

## Estudio del pretratamiento alcalino del meollo y su efecto sobre el crecimiento bacteriano

R. LÓPEZ PLANES, L. HERNÁNDEZ, R. SANJURJO Y M. GONZÁLEZ

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
Ciudad La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de septiembre de 1977

Recibido: 27 de abril de 1978

**ABSTRACT.** The alkali pretreatment of bagasse and pith enhances their biodegradability by cellulolytic bacteria which produce protein for animal consumption. Factorial statistical design was used to study the effect of temperature, air flow, alkali concentration and reaction time over bacterial, specific growth velocity and the recovery of solid after the chemical pretreatment. The significant coefficients showed the convenience of decreasing the temperature and the air flow in order to obtain good solid recovery, higher specific growth velocities, and a higher solid consumption after the fermentation. The best results were obtained at 90-100°C, but never the loss we obtained losses of 20-30% of the fermentable polysaccharides. Bacterial, specific growth velocities of  $0.145 \text{ hr}^{-1}$  for the first step of the diauxic growth and  $0.04 \text{ hr}^{-1}$  for the second step were obtained.

**RESUMEN.** El pretratamiento alcalino del bagazo y el meollo facilita su biodegradabilidad mediante bacterias celulolíticas que pueden ser utilizadas para la obtención de proteína de consumo animal. En el trabajo se analiza, mediante planes factoriales de Diseño Estadístico, el efecto de la temperatura, flujo de aire, concentración de soda y tiempo de exposición sobre la cristalinidad del material, la velocidad de crecimiento bacteriano y la recuperación de materia prima después del tratamiento. El análisis de los coeficientes significativos de los polinomios adaptados señalaron, en las experiencias de altas temperaturas ( $140^{\circ}$ - $160^{\circ}$ ) que conviene disminuir la temperatura y eliminar el flujo de aire para obtener buenos rendimientos de sólidos residuales, mayores velocidades específicas de crecimiento, mayores densidades ópticas finales y un consumo mayor de meollo en la fermentación. Las experiencias efectuadas a  $90$  y  $100^{\circ}\text{C}$  fueron las que reportaron mejores resultados. No obstante estos tratamientos alcalinos producen pérdidas del 20 al 30% de los polisacáridos fermentables.

Se han obtenido velocidades específicas de crecimiento de  $0.145 \text{ hr}^{-1}$  para la primera etapa del crecimiento diáuxico y de  $0.04 \text{ hr}^{-1}$  para la segunda etapa, valores que señalan las buenas características del meollo como materia prima para la obtención de proteína de consumo animal.

## INTRODUCCION

Una de las principales vías para la obtención de proteína a partir de los materiales celulósicos tales como bagazo y meollo, lo constituye el pretratamiento alcalino de estos a altas temperaturas y oxidación con aire. (*Dunlap, 1969; Ley y cols., 1971; Enríquez, 1973; López Planes, 1975; Osman y cols. 1973*).

El pretratamiento alcalino del bagazo y el meollo facilita su biodegradabilidad por bacterias celulolíticas forrajeras. En nuestro país se dispone de grandes cantidades de meollo como residuo de la fabricación del papel y la elaboración de azúcar, de manera que la obtención de proteína a partir del mismo para su empleo en la constitución del forraje es un campo de gran importancia industrial y económica.

Las técnicas alcalinas fueron desarrolladas esencialmente por Han y Srinivasan (1969) y Dunlap y Callihan (1971, 1973) sobre la base de un tratamiento alcalino con sosa a concentración entre 6 y 10%, temperaturas cercanas a  $180^\circ\text{C}$  y tiempos entre 30 y 60 minutos. La desventaja de este tratamiento es que en él se destruye más de la mitad de las hemicelulosas que podrían ser utilizadas como fuentes de reductores y el rendimiento obtenido no supera el 60% como material biodegradable con respecto al peso de bagazo seco inicial.

La fermentación de este sustrato presenta un crecimiento diáuxico característico (*López Planes y López 1973, Enríquez, 1973*).

## MATERIALES Y METODOS

Para realizar las experiencias a altas temperaturas se hizo uso del Diseño Estadístico mediante un plan factorial  $2^{4-1}$ , según se indica por la matriz D de los experimentos.

	$x_1$ (% de Sosa)	$x_2$ (Flujo de aire)	$x^3$ (Temp)	$x_4$ (Tiempo)
$D =$	-1 1	(6%) (10%)	-1 (200 lpm) -1 (400 lpm)	-1 (140°C) -1 (160°C)
	-1 1	1 -1	-1 1 1 1	1 -1 -1 1
	-1 1	-1 -1	-1 1 1 1	-1 -1 -1 1
	1	1	1	1

donde  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  y  $x_4$  son las variables codificadas correspondientes a concentración de sosa en %, flujo de aire en litros por minuto, temperatura de tratamiento en la estufa y tiempo de tratamiento respectivamente. Se procedió a adaptar un polinomio del tipo:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

donde los coeficientes  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ , etc. se calculan mediante el sistema matricial: (*Bacon y Henson, 1971*).

$$\mathbf{B} = [b_0 \ b_1 \ b_2 \dots \ b_{23}]' = (1/8)\mathbf{X}'\mathbf{Y}$$

donde  $\mathbf{X}$  es la matriz de las variables independientes e  $\mathbf{Y}$  el vector de resultados que se determinan experimentalmente.

