:



Donde:

S: Sustrato insoluble, O: Oligosacárido soluble, G: Glucosa, EG: Endoglucanasa, CBH: Celobiohidrolasa, BG: β - glucosidasa

El primer paso es la reacción heterogénea entre sustrato insoluble S y solución enzimática para producir el oligosacárido soluble O bajo la acción sinérgica de EG y CBH, la cual se considera como el paso que gobierna la velocidad global de reacción. El segundo paso es la reacción homogénea de los oligosacáridos para producir glucosa G, catalizada principalmente por la BG y con una velocidad de reacción mucho mayor que la del primer paso. Si se considera que los oligosacáridos O liberados durante la reacción están formados en su mayor proporción por celobiosa, la suma de oligosacáridos y glucosa ($T = O+G$), representan la fracción de los productos de la reacción que inhiben las enzimas celulasas. Considerando como único efecto inhibitorio, el esquema simplificado de reacción que se reduce a:



El modelo pseudo – homogéneo asume que T es producido a partir de un sustrato soluble hipotético cuya concentración durante la reacción corresponde a la diferencia entre la máxima cantidad de T producida durante la reacción, (T^∞) y la cantidad de T presente en el tiempo t. El nuevo sustrato ($T^\infty - T$) se introduce en los modelos

cinéticos de Michaelis-Menten. T_{∞} es un nuevo parámetro del modelo cinético para el cual se halla una relación funcional con la concentración inicial de sustrato.

Según Li et al. (2004) y González (2007), la expresión para determinar la velocidad de reacción de la formación de ART en el tiempo es la siguiente:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{k E_0(T_{\infty} - T)}{K_M [1 + (1/K_I)T] + 0,9(T_{\infty} - T)} \quad (3)$$

Donde:

T_{∞} : Representa el máximo valor de T (O+G) alcanzado durante la reacción

$(T_{\infty} - T)$: Concentración de sustrato hipotético del modelo pseudo-homogéneo.

0,9: Relación entre el peso molecular de una unidad de glucosa en celulosa y el peso molecular de la glucosa.

k: Constante aparente que representa la frecuencia de enlace entre celulosa y celulasa

K_M : Constante aparente de Michaelis Menten que representa la afinidad entre la celulosa y la celulasa.

K_I : Constante aparente de inhibición competitiva o no competitiva entre celulosa-glucosa y celulasa.

E_0 : Concentración inicial de la enzima.

Para un sistema dado los valores de k dependen de la eficiencia de contacto entre el sustrato insoluble y la solución de celulasa, de las propiedades del sustrato y condiciones de operación como tipo y tamaño del reactor, mezclado y concentración inicial de sustrato. Los valores de T_{∞} dependen de las mismas variables anteriores, especialmente de la concentración inicial de sustrato. Por otro lado se asume que los valores de K_M y K_I son intrínsecos al sistema dado

de celulosa y celulasa, y son independientes de las variables de operación descritas previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados experimentales de la hidrólisis enzimática

Los niveles de las variables estudiadas experimentalmente y explicadas en el epígrafe de la sección anterior fueron:

Variables independientes:

X1: Temperatura: 38-50 °C

X2: Concentración de la enzima: 10-20 UPF/g
CE (0,15-0,31mL/g)

X3: Concentración de sustrato: 5 - 10 %
CS (50-100 g/L)

Variable dependiente:

Formación de Azúcares Reductores Totales (ART) g/L En la tabla 2 se muestra la matriz experimental planteada, se hicieron réplicas al azar de los experimentos 1, 5, 6 y 8. También se muestran los valores máximos de ART obtenidos a las 48 horas de experimento.

Tabla 2. Matriz experimental para hidrólisis enzimática

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	ART max obtenido (g/L)
1	+	+	+	48,74
1-R	+	+	+	58,02
2	+	+	-	25,38
3	+	-	+	38,05
4	+	-	-	19,26
5	-	+	+	40,82
5-R	-	+	+	35,01
6	-	+	-	20,58
6-R	-	+	-	23,03
7	-	-	+	31,23
8	-	-	-	15,59
8-R	-	-	-	15,78

Obtención de los parámetros del modelo pseudo-homogéneo de Michaelis Menten

Aplicando dicha metodología propuesta por Li et al. (2004) se grafican los valores de T(O+G) (g/L) en el tiempo (t) obtenidos al final de la hidrólisis enzimática tomando como base de cálculo 100 kg de material.

En la figura 1 se observa la tendencia de la formación de ART en el tiempo de los experimentos realizados y sus réplicas, apreciándose como tendencia general que la mayor formación de azúcares ocurre en las primeras 5 a 15 horas, ya a partir de ese momento la formación de ART ocurre de forma más moderada.

Si se analiza el experimento 1-R y 8 se observa como en el 1-R la máxima formación de ART es de aproximadamente 58 g/L, siendo este valor mucho mayor que en el experimento 8 que es de 16 g/L, este comportamiento se debe a que en el 1-R la temperatura a la que se llevó a cabo el experimento fue de 50°C, siendo esta la temperatura de trabajo óptima reportada para esta enzima y en el 8 fue de 38 °C que fue la óptima obtenida por Mesa (2010).

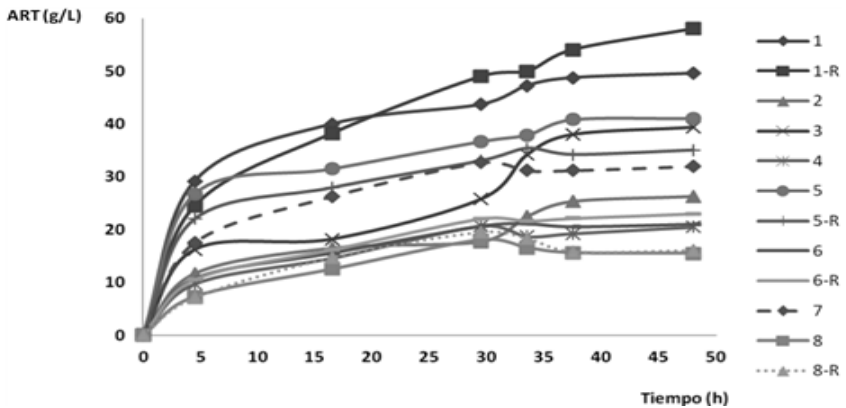


Figura 1. Formación de ART experimentales en el tiempo

Si se compara el 1-R con el 2, en el cual se mantienen constantes la temperatura y la concentración de enzima, se observa que a medida que es mayor la concentración de sustrato (1-R) mayor es la formación de ART, manteniéndose el mismo comportamiento en el caso de la concentración de la enzima en los experimentos 1-R y 3 en los cuales se evidencia claramente que a mayor concentración de enzima mayor será la formación de T notando una diferencia

marcada de producción de ART de aproximadamente 18 g/L, Albernas (2014).

Siguiendo la metodología planteada por Li et al. (2004) se determina la T_{∞} para los experimentos 1-R, 8 y 2 (figura 2) a partir de graficar T (O+G) en el tiempo. Se tomaron los experimentos 1-R y 8 por representar las condiciones de los extremos de las variables independientes y el 2 por representar un punto intermedio; lo cual permite que el experimento sea válido para todo el rango de las variables independientes estudiado.

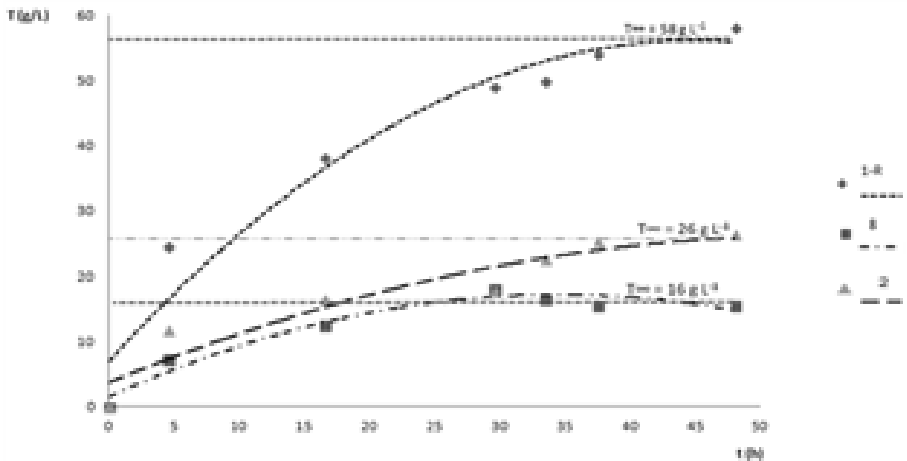


Figura 2. Determinación de T_{∞}

Posteriormente en la figura 3 se determina la velocidad inicial (dt/dt) $t \rightarrow 0$ a partir de la curva que muestra la evolución en el tiempo de T (g/L)

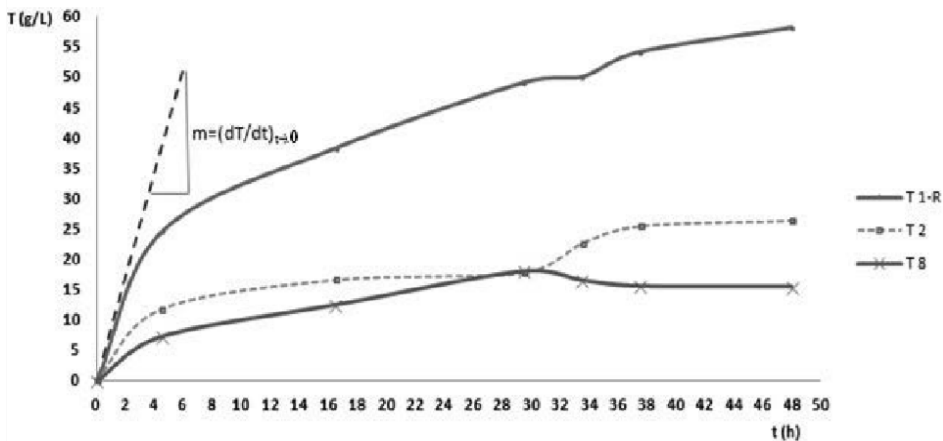


Figura 3. Determinación de $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la figura anterior para la determinación de la velocidad inicial $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

Tabla 3. Determinación de la velocidad inicial $(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$

Experimentos	$(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$	$1/(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$	T_{∞}	$1/T_{\infty}$
1-R	6,25	0,160	58	0,0172
2	3,57	0,280	26	0,0385
8	2,1	0,476	16	0,0625

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se grafica $1/(dT/dt)_{t \rightarrow 0}$ vs $1/T_{\infty}$, en la misma se determina en intercepto y la pendiente de dicha recta obteniéndose así los valores de K_M y k .
 Pendiente = K_M/kE_0

Intercepto = $0,9/kE_0$ $K_M=217,49$ g/L $k=0,735$ h⁻¹

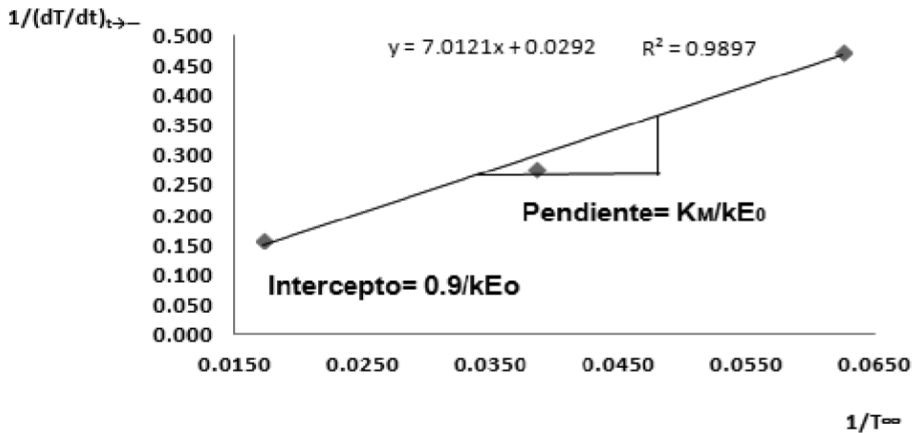


Figura 4. Determinación de k y K_M

Análisis de la constante de Michaelis-Menten obtenida (K_M).

La máxima concentración de sustrato que se utilizó fue de 100 g/L, esto quiere decir la mayor parte de los centros activos del complejo enzima-sustrato no están ocupados. Esto se debe a la presencia en el sustrato de lignina, que actúa como barrera entre el sustrato y la enzima. En reacciones enzimáticas en general, Lehninger (1981), plantea que cuando $[S] \ll K_M$, la velocidad de reacción es de primer orden con respecto al sustrato, aspecto que fue asumido en el desarrollo del presente modelo y da una medida de la adecuación del mismo.

Determinación de K_i (Constante de inhibición)

Para determinar la constante de inhibición K_i , se integra la ecuación 4 bajo las condiciones iniciales y finales ($T = T_0$ en $t = 0$ y $T = T$ en $t = t$, respectivamente) obteniendo la ecuación siguiente:

$$\frac{t}{0,9 (T - T_0)} = \beta \frac{\ln [(T_\infty - T_0)/(T_\infty - T)]}{0,9 (T - T_0)} - \gamma \quad (4)$$

ó $Y = \beta X - \gamma$; donde:

$$\beta = K_M / (k E_0 K_I) T_\infty + (K_M / k E_0) \quad (5)$$

$$\gamma = K_M / (0,9 k E_0 K_I) - 1 / (k E_0) \quad (6)$$

$$Y = \frac{t}{0,9 (T - T_0)} \quad (7)$$

$$X = \frac{\ln [(T_\infty - T_0)/(T_\infty - T)]}{0,9 (T - T_0)} \quad (8)$$

Se sustituyeron los valores de T (g/L) en el tiempo correspondientes a los experimentos 1-R y 8 en las ecuaciones 7 y 8 para calcular los valores de X y Y, los cuales satisfacen la ecuación de una línea recta. Para determinar un simple valor razonable de K_I se trazan líneas rectas de X vs Y para los experimentos 1-R y 8 hasta obtener un intercepto que satisfaga simultáneamente las ecuaciones 5 y 6 para cada valor de concentración inicial de sustrato.

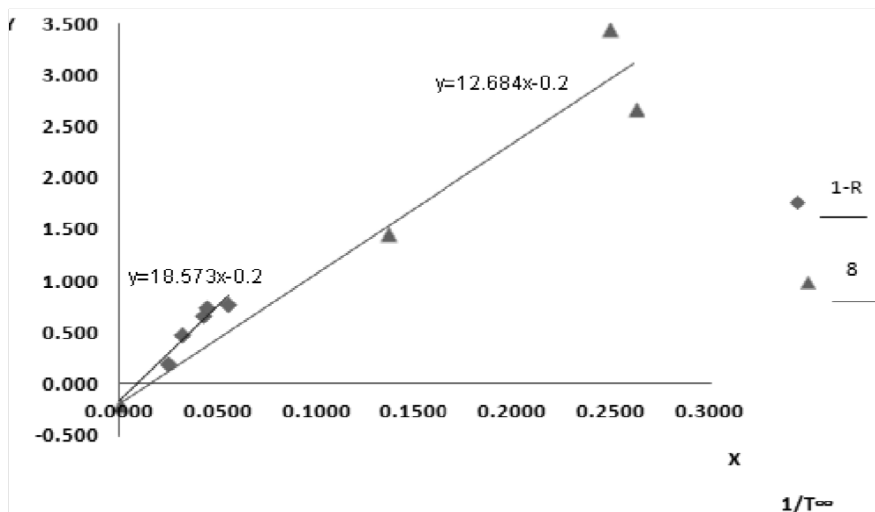


Figura 5. Determinación de β y γ para K_i

Los resultados obtenidos son:

$$\beta = 18,57$$

$$\gamma = - 0,2$$

$$K_i = 32,64 \text{ g/L}$$

Se asume que los valores de K_M y K_i son intrínsecos del sistema de celulosa y celulasa dado y que son independientes de las variables descritas anteriormente, al igual que lo aplicaron Li et al. (2004) y lo explica Albernas (2014).

Determinación de K (Constante de equilibrio) Según el modelo planteado en la metodología reportada por Li et al. (2004) de G (g/L) vs T (g/L) se determina para el caso en cuestión los valores de G (g/L) - T (g/L), encontrando un modelo en el cual la pendiente es:

$$\text{Pendiente} = \frac{K}{K + 1}$$

El valor de la constante de equilibrio, K, obtenido es de 3,35.

Después de calculados cada uno de los parámetros anteriores se sustituye en la ecuación 3 expresión general del modelo y se determina así la expresión de velocidad de reacción de la formación de ART en el tiempo siendo esta la siguiente:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{0,735 \cdot 42,2 (58 - T)}{217,49 [1 + 1/32,6)T] + 0,9 (58 - T)} \quad (9)$$

CONCLUSIONES

1. El experimento que mejores condiciones presenta en la etapa de hidrólisis enzimática es el experimento 1-R con la mayor producción de ART en el tiempo que es de 58 g/L con una concentración máxima de enzima y sustrato de 0,31 mL/g y 100 g/L respectivamente.
2. El valor de la constante de Michaelis Menten para este complejo enzima sustrato es elevado ($K_M=217,49$ g/L) respecto a la máxima concentración de sustrato que se utilizó que fue de 100 g/L, lo que demuestra que la mayor parte de los centros activos del complejo enzima-sustrato no están ocupados, debido a la presencia de lignina en el material a hidrolizar, que actúa como barrera.
3. El modelo cinético desarrollado en el presente trabajo sirve como guía para la obtención de modelos cinéticos de hidrólisis enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos, teniendo en cuenta que el mismo presenta las limitaciones siguientes:
 - El valor de k depende de la eficiencia de contacto entre el sustrato insoluble y la solución de celulosa, de las propiedades del sustrato y condiciones de operación.
 - El valor de T_∞ depende de las mismas variables anteriores y en especial de la concentración inicial del sustrato.
 - Los valores de K_M y K_i son intrínsecos al sistema dado de celulosa y celulosa, y son independientes de las variables de

operación descritas anteriormente (al cambiar la enzima o el sustrato cambian estos valores y hay que repetir todo el procedimiento)

- Teniendo en cuenta lo reportado por González (2007), solo se ajusta al mecanismo de inhibición competitiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba (CITMA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Albernas, Y., Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar., Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2014.
2. Fan, L.T., & Lee, Y.H., Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetic model., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 14, 1983 , pp. 2707-2733.
3. Gan Q., Allen S.J., & Taylor G., Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling., *Process Biochemistry*, Vol. 38, 2003, pp.1003-1018.
4. Granado J., Cornes, I., Albernas, Y., Corsano, G., González, E., Santos, R., y Mesa L., Aproximación de las expresiones cinéticas en las etapas de pretratamiento ácido y básico del bagazo., *Centro Azúcar*, Vol. 40, No. 4, Sept-Dic, 2013, pp. 8-15.

5. González, A., Hidrólisis enzimática de bagazo de caña; cinética y diseño preliminar de reactores., Trabajo presentado en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química Bucaramanga, 2007.
6. Howell. JA., & Stuck, JD., Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulose., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 17, 1975, pp. 873-893.
7. Howell, JA.,& Mangat, M., Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis., *Biotechnol Bioeng*, 20, 1978, pp. 847-863.
8. Huang, AA., Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system., *Biotechnol Bioeng*; 17, 1975, pp. 1421-1433.
9. Lehninger, A., *Bioquímica*, Segunda Edición, Editorial Pueblo y Educación, Capítulo 8, 1981, pp. 189-218.
10. Ljunggren, M., Kinetic analysis and modeling of enzymatic hydrolysis and SSF., Department of Chemical Engineering, Lund Institute of Technology, Sweden, 1999.
11. Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K. & Nakao, K. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation., *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 19, 2004, pp. 155–164.
12. Mesa, L., Estrategia Investigativa para la Tecnología de Obtención de Etanol y Coproductos del Bagazo de la Caña de Azúcar., Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2010.
13. Okazaki, M., & Moo-Young, M., Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 20, 1978, pp. 637-663.
14. Peitersen, N., & Ross, EW., Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 21, 1979, pp. 997-1017.

15. Ryu, DDY., Lee, SB., Tassinari, T., & Macy, C., Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics., *Biotechnol Bioeng*, Vol. 24 , 1982, pp. 1047-1967.
16. Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G., *Bioreaction Engineering Principles* Third edition, Chapter 6, 2011, ISBN: 978-1-4419-9687-9.

CAPÍTULO IV

PRODUCCIÓN LOCAL DE COCTELES ENZIMÁTICOS CELULOLÍTICOS EMPLEADOS EN LA HIDRÓLISIS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL

Carmen Amelia Salvador Pinos
Layanis Mesa Garriga
Erenio González Suárez
Juan Esteban Miño Valdés

Introducción

A escala mundial, la biomasa vegetal es considerada una materia prima de enorme disponibilidad que se genera a partir de diferentes fuentes como la agroindustrial (Muñoz et al., 2014). Para el aprovechamiento de esta biomasa se encuentran algunos métodos, entre ellos biológicos en los que intervienen organismos lignocelulolíticos y/o sus metabolitos para modificar la estructura altamente compactada de la celulosa y, también obtener azúcares fermentables a partir de ella. Las enzimas celulolíticas juegan un papel importante en la bioconversión de la biomasa. No obstante, para la utilización de forma masiva de las enzimas celulolíticas, existe una barrera a superar que es la falta de una tecnología eficiente de bajo costo para producirlas, separarlas, purificarlas y posteriormente emplearlas adecuadamente. Además, la biomasa lignocelulósica tiene una estructura difícil de desdoblar porque está conformada de componentes intrincados que le dan rigidez (Pengilly et al., 2015). Son varias las investigaciones desarrolladas para encontrar nuevas enzimas que permitan desdoblar los residuos lignocelulósicos (Salvador et al., 2018 a; Gonzalo et al., 2016; Mesa et al., 2016 b). La búsqueda de nuevos crudos enzimáticos in house, de origen microbiológico, permitirá aprovechar la capacidad natural

para degradar celulosa que tienen algunos microorganismos como *Penicillium* (Mesa et al., 2016 b), aspecto que constituye una alternativa interesante y actual por los logros que se pueden alcanzar a nivel productivo y económico.

Recolección de material lignocelulósico

Para iniciar la búsqueda de microorganismos que manifiesten potencialidad en la expresión de enzimas celulolíticas, se requiere seleccionar sitios con alta diversidad (Nargotra et al., 2016). Por tal razón se seleccionó Yasuní (56°78'33''O; 01°03'84,1''N) y Balzapamba (70°88'61'' E; 98°06'84,1''S). Además por la presencia de especies extremófilas de importancia biotecnológica (Comerio et al., 2014) se recolectaron muestras en la estación Pedro Vicente Maldonado (62°26'47,8''S; 59°44'04''O). Fueron recolectados 120 g de material vegetal en cada una de las localidades muestreadas. Los sitios mencionados en el muestreo pertenecen a la ciudad de Quito, Ecuador.

Obtención de microorganismos productores de celulasas

La metodología empleada fue la búsqueda de actividades celulolíticas. Esta metodología fue utilizada, en el Laboratorio de Bioindustria del Centre Wallon de Biologie Industrielle, de la Facultad Gembloux Agro-Bio-Tech. Unité Bioindustries de la Université de Liège (Bélgica) (CWBI, 2009).

Se aislaron 108 colonias de bacterias, 60 de levaduras y 70 hongos, que mostraron diferencias morfológicas macroscópicas. De las 17 cepas evaluadas se comprobó que 8 de ellas presentaron actividad cualitativa en CMC y de éstas, 5 fueron las que exhibieron los halos de degradación más altos, siendo el rango mayor 6,82 mm para la cepa Bal 3. En los ensayos cuantitativos que miden la cantidad de glucosa producida se determinó que el hongo *Scopulariopsis*

brevicaulis produjo valores de glucosa superiores a 0,01 g/mL en medio carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa cristalina y generó 0,39 g/mL sobre papel filtro. Se encontró que la bacteria proveniente de la Antártida (Ant 12) no degradó la celulosa cristalina, lo que muestra la carencia de exoglucanasas. La bacteria Bal 3 posee todo el set de enzimas y produjo valores de 0,05 g/mL para CMC, en celulosa cristalina presentó valores de 0,02 g/mL y sobre papel filtro los valores fueron de 0,05 g/mL. Este hallazgo es interesante porque es poco común encontrar bacilos que degraden sustratos celulósicos, debido a que la mayoría de *Bacillus subtilis* no poseen todo el set de enzimas para degradar la celulosa a glucosa (Balasubramanian et al., 2014).

