

**BIODEGRADACIÓN DE DOS BIOMASAS RESIDUALES MEDIANTE
MICROORGANISMOS Y MODELAMIENTO DEL PROCESO DE HIDROLISIS
COMO FASE PREVIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.**

**DANIELA OCACIONES MEJÍA
ANDREA VIVIANA VEGA MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN ENERGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
BUCARAMANGA
2019**

**BIODEGRADACIÓN DE DOS BIOMASAS RESIDUALES MEDIANTE
MICROORGANISMOS Y MODELAMIENTO DEL PROCESO DE HIDROLISIS
COMO FASE PREVIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.**

**DANIELA OCACIONES MEJÍA
ANDREA VIVIANA VEGA MARTÍNEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
INGENIERAS EN ENERGÍA**

**Director: Dr. ALEXANDER MENESES JÁCOME
Codirectora: Dr. GRACIELA CHALELA ALVAREZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN ENERGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
BUCARAMANGA
2019**

Nota de aceptación:

Firma del Director

Firma del Calificador

Firma del Calificador

Bucaramanga, 25 de junio de 2019.

AGRADECIMIENTOS

Dios tu amor y tu bondad no tienen fin, gracias por tu ayuda y compañía incondicional durante el proceso de aprendizaje, desarrollo y culminación de la presente tesis.

Agradecemos al Dr. Alexander Meneses Jácome y la Dra. Chálela Graciela Álvarez por su paciencia, dedicación de tiempo, apoyo y conocimiento compartido en cada fase de este proyecto. También agradecemos a las profesionales del centro de investigación en biotecnología, bioética y ambiente por su ayuda, especialmente a nuestra tutora Biol. MSc. Luz Irene Pinzón. Y en definitiva a todas aquellas personas que no mencionamos, pero fueron parte del proceso para este logro.

A mis padres por confiar en mí y apoyarme en cada decisión de mi vida. Agradezco profundamente a mis tíos por darme apoyo en este proceso de aprendizaje, ayudarme a corregir errores y enseñarme lo que puede hacer la unión familiar. Especialmente a mi abuelita, María del Carmen, por enseñarme a ver lo positivo de las personas y de la vida, por todo el amor, educación y valores que ayudaron en mi formación personal para cumplir esta meta.

Daniela

Gracias a mi familia, sobre todo a mis padres Jesús Alberto Vega Lozano y Marizol Martínez, quienes siempre estuvieron pendientes, me brindaron su amor y apoyo incondicional en los momentos difíciles. Por último, al gobierno colombiano quien me otorgó la beca académica que me permitió llegar hasta este punto tan importante para mí.

Andrea

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO CONCEPTUAL	4
1.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA HIDROLIZABLE	4
1.1.2 POTENCIAL DE LAS BIOMASAS RESIDUALES	4
1.1.3 PRETRATAMIENTO DE LAS BIOMASAS RESIDUALES	5
1.1.4 HIDRÓLISIS.....	6
1.1.5 HIDRÓLISIS ÁCIDA	6
1.1.6 HIDRÓLISIS BIOLÓGICA Y ENZIMÁTICA	7
1.1.7 HIDRÓLISIS ALCALINA.....	7
1.1.8 REACTOR QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.....	8
1.1.9 REACTOR BATCH.....	8
1.1.10 REACTOR CSTR	9
1.1.11 MODELOS BIO-CINÉTICOS.....	9
1.1.12 MODELOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	10
1.1.13 MODELO DE MONOD	11
1.1.14 MODELO DE MOSER.....	12
1.1.15 MODELO DE TEISSER.....	13
1.1.16 MODELO DE HALDANE	13
1.1.17 MODELO DE GOMPertz.....	14
1.1.18 MODELO DE POWELL	15
1.1.19 MÉTODOS DE VALIDACIÓN DE MODELOS	16
2 ESTADO DEL ARTE.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGÍA.....	19
4.1.1 RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA (OBJETIVO 1).....	19
4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS SELECCIONADAS (OBJETIVO 2)	

4.1.3	DESARROLLO DE MODELO CONCEPTUAL DEL BIOREACTOR PARA EL ESTUDIO CINÉTICO.....	20
4.1.4	ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: AJUSTE DEL MODELO.....	21
4.1.5	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	21
5	DESARROLLO	22
5.1.1	RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	22
5.1.2	DETERMINACIÓN DE CELULOSA	23
5.1.3	DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN	25
5.1.4	DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA POR DNS	26
5.1.5	EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	27
5.1.6	MODELO CONCEPTUAL DEL BIOREACTOR DE HIDRÓLISIS	29
5.1.7	EXPERIMENTO PARA DETERMINACIÓN DEL MODELO CINÉTICO ...	31
5.1.8	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	32
6	RESULTADOS	33
6.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS	33
6.1.1	GLUCOSA.....	33
6.1.2	CELULOSA	35
6.1.3	ALMIDÓN	36
6.2	MODELO CINÉTICO.....	38
6.2.1	MODELO CINÉTICO PARA <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	39
6.2.2	MODELO CINÉTICO PARA LA DEGRADACIÓN DEL SUSTRATO CON <i>TRICHODERMA SPP</i>	43
6.3	POTENCIAL PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	45
7	CONCLUSIONES	47
8	RECOMENDACIONES Y OBSERVACIONES	48
	REFERENCIAS.....	49
	ANEXOS	52
	ANEXO A.	52
	ANEXO B.	53
	ANEXO C.	54
	ANEXO D.	55

ANEXO E.....	56
ANEXO F.....	58
ANEXO G.....	61
ANEXO H.....	62
ANEXO I.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cáscaras de yuca (<i>Manihot esculenta</i>) y papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	5
Figura 2. Reactor batch.	8
Figura 3. Reactor CSTR.	9
Figura 4. Crecimiento microbiano teórico.	10
Figura 5. Cáscaras de yuca en la recolección y en el proceso de secado.	22
Figura 6. Cáscaras de yuca y papa después de la molienda y esterilización.	23
Figura 7. Prueba de celulosa.	23
Figura 8. Prueba de almidón.	25
Figura 9. Prueba de glucosa.	26
Figura 10. Crecimiento y adaptación de los hongos.	28
Figura 11. Cajas de Petri en pruebas de peso.	29
Figura 12. Modelo del biorreactor teórico en Solidwords.	30
Figura 13. Aplicación del biorreactor en el estudio de hidrólisis de biomasas residuales.	31
Figura 14. Toma de muestras de material de los biorreactores.	31
Figura 15. Comportamiento de glucosa durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.	34
Figura 16. Comportamiento de celulosa durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.	35
Figura 17. Comportamiento de almidón durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.	36
Figura 18. <i>Trichoderma spp</i> en el proceso de hidrólisis.	37
Figura 19. <i>Aspergillus niger</i> en el proceso de hidrólisis.	37
Figura 20. Crecimiento del <i>A. niger</i> (X) y degradación del sustrato (S).	39
Figura 21. Datos seleccionados de (X) y (S).	40
Figura 22. Linealización de la ecuación experimental para el modelo de Monod.	40
Figura 23. Gráfica de degradación del sustrato, modelo y datos experimentales.	42
Figura 24. Gráfica de linealización, modelo y datos experimentales.	42
Figura 25. Crecimiento del <i>Trichoderma spp.</i> (X) y degradación del sustrato (S).	44
Figura 26. Datos seleccionados de (X) y (S).	44
Figura 27. Modelo cinético del <i>Trichoderma spp.</i>	45
Figura 28. Curva de calibración del kit de glucosa.	54
Figura 29. Cuadrícula para el conteo de esporas.	56
Figura 30. Plano del modelo del biorreactor.	61
Figura 31. Comportamiento de glucosa durante la hidrólisis de la cáscara de papa.	64
Figura 32. Comportamiento de celulosa durante la hidrólisis de la cáscara de papa.	65
Figura 33. Comportamiento de almidón durante el proceso de hidrólisis de la cáscara de papa.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización teórica de cáscaras de yuca y papa.	5
Tabla 2. Estado del arte.	17
Tabla 3. Datos de peso [g] de la prueba de celulosa para las cáscaras de papa..	24
Tabla 4. Datos de peso [g] de la prueba de celulosa para las cáscaras de yuca. .	24
Tabla 5. Datos de peso en [g] de la prueba de almidón para las cáscaras de papa.	25
Tabla 6. Datos de peso en [g] de la prueba de almidón para las cáscaras de yuca.	26
Tabla 7. Datos de peso [g] de la prueba de glucosa para las cáscaras de papa. .	27
Tabla 8. Datos de peso [g] de la prueba de glucosa para las cáscaras de yuca...	27
Tabla 9. Peso en gramos de las cajas de Petri para <i>Aspergillus niger</i>	29
Tabla 10. Peso en gramos de las cajas de Petri para <i>Trichoderma spp.</i>	29
Tabla 11. Caracterización experimental de la materia prima.....	33
Tabla 12. Resultados de glucosa en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.	34
Tabla 13. Resultados de celulosa en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.	35
Tabla 14. Resultados de almidón en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.	36
Tabla 15. Peso en gramos de las cajas de Petri para <i>Aspergillus niger</i>	38
Tabla 16. Peso en gramos de las cajas de Petri para <i>Trichoderma spp.</i>	38
Tabla 17. Constantes cinéticas del modelo Monod.	41
Tabla 18. Degradación del sustrato.....	41
Tabla 19. Porcentaje de error de degradación de sustrato del modelo.	43
Tabla 20. Porcentaje de error de linealización del modelo.	43
Tabla 21. Factores de conversión	46
Tabla 22. Potencial para producción de bioetanol.....	46
Tabla 23. Datos de la curva de calibración.....	54
Tabla 24. Preparación de las muestras.....	55
Tabla 25. Recuento de esporas en la inoculación de los biorreactores.	57
Tabla 26. Pesos en gramos de las cajas de control.	58
Tabla 27. Pesos en gramos de las cajas inoculadas con <i>Aspergillus niger</i>	59
Tabla 28. Pesos en gramos de las cajas inoculadas con <i>Trichoderma spp.</i>	60
Tabla 29. Resultados de glucosa en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.	64
Tabla 30. Resultados de celulosa en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.	65
Tabla 31. Resultados de almidón en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.	65

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo del método de Kurschner y Hoffer para determinación de celulosa.	52
ANEXO B. Técnica de Grace 1977 para determinación de almidones.	53
ANEXO C. Curva de Calibración de la DNS para glucosa	54
ANEXO D. Protocolo de la prueba DNS para glucosa	55
ANEXO E. Conteo de esporas.	56
ANEXO F. Datos de peso cajas de Petri.	58
ANEXO G. Planos del biorreactor.	61
ANEXO H. Modelo cinético.	62
ANEXO I. Resultados de las cáscaras de papa.	64

NOMENCLATURA

Abreviatura	Nombre
H_3PO_4	Ácido fosfórico
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
H_2O	Agua
NH_3	Amoniaco
A. niger	<i>Aspergillus niger</i>
X	Cantidad del microorganismo
S	Cantidad del sustrato
S_0	Cantidad inicial de sustrato
X_0	Cantidad inicial del microorganismo
HCl	Cloruro de hidrogeno
$C_{Patrón}$	Concentración de glucosa en el patrón
$C_{Muestra}$	Concentración de glucosa en la muestra
L	Constante de difusión
K_1	Constante de inhibición por sustrato
K_m	Constante de saturación microorganismo
K_s ,	Constante de saturación sustrato
A	Constante en el modelo de Gompertz
c, m y b	Constantes en modelo de Gompertz y en Modelo de Monod
K	Contante del modelo de Monod
CSTR	Continuously Stirred Tank Reactor
f_i	Datos calculados del modelo
γ_i	Datos experimentales
LDP	Duración de la fase de latencia
e	Euler
FC	Factor de conversión de glucosa a etanol
$C_6H_{12}N_6$	Glucosa
° C	Grados Celsius
g/l	Gramo por litro
g	Gramos
Ca(OH) ₂	Hidróxido de calcio
KOH	Hidróxido de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
l	Litros
MDP	Máxima densidad de población
μl	Microlitro
M. O	Microorganismo
mg/dl	Miligramo por decalitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
n_t	Número total de datos

CaO	Óxido de calcio
O_2	Oxígeno
n	Parámetro empírico del modelo de Moser
p/p	Peso a peso
p/v	Peso a volumen
P_o	Peso anhidrido de la muestra
P_{or}	Peso seco del residuo
MSE	Porcentaje de error de mínimos cuadrados
PDA	Potato Dextrose Agar
$Y_{x/s}$	Rendimiento del sustrato
rpm	Revoluciones por minuto
μ	Tasa de crecimiento específica
$\mu_{máx}$	Tasa de crecimiento específica máxima
t	Tiempo
cfu	Unidad formadora de colonias
r_s	Velocidad de reacción

RESUMEN

En esta propuesta se plantea el modelamiento del proceso de hidrólisis biológica para dos biomásas residuales, cáscaras de yuca y cáscaras de papa como fase previa para la producción de bioetanol. Se hizo la recolección y caracterización de las materias primas, pretratamientos como molienda y secado por radiación solar para la adaptación de los hongos filamentosos (*Aspergillus niger* y *Trichoderma* spp.) al sustrato. Durante la hidrólisis fúngica se realizaron pruebas de azúcares como celulosa, almidón y glucosa junto con pruebas de peso para determinar la variación másica del hongo y del sustrato. Para las cáscaras de yuca la hidrólisis inicial transcurre en los primeros ocho días, donde la cantidad máxima de glucosa obtenida es 6,6558 [g/l], mientras que en las cáscaras de papa la cantidad de datos obtenidos no sirven como soporte para el planteamiento de una cinética ni para la estimación del potencial para producción de bioetanol, debido a que se presentó contaminación por un tercer agente no identificado. Para la degradación de cáscaras de yuca con *Aspergillus niger* se ajustó un modelo cinético tipo Monod, con un porcentaje de error del 2,4908%. El modelo cinético del *Trichoderma* spp para la degradación del sustrato, se determinó por una ecuación tipo logarítmica dado que no presentó compatibilidad con ningún modelo establecido dentro de la literatura. Como punto final a partir del sustrato hidrolizado se puede obtener teóricamente 4,3038 ml de bioetanol, tomando el rendimiento teórico de fermentación como un 43%.

PALABRAS CLAVES: cáscaras de yuca, cáscaras de papa, *aspergillus niger*, *trichoderma* spp., hidrólisis biológica, modelo cinético.

ABSTRACT

This project presents the kinetic modeling of the hydrolysis process biological for two biomass waste, peels of cassava and potato peels as a preliminary stage to produce bioethanol. It made the collection and characterization of the raw materials, pretreatments such as milling and drying by solar radiation for the adaptation of the filamentous fungi (*Aspergillus niger* and *Trichoderma spp.*) to the substrate. In the biological hydrolysis, tests were conducted sugars such as cellulose, starch and glucose along with test weight to determine the variation in mass of the fungus and the substrate. For the peels of cassava hydrolysis initial passes in the first eight days, where the maximum amount of glucose obtained is 6,6558 [g/l], while in the potato peels the amount of data obtained do not serve as support for the approach of a kinetic or for the estimation of the potential for bioethanol production, because that would be submitted contamination by a third agent not identified. For the degradation of peels of cassava with *Aspergillus niger* was adjusted by a kinetic model of type Monod, with a percentage of error of the 2,4908%. The kinetic model of the *Trichoderma spp.* for the degradation of the substrate, is determined by an equation type logarithmic given that he presented no compatibility with any model established within the literature. As a final point from the substrate hydrolyzed can be obtained theoretically 4,3038 ml of bioethanol, taking the theoretical fermentation yield as 43%.

KEYWORDS: cassava peels, potato peels, *aspergillus niger*, *trichoderma spp.*, biological hydrolisis, kinetic model.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción de bioetanol (alcohol proveniente de materia orgánica) ha aumentado en los últimos años, como resultado de la ley 693 de 2001, la cual establece que, las ciudades con más de 500 mil habitantes deben utilizar gasolina en una mezcla 8% de alcohol carburante y 92% de gasolina motor [1]. Sin embargo, en la actualidad la materia prima que se utiliza para obtener biocombustibles son alimentos de primera generación, es decir, alimentos de consumo humano. Con base en esto, se investiga en recursos alternativos como son los residuos alimenticios de restaurantes y domésticos que proporcionan biomasa con potencial para este combustible, entre estas biomásas se encuentran las cáscaras de yuca (*Manihot esculenta*) y papa (*Solanum tuberosum*), utilizando este tipo de biomasa se efectúan los procesos de pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación. Una de las principales etapas es la hidrólisis, la cual se realiza por medios químicos o biológicos. Siendo el primero el más utilizado por su rendimiento y economía; sin embargo, causa un impacto ambiental en su disposición final y sobre el proceso, ya que promueve inhibidores químicos para los procesos posteriores, principalmente la fermentación.

Durante un periodo de cuatro semestres en el centro de investigación para la biotecnología, bioética y ambiente, dentro del semillero BUIATÁ, se han realizado varios montajes con diferentes cantidades de cáscaras de yuca y papa, para posible obtención de bioetanol. En cada montaje se realizaron las etapas de recolección del sustrato, los cultivos aptos para inoculación, el tratamiento correspondiente con microorganismos en remplazo de químicos (hidrólisis), e inclusive etapas de fermentación y destilación, obteniendo resultados consistentes hasta la etapa de hidrólisis.