Al mismo tiempo se probó un proceso de tratamiento con sosa menos energético, sin pasar aire y trabajando a temperaturas de 90° y 100°C mediante un plan factorial 2<sup>3</sup> representado por otra matriz D.

	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Experiencia
$D =$	-1 1	(6%) (10%)	-1 (90°C) -1 (100°C)	-1 (60 min.) -1 -1 -1 1 (120 min.) 1 1 1
	-1 1	1 -1	1 -1 -1 -1	2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 2-6 2-7 2-8
	-1 1	-1 -1	-1 1 1 1	
	1	1	1	

donde  $X_1$  es la concentración de sosa usada en el tratamiento,  $X_2$  la temperatura y  $X_3$  el tiempo de tratamiento.

En este caso se adapta el polinomio:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

cuyos coeficientes se evalúan de la misma forma por el sistema matricial.

### TECNICA OPERATORIA

Se pesan 30 gramos de meollo húmedo y se mezclan con 300 ml de sosa durante 40 minutos, después de lo cual se filtra en una malla de nylon de apertura promedio de 0,1 mm para eliminar el exceso de sosa y se coloca el meollo embebido en una malla de acero inoxidable de apertura promedio de 0,2 mm en la estufa con un flujo de aire y una temperatura dada para la experiencia correspondiente del plan. Después de pasado el tiempo requerido de calentamiento se saca la malla y se lava la muestra con un volumen de agua medida. El meollo que queda después del lavado se neutraliza, se lava con agua destilada para eliminar las sales, se filtra y se seca totalmente en la estufa, se somete a análisis y es fermentado con bacterias celulolíticas del género *Cellulomonas*, las cuales eran inoculadas previamente en cuñas de CMC durante 48 horas. El medio donde se desarrolla la fermentación es el M-9 compuesto de sales de amonio, fósforo, potasio, magnesio, vitamina B<sub>1</sub>, al cual se le añade el meollo pretratado. El crecimiento fue seguido mediante lecturas de densidad óptica a 660 nm.

En algunas experiencias se le determinó al meollo su contenido de hemi-celulosas mediante la técnica espectrofotométrica de Jones (1961) y celulosa por la técnica gravimétrica de Crampton y Mainard (1938).

La cristalinidad se determinó haciendo uso del método de Segal y Creely (1959) que consiste en medir la intensidad del pico a los 11,2° y la intensidad del fondo a los 9° del difractograma de Rayos X, y aplicar la fórmula:

$$C_I = \frac{I_{\text{pico}} - I_{\text{fondo}}}{I_{\text{pico}}} \times 100$$

donde C<sub>I</sub> es la cristalinidad por el método de Segal y Creely.

También se determinó por su segundo método, desarrollado por Szabó, (1971) y adaptado por López Planes, (1975) que consiste en calcular las

áreas de pico y de fondo mediante integrales aproximadas y determinar la llamada intensidad integral.

$$I = I_1 - I_2$$

donde

$$I_1 = \frac{L}{n_1} \sum_{i=1}^n h_{i_1} = \text{área del pico}$$

$$I_2 = \frac{L}{n_2} \sum_{i=1}^n h_{i_2} = \text{área del fondo}$$

L: intervalo en grados para las mediciones de alturas en el difractograma.

$h_{i_1}$ : altura medida bajo el pico con respecto a la línea base

$h_{i_2}$ : altura medida bajo el fondo a ambos lados del pico de forma simétrica.

La cristalinidad por este método se calcula mediante:

$$C_{II} = \frac{I}{I_1} \times 100 = \frac{I_1 - I_2}{I_1} \times 100$$

Este último método, aunque más complejo, nos había dado una varianza experimental menor, por lo que decidimos aplicarlo para comparar sus resultados con el método de Segal y Creely (*López Planes, 1975*).

## RESULTADOS

### *Pretratamiento a altas temperaturas.*

*Resultados de la cristalinidad.* Después de realizados los pretratamientos del material se tomaron 0,45 g de meollo para fabricar las pastillas, con las cuales se obtuvieron los difractogramas. Para cada corrida sólo fue posible realizar un difragrograma a partir de los cuales se determinaron las dos cristalinidades  $C_1$  y  $C_2$ . Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla I, para las 8 experiencias del primer plan factorial.

De los valores de cristalinidad podemos observar que el método de Segal y Creely da mayores % y por su sencillez resulta más adecuado para discriminar entre distintos tratamientos.