Identificación de las especies de Hongos y Bacillus Bal 3

Las especies de bacterias y hongos fueron identificadas morfológicamente empleando las técnicas de Koneman (2004) y bioquímicamente, mediante las pruebas API 50 CHBE (Biomeriux, 2016) para la bacteria y el método de tinción para hongos de Gamboa (2018). La identificación molecular ha sido realizada empleando el kit de purificación Pure Link Genomic DNA (Invitrogen). Los cebadores empleados para la secuenciación de la región 16S ARNr fueron el 8 Forward AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y el 1492 Reverse (s) GGTTACCTGTTACGACT. Las secuencias en pares de bases (bp) Forward y Reverse fueron alineadas empleando el Database GenBank usando el Basic Local Alignment Search Tool (Blast). De acuerdo a estos análisis, Bal 3 y Ant 12 pertenecen a la especie *Bacillus subtilis*, que no posee patogenicidad y el hongo a la especie de *Scopulariopsis brevicaulis*, que causa tiña micótica (SMI, 2018). Adicionalmente, se confirmó molecularmente que la especie bacteriana es *Bacillus subtilis*.

Obtención de crudos enzimáticos celulolíticos en el laboratorio

Los hongos son los principales productores de celulasas sin embargo en los últimos años también se ha reportado actividad en las bacterias y actinomicetos (FAO, 2018). Las bacterias tienen un alta tasa de crecimiento en comparación con los hongos por lo tanto tienen un buen potencial lo que justifica que sean utilizadas en la producción de celulasas, no obstante, la aplicación de bacterias en la producción de celulasas es reducida (Sethi et al., 2013).

Para la primera obtención de los crudos enzimáticos celulolíticos a partir del hongo y de la bacteria se emplearon 2 matraces Kimaxn de 1 000 mL y se colocaron 3,39 g de CMC, 1 g de celulosa cristalina, se aforó con agua peptonada y se esterilizó el medio. El pH de la solución fue de 6,1. Se inoculó 0,012 g peso seco de la cepa de *Bacillus subtilis* correspondiente a $2E^4$ UFC y en el otro matraz 0,02 g peso seco de las esporas de *Bacillus subtilis* $3E^5$ UFC/g de las esporas de *Scopulariopsis brevicaulis*. El peso seco fue medido de acuerdo a la metodología empleada por Coombs et al., (1926), la misma ha sido empleada por Londoño (2018) en estudios cinéticos. En este medio de cultivo del microorganismo, se filtraron los crudos enzimáticos, empleando una membrana millipore 0,45 μm y se midió la actividad FPAasa por la acción de las unidades de enzimas sobre el papel filtro (UPF). Se encontró 870 ml de crudo de hongo con una actividad de 0,25 UPF/mL y 920 mL de crudo de bacteria, con una actividad de 0,5 UPF/mL, siendo estas actividades más altas que las reportadas por Manjarrés (2015) que alcanzaron valores de 0,1 UPF/mL pero son más bajas a las reportadas por Ramos (2018), en las que se encuentran 60 UI/g_{MS} de FPasa en sustrato bagazo de caña.

EVALUACIÓN DE LOS CRUDOS ENZIMÁTICOS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Se realizó una tercera prueba de degradación en bagazo de caña de azúcar para evaluar la producción de glucosa a partir de crudos enzimáticos celulolíticos. Para efectuar la hidrólisis enzimática se ejecutaron los tratamientos con ácido H₂SO₄ (Mesa et al., 2016 a) y el Organosolv (Sidiras et al., 2015). La composición del bagazo de caña de azúcar que se observa antes y después del pretratamiento, está reflejada en la tabla 1.

Tabla 1. Características del bagazo de caña de azúcar (% en peso)

BAGAZO	Glucosa Xilosa Lignina		
	%	%	%
Inicial, antes del pretratamiento	37,00	10,93	26,18
después del pretratamiento	46,88	29,66	18,51
después de la hidrólisis enzimática	67,29	06,07	16,12

Fuente: elaboración propia (2018)

Planificación experimental del estudio de hidrólisis enzimática

Se desarrolló una estrategia de evaluación y optimización que empezó por un estudio de mezclas, aplicando el método de Enrejado Simplex (Scheffe, 1985) para mejorar el rendimiento de hidrólisis enzimática a partir de un coctel de celulasas de origen bacteriano y fúngico (aisladas a partir de microorganismos nativos de Ecuador) y de una enzima comercial *Aspergillus niger* (Sigma 39 UI/g). Para la obtención de los modelos del proceso tecnológico de hidrólisis enzimática con la mezcla de enzimas nativas y comerciales se empleó el diseño experimental de Plackett–Bürman (1945) combinado con el de Box-Hunter (1961), lo que han sido empleados con éxito por González (1986).

Para el desarrollo del estudio de hidrólisis enzimática en el bagazo de caña de azúcar se partió, como referencia, de la metodología empleada por Mesa (2010). Las variables independientes que fueron evaluadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Variables independientes tomadas para la hidrólisis enzimática

VARIABLES	Código	Menor	Mayor
Temperatura (°C)	X ₁	35 (-)	50 (+)
Carga enzimática (UPF)	X ₂	10 (-)	25 (+)
Velocidad de agitación (rpm)	X ₃	150 (-)	200 (+)
Tiempo (h)	X ₄	15 (-)	24 (+)
% de sólidos (p/v)	X ₅	5 (-)	8 (+)
Tween 80 (% en base a fibra)	X ₆	0,1 (-)	0,2 (+)

Fuente: elaboración propia (2018)

Como variable dependiente o parámetro de respuesta de la hidrólisis se midió la concentración de glucosa, empleando cromatografía líquida de alta resolución, mediante un HPLC Sugar Pack Column (Waters USA) a 80°C; 0,001 M EDTA, con una tasa de flujo de 0,5 mL/min y un detector de índice de refracción a 40°C.

A partir de la concentración de la glucosa, se calculó su rendimiento en % en peso

(g glucosa/100 g de materia prima).

Se pudo observar que para el hongo *Scopulariosis brevicaulis* los rendimientos de glucosa encontrados fueron de (0,53 g glucosa /100 g bagazo), por lo tanto el hongo se descartó. Por el contrario la bacteria *Bacillus subtilis* presentó un rendimiento del (11,96 g glucosa / 100 g bagazo), en el ensayo 7. Las condiciones del ensayo 7 fueron temperatura de 35°C, carga enzimática de 25 UPF, velocidad de

agitación de 200 rpm, 8% de sólido y 0,1 g de Tween 80 y 15 h el tiempo de hidrólisis.

Al respecto es necesario incorporar la sacarificación enzimática como un proceso eficiente y barato en la selección de cepas, debido al comportamiento exitoso de los hongos en sustratos sintéticos e ineficiente en relación a sustratos naturales como el bagazo de caña de azúcar, lo que ha sido reportado por Jain et al., (2018).

Cinética del crecimiento de *Bacillus subtilis* para la producción de un crudo enzimático con actividad celulolítica en fermentación discontinua

Inicialmente se aplicó el modelo de Monod para describir la velocidad de crecimiento específica de la cepa, la constante de saturación y el tiempo de generación. El ajuste de los parámetros cinéticos del modelo a partir de los datos experimentales se realizó por medio de la linearización de los resultados empleando el método de Lineweaver-Burk (Thonard, 2009), en el que se encontró un $R^2 = 0,85$. Como se observa en la figura 2, $\mu_{max} = 0,043 \text{ h}^{-1}$ y $K_s = 0,092 \text{ g/mL}$.

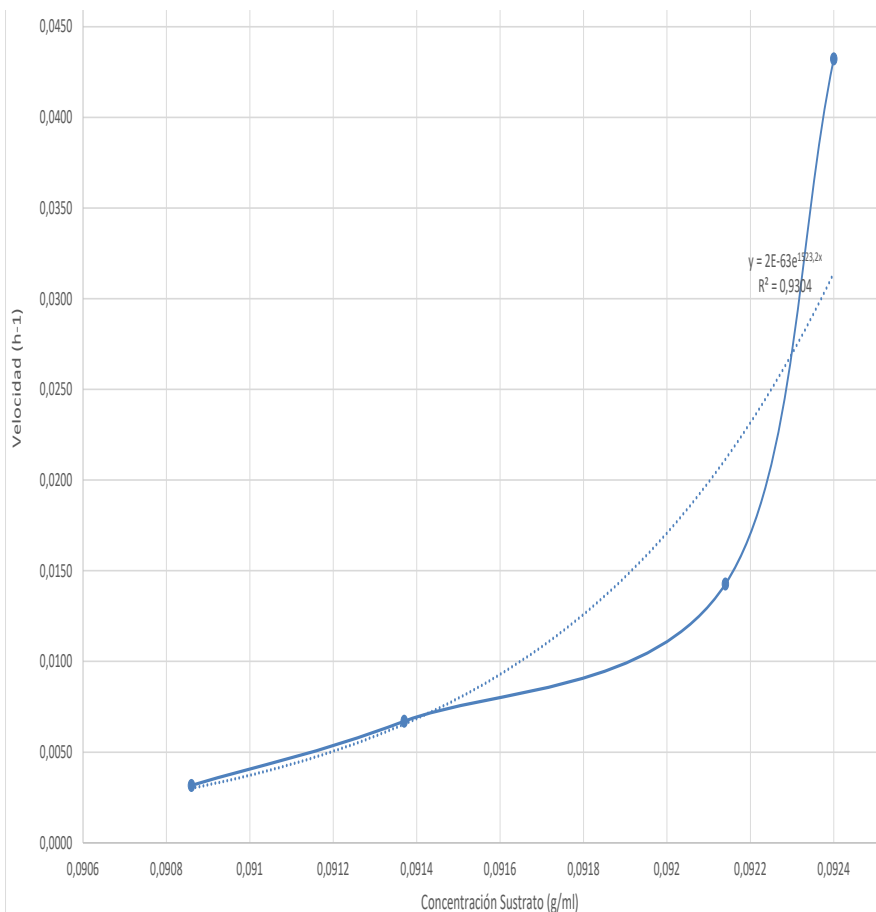


Figura 1. Velocidad de la reacción enzimática en función del sustrato
Fuente: elaboración propia (2018)

Después de calcular los valores de μ y μ_{\max} , se calculó el tiempo de generación (tg) mediante la ecuación:

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu}$$

mostrando como resultado el tiempo de generación para *Bacillus subtilis* (Bal 3) que es de 15,40 horas.

A partir de la información generada en el laboratorio, se procedió a predecir la cantidad de biomasa bacteriana que fue determinada a través de la ecuación de Velhurs-Pearl (Gatto, 1988). El consumo del sustrato fue modelado, usando la expresión propuesta por Pirt (1975). Para el cálculo del producto, se aplicó un estudio clásico de Luedeking et al., (1959).

Partiendo de la información generada en el ensayo 7 de la hidrólisis enzimática y aplicando las ecuaciones mencionadas se realizó un balance de masas en el que se determinó que se requiere una producción de 2,3 ton de crudos enzimáticos celulolíticos de *Bacillus subtilis* Bal 3, para obtener la cantidad de glucosa necesaria que fermenta a 500 hL/día. Los crudos enzimáticos celulolíticos son producidos por la bacteria *Bacillus subtilis* mediante el esquema de trabajo que se muestra en la figura 2, considerando un modelo de cultivo discontinuo.

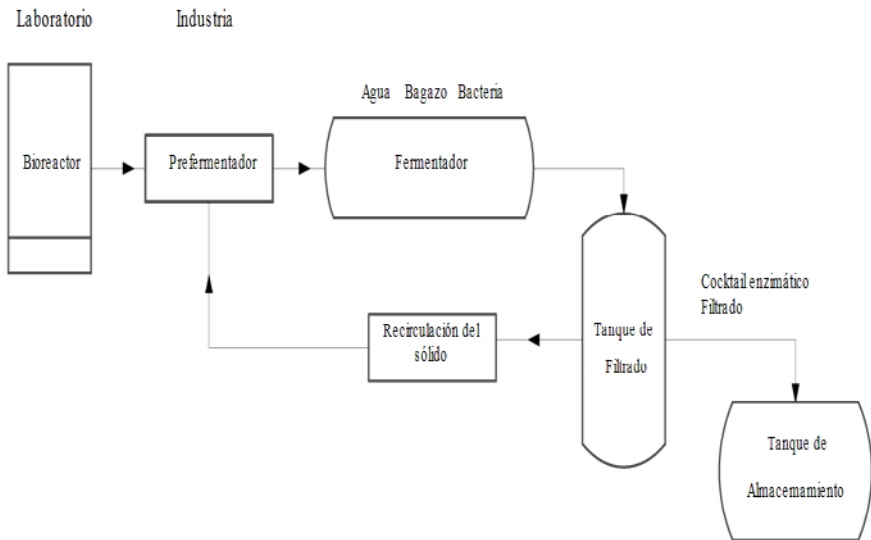


Figura 2. Producción de crudo enzimático de la bacteria *Bacillus sp.*

Análisis técnico económico de la producción de celulasas

El salto entre un bioreactor a escala de laboratorio y la industria, debe realizarse a partir de la implementación de una planta piloto (Peters y Timmerhaus, 1981). Las condiciones fueron las mismas que se mantuvieron en este estudio en la etapa del prefermentador y del fermentador. Se calcularon los indicadores dinámicos **VAN** (Valor Anual Neto), **TIR** (Tasa Interna de Retorno) y **PRD** (Período de Recuperación de la Inversión). Se consideró la producción de 50 000 L etanol/día.

La obtención de etanol es ampliamente conocida y en este campo se realizan actualmente investigaciones (Chandel et al., 2011). Para el cálculo de los costos de inversión del equipamiento, se emplearon valores reales de equipos instalados industrialmente con características similares.

Determinación de los valores inversionistas para la producción de crudos enzimáticos de *Bacillus subtilis*

El valor de las inversiones para la obtención del crudo enzimático, presenta un costo directo de 448 796 USD que aunque es un monto considerable, por un lado permite que parte de la inversión se quede en el país por medio del pago de mano de obra y compra de materia prima, ver en la tabla 3.

Tabla 3. Inversiones para la producción con enzima de *Bacillus subtilis*

Concepto	Estimado (USD)	Cantidad (USD)
I Costos directos	A+B+C+D	448 796
II Costos indirectos	A+B+C	80 311
III Capital fijo invertido	I+II	529 107
IV Capital de trabajo	10% CTT	58 790
V Capital total	III+IV	587 896

En la tabla 4 se muestra el Costo Total de Producción (CTP) = 827 578 USD/año.

Tabla 4. Costo total de producción de enzimas de bacterias

Concepto	Costo (USD/año)
Gastos de fabricación	444 289
Gastos Generales.	403 289
Costo Total de Producción	827 578

(tomando en cuenta la materia prima a utilizarse)

En la tabla 5 se muestran los ahorros de los costos de producción al evitar pagos al exterior por importaciones, debido a que se logran los suministros necesarios en Ecuador que representan el 81%, lo que resulta significativo por la carga simbólica de la autosuficiencia de un país y la circulación de capitales en el mercado interno.

Tabla 5. Costo de producción del crudo enzimático de *Bacillus subtilis*

Bal 3		
Origen	Precio (USD)	Por ciento (%)
Importado	158 351	19,13
Nacional	669 227	80,87
Insumos totales	827 578	100

(de acuerdo a procedencia de gastos)

El período de recuperación de la inversión (PRD) será de 6 años a partir de la operación de la planta de producción de enzimas celulolíticas de la bacteria *Bacillus* ver figura 4.

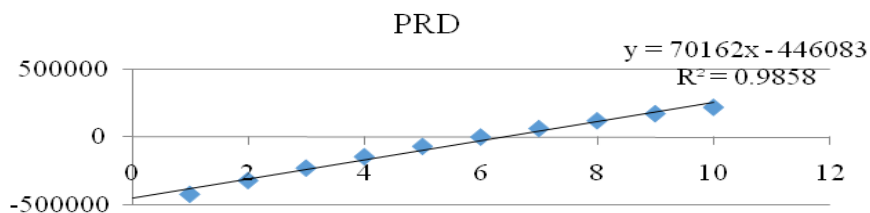


Figura 3. Período de recuperación de la inversión en el proceso de producción de crudos enzimáticos de *Bacillus subtilis*

El PRD podría determinar la no conveniencia de su ejecución, debido a que el tiempo de inmovilización del dinero, es extenso, sin embargo la inversión se queda en el país. La recuperación de la inversión debería ocurrir en 3 años o menos; se obtiene un VAN de \$198 386 y un TIR de 19%.

Hidrólisis de las mezclas entre crudos enzimáticos nativos y enzimas comerciales

Aplicando el diseño Plackett-Bürman para la mezcla de enzima comercial y enzimas nativas de bacteria, el rendimiento de glucosa más alto es de 15,64 g/100 g en el ensayo 2. A partir de los datos expuestos, se calcularon los coeficientes de rendimiento que se detallan en la tabla 6, donde se aplicó la ecuación:

$$E_0 + \frac{1}{2} [E_1 x_1 + E_2 x_2 + E_3 x_3 + E_4 x_4 + E_5 x_5 + E_6 x_6]$$

Tabla 6. Coeficiente de rendimiento de glucosa con la mezcla de enzima comercial y crudos enzimáticos de *Bacillus subtilis*

E ₁	E ₂	E _F	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆
2,73	2,31	-0,04	-0,36	4,32	-6,1	-0,58

Del valor de las t calculadas, se descartaron las variables X_3 y X_6 , que corresponden a la velocidad de agitación y Tween 80 que no resultaron estadísticamente significativas en los rangos evaluados sobre los parámetros de respuestas en la hidrólisis del crudo enzimático en el estudio. Con respecto al uso del Tween 80, pese a que varios estudios lo recomiendan, se ha encontrado según Aswathy et al., (2010), que al aumentar la carga enzimática de celulasa hasta 16 UPF/g sustrato pretratado, el efecto del Tween 80 sobre la hidrólisis enzimática decrece.

Diseño de box-hunter para mezcla de enzima comercial y crudos enzimáticos de bacteria

Se planteó hacer el diseño factorial 2^{4-1} , bajo condiciones ajustadas a los datos obtenidos empíricamente en los experimentos de hidrólisis enzimática de la mezcla de enzimas comerciales y crudos enzimáticos de bacteria, para lo cual se utilizó un factor de confusión: $X_5 = - X_1 X_2$, que generó una relación de: $1 = - X_1 X_2 X_5$.

Se empleó para el modelo de Box-Hunter la ecuación:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_4 X_4 + b_5 X_5 + b_{24} X_2 X_4 + b_{45} X_4 X_5$$

Donde: $b_1 = \beta_1 - \beta_{25}$

$b_2 = \beta_2 - \beta_{15}$; $b_4 = \beta_4 - \beta_{1245}$; $b_5 = \beta_5 - \beta_{12}$; $b_{24} = \beta_{24} - \beta_{145}$; $b_{45} = \beta_{45} - \beta_{124}$.

La varianza de reproducibilidad $\sum(Y) 2/8$, obtenida fue de 0,53.

Posteriormente fueron calculados los coeficientes para la mezcla de enzimas comerciales y crudos enzimáticos nativos de Ecuador, ver tabla 7.

Tabla 7. Coeficientes de rendimiento de glucosa de la hidrólisis enzimática con la mezcla de enzima comercial y el crudo enzimático de bacteria *Bacillus subtilis*

b_1	b_2	b_4	b_5
1,36	1,158	2,1	-3,05

Se demostró que los factores tiempo (X_4) y porcentaje de sólido (X_5) son más significativos si se comparan con la temperatura (X_1) y carga enzimática (X_2). Resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Domínguez (2003) al constatar que como efecto de la concentración de celulasa (Celluclast CCN y Novozym TN 188) en la hidrólisis de un 2% (p/v) de chopo pretratado hidrotérmicamente, no se observaron grandes diferencias en los porcentajes de conversión cuando se emplean concentraciones entre 15 y 25 UPF/g de celulosa. El tiempo X_4 puede ser trabajado a nivel industrial, en el nivel más bajo, lo que constituye una ventaja, porque se eliminan los tiempos ociosos y aumenta la productividad. En relación a X_5 , es conocida la fuerte relación entre el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática (Ageitos, 2011). Este comportamiento cinético es conocido como curva de saturación hiperbólica (en el caso de las enzimas michaelianas), el exceso de sustrato limita la formación del complejo enzima-sustrato.

De acuerdo con estos resultados la prueba de Fisher calculada $F_c 2,8$ fue $= 0,44/0,5354 = 0,82$, valor menor que el tabulado $F_{2, 4} = 1,86$ (Perry y Chilton, 1973) y considera que el modelo es adecuado para predecir los resultados.

Aplicación del método de optimización directa en el análisis económico de evaluación de las mezclas

En esta etapa el objetivo es optimizar el costo de la tecnología, mediante el modelo obtenido el rendimiento de glucosa en 100 g

materia prima para diferentes proporciones de mezclas entre enzimas comerciales y nativas.

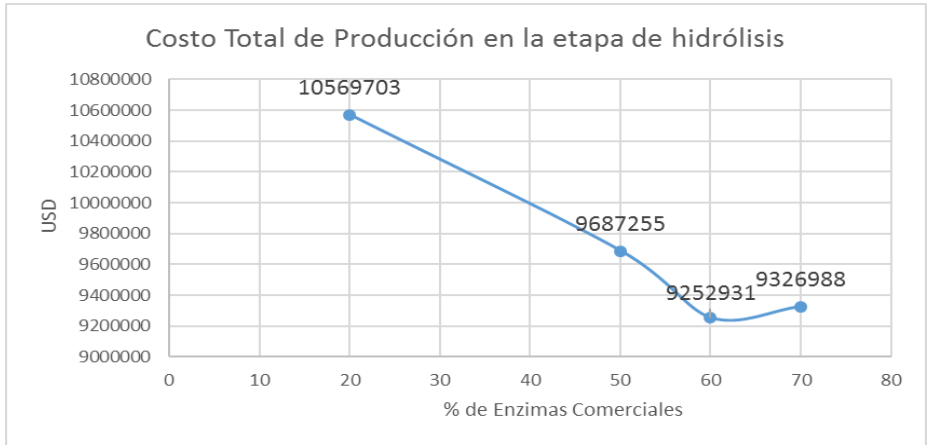


Figura 4. Costo Total de Producción del uso de enzimas comerciales en la etapa de hidrólisis. **Fuente:** elaboración propia (2018)

Según se refleja en el gráfico de la Figura 4, y de acuerdo al comportamiento de la curva, se buscó una ecuación cuadrática que representara el comportamiento de la curva, la ecuación encontrada fué:

$$y = 2541,9 x^2 - 323042 x + 2.10^{0,7}$$

Donde $R^2 = 1$

Derivada esta ecuación para determinar el porcentaje óptimo de enzimas comerciales; se obtiene $x = 63,55$. Es decir 63,5% de enzima comercial y 36,5% de crudos enzimáticos nativos. Esto es acorde con la propuesta de Consorti (2015), de hacer un balance entre las enzimas en un crudo enzimático constituye una aproximación promisoría para optimizar la hidrólisis enzimática y que Da Silva

(2016) realiza mezclas de celulasas hechas en el laboratorio lab-made y comerciales, como se propone.

Cinética enzimática en bagazo de caña de azúcar

Para este estudio se empleó la metodología de Li et al., (2004) determinándose que K_M es de 40,98 g/L. Este valor muestra que existe más afinidad por el sustrato que el resultado alcanzado por Albernas et al., (2015) en bagazo de caña de azúcar, en el que se obtiene un K_M de 217, 49 g/L; que indica que la afinidad entre la mezcla de crudos enzimáticos nativos con enzimas comerciales presenta ventajas. Esto responde a que el set enzimático es más completo y permite degradar mejor la celulosa (Chander et al., 2011). La V_{max} que se estableció es de 0,3 g L⁻¹ min⁻¹ y una constante de inhibición similar de 3 g L⁻¹, Sin embargo, Carvalho (2013) obtiene una V_{max} de 0,1 g L⁻¹ min⁻¹ con una constante de inhibición similar de 3,34 g L⁻¹, empleando enzimas comerciales, un pretratamiento con vapor y una posterior deslignificación. Mientras menor es el valor de K_i , más fuerte es la unión del inhibidor con la enzima, que no permite esté disponible para unirse al sustrato. Los valores cinéticos encontrados permiten constatar que una parte del uso de enzimas comerciales puede ser sustituida por enzimas producidas *in-house*.

ESTRATEGIA PARA EL RECICLAJE DE LAS ENZIMAS

En la etapa de hidrólisis enzimática se evaluó, experimentalmente, la posibilidad de recuperar la mezcla de enzimas empleando la metodología de Mesa (2016 a), y Salvador et al., (2018 a).