El desarrollo de este proyecto consiste en el modelo cinético de la etapa de hidrólisis biológica en un biorreactor a escala de laboratorio, partiendo de datos experimentales obtenidos por autoría propia. Con el fin de cumplir este objetivo es necesario hacer el diseño teórico del biorreactor y la caracterización tanto de la materia prima como del comportamiento de los microorganismos. Con esto se espera que el modelo pueda predecir el proceso realizado por los microorganismos (hongos filamentosos), con lo cual, se validará el modelo propuesto. Basándose en los resultados del hidrolizado se estima el potencial teórico de producción de bioetanol, aportando datos primarios sobre la utilización y biodegradación de estas biomásas en el territorio nacional para posible producción de biocombustibles a escala piloto o industrial.

1. MARCO CONCEPTUAL

El presente marco conceptual describe con cierto detalle, algunos de los términos y de las definiciones más importantes para comprender el contexto y el desarrollo del presente trabajo.

1.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA HIDROLIZABLE

La biomasa lignocelulósica es una materia prima importante para la producción de biocombustibles, principalmente alcoholes. Esta biomasa está constituida primordialmente por 3 polímeros asociados entre sí, la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, en concentraciones típicas en peso seco de 20%-50%, 15%-35% y 10%-30% respectivamente. Estos polímeros pueden degradarse o hidrolizarse, hasta obtener mezclas de azúcares simples fermentables que son la base para la producción biológica de alcoholes, ácidos grasos y otros productos bioquímicos de interés comercial [2], [3].

Debido a los conflictos sociales causados por los cambios en el uso del suelo, la generación de bioenergía a partir de cultivos energéticos, está dando paso al uso preferente de la biomasa lignocelulósica de los desechos o residuos agrícolas, tales como el bagazo de la caña de azúcar, cáscaras y cortezas de alimentos, rastrojo de maíz y fibras, entre otros, como insumo para la producción de biocombustibles, propiciando lo que se conoce como producción de biocombustibles de segunda generación [2], [4], [5].

Para el mejor aprovechamiento de estas biomásas, se requiere mejorar diversos aspectos, como las tecnologías de transformación y el conocimiento de los potenciales y disponibilidad de cada región. En el continente americano las biomásas residuales más utilizadas son el bagazo de caña de azúcar, la pulpa y las cáscaras de tubérculos, y las cáscaras de frutas como el banano, la piña y la naranja [6].

1.1.2 POTENCIAL DE LAS BIOMASAS RESIDUALES

Colombia es un país muy diverso en la disponibilidad de biomásas residuales con potencial energético significativo. Entre estas se encuentran las cáscaras de tubérculos como la yuca (*Manihot esculenta*) y la papa (*Solanum tuberosum*), productos muy comunes en la canasta familiar colombiana. Aunque la pulpa de estos alimentos tiene un alto potencial de producción de hidrolizado fermentable para la producción de bioetanol, sus cáscaras (figura 1), también guardan un

potencial considerable para este mismo fin, como se evidencia en su composición química (tabla 1). En general el potencial para producir bioetanol está determinado por la obtención de glucosa durante el proceso de hidrolizado, pues la obtención de este biocombustible se basa en la fermentación de este azúcar por la acción de levaduras u otros tipos de microorganismos [6].

Figura 1. Cáscaras de yuca (*Manihot esculenta*) y papa (*Solanum tuberosum*).



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1. Caracterización teórica de cáscaras de yuca y papa.

Componente	Cáscara yuca [g/100 g]	Cáscara papa [g/100 g]
Almidón	53,15 ± 1,86	33,05 ± 0,09
Lignina	7,68 ± 0,03	8,15 ± 0,43
Celulosa	22,80 ± 0,13	20,36 ± 0,14
Hemicelulosa	8,42 ± 0,05	13,32 ± 0,14
Azúcares reductores	7,04 ± 0,10	5,22 ± 0,03
Lípidos	0,15 ± 0,02	0,52 ± 0,09
Cenizas	0,23 ± 0,04	3,77 ± 0,15
Proteínas	0,53 ± 0,05	15,21 ± 0,82

Fuente: Tomado de G. Mithra [2], Daiana G. Martinez [3], S. Pooja [4] y Ben J. Khawlaa [5].

1.1.3 PRETRATAMIENTO DE LAS BIOMASAS RESIDUALES

En la actualidad el acceso a estos residuos es fácil en todo el país, debido a su abundancia y disponibilidad en todo el territorio, además de su bajo valor económico por la falta de cadenas de valor asociadas a su manejo como subproductos y no como desechos.

El proceso de valorización de estas biomásas residuales inicia con su separación de otros residuos, para evitar contaminaciones durante los procesos de transformación a que son sometidas. Así, algunos de los primeros pretratamientos están enfocados en evitar o inhibir la presencia de microorganismos y sustancias diferentes a las que se requiere estén presentes en las cáscaras y su posterior procesamiento.

Así mismo, el sustrato (las cáscaras) requiere de tratamientos previos para facilitar el proceso de hidrólisis y aumentar su rendimiento, estos varían de acuerdo con el tipo de biomasa, aunque en todos se busca disminuir la cristalinidad de la celulosa, romper la estructura o matriz que conforman la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Estos pretratamientos de separación y reducción de tamaño pueden ser físicos, químicos, biológicos o su combinación [6].

Los tratamientos físicos son básicamente la trituración mecánica con el fin de aumentar el área superficial, facilitando posteriormente el proceso de hidrólisis y radiación de alta energía, para romper los enlaces de las grandes cadenas de azúcar, sin embargo, es compleja y de alto costo. Por otro lado, los químicos buscan modificar la estructura de azúcares complejos para una fácil acción de la enzima en procesos posteriores, entre ellos se encuentra agua caliente, oxidación húmeda, ozono, hidróxido de sodio y organosolventes [2].

Del mismo modo, hay métodos fisicoquímicos, como la explosión al vapor, y la explosión al vapor de amoníaco [6]. Finalmente, hay tratamientos biológicos o bioquímicos, donde microorganismos o enzimas se aplican para realizar una degradación preliminar de las grandes cadenas poliméricas como la celulosa [2], [3].

1.1.4 HIDRÓLISIS

Este término define la destrucción, descomposición o ruptura de un producto químico orgánico por acción del agua, para formar dos o más sustancias nuevas [6]. Los tres principales tipos de hidrólisis se describen a continuación:

1.1.5 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Consiste en el ataque de la biomasa lignocelulósica con ácidos inorgánicos (e. g. H_3PO_4 , H_2SO_4 , HCl) o ácidos orgánicos débiles (e. g. ácido acético) bajo condiciones de concentración y temperatura variables, para la obtención de una fracción líquida rica en azúcares fermentables y una fracción sólida compuesta principalmente de celulosa y lignina. El tratamiento ácido, es eficiente en la

disolución de la hemicelulosa, en especial el xilano, aunque no lo es tanto en la eliminación de la lignina. Este método es el más utilizado para hidrólisis de la celulosa en cuanto a producción de jugos fermentables, sin tener en cuenta que estos ácidos concentrados en general son tóxicos, corrosivos y peligrosos, causando impactos ambientales y un aumento de costos operacionales por la necesidad de utilizar equipo resistente a la corrosión [12].

1.1.6 HIDRÓLISIS BIOLÓGICA Y ENZIMÁTICA

En este tipo de hidrólisis se utilizan diferentes tipos de hongos y bacterias o en su defecto directamente sus enzimas, para reducir la cristalinidad de la biomasa lignocelulósica y facilitar los procesos de conversión a jugos o jarabes, productos intermedios ricos en azúcares (hidrosilato), que son la base de la producción fermentativa de bioproductos, especialmente alcoholes. [11]

El tratamiento de la biomasa con microorganismos se muestra como una técnica prometedora, debido a que no necesita reactivos químicos que comprometan el medio ambiente y su bajo costo pues son procesos a baja temperatura. Los microorganismos más utilizados son diversos tipos de hongos, en especial los hongos de pudrición blanca, parda o blanda. Los dos últimos tienen comprobada acción en la celulosa; mientras que los hongos de pudrición blanca tienen capacidad de degradar la lignina. [12]

1.1.7 HIDRÓLISIS ALCALINA

Es un proceso que se hace con soluciones alcalinas a temperaturas entre 150 y 180°C, que son capaces de descomponer material biológico como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, para obtener una solución compuesta de aminoácidos y azúcares simples [6].

En la producción de bioetanol el tratamiento alcalino de los substratos iniciales es capaz de separar tanto la hemicelulosa como la lignina, sin tener grandes efectos sobre los demás componentes. Los reactivos más utilizados son NaOH, KOH, NH₃, CaO y Ca(OH)₂. A diferencia de los tratamientos ácidos, parece haber un menor porcentaje de degradación de los azúcares, las temperaturas tienden a ser más altas, pero se requieren mayores tiempos de contacto. El uso de un reactivo alcalino provoca la degradación del éster y las cadenas laterales de la lignina, alterando su estructura y provocando una solvatación parcial de la hemicelulosa. La principal desventaja de este tratamiento son los remanentes de sales en la biomasa, que pueden causar interferencias en las etapas posteriores de la ruta hacia la producción fermentativa del alcohol [7].

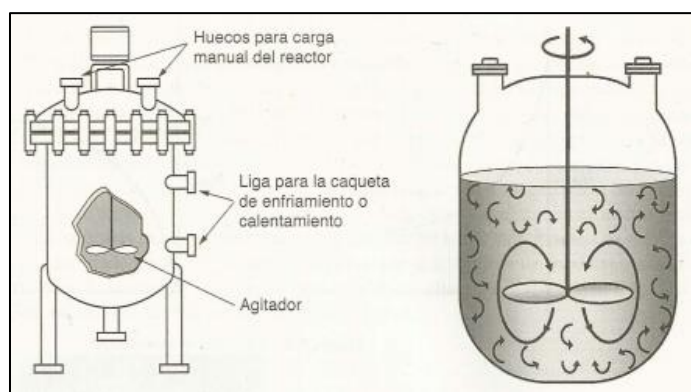
1.1.8 REACTOR QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Son los dispositivos que proveen el espacio físico (volumen) donde ocurre una reacción o transformación química o biológica. Estos se diseñan con la finalidad de proporcionar condiciones que favorezcan la conversión de las materias primas o sustratos con la mayor eficiencia posible y bajo costo operacional. Los reactores más utilizados en procesos de hidrólisis son los tipos batch, semi-batch, CSTR y los reactores tubulares, aunque en la práctica y en especial en las etapas primarias de estudio de los procesos biológicos, una caja de Petri puede considerarse como el primer biorreactor en el desarrollo del mismo, pues es allí donde se realizan las pruebas preliminares de consumo de sustrato y de estudio de las condiciones básicas para el crecimiento de los microorganismos.

1.1.9 REACTOR BATCH

Es un reactor intermitente donde no hay flujo de entrada ni salida y tiene un agitador para homogenizar la mezcla, se emplea para operaciones a pequeña escala, pruebas de procesos en desarrollo, fabricación de productos costosos y procesos difíciles de convertir en operaciones continuas [8]. El modelo del reactor batch se presenta en la figura 2.

Figura 2. Reactor batch.

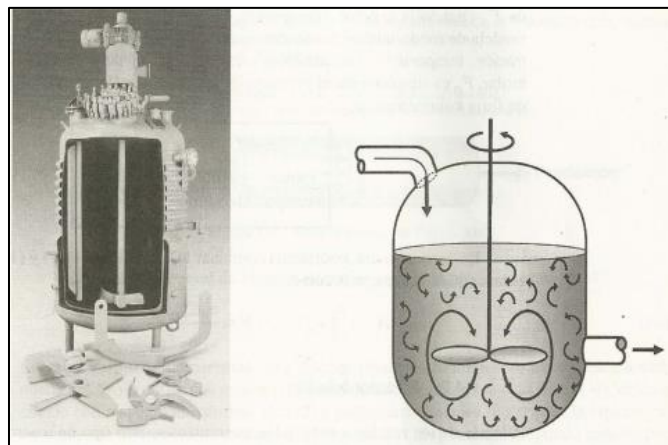


Fuente: Tomado de H. S. Fogler [8].

1.1.10 REACTOR CSTR

Se llama CSTR por sus siglas en inglés (Continuously Stirred Tank Reactor) y se emplea comúnmente para reacciones en fase líquida en procesos industriales. Normalmente se opera en estado estacionario, se asume que produce una mezcla perfecta y que en el interior todas las variables son iguales como se muestra en la figura 3 [8].

Figura 3. Reactor CSTR.



Fuente: Tomado de H. S. Fogler [8].

1.1.11 MODELOS BIO-CINÉTICOS

En el modelado de procesos bioquímicos se tiene en cuenta las reacciones catalizadas por los microorganismos y los procesos físicos o químicos que puedan representar algún tipo de influencia o control en la cinética del mismo, pero excluyendo en lo posible la influencia de la configuración física del biorreactor. El modelamiento de procesos bioquímicos es muy complejo y en general incompleto, porque en sentido estricto debería incluir interacciones intracelulares, metabolismo microbiano, alto número de reacciones celulares individuales, fenómenos difusivos y de adaptación de los microorganismos al medio, entre otros tantos factores de elevada complejidad.

En síntesis, no es posible formular un modelo cinético de crecimiento de microorganismos o de degradación bioquímica de sustratos, que contemple todos estos aspectos, la mayoría de ellos especializándose en la estequiometría de los procesos (estequiometría microbiana) y la cinética, sea desde la perspectiva del

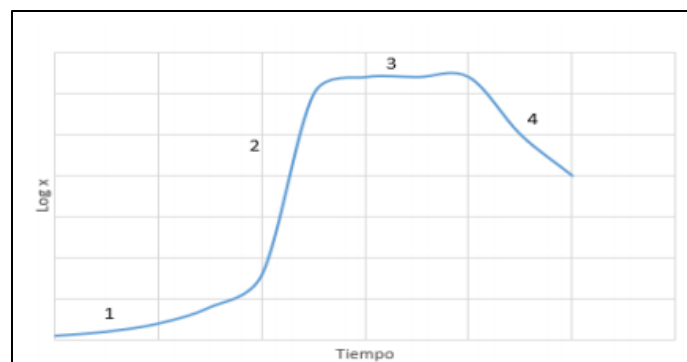
crecimiento celular o del consumo de sustratos de referencia, como base para la descripción y predicción matemática aproximada del comportamiento de estos procesos [14].

1.1.12 MODELOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento teórico de los microorganismos en un proceso de degradación de un sustrato orgánico, en general se explica a partir de un modelo de cuatro etapas, según se ilustra en la figura 4 y se explica a continuación [15]:

- Fase de adaptación: Explica el transcurso de un tiempo inicial para la adaptación de los microorganismos inoculados al medio para degradar el sustrato antes de iniciar procesos de división celular o reproducción. En esta fase el microorganismo generalmente consume las fuentes de carbono que metaboliza más fácilmente.
- Fase de crecimiento o exponencial: Superada la fase de latencia, se inicia la división celular, siguiendo un modelo típico de progresión geométrica 2^0 , 2^1 , $2^2 \dots 2^n$; que mantiene un comportamiento constante siempre y cuando no exista algún tipo de inhibición.
- Fase estacionaria: En este transcurso de tiempo las fuentes de carbono son estrictamente las mínimas necesarias para el sostenimiento de una población estable y madura de microorganismos, de tal forma que, si no se estimula el crecimiento de la población, esta se mantiene relativamente estable durante algún tiempo.
- Fase de muerte o de decaimiento: Las fuentes de carbono derivadas del sustrato y necesarias para los microorganismos se agotan, haciendo que la población comience a morir o decaer.

Figura 4. Crecimiento microbiano teórico.



Fuente: Tomado de Juan Fernando Calderón Vargas [9].

La matematización de la fenomenología del crecimiento microbiano o la degradación por vía bio-química, generalmente acude a dos tipos de modelos; los denominados estructurados, que consideran aspectos básicos de la célula y su estructura química y los no estructurados, que consideran la población como un todo, asumiendo la estructura celular como la misma. También puede haber modelos segregados, en donde la población se considera como heterogénea distinguiendo edades, formas, tamaños y composiciones internas como distintas o variables; o no segregados en donde la población es homogénea y el comportamiento celular es el mismo, como si fueran una célula promedio [15].