TABLA I  
*Resultados de la cristalinidad*

Experiencia	C <sub>I</sub>	C <sub>II</sub>
1-1	55,3	44,2
1-2	47,7	37,8
1-3	41,7	31,3
1-4	43,2	40,1
1-5	53,2	45,7
1-6	46,6	39,4
1-7	50	35,9
1-8	47,4	40,4

La cristalinidad menor se obtuvo en la experiencia 1-3 mientras que la mayor fue en 1-5, teniendo en cuenta los dos métodos de cálculo. Como veremos posteriormente la experiencia 1-3 fue la tercera corrida en el orden de mayores velocidades de crecimiento, aunque la 1-1 y la 1-5 mostraron muy buenos crecimientos, mientras que la 1-4 no creció apreciablemente. Esto corrobora el hecho visto por nosotros anteriormente de que la cristalinidad por si sola no permite explicar el crecimiento bacteriano sobre el material pretratado (*López, 1975*).

Mediante el sistema matricial antes visto se procedió a determinar los coeficientes del polinomio, obteniéndose:

$$C_I = 48,1 - 1,9X_1 - 2,6X_2 + 1,16X_3 - 0,6X_4 - 0,4X_1X_3 + \\ + 1,96 X_1X_4 + 1,6X_3X_4$$

$$C_{II} = 39,4 + 0,08X_1 - 2,4X_2 + 1,0X_3 - 0,5X_4 - 0,5X_1X_3 + \\ + 0,2X_1X_4 + 4,5X_3X_4$$

De nuestros trabajos anteriores disponemos de la varianza del error puro para C<sub>I</sub>, S<sup>2</sup><sub>C<sub>I</sub></sub> = 7,1 y para C<sub>II</sub>, S<sub>C<sub>II</sub></sub> = 1,6 (*López Planes, 1975*).

Con estos valores es posible analizar los coeficientes significativos de cada polinomio, pues

$$S_{b_0}^2 = S_{b_1}^2 = \dots = S_{b_{12}}^2 = (1/8) S_{C_I}^2$$

de donde el intervalo de 95% de confianza de cada coeficiente vendrá dado por:

$$2S_{b_0} = 2S_{b_1} = \dots = 1,9$$

despreciando los coeficientes no significativos el polinomio quedará:

$$C_I = 48,1 - 1,9X_1 - 2,6X_2 - 1,96X_1X_4$$

De igual forma para  $C_{II}$ ,  $2S_{b_0} = 2S_{b_1} = 0,9$ , de donde:

$$C_{II} = 39,4 - 2,4X_2 + 1,0X_3 + 4,5X_3X_4$$

De acuerdo con estos resultados para disminuir la cristalinidad es conveniente aumentar la concentración de sosa y el flujo de aire, lo que concuerda con lo esperado. El efecto de la temperatura en ambos polinomios ha dado muy cercano al rango del error, al igual que el efecto de la concentración de sosa. En ambos casos aparecen interacciones significativas pero no es factible dar una explicación detallada debido a que se ha usado un plan fraccionario y estas interacciones aparecen confundidas, por ejemplo:  $X_1X_4$  con  $X_2X_3$  y  $X_3X_4$  con  $X_1X_2$ .

*Recuperación del material después del pretratamiento.* Cada corrida de pretratamiento se comenzó con 30 g de meollo húmedo, cuya humedad es de 13%, por tanto teníamos al inicio 26,1 g de meollo seco. La composición inicial del meollo era de 23,8% de hemicelulosas, determinadas como pentosas, y de 40,1% de celulosa.

Después de terminado el pretratamiento se secó y pesó el material residual obteniéndose los resultados que aparecen en la Tabla II.

Como se observa la recuperación es muy baja no llegándose nunca a un 50% del material recuperado, lo cual es, sin duda alguna una gran desventaja económica del tratamiento.

TABLA II

*Recuperación de meollo en el pretratamiento.*

Experiencia	% de recuperación
1-1	48,5
1-2	40,8
1-3	47,7
1-4	34,6
1-5	22,4
1-6	43,5
1-7	40,0
1-8	30,0

En este caso el vector de coeficientes obtenidos produce el polinomio siguiente:

$$\%R = 37,2 + 0,04X_1 + 0,9X_2 - 5,7X_3 - 4,5X_4 + \\ + 5,2X_1X_3 + 2,6X_1X_4 - 5,8X_3X_4$$

De aquí se desprende que para aumentar el % de recuperación deben disminuirse la temperatura ( $X_3$ ) y el tiempo ( $X_4$ ) como indican los signos negativos de sus coeficientes. Además, también deben disminuirse la concentración de sosa y el flujo de aire, de manera que los términos sexto y séptimo del polinomio aumenten.

Obsérvese que los efectos de los términos de  $X_1$  y  $X_2$  son despreciables debido al bajo valor de los coeficientes en comparación con los demás. En resumen el % de recuperación disminuye, como es lógico, mientras más enérgico es el tratamiento, por lo que el modelo nos sugiere emplear parámetros de operación menos severos.

*El proceso de fermentación.* La fermentación se llevó a cabo en erlenmeyers con tubos laterales soldados para facilitar la lectura de la densidad óptica. La temperatura fue controlada a 30-31°C y la zaranda tenía una velocidad de 100 golpes por minuto.