Se realizaron los balances de UPF con reciclaje para la mezcla de enzimas comercial y crudos enzimáticos nativos, se hizo la operación con enzimas frescas, recicladas una vez y hasta 2 veces para la obtención de (500, 1 000 y 1 500) hL etanol/día.

Para la primera operación: se necesitan $6,5 \cdot 10^9$ UPF/día. El costo anual por uso de la mezcla de enzimas en la proporción optimizada es de 2 740 983 USD/año.

En la segunda operación se necesitaron igualmente: $6,5 \cdot 10^9$ UPF/día, que serán aportadas de la mezcla de enzimas recicladas con un rendimiento menor equivalente a 0,37 y además la mezcla de enzimas frescas. Mientras que el rendimiento de la mezcla de las enzimas fresca fue de 0,47 por lo que el aporte para las UPF requeridas sería entonces las aportadas por las enzimas recicladas y una necesaria cantidad de enzimas frescas, a saber, el balance para las requeridas en UPF/día fue:

$$\text{Mezcla Enzimas requeridas} = A (0,37/0,47) 25 \text{ (UPF/g)} + B 25 \text{ (UPF/g)}$$

Siendo:

$$A = 34\ 160\ 000 \text{ g/día}$$

$$B = (751\ 520\ 000 \text{ UPF/día}) / (25 \text{ UPF/g}) = 30\ 060\ 800 \text{ g/día}$$

Los costos de enzimas reciclando una vez se reducen en la operación de reciclado a: 8 040 USD/día y para 300 día/año el costo es 2 412 065 USD/año. En una tercera operación se estaría reciclando por segunda vez una cantidad A de enzimas con un rendimiento de 0,13 y por primera vez una cantidad B de enzimas, siendo entonces el balance de UPF/día el siguiente:

$$A (0,37/0,47) 25 \text{ UPF/g} + B (0,13/0,37) 25 \text{ UPF/g} + C 25 \text{ UPF/g.}$$

Para: $A = 34\ 160\ 000 \text{ g/día}$, y $B = 30\ 060\ 800 \text{ g/día}$.

$$C = (854 \cdot 10^6 \text{ UPF/día} - A (0,13/0,47) 25 \text{ UPF/g} - B (0,37/0,47) 25 \text{ UPF/g}) / 25 \text{ UPF/g.}$$

$$C = (854.10^6 \text{ UPF/día} - 34,16.10^6 \text{ g/día (0,27)} \text{ 25 UPF/g} - 14 \text{ 347 200 (0,78)})$$

$$C = 463 \text{ 209 600/25} = 18 \text{ 528 384 g/día.}$$

Lo que implica que los costos de enzimas reciclando otra vez se reducen en la operación del segundo reciclado a: 4 956 USD/día, y para 300 día/año tienen un CTP de 1 486 709 USD/año.

Los indicadores dinámicos demuestran que el tiempo de recuperación del capital invertido es más rápido, a medida que aumenta la capacidad de producción, ver tabla 8.

Tabla 8. Indicadores económicos para la recuperación de la inversión

INDICADORES	PRODUCCIÓN		
	500 (hL/día)	1 000 (hL/día)	1 500 (hL/día)
Económicos			
Dinámicos			
VAN (USD)	402 859,00	1 558 855.96	11 147 785.25
TIR (%)	14	20	21
PRD (años)	8	6,1	5,9

Fuente: elaboración propia (2018)

Aún es muy largo el tiempo de recuperación de la inversión, sin embargo en la tabla 9 se observan los impactos positivos del reciclaje a partir de una mezcla de enzimas comerciales y crudos enzimáticos celulolíticos recuperados en el proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para la obtención de etanol de segunda generación.

Tabla 9. Impactos ambientales y sociales de la investigación

AMBIENTAL	SOCIAL
El bagazo no compite con biomasa alimenticia	Contribuye a que se cumpla el Objetivo 12 de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas, que plantea garantizar modalidades de consumo y producción sostenible
Disminuye lixiviados que contaminan las aguas subterráneas	Sustentable para crear ciudades resilientes
Promueve la biotecnología blanca	Favorece las políticas públicas a favor del reciclado, de materiales y su empleo por parte de las compañías y empresas con una disminución de costos
Promueve indirectamente la conservación de la biodiversidad para hacer uso sostenible de ella	Manejo de desechos que puede converger con otras industrias y que impulsará indirectamente el desarrollo de la matriz productiva y energética de los países en vías de desarrollo

Conclusiones

- Es factible la producción de enzimas nativas, con insumos nacionales en cuanto a materia prima, lo que tiene un impacto positivo económico, técnico y social.
- La cepa de *Bacillus subtilis*, posee el juego de enzimas celulolíticas (endobetaglucanasas y exoglucanasas) y betaglucosidasa, que desdoblan la celulosa, formando un crudo enzimático que permite

su uso con tecnología de bajo costo en relación a los crudos enzimáticos de enzimas comerciales.

- Resulta económica la sustitución parcial de las enzimas comerciales por nativas de Ecuador, aprovechando las características de la hidrólisis de la enzima comercial, combinando un 63% de enzimas comerciales y el 37% de enzimas nativas, lo que permite reducir los costos de producción por litro de etanol.
- La metodología del estudio técnico económico del reciclaje es efectiva porque permite comprender que aunque el reciclaje de las enzimas de la mezcla es factible de ser realizado técnicamente, su implementación aún requiere disminuir el período de recuperación de la inversión, por lo tanto el análisis técnico económico sustentando en las capacidades que deben tener los equipos en una industria para la producción de etanol permite distinguir los futuros retos del estudios en este contexto.
- La optimización mediante los diseños y modelos propuestos permitió encontrar la región del óptimo resultado para la hidrólisis enzimática a partir de la mezcla de enzimas comerciales y nativas, por lo que se propone implementar una planta piloto bajo las condiciones encontradas en este estudio.

Referencias bibliográficas

1. Ageitos, José Manuel. (2011). *Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menox extracelular(EPr) de Bacillus licheniformis*. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
2. Albornas, Y., Corsano, G., Mesa, L., Santos, R., González, E. (2015). *Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pre tratado*. AFINIDAD LXXII, pp127-132.
3. Aswathy, U., Sukumaran, R., Deni, L., Rani, R., Pandey, A. (2010). *Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of*

- enzymatic saccharification strategy*. *Bioresource Technology*,101, pp 925-930.
4. Balasubramanian, N., Simões, N. (2014). *Bacillus pumilus S124. A carboxymethyl cellulase; athermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility*. *Int J Biol Macromol*, 67, pp 132– 139.
 5. Box, G., Hunter, J. (1961). *The key k-y Fractional factorial Desing en Techometrics*. Vol3, J. Disponible en: <https://amstat.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00401706.1961.10489951>
 6. Carvalho, M., Sousa, R., Rodríguez U., Suarez, C., Rodrigues, D., Giordano, R., Giordano, R. (2013). *Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30 (3), July - September, pp. 437 – 447.
 7. Chandel, A., Singh, O., Venkateswar, R. (2011). *Bioconversion of novel substrate Saccharum spontaneum, a weedy material, intoethanol by Pichia stipitis NCIM3498*. *Bioresour Technol*, 102, pp 1709–1714.
 8. Chander, R., Rishi, G. y Ajay, S. (2011). *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Review Article*. *Enzyme Research*, pp10.
 9. Comerio, R., Tarapow, M., Vázquez, S., Mac Cormack, W. (2014). *Buscando bacterias sicrófilas en la Antártida*. *En Ciencia Hoy*.Vol 17 (99). En: https://www.researchgate.net/publication/260790459_Buscando_bacterias_sicrofilas_en_la_Antartida
 10. Consorti, B., Sindelia, F., Carvalho, A. (2015). *Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail*. *Bioresource Technology*,(187), pp173-181.
 11. Coombs, H., Stephenson, M. (1926). *The gravimetric estimation of bacteria and yeast*. *Biochemical Laboratory*, Cambridge.

12. CWBI (2009). *Centre Wallon de Biologie Industrielle*. Université de Liège. Facultad Gembloux, Agro-Bio-Tech. Unité Bioindustries. Procédés de laboratoire.
13. Da Silva, A., Sant'Ana, F., Ballesteros, I., Paloma, M., Ballesteros, M. (2016). *High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations*. Journal Process Biochemistry, 51 (10), pp1561-1567.
14. Domínguez, O. (2003). *Efectos de los productos de degradación originados por la explosión de vapor de biomasa de chopo sobre kluyveromyces marxianus*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Memoria presentada para optar por el grado de Doctor.
15. FAO. (2018). *Caña de azúcar, principal producto agrícola de Ecuador*. Disponible en: www.fao.org/faostat/es/#home.
16. Gatto, M., Muratori, S., Rinaldi, S. (1988). A functional interpretation of the logistic equation, Ecol. Modell. 42 (2), pp155–159.
17. González, E., Ramos, F., Ribot, A., Peralta, L. (1986 a). *Combinación de los métodos de diseño experimental en la minimización de los ensayos de una investigación*. Tecnología Química, 11, pp17-21.
18. Gonzalo, D., Mohamed, H., Habib, M., Fraaije, W. (2016). *Bacterial enzymes involved in lignin degradation*. Journal of Biotechnology 236, pp110–119.
19. Koneman, E. (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 5ta impresión. pp956-969.
20. Li, Ch., Makoto, Y., Naoki, T., Kimitoshi, F., Katsumi, N. (2004). *Kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation*. Biochemical Engineering Journal 19, pp 155–164.

21. Londoño, P. 2018. *Procedimientos de laboratorio. Laboratorio de Investigación*. Facultad de Ingeniería Química. Universidad del Ecuador.
22. Luedeking, R.y Piret, E. (1959). *A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH*. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, 1(4), pp393-412.
23. Manjarrés, K., Piñeros, J. y Rodríguez, E. (2011). *Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de Aspergillus y Trichoderma en fase sólida sobre residuos de palma*. Bioagro 23(1) pp19-26.
24. Mesa, L. (2010). *Estrategia investigativa para la tecnología de obtención de etanol y coproductos del bagazo de la caña de azúcar*. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas.UCLV.
25. Mesa, L., González, E., Cara, C., Mussatto, S. (2016 a). *An approach to cellulase recovery from enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse with high lignin content*. Biocatalysis and Biotransformation, pp1-11.
26. Mesa, L., Salvador, C., Herrera, M., Carrazana, D., González, E. (2016 b). *Cellulases by Penicillium sp. in different culture condition*. Bioethanol 2, pp84–93.
27. Muñoz, D., Pantoja, A., Cuatin, M. (2014). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales como combustible y biorefinería*. Revista Biotecnología Universidad del Cauca, 12(2), pp10-19.
28. Nargotra, P., Surbhi, V., and Bigender, K. (2016). *Cellulase production from Bacillus subtilis SV1 and its application Potential for saccharification of ionic liquid pretreated pine needle biomass under one pot consolidated bioprocess*. Fermentation. pp2-19.
29. Pengilly, C., García, M., Diedericks, D., Brienzo (2015). *Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by*

- combinations of cellulase and endo-xylanase*. Fuel, 154, pp 352-360.
30. Perry, R., y Chilton, C. (1973). *Chemical Engineers Handbook*. Ed., McGraw Hill, New York, pp1974-1822.
 31. Peter, M., y Timmerhaus, K. (1981). *Plant Design and Economics for chemical engineers*. Ed., Mc GrawHill International, pp396-412.
 32. Pirt, J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell. Scientific Publications, Oxford. pp74-75.
 33. Plackett, R., Bürman, J. (1946). *The design of multifactorial experiment*. Biometrika, 33, pp305-325.
 34. Salvador, C., González, E., Mesa, L., Rojas, M., Batallas, F., Pérez, A., Concepción, D. (2018 a). *Empleo de biocatalizadores en la degradación de material lignocelulósico: Principales Impactos*. Aceptado para publicar en: Revista FIGEMPA, 8.
 35. Salvador, C., Mesa, A., Mesa, L., González, E. (2018 b) . *Recycling of commercial enzymes in the production of second-generation ethanol*. Revista Centro Azúcar. 45 (3), pp 78-90.
 36. Sethi, S., Aparna, D., Lal, Gupta., Saksham, Gupta. (2013). *Optimization of cellulose production from Bacteria Isolated from soil*. Biotechnology, pp1-7.
 37. Sidiras, D., y Salapa, I. (2015). *Organosolv pretreatment as a major step of lignocellulosic biomass refining*. Conferences international. http://dc.engconfintl.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1013&context=biorefinery_I. Batallas, F., Salvador, C., Villavicencio, J., González, H., González, E. (2018). *Analisis of the hydrolisis of sugar cane bagasse to obtain ethanol using a cocktail of native and comercial enzymes*. Aceptado para publicar en: Revista Centro Azúcar. 45(4).
 38. SMI. (2018). Stantards for microbiology investigations (SMI). Disponible en: www.gov.uk

39. Thonard, P.(2009). *Industrie d' extraction et fermentation*. Texto de Maestría en Biotecnología y Biología aplicada. Facultad de Gembloux. Universidad de Lieja. Bélgica.

CAPITULO V
CINÉTICA Y DISTRIBUCIÓN DE PRODUCTO EN LA ACETILACIÓN
BÁSICA ACUOSA DE ALMIDÓN DE MANIHOT ESCULENTA CRANTZ
(YUCA)

Omar Pérez Navarro
Erenio González Suarez
Néstor ley Chong
Juan Esteban Miño Valdés

La acetilación como vía de modificación química de almidones

En medio básico, es posible el fraccionamiento de los grupos hidroxilos de las unidades de anhidro glucosa (UAG) del almidón, por liberación del hidrógeno de los enlaces C-O en las posiciones reactivas C₂, C₃ y C₆. El grupo hidroxilo primario C₆, se localiza en la región exterior de la molécula y alcanza mayor reactividad que los grupos secundarios (*Gong et al., 2006*); (*Pushpamalar et al., 2006*); (*Hernández y López, 2007*); (*Wang et al., 2010*).

La reacción de sustitución permite la formación de éteres y ésteres de almidón. El grado de sustitución (GS) indica el número promedio de sustituciones por UAG. El máximo GS alcanzable es 3, coincidiendo con el número de grupos hidroxilo disponibles de acuerdo a la reactividad de los carbonos C₂, C₃ y C₆ (*Miladinov y Hanna, 2000*).

Una vía importante de esterificación es la acetilación (*Prieto-Méndez et al., 2010*). A través de ella, se obtienen almidones acetilados por incorporación de grupos acetilo. Esta sustitución nucleofílica modifica el comportamiento hidrofóbico provocando que los almidones acetilados sean atractivos como aditivos alimentarios (*Carrascal, 2013*).

También son facilitadores de suspensiones acuosas de la industria química y farmacéutica a GS bajos y cuando están altamente sustituidos son utilizados en la industria química, como

termoplásticos y como sustitutos del acetato de celulosa (*De Graaf et al., 1995*); (*Xu et al., 2004*).

La acetilación de almidón en medio básico acuoso ha sido reportada como un método eficaz, cuando se usa anhídrido acético (AA) como agente esterificante y NaOH como catalizador, con mínimo consumo de agentes químicos (*Chiu y Solarex, 2009*); (*Mirmoghtadaie et al., 2009*); (*Salcedo et al., 2016*).

Un estudio cinético de la acetilación de almidón nativo en medio no acuoso, con exceso de AA a 120 °C, durante 4 horas, alcanzó GS de 1,5 para plátano y 2,5 para maíz, pero dicho método requiere consumos elevados de agente esterificante (*Guerra et al., 2008*). La acetilación de almidón gelatinizado de papa en medio básico acuoso de pH= 7,5; empleando como agente esterificante 0,22 mol_{vinilacetato}/mol_{UAG} a 37 °C, durante 0,9 horas, alcanzó un GS= 0,1 y la ventaja de reducir el consumo de agentes químicos y las complejidades asociadas a la recuperación del agente (*De Graaf et al., 1995*).

En la figura 1 aparecen las reacciones que ocurren durante la acetilación en medio básico acuoso. El paso deseado es la sustitución nucleofílica progresiva y preferencial hacia las posiciones C₆, C₂ y C₃. Existe reversibilidad, no deseada, por hidrólisis de los productos acetilados combinada con la hidrólisis del AA competitiva con la acetilación.

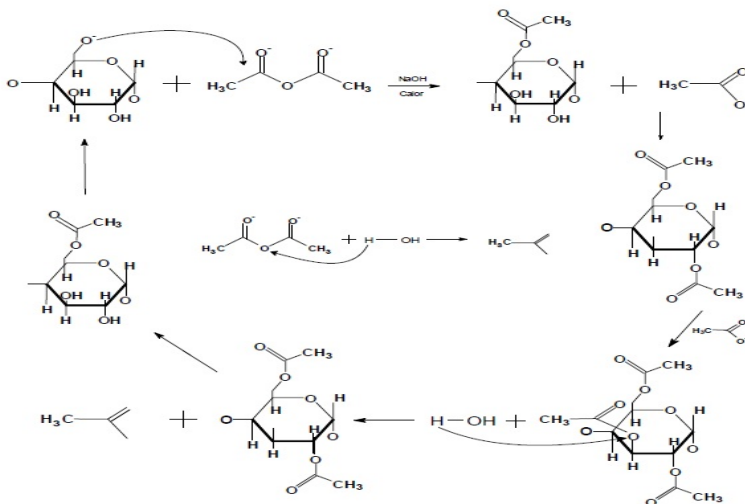


Figura 1. Reacciones presentes en la acetilación del almidón en medio básico acuoso **Fuente:** Xu et al., 2004

En las reacciones no deseadas el medio de reacción hidroliza en paralelo al agente esterificante y a los productos polisustituídos (Chiu y Solarex, 2009). Atendiendo a ello, el proceso tiene tendencia a la reversibilidad, sin embargo se ha demostrado a través de las constantes cinéticas, que en medio básico moderado la velocidad de la acetilación es muy superior a la de los procesos de hidrólisis (De Graaf et al., 1995).

En los reportes asociados a la acetilación se usa muy frecuentemente el GS determinado por titulación, como expresión del avance de la modificación pero no se aprecian referencias directas a la relación de la concentración de acetato de almidón con el GS (Wilkins et al., 2003); (Xu et al., 2004); (Prieto-Méndez et al., 2010); (Olu-Owolabi et al., 2014). Ello constituye una limitante importante en las investigaciones desarrolladas hasta el presente.

La acetilación de almidones de yuca (GS= 0,037) y ñame (GS= 0,058) dispersando el almidón en medio acuoso, a 35 °C, empleado 0,1

$\text{mol}_{\text{AA}}/\text{mol}_{\text{UAG}}$ como agente esterificante y manteniendo el pH entre 8 y 8,4 con NaOH al 3,0 % p/v logra propiedades estructurales y funcionales adecuadas en este material (*Salcedo et al., 2016*). Sin embargo, no se han encontrado precedentes de las expresiones cinéticas para la acetilación básica acuosa de almidón de yuca usando como agente modificante el AA y los correspondientes efectos térmicos sobre las mismas.

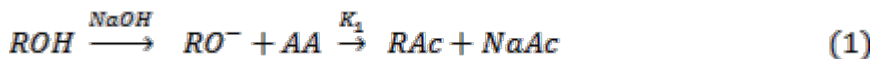
El promedio de sustituciones por UAG alcanzado durante la esterificación y la acetilación es superior en los almidones gelatinizados que en los nativos. Ello se debe a la acción positiva del fraccionamiento molecular sobre la facilidad de la sustitución nucleofílica. La combinación de ambos métodos es una alternativa efectiva que ha sido reportada con buenos resultados para la carboximetilación (*Lefnaoui y Moulai-Mostefa, 2015*) y para la acetilación (*De Graaf et al., 1995*).

Atendiendo a los aspectos anteriores y con fines de diseño de las alternativas tecnológicas para la acetilación básica acuosa de almidón nativo y pregelatinizado de yuca; proveniente de variedades cosechadas con fines industriales, como la INIVIT Y-93-4, es necesario determinar las expresiones cinéticas completas para este proceso.

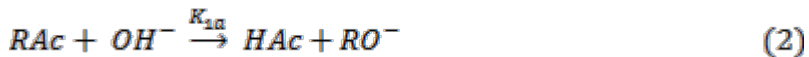
Determinación de la cinética de la acetilación básica acuosa de almidón de yuca

Selección del mecanismo de reacción

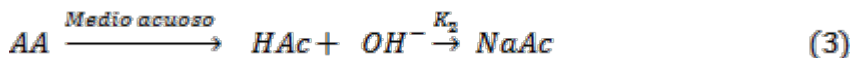
En medio básico las UAG, que pueden denotarse estructuralmente como (ROH), se activan liberando un hidrógeno (RO^-) y permitiendo el ataque sustitutivo de los grupos acetilos provenientes del AA. Como producto principal se obtiene acetato de almidón (RAC) y como producto secundario los restos de AA no sustituidos se hidrolizan a NaAc (*De Graaf et al., 1995*), como:



Se producen procesos de hidrólisis de los productos sustituidos por lo que la formación del éster de almidón tiene tendencia a ser reversible, obteniéndose como productos finales ácido acético (HAc) y RO^- (Chiu y Solarex, 2009), como:



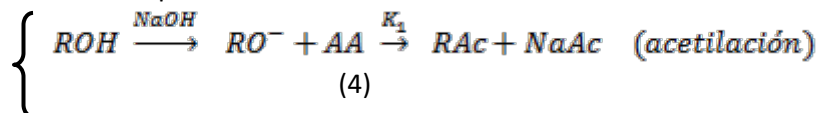
En estas condiciones, el AA tiene tendencia a formar HAc e hidrolizar a NaAc, siendo el agente modificante atacado por el medio de reacción, como:

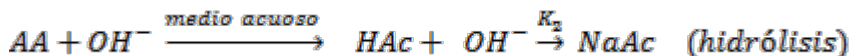


En medio no acuoso, los procesos (2) y (3) se desarrollan en muy poca extensión, pero en medio básico acuoso tienen que ser considerados (Xu et al., 2004); (Warnken et al., 2001).

Para las reacciones (1) y (2), con almidón gelatinizado de papa, en disolución acuosa y empleando vinilacetato, se demostró a través de los factores de frecuencia (K_1^0 y K_{1a}^0), que la velocidad de hidrólisis de los productos polisustituidos es muy baja ante la de acetilación (De Graaf et al., 1995); por lo que entre estos dos procesos es predominante la acetilación y los mismos pueden considerarse como los describe (1).

Para la reacción (3) y también a través del factor de frecuencia (K_2^0), la velocidad de hidrólisis del anhídrido no puede despreciarse frente a la de acetilación (De Graaf et al., 1995). Atendiendo a ello, se propuso para la evaluación cinética el siguiente mecanismo de dos reacciones en paralelo:





Procedimiento Analítico

La velocidad de reacción a volumen constante, resulta para RO^- y RAc , según el paso de acetilación en (4), como:

$$-r_{RO^-} = \frac{-dC_{RO^-}}{dt} = r_{RAc} = \frac{dC_{RAc}}{dt} = K_1 (C_{RO^-}^\alpha) (C_{AA}^\beta) \quad (5)$$

Y para OH^- según el paso de hidrólisis en (4), como:

$$-r_{OH^-} = \frac{-dC_{OH^-}}{dt} = K_2 (C_{AA}^\beta) (C_{OH^-}^\gamma) \quad (6)$$

Donde: α , β y γ corresponden al orden de reacción respecto a RO^- , AA y OH^- respectivamente. En medio acuoso, aunque con diferente fuente y agente, se obtuvo que $\alpha=\beta=\gamma=1$ (*De Graaf et al., 1995*). K_1 y K_2 son las constantes cinéticas de segundo orden para la acetilación y la hidrólisis.

Considerando un análisis parcial de las ecuaciones cinéticas, trabajando en aislamiento, a relación de concentraciones iniciales $C_{AA}^0/C_{RO^-}^0 = 10$ se obtienen expresiones cinéticas que pueden resolverse por el método integral. Expresiones cinéticas simplificadas, para la acetilación y la hidrólisis, se derivan de (5) y (6) como:

$$-r_{RO^-} = \frac{-dC_{RO^-}}{dt} = r_{RAc} = \frac{dC_{RAc}}{dt} = K_1 (C_{AA}^0) (C_{RO^-}) = K_1' (C_{RO^-}) \quad (7)$$

$$-r_{OH^-} = \frac{-dC_{OH^-}}{dt} = K_2 (C_{AA}^0) (C_{OH^-}) = K_2' (C_{OH^-}) \quad (8)$$

Donde: K_1' y K_2' son las constantes cinéticas de pseudo primer orden para la acetilación y la hidrólisis.