El modelo matemático para el crecimiento microbiano contiene básicamente: principios químicos, físicos y biológicos involucrados; inferencias que se pueden hacer de los datos experimentales obtenidos y, por último, consideraciones necesarias basadas en criterios válidos para modelar algunos procesos complejos. En estos modelos tomar todos los microorganismos como un conjunto homogéneo y el crecimiento como un comportamiento estándar son las consideraciones más comunes, es decir, el modelo matemático de crecimiento microbiano generalmente es de tipo no estructurado o no segregados. Algunos de los modelos de crecimiento microbiano más frecuentes en distintos tipos y cepas de microorganismos son los siguientes [15]:

1.1.13 MODELO DE MONOD

En este modelo se asume una población homogénea y se consideran las fases positivas de crecimiento, representando así la relación entre el sustrato que limita el crecimiento y el crecimiento microbiano sin considerar inhibiciones durante el proceso. Su modelo matemático se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = X \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

Partiendo de las ecuaciones (1) y (2) se sintetiza el modelo que permite relacionar la producción de biomasa y el consumo de sustrato simultáneamente en la ecuación (3).

$$\mu_{m\acute{a}x}t = \frac{Y_{x/s}S_0 + Y_{x/s}K_s + X_0}{Y_{x/s}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + \frac{Y_{x/s}K_s}{Y_{x/s}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{Y_{x/s}S_0}{Y_{x/s}S_0 + X_0 - X}\right) \quad (3)$$

Donde,

$\mu_{m\acute{a}x}$: Tasa de crecimiento especifica maxima [h^{-1}]

$\frac{Y_x}{s}$: Rendimiento del sustrato $\left[\frac{UFC}{g}\right]$

S_0 : Sustrato inicial $\left[\frac{g}{ml}\right]$

K_s : Constante de saturaci3n $\left[\frac{g}{ml}\right]$

X : Biomasa $\left[\frac{UFC}{ml}\right]$

t : tiempo [h]

1.1.14 MODELO DE MOSER

Este modelo es utilizado principalmente cuando la composici3n celular es independiente del proceso del tiempo y apareci3 de la transformaci3n del modelo Monod, teni3ndose en cuenta la consideraci3n del efecto de la propagaci3n de especies mutantes en la poblaci3n. La modelo está determinada por la ecuaci3n (4):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S^n}{K_s + S^n} \quad (4)$$

Con la ecuaci3n (4), un balance de masa microbiana y de sustrato, se obtienen las variables en funci3n de la biomasa (masa microorganismo), resultando la ecuaci3n (5):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{\left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{xs}}\right)^n}{K_m + \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{xs}}\right)^n} \cdot X \quad (5)$$

Este modelo en comparaci3n al de Monod, varía con el parámetro n que está dado empíricamente para cada proceso.

1.1.15 MODELO DE TEISSER

Este modelo apareció antes que el de Monod y explica el efecto de hormonas en el crecimiento de ciertos cultivos microbianos, introduce la deficiencia de crecimiento mostrándola en la relación semi algorítmica entre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa. Este modelo esta descrito matemáticamente según la ecuación (6):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_s}\right)} \right) \quad (6)$$

Con la ecuación (6), un balance de materia y sustrato, se obtiene la ecuación (7) de crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S_0 - \frac{X_0 - X}{Y_{xs}}}{K_m}\right)} \right) \cdot X \quad (7)$$

Donde,

$\mu_{m\acute{a}x}$: Tasa de crecimiento especifica máxima [h^{-1}]

S: Concentración de sustrato [$\frac{g}{ml}$]

K_m : Constante de saturación [$\frac{g}{ml}$]

Y_{xs} : rendimiento de sustrato [$\frac{UFC}{g}$]

X: Biomasa [$\frac{UFC}{ml}$]

1.1.16 MODELO DE HALDANE

En este modelo se muestra el proceso de adaptación del microorganismo a un sustrato, por lo cual puede representar la presencia de sustratos inhibidores. Su expresión matemática es simple y está dada según la ecuación (8):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_m + S + K_1 S^2} \quad (8)$$

Al despejar la variable sustrato (S) de la ecuación (8) y realizando un balance de masa, se genera la ecuación (9) para el crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_o + \frac{X_o - X}{Y_{xs}}}{K_s + S_o + K_1 + \left(S_o + \frac{X_o - X}{Y_{xs}}\right)^2} \cdot X \quad (9)$$

Esta expresi3n integrada, seg3n (9) es una funci3n independiente de la biomasa y esta descrita mediante la ecuaci3n (10):

$$t = \frac{(S_o^2 K_1 + S_o + K_s) Y_{xs}^2 + ((2S_o K_1 + 1) X_o Y_{xs} + K_1 X_o^2) \ln\left(\frac{X}{X_o}\right)}{\mu_{m\acute{a}x} (S_o Y_{xs}^2 + X_o Y_{xs})} + \frac{K_s Y_{xs} \ln(X - S_o Y_{xs} - X_o)}{\mu_{m\acute{a}x} (S_o Y_{xs} + X_o)} - \frac{K_1 X}{\mu_{m\acute{a}x} Y_{xs}} \quad (10)$$

Donde,

$\mu_{m\acute{a}x}$: Crecimiento especifiko [h^{-1}]

K_s : Constante de saturaci3n [$\frac{g}{ml}$]

S : Concentraci3n de sustrato [$\frac{g}{ml}$]

K_1 : Constante de inhibici3n por sustrato [$\frac{g}{ml}$]

1.1.17 MODELO DE GOMPERTZ

Este modelo a diferencia de los anteriores se basa en la mortalidad de microorganismos, es un modelo cin3tico capaz de describir la concentraci3n de biomasa durante un periodo de tiempo, y se encuentra especificado seg3n la ecuaci3n (11):

$$X = X_o + ce^{-e^{-b(t-M)}} \quad (11)$$

Donde c , M y b son recuentos de la biomasa cuando el tiempo aumenta indefinidamente, tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento especifika m\acute{a}xima y la velocidad de crecimiento relativo.

Las variables mencionadas anteriormente se representan matem\acute{a}ticamente seg3n las ecuaciones (12), (13) y (14):

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{bc}{e} \quad (12)$$

$$LDP = \frac{M-1}{b} \quad (13)$$

$$MDP = A + c \quad (14)$$

1.1.18 MODELO DE POWELL

En este modelo cinético se adiciona a la ecuación de Monod la transferencia de masa de sustrato a través de la célula, por lo cual contiene la difusividad del sustrato y la permeabilidad en la membrana, obteniendo la ecuación (15):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{(K_m+L)+S} \quad (15)$$

Se da paso a la ecuación diferencial descrita en la ecuación (16) acoplado al anterior a un balance de biomasa y sustrato, así:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_o + \frac{X_o - X}{Y_{xs}}}{(K_s + L) + S_o + \frac{X_o - X}{Y_{xs}}} \cdot X \quad (16)$$

La forma integrada de la ecuación (16) en función de la biomasa, representa la ecuación (17):

$$t = \frac{(\ln(X/X_o))(X_o + Y_{xs}(K_s + L + S_o)) - Y_{xs}(K_s + L) \ln(-X_o - S_o Y_{xs} - X)}{\mu_{m\acute{a}x} \frac{X_o + S_o Y_{xs}}{Y_{xs}}} \quad (17)$$

Donde,

$\mu_{m\acute{a}x}$: Tasa de crecimiento específica máxima [h^{-1}]

K_s : Constante de saturación [$\frac{g}{ml}$]

S : Concentración de sustrato [$\frac{g}{ml}$]

L : Constante de difusión

X : Biomasa [$\frac{UFC}{ml}$]

t : tiempo [h]

1.1.19 MÉTODOS DE VALIDACIÓN DE MODELOS

En el modelado de procesos, la validación de los modelos cinéticos planteados tiene una importancia significativa para determinar el porcentaje de error del modelo y los datos experimentales obtenidos. La evaluación se realiza mediante:

- Coeficiente de correlación obtenido (R^2)
- Porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE)

$$MSE(\%) = \left(\frac{\sum(\gamma_i - f_i)^2}{n_t} \right) \quad (18)$$

Donde,

γ_i : Datos experimentales

f_i : Datos calculados del modelo

n_t : Número total de datos

2 ESTADO DEL ARTE

Para el desarrollo este proyecto se realizó la revisión bibliográfica de trabajos similares o con información importante sobre los procesos. Los documentos que aportan al cumplimiento de los objetivos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Estado del arte.

Fuente	Año	Autor	Biomasa	Tipo de microorganismo	Aporte al proyecto
[10]		Sergio Felix	Medios ricos en glucosa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ejemplifica el planteamiento de la estequiometría del hongo.
[11]	2011	Ana M. Torrado, Sandra Cortés, José Salgado, Belén Max.	Cáscara de naranja valenciana	<i>Aspergillus niger</i>	Aporta a la metodología para determinar el comportamiento másico del hongo.
[12]	2013	Lisset René Manzano Chavéz	Trigo	<i>Trametes versicolor</i>	Orienta como estimar el potencial teórico de etanol a partir de la glucosa.
[13]	2015	Fani Mantzouridou, A. Paraskevopoulou, Sofia Lalou	Cáscara de naranja	Levaduras	Aconseja la relación humedad-sustrato y la relación de inoculación sustrato-microorganismo.
[9]	2017	Juan Fernando Calderón Vargas	Sustrato complejo	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Indica la teoría y desarrollo de los modelos cinéticos.
[14]	2018	María Marín, Antoni Sánchez, Adriana Artola	Cáscara de naranja, pulpa de manzana y fibra de arroz	Celulasa	Orienta sobre el diseño de un biorreactor adecuado para el estudio cinético de una hidrólisis biológica.
[15]	2018	C. Marzo, A.B. Díaz, I. Caro & A. Blandino	Cáscara de naranja	Coctel de enzimas	Aporta a la metodología para determinar el comportamiento másico del hongo.

Fuente: Elaboración propia.

3 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Biodegradar la biomasa residual de papa y yuca mediante microorganismos y modelar la cinética de la hidrólisis biológica como fase previa para la producción de bioetanol.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.3 Caracterizar el almidón, la celulosa y la glucosa de las dos biombras residuales objeto de la investigación.

3.1.4 Caracterizar las condiciones de crecimiento de los hongos filamentosos biodegradadores, *Aspergillus niger* y *Trichoderma* spp. y su adaptación a los sustratos cascaras de yuca y papa.

3.1.5 Realizar el diseño conceptual de un biorreactor a escala de laboratorio, para el estudio de la biodegradación de las biombras residuales con los hongos filamentosos escogidos.

3.1.6 Ajustar un modelo cinético, que permita la predicción del proceso de hidrólisis biológica de las biombras en referencia.

4 METODOLOGÍA

El trabajo presente se divide en las siguientes fases:

- Recolección y caracterización de la materia prima
- Obtención de datos experimentales
- Modelo conceptual del biorreactor
- Modelo cinético
- Estimación del potencial para la producción de bioetanol

4.1.1 RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Se recolectan las cáscaras de yuca y papa de fuentes conocidas, se llevan a un lugar establecido donde pasan por las siguientes etapas:

- Lavado para eliminación de sustancias no deseadas existentes en el sustrato.
- Secado por exposición solar.
- Molienda.
- Determinación del potencial hidrolizable.

4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS SELECCIONADAS

Los hongos serán los encargados de realizar el proceso de hidrolisis, por ende, las características de adaptación y crecimiento en el sustrato son muy importante. Para determinar el tipo de hongo, la adaptación óptima y el crecimiento se realiza el siguiente procedimiento:

- Revisión bibliográfica para escoger cepas aptas para la degradación del tipo de sustrato a trabajar.
- Toma de muestras de *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp.*
- Réplicas de hongos, de manera aislada.
- Verificación microscópica de cepa y no presencia de cualquier otro agente en las réplicas.
- Se asegura la previa adaptación del hongo a la materia prima.

Luego tener los cultivos de cepa, se procede a inocular en los biorreactores y las cajas de Petri para la determinación másica.

Para el planteamiento del modelo cinético de la degradación del sustrato, se requiere la cuantificación másica del microorganismo y las cáscaras. Este valor másico se determina mediante diferencias de pesos entre una unidad de control (sin inóculo) y otra unidad con inóculo.

Para confirmar que se realiza el proceso de hidrolisis es necesario cuantificar la degradación de la celulosa y el almidón, así como el aumento de la glucosa, siendo esta última la finalidad del proceso biológico realizado por los microorganismos *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp.* Las pruebas para la cuantificación de azúcares se hicieron por los métodos:

- Celulosa: Método de Kurschner y Hoffer.
- Almidón: Grace 1977.
- Glucosa: DNS (espectrofotometría).

4.1.3 DESARROLLO DE MODELO CONCEPTUAL DEL BIOREACTOR PARA EL ESTUDIO CINÉTICO

Determinar el diseño de un reactor implica varias consideraciones dependiendo de su aplicación. En el diseño conceptual del biorreactor para el proceso biológico planteado en este documento, se considera:

- Facilidades de manipulación: Se indica que el sustrato no debe ocupar más del 60% del volumen total de biorreactor. [14]
- Facilidades para toma de datos: Recipiente con tapa removible para toma de muestras.
- Condiciones de aislamiento: Recipiente sellado, interrumpiendo el contacto con el exterior.
- Tipo de material: Material que no reaccione con el contenido y asegure no contaminación.
- Distribución del flujo del aire: Se debe asegurar un flujo de aire en todo el interior del recipiente.

Conexiones: Se requieren conexiones para lixiviados, entrada y salida de aire.

4.1.4 ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: AJUSTE DEL MODELO

El modelo cinético está dividido en dos partes, la primera consiste en el crecimiento del microorganismo y la degradación del sustrato; la segunda es la estequiometría microbiana.

Según los datos experimentales obtenidos se puede determinar la degradación del sustrato por la acción de los microorganismos y el crecimiento de estos. Se espera obtener el comportamiento de cada hongo de la siguiente manera:

- Se calcula y grafica, mediante diferencia de peso, el comportamiento másico del hongo y del sustrato.
- Definición de la ecuación que describe el comportamiento experimental, partiendo de la gráfica de datos filtrados.
- Ajuste de datos experimentales a un modelo cinético de degradación de sustrato.
- Determinación del modelo cinético ajustable a los datos experimentales.
- Cálculo de constantes del modelo definido.
- Validación de modelo, mediante cálculo de error entre datos experimentales y datos obtenidos con el modelo planteado.

4.1.5 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Se determina mediante el balance de la reacción que ocurre en la fermentación de glucosa [12].

5 DESARROLLO

5.1.1 RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Incluye la recolección y caracterización de la materia prima, así como los experimentos exploratorios o iniciales de crecimiento y adaptación de microorganismos a los medios de cultivo y sustratos¹. Las cáscaras de yuca fueron recolectadas de la plaza de mercado central de Bucaramanga y las de papa de los residuos domésticos. Estas fueron lavadas y hervidas, para luego dejarse escurrir en un colador durante diez minutos, después se exponen al sol sobre papel periódico para su secado (figura 5).

Figura 5. Cáscaras de yuca en la recolección y en el proceso de secado.



Fuente: Elaboración propia.

Una vez secas, las cáscaras pasan por el proceso de molienda, el cual, consiste en licuar las cáscaras hasta obtener segmentos de aproximadamente 1 a 1.5 mm. Esta biomasa molida pasa por la autoclave en frascos de vidrio (figura 6), como método de esterilización tendiente a asegurar el crecimiento exclusivo del inóculo sembrado. La cantidad de cáscaras esterilizadas fue ~1200 g por cada sustrato, con el fin de garantizar materia prima para alimentar durante toda la fase experimental, los reactores y las cajas de Petri para cultivo. El reactor requiere cerca de 150 g de biomasa y las cajas de Petri alrededor de 15 g.

¹ Los procedimientos experimentales aplicados en esta etapa se realizaron en su mayoría en el laboratorio de biotecnología de la UNAB.

Figura 6. Cáscaras de yuca y papa después de la molienda y esterilización.



Fuente: Elaboración propia.

Luego se toman muestras de las cáscaras trituradas y esterilizadas, para caracterizar la materia prima, especialmente determinando azúcares con el fin de obtener el potencial hidrolizable.

5.1.2 DETERMINACIÓN DE CELULOSA

El contenido de celulosa se utilizó especialmente para hacer seguimiento de su degradación a glucosa durante el proceso de hidrólisis de los sustratos. El método aplicado fue el de Kurschner y Hoffer, probado en otros estudios de degradación de biomásas residuales con el sistema biológico (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces cerevisiae*) [16]. Este análisis se hace según el protocolo descrito en el ANEXO A. La figura 7 presenta algunas imágenes de la realización de este análisis, en tanto que los resultados obtenidos, para la cáscara de yuca y papa se reportan en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Figura 7. Prueba de celulosa.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Datos de peso [g] de la prueba de celulosa para las cáscaras de papa.

		Cáscaras de papa						
Día	Peso	0	2	8	10	15	16	17
Control	Inicial	30,7044	-	-	-	-	-	-
	Final	29,9254	-	-	-	-	-	-
A. niger	Inicial	30,7044	30,8071	-	-	-	-	-
	Final	29,9254	30,6923	-	-	-	-	-
Trichoderma spp	Inicial	30,7044	30,8865	-	-	-	-	-
	Final	29,9254	30,6508	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Datos de peso [g] de la prueba de celulosa para las cáscaras de yuca.

		Cáscaras de yuca						
Día	Peso	0	2	8	10	15	16	17
Control	Inicial	30,8994	30,7425	-	-	-	-	-
	Final	30,3758	30,3295	-	-	-	-	-
A. niger	Inicial	30,8994	30,8865	30,8994	30,8822	30,8476	30,8865	30,8994
	Final	30,3758	30,4624	30,596	31,1737	30,2509	31,0893	30,9579
Trichoderma spp	Inicial	30,8994	30,8071	30,6848	29,9613	30,8994	30,8994	30,8476
	Final	30,3758	30,4036	30,1574	30,1376	30,3201	30,4561	30,1882

Fuente: Elaboración propia.