Hemos fijado la atención en tres aspectos fundamentales:

- La velocidad específica en la fase logarítmica.
- La densidad óptica del medio al final del proceso, al cabo de 50 horas.
- El porcentaje de material seco residual al final de la fermentación.

*Velocidad específica de crecimiento.* En las Figs. 1, 2, 3 y 4 se muestran los valores de densidad óptica (D.O.) contra el tiempo en un diagrama semilogarítmico. De estos gráficos se obtuvieron los valores de pendientes máximas en la fase log. En la Tabla III aparecen estos valores para dos experiencias en cada caso y en la última columna el correspondiente promedio con el que se calculan los coeficientes.

TABLA III

Experiencia	A	B	$M_{\log}$
1-1	0,085	0,105	0,095
1-2	0,059	0,045	0,052
1-3	0,074	0,068	0,071
1-4	—	—	—
1-5	—	0,061	0,061
1-6	0,044	0,064	0,054
1-7	0,047	0,040	0,044
1-8	0,081	0,078	0,080

La muestra 1-4 no creció por lo que su velocidad específica se considerará igual a 0.

La corrida donde se obtuvo mayor velocidad de crecimiento fue la 1-1 la cual también produjo el mayor valor de D.O. a las 50 horas. Conviene destacar aquí que esta corrida es la que ofreció mayor % de recuperación de material después del tratamiento y que como se observa en la matriz D, es la corrida menos energética del plan factorial, pues en ella los parámetros estudiados poseen todos sus menores valores. Basándose fundamentalmente en estos criterios es por lo que entendemos que el pretratamiento debe ser menos energético.

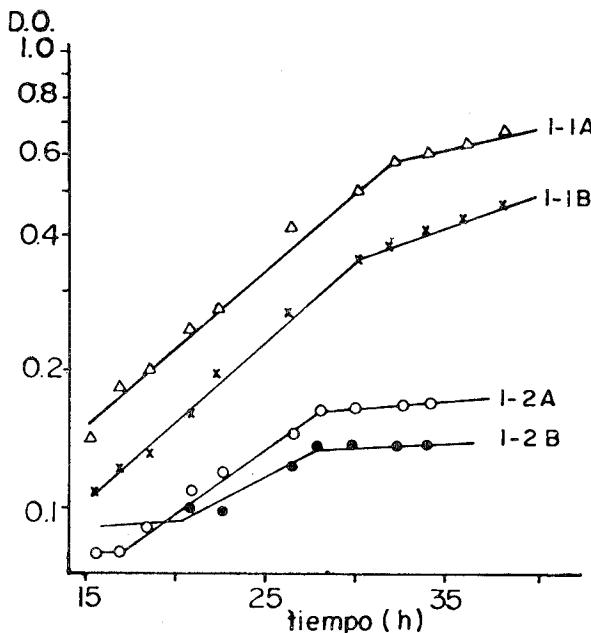


Fig. 1. Crecimiento bacteriano sobre meollo pretratado a altas temperaturas.

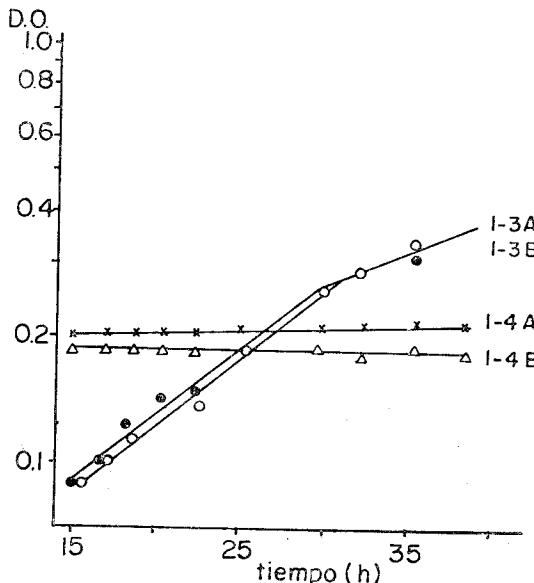


Fig. 2. Crecimiento bacteriano sobre meollo pretratado a altas temperaturas.

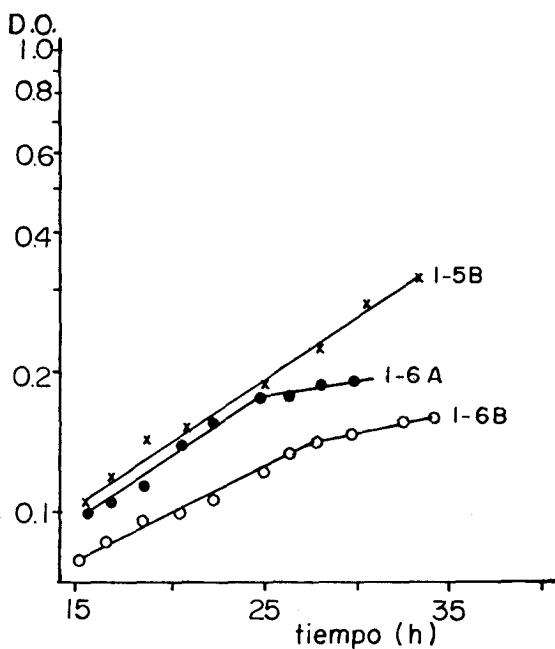


Fig. 3. Crecimiento bacteriano sobre meollo pretratado a altas temperaturas.