Aplicando el método integral de análisis, considerando (7), separando variables e integrando, resulta una solución lineal de esta expresión cinética como:

$$-\ln \left(\frac{C_{RO^-}}{C_{RO^-}^0} \right) = K_1' t \quad (9)$$

De modo análogo, para (8) resulta una solución lineal de esta expresión cinética como:

$$-\ln \left(\frac{C_{OH^-}}{C_{OH^-}^0} \right) = K_2' t \quad (10)$$

Los efectos térmicos sobre la cinética se determinan a través de la relación de Arrhenius, entre las temperaturas consideradas (Smith, 1991); (Levenspiel, 1999); obteniendo:

$$\ln K = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \ln K_0 \quad (11)$$

Donde: K_0 es el factor de frecuencia en L/mol min y E_a es la energía de activación en J/mol.

Para analizar la distribución de producto se seleccionó la selectividad, definida como la relación entre la velocidad de formación del producto deseado RAc y el no deseado NaAc, como:

$$S \left(\frac{RAc}{NaAc} \right) = \frac{r_{RAc}}{r_{NaAc}} = \frac{K_1 (C_{RO^-}^R)(C_{AA}^B)}{K_1 (C_{RO^-}^R)(C_{AA}^B) + K_2 (C_{AA}^B)(C_{OH^-}^Y)} \quad (12)$$

Procedimiento Experimental

Experimentalmente se procedió a la síntesis de acetato de almidón de bajo GS, determinando el comportamiento del consumo de almidón nativo e iones hidroxilo como función del tiempo de reacción.

La acetilación se efectuó en condiciones isotérmicas, en un reactor de vidrio, enchaquetado, cilíndrico, con fondo ligeramente cónico, de

altura igual al diámetro, con agitación mecánica y 4 L de capacidad efectiva, al que se le acopló un pH metro HANNA. El equipo trabajó con circulación de agua desde termostato NINGBO SCIENTZ BIOTECHNOLOGY y reflujo de los componentes volátiles a través de un condensador de vidrio con refrigeración proveniente del propio termostato.

Como reactivos se utilizaron AA Panreac, NaOH Uni-chem y HCl Uni-chem, todos de grado de análisis y 95 % de pureza.

Se prepararon 4 L de solución al 10 % p/v (b. s.) de almidón nativo o pregelatinizado de yuca, aislado previamente desde la variedad INIVIT Y-93-4, en agua desionizada. Se mantuvo la agitación y las condiciones isotérmicas a la temperatura de cada experiencia. Se ajustó el pH a 8,0 con solución de NaOH al 3% p/p. Manteniendo el pH entre 8,0 y 8,5 con NaOH al 3% p/p y luego de adicionar lentamente el volumen requerido de AA se dejó reaccionar por dos horas. Se operó de manera semicontinua por adición y medición del flujo volumétrico de disolución de NaOH al 3 % p/p como determinación indirecta del consumo de iones hidroxilo para mantener el pH constante durante todo el tiempo de reacción. Transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción ajustando el pH a 4,5 con disolución de HCl a 0,5 kmol/m³. Se efectuaron extracciones de muestras de 10 mL cada 20 minutos para determinar el avance de la acetilación.

La variación total del volumen del reactor fue de 1,5 % por lo que su operación puede ser considerada a volumen constante. Se trabajó a concentraciones iniciales $C_{AA}^0 = 6,38 \text{ kmol/m}^3$ y $C_{RAC}^0 = 0,638 \text{ kmol/m}^3$. Cada muestra extraída y el contenido final del reactor fueron lavados tres veces con agua destilada seguido de filtrado a vacío, secado, molinado y tamizado.

La determinación del GS se efectuó por titulación de los residuos acetilos procedentes de un tratamiento alcalino aplicando dos

métodos, por el contenido de grupos acetilo (% GA) (Guerra, 2007) y calculando directamente desde la titulación (Xu et al., 2004).

Determinación de la concentración de acetato de almidón con el GS

Una dificultad a resolver para obtener la expresión cinética de este proceso es la deducción de la relación entre la concentración de RAC y el GS.

Es posible la formación de mono, di o triacetil glucosa, sin embargo a bajos GS, la más probable es la monoacetil glucosa, en la posición preferencial del C₆ que es más reactivo en suspensión acuosa. La relación entre el GS y las fracciones molares se establece como (Singh et al., 2007); (Tijsen et al., 2001); (Jie et al., 2004) :

$$GS = \sum_{i=0}^{i=3} iX_i \quad (13)$$

Donde: i es 0 para la glucosa, 1 para la glucosa monoacetilada, 2 para la diacetilada y 3 para la triacetilada y X_i es la fracción molar de RAC para el componente i, por mol de UAG activas alimentadas al reactor.

Se ha demostrado que la fracción molar de componentes polisustituídos es muy baja a GS < 0,6 (Warnken et al., 2001); (Singh et al., 2007). Adicionalmente se ha encontrado que, incluso a GS muy cercanos a 1,3; la mono sustitución alcanza hasta alrededor del 60 % del GS total obtenido (PFEIFFER et al., 2002).

Atendiendo a estos elementos, para GS < 0,6; la probabilidad de formación de los productos polisustituídos es muy baja respecto a la monoacetilación por lo que puede considerarse la relación entre el GS y la fracción molar de monoacetil glucosa de (13) como GS ≈ X₁, de donde se obtiene la expresión descrita por Pérez y colaboradores (Pérez et al., 2018) como:

$$C_{RAC} = GS C_{RO}^0 \quad (14)$$

Donde: C_{RAC} es la concentración de almidón acetilado como monoacetil glucosa en kmol/m^3 y C_{RO}^0 es la concentración inicial de UAG activas en kmol/m^3 .

Resultados del estudio cinético en la acetilación de almidón nativo

En la Tabla 1 aparecen los resultados del GS, a partir de los dos métodos considerados y los consumos de hidroxilos requeridos para mantener el pH constante a ambas temperaturas.

Tabla 1. GS y consumo de hidroxilos a 25 y 40 °C en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y 93-4

Tiempo (min)	25 °C					40 °C				
	%	GS ^a	GS ^b	GS ^p	kmol	% GA	GS ^a	GS ^b	GS ^p	kmol
20	1,83	0,070	0,060	0,065	0	2,25	0,086	0,188	0,137	0
40	3,78	0,148	0,150	0,149	$5,94 \cdot 10^{-1}$	5,83	0,233	0,251	0,242	$1,72 \cdot 10^{-1}$
60	5,52	0,219	0,237	0,228	$8,75 \cdot 10^{-1}$	8,81	0,363	0,189	0,357	$2,25 \cdot 10^{-1}$
80	7,55	0,307	0,284	0,296	$9,69 \cdot 10^{-1}$	11,05	0,466	0,488	0,477	$2,62 \cdot 10^{-1}$
100	7,66	0,312	0,324	0,318	$1,53 \cdot 10^{-1}$	13,03	0,562	0,544	0,553	$3,00 \cdot 10^{-1}$
120	8,83	0,364	0,366	0,365	$1,72 \cdot 10^{-1}$	13,91	0,606	0,590	0,598	$3,03 \cdot 10^{-1}$

^aGS determinado a través del contenido de acetilos por el método de Guerra (Guerra, 2007).

^bGS determinado directamente desde la titulación por el método de Xu (Xu et al., 2004).

^pGS promedio de ambos métodos.

Con los GS^p se aplicó (14) para determinar las C_{RAC} . Con dicha concentración y el consumo de hidroxilos, a través de balance de materiales se determinó la progresión concentración vs tiempo para RO⁻ y RAC que aparece reflejada en la figura 2. En la Tabla 2 aparecen

las constantes cinéticas de pseudo primer y segundo orden para ambas reacciones a las temperaturas consideradas.

A partir de (9) y (10) se aplicó el método integral de análisis a ambas temperaturas cuyos resultados aparecen en la figura 3 (a) para la acetilación y en la figura 3 (b) para la hidrólisis.

Se obtuvo un comportamiento lineal con altos coeficientes de regresión de la función de la concentración reflejada en (9) y (10). Ello demuestra que el mecanismo de reacción propuesto en (4) es adecuado para describir el transcurso del proceso, donde la acetilación es de primer orden respecto al RO^- y al AA y transcurre en paralelo a la hidrólisis del agente, la cual también es de primer orden respecto a los OH^- y el AA, siendo dos el orden global de cada paso.

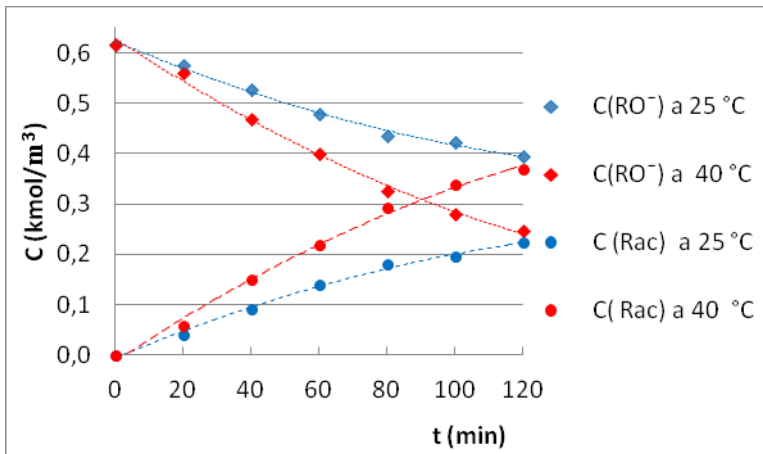
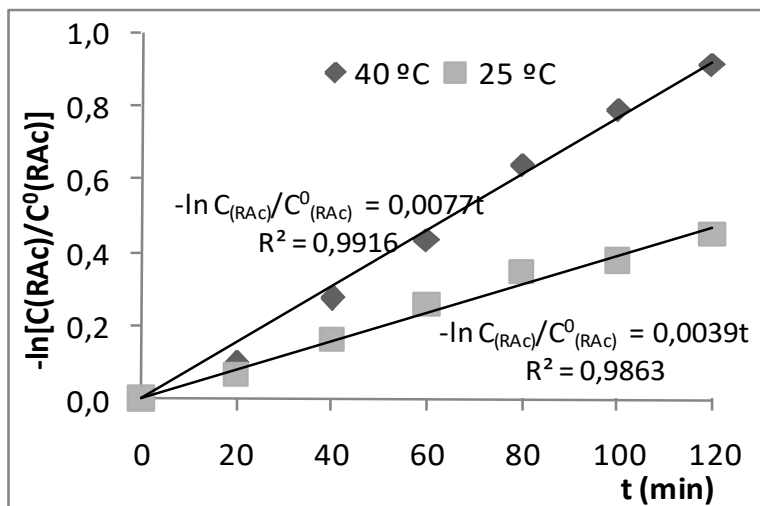
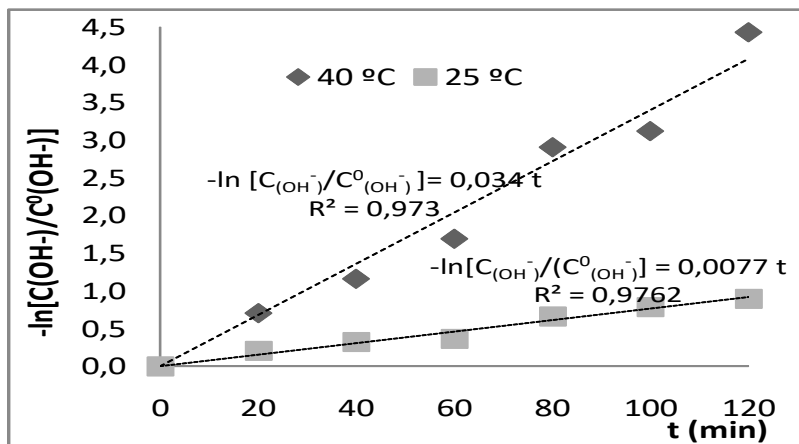


Figura 2. Progresión de C_{RO^-} y C_{RAC} a 25 y 40 °C en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y 93-4



a)

b)

Figura 3: Método integral de analisis en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y-93-4 a 25 y 40 °C: a) para la acetilación b) para la hidrólisis

Tabla 2. Constantes de pseudo primer y segundo orden para el mecanismo de acetilación de almidón nativo de yuca

$K' \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$K \text{ (m}^3\text{/kmol min)}$
$K'_{1 \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}} = 0,00390$	$K_{1 \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}} = 6,32 \cdot 10^{-4}$
$K'_{1 \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C}} = 0,00778$	$K_{1 \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C}} = 1,26 \cdot 10^{-3}$
$K'_{2 \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}} = 0,00771$	$K_{2 \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}} = 1,25 \cdot 10^{-3}$
$K'_{2 \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C}} = 0,03500$	$K_{2 \text{ a } 40 \text{ }^\circ\text{C}} = 5,67 \cdot 10^{-3}$

Las constantes de pseudo primer y primer orden para la acetilación son de magnitud inferior a las obtenidas por Guerra y colaboradores (*Guerra et al., 2008*) con disolución directa del almidón en AA, pero existen diferencias considerables en la fuente de partida de los almidones, las temperaturas de experimentación y la composición del medio.

Aplicando (11) se graficó $\ln K$ vs $1/T$ para ambos pasos y se obtuvieron los valores del factor de frecuencia y la energía de activación para cada paso, que se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Factor de frecuencia y energía de activación en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y 93-4

	$K_0 \text{ (m}^3\text{/kmol min)}$	$E_a \text{ (J/mol)}$
Acetilación	$K_{01} = 916$	$E_{a1} = 35\ 150,5$
Hidrólisis	$K_{02} = 6,581 \cdot 10^{10}$	$E_{a2} = 78\ 241,1$

Las expresiones cinéticas completas para el mecanismo, con la temperatura en K, resultaron en:

$$-r_{RO^-} = r_{RAc} = \left[916 e^{-\left(\frac{35\,150,5}{8,31 T}\right)} \right] (C_{RO^-}) (C_{AA})$$

$$-r_{OH^-} = \left[6,581 \cdot 10^{10} e^{-\left(\frac{78\,241,1}{8,31 T}\right)} \right] (C_{OH^-})(C_{AA})$$

$$r_{NaAc} = -r_{AA} = C_{AA} \left\{ \left[916 e^{-\left(\frac{35\,150,5}{8,31 T}\right)} \right] (C_{RO^-}) + \left[6,581 \cdot 10^{10} e^{-\left(\frac{78\,241,1}{8,31 T}\right)} \right] (C_{OH^-}) \right\}$$

La energía de activación para la hidrólisis es superior que para la acetilación, lo cual es un efecto importante para la operación del reactor, puesto que incrementos de temperatura favorecen más la hidrólisis. Sin embargo las diferencias entre el orden de magnitud de la C_{OH^-} y la del resto de las especies y las expresiones cinéticas obtenidas, muestran que el efecto determinante en la velocidad es la C_{OH^-} . Dicho efecto se aprecia claramente, analizando la tendencia de las velocidades de arranque de la reacción para RAc, NaAc y OH^- a 40 °C, en función del pH inicial del medio, mostrada en la Figura 4.

Las velocidades de arranque fueron determinadas sustituyendo las concentraciones iniciales en las correspondientes expresiones cinéticas y su comportamiento como tendencia es permanente durante el proceso debido a que no existen pasos en serie y por lo tanto la concentración de ninguna de las especies tiene un extremo local durante la reacción.

Analizando las velocidades de arranque, se aprecia que a pH inferiores a 10,5; existe coincidencia entre r_{RAc} y r_{NaAc} , lo cual indica, junto a las bajas $-r_{OH^-}$, que en dichas condiciones es muy limitada la ocurrencia de la hidrólisis del AA. Sin embargo a pH superiores se incrementa la r_{NaAc} respecto a r_{RAc} y para pH superiores a 10 aumenta exponencialmente la $-r_{OH^-}$ indicando un comportamiento cinético diferente en el cual la hidrólisis del AA afecta sensiblemente la acetilación.

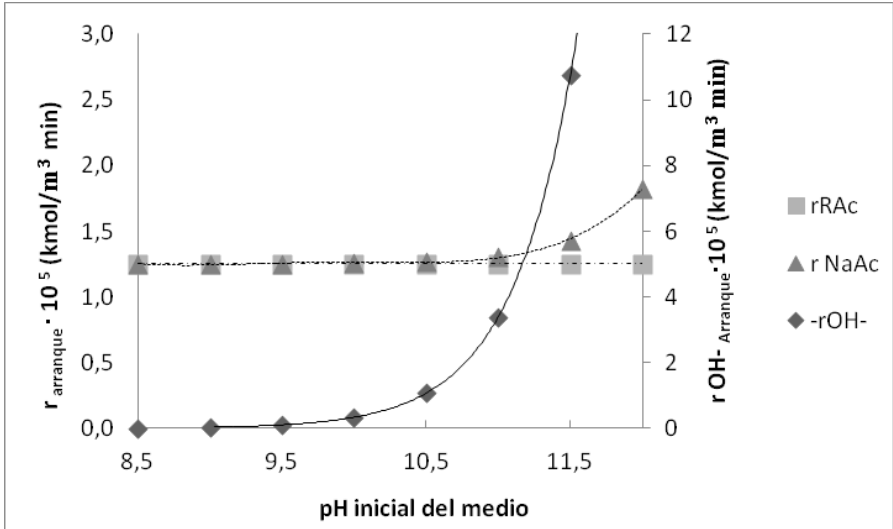


Figura 4. Velocidades de arranque en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y-93-4 a 40 °C

Respecto a la distribución de producto, la combinación de (12) con las expresiones cinéticas completas resultó en la expresión:

$$S\left(\frac{RAc}{NaAc}\right) = \frac{r_{RAc}}{r_{NaAc}} = \frac{\left[916 e^{-\left(\frac{35150,5}{8,31 T}\right)}\right] (C_{RO^-}) (C_{AA})}{C_{AA} \left\{ \left[916 e^{-\left(\frac{35150,5}{8,31 T}\right)}\right] (C_{RO^-}) + \left[6,581 \cdot 10^{10} e^{-\left(\frac{78241,1}{8,31 T}\right)}\right] (C_{OH^-}) \right\}}$$

A partir de ella, variando un parámetro y manteniendo constante el resto, se determinó la selectividad a RAc, lo cual permitió definir que a pH= 8,5 la $S\left(\frac{RAc}{NaAc}\right) = 1$ en todos los casos, por lo que la concentración de reactantes y la temperatura no afectan la distribución de producto en dichas condiciones. Sin embargo, incrementos en la C_{OH^-} sí tienen gran influencia sobre ella, afianzando además los efectos térmicos sobre la cinética y la distribución de producto.

Atendiendo a ello, se determinó nuevamente el comportamiento de la $S\left(\frac{R_{Ac}}{N_{Ac}}\right)$ a $C_{RO^-} = C_{AA} = 0,1 \text{ kmol/m}^3$ para diferentes valores de pH, en función de la temperatura, mostrando los resultados en la Figura 5. A pH iguales o inferiores a 10, ninguno de los factores considerados, temperatura y concentración de reactivos afecta la distribución de producto. Sin embargo a pH superiores comienza a apreciarse el efecto de reducción de la selectividad con incrementos de pH y de temperatura. Para pH superiores a 12 la distribución de producto no es favorable y el efecto se degrada con incrementos de temperatura. El análisis de las velocidades de arranque y de distribución de productos se complementa y demuestra que el factor determinante en la cinética de la acetilación de almidón es la C_{OH^-} .

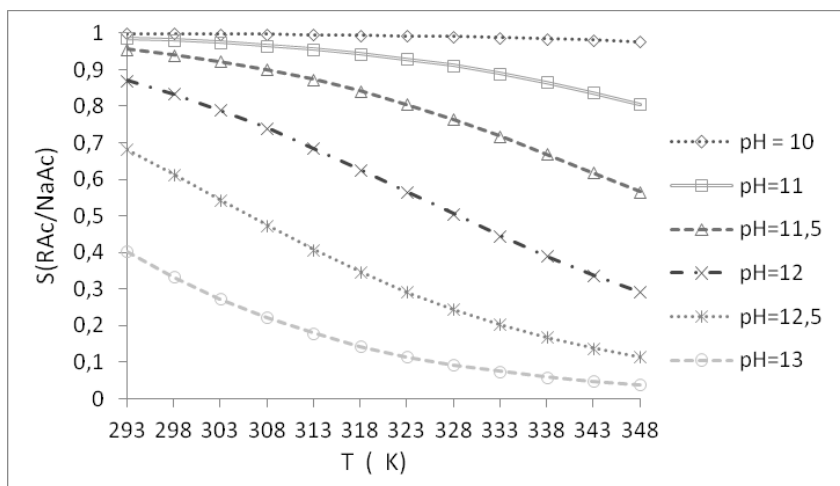


Figura 5. Distribución de producto en la acetilación de almidón nativo de yuca INIVIT Y-93-4 a diferentes pH en función de la temperatura

Atendiendo a los resultados anteriores, en medio básico moderado (de $\text{pH} \leq 10$) la hidrólisis competitiva del AA para la esterificación de

almidón de yuca se desarrolla en muy poca extensión por lo que el proceso se desarrolla como una reacción simple de segundo orden.

Resultados del estudio cinético en la acetilación de almidón pregelatinizado

Atendiendo a los resultados cinéticos en la acetilación del almidón nativo, estos procesos deben desarrollarse en condiciones básicas moderadas donde se logra la activación efectiva de las UAG, pero no se desarrollan de manera apreciable los procesos de hidrólisis del AA (Pérez *et al.*, 2018).

Por ello, se consideró para la determinación de la cinética del material pregelatinizado en medio básico moderado solamente la reacción de acetilación descrita en (1). Integrando en (7), sin considerar exceso de AA y transformando resulta:

$$\ln\left(\frac{C_{AA}}{C_{RO^-}}\right) = (C_{AA}^0 - C_{RO^-}^0) K_1 t$$

Considerando que K_1 es la constante cinética y M es la relación molar de concentraciones en la alimentación como $M = \left(\frac{C_{AA}^0}{C_{RO^-}^0}\right)$.

Evaluando la expresión integrada (15) entre los límites M y $\left(\frac{C_{AA}}{C_{RO^-}}\right)$ y graficando $\ln\left(\frac{C_{AA}}{C_{RO^-}}\right)$ *vs* t resulta una línea recta de pendiente $(C_{AA}^0 - C_{RO^-}^0) K_1$ e intercepto $\ln M$, si los datos se ajustan al orden de reacción considerado (Levenspiel, 1999).

El procedimiento experimental se efectuó en condiciones y equipos similares al almidón nativo, pero en operación discontinua, partiendo de material pregelatinizado a $C_{RO^-}^0 = 0,638 \text{ kmol/m}^3$ y $C_{AA}^0 = 1,06 \text{ kmol/m}^3$. Los resultados de la determinación del % GA y

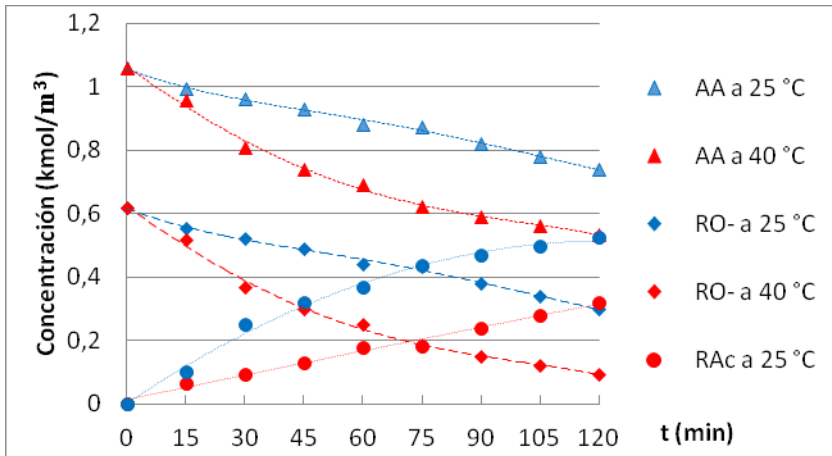
los GS por el método de Guerra (*Guerra, 2007*) así como la C_{RAC} determinada a partir de (14) aparecen reflejados en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados del estudio cinético a 25 y 40 °C para almidón pregelatinizado de yuca INIVIT Y-93-4

t (min)	25°C			40°C		
	% GA	GS	C_{RAC} (kmol/m ³)	%GA	GS	C_{RAC} (kmol/m ³)
15	2,71	0,10	0,06	4,14	0,16	0,10
30	3,90	0,15	0,09	9,71	0,40	0,25
45	5,26	0,21	0,13	12,10	0,52	0,32
60	7,09	0,29	0,18	13,70	0,60	0,37
75	7,33	0,30	0,18	15,85	0,71	0,44
90	9,32	0,39	0,24	16,80	0,76	0,47
105	10,75	0,45	0,28	17,68	0,80	0,50
120	12,10	0,52	0,32	18,47	0,85	0,52

Aplicando balances de materiales se obtuvo el perfil de concentración para C_{RO^-} , C_{RAC} y C_{AA} , a ambas temperaturas que se muestra en la Figura 6.