El porcentaje de celulosa se calcula mediante la ecuación (32):

$$Celulosa (\%) = \frac{P_{or}}{P_o} * 100 \quad (19)$$

Donde,

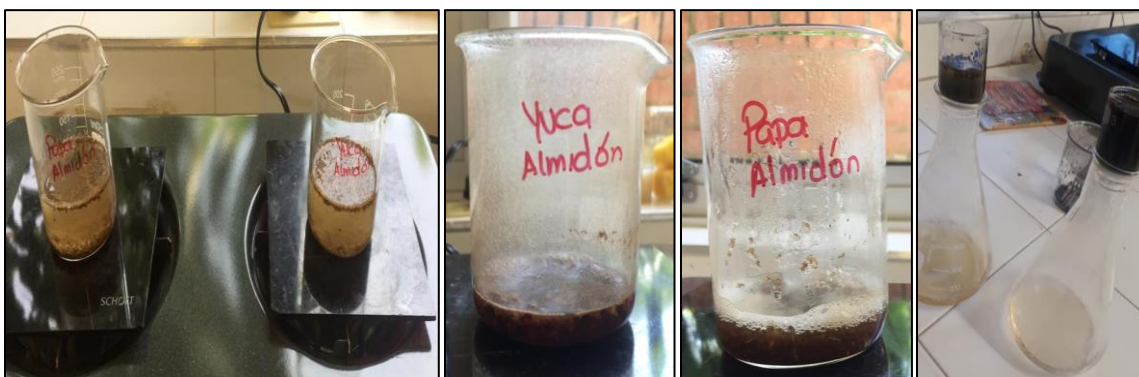
P_{or} : Peso seco del residuo [g]

P_o : Peso anhidrido de la muestra [g]

5.1.3 DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN

El contenido de almidón se determina por medio de la técnica Grace 1977, acorde al protocolo dado en el ANEXO B. La figura 8 ilustra la aplicación de esta técnica de caracterización de biomásas vegetales, en tanto que las tablas 5 y 6 resumen los resultados obtenidos para las cáscaras de papa y yuca respectivamente.

Figura 8. Prueba de almidón.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Datos de peso en [g] de la prueba de almidón para las cáscaras de papa.

		Cáscaras de papa						
Día	Peso	0	2	8	10	15	16	17
Control	Inicial	30,6848	-	-	-	-	-	-
	Final	30,2039	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	Inicial	30,6848	30,5281	-	-	-	-	-
	Final	30,2039	30,093	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma spp</i>	Inicial	30,6848	30,8071	-	-	-	-	-
	Final	30,2039	30,7547	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Datos de peso en [g] de la prueba de almidón para las cáscaras de yuca.

Día	Peso	Cáscaras de yuca						
		0	2	8	10	15	16	17
Control	Inicial	30,8476	-	-	-	-	-	-
	Final	30,2088	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	Inicial	30,8476	30,8994	30,8822	30,8071	32,0227	1,13	1,14
	Final	30,2088	30,3056	30,7843	30,9877	33,0736	2,5884	2,5204
<i>Trichoderma spp</i>	Inicial	30,8476	32,0227	30,8994	30,5281	32,1919	1,16	1,15
	Final	30,2088	31,4376	30,857	30,5849	32,9729	1,8401	2,1756

Fuente: Elaboración propia.

El contenido de almidón se determina de acuerdo con la ecuación (33):

$$\text{Almidón (\%)} = \frac{\text{Peso filtro despues del secado (g)} - \text{peso del filtro vacio (g)}}{\text{peso de la muestra analizada (g)}} * 100 \quad (20)$$

5.1.4 DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA POR DNS

La determinación del contenido de glucosa se realizó acorde al protocolo del método de DNS, que se encuentra en el ANEXO D. La figura 9 documenta con imágenes la realización de la prueba de glucosa y las tablas 7 y 8 resumen en cada caso, los resultados obtenidos para las cáscaras de papa y yuca.

Figura 9. Prueba de glucosa.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Datos de peso [g] de la prueba de glucosa para las cáscaras de papa.

Cáscaras de papa							
Día	0	2	8	10	15	16	17
Patrón	0,385	0,34	0,369	0,351	0,431	0,337	0,34
Control	0,204	0,144	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	0,204	0,52	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma spp</i>	0,204	0,156	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Datos de peso [g] de la prueba de glucosa para las cáscaras de yuca.

Cáscaras de yuca							
Día	0	2	8	10	15	16	17
Patrón	0,385	0,34	0,369	0,351	0,431	0,337	0,34
Control	0,661	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	0,661	1,074	2,456	2,291	1,997	0,605	0,517
<i>Trichoderma spp</i>	0,661	0,425	0,209	0,219	0,973	0,534	0,237

Fuente: Elaboración propia.

La concentración de glucosa se halla de acuerdo con la ecuación (21):

$$C_{Muestra} = C_{Patrón} * \frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ del\ patrón} \quad (21)$$

5.1.5 EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Tomando cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp*, disponibles en el laboratorio de biotecnología de la UNAB, se hicieron replicas en cajas de Petri, para comprobación del microorganismo en el microscopio.

El medio contenido en las cajas de Petri fue una mezcla de agar-agar, malta y materia prima triturada; las mezclas agar-agar y malta se escogieron, sobre otros medios como el PDA o el Sabouraud, dado que pruebas previas mostraron el crecimiento de una mayor población de microorganismos en este medio al que se

agregan cáscaras de papa y yuca, molidas y esterilizadas, para asegurar la adaptación del hongo a estas biomasas como sustratos.

Para el crecimiento de los hongos se deja un periodo de ocho días, y se tienen réplicas de cada hongo adaptado a cada sustrato por separado, para realizar la inoculación de los reactores y las cajas de Petri. En la figura 10 se muestran las imágenes del proceso de crecimiento y adaptación de los hongos al sustrato.

Figura 10. Crecimiento y adaptación de los hongos.

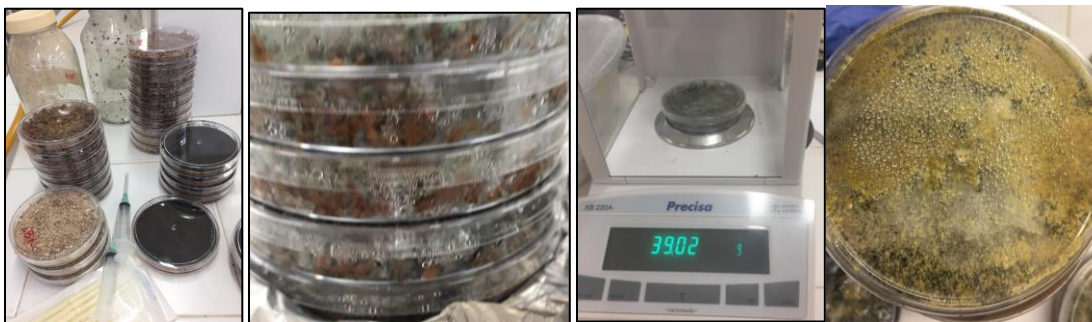


Fuente: Elaboración propia.

Teniendo el inoculo preparado se realizan 10 montajes de cajas de Petri para cada sustrato con su respectivo hongo y diez cajas sin inóculo, con el fin de tener datos másicos de la degradación del sustrato y crecimiento del microorganismo. Todas las cajas son pesadas vacías, cuando se agregan las cáscaras y los inóculos para los pesos iniciales. Se realizan pruebas de peso diarias para determinar por diferencia de peso, entre la caja de control y la caja inoculada, el crecimiento del hongo y la degradación del sustrato. Los datos de los pesos para cada uno de los sustratos con los hongos y las cajas de control se presentan en el ANEXO F.

Es importante mencionar que se realizan 10 montajes, para asegurar la obtención de datos de al menos una caja donde se evidencie crecimiento del hongo, esto es una medida preventiva debido a que en pruebas experimentales previas se presentó contaminación o la muerte del hongo. Como se esperaba durante el proceso algunas de las unidades presentaron contaminación por un hongo de coloración amarilla, posiblemente una clase de *Aspergillus*; para tener certeza en los datos se descartaron todas las cajas de Petri que mostraran contaminación, se escogió una caja de cada hongo revisando la población del microorganismo y que se encontrara sin contaminación. En la figura 11 se muestran las imágenes de cajas de Petri y el hongo contaminante. En las tablas 9 y 10 se presentan los datos de las cajas escogidas de cada hongo.

Figura 11. Cajas de Petri en pruebas de peso.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Peso en gramos de las cajas de Petri para *Aspergillus niger*.

Día	0	1	3	5	7
Control	10,1021	25,2408	25,0325	24,5779	24,1844
A.niger	10,1021	24,7536	24,2737	23,8115	23,2868

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Peso en gramos de las cajas de Petri para *Trichoderma spp.*

Día	0	1	3	7	9
Control	11,2859	31,1481	30,9973	30,2138	30,1752
<i>Trichoderma spp.</i>	11,2859	28,1909	27,6747	27,0362	26,7076

Fuente: Elaboración propia.

5.1.6 MODELO CONCEPTUAL DEL BIOREACTOR DE HIDRÓLISIS

Se planteó manejar hidrólisis sólida, para controlar la contaminación de las unidades experimentales, ya que la humedad es uno de los principales factores para el crecimiento de bacterias invasoras de los medios de cultivo y sustratos.

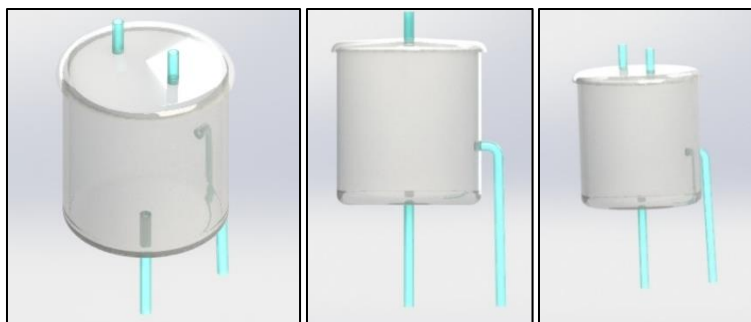
Según las consideraciones mencionadas en la metodología, el bioreactor se concibió como un recipiente que permita tomar muestras con comodidad. En su interior se instaló una malla a nivel medio, para brindar soporte al sustrato, que ocupa ~60% del volumen y espacios para permitir un flujo de aire bien distribuido y facilitar la percolación del hidrolizado producido. El recipiente cuenta con una tapa

removible dotada de un conducto de salida de aire. El aire proviene de una manguera lateral conectada a una bomba para peceras, que suministra dicho flujo. El material del recipiente y la malla es plástico, ya que este no reacciona con los microorganismos ni interviene en la degradación del sustrato.

La figura 12 ilustra un esquema y tres vistas espaciales del biorreactor propuesto, cuyo detalle es ampliado en el ANEXO G. Así mismo, la figura 13 muestra evidencia fotográfica de su aplicación en el presente estudio. Esta fase de la experimentación compromete tres biorreactores para cada hongo con el respectivo sustrato, agregando 150 g de cada cáscara e inoculando con 150 ml de hongo en cada reactor. La relación de inoculación fue 1:1 (p/v) del sustrato con *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp.* La cantidad de esporas inoculadas por cada litro de reactor se conoce y determina según el protocolo dado en el ANEXO E. Las condiciones para crecimiento del hongo fueron temperatura entre los 20-35°C y humedad de 75% (p/p).

El proceso de hidrólisis en los biorreactores se trabajó en corridas de 12 a 17 días, algunas exitosas y otras fallidas por contaminación del medio. En general, el buen desarrollo del hongo se evidencia en el aumento de la densidad de población, la posterior degradación de las cáscaras y la producción de líquido, “hidrosilato” o hidrolizado, el cual es objeto de determinación de azúcares mediante pruebas de almidón, celulosa y glucosa, como estrategia de seguimiento del proceso de hidrólisis. Este muestreo se realiza tomando 3 g del complejo “hongo-sustrato” de cada reactor, estas se mezclan y homogenizan, para luego repartir el material en las pruebas de azúcares así: 5 g para determinación de glucosa, 3 g para almidón y 1 g para celulosa. En la figura 14 se presentan imágenes de las tomas de muestras.

Figura 12. Modelo del biorreactor teórico en Solidworks.



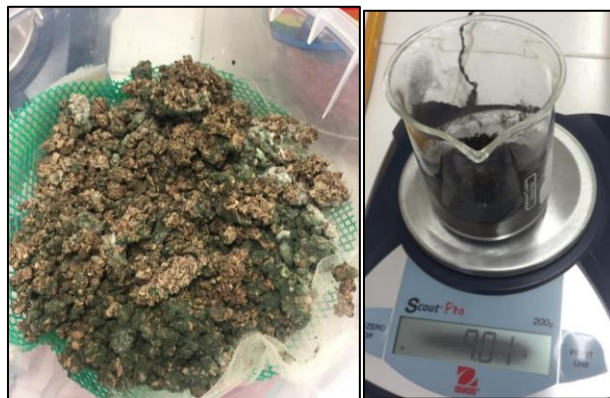
Fuente: Simulación en Solidwords.

Figura 13. Aplicación del biorreactor en el estudio de hidrólisis de biomásas residuales.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 14. Toma de muestras de material de los biorreactores.



Fuente: Elaboración propia.

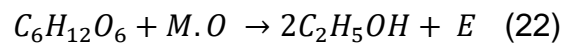
5.1.7 EXPERIMENTO PARA DETERMINACIÓN DEL MODELO CINÉTICO

Para determinar el modelo cinético de la hidrólisis biológica, se tomaron dos cajas con crecimiento del hongo, que contengan el mismo sustrato y peso de materia prima, una de control y otra con inóculo, cabe aclarar que la caja de control tiene el mismo volumen de agua destilada que la de inóculo. Estas cajas se pesan diariamente por un periodo de 12 días, hasta que la variación del peso fue mínima con respecto al día anterior, calculando la diferencia de peso entre las dos cajas se obtiene el peso del microorganismo, y el peso del sustrato se obtiene restando el peso del hongo al peso total de la caja con inóculo.

Con los datos seleccionados se gráfica el comportamiento y la derivada de la tendencia resultante, lo cual permite comparar con curvas típicas de modelos planteados en la literatura y así tratar de encontrar el modelo más cercano o que mejor se ajuste a los datos obtenidos experimentalmente, y finalmente se determinan los valores de las constantes típicas del modelo.

5.1.8 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

En condiciones ideales (rendimiento del 100%), por cada mol de glucosa se producen 2 moles de etanol como se evidencia en el balance de la reacción (22). Con dicho balance se obtuvo el valor del factor de conversión ideal con la relación entre el reactivo y producto mostrada en la ecuación (23).



$$FC_{ideal} = \frac{\text{moles de Glucosa}}{\text{moles de bioetanol}} \quad (23)$$

Con la cantidad de máxima de glucosa obtenida en el proceso de hidrólisis y el factor de conversión ideal se determina el potencial de producción de bioetanol teórico según la ecuación (24).

$$Etanol\ teorico [mol] = \frac{Glucosa [mol]}{FC_{ideal}} \quad (24)$$

Sin embargo, esta cantidad molar de etanol se produciría si se supone un proceso ideal. Como todo proceso cuenta con pérdidas y con un rendimiento real, se determinó un factor de conversión real aproximado (FC_{real}) tomado de literatura. De este modo, se calcula mediante la ecuación (25) el potencial de producción de etanol real partiendo de la glucosa máxima hidrolizada.

$$Etanol\ real [mol] = \frac{Glucosa [mol]}{FC_{real}} \quad (25)$$

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

La caracterización de la materia prima obtenida experimentalmente, presentada en la tabla 11, concuerda con los rangos dados en la literatura, confirmando su potencial hidrolizable.

Tabla 11. Caracterización experimental de la materia prima.

Componente	Cáscara yuca [%]	Cáscara papa [%]
Almidón	21,29	16,03
Celulosa	52,36	77,9
Glucosa	8,58	2,65

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados presentados, exceptuando la caracterización, corresponden a los datos experimentales obtenidos de la corteza de yuca, debido a que, en las unidades experimentales de cáscara de papa, se presentó el crecimiento de un tercer agente. En el ANEXO I se presentan los pocos datos obtenidos de dicho sustrato, de los cuales se puede afirmar la degradación de celulosa y almidón en glucosa en los primeros dos días, pero sin poder distinguir si este proceso fue realizado solo por el hongo inoculado, o hubo intervención del agente contaminante. Con base en todos los argumentos mencionados anteriormente, es importante indicar que los resultados presentados en esta sección corresponden a los montajes de cáscara de yuca para cada uno de los hongos.