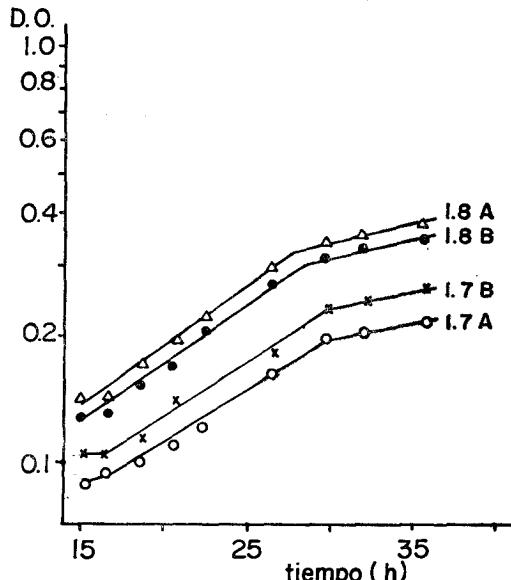


Fig. 4. Crecimiento bacteriano sobre meollo pretratado a altas temperaturas.

*Densidad óptica a las 50 horas. (D.O.)* Si bien este parámetro depende del inóculo, el cual no es totalmente uniforme, no es menos cierto que da una medida del crecimiento obtenido. La normalización de la D.O. hubiese minimizado esta causa de error pero tratándose de un estudio comparativo preferimos no considerarlo, analizando solamente las direcciones en que aumenta la D.O.

Los valores promedios de D.O. a las 50 horas constituyen el vector de resultados, el cual aparece en la Tabla IV. Los coeficientes de esta variable aparecen a continuación:

$$\begin{aligned} \text{D.O.} = & 0.533 - 0.091X_1 + 0.033X_2 + 0.03X_3 + 0.019X_4 + \\ & + 0.13X_1X_3 + 0.069X_1X_4 + 0.066X_3X_4 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que en este caso la desviación standard fue de:

$$S_{pe} = 0.040, \text{ entonces } S^2_{b_0} = S^2_{b_1} \dots = S^2_{b_{34}} = \frac{S^2}{8} = 0.0002$$

$$2S_{b_0} = 2S_{b_1} = \dots = 2S_{b_{34}} = 0.0283 = 0.03$$

De forma tal que se tiene el polinomio siguiente:

$$\text{D.O.}_{50} = 0.533 - 0.091X_1 + 0.033X_2 + 0.13X_1X_3 + 0.069X_1X_4 + 0.066X_3X_4$$

TABLA IV

Corrida	A	B	D.O. <sub>50</sub>
1-1	0.75	0.87	0.81
1-2	0.27	0.27	0.27
1-3	0.66	0.63	0.65
1-4	0.26	0.32	0.29
1-5	—	0.51	0.51
1-6	0.33	0.49	0.41
1-7	0.44	0.65	0.55
1-8	0.82	0.75	0.79

De acuerdo con este conviene disminuir la concentración de sosa ( $X_1$ ) y la temperatura ( $X_3$ ), aumentar el flujo de aire ( $X_2$ ) y disminuir el tiempo de tratamiento ( $X_4$ ). Se debe observar que  $X_2$  está muy cercano al rango del error experimental. De nuevo el valor alto de los coeficientes de las interacciones hace sospechar que el modelo cuadrático se adapta mejor. Aunque no hemos analizado las variables confundidas, el hecho de que  $X_2$  y  $X_4$  tengan poco peso nos hace sospechar que las interacciones con  $X_2$  no sean significativas.

Como se observa la corrida 1-1 fue la de mayor D.O. a las 50 horas, mientras que la 1-4 casi no creció.

*Meollo residual después de la fermentación.* Estos datos aparecen en la Tabla V. De esta hay varios aspectos que merecen ser destacados.

TABLA V

Corrida	% de meollo residual después de fermentado
1-1	22.2
1-2	46.8
1-3	37.1
1-4	no se obtuvo
1-5	19.9
1-6	50.5
1-7	no se obtuvo
1-8	27.8

En primer lugar debe destacarse que en la corrida 1-1 donde hubo mayor velocidad de crecimiento y densidad óptica a las 50 horas, fue una de las que más meollo consumió cosa que concuerda perfectamente. Además, que en las dos corridas donde mayor % de meollo se consumió (menos residuo) la 1-1 y la 1-5, la concentración de sosa era de 6% mientras que en las dos corridas, donde menos se consumió, la 1-2 y la 1-6, la concentración era de 10%.