Los resultados de la aplicación del método integral, a ambas temperaturas, son mostrados en la figura 7. La función de la



concentración obtenida en (15), se ajustó a una línea recta con adecuados coeficientes de regresión. Se demostró que la reacción es de orden uno respecto a RO⁻ y AA siendo dos el orden global. También en este caso los órdenes de reacción considerados en la definición de la expresión integrada son adecuados. Con las pendientes de las rectas obtenidas en la aplicación del método integral de análisis se determinaron las constantes cinéticas a ambas temperaturas, resultando las mismas en: $K_{1a\ 25^{\circ}\text{C}} = 6,1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kmol min}$ y $K_{1a\ 40^{\circ}\text{C}} = 2,13 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{kmol min}$.

Figura 6. Perfil de C_{RO^-} , C_{RAC} y C_{AA} a 25 y 40 °C en la acetilación de almidón pregelatinizado de yuca INIVIT Y-93-4

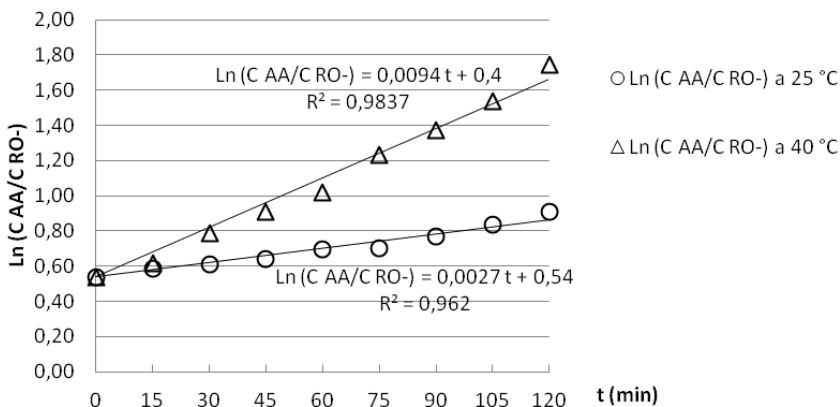


Figura 7. Método integral de análisis aplicado a la acetilación de almidón pregelatinizado de yuca INIVIT Y-93-4 para pH = 8 a 25 y 40 °C

Aplicando (11) se determinó la energía de activación y el factor de frecuencia para esta reacción, resultando los mismos en:

$$K_{01} = 1,306 \cdot 10^9 \text{ m}^3/\text{kmol min} \quad E_{a1} = 64 \, 613,6 \text{ J/mol}$$

Con ello se obtuvo la expresión cinética completa de este proceso, con la temperatura en K, como:

$$-r_{RO^-} = -\frac{dC_{RO^-}}{dt} = K_1 (C_{RO^-}) (C_{AA}) = 1,306 \cdot 10^9 e^{-\left(\frac{64 \, 613,6}{8,317 T}\right)} (C_{RO^-}) (C_{AA}) \quad (16)$$

Los resultados cinéticos alcanzados para almidón nativo y pregelatinizado muestran que la relación entre las constantes de velocidad para la acetilación en condiciones acuosas y básicas moderadas evaluadas a 40 °C es:

$$\frac{K_{1 \text{ pregelatinizado}, 40 \text{ } ^\circ\text{C}}}{K_{1 \text{ nativo}, 40 \text{ } ^\circ\text{C}}} = \frac{2,13 \cdot 10^{-2}}{1,26 \cdot 10^{-3}} = 16,9$$

Por lo que la velocidad de acetilación es 17 veces superior cuando se parte de material pregelatinizado.

Durante el procesamiento industrial de yuca es posible y conveniente efectuar la modificación física y química cuando el producto está en disolución acuosa en lugar de aislarlo como un sólido seco y disolverlo en agua nuevamente. Por ello, la situación tecnológica modificativa más ventajosa es la gelatinización directa en suspensión acuosa. Por otra parte, a la salida de las centrifugas del proceso mecanizado, el contenido de sólidos puede ajustarse a las concentraciones consideradas en el estudio cinético para las cuales, la gelatinización total se alcanza a partir de los 60 °C. La relación entre las constantes cinéticas para ambos materiales, evaluando $K_{1 \text{ gelatinizado}}$ a dicha temperatura desde (16), resulta entonces en:

$$\frac{K_{1 \text{ gelatinizado}, 60 \text{ } ^\circ\text{C}}}{K_{1 \text{ nativo}, 40 \text{ } ^\circ\text{C}}} = \frac{9,44 \cdot 10^{-2}}{1,26 \cdot 10^{-3}} = 74,92$$

Como la velocidad de acetilación resulta 75 veces superior cuando la suspensión de almidón está gelatinizada, a escala industrial no es efectiva la acetilación directa de almidón nativo de yuca y es muy ventajosa la gelatinización previa a la etapa química.

CONCLUSIONES

En medio básico moderado, de pH menor o igual a 10, la hidrólisis competitiva del anhídrido acético se desarrolla en muy poca extensión por lo que la acetilación de almidón de yuca puede considerarse como una reacción simple, de orden uno respecto a las

unidades de anhidro glucosa y el anhídrido, siendo dos el orden global.

En la acetilación de almidón nativo de yuca, el factor de frecuencia es $916 \text{ m}^3/\text{kmol min}$ y la energía de activación es $35\,150,5 \text{ J/mol}$, mientras que cuando el material está pregelatinizado el factor de frecuencia es $1,306 \cdot 10^9 \text{ m}^3/\text{kmol min}$ y la energía de activación es $64\,613,6 \text{ J/mol}$.

La velocidad de acetilación básica acuosa del almidón gelatinizado de yuca es muy superior a la del nativo debido al efecto positivo del fraccionamiento de la estructura molecular sobre la facilidad de sustitución nucleofílica por lo que los procesos de acetilación deben estar precedidos de la gelatinización.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrascal, J. J. (2013) *"Acetilación Del Almidón De Arracacia Xanthorrhiza Y Evaluación De Su Aplicación Como Posible Auxiliar Farmacéutico"*. Bogotá, Universidad Nacional De Colombia.
- Chiu, C. W. & Solarex, D. (2009). *"Modification Of Starches"* En: Bemiller, J. (Ed.) *Starch: Chem. Technol* 3 Th Ed.
- De Graaf, R. A., Broekroelofs, G. A., Janssen, L. P. & Beenackers, A.A. (1995) *"The Kinetics Of The Acetylation Of Gelatinised Potato Starch"*. *Carbohydr. Polym*, 28 Pp. 137-144.
- Gong, Q., Wang, L. Q. & Kehua, T. (2006) *"In Situ Polymerization Of Starch With Lactic Acid In Aqueous Solution And The Microstructure Characterization."*. *Carbohydrate Polymers* 64 Pp. 501-509.
- Guerra, D. (2007) *"Efecto Del Nivel De Acetilación En Las Características Morfológicas Y Moleculares De Almidón De Plátano (Musa Paradisiaca L)"*. Tesis En Opción Al Grado De

- Maestro En Ciencias En Desarrollo De Productos Bióticos.,
Instituto Politécnico Nacional, Centro De Desarrollo De
Productos Bióticos.
- Guerra, D., Bello, L. A., González, R. A., Solorza, J. & Arambula, G.
(2008) *"Efecto Del Tiempo De Reacción En La Acetilación De
Almidón De Plátano"*. Rev. Mex. Ing. Quim, 7 (3), Pp. 283-291.
- Hernández, M. & López, G. Y. (2007) *"Síntesis De Carboximetil
Almidón"*. VII Congreso De La Sociedad Cubana De Bioingeniería.
Sociedad Cubana De Bioingeniería.
- Jie, Y., Wen, C., Manurung, R., Ganzeveld, K. & Heeres, H. (2004)
*"Exploratory Studies On The Carboximethylation Of
Cassava Starch In Water-Miscible Organic Media"*. Starch/Stärke,
56 Pp. 100-107.
- Lefnaoui, S. & Moulai-Mostefa, N. (2015) *"Synthesis And Evaluation
Of The Structural And Physicochemical Properties Of
Carboxymethyl Pregelatinized Starch As A Pharmaceutical
Excipient"*. Saudi Pharmaceutical Journal 23, Pp. 698-711.
- Levenspiel, O. (1999) *"Chemical Reaction Engineering"*. New York,
USA, Wiley Press.
- Miladinov, V. D. & Hanna, M. A. (2000) *"Starch Esterification By
Reactive Extrusion"*. Industrial Crops And Products, 11 Pp. 51-57.
- Mirmoghtadaie, L., Kadivar, M. & Shahedi, M. (2009) *"Effects Of
Cross-Linking And Acetylation On Oat Starch Properties"*. Food
Chem, 116 Pp. 709-713.
- Olu-Owolabi, B. I., Olayinka, O. O., Adegbemile, A. A. & Adebowale, K.
O. (2014) *"Comparison Of Functional Properties Between Native
And Chemically Modified Starches From Acha (Digitaria Stapp)
Grains"*. Food And Nutrition Sciences, 5 Pp. 222-230.
- Pérez, O., Ley, N., González, E. & Toledo, L. (2018) *"Cinética Y
Distribución De Producto En La Acetilación De Almidón De Bajo
Grado De Sustitución."* Afinidad Lxxv (583), Pp. 204-211.

- Pfeiffer, K., Heinze, T. & Lazik, W. (2002) *"Starch Derivatives Of High Degree Of Functionalization 5. Stepwise Carboxymethylation Of Amylose. 2002"*. Chem. Pap., 56 Pp. 261-266.
- Prieto-Méndez, J., Trejo-Cárdenas, C. L., Prieto-García, F., Méndez-Marzo, M. A., Bello-Pérez, L. A. & Román-Gutiérrez, A. D. (2010) *"Acetilación Y Caracterización Del Almidón De Cebada"*. Revista Latinoamericana De Recursos Naturales, 6 (1), Pp. 32-43.
- Pushpamalar, V., J., L. S. & Lim, Y. Y. (2006) *"Optimization Of Reaction Conditions For Preparing Carboxymethyl Cellulose From Sagu Waste"*. Carbohydr. Polym 64, Pp. 312-318.
- Salcedo, J. G., Rodríguez, M. C. & Figueroa, J. A. (2016) *"Efecto De La Acetilación En Las Propiedades Estructurales Y Funcionales De Almidones De Yuca (Manihot Esculenta Crantz) Y Ñame (Dioscorea Alata Cv. Diamante 22)"*. Rev. Mex. Ing. Quim, 15 (3), Pp. 787-796.
- Singh, J., Kaur, L. & Mccarthy, O. J. (2007) *"Factors Influencing The Physico-Chemical, Morphological, Thermal And Rheological Properties Of Some Chemically Modified Starches For Food Applications"*. Food Hydrocolloids, 21 Pp. 1-22.
- Smith, J. M. (1991) *"Chemical Engineering Kinetics"*. Mc. Graw Hill Book Company.
- Tijssen, C. J., Kolk, H. J., Stamhuis, E. J. & Beenackers, A. A. (2001) *"An Experimental Study On The Carboxymethylation Of Granular Potato Starch In Non Aqueous Media"*. Carbohydr. Polym, 45 Pp. 219-226.
- Wang, L.F., Pan, S.Y., Hu, H., Miao, W. H. & Xu, X.Y. (2010) *"Synthesis And Properties Of Carboxymethyl Kudzu Starch"*. Carbohydrate Polymers, 80 Pp. 174-179.
- Warnken, H. H., Asskali, F. & Förster, H. (2001) *"Rapid Hplc Method For Acetyl Starch Determination In Blood"*. Chromatographia, 53 Pp. 85-88.

- Wilkins, M. R., Wang, P., Xu, L., Niu, Y., Tumbleson, M. E. & Rausch, K. D. (2003) "*Variability In Starch Acetylation Efficiency From Commercial Waxy Corn Hybrids*". Cereal Chem, 80 (1), Pp. 68-71.
- Xu, Y., Miladinov, V. & Hanna, M. A. (2004) "*Synthesis And Characterization Of Starch Acetates With High Substitution*". Cereal Chem, 81 Pp. 735-740.

CAPÍTULO VI

COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA REACCIÓN DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FOSFÓRICO.

Julio Pedraza Garciga
Iván Rodríguez Rico
Erenio González Suárez

RESUMEN.

En este artículo se muestra el estudio cinético realizado como parte del diseño de una planta de ácido fosfórico, obteniéndose como resultado del mismo un modelo cinético de la etapa de reacción química.

INTRODUCCION

En cualquier proceso químico un papel determinante lo desempeña la etapa de reacción química por su incidencia en la calidad del producto final obtenido, así como en la eficiencia técnico-económica global del sistema. Por todo lo anterior, en el diseño de una nueva instalación de procesos especial importancia tiene la determinación de las mejores condiciones de operación de la etapa con reacción química. En específico en el diseño de una planta para la producción de ácido fosfórico utilizando la roca fosfórica del yacimiento “Trinidad de Guedes”, se procedió a un estudio integral de esta etapa por cuanto la bibliografía sobre este proceso es muy escueta en lo referente a los mecanismos cinéticos de las reacciones químicas que tienen lugar. El estudio cinético que se muestra a continuación forma parte del estudio integral que se llevó a cabo para el diseño de este proceso.

Estudio cinético. Etapa de reacción química.

Estudio sobre la influencia de la temperatura y tamaño de partículas en la conversión de P_2O_5 .

En el estudio cinético de esta reacción, sin determinar cuál es la etapa controlante de la misma, ya que esto requiere de un gran número de experimentos y además se encarece mucho la investigación sobre el proceso, nos proponemos al menos estudiar la influencia de la temperatura y del tamaño de partículas en el proceso de reacción y tener un criterio de cuál es la etapa que más influye en este proceso, si la etapa química o la física y corroborar los resultados obtenidos en experimentos anteriores para determinar las mejores condiciones de operación de la etapa de reacción química en el diseño de una planta para la producción de ácido fosfórico.

Influencia de la temperatura en el proceso de reacción.

Como se conoce, la etapa química depende mucho más de la temperatura que las etapas físicas por eso trabajando a una granulometría constante (100 mesh) por ser la más recomendada en la literatura científica consultada (1), (2), (3), (4), (5) y utilizando la concentración de H_2SO_4 determinada en un trabajo previo (65 %) realizamos experimentos a diferentes temperaturas: 60-70-80-90 °C para poder analizar el verdadero efecto de la temperatura sobre la conversión de P_2O_5 y poder analizar si la etapa controlante es la de difusión a través de la película a través de la ceniza o si es la reacción química.

Los resultados obtenidos en términos de % de P_2O_5 y conversión fueron analizados estadísticamente mediante el programa "Stepwise", encontrándose un modelo que tiene la forma:

$$Y_c = A_0 + A_1.t + A_2.t^2$$

donde: Y_c - Conversión en % t - Tiempo (h).

Se pudo apreciar que hay una buena correspondencia entre los valores de conversión y la temperatura de 70 °C determinada anteriormente durante el ajuste de las condiciones de operación para la etapa de reacción.

Además, se comprueba que no existe una notable influencia de la temperatura en el grado de conversión, por lo que nuestro sistema no depende en gran medida de la etapa química.

Influencia del tamaño de partículas.

Con el objetivo de corroborar que para nuestro sistema las etapas de mayor influencia son las físicas, se realizó una serie de experimentos, donde determinamos el % de P₂O₅ y la conversión en las primeras cuatro horas de reacción a diferentes tiempos, manteniendo constante la temperatura y variando la granulometría.

El plan experimental consistió en obtener valores de extracción de P₂O₅ en las primeras dos horas cada 15 minutos y posteriormente en las dos horas restantes cada media hora obteniendo una tabla de valores de conversión contra tiempo.

El tamaño de partículas ensayado fue : 0,15 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2 mm.

Este intervalo se escogió considerando las diferentes granulometrías usadas industrialmente para las fosforitas.

Los resultados obtenidos en términos de % de P₂O₅ y conversión fueron analizados estadísticamente mediante el programa "Stepwise".

Al analizar estos modelos se puede suponer erróneamente que no existe una dependencia del grado de conversión con el tamaño de la partícula, ya que los valores encontrados para un mismo tiempo no difieren apreciablemente, sin embargo, al analizar detenidamente el modelo encontrado para el estudio cinético:

$$\tau = 4,01.R^{0,3(\ln R) - 1,05}$$

Como se observa la dependencia entre τ y R no es lineal, ni cuadrática ni está entre 1,25 y 2,5, lo que presupone que exista un efecto combinado de las etapas físicas y químicas en el control de la velocidad global del proceso en estudio, con más incidencia de las etapas físicas, si se tienen en cuenta los resultados de los experimentos a diferentes temperaturas. Es evidente que este sistema es muy complejo en el que ocurren muchas reacciones a la vez y la cinética o etapa controlante debe producirse de un estudio más profundo.

CONCLUSIONES

- 1- La ecuación que describe el comportamiento de la conversión a través del tiempo para este sistema responde a la forma: $Y_c = A_0 + A_1 \cdot t + A_2 \cdot t^2$, demostrándose que la influencia de la temperatura sobre la conversión no es tan marcada.
- 2- Del estudio cinético realizado se concluye que existe un predominio de las etapas físicas en el control de la velocidad global del proceso sin soslayar el efecto combinado de las etapas químicas y físicas, corroborado lo anterior por el estudio de la influencia de la temperatura y del radio de partículas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Casilla, J. "Fabricación de ácido fosfórico por vía húmeda (2)", Rev. Tecnológica, España, Marzo, 1991
- 2- Lima, A. "Influencia del pentóxido de fósforo de la roca fosfórica en la calidad del superfosfato sencillo", Rev. Tecnológica, La Habana, 1985.
- 3- Najjar, M y F. Szues. "The effects of row phosphate particle size and the intensity of mixing on the efficiency of digestion", Hungarian Journal of Industry Chemical, Vol. 17, No 3, 1989.

- 4- Riegel, E.R. "Química Industrial", Primera edición, Ediciones Grijalbo S.A, Barcelona, México D.F, 1964.
- 5- Waggaman, W.H. "Phosphoric acid, phosphates and phosphatic fertilizer", Edit. Reinhold Publishing Corp., New York, 1959

CAPITULO VII

METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS MODELOS CINÉTICOS DE REACCIONES COMPLEJAS EN AÑEJAMIENTOS DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS

Cesar A Martí Marcelo
José A Fabelo Falcón
Erenio González Suárez
Yedier Rodríguez Padrón

RESUMEN

En el presente trabajo se expone una metodología que ha sido diseñada para la obtención de los modelos cinéticos y las constantes cinéticas de las principales reacciones complejas que ocurren en el proceso de añejamiento que se lleva a cabo en la industria ronera, con el objetivo de caracterizar el mismo y así dirigir las operaciones tecnológicas que se realizan con mayor acierto. Para ello se analiza el comportamiento de las variables principales que intervienen en el proceso de añejamiento entre las que se señalan las concentraciones de etanol entre otros compuestos. Para su determinación se utilizó como técnica analítica la cromatografía de gases a partir de la cual se evaluaron productos que han estado sometidos al añejamiento y se elaboraron las curvas de comportamiento de estos compuestos en el tiempo.

Para la obtención de los modelos cinéticos se aplicó el método integral de análisis de datos obteniéndose un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales. La resolución de este sistema se realizó mediante la aplicación del software MatLab R2010a y los resultados obtenidos se validaron estadísticamente. Los resultados evidencian que los modelos cinéticos obtenidos describen

adecuadamente el comportamiento del proceso de añejamiento en la industria ronera.

Palabras claves: añejamiento, constante cinética, modelos cinéticos.

INTRODUCCIÓN

El añejamiento es fundamental para el ron cubano. Este comienza inmediatamente después de la destilación del aguardiente, al llenar los barriles con el destilado fresco e incoloro.

El tiempo de añejamiento varía de acuerdo al producto que quiere elaborarse y este proceso se puede hacer en varias etapas. La madera utilizada en la confección de los barriles es el roble blanco, con diferentes especies en dependencia del producto y de la región geográfica donde se produce la bebida alcohólica destilada. González, 2000¹; MINAL, 2001²; González y Morales, 2004³.

El proceso de añejamiento de rones es complejo, seguir cada una de los componentes y reacciones resulta una tarea prácticamente imposible. Sin embargo, los cambios de mayor significación en la solución alcohólica se producen en los compuestos mayoritarios, es decir, en el etanol y sus derivados de igual cadena carbonada, junto con los compuestos que aporta la madera. En estas transformaciones se manifiestan reacciones de oxidación y condensación (esterificaciones) debido a la interacción de los compuestos que están presentes en la solución hidroalcohólica y el oxígeno que se difunde a través de las duelas del barril.

Durante el envejecimiento ocurren un sin número de reacciones dentro del barril que no han sido estudiadas en su totalidad. Lo que se conoce del proceso, es que se ve afectado por gran cantidad de factores que a medida que pasa el tiempo le otorgan al producto una mayor calidad debido a que este alcanza un mejor balance y armonización entre sus componentes. Además de las reacciones de disolución de los componentes de la madera, se producen reacciones

de hidrólisis, oxidación e interacción de estos con los provenientes de la materia prima.

La generalidad de las investigaciones relativas a los cambios que sufren los destilados alcohólicos durante el añejamiento se han realizado en whisky. Reazin y col., 1976⁴; Black y Andreasen, 1974⁵; Reazin, 1979⁶ en coñac o brandy Onishi y col., 1977⁷; Viriot y col., 1993⁸; Quesada-Granados y col., 1996⁹; Caldeira y col., 2002¹⁰; 2006¹¹, pero casi nunca en ron, con la excepción de algunos pocos trabajos, incluidos los realizados por autores cubanos y, por lo general, sobre indicadores químicos como acidez, sólidos, fenoles totales, etc. Levy y Maranon, 1996¹²; González-Delgado, 2000¹ y muy pocos sobre los compuestos volátiles. Pino y col., 1996¹³.

Para el ron cubano es necesario que la cinética de reacción de compuestos alifáticos con la madera, de ellos entre sí y entre los productos intermedios, se desarrollen hasta el equilibrio al menos en una parte del producto o lo que es igual se deje llegar hasta la madurez del añejamiento para así garantizar organolépticamente el perfil aromático del ron cubano de siempre, por lo que resulta la resulta de especial interés conocer más detalladamente como se efectúan los cambios que se producen durante el proceso de añejamiento y a qué velocidad estos ocurren para poder actuar sobre ellos. Navarro, 2004¹⁴.

Los modelos de reacción caracterizan el proceso y permiten conocer a plenitud la influencia de las variables operacionales. De este modo es posible establecer mejores parámetros en las operaciones involucradas en el añejamiento, siendo el objetivo del presente trabajo la obtención de los modelos cinéticos de las principales reacciones complejas en el proceso de añejamiento de rones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del estudio se diseñó un experimento donde se definieron dos materias primas fundamentales, aguardiente fresco y rones, distribuidos en dos lotes, de 36 720 litros y 73 440 litros respectivamente, teniendo en cuenta que estas capacidades corresponden a volúmenes normales del procesamiento en la industria diariamente. Dichos volúmenes fueron añejados en barricas de roble blanco divididas en pipas o bocoyes.

Se tuvo en cuenta además en el estudio las posibles fuentes de variación de los factores ambientales por la ubicación de los barriles en diferentes niveles de altura así como la variabilidad que se presenta en un grupo de barriles de un mismo tipo. Martí, 2018¹⁵. Se determinaron como variables de estudio las variaciones en compuestos mayoritarios como el etanol y otros compuestos que están presentes en el ron durante el proceso de añejamiento, los cuales imprimen características organolépticas destacables en determinadas concentraciones. Navarro, 2004¹⁴.

Para la recolección de datos se monitoreó el añejamiento en cada lote, tomando como referencia nueve barriles ubicados en diferentes soleras e hileras de un mismo soporte abarcando diferentes posiciones de las mismas (alto, medio y bajo).