6.1.1 GLUCOSA

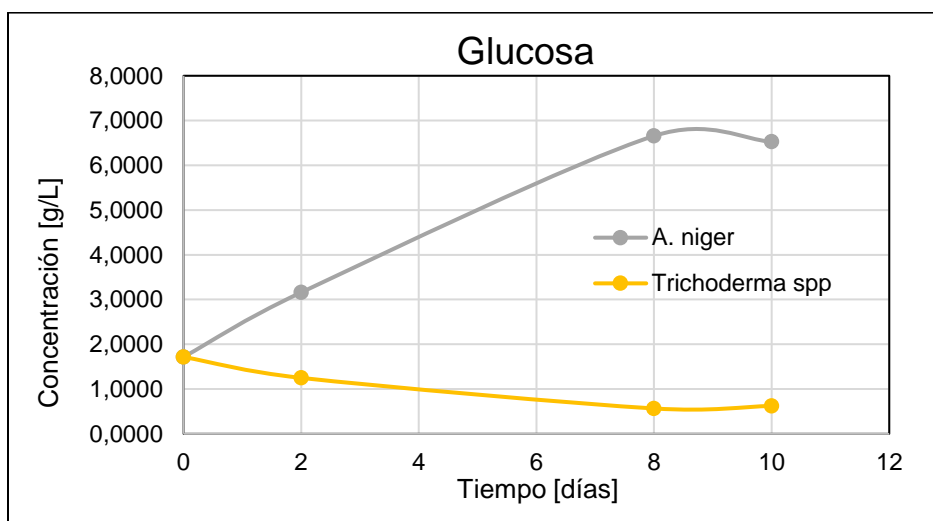
Los porcentajes de glucosa se calcularon basándose en la curva y las concentraciones obtenidas mediante la prueba de DNS, estos resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de glucosa en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.

Cáscaras de yuca				
Microorganismo	A. Niger		Trichoderma spp.	
Día	%	[g/l]	%	[g/l]
0	8,58	1,7169	8,58	1,7169
2	15,79	3,1588	6,25	1,2500
8	33,28	6,6558	2,83	0,5664
10	32,64	6,5271	3,12	0,6239

Fuente: Elaboración propia.

Figura 15. Comportamiento de glucosa durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 15 se observa el comportamiento de la glucosa en las cáscaras de yuca durante la hidrólisis biológica, donde se evidencia el aumento de la concentración de glucosa por el *A. niger* hasta el día octavo, para luego iniciar su consumo y el *Trichoderma spp*, por el contrario, consume este azúcar hasta el día 8 para luego iniciar su aumento.

Lo anterior, se debe a la diferencia en la adaptación y crecimiento de cada hongo. Para el caso del *Aspergillus niger*, sus fases de adaptación y crecimiento en el sustrato son rápidas por lo que en sus primeros días tiene una población considerable que acelera el proceso de síntesis en glucosa. Por otro lado, el *Trichoderma spp* utiliza la glucosa presente como fuente de energía para realizar su adaptación y crecimiento en un lapso de 8 días, en donde la población ya creció y empieza a sintetizar grandes cadenas de azúcar en glucosa.

6.1.2 CELULOSA

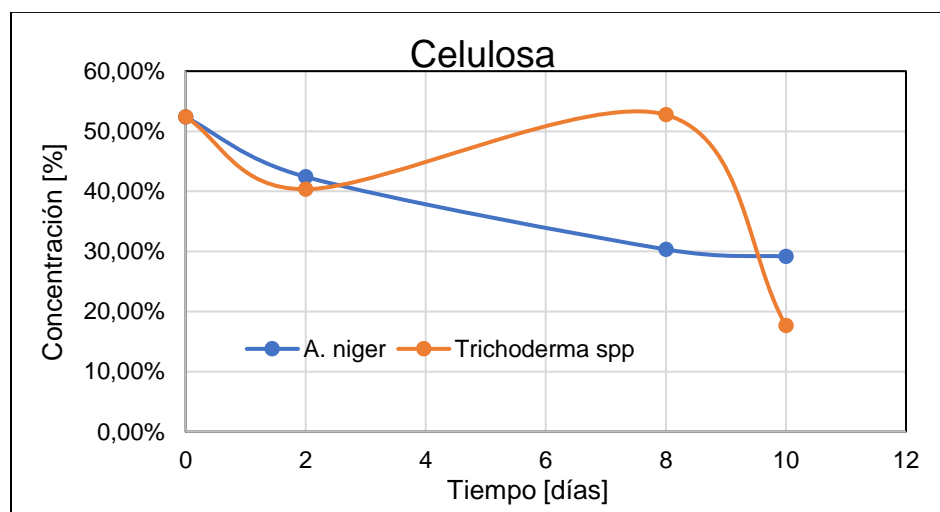
En la tabla 13 se muestran los resultados cuantitativos de las pruebas experimentales de celulosa realizadas, así mismo en la gráfica 21 se ilustra el comportamiento de celulosa con la presencia de cada hongo.

Tabla 13. Resultados de celulosa en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.

Cáscaras de yuca [%]				
Día	0	2	8	10
Control	52,36	-	-	-
<i>A. niger</i>	52,36	42,41	30,34	29,15
<i>Trichoderma spp</i>	52,36	40,35	52,74	17,63

Fuente: Elaboración propia.

Figura 16. Comportamiento de celulosa durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.



Fuente: Elaboración propia.

En presencia del *A. niger* la celulosa presenta un comportamiento descendente, lo cual afirma la ruptura de este polímero por parte del microorganismo, sin embargo la disminución de este polímero es significativa hasta el día 8, y la variación del día 8 al 10 no es muy significativa comparada con días previos, siendo del 1,19%. En cuanto al comportamiento de celulosa con *Trichoderma spp* los primeros dos días es descendente y luego aumenta hasta el octavo día en donde empieza a disminuir, este comportamiento puede ser generado por presencia de hemicelulosa en el

sustrato, ya que este microorganismo puede estar degradando esta molécula en celulosa y posteriormente en la celulosa en glucosa. Sin embargo, no puede comprobarse esta hipótesis la falta de datos cuantitativos de hemicelulosa.

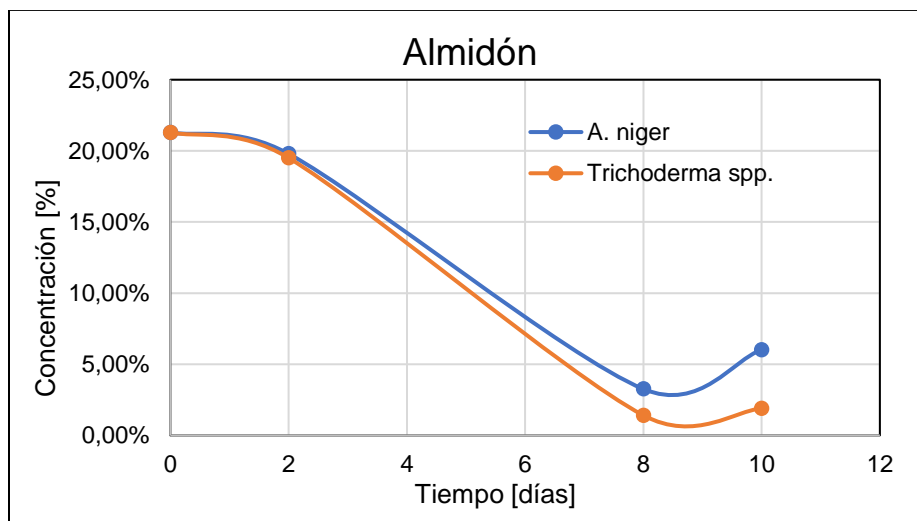
6.1.3 ALMIDÓN

Tabla 14. Resultados de almidón en cáscaras de yuca en el proceso de hidrólisis.

Día	Cáscaras de yuca [%]			
	0	2	8	10
Control	21,29	-	-	-
<i>A. niger</i>	21,29	19,79	3,26	6,02
<i>Trichoderma spp</i>	21,29	19,50	1,41	1,89

Fuente: Elaboración propia.

Figura 17. Comportamiento de almidón durante la hidrólisis de la cáscara de yuca.



Fuente: Elaboración propia.

Al igual que en los resultados de celulosa, los de almidón están dados en porcentajes, los cuales se encuentran contenidos en la tabla 14. A partir de los porcentajes de almidón presentes en las muestras de sustrato se determina el comportamiento de este polímero en presencia de *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp*. En la figura 17 se observa que el comportamiento del contenido de almidón es similar para ambos microorganismos, sin embargo, en el caso del *Trichoderma spp* se tiene una mayor degradación que en el *A. niger*, donde la curva del *Trichoderma*

spp está por debajo de la de la curva de *Aspergillus*. Dicho de otra manera, luego del día 2 el contenido de almidón en los biorreactores inoculados con *A. niger* tienen un mayor porcentaje de almidón comparado a los inoculados con *Trichoderma spp*, por lo que se infiere que el *Trichoderma* degrada mejor la molécula de almidón que el *A. niger*.

Con respecto al periodo de tiempo, los datos muestran consistencia para el proceso de hidrólisis hasta el día octavo, pues en este proceso ocurre la ruptura de grandes cadenas de azúcares, como el almidón, el punto de inflexión es en el día 8 y en el día decimo el comportamiento de crecimiento ya no corresponde a la fase de hidrólisis. En las figuras 18 y 19 se presentan las fotografías del crecimiento de cada uno de los hongos durante el proceso de hidrólisis.

Figura 18. *Trichoderma spp* en el proceso de hidrólisis.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 19. *Aspergillus niger* en el proceso de hidrólisis.



Fuente: Elaboración propia.

6.2 MODELO CINÉTICO

En el Anexo E se encuentran los datos y gráficas del modelo cinético. Las tablas 15 y 16 contienen los pesos para cada hongo.

Tabla 15. Peso en gramos de las cajas de Petri para *Aspergillus niger*.

Día	0	1	3	5	7
Control	10,1021	25,2408	25,0325	24,5779	24,1844
A.niger	10,1021	24,7536	24,2737	23,8115	23,2868
Hongo	0	0,4872	0,7588	0,7664	0,8976
Sustrato	10,1021	24,2664	23,5149	23,0451	22,3892

Fuente: Elaboración propia.

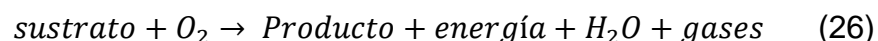
Tabla 16. Peso en gramos de las cajas de Petri para *Trichoderma spp.*

Día	0	1	3	7	9
Control	11,2859	31,1481	30,9973	30,2138	30,1752
<i>Trichoderma spp.</i>	11,2859	28,1909	27,6747	27,0362	26,7076
Hongo	0	2,9572	3,3226	3,1776	3,4676
Sustrato	10,1021	25,2337	24,3521	23,8586	23,24

Fuente: Elaboración propia.

Como se evidencia en las gráficas 20 y 25, el *Aspergillus niger* y el *Trichoderma spp* tienen un comportamiento similar, tanto en las cáscaras de yuca como en las de papa. Sumado a lo anterior, en los biorreactores de papa se presentó crecimiento de los hongos y degradación de celulosa y almidón a glucosa, pero en el segundo día se contaminaron las unidades experimentales. Por los argumentos mencionados anteriormente, se plantea un modelo cinético para cada microorganismo asumiendo las cáscaras de yuca y papa como un mismo sustrato. Es necesario aclarar que los datos utilizados en los modelos cinéticos pertenecen a las cáscaras de yuca. En el ANEXO H se encuentran los datos del modelo cinético.

Ahora, en el tema de la estequiometría microbiana se plantearon los balances de las ecuaciones (26) y (27).



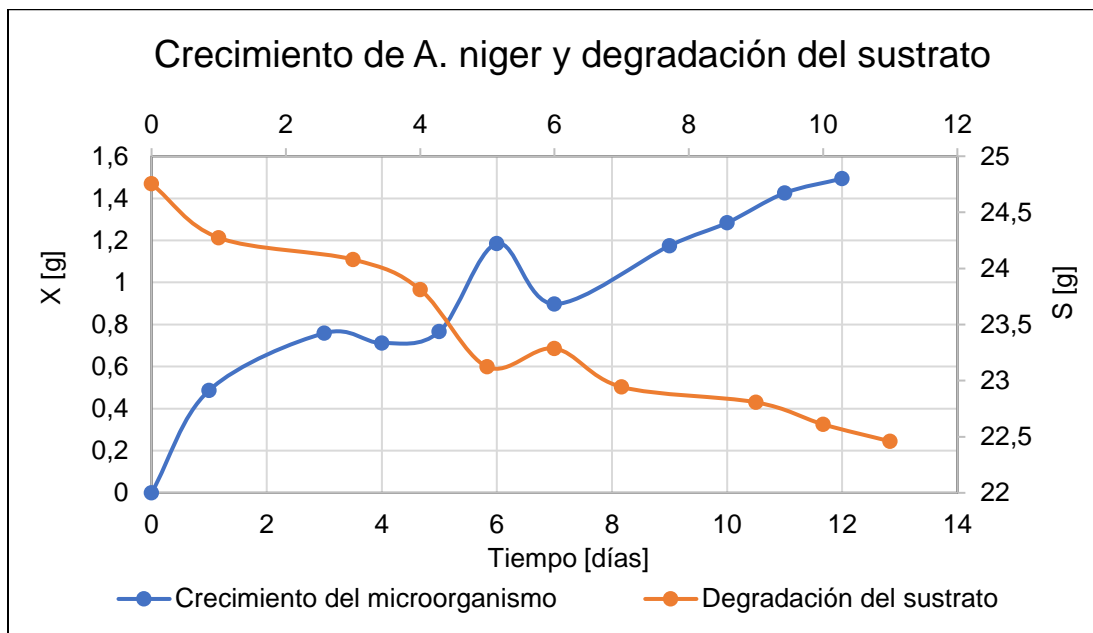
$Sustrato + energía + microorganismo \rightarrow microorganismo + producto$ (27)

6.2.1 MODELO CINÉTICO PARA *ASPERGILLUS NIGER*

El modelo se plantea así:

De los datos obtenidos por diferencia de peso de las cajas de Petri se determina la degradación del sustrato y el crecimiento de los microorganismos mostrados en la gráfica 20.

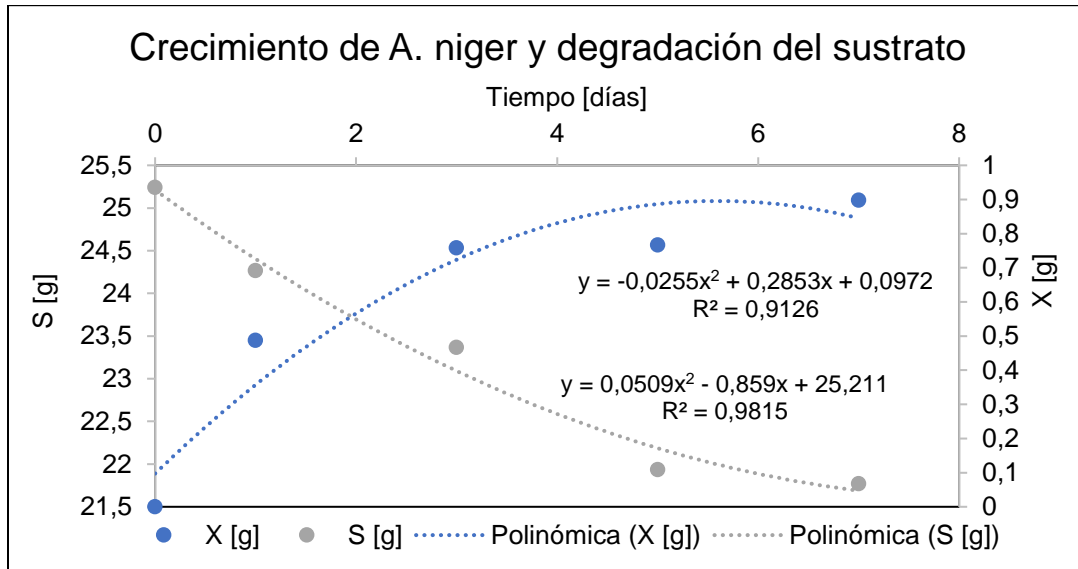
Figura 20. Crecimiento del *A. niger* (X) y degradación del sustrato (S).



Fuente: Elaboración propia.

Luego de realizar el filtrado de datos, se gráfica el mismo comportamiento con los datos seleccionados, obteniendo la degradación de sustrato y crecimiento de microorganismos evidenciados en la gráfica 21.

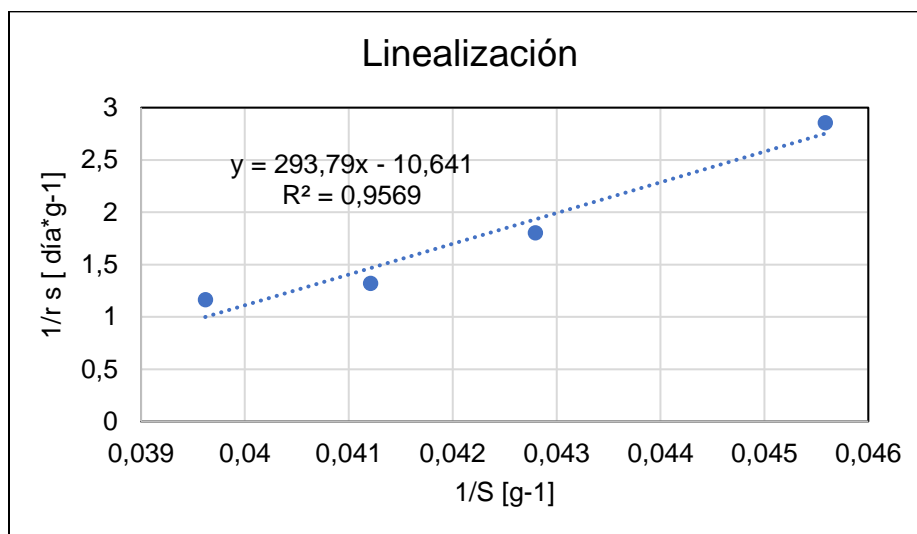
Figura 21. Datos seleccionados de (X) y (S).