*Pretratamiento a bajas temperaturas.* Como consecuencia de estos resultados se realizaron una serie de experiencias preliminares para determinar si un tratamiento menos enérgico podría dar mejores resultados, por lo que se realizó otro plan factorial 2<sup>3</sup> considerando las mismas concentraciones de sosa pero menores temperaturas (90 y 100°C), tiempos de 60 y 120 minutos, pero sin pasar aire. (Tabla VI).

Se partió de 22.3 gramos de meollo seco. Se puede observar que la perdida en peso seco es del orden de 14 a 27% pero es importante observar que el % de cenizas es muy alto, en algunos casos cerca de la mitad del peso. Por lo que para los efectos de la recuperación del material fermentable es necesario considerar que el material inicial tenía:  $(23.8 + 40.0) / 22.3 = 14.85$  gramos de polisacáridos teóricos y con esto conocida la composición de celulosa y hemicelulosa en el material residual, determinar el % de polisacáridos residuales.

Como se aprecia en la tabla, en los 3 casos en que se efectuaron todos los análisis, el % de recuperación de polisacáridos es bajo del orden 70 al 83%. Este 20 al 30% de polisacáridos que pasan a solución corresponde a las hemicelulosas y celulosas más degradables lo cual es una de las desventajas fundamentales de este proceso.

En las Figs. 5, 6, 7 y 8 se muestran los crecimientos de la bacteria celulolítica sobre los meollos sometidos a los distintos tratamientos del plan factorial 2<sup>3</sup>. Se observaron velocidades de crecimiento grandes, así como las dos etapas de crecimiento exponencial correspondiente al crecimiento diáuxico.

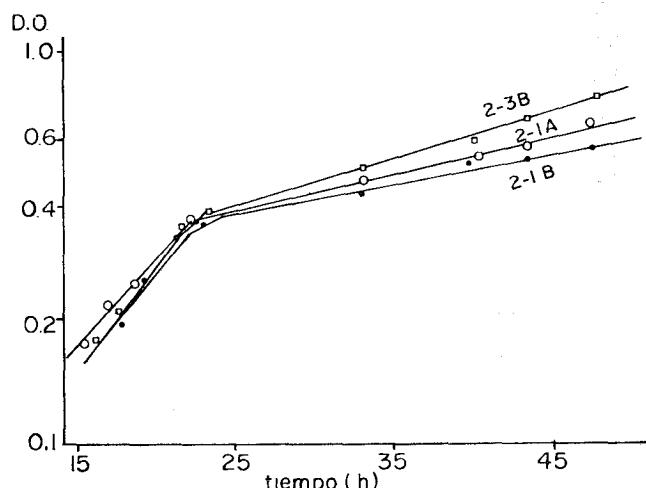


Fig. 5. Fermentación bacteriana de meollo pretratado a bajas temperaturas.

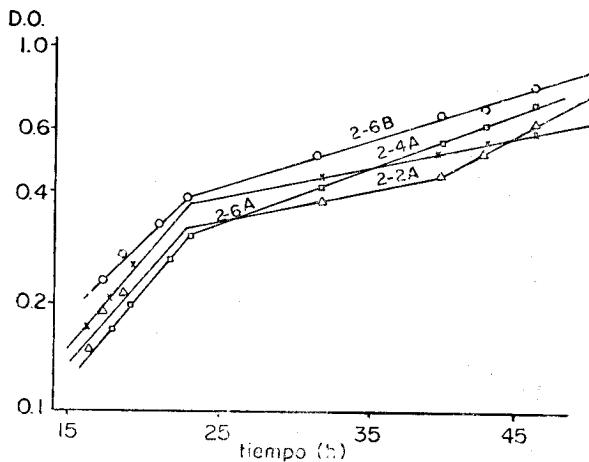


Fig. 6. Fermentación bacteriana de meollo pretratado a bajas temperaturas.

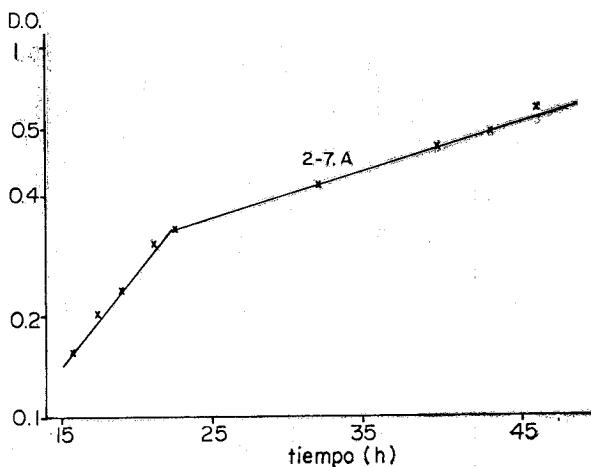


Fig. 7. Fermentación bacteriana de meollo pretratado a bajas temperaturas.