A partir de los datos obtenidos durante el período de añejamiento evaluado, se realizaron análisis de comparación de muestras t de student para las medias y F de Fisher para las desviaciones estándar, empleando el software StatgraphicsCenturion XV, para cada una de las variables analizadas, con el objetivo de determinar si los barriles estudiados, (se comportan como reactores discontinuos), puedan representarse bajo el mismo modelo. Para la determinación de las expresiones cinéticas se tuvo en cuenta la metodología que se muestra en la figura 1, tomando para los cálculos el valor de la temperatura ambiente 25°C y los intervalos de tiempo cada 6 meses, empleando para la determinación de las

concentraciones la cromatografía de gases.

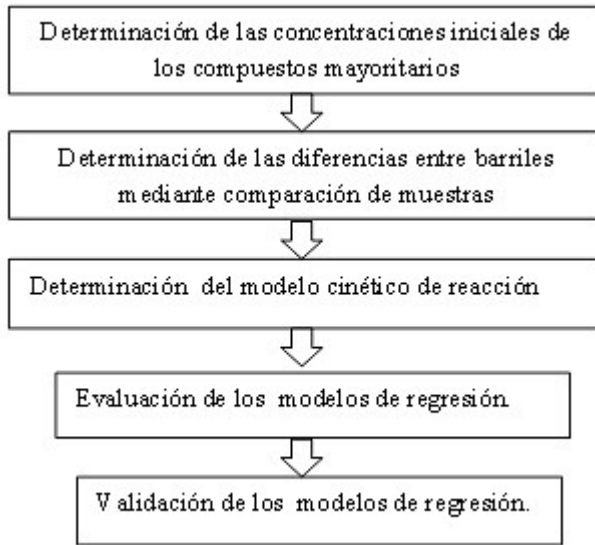


Figura 1. Metodología para la determinación de los modelos cinéticos en el añejamiento. **Fuente:** Elaboración de los autores.

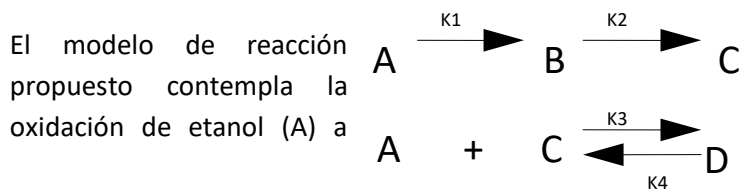
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se aprecian los resultados de la Prueba de múltiples rangos para las medias de las muestras, en la que se reflejan los grupos homogéneos con una X en la misma columna, al observar se aprecia que para cada lote los barriles se comportan de igual modo para la variable CA (concentración de etanol). Los análisis mostraron que entre los reactores muestreados en cada lote no existen diferencias estadísticamente significativas para cada uno de las variables en estudio de dichos lotes, así como tampoco existen diferencias entre la base blanca añejada en bocoy y la añejada en pipas por lo que podemos representar el añejamiento de aguardiente en un único modelo al igual que la base blanca ya sea en pipas o en bocoyes.

Tabla 1. Comparación de varias muestras. Variable CA (concentración de etanol). Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CA R1 S1H3	8	12,255	X
CA R12 S1H1	8	12,2625	X
CA R1 S1H1	8	12,2625	X
CA R12 S1H3	8	12,265	X
CA R12 S1H5	8	12,2738	X
CA R1 S1H5	8	12,2763	X
CA R6 S1H1	8	12,2963	X
CA R6 S1H5	8	12,2963	X
CA R6 S1H3	8	12,2975	X

Se representa el añejamiento de los compuestos mayoritarios por las siguientes ecuaciones, tomando como referencia el conocimiento y la experiencia centenaria de mezclar y añejar sucesivamente una apreciable variedad de rones hasta alcanzar el carácter organoléptico deseado que poseen los Maestros del Ron Cubano: (1) y (2)



acetaldehído(B) y luego éste a ácido acético(C) como reacciones en serie o consecutivas, mientras que la esterificación de etanol y el ácido acético para formar acetato de etilo(D), donde “K”, representa los valores de la constante de reacción para cada ecuación estequiométrica.

Como resultado se definen las siguientes expresiones de velocidad:

$$-\frac{dCA}{dt} = K_1.CA + K_3.CA.CC - K_4.CD \quad (3)$$

$$\frac{dCB}{dt} = K_1.CA - K_2.CB \quad (4)$$

$$\frac{dCC}{dt} = K_2.CB - K_3.CA.CC + K_4.CD \quad (5)$$

$$\frac{dCD}{dt} = K_3.CA.CC - K_4.CD \quad (6)$$

La determinación de las constantes cinéticas se realizó a partir del Método Integral de Análisis de Datos Cinéticos (Levenspiel, 1987).

Siguiendo la metodología planteada en la figura 1 se obtuvo un modelo de regresión para cada variable en estudio.

Para la determinación de los cambios de concentración de los componentes volátiles mayoritarios, se realizó un muestreo aleatorio cada seis meses, teniendo en cuenta que este es tiempo prudencial donde se ponen de manifiesto las variaciones de la composición físicoquímica de los productos en añejamiento. A partir de lo anterior se derivan y evalúan las expresiones obtenidas y se tiene como resultado los valores de las concentraciones de cada componente y sus respectivas velocidades instantáneas de reacción. Con estos resultados se conformó una matriz sustituyendo cada término en el sistema que representa las expresiones de velocidad, quedando de este modo tres sistemas de ecuaciones lineales en

función de las constantes cinéticas, cada uno de estos sistemas para un tiempo diferente. Para la solución de los sistemas de ecuaciones diferenciales se empleó el Software MATLAB R2010a., obteniéndose los modelos estadísticos para aguardientes y rones que se muestran a continuación:

Modelos estadísticos de añejamiento.

$$CA = \sqrt{(162,284 - 2,87429(\sqrt{t}))} R^2 = 98 \quad (7)$$

$$CB = \sqrt{(2,11357E-07 + 6,5431E-10.t^2)} R^2 = 97 \quad (8)$$

$$CC = (0,0396893 + 0,00784681\sqrt{t})^2 R^2 = 97,35 \quad (9)$$

$$CD = \sqrt{(2,8687E-06 + 7,3571E-09.t^2)} R^2 = 97,45 \quad (10)$$

Sustituyendo y derivando los modelos estadísticos en función del tiempo se obtienen los modelos de velocidades de reacción.

$$\frac{dCA}{dt} = - \frac{2,87421}{4\sqrt{t(162,284 - 2,87421\sqrt{t})}} \quad (11)$$

$$\frac{dCB}{dt} = \frac{6,5431E-10t}{\sqrt{(2,11357E-07 + 6,5431E-10.t^2)}} \quad (12)$$

$$\frac{dCC}{dt} = \frac{3,1143E-04 + 6,1572E-05.\sqrt{t}}{\sqrt{t}} \quad (13)$$

$$\frac{dCD}{dt} = \frac{7,3571E-09.t}{\sqrt{(2,8687E-06+7,5371E-09.t^2)}} \quad (14)$$

En la tabla 2 se muestran las concentraciones y velocidades instantáneas en función del tiempo para el añejamiento de aguardiente.

Tabla 2. Concentraciones y velocidades instantáneas en el añejamiento

t	CA (mol/l)	CB (mol/l)	CC (mol/l)	CD (mol/l)
6	12,4597	0,0005	0,0035	0,0018
12	12,3420	5,53E-04	4,47E-03	1,98E-03
18	12,2510	6,51E-04	5,33E-03	2,29E-03
t	dvCA (mol/l·mes)	dvCB (mol/l·mes)	dvCC (mol/l·mes)	dvCD (mol/l·mes)
6	-0,0235	8,10E-06	1,89E-04	2,49E-05
12	-0,0168	1,42E-05	1,51E-04	4,45E-05
18	-0,0138	1,81E-05	1,35E-04	5,78E-05
	K1 ¹	K2	K3	K4
Valores	1,98E-05	2,62E-01	3,58E-01	7,38E+00
Desviación estándar	8.70056E-07	0.044351516	0.172636076	0.299607482
Coefficiente de variación	7.56997E-13	0.001967057	0.029803215	0.089764643

Como resultado final se obtiene los siguientes modelos cinéticos de reacción para añejamiento de aguardiente:

$$\frac{dCA}{dt} = (1,98E-05)CA + (3,58E-01)CA.CC - (7,38E+00)CD \quad (15)$$

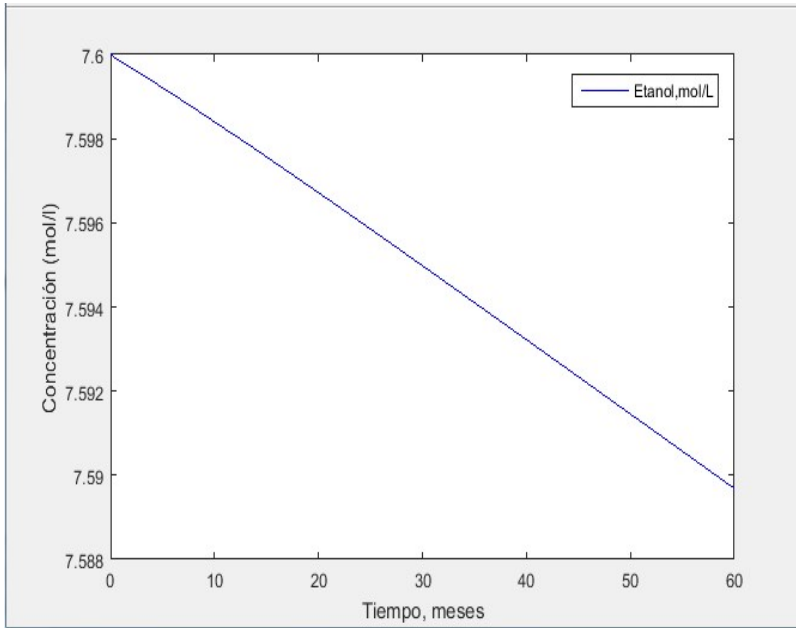
$$\frac{dCB}{dt} = (1,98E-05)CA - (2,62E-01)CB \quad (16)$$

$$\frac{dCC}{dt} = (2,62E-01)CB - (3,58E-01)CA \cdot CC + (7,38E+00)CD \quad (17)$$

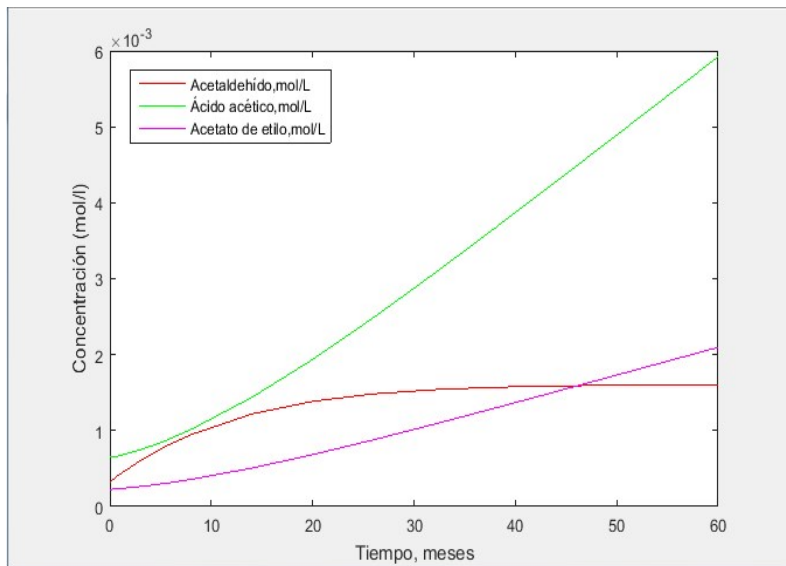
$$\frac{dCD}{dt} = (3,58E-01)CB - (7,38E+00)CD \quad (18)$$

VALIDACIÓN DE LOS MODELOS DE REACCIÓN

Siguiendo la metodología propuesta en la figuras siguientes muestran los resultados de solución del sistema de ecuaciones diferenciales que constituye el modelo cinético de reacción para el añejamiento de aguardiente para un tiempo $t=48$ meses, empleando el ¹K: Puntos de la data de concentración versus tiempo software MATLAB R2010a. La figura 2a) muestra el comportamiento de la concentración de etanol en función del tiempo y mientras que la figura 2b) muestra el comportamiento de las concentraciones de los compuestos derivados del etanol.



a)



b)

Figura 2. Modelo cinético de reacción para el añejamiento de guardiente. **Fuente:** MATLAB R2010a.

De los parámetros que ofrece el modelo se aprecia que, la concentración de etanol disminuye en el añejamiento, sin embargo esta no ocurre en la misma magnitud que lo hace la real durante el experimento. No obstante, la magnitud ofrecida por el modelo está en correspondencia con la formación de productos de la reacción, según análisis de comparación de muestras realizados con el Software StadrphicsCenturium XV, entre la data experimental y los datos ofrecidos por el modelo, es decir, si la formación de productos no es alta, el consumo de etanol no puede serlo tampoco. Así mismo, las concentraciones de los compuestos mayoritarios estudiados (acetaldehído, ácido acético y acetato de etilo) se incrementan con el tiempo de modo satisfactorio. La diferencia entre los datos reales y los experimentales para el caso del etanol se deben principalmente a pérdidas por evaporación.

CONCLUSIONES

1. La metodología propuesta permitió construir los modelos cinéticos que constituyen una herramienta útil para la optimización del proceso de añejamiento de rones.
2. La implementación del software MATLAB R2010a permitió obtener los parámetros de los modelos cinéticos que describen el proceso de añejamiento de rones.
3. Los modelos obtenidos permiten describir la influencia del tiempo de añejamiento en el comportamiento de los compuestos mayoritarios del ron proceso y establecer los criterios para la etapa de añejamiento que cumplan con los requerimientos de mermas establecidos en la ronera.

REFERENCIAS

1. González, J.C. El añejamiento del ron en grandes lotes de barriles. Efecto del tiempo y otras variables sobre algunas características físicoquímicas. *Rev. Cub. Farm. (Suplemento Especial)* 2000, 34, 442-443.
2. MINAL. Resolución 135/01. *Gaceta Oficial de la República de Cuba*. 2001, octubre 30, pp. 1599-1600.
3. González, J.C.; Morales, A. El añejamiento natural y tradicional en Cuba. *Memorias del Primer Festival Internacional del Ron, La Habana*, 6-9 de Junio, 2004, p. 23-38.
4. Reazin, G. H.; Baldwin, S.; Scales, H. S.; Washington, H. W; Andreasen, A. A.
Determination of the congeners produced from ethanol during whisky maturation. *J. AOAC*. 1976, 59 (4), 770-776.
5. Black, R. A; Andreasen, A. A. Gas-liquid chromatographic determination of monosaccharides and glycerol in aged distilled spirits. *J. AOAC*. 1974, 57 (1), 111-117.
6. Reazin, G. H. Barrel chemistry and whisky maturation. *Brewersc Guardian*. 1979. 31-34
7. Onishi, M.; Guymon, J. F.; Crowell, E. A. Changes y some volatiles constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 1977, 28 (3), 152-158.
8. Viriot, C.; Scalbert, A.; Lapierre, C.; Moutounet, M. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1872-1879.
9. Quesada-Granados, J.; Villalon-Mir, M.; López-Serrano, H.; López- Martínez, MC. The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chem.* 1996, 56 (4), 415-419.

10. Caldeira, I.; Belchior, A.P.; Climaco, M.C.; Bruno de Sousa, R. Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 458, 55-62.
11. Caldeira, I.; Climaco, M.C.; Bruno de Souza, R.; Belchior, A.P. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *J. Food Eng.* 2006, 76, 202-211.
12. Levy-Chiprut, G.; Maranon, A.M. Análisis estadístico de las variaciones en los parámetros característicos del ron cubano durante el añejamiento. *Aliment.* 1996, 269, 8789.
13. Pino, J.A.; Pérez, J.; Nuñez de Villavicencio, M. Componentes volátiles del ron: Influencia del tiempo de añejamiento y tipo de barril. *Tecnol. Aliment (Méx).* 1996, 31 (5), 510
14. Navarro, J.P. El ron Cubano. Memorias del Primer Festival Internacional del Ron,. La Habana, 6-9 de Junio, 2004.
15. Martí, C.A; Fabelo, J.A; González, E; Lago, B. A; Rodríguez, Y. Comportamiento de parámetros ambientales en las naves de añejamiento en la Ronera Central “Agustín Rodríguez Mena”. *Centrazúcar.* 2018, 45, 2223- 4861.

CAPITULO VIII

CRECIMIENTO Y CULTIVO DE LA CHLORELLA SP. EMPLEANDO VINAZAS CUBANAS COMO MEDIO DE CULTIVO

Ana Celia de Armas Martínez
Arianna Díaz Díaz
Erenio González Suárez
Juan Esteban Miño Valdés

RESUMEN

En la presente investigación se estudió el crecimiento y cultivo de la *Chlorella* sp. empleando vinazas cubanas como medio de cultivo. Se utilizó la vinaza procedente de la destilería “UEB Derivados Paraíso” la cual contiene minerales como K, Ca y Mg y valores de DQO y DBO₅ de 31 919,6 y 19 151,76 mg/l respectivamente. Para el desarrollo experimental se propuso un diseño Placket-Bürman considerándose dos variables falsas y como reales concentración de vinaza, pH del medio, aireación y tiempo de crecimiento, así como peso seco total y remoción de carga contaminante y minerales como parámetros finales medidos. Los indicadores analizados para el crecimiento fueron conteo celular, peso seco, densidad óptica y clorofila total. La mayor productividad fue de 5,0864 mg y se alcanzó con 100% de vinaza, pH ocho, aireación y siete días de crecimiento. Al analizar los modelos obtenidos en la producción de biomasa y la remoción de DQO y DBO₅ la concentración de vinaza resultó la variable más significativa.

Palabra claves: microalgas, *Chlorella* sp., vinazas

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos autótrofos unicelulares, coloniales y filamentosos que habitan diversos ambientes acuáticos en todas las latitudes y ecosistemas del planeta. Son fuentes de biomoléculas y

metabolitos de gran importancia económica y constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos, forraje, fertilizantes y combustible, e incluso, como indicadoras de contaminación.

Dentro de estos microorganismos se encuentra la *Chlorella sp.*, la cual es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las Chlorophyceae (López, 2016a). Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos.

Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales. Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Garza et al., 2010); dada la capacidad que tiene de retener en su pared celular los contaminantes ambientales que no son removidos mediante los tratamientos de aguas residuales tradicionales (Montaño et al., 2017).

Pueden crecer y desarrollarse en diversos ambientes, entre ellos las aguas dulces estancadas, el agua de mar, efluentes procedentes de las industrias que posean los minerales necesarios para su crecimiento, así como en medios inorgánicos. Estas características han despertado interés en investigadores, quienes han estudiado el crecimiento de microalgas en residuales líquidos procedentes de la industria láctea y las destilerías.

En este aspecto, las vinazas procedentes del proceso de obtención de etanol se caracterizan por ser un residual con una alta carga contaminante pero que a su vez es rico en nutrientes y materia orgánica. Las vinazas se obtienen de la fermentación y destilación de las melazas; constituyendo el principal residuo orgánico en la obtención de alcohol. Es un líquido de color café con bajo pH, olor dulce y alto contenido de materia orgánica disuelta y en suspensión.

Su composición química es variable y depende de factores como: el método de conducir la fermentación alcohólica, las especies de levaduras utilizadas, la relación fondaje-vinaza y la materia prima utilizada en la fermentación; la cual puede proceder de la melaza (concentrada), directamente del jugo de los molinos o mixta (mezcla de jugo y melaza) (2016b).

Estas aguas residuales cuentan con una concentración rica de nutrientes que permiten el desarrollo de las microalgas que requieren nitrógeno y fósforo para su crecimiento. El cultivo de las mismas en aguas residuales tiene dos objetivos: proveer de nutrientes a las microalgas para su desarrollo y reducir la carga de nutrientes en las mismas (tratamiento terciario). Esto se puede lograr gracias a la capacidad depuradora de las mismas conocida como ficorremediación (Rawat et al., 2011, Park et al., 2011a, Prajapati et al., 2013).

En Cuba, las vinazas residuales de las destilerías constituyen el principal problema de contaminación que presentan esas industrias, en caso de que su sistema de tratamiento no sea efectivo. Han sido destinadas para la producción de biogás, levadura torula o fertirriego. Sin embargo, su destino como medio de cultivo para el crecimiento de microalgas no se ha desarrollado a escala industrial, es por ello que en la presente investigación se propone como problema científico:

A partir de lo antes expuesto, en el presente trabajo se pretende determinar las condiciones idóneas para el cultivo y crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en vinazas procedentes de destilerías cubanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleará la vinaza proveniente de la “Unidad Empresarial de Base (UEB) Derivados Paraíso”, perteneciente a la Empresa Azucarera Sancti Spíritus. Se midieron sus principales características físicas y se

determinaron los minerales empleando un equipo de adsorción atómica SP9 Firma: PYE UNICAM.

La muestra a utilizar de *Chlorella sp.* fue donada por el Centro de Investigaciones Pesqueras, ubicado en el municipio Playa perteneciente a la provincia de La Habana, considerándose para el desarrollo experimental tres etapas fundamentales: la preparación de las vinazas como medio de cultivo, el crecimiento celular en las vinazas y por último la separación de la biomasa obtenida.

En el estudio del proceso de cultivo de *Chlorella sp.* en vinazas, se aplica un diseño factorial completo Plackett and Bürman (Plackett and Bürman, 1946) el cual permite analizar variables reales que indiquen diferentes condiciones de trabajo, así como falsas variables que no son consideradas pero que puedan influir en el comportamiento de los experimentos. Además se aprovechan las bondades que brinda este tipo de diseño, pues permite minimizar las réplicas y gastos experimentales (González, 2003).

La matriz de diseño de Plackett-Bürman consta de ocho experimentos y siete variables, considerando solamente el efecto de cuatro variables reales, (a saber: X_1 : concentración de vinaza, X_2 : pH, X_3 : aireación y X_4 : tiempo), esto permite utilizar tres falsas variables. Además, esta matriz de diseño incluye en la selección de las tres primeras columnas para las variables reales un Plan Experimental de un Diseño Factorial 2^3 , lo cual facilita que se desarrollen experimentos cuyos resultados puedan procesarse considerando dos tipos de diseños experimentales (González, 2003). La matriz ajustada a las variables reales y falsas consideradas en el desarrollo experimental se muestra en la tabla 1.

Tabla 2.4. Matriz Experimental del Diseño de Plackett-Bürman

N	X ₁	X ₂	X ₃	X _{f1}	X ₄	X _{f2}	X _{f3}
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-

Los niveles de las variables reales consideradas se tomaron a partir de los mejores resultados reportados en la literatura:

- ✓ X₁: Concentración de vinaza, para valores de 50% y 100%
- ✓ X₂: pH, para valores iniciales de 6 y 8
- ✓ X₃: Aireación, (Sí/No)
- ✓ X₄: Tiempo, para valores de 7 y 10 días

Los parámetros finales (Y) medidos fueron: Producción de biomasa seca en (mg) y remoción de DQO y DBO₅.

Para el desarrollo experimental se establecen cultivos de 160 ml a partir de 16 ml de inóculo en Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, de forma tal que se garantice un mayor aprovechamiento de la luz por parte de las microalgas en todo el recipiente. Las condiciones experimentales generales aparecen reportadas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales para el cultivo de microalgas en vinaza

Exp.	Conc.vinaza (%)	pH	Aireación	Tiempo (días)
1	100	8	Si	10
2	100	8	No	7
3	100	6	Si	7
4	50	8	No	10
5	100	6	No	10
6	50	6	Si	10
7	50	8	Si	7
8	50	6	No	7

Primeramente, la vinaza es filtrada para eliminar residuos sólidos sedimentables que se encuentren presentes. Las diluciones al 50% volumen se realizan con agua destilada añadiendo 80 mL de vinaza previamente caracterizada y 80 mL de agua destilada.

El pH se ajusta después de la caracterización de la vinaza, para ello se utiliza un medidor de pH Microprocessor pH Meter, marca Hanna. Los valores establecidos se alcanzan empleando solución de NaOH a 6 N y un agitador magnético marca Heidol pH, de forma tal que se garantice la homogeneidad de la mezcla y por lo tanto la basicidad establecida para el medio.

Se aplica un sistema de aireación a los cultivos por burbujeo, siendo el flujo de aire de $0,45 \text{ l min}^{-1}$, para ello se emplea aire atmosférico durante 8 h/d suministrado a través de una bomba Neuberger Type: N810FT.18, marca KNF.

El conteo celular y la cuantificación de la clorofila total fueron los parámetros medidos para tener conocimiento del crecimiento celular en cada muestra. La densidad celular se determina por recuento diario de una alícuota del cultivo en cámara de recuento

hematológica Neubauer, utilizando un microscopio óptico marca Novel. Se realizan diluciones en agua destilada siempre que sea necesario, de forma tal que el número de células contadas por campo 1/5 se encuentre entre 20 y 30 cél/ml.