Fuente: Elaboración propia.

Observando la gráfica y la ecuación resultante de los datos filtrados, se evidencia su similitud con el modelo de Monod. Por lo cual, se realiza la linealización de los datos (figura 22) para verificar que se ajusta con el modelo cinético de Monod y se determinan las constantes del modelo según el ANEXO H.

Figura 22. Linealización de la ecuación experimental para el modelo de Monod.



Fuente: Elaboración propia.

Con las gráficas del comportamiento del *Aspergillus niger* y la degradación de las cáscaras de yuca en el tiempo, se observa que las curvas son similares a las presentadas en el modelo de Monod, para confirmar si es posible ajustar los datos experimentales al modelo de Monod se hace la linealización correspondiente. En el ANEXO D, se encuentra el desarrollo matemático. Las constantes del modelo se calculan mediante la ecuación de la recta graficando la derivada inversa. Los resultados de las constantes del modelo de Monod para *A. niger* son:

Tabla 17. Constantes cinéticas del modelo Monod.

M	b	K [g/día]	K_s [g]
293,79	-10,641	0,09398	-27,60925

Fuente: Elaboración propia.

La expresión cinética de Monod para la degradación del sustrato por el *Aspergillus niger* es:

$$-\frac{dS}{dt} = -r_s = \frac{0,09398*[S]}{[S]-27,60925} \quad (28)$$

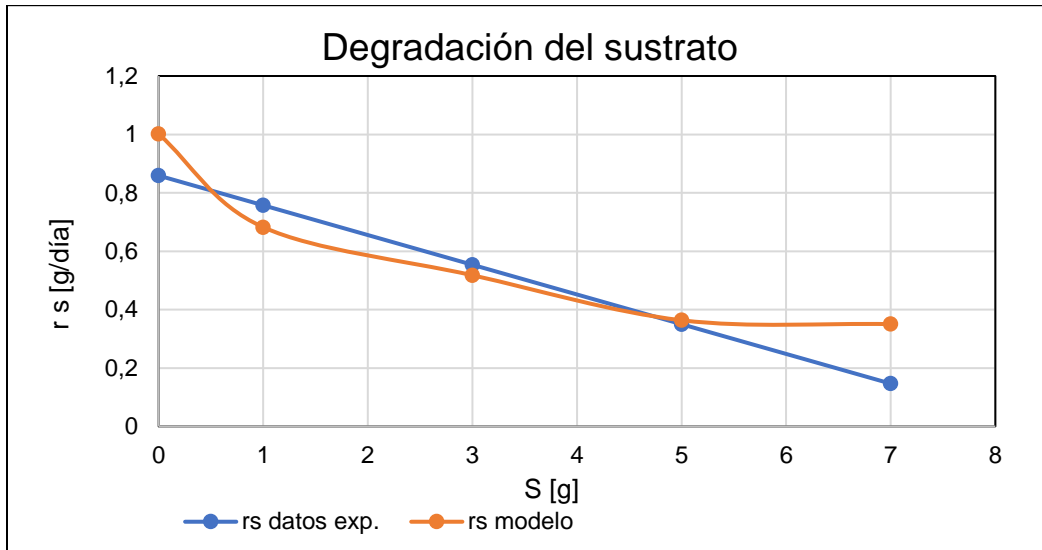
Se hicieron dos gráficas, la primera es la degradación del sustrato con respecto a la concentración del sustrato y la segunda es de la velocidad de reacción hallada con los datos experimentales y la obtenida al reemplazar la expresión cinética del modelo de Monod (ecuación (28)).

Tabla 18. Degradación del sustrato

Datos experimentales	Datos del modelo
0,859	1,0015
0,7572	0,6822
0,5536	0,5177
0,35	0,3634
0,1464	0,3503

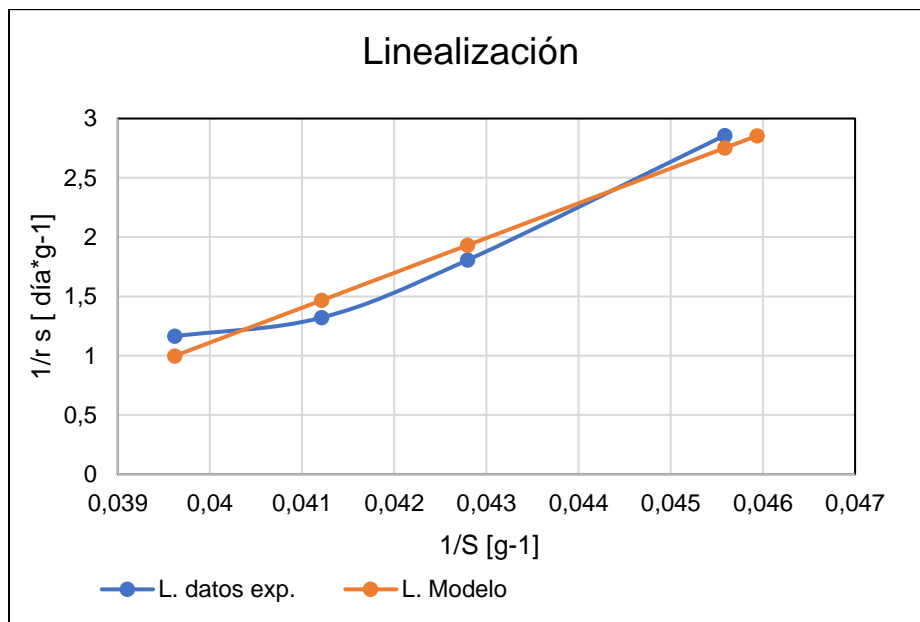
Fuente: Elaboración propia

Figura 23. Gráfica de degradación del sustrato, modelo y datos experimentales.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 24. Gráfica de linealización, modelo y datos experimentales.



Fuente: Elaboración propia.

Los porcentajes de error entre los datos experimentales y los datos del modelo se calcularon mediante la ecuación (18).

Tabla 19. Porcentaje de error de degradación de sustrato del modelo.

Error MSE hasta día 10	Error MSE hasta día 8
2,4908%	0,5647%
Fuente: Elaboración propia.	

Tabla 20. Porcentaje de error de linealización del modelo.

Error MSE hasta día 10	Error MSE hasta día 8
39,7732%	0,0167%
Fuente: Elaboración propia.	

En las tablas 19 y 20 se muestran los datos del porcentaje de error que tiene el modelo ajustado a los datos experimentales para degradación y linealización, estos se presentan hasta el día 8 y hasta el día 10. Como se estableció en puntos anteriores la hidrólisis inicial se toma durante un periodo de 8 días, demostrando que después de este tiempo el error de ajuste del modelo es de 39,7732% por lo que no es aconsejable aplicarlo; el comportamiento del microorganismo en el proceso demuestra que después del octavo día realiza otros tipos de cinéticas.

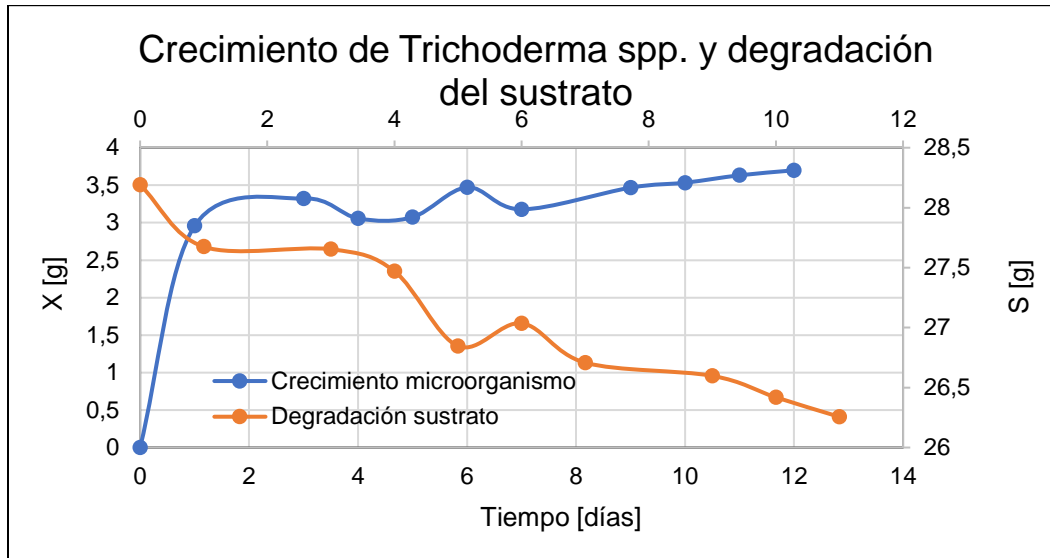
Comparando los porcentajes de error calculados para el día 8 con respecto a los calculados hasta el día 10, se evidencia que, tanto en la degradación del sustrato como en la linealización, el modelo ajustado tiene menor error en el tiempo establecido como tiempo de hidrólisis inicial.

6.2.2 MODELO CINÉTICO PARA LA DEGRADACIÓN DEL SUSTRATO CON *TRICHODERMA SPP*

El modelo se plantea así:

De los datos obtenidos por diferencia de peso de las cajas de Petri se determina la degradación del sustrato y el crecimiento de los microorganismos mostrados en la gráfica 25.

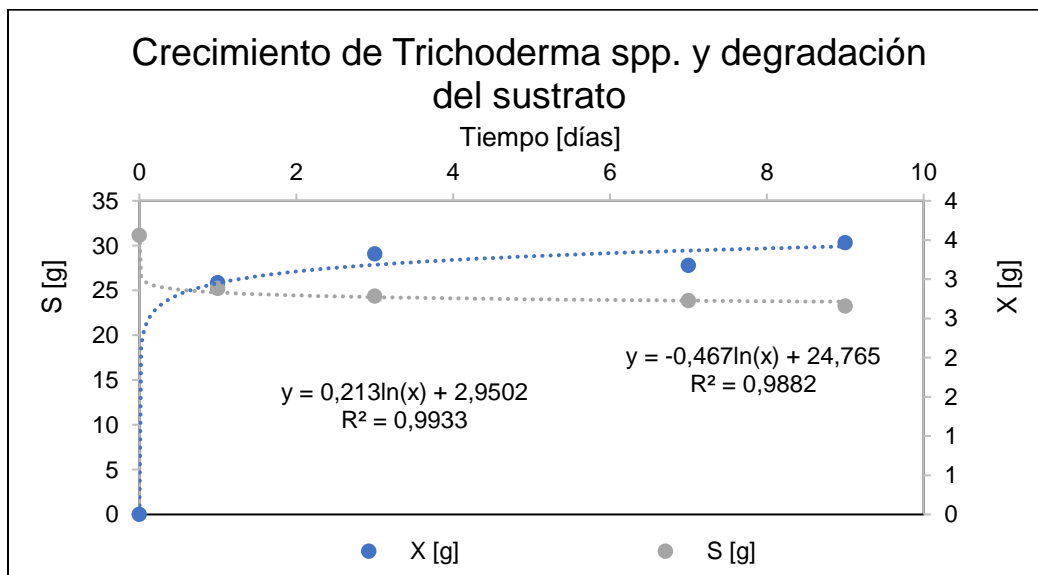
Figura 25. Crecimiento de *Trichoderma spp.* (X) y degradación del sustrato (S).



Fuente: Elaboración propia.

Luego de realizar el filtrado de datos, se gráfica el mismo comportamiento con los datos seleccionados, obteniendo la degradación de sustrato y crecimiento de microorganismos evidenciados en la gráfica 26.

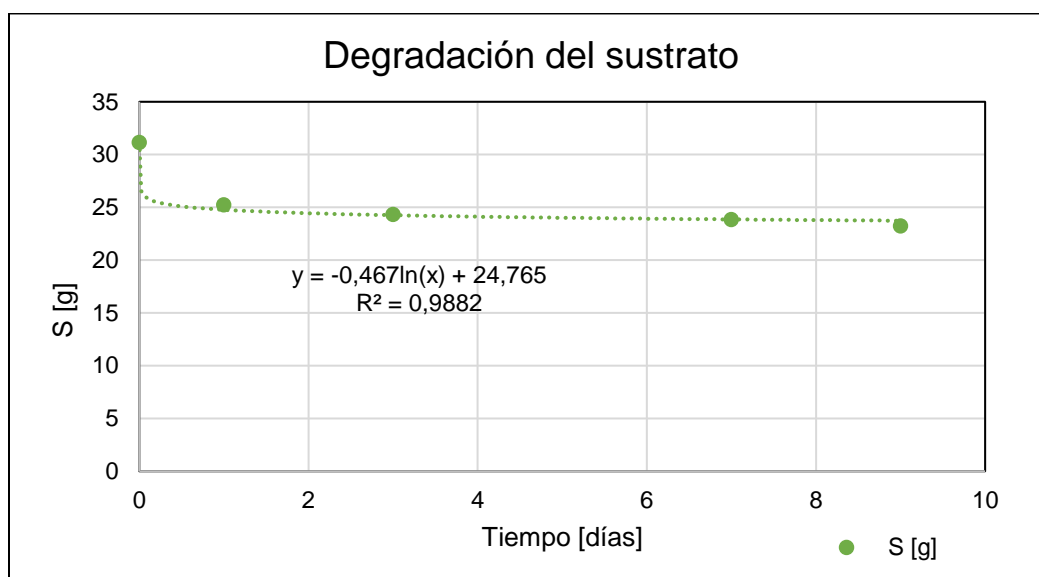
Figura 26. Datos seleccionados de (X) y (S).



Fuente: Elaboración propia.

El comportamiento que se muestra en la figura 26, es de tendencia logarítmica. Al realizar la revisión de los modelos se encontró que no hay compatibilidad entre la curva experimental y los modelos existentes, por tanto, se dice que el modelo cinético del hongo es el representado en la figura 27.

Figura 27. Modelo cinético del *Trichoderma spp.*



Fuente: Elaboración propia.

Este comportamiento indica que en el transcurso del tiempo no habrá variación del comportamiento, en otras palabras, la tendencia logarítmica evidencia inhibición del crecimiento después del tercer día. Una posible causa de la inhibición del hongo es el crecimiento superficial del hongo en el sustrato, es decir, las esporas del microorganismo solo se encontraban en la superficie, esto se puede observar en la figura 18. Lo anterior indica un problema de difusión, que puede ser porque la penetración del hongo en el sustrato no se efectuó, posiblemente por el tamaño de la partícula o por la humedad.

6.3 POTENCIAL PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

En la tabla 21 se muestran los factores de conversión real e ideal tomados de literatura. El factor real corresponde a un rendimiento de fermentación del 43% [17].

Tabla 21. Factores de conversión

FC_{ideal}	FC_{real}
0,5	0,86

Fuente: Chávez L. [12] y Gonzales J. [17]

En la tabla 22 se presentan los resultados de la cantidad máxima de glucosa en gramos obtenida por el *Aspergillus niger* y la cantidad de bioetanol que puede ser producida por fermentación alcohólica de la glucosa. Dicho potencial solo se determinó con la máxima cantidad de glucosa obtenida por el *Aspergillus niger* ya que el *Trichoderma spp* no produce glucosa, si no como se explicó anteriormente este hongo consume la glucosa ya presente en el sustrato para realizar otras síntesis celulares.

Tabla 22. Potencial para producción de bioetanol

Cantidad de glucosa <i>A. niger</i> [g]	Cantidad etanol ideal [g]	Cantidad etanol real [g]	Cantidad etanol ideal [ml]	Cantidad etanol real [ml]
3,99348	7,98696	3,4344	10,0087	4,3038

Fuente: Elaboración propia.

El dato de glucosa obtenida se tomó del octavo día, ya que en este se presenta la cantidad máxima. Además, como los resultados de las pruebas de glucosa están dados en gramos por litro, se calculó la cantidad en gramos de este polímero partiendo de que el volumen del sustrato total es de 0,6 litros; con este valor y la concentración de glucosa, se determina la cantidad en gramos de la glucosa presente en las cáscaras. Con los gramos de glucosa y los factores de conversión ideal y real, se determinó los gramos de etanol ideal o teórico mediante la ecuación 24 y los gramos de etanol real mediante la ecuación 25. Normalmente la cantidad de bioetanol se expresa en unidades de volumen. Entonces, mediante la relación de densidad se determinó la cantidad de etanol real e ideal obtenido en mililitros, sabiendo que la densidad del etanol es de 0,798 g/ml.