TABLA VI

Muestras	Condiciones del tratamiento	Sólido residual	Celulosa g. meollo residual	Hemicelulosa g. meollo residual	Ceniza g.m.r.	% Polisacáridos recuperados
2-1	6% 90°C 60 minutos	91.5	37.2	13.3	42.7	83
2-2	10% 90°C 60 minutos	71.7				
2-3	6% 100°C 60 minutos	89.2				
2-4	10% 100°C 60 minutos	84.8				
2-5	6% 90°C 120 minutos	83.7	49.6	18.2	36.3	79.3
2-6	10% 90°C 120 minutos	72.8	48.8	16.9		
			38.7	13	35.2	70.8
2-7	6% 100°C 120 minutos		74.5			
2-8	10% 100°C 120 minutos		74.5			
			39.3			

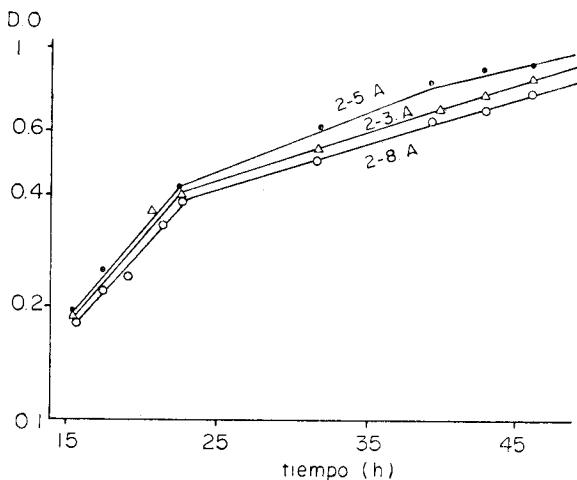


Fig. 8. Fermentación bacteriana de meollo pretratado a bajas temperaturas.

La Tabla VII muestra las velocidades específicas de crecimiento en las dos etapas de crecimiento  $M_{m1}$  y  $M_{m2}$  así como las densidades ópticas alcanzadas a las 67 horas.

Con estos valores se procedió a calcular el polinomio mediante las matrices de regresión obteniéndose para  $M_{m1}$

$$M_{m1} = 0.114 - 0.00163X_1 + 0.009125X_2 - 0.01088X_3 - 0.00066X_1X_2 - \\ - 0.000125X_1X_3 - 0.00288X_1X_2 - 0.000125X_1X_2X_3$$

Considerando las repeticiones se obtuvo una varianza experimental

$$S^2_{m1} = 1.845 \times 10^{-4}$$

de donde  $S^2_{b_0} = S^2_{b_1} = \dots = (1/8) S^2_{m1} = 23 \times 10^{-6}$

$$\text{y } 2S_{b_0} = 2S_{b_1} = \dots = 2S_{b_{123}} = 9.6 \times 10^{-3}$$

de donde despreciando los coeficientes no significativos se obtiene

$$M_{m1} = 0.114 - 0.011X_3$$

TABLA VII

Experiencia	$M_{m1}$	Promedio	$M_{m2}$	Promedio	D.O. (67 horas)
2-1	0.116 0.099	0.108	0.046 0.04	0.043	0.6 - 0.77
2-2	0.118		0.046		0.84
2-3	0.153 0.13	0.145	0.039 0.034	0.036	1.0
2-4	0.129		0.028		1.0
2-5	0.092		0.02		1.0
2-6	0.094 0.111	0.102	0.032 0.044	0.038	1.0
2-7	0.118		0.043		1.0
2-8	0.101		0.028		0.87

Es oportuno señalar que este valor del coeficiente  $b_3$  está muy cercano al intervalo de 95% de confianza pues  $2S_{b_3} = 0.01$  y su efecto podría deberse a errores experimentales. El signo negativo del coeficiente indica que conviene disminuir el tiempo del tratamiento aunque si inspeccionamos el polinomio anterior sin despreciar los coeficientes, vemos que el próximo coeficiente en magnitud es el de  $X_2 (b_2 = 0.009)$  que aunque dentro del rango del error, indica aumentar temperatura. Una explicación alternativa es que ningún coeficiente es significativo a excepción del coeficiente  $b_0 = 0.114$ , este valor, no obstante, indica una velocidad de crecimiento  $M_{m1}$  aceptable y mejor que las obtenidas con tratamientos más energéticos.

Para la segunda velocidad se obtuvo:

$$M_{m2} = 0.0353 - 0.0025X_1 - 0.0015X_2 - 0.003X_3 - 0.0055X_1X_2 + \\ + 0.001X_1X_3 + 0.00475X_2X_3 - 0.00275X_1X_2X_3$$

y con las repeticiones  $S^2_{m2} = 34.2 \times 10^{-6}$

$$2S_{b_0} = 2S_{b_1} = \dots = 2S_{b_{123}} = 0.00414$$

donde el polinomio quedará:

$$M_{m2} = 0.0353 - 0.0055X_1X_2 + 0.00475X_2X_3$$

El hecho de que los coeficientes de las interacciones nos hayan dado significativas, podrá indicar que nos encontramos en una zona donde la respuesta tenga curvatura o el modelo lineal no sea aplicable. El análisis de las variables es un poco más complejo, indicándonos que resulta recomendable disminuir la concentración de sosa ( $X_1$ ) y aumentar la temperatura ( $X_2$ ) así como aumentar el tiempo ( $X_3$ ) para aumentar  $M_{m2}$  lo cual lógicamente es aceptable pues esta velocidad representa el crecimiento sobre el material de estructura cristalina más difícil de degradar y el más protegido por la lignina.