Para la cuantificación de clorofila total se consideró la presencia en la *Chlorella sp.* de clorofila a, b y carotenos. Inicialmente se toman alícuotas de 5 ml de cada fotobioreactor, separándose por centrifugación a 3 400 rpm durante 3,5 min. Luego se extrae el sobrenadante con el fin de eliminar el medio presente. El pellet es resuspendido en 1,5 ml de etanol al 99 %. La mezcla se lleva a calentamiento en baño maría durante 3 min y después de enfriarse se le agrega 1 ml de etanol y se centrifugan nuevamente por 1 min a 2 000 rpm. La concentración de clorofila en el sobrenadante se calcula leyendo la absorbancia (A) del pigmento en el espectrofotómetro a 470, 649 y 664 nm. La relación de la cantidad de clorofila a, b y carotenos se calcula según las expresiones 1, 2 y 3.

$$\text{Clorofila a} = 13,36 * A_{664} - 5,19 * A_{649}$$

$$\text{Clorofila b} = 27,43 * A_{649} - 8,12 * A_{664}$$

$$\text{Carotenos} = \frac{(1000 * A_{470} - 2,13 * Ca - -97,63Cb)}{209}$$

Por otra parte, a partir del conteo celular realizado diariamente se puede determinar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación o de generación de las muestras. En cultivos estancados, la velocidad específica de crecimiento (μ), expresada en d^{-1} se determina durante la fase exponencial, según la ecuación 4 (García, 2013), donde x_1 y x_2 representan la densidad celular a tiempos t_1 y t_2 .

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

El tiempo de duplicación y/o generación, es el tiempo necesario para que se duplique la población. Cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado como lo plantea (Arredondo-Vega, 2007):

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

Una vez finalizado el tiempo establecido en el diseño experimental realizan las mediciones finales, ya sea en la biomasa producida (peso seco total) como en la vinaza residual (remoción de la carga contaminante DQO y DBO₅).

Para la determinación de peso seco total se toman alícuotas de 10 ml de la muestra extraída las cuales son centrifugadas a 3 400 rpm durante 20 minutos, se emplea una centrífuga 570212 marca EPENDORF. Una vez culminada la centrifugación se retira el sobrenadante del tubo y se almacena para posteriores análisis y el pellet resultante se deposita en placas Petri (secadas y pesadas con anterioridad), para luego ser llevado a un horno de conversión forzada marca BOXUN a una temperatura de 105 °C durante seis horas; al término de estas, se retiran las muestras y se llevan a un desecador, luego se pesan en una balanza digital SI-64 marca DENVER registrándose los datos de peso seco en base a volumen total de cultivo.

Para determinar el grado de contaminación a través del contenido de la demanda química y bioquímica de oxígeno se realizan los análisis correspondientes a las muestras tal y como aparece en Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater (2005), tanto al inicio como al sobrenadante final de cada experimento.

Conociendo estos valores se determina el por ciento de remoción a partir de la ecuación 6.

$$\% \text{ de Remoción} = \frac{\text{Valor inicial} - \text{Valor final}}{\text{Valor inicial}} * 100$$

A partir de los valores de los parámetros finales se puede conforma la matriz experimental de Plackett-Bürman, de forma tal que permita obtener los modelos del diseño de experimentos. Los coeficientes se calculan para cada variable del modelo, según las ecuaciones 7 y 8.

$$E0 = \frac{\Sigma(Y)}{8} * 2$$

$$Ei = \frac{\Sigma(Y_{x_{fi}})}{8} * 2$$

Donde E_i es E_1 , E_2 y E_3 , para los niveles de x_1 , x_2 y x_3 , respectivamente, establecidos en la matriz experimental. De igual forma se determina E_{fi} para cada nivel de las falsas variables en la matriz experimental como:

$$E_{fi} = \frac{\Sigma(Y * x_{fi})}{8} * 2$$

De acuerdo a los resultados de los coeficientes e determina el Error Estándar a partir de la suma de los cuadrados de las falsas variables, como se plantea en la ecuación 10. Donde N es el número de falsas variables (este caso 3).

$$SE = \left(\frac{\Sigma(E_{fi})^2}{N} \right)^{0,5}$$

La significación de los efectos se mide a partir de la comparación del valor calculado de la prueba (t) de Student con f grados de libertad (f : número de falsas variables) con el valor tabulado, y serán significativas aquellas variables cuyo E_i brinde una t calculada mayor que la tabulada para idénticos grados de libertad, siendo:

$$t_{\text{calc}} = \frac{E_i}{SE}$$

Si alguna falsa variable es significativa indica que existen interacciones o efectos cuadráticos que no han sido considerados, en ese caso se recomienda utilizar los resultados experimentales del diseño factorial completo 2^3 , ya que el diseño experimental de Plackett–Bürman brinda la posibilidad de analizar los resultados por este método al incluir en sus tres primeras columnas una matriz de diseño 2^3 . Los coeficientes de las variables (b_0 , b_1 , b_2 y b_3), se determinan de la misma forma que los coeficientes del diseño de Plackett – Bürman (ecuaciones 7 y 8). Mientras que, los coeficientes de interacción se calculan como:

$$b_{ij} = \frac{\Sigma(Y_{\text{exisrj}})}{g} * 2$$

Para determinar la significación de los coeficientes se calcula el intervalo de confianza Δb_j (Adler, 1975) que es igual a:

$$\Delta b_j = \pm t * (Sb_j)$$

Siendo:

$$Sb_j = \left(\frac{S(Y)^2}{f2} \right)^{0,5}$$

$$S(Y)^2 = \frac{\sum(y_i - y_m)^2}{g}$$

RESULTADOS

Las vinazas procedentes de la destilería “UEB Derivados Paraíso” se caracterizan por tener un pH de 4,67 y valores de DQO de 31 919 mg/L, tal y como se muestra en la tabla 3, además se destaca la presencia de minerales como el magnesio y el calcio, tabla 4.

Tabla 3. Propiedades medidas a la vinaza “UEB Derivados Paraíso”

Parámetros	Valores
$\rho_{\text{vinaza}}(15^{\circ}\text{C})$	0,890 (g/cm ³)
pH	4,67
DQO	31 919,60 mg/L
DBO ₅	19 171,76 mg/L

Tabla 4. Minerales determinados a la vinaza “UEB Derivados Sancti Spiritus”

Minerales (% peso)						
Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	K	Na
6,07	1,91	0,01	0,01	0,16	8,54	0,34

La densidad celular medida diario por recuento de una alícuota del cultivo en cámara hematológica Neubauer se comportó según se muestra en la figura 1.

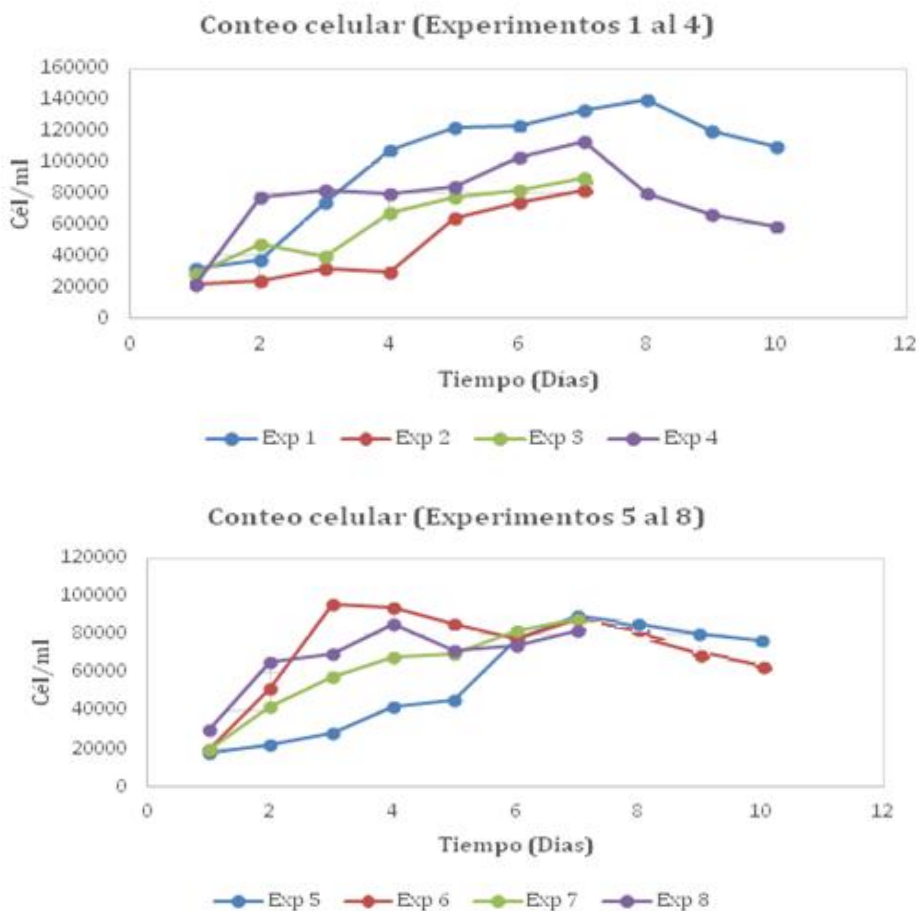


Figura 1. Conteo celular, (a) Experimentos 1, 2, 3 y 4; (b) Experimentos 5, 6, 7 y 8

El comportamiento de la clorofila durante el desarrollo experimental se muestra en la figura 2.

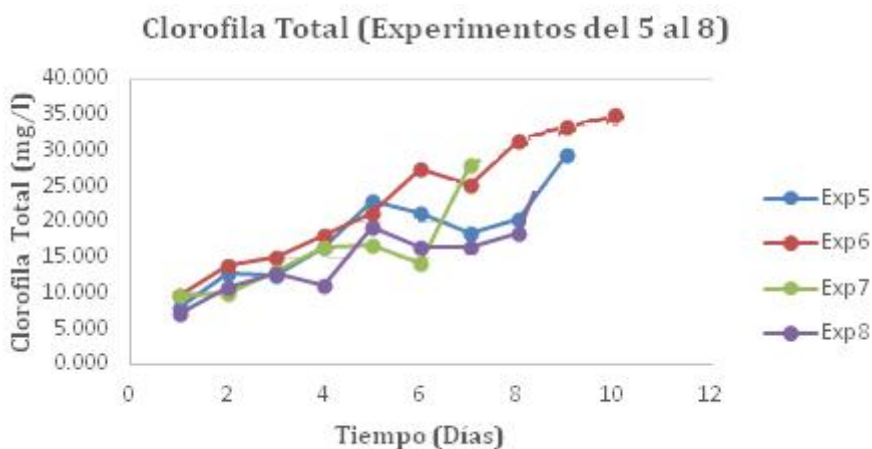
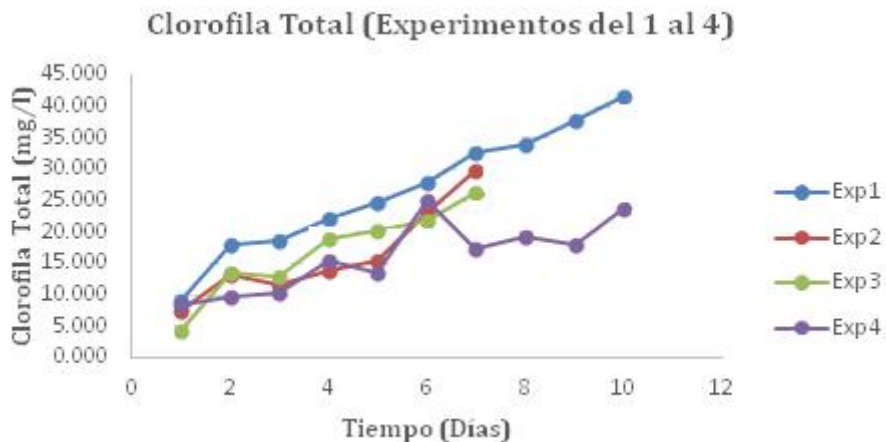


Figura 2. Clorofila total, (a) Experimentos 1, 2, 3 y 4; (b) Experimentos 5, 6, 7 y 8

A partir de las expresiones para calcular la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación se obtienen los valores que aparecen en la tabla 5.

Tabla 5. Velocidad de crecimiento (VC (d⁻¹) y tiempo de duplicación (TD (d))

Día	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	Exp.8
1	VC 0,288	0,087	0,154	0,087	0,288	0,182	0,182	0,223
	TD 2,409	7,966	4,497	7,966	2,409	3,802	3,802	3,106
2	VC 0,230	0,000	0,347	0,589	0,044	0,387	0,280	0,506
	TD 3,017	0,000	2,000	1,176	15,932	1,793	2,477	1,370
3	VC 0,375	0,096	0,170	0,410	0,051	0,462	0,294	0,357
	TD 1,847	7,228	4,071	1,692	13,490	1,500	2,357	1,943
4	VC 0,376	0,056	0,260	0,301	0,140	0,341	0,260	0,319
	TD 1,843	12,425	2,662	2,303	4,954	2,031	2,662	2,172
5	VC 0,325	0,196	0,236	0,251	0,130	0,255	0,214	0,220
	TD 2,131	3,533	2,940	2,766	5,327	2,715	3,238	3,155
6	VC 0,274	0,188	0,205	0,244	0,196	0,196	0,205	0,188
	TD 2,532	3,693	3,385	2,836	3,528	3,528	3,385	3,693
7	VC 0,246	0,176	0,189	0,223	0,189	0,186	0,186	0,176
	TD 2,821	3,949	3,671	3,114	3,671	3,734	3,734	3,949
8	VC 0,220	-	-	0,150	0,160	0,154	-	-
	TD 3,144	-	-	4,606	4,345	4,513	-	-
9	VC 0,179	-	-	0,112	0,134	0,119	-	-
	TD 3,876	-	-	6,167	5,181	5,828	-	-
10	VC 0,152	-	-	0,090	0,117	0,098	-	-
	TD 4,553	-	-	7,706	5,946	7,067	-	-
*VC	0,266	0,093	0,180	0,228	0,079	0,202	0,162	0,233
*TD	2,817	4,418	5,448	2,440	2,810	2,891	3,144	3,975

*promedio

Los resultados alcanzados de peso seco y remoción de la carga contaminante, en cada experimento, al culminar el tiempo establecido, son los que aparecen de forma resumida en la tabla 6

Tabla 6. Peso seco y remoción de carga contaminante en cada experimento

Exp.	Peso seco (mg)	Rem.DQO (%)	Rem.DBO ₅ (%)
1	5,0864	62,285	37,371
2	1,4256	17,457	10,474
3	2,56	31,348	18,808
4	0,6304	7,720	4,631
5	1,1728	14,361	8,616
6	1,272	15,576	9,345
7	1,1872	14,538	8,722
8	0,656	8,033	4.819

Con los valores anteriores se conformó la matriz experimental de Plackett-Bürman, (tabla 7) para obtener los modelos del diseño de experimentos en función de los parámetros finales medidos.

Tabla 7. Matriz Experimental de Plackett-Bürman con los resultados experimentales

N	1	2	3	4	5	6	7	8
X ₁	+	+	+	-	+	-	-	-
X ₂	+	+	-	+	-	-	+	-
X ₃	+	-	+	-	-	+	+	-
X _{f1}	-	+	-	-	+	+	+	-
X ₄	+	-	-	+	+	+	-	-
X _{f2}	-	-	+	+	+	-	+	-
X _{f3}	-	+	+	+	-	-	-	-
Y (mg/mL)	5,0864	1,4256	2,56	0,6304	1,1728	1,272	1,1872	0,656
Rem.DQO (%)	62,285	17,457	31,348	7,720	14,361	15,576	14,538	8,033
Rem.DBO ₅ (%)	37,371	10,474	1,808	4,631	8,616	9,345	8.722	4,819

Los coeficientes calculados del diseño de Plackett-Bürman son los que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de los coeficientes calculados del diseño de Plackett-Bürman

	E0	E1	E2	E3	Ef1	E4	Ef2	Ef3
Biomasa seca	4,663	2,166	0,890	2,074	-1,292	0,778	-0,963	-0,738
Remoción de DQO	75,253	75,253	-9,596	-10,606	10,606	-6,565	9,596	6,565
Remoción de DBO ₅	93,680	93,680	30,548	30,548	-30,548	30,548	-30,548	-30,548

Resultados para el efecto cuadrático de las falsas variables se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto cuadrático de las falsas variables

Valor final medido	Ef1 ²	Ef2 ²	Ef3 ²	ΣE ²	SE
Biomasa Seca	1,668	0,927	0,544	2,596	0,930
Remoción de DQO	112,487	92,083	43,104	204,570	11.391
Remoción de DBO ₅	933,201	933,201	933,201	1866,401	10.171

En la tabla 10 se muestran los valores de la *t* tabulada para dos grados de libertad determinada, según diferentes niveles de probabilidad de las Tablas Especializadas (Eilon, 1975), y las *t* calculadas de las variables para el diseño de Plackett-Bürman, con ella se establecen los diferentes niveles de significación de las variables según se considere la probabilidad en un rango de 95% (normalmente usado) y un 85% propuesto para experimentos realizados en condiciones industriales o similares (Isaccson, 1970b).

Los resultados se muestran para el peso seco, pero de igual forma se determinaron para la remoción de la carga contaminante.

Tabla 10. Significación de las variables de acuerdo al método de Plackett–Bürman

t student	to	t1	t2	t3	tf1	t4	tf2	tf3
Peso Seco								
tcal	5,012	2,328	0,956	2,228	-1,388	0,835	-1,035	-0,793
2,92	95%	s	n	n	n	n	n	n
1,386	85%	s	s	n	s	s	n	n

Coefficientes de las variables y los de interacción son los que aparecen en la tabla 11.

Tabla 11. Coeficientes de las variables y las interacciones para el diseño factorial 2³

b0	b1	b2	b3	B12	B23	B13	B123
4,663	2,166	0,889	2,073	0,963	0,738	1,291	0,777

Un coeficiente será significativo cuando su valor absoluto sea mayor que Δb_j . Los valores comparativos para este criterio se muestran en la tabla 12, para peso seco y de igual forma se calcularon para la remoción de DQO y DBO₅.

Tabla 12. Análisis de la significación de las variables

Δb_j		b0	b1	b2	b3	b12	b23	b13	b123
Peso Seco									
		4,663	2,166	0,889	2,073	0,963	0,738	1,291	0,777
4,027	95%	s	n	n	n	n	n	n	n
1,911	85%	s	s	n	s	n	n	n	n

A partir de estos resultados no se alcanza significación para la variable pH. Es por eso que el modelo para un 85 % de probabilidad considerará solamente el efecto de la concentración de vinaza y la aireación. Un resumen de los modelos obtenidos para cada parámetro se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Modelos del diseño factorial para los parámetros finales medidos

Parámetro	N.S.	Modelo
Biomasa seca	85%	$4.663 + 2.166 * x_1 + 2.073 * x_3$
DQO	85%	$57.10 + 26.528 * x_1 + 25.392 * x_3$
DBO ₅	85%	$48.8 + 18.223 * x_1 + 17.087 * x_3$

DISCUSIÓN

Las vinazas por el contenido que tienen, ya sea de minerales o carga orgánica, pueden constituir un medio para el cultivo de microalgas. La empleada en esta investigación tiene valores de carga contaminante expresada en DQO y DBO₅ de 31 919,6 y 19 151,76 en mg/l respectivamente. Su composición de minerales se destaca por la presencia de potasio en un 8.54% y calcio en 6.07%, teniendo magnesio en una menor proporción (1.91%), los demás minerales determinados como el cobre, cinc, hierro y sodio, constituyen elementos trazas.

Al analizar el comportamiento del conteo celular en el tiempo se comprobó que hubo crecimiento de la especie y que por lo general, en todos los experimentos se alcanzó la fase estacionaria del crecimiento para valores mayores que 70 000 cél/ml. El conteo más alto se alcanzó en el primer experimento, donde se obtuvieron 140 000 cél/ml, para una concentración de vinaza del 100% y pH ocho. En este caso, se manifiestan las diferentes etapas del crecimiento, la

adaptación en los dos primeros días, seguido del crecimiento exponencial hasta el día ocho, esto puede deberse al cambio de medio, que provoca que los microorganismos entren en un período de estrés y al tratar de sobrevivir aprovechan al máximo el gran contenido de nutrientes que poseen las vinazas (Castro Ruiz C.L., 2011) y finalmente la fase estacionaria hasta culminar el tiempo establecido en el diseño de experimentos. Lo anterior planteado demuestra que la *Chlorella sp.* puede crecer en vinazas residuales de una destilería siempre y cuando estas tengan un pH básico.

Por su parte los valores calculados de clorofila total (considerando la presencia de clorofila a, b y carotenos) están en correspondencia con el crecimiento celular en cada experimento, reportándose los valores entre 5 y 43 mg/l.

Cuando se analizan los datos reportados en la tabla 6 la mayor productividad de biomasa seca se alcanzó en el primer experimento seguido del tercero, correspondiéndose al 100% de vinaza en ambos casos. Aunque se alcanzan resultados inferiores a los obtenidos en (Castro Ruiz C.L., 2011) para la *Chlorella vulgaris*, se coincide con estos autores en mayor productividad a mayor concentración de vinaza, demostrándose que esta especie de microalgas puede sobrevivir en vinazas sin diluir.

En cuanto a la remoción de la demanda química y bioquímica de oxígeno, aunque son valores bajos, son similares a los alcanzados en (Olarte Gómez, 2016), quien trabajó con la especie *Chlorella vulgaris*, por lo que la especie de microalga en cuestión es capaz utilizar diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Según los resultados alcanzados en la tabla 6, las variables pH y tiempo, nunca son significativas, mientras que los niveles de significación de la concentración de vinaza y de la aireación se alcanzan a un 90% de probabilidad. Por otra parte la falsa variable f1 alcanza niveles de significación a un 85 %, lo que indica que existen

interacciones de las variables o efectos cuadráticos que no se consideraron, por lo que se utilizaron los resultados experimentales del diseño factorial completo 2³.

En este análisis, los modelos para peso seco se obtienen para un 85% de confiabilidad y solamente influyen la concentración de vinaza y la aireación en sus máximos valores, siendo la concentración la de mayor significación. De igual forma en la remoción de DQO y DBO₅, para 80% de confiabilidad, se hacen significativas la concentración de vinaza y la aireación en sus máximos valores.

CONCLUSIONES

1. Las vinazas residuales de una destilería contienen minerales como potasio, calcio y magnesio y una alta carga contaminante que pueden ser aprovechados para el cultivo de microalgas.
2. El mayor rendimiento obtenido de biomasa de *Chlorella* sp. fue de 5,0864 mg correspondiente al Experimento I con la máxima concentración de vinazas, pH de ocho y aireación.
3. El crecimiento de *Chlorella* sp. en vinazas disminuye la carga contaminante presente en este residual ya que logra la remoción de un 30% de la DQO y DBO₅.
4. Las variables concentración de vinaza y la aireación son las que tienen influencia significativa en los modelos experimentales obtenidos para el rendimiento de biomasa y la remoción de DQO y DBO₅.

BIBLIOGRAFÍA

- 2016b. *Vinazas alternativas de uso* [Online]. Available: www.docplayer.es/61263513-Vinazas-alternativas-de-uso.html.
- ADLER, Y., MARKOVA, V. & GRANOVSKY, V. 1975. The design of experiments to find optimal conditions.