7 CONCLUSIONES

- Las cáscaras de papa y yuca son biomásas con potencial hidrolizable al contener en su composición química cantidades significativas de almidón, celulosa y glucosa. En procesos con medios biológicos, las cáscaras de yuca son una materia prima más apropiada que las cáscaras de papa, ya que permite mejor adaptación de hongos filamentosos y menor probabilidad de contaminación.
- El hongo *Aspergillus niger* penetra completamente el sustrato debido a su facilidad de adaptación y crecimiento. Por medio del esporulado se propaga por todo el sustrato, degradando prácticamente la cantidad total aprovechable de celulosa y almidón en glucosa. El modelo cinético de degradación de las cáscaras de yuca por *A. niger* se define como tipo Monod al presentar un error máximo del 2,4908%, afirmando que existe una relación entre el crecimiento del microorganismo y la concentración de sustancias aprovechables en el sustrato (celulosa y almidón).
- En la revisión bibliografía se encuentra que la constante de Monod comúnmente es expresada en unidades de concentración, la constante calcula para *A. niger* por el modelo es 27,60925, la cual varía de acuerdo al tipo de sustrato sometido.
- El *Trichoderma spp* no es un microorganismo idóneo para realizar el proceso de hidrólisis biológica de las biomásas analizadas, en las condiciones de trabajo planteadas. A diferencia del *Aspergillus niger* establece su población superficialmente, ocasionando el no aprovechamiento del potencial total de las cáscaras.
- El *Trichoderma spp* presento un comportamiento atípico, en donde se evidencia una inhibición desconocida perjudicando el modelamiento. El proceso desarrollado por el hongo sugiere ser una hidrólisis para obtención de celulosa y no de glucosa, lo que lleva a concluir que el modelo formulado mediante la ecuación logarítmica no es válido para el tipo de hidrólisis planteado.
- El biorreactor propuesto puede utilizarse en procesos biológicos en estado sólido donde se requiera facilidad de toma de muestras, difusión másica, distribución del flujo de aire y recuperación de lixiviados.
- Se proyectan resultados prometedores para la hidrólisis planteada en las cáscaras de yuca con el hongo *Aspergillus niger*, ya que, aunque se trata de un proceso biológico en donde los resultados no son significativos, la cantidad de bioetanol que puede obtenerse es admisible partiendo de un rendimiento del 43% de fermentación alcohólica.

8 RECOMENDACIONES Y OBSERVACIONES

Según lo aprendido, observado y analizado de este proyecto se indica:

Para trabajos con microorganismos es importante conocer su comportamiento y las condiciones necesarias para desarrollarse, es decir, revisar las condiciones de humedad, tamaño de partícula y tipos de sustratos. Es importante indicar que la humedad es uno de los factores más relevantes al trabajar con un hongo, si hay exceso o falta de humedad el microorganismo no crece o se contamina la unidad experimental.

Para revisiones futuras en procesos de hidrólisis se recomienda en sustratos con presencia de hemicelulosa, llevar el seguimiento de su comportamiento durante el proceso, ya que, es posible su degradación por el microorganismo en moléculas de celulosa alternado los resultados del estudio.

Se recomienda asegurar condiciones de aislamiento donde se encuentre el biorreactor o que el ambiente sea estéril, para evitar contaminaciones durante el transporte o el muestreo, también utilizar un gas de arrastre en los montajes de las unidades asegurando un ambiente puro dentro del biorreactor. En caso de tener que mover los reactores hasta un punto estéril para realizar el muestreo se aconseja que estén cerca y que el reactor tenga cierres de las entradas para lograr total aislamiento.

En etapas posteriores como la fermentación alcohólica es necesario realizar procesos de separación del sustrato y el hongo, ya que la presencia de microorganismos anteriores puede inhibir estas etapas.

Al momento de plantear un modelo cinético con datos experimentales, es recomendable tener claridad del proceso y realizar filtrado de datos, debido a que algunas de las desviaciones presentados pueden ser por errores humanos.

En procesos que trabajan con seres vivos los rendimientos esperados son bajos en comparación a otros, teniendo en cuenta que no es posible determinar un comportamiento estable por la sensibilidad que tienen respecto a las condiciones ambientales.

En base a montajes realizados anteriormente, se conoce que las cáscaras de papa son un sustrato difícil de trabajar para este tipo de procesos, ya que son muy sensibles a contaminación o presencia de otros microorganismos por la humedad que contienen, por tanto, se recomienda deshidratar las cáscaras antes de iniciar el proceso de hidrólisis.

REFERENCIAS

- [1] F. N. d. B. d. Colombia, «Federeación Nacional de Biocomustibles de Colombia,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.fedebiocomustibles.com/v3/nota-web-id-32.htm>. [Último acceso: 2018].
- [2] M. L. J. M. S. S. G. P. M. G. Mithra, «Comparison of ethanol yield from pretreated lignocellulostarch biomass under fed-batch SHF or SSF modes,» *Heliyon* 4, 2018.
- [3] A. F. R. B. a. K. R. d. F. Z. Daiana G. Martinez, «Ethanol Production from Waste of Cassava Processing,» *Applied Sciences*, vol. 8, nº 11:2158, 2018.
- [4] M. S. S. M. L. J. G. P. N. S. Pooja, «Bioethanol production from microwave-assisted acid or alkali-pretreated agricultural residues of cassava using separate hydrolysis and fermentation (SHF),» *Biotech*, 2018.
- [5] M. S. G. I. F. D. G. D. E. G. R. N.-E. O. Ben Jeddou Khawlaa, «Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis,» *Industrial Crops and Products*, vol. 52, pp. 144-149, 2014.
- [6] G. B. V, «Hidrólisis,» [En línea]. Available: <https://www.euston96.com/hidrolisis/>. [Último acceso: marzo 2019].
- [7] S. M. D. L. ROSA, HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CELULOSA Y BIOMASA LIGNOCELULÓSICA ASISTIDA CON LÍQUIDOS IÓNICOS, Madrid: Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, 2015.
- [8] H. S. FOGLER, Elementos de ingeniería de las reacciones químicas, México: PEARSON, 2008.
- [9] J. F. C. Vargas, AJUSTE DE UN MODELO CINÉTICO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* EN LA FERMENTACIÓN DE UN SUSTRATO COMPLEJO, Bogotá: Fundación Universidad de America, 2017.
- [1] M. Z. Sergio Felix, «ESTEQUIOMETRÍA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO,» 0] [En línea]. Available: https://www.academia.edu/33246185/ESTEQUIOMETR%C3%8DA_DEL_CRECIMIENTO_MICROBIANO. [Último acceso: 2019].
- [1] A. M. Torrado, S. Cortés, J. M. Salgado, B. Max, N. Rodríguez, B. P. Bibbins, 1] A. Converti y J. M. Domínguez, «Citric acid production from orange peel

- wastes by solid-state fermentation,» *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, pp. 394-409, 2011.
- [1 L. R. M. Chavéz, Estudio de la producción de proteínas lignocelulíticas para la
2] hidrólisis de trigo por el hongo *Trametes versicolor*, Santiago de Chile:
Universidad de Chile, 2013.
- [1 A. P. S. L. Fani Th Mantzouridou, «Yeast flavour production by solid state
3] fermentation of orange peel waste,» *Biochemical Engineering Journal*, vol.
101, pp. 1-8, 2015.
- [1 «Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of
4] selected lignocellulosic wastes,» *Cleaner Production* , vol. 209, pp. 937-946,
2019.
- [1 A. D. I. C. & A. B. C. Marzo, «Valorization of agro-industrial wastes to produce
5] hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation,» *SAGE*, vol. 37, nº 2,
pp. 149-156, 2018.
- [1 M. G. L. P. Vanessa CÁRDENAS, DEGRADACIÓN DE CELULOSA Y
6] PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN DE GUADUA
UTILIZANDO EL SISTEMA BIOLÓGICO (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces*
cerevisiae), Armenia: GYMOL, Universidad del Quindío, 2009.
- [1 J. A. S. Gonzales, "DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA"
7] *Sacharomyces cerevisiae*, Universidad Nacional del Trujillo, 2012.
- [1 ICONTEC, NTC 6066, Bogotá, 2014.
8]
- [1 A. A. R. Colorado, FACTORES DE ESCALA PARA LA PRODUCCIÓN
9] BIOTECNOLÓGICA DE ETANOL CARBURANTE, Medellín: Universidad
Nacional de Colombia, 2009.
- [2 M. Viñals-Verde, A. Bell-García, G. Michelena-Álvarez y M. Ramil-Mesa,
0] Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, La Habana, Cuba:
Instituto Cubano de Investigaciones de los, 2012.
- [2 Centro tecnológico agrario y agroalimentario ITAGRA.CT, Biomasa,
1] biocombustibles y sostenibilidad, 2012.
- [2 Asamblea general de las naciones unidas, «Desarrollo sostenible,» ONU, [En
2] línea]. Available: <https://www.un.org/es/ga/president/65/issues/sustdev.shtml>.
[Último acceso: 2019].

- [2] P. N. M. Y. H. A. V. S. ANDERSON GUARNIZO FRANCO,
3] «SACARIFICACIÓN, PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN,» *Scientia et Technica Año XV*, nº 42, 2009.
- [2] e. n. d. C. D. d. H. Profesor Igor Tikhonovich, «Organización nacional de las
4] naciones unidas para la alimentación y la agricultura,» 08 mayo 2012. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/fsnforum/es/activities/discussions/biofuels-scope>.
- [2] D. P. G. Ramírez y S. A. A. y. J. E. M. Jaramillo, Efectos de los
5] Biocombustibles en la Seguridad Alimentaria en Colombia: Una Aproximación Sistémica, Medellín: Fac. Nac. Agron. Medellín, 2014.
- [2] S. M. L. CAICEDO, ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE
6] VAPORES BTXS EN REACTORES “BATCH”: FUNDAMENTO PARA LA MEJORA DE LOS PROCESOS EN UN BIOFILTRO PERCOLADOR, Santiago De Cali: UNIVERSIDAD DEL VALLE, 2015.

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo del método de Kurschner y Hoffer para determinación de celulosa.

- Tomar 1 gramo de materia anhidrida y colocarlo en un matraz.
- Adicionar 20 ml de etanol y 5 ml de ácido nítrico concentrado, en el orden escrito para las dos primeras digestiones (hervir a baño maría) durante 30 minutos.
- Por medio de un filtro Gooch de porosidad media, previamente pesado, filtrar las soluciones.
- Realizar la tercera digestión con 100 ml de agua destilada durante una hora, para pasar la solución y el material sólido por el filtro.
- Lavar el filtro con 250 ml de agua destilada caliente, 100 ml de solución saturada de acetato de sodio y 250 ml de agua destilada caliente, para luego llevarlo al horno a 105 ± 3 °C durante 12 horas y finalmente pesarse.

ANEXO B. Técnica de Grace 1977 para determinación de almidones.

- Tomar tres gramos de la muestra.
- Adicionar la muestra en un vaso de precipitado 100 ml de ácido clorhídrico (0,4 % concentración).
- Hervir durante una hora.
- Filtrar el contenido del vaso precipitado en un filtro Gooch o un embudo con papel de filtro (pesado previamente).
- Secar el filtro con la muestra en un horno eléctrico a 105-110 °C hasta peso constante.
- Pesar la muestra luego del secado.

ANEXO C. Curva de Calibración de la DNS para glucosa

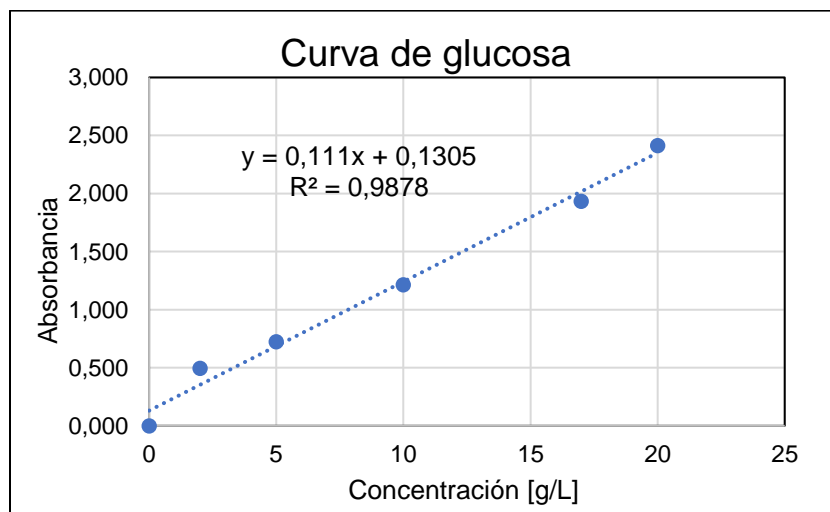
Partiendo de una muestra con concentración conocida se mide su absorbancia y utilizando la fórmula del equipo se comprueba que la concentración hallada es la misma o cercana a la conocida. De una solución madre con concentración de 100% de glucosa, se tomaron varios volúmenes para obtener las diferentes concentraciones. La solución madre se preparó con 20 g de glucosa por litro. En la tabla 8 se muestran las concentraciones tomadas para la curva con los porcentajes correspondientes y la absorbancia resultante. En la figura 9 se presentan las fotografías de las pruebas, en la figura 10 se puede observar gráficamente la curva de calibración del kit y en la tabla 9 se presenta la ecuación de la curva junto con el coeficiente de determinación.

Tabla 23. Datos de la curva de calibración.

Curva de calibración		
%	[]	Absorbancia
0%	0	0,000
10%	2	0,496
25%	5	0,723
50%	10	1,213
85%	17	1,934
100%	20	2,413

Fuente: Elaboración propia.

Figura 28. Curva de calibración del kit de glucosa.



Fuente: Elaboración propia.

ANEXO D. Protocolo de la prueba DNS para glucosa

Para la determinación de la glucosa libre durante el tiempo de experimento, se utilizó el método de DNS (espectrofotometría), el cual consiste en tomar muestras líquidas del sustrato a analizar y adicionar en ellas una serie de reactivos de la siguiente manera:

- Se obtiene la muestra líquida a analizar partiendo de 5 gramos de material sólido.
- Se toman tubos de ensayo según la cantidad de muestras a examinar, contando adicionalmente un tubo para el blanco y otro para el patrón.
- A cada uno de los tubos se le adiciona la cantidad mencionada en la tabla 24.
- Se agitan y se dejan reposar durante 10 minutos.
- Se calibra el espectrofotómetro a 500 nm y para cubetas de 10 mm.
- El blanco se toma como referencia para las mediciones, entonces se ajusta el equipo para que el cero sea el valor de la muestra blanco.
- Se examinan las muestras en cubetas de 10 mm para el espectrofotómetro.

Tabla 24. Preparación de las muestras.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	3 μ l	-
Muestra	-	-	3 μ l
Reactivo	3 ml	3 ml	3 ml

Fuente: Elaboración propia.

Los reactivos utilizados son: el reactivo de glucosa y el patrón estándar (glucosa 100 mg/dl). Se utilizan micropipetas para tener mayor precisión en la preparación de las muestras. La hidrólisis que se trabaja es en estado sólido, por lo que se toma una muestra sólida de 5 g que se mezcla con 25 ml de agua destilada en un mixer durante 30 minutos a una velocidad aproximada de 500 rpm; después de mezclarse pasa por un filtro y se deja decantando durante 30 minutos, para tomar solo el sobrenadante y no tener alteraciones en la muestra.

ANEXO E. Conteo de esporas.

Para el conteo de esporas se usó una micropipeta de 10 microlitros, una muestra diluida y una lámina de recuento o hematocitómetro. Se diluyó 1ml de muestra madre en 9ml de agua destilada para cada una de las muestras. La cuadrícula tomada es la siguiente:

Figura 29. Cuadrícula para el conteo de esporas.

1				2
		5		
4				3

Fuente: Elaboración propia.

Como margen de error se tomaron el lateral izquierdo y el lado superior. El conteo se hizo contando las esporas en los cuadros de las esquinas y el central, se saca un promedio de este, y luego el total de esporas por mililitro el cual está dado por la siguiente fórmula:

$$Total = Promedio * Factor de volumen de la camara * Dilusión \left[\frac{Esporas}{ml} \right] \quad (29)$$

El total de esporas por unidad experimental es:

$$Total_{UE} = Volumen de la unidad * Total [Esporas] \quad (30)$$

El conteo de esporas para inoculación de los biorreactores se presenta en la tabla:

Tabla 25. Recuento de esporas en la inoculación de los biorreactores.

Reactor-inoculo	Conteo en cuadrícula					Promedio [esporas]	Esporas por mililitro [esporas/ml]	Esporas por reactor [esporas]
	1	2	3	4	5			
Yuca <i>A.niger</i>	19	17	19	21	20	19,2	$19,2 \times 10^5$	$28,8 \times 10^7$
Papa <i>A.niger</i>	13	12	18	19	13	15	15×10^5	$22,5 \times 10^7$
Yuca <i>Tichoderma spp</i>	42	35	38	26	35	35,2	$35,2 \times 10^5$	$52,8 \times 10^7$
Papa <i>Trichoderma spp</i>	29	28	20	26	29	26,4	$26,4 \times 10^5$	$39,6 \times 10^7$

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO F. Datos de peso cajas de Petri.