De nuevo los coeficientes  $b_{12}$  y  $b_{23}$  están cerca de sus errores experimentales ( $2S_{b_{12}} = 2S_{b_{23}} = 0.004$ ) y una explicación alternativa podría ser que sólo  $b_0 = 0.035$  sea significativo.

Los valores mayores de  $M_{m2}$  son aceptables en comparación con los obtenidos en el crecimiento sobre meollo pretratado a altas temperaturas por lo que de nuevo es recomendable un tratamiento con sosa menos enérgico en el caso del meollo.

## CONCLUSIONES

El pretratamiento alcalino del meollo facilita su biodegradabilidad mediante bacterias celulolíticas.

El análisis de los coeficientes significativos de los polinomios adaptados mediante diseño estadístico a las experiencias de altas temperaturas señalaron que es conveniente la disminución de la temperatura, flujo de aire y demás parámetros para obtener mejores rendimientos de sólidos residuales, mejores velocidades de crecimiento y mayores densidades ópticas finales y un menor porcentaje residual de meollo después de fermentado. Las experiencias efectuadas a 90 y 100°C fueron las que señalaron mayores velocidades de crecimiento y valores aceptables de densidad óptica a las 67 horas. No obstante estos tratamientos alcalinos producen pérdidas de polisacáridos fermentables del orden del 20 al 30% de los polisacáridos potenciales. En el caso del pretratamiento alcalino

a bajas temperaturas se han obtenido velocidades de crecimiento de  $0.145 \text{ hr}^{-1}$  para la primera etapa del crecimiento diáxico y de 0,04 para la segunda etapa, valores muy buenos para la fermentación con bacterias celulolíticas en zaranda, señalando esto las buenas características del meollo, como materia prima para la obtención de proteína de consumo animal.

La explicación más aceptable de la mayor recuperación de sólido residual en el pretratamiento alcalino menos enérgico y velocidades específicas de crecimiento aceptables, es basándose en una menor destrucción de las hemicelulosas y celulosas amorfas, que en el caso del meollo constituyen una parte considerable del material, debido a su naturaleza parenquimatosa, además estas hemicelulosas y celulosas amorfas son fácilmente fermentables por las bacterias celulolíticas usadas.

## RECONOCIMIENTOS

Deseamos agradecer la cooperación prestada por los compañeros del Dpto. de Rayos X del CENIC, así como la ayuda brindada por los compañeros técnicos Lucía Román, Nancy Ravelo, Isolina Argüelles, Regla Ma. Rodríguez y Ana Ibis J. del Dpto. de Fermentaciones, así como los compañeros alumnos de la Esc. de Ing. Química Angel Gutiérrez y Nilda Hernández.

## REFERENCIAS

- BACON D. AND HENSON T. Statistical Design and Model Building. Queen's University. Ontario, Canada, 1971.
- CALLIHAN C. D. AND DUNLAP CH. E. Report SW — 24C. US. Env. Protection. Ag. 1971.
- CRAMPTON E. W. AND MAINARD L. A. *J. Nutrition* 15, 383, 1938.
- DUNLAP CH. E. Ph. D. Dissertation. Louisiana State Univ. Jan. 1969.
- DUNLAP CH. E AND CALLIHAN C. D. EPA — 670/2 — 73 — 02; PB — 221096 U.S. Env. Protection Agency 1973.
- ENRÍQUEZ MOURIZ A. IV Seminario Científico del CENIC. Habana. Dic. 1973.
- HAN Y. W. AND SRINIVASAN V. R. Adv. in Chemistry. Series 95, 1969.
- JONES H. L. *TAPPI* 44, 10, 1961.
- LEY F., ORTEGA O. Y VILLEGAS R. III Seminario Científico del CENIC. Habana, Dic. 1971.

- LÓPEZ PLANES R. Y LÓPEZ I. IV Seminario Científico del CENIC. Habana. Dic. 1973.
- LÓPEZ PLANES R. Simposio Aprovechamiento Industrial del Bagazo. V Seminario Científico del CENIC. Habana. Oct., 1975.
- LÓPEZ PLANES R. Tesis de Candidatura Dr. Sc. CENIC Univ. de la Habana. Oct., 1975.
- OSMAN H. G., BELL A., CASADO C. Y QUINTANA M. Simposio 10 años del ICIDCA. Habana Sept., 1973.
- SEGAL L., CREELY J. J., MARTIN A. E. AND CONRAD C. M. *Text. Research J.* 29, 786, 1959.
- SZABÓ P. *Rev. CENIC. Ciencias Físicas* 3, 129, 1971.