- ANDERSEN, R. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press.
- ARREDONDO VEGA, B. O., D. VOLTOLINA. concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas Analíticas en la Evaluación de la biomasa Microalgal*.
- CASTRO RUIZ C.L., P. R. J. 2011. Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala de laboratorio. Bucaramanga.
- CUBERO, R. G. 2014. *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂*. Universidad de Sevilla.
- EILON, S. 1975. *Industrial Engineering Tables*.
- GARCÍA, R. 2013. Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂.
- GARZA, M. T., ALMAGUER, V., RIVERA, J. & LOREDO, J. Á. 2010. Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella* sp inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*, 13, 174-177.
- GONZÁLEZ, E. S. 2003. El pulpeo con etanol como alternativa para incrementar la competitividad de fábricas de papel mediante su desarrollo prospectivo integrado a industrias de la caña de azúcar. Cuba.
- ISACCCSON, W. B. 1970a. Statistical Analyses for Multivariable Systems. *Chemical Engineering*, 69-75.
- ISACCCSON, W. B. 1970b. Statistical Analyses for Multivariable Systems. *Chemical Engineering*, 6, 69-75.
- LÓPEZ, L. K. 2016a. *Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas.*, Universidad Científica de Perú.
- MONTAÑO, A., ACUÑA, L. B., MERCADO, E. A. & MERCADO, I. 2017. Evaluación del uso de la microalga *Chlorella* sp. no viva en la

- remoción de cefalexina. *In: GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS, F.-Q. A. Y. E. A. (ed.) Seminario Internacional de Ciencias Ambientales. Barranquilla, Colombia: Universidad del Atlántico.*
- OLARTE GÓMEZ, E. A. M. J. V. G. 2016. Evaluación del uso de la microalga *Chlorella Vulgaris* en el tratamiento de aguas residuales industriales. .
- PARK, J., CRAGGS, R. & SHILTON, A. 2011a. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *BioresourceTechnology*, 102, 35-42.
- PLACKETT, R. L. & BÜRMAN, J. P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
- PRAJAPATI, S., KAUSHIK, P., MALIK, A. & VIJAY, V. 2013. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, 1408-1425.
- RAWAT, I., RANJITH-KUMAR, R., MUTANDA, T. & BUX, F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 3411-3424.
- Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 21st. Centennial Edition. APHA, AWWA, ECF. USA. 2005

CAPÍTULO IX

CINÉTICA DEL CAMBIO DE COLOR EN SNACKS DE MANDIOCA FRITOS POR INMERSIÓN

Sandra Liliana Hase
Juan E. Miño Valdés
Omar Pérez Navarro

Introducción

La mandioca es un producto regional que se consume hervida, o hervida y luego frita, cuya transformación industrial en nuevos productos alimenticios es casi nula, destinándose principalmente a la producción de fécula. La industrialización de la mandioca en la provincia de Misiones se realizaba casi exclusivamente mediante la extracción de almidón nativo y su conversión a un conjunto de almidones modificados y a algunos adhesivos para diferentes tipos de aplicaciones. La producción de puré deshidratado de mandioca, es una nueva aplicación desarrollada con la colaboración del grupo de investigadores en la FCEQyN de la UNaM e industrializada en la Cooperativa Agrícola e Industrial San Alberto Ltda, (Puerto Rico, Misiones) La formulación de un snack a partir del puré de esta raíz es una buena alternativa para ampliar la aplicación industrial de esta materia prima debido a las ventajas de reproducibilidad, uniformidad y pérdida de defectos y al rol que cumplen estos alimentos crujientes en la dieta de los consumidores modernos [1]. El color de los productos de snack fritos es uno de los factores de calidad más significativos para su aceptación.

Los extrudidos de puré de mandioca son blancos y el color se genera durante la fritura debido a cambios físicos y químicos causados por los fenómenos de transferencia de masa y calor que tienen lugar

durante la operación [2], [3]; por lo tanto, la temperatura del aceite y el tiempo de fritura afectan el color de los snacks de mandioca.

Se han realizado muchos estudios de la cinética de cambio de color para productos fritos por inmersión profunda en aceite pero escasos trabajos sobre snacks de puré de mandioca.

Se han reportado los parámetros cinéticos de cambio de color para albóndigas de carne [4], papas fritas [2], [5], tofu [3] y Gulabjamun [6]; en ellos se señala la influencia de: la temperatura y composición del aceite, el tiempo de fritura y el tamaño de la muestra.

El objetivo de este trabajo fue modelar la cinética del cambio de color en los snacks de puré de mandioca, durante la fritura por inmersión a 150, 170 o 190°C.

Materiales y métodos

Los snacks de mandioca se prepararon a partir de puré obtenido por compresión de raíces de mandioca cocidas al vapor, variedad Rocha, de la cosecha anual 2013, provistas por la Cooperativa Agrícola San Alberto Ltda. y conservadas a -24°C. Los extruidos se obtuvieron haciendo pasar el puré a través de orificios de 6 mm de diámetro y se conservaron en Ziploc herméticos a -24°C hasta la realización de las experiencias. Los mismos fueron fritos por 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 540 segundos para evaluar pérdida de agua, absorción de aceite y color.

Para la fritura por inmersión se utilizó una freidora marca Moulinex® de 1,2 kg de capacidad con control de temperatura. La temperatura del aceite se controló mediante una termocupla con sonda Testo de inmersión flexible estanca tipo K clase 1, rango de (- 60 a 1.000) °C, transductor patrón Testo un canal T/P modelo 925, con tiempo de respuesta 2 segundos. La freidora se cargó con 2,2 L de aceite de girasol marca Natura® y se mantuvo una relación snacks/aceite de 0,2 (% peso/volumen). La temperatura de fritura se fijó en: 150, 170 ó

190 °C. Los snacks fritos fueron removidos del aceite mediante una cesta extraíble provista por la freidora y colocados sobre papel adsorbente. Después de cada experiencia se controló el volumen de aceite, el que fue cambiado después de cada hora de fritado. Todas las experiencias se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como un promedio de los valores individuales obtenidos. El agua contenida en los snacks fritos fueron medidos por secado en estufa a 100°C hasta peso constante y el contenido de aceite en los snacks fritos fueron determinados mediante extracción con Twisselman. Las muestras secas fueron molidas y extraídas con éter de petróleo (p.e. 60-80 °C) por 4 horas. El éter de petróleo fue removido por evaporación y los matraces de Twisselman, colocados a 60 °C en estufa por 24 hs. El aceite recuperado fue pesado por triplicado, los resultados son el promedio de los valores obtenidos. Las muestras de snacks molidas fueron utilizadas para la medición de color. Los parámetros de color (L, a, b) fueron medidos con un colorímetro HunterLab D25-9 (Hunter Associates Laboratory, Reston VA). Las muestras fueron escaneadas en ocho diferentes localizaciones para determinar los valores de L, a, b como el promedio de las ocho mediciones.

Modelos cinéticos

El contenido de agua (W_s) y el contenido de aceite (F_s) de los snacks de mandioca se expresan en base al contenido de sólidos no grasos, a partir de los valores expresados en base seca (W y F , respectivamente), como sigue:

$$W_s = \frac{W}{1 - W - F} \quad (1)$$

$$F_s = \frac{F}{1 - W - F} \quad (2)$$

Donde: W y F son el contenido de agua y el contenido de aceite de los snacks, expresados en (kg / kg masa de snacks en base seca), y W_S y F_S son el contenido de agua y el contenido de aceite de los snacks, expresados en (kg / kg masa de materia seca no grasa).

La cantidad de agua perdida se modela mediante la ecuación [5]:

$$W_S = (W_{S_0}^{(1-n)} + (1-n)qt)^{1/(1-n)} \quad (3)$$

Donde W_{S_0} es el contenido de agua inicial, W_S es el contenido de agua al tiempo t , y n y q son parámetros de ajuste del modelo que se obtienen por regresión múltiple para cada temperatura de fritura. Para describir los cambios de color de los parámetros L y “ a ” durante el proceso de fritura se eligió un modelo cinético de primer orden [2].

$$\frac{dC}{dt} = -K_c (C_0 - C_e) \quad (4)$$

Donde C es el parámetro de color (L , “ a ”), C_e es el valor de equilibrio, K_c es la constante de velocidad (min^{-1}) de cada parámetro de color, C_0 es el valor inicial para cada parámetro de color al tiempo cero y t es el tiempo de fritura (min). Los parámetros C_e y K_c para los parámetros de color L y “ a ” fueron estimados por un método de regresión no lineal.

Para describir los cambios de color del parámetro “ b ” durante el proceso de fritura se eligió un modelo cinético de orden cero.

$$\frac{db}{dt} = -K_b \quad (5)$$

Donde b es el parámetro de color “ b ”, K_b es la constante de velocidad (min^{-1}) del parámetro de color “ b ” y t es el tiempo de fritura (min).

Los cambios de color fueron calculados por [5]:

$$\Delta E = \left((L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2 \right)^{1/2} \quad (6)$$

Donde L , a y b son los parámetros de color medidos al tiempo t y L_0 , a_0 y b_0 son los parámetros de color al tiempo cero.

El cambio de color durante la fritura se ajustó a la siguiente relación empírica [2]:

$$\Delta E = b_1 + b_2 \exp\left(-\frac{t}{b_3}\right) \quad (7)$$

Donde b_1 , b_2 y b_3 son parámetros del modelo, estimados por un método de regresión no lineal.

Los valores de la constante de velocidad específica del cambio de color, k , se determinaron a partir de [2]:

$$k = \frac{-b_2 \exp\left(-\frac{t}{b_3}\right)}{b_3(\Delta E_{\text{máx}} - \Delta E)} \quad (8)$$

Donde $\Delta E_{\text{máx}}$ es el máximo valor del cambio de color obtenido experimentalmente y ΔE es el cambio de color al tiempo t .

Los valores experimentales de los parámetros de color L , a y b y los valores de contenido de agua se sometieron a un análisis estadístico con pruebas de ANOVA y pruebas de rango múltiple utilizando el Statgraphics Centurion® XVI versión 16.0.09.

La bondad del ajuste de los modelos a los datos experimentales, se evaluaron mediante el error cuadrático medio (RMSE):

$$RMSE = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (c_{cal} - c_{exp})^2}{n} \right)^{0,5} \quad (9)$$

Donde c_{cal} es el valor estimado por el modelo, c_{exp} es el valor obtenido experimentalmente y n es el número de datos experimentales.

Resultados y discusión

Cinética de pérdida de agua

El contenido inicial de agua en las muestras de $Ws_0 = 0,593$ disminuye rápidamente con el tiempo de fritura. Los valores experimentales de Ws se ajustaron al modelo dado por la ecuación (3). Los valores de los parámetros cinéticos n y q y de la bondad del ajuste del modelo se resumen en la Tabla 1 y los valores experimentales y los predichos por el modelo se presentan en la Fig. 1.

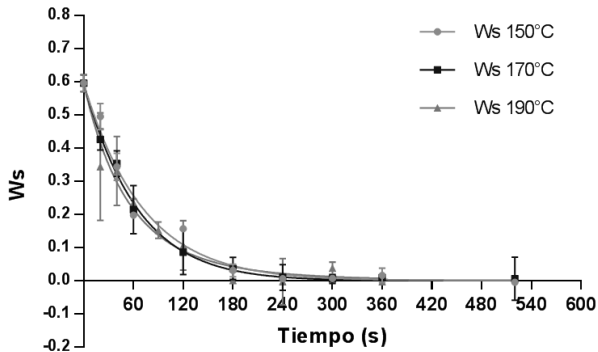


Fig. 1: Datos experimentales y modelo cinético para la pérdida de agua de snacks de mandioca por fritura a 150 °C, 170 °C ó 190 °C

Tabla 1: Valores de los parámetros cinéticos n y q para la ecuación (3) y la bondad del ajuste del modelo para la pérdida de agua

$^{\circ}\text{C}$	n	$q \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$*R^2$
150	0,974±0,109	-0,014±0,001	0,980
170	0,945±0,076	-0,015±0,001	0,991
190	1,161±0,151	-0,151±0,004	0,956

*R: coeficiente de determinación

Luminosidad (L)

Un análisis de ANOVA indica que tanto el tiempo como la temperatura de fritura influyen significativamente sobre el parámetro de color L ($p < 0,05$). Los valores experimentales de la luminosidad (L) se ajustaron al modelo de primer orden dado por la ecuación (4). Los valores de los parámetros cinéticos L_e y K_L y de la bondad del ajuste del modelo se resumen en la Tabla 2 y los valores experimentales y los predichos por el modelo se presentan en la Fig. 2.

El valor inicial de luminosidad (L) de los snacks de mandioca fritos es de $73,01 \pm 1,13$. Este valor disminuye con el tiempo de fritura como se muestra en la Fig. 2. El cambio es aparentemente rápido en las primeras etapas de fritura y luego se vuelve más lento hasta alcanzar los valores de equilibrio estimados, que dependen de la temperatura del aceite, según se muestra en la Tabla 2. Un comportamiento similar fue reportado en tofu [3] y en nuggets de pollo [7]. A medida que aumenta la temperatura de fritura la luminosidad disminuye para el mismo tiempo de fritura, y los valores de luminosidad de equilibrio decrecen. Esto puede atribuirse a reacciones de caramelización a altas temperaturas de fritura [7]. Considerando que el oscurecimiento es un efecto no deseado en un producto frito, serían aconsejables cortos tiempos de fritura a bajas temperaturas.

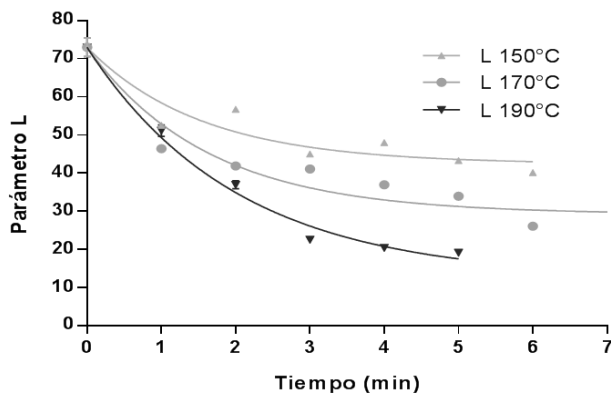


Fig. 2: Datos experimentales y modelo cinético de primer orden para la luminosidad de snacks de mandioca obtenidos por fritura a 150, 170 y 190 °C

Tabla 2: Valores de los parámetros cinéticos L_0 , L_e y K_L para el modelo de primer orden y la bondad del ajuste del modelo para la luminosidad (L)

T (°C)	L_e	K_L (min^{-1})	* R^2	**RMSE
150	42,39±0,70	0,645±0,049	0,814	3,99
170	29,23±0,63	0,614±0,031	0,885	4,28
190	12,43±1,02	0,435±0,021	0,976	2,81

*R:coeficiente de determinación. **Error cuadrático medio

Parámetro "a"

Un análisis de ANOVA indica que tanto el tiempo como la temperatura de fritura influyen significativamente sobre el parámetro de color "a" ($p < 0,05$). Los valores experimentales del parámetro "a" se ajustaron al modelo de primer orden dado por la ecuación (4). Los valores de los parámetros cinéticos a_0 , a_e y K_a y de la

bondad del ajuste del modelo se resumen en la Tabla 3 y los valores experimentales y los predichos por el modelo se presentan en la Fig. 3.

Como se muestra en la Fig. 3 el parámetro “a” de los snacks de mandioca fritos aumentan con el tiempo de fritura a partir de un valor inicial de $-0,74 \pm 0,05$, indicando que los productos se vuelven más rojo. A medida que aumenta la temperatura de fritura los valores de “a” de equilibrio decrecen.

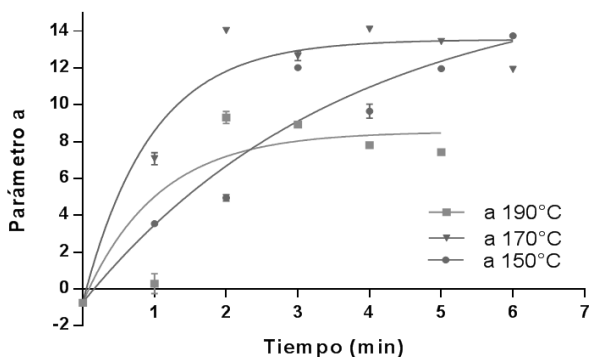


Fig. 3: Datos experimentales y modelo cinético de primer orden para el parámetro “a” de snacks de mandioca obtenidos por fritura a 150 °C, 170 °C y 190 °C

Tabla 3: Valores de los parámetros cinéticos a_0 , a_e y K_a para el modelo de primer orden y la bondad del ajuste del modelo para el parámetro “a”

T (°C)	a_e	K_a (min ⁻¹)	*R ²	**RMSE
150	$16,82 \pm 0,89$	$0,274 \pm 0,026$	0,900	1,48
170	$13,13 \pm 0,14$	$1,139 \pm 0,063$	0,897	1,35
190	$8,54 \pm 0,97$	$0,965 \pm 0,146$	0,757	1,78

*R: coeficiente de determinación. **Error cuadrático medio

Parámetro “b”

Un análisis de ANOVA indica que tanto el tiempo como la temperatura de fritura influyen significativamente sobre el parámetro de color “b” ($p < 0,05$). El valor inicial del parámetro “b” de los snacks de mandioca fritos fue de $8,61 \pm 0,17$. Este valor aumentó inicialmente con el tiempo de fritura hasta el máximo color dorado de $23,90 \pm 0,05$ ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 minutos), $20,43 \pm 0,10$ ($170\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 minuto), y $16,96 \pm 0,26$ ($190\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 minuto) y luego disminuye hasta el tiempo final de fritura, como se observa en la Fig. 4. Los valores del parámetro “b” de esta segunda etapa de descenso se ajustaron al modelo de orden cero dado por la ecuación (5). Los valores de los parámetros cinéticos b_0 y K_b y de la bondad del ajuste del modelo se resumen en la Tabla 4 y los valores experimentales y los predichos por el modelo se presentan en la Fig. 4. Un comportamiento similar fue reportado durante la fritura de tofu [3].

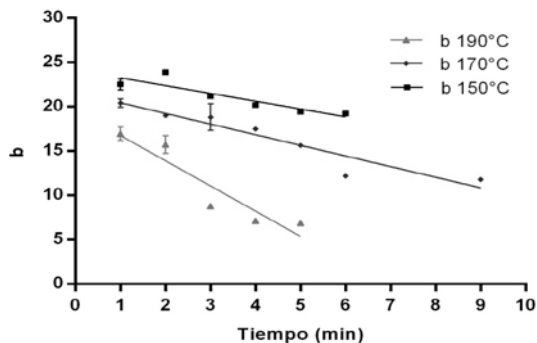


Fig. 4: Datos experimentales y modelo cinético de orden cero para el parámetro “b” de snacks de mandioca obtenidos por fritura a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $190\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabla 4: Valores de los parámetros cinéticos b_0 y K_b para el modelo de orden cero y la bondad del ajuste del modelo para el parámetro “b”

T (°C)	b_0	K_b (min ⁻¹)	R ²
150	24,17 ± 0,15	-0,880 ± 0,039	0,776
170	21,67 ± 0,18	-1,200 ± 0,037	0,869
170	19,63 ± 0,47	-2,843 ± 0,134	0,814

Cinética del cambio de color (ΔE)

Los valores experimentales del cambio de color (ΔE) calculados por la ecuación (6), se ajustaron al modelo empírico dado por la ecuación (7). Los valores de los parámetros cinéticos b_1 , b_2 y b_3 y de la bondad del ajuste del modelo se resumen en la Tabla 5 y los valores experimentales y los predichos por el modelo se presentan en la Fig. 5.

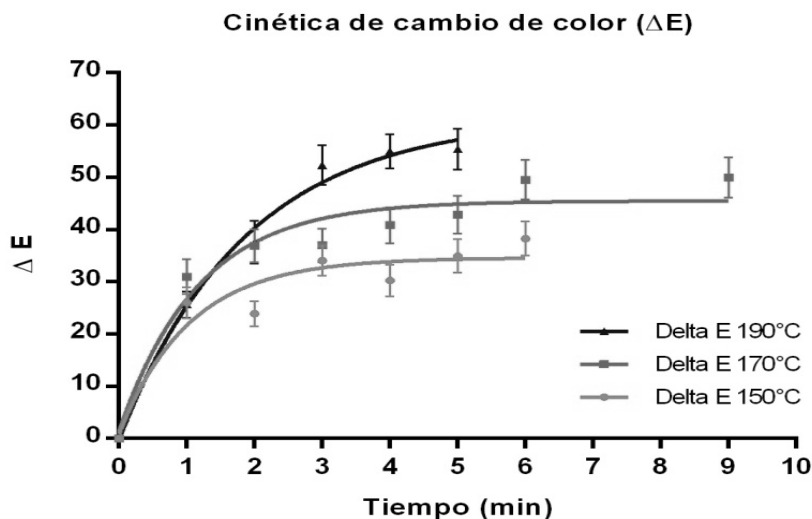


Fig. 5: Datos experimentales y modelo cinético empírico para el cambio de color (ΔE) de snacks de mandioca obtenidos por fritura a 150, 170 ó 190 °C

Tabla 5: Valores de los parámetros cinéticos b_1 , b_2 y b_3 y la bondad del ajuste del modelo para el cambio de color (ΔE)

T (°C)	b_1	b_2	b_3	*R ²
150	34,56 ± 0,56	-33,72 ± 1,01	1,04 ± 0,08	0,872
170	45,45 ± 0,57	-44,26 ± 1,07	1,17 ± 0,07	0,904
190	61,42 ± 1,27	-61,63 ± 1,36	1,87 ± 0,11	0,967

*R: coeficiente de determinación

Para obtener los parámetros cinéticos del color se procede como sigue: para cada valor de Ws dado y para cada temperatura de fritura, se obtiene el tiempo para alcanzar dicho contenido de agua (Fig.1). Así, para un dado contenido de agua y tiempo de reacción se determina el valor de (ΔE) (Fig. 5) para cada temperatura. A partir de estos valores se determina k (constante de velocidad específica del cambio de color) con la ecuación (8), haciendo posible obtener un gráfico de Arrhenius para determinar la energía de activación (E_a) para valores de contenido de agua seleccionados. En la Tabla 6 se dan valores de energía de activación para el cambio de color como función del contenido de agua.

Tabla 6: Energía de activ. para el cambio de color (ΔE) a contenidos de agua seleccionados

Ws %	E_a (kJ/mol)
59,26	16,05
50	15,66
40	13,97
30	9,80
20	0,35

La energía de activación E_a (kJ/mol) disminuyó de (16,05 a 0,35) a medida que disminuyó el contenido de humedad Ws % de (59,26 a 20).

Conclusiones

El cambio de color fue modelado usando ecuaciones cinéticas de 1er orden para la luminosidad (L) y el parámetro de color *redness* "a"; mientras que el parámetro de color *yellowness* "b" fué ajustado con una ecuación de orden cero.

El valor de "a" aumentó con el Tiempo de fritado volviéndose mas rojizo y a mayor Tiempo de fritado los valores de " a "_{equilibrio} decrecieron.

El Tiempo y la Temperatura de fritado influyeron significativamente, a un nivel de confianza del 95%, sobre los parámetros de color *redness* y *yellowness*.

La cinética modelada se puede aplicar para predecir cambios de color en función del contenido de agua, cuando los snacks de mandioca son fritos en aceite de girasol a 150, 170 ó 190°C.

Referencias

- [1] J. M. Barata de Carvalho, “Textura de snacks crujientes culinarios”, tesis doctoral, Universidad de Extremadura, Cáceres, España, 2012.
- [2] M. K. Krokida, V. Oreopoulou, Z. B. Maroulis, D. Marinos-Kouris, “Colour changes during deep fat frying”, *Journal of Food Engineering*, vol. 48, pp. 219-225, 2001.
- [3] O. D. Baik y G. S. Mittal, “Kinetics of tofu color changes during deep-fat frying”, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, vol. 36, pp. 43-48, 2003.
- [4] P. Ateba y G. S. Mittal, “Dynamics of crust formation and kinetics of quality changes during frying of meatballs”, *Journal of Food Science*, vol. 59, pp. 1275-1278, 1994.
- [5] P. C. Moyano, V. K. Ríoseco, P. A. González, “Kinetics of crust color changes during deep-fat frying of impregnated french fries”, *Journal of Food Engineering*, vol. 54, pp. 249-255, 2002.
- [6] A. Jayendra Kumar, R. R. B. Singh, A. A. Patel, G. R. Patil, “Kinetics of color and texture changes in Gulabjamun balls during deep-fat frying”, *LWT*, vol. 39, pp. 827-833, 2006.
- [7] L. Yunsheng, “Quality changes in chicken nuggets fried in oils with different degrees of hydrogenation”, Thesis for the degree of Master of Science, McGill University, Montreal, Quebec, Canadá, 2005.

Nuestro aporte está en el contenido de este libro:

Modelación de la cinética fermentativa en la obtención de biomasa proteica a partir de la diversificación azucarera. Primera aproximación a la cinética de la obtención de etanol mediante sacarificación y fermentación simultánea del bagazo. Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado. Producción local de cocteles enzimáticos celulolíticos empleados en la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar para la obtención de etanol. Cinética y distribución de producto en la acetilación básica acuosa de almidón de *Manihot esculenta* Crantz (Yuca). Comportamiento cinético de la reacción de producción de ácido fosfórico. Metodología para la obtención de los modelos cinéticos de reacciones complejas en añejamientos de bebidas espirituosas. Crecimiento y cultivo de la *Chlorella* sp. empleando vinazas cubanas como medio de cultivo. Cinética del Cambio de Color en Snacks de Mandioca Fritos por Inmersión.