En las tablas 28, 29 y 30 se encuentran los datos experimentales de los pesos de todas las cajas de Petri, incluyendo las descartadas por no crecimiento o contaminación en el proceso de selección para el modelado cinético.

Tabla 26. Pesos en gramos de las cajas de control.

Caja/Día	Control										
	0	1	3	4	5	6	7	9	10	11	12
1	22,3089	38,8835	38,6216	38,4063	37,9372	37,6513	37,5069	37,4449	37,3893	37,317	37,2288
2	23,3684	41,5437	41,3969	41,1438	40,9557	40,6806	40,4715	40,3698	40,2963	40,2089	40,1377
3	25,0263	46,3021	46,1341	45,8406	45,627	45,3371	45,2211	45,1585	45,1149	45,0581	44,9716
4	23,2331	43,0953	42,9445	42,6582	42,4912	42,2644	42,161	42,1224	42,0785	41,9981	41,902
5	24,7275	39,9429	39,7802	39,5019	39,2479	38,9204	38,7417	38,653	38,6291	38,5806	38,4797
6	23,6458	38,1985	38,0635	37,8779	37,7177	36,9823	37,0257	36,817	36,7279	36,6309	36,5206
7	21,905	36,7756	36,6707	36,4531	36,295	35,6662	35,8988	35,7467	35,6886	35,617	35,5265
8	20,4081	37,3119	37,1746	36,9601	35,1155	34,8426	34,8108	34,756	34,7302	34,692	34,6439
9	21,4526	36,8645	36,71	36,4897	36,3158	36,1014	36,0076	35,9504	35,9287	35,8822	35,8006
10	22,4812	37,6199	37,4116	37,1711	36,957	36,6868	36,5635	36,4976	36,4703	36,4149	36,332

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 27. Pesos en gramos de las cajas inoculadas con *Aspergillus niger*.

<i>Aspergillus niger</i>											
Caja/Día	0	1	3	4	5	6	7	9	10	11	12
1	23,7151	43,1533	42,8863	42,7467	42,572						
2	22,3403	37,0763	36,6609	36,3738	36,1715	35,88	35,511				
3	23,3962	38,4473	38,0462	37,8727	37,6847	37,314	37,1909				
4	23,3224	38,3336	37,6787	37,5053	37,3399	36,6384	36,7863	36,4846	36,3782	36,2151	35,703
5	23,4684	36,769	37,7804	37,6093	37,3698	36,6824	36,8299	36,4352	36,2833	36,1013	35,772
6	21,99	35,6289	36,5364	36,2679	36,0129	35,4379	35,666				
7	20,8371	35,6289	35,2351	35,096	34,9679						
8	21,7603	36,3237	35,9171	35,6901	35,5329	34,8846	35,0731	34,7696	34,6435	34,4716	34,2861
9	22,163	36,9716	36,6917	36,6338	36,4723	35,7939	35,9327	35,7844	35,6632	35,4599	35,2505
10	22,9981	37,6496	37,1697	36,9757	36,7075	36,0185	36,1828	35,8398	35,7033	35,5068	35,3552

Fuente: Elaboración propia.

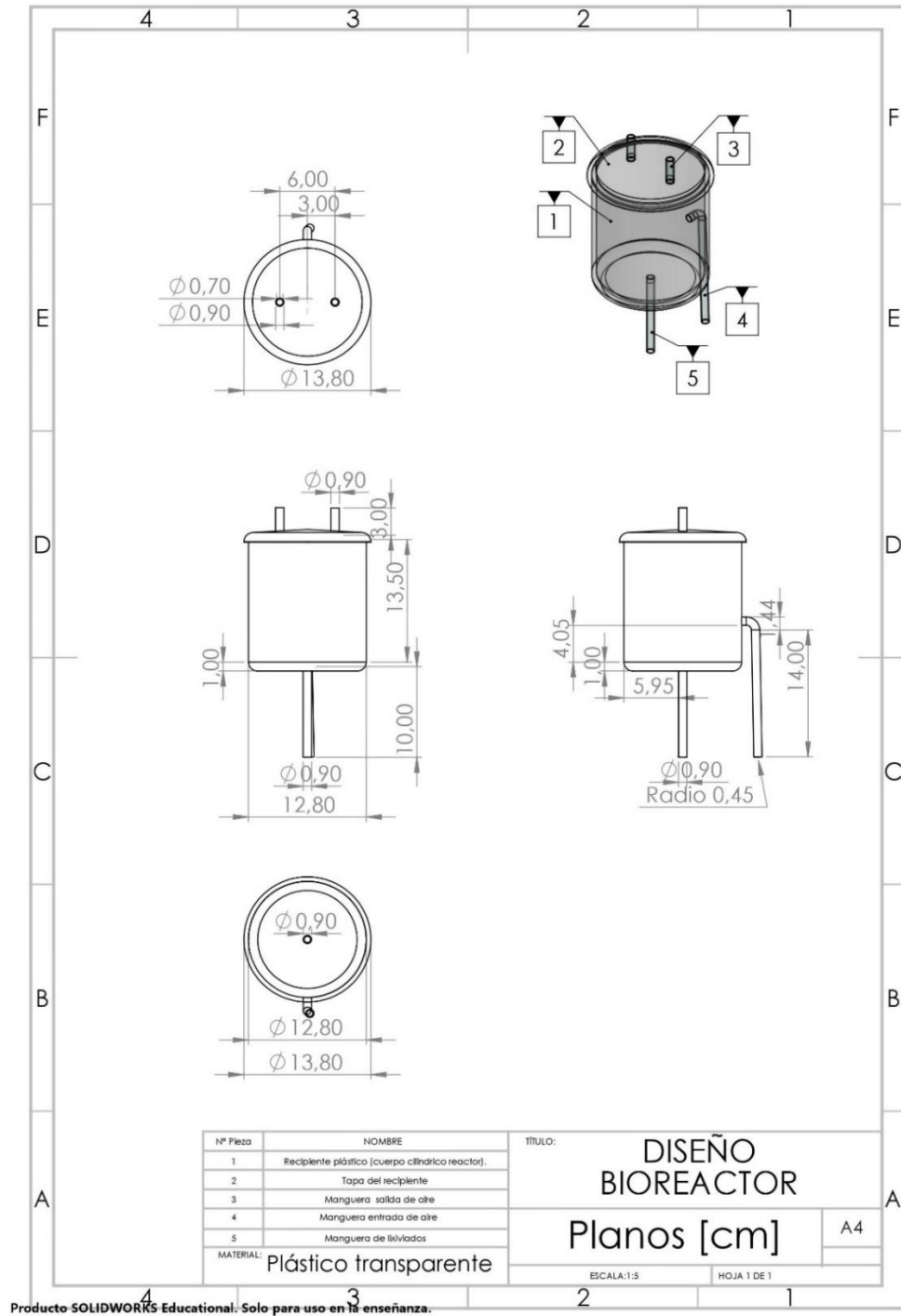
Tabla 28. Pesos en gramos de las cajas inoculadas con *Trichoderma spp.*

<i>Trichoderma spp.</i>											
Caja/Día	0	1	3	4	5	6	7	9	10	11	12
1	21,1717	38,2376	37,8998	36,6283	36,3844	35,6472	35,774	34,6003			
2	21,0881	38,1623	36,917	35,967	35,7716	34,9349	35,0133	34,0334			
3	21,282	38,2067	37,8002	37,713	37,4942	36,8465	37,0001	36,8943			
4	20,5147	36,4031	36,136	36,6318	36,3925	35,7913	35,928	35,8028			
5	22,7768	39,0515	38,6836	38,8167	38,6211	37,9771	38,132	37,8437			
6	23,0271	39,9308	39,5938	39,5203	39,2247	38,5805	38,6503	38,3989			
7	23,7463	38,4625	38,0448	38,0397	37,8733	37,275	37,4783	37,1953	37,1418	37,0494	36,9667
8	23,8899	40,7949	40,2787	40,2578	40,074	39,45	39,6402	39,3116	39,202	39,0228	38,8599
9	22,0991	38,5448	38,4669	38,3597	38,1769	37,5911	37,8283	37,6908			
10	21,0384	37,7366	36,9534	36,8346	36,575	35,8729	36,0323	35,8127			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO G. Planos del biorreactor.

Figura 30. Plano del modelo del biorreactor.



Fuente: Adaptado de Solidworks.

ANEXO H. Modelo cinético.

Realizando ajustes a las ecuaciones descritas en el modelo de Monod se obtiene la ecuación (45) para la degradación del sustrato:

$$-\frac{dS}{dt} = -r_s = \frac{K[S]}{[S]+K_s} \quad (31)$$

De la ecuación anterior:

$$\frac{1}{-r_s} = \frac{S+K_s}{K[S]} \quad (32)$$

Separando términos obtenemos:

$$\frac{1}{-r_s} = \frac{[S]}{K[S]} + \frac{K_s}{K} * \frac{1}{[S]} \quad (33)$$

$$\frac{1}{-r_s} = \frac{1}{K} + \frac{K_s}{K} * \frac{1}{[S]} \quad (34)$$

La ecuación (48) tiene la forma de la ecuación de una recta (49):

$$Y = b + mx \quad (35)$$

Donde,

$$Y = \frac{1}{-r_s} \quad (36)$$

$$x = \frac{1}{S} \quad (37)$$

Obteniendo las siguientes relaciones:

$$b = \frac{1}{K} \quad (38)$$

$$m = \frac{K_s}{K} \quad (39)$$

Mediante los datos másicos experimentales se realiza la gráfica de linealización (figura 18), obteniendo la ecuación de la recta:

$$Y = 293,79x - 10,641 \quad (40)$$

Desarrollando las relaciones 40 y 41 con los resultados de la ecuación (42), se obtienen las constantes del modelo K y K_s , así:

$$-10,641 = \frac{1}{K} \quad (41)$$

$$m = \frac{K_s}{K} \quad (42)$$

ANEXO I. Resultados de las cáscaras de papa.

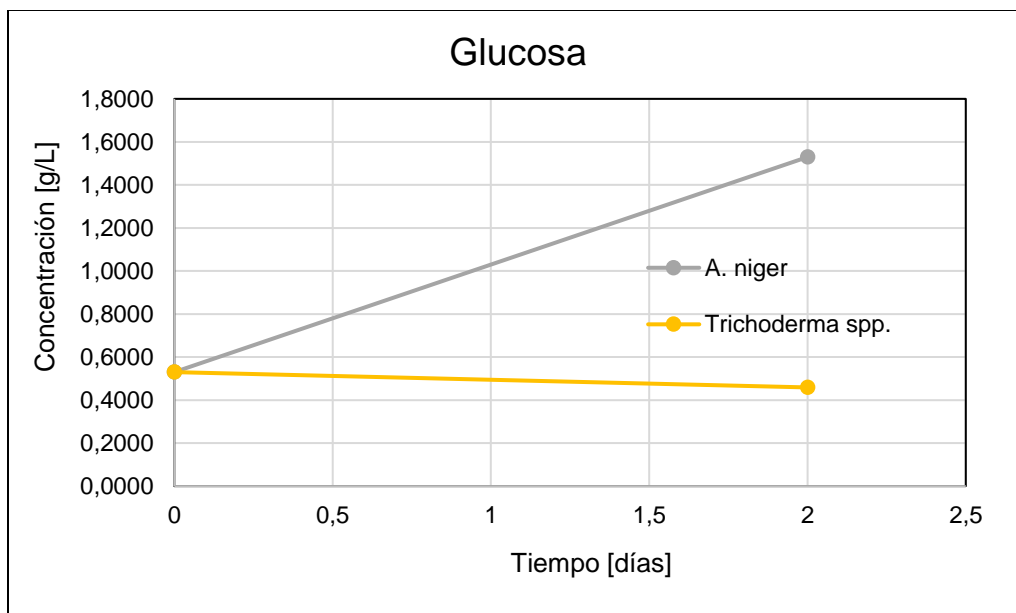
Los resultados de las cáscaras de papa durante el proceso de hidrólisis biológica se muestran a continuación en las tablas 31 a 33 y en las figuras 32 a 34. Se evidencia que los hongos degradaron el sustrato, aunque no se puede tener certeza del comportamiento de cada polímero por la cantidad de datos experimentales tomados antes de observar la contaminación.

Tabla 29. Resultados de glucosa en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.

Cáscaras de papa				
Microorganismo	A. Niger		Trichoderma spp.	
Día	%	[g/l]	%	[g/l]
0	2,65	0,5299	2,65	0,5299
2	7,65	1,5294	2,29	0,4588

Fuente: Elaboración propia.

Figura 31. Comportamiento de glucosa durante la hidrólisis de la cáscara de papa.



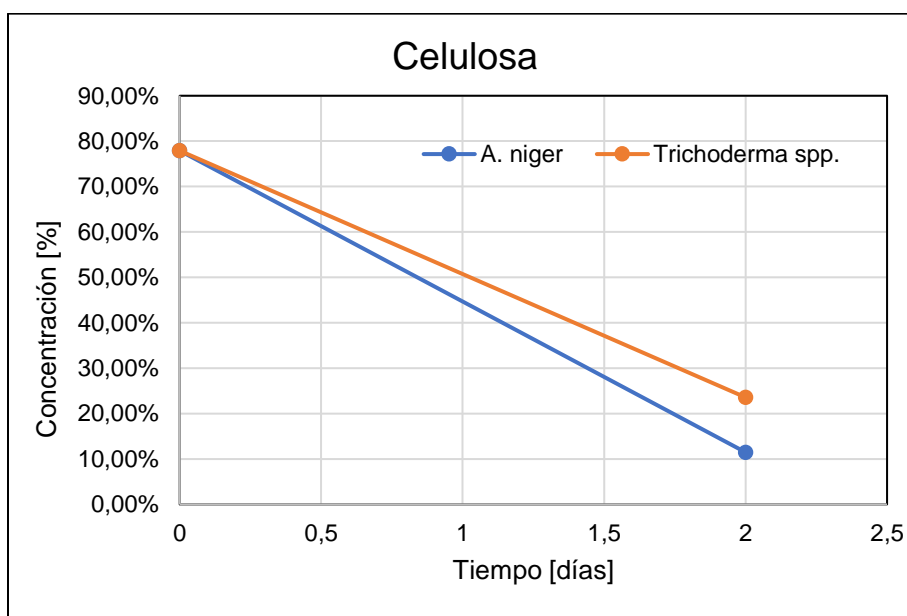
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 30. Resultados de celulosa en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.

Día	Cáscaras de papa [%]			
	0	2	8	10
Control	77,90	-	-	-
A. niger	77,90	11,48	-	-
Trichoderma spp	77,90	23,57	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Figura 32. Comportamiento de celulosa durante la hidrólisis de la cáscara de papa.



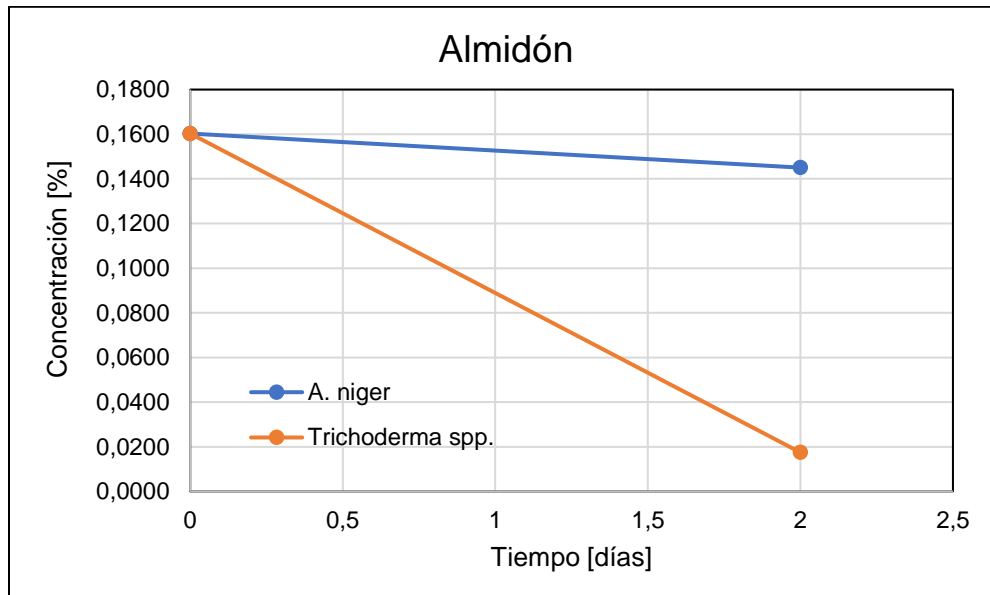
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 31. Resultados de almidón en cáscaras de papa en el proceso de hidrólisis.

Día	Cáscaras de papa [%]			
	0	2	8	10
Control	1,7169	-	-	-
A. niger	52,36	0,4130	-	-
Trichoderma spp	52,36	0,4241	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Figura 33. Comportamiento de almidón durante el proceso de hidrólisis de la cáscara de papa.



Fuente: Elaboración propia.