

**TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DEL BAGAZO DE CAÑA PANELERA EN
AZÚCARES FERMENTABLES UTILES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

**FRANK CARLOS VARGAS TANGUA
WILLIAM GUERRERO SALAZAR**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2010**

**TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DEL BAGAZO DE CAÑA PANELERA EN
AZÚCARES FERMENTABLES UTILES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

**FRANK CARLOS VARGAS TANGUA
WILLIAM GUERRERO SALAZAR**

Monografía para optar al título de especialista en química ambiental

**DIRECTORA: GRACIELA CHALELA ALVAREZ
Bacterióloga Msc. Dr. rer. nat.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2010**

DEDICATORIA

A Dios por su amor incondicional
A María de Soracá, Señora de la Esperanza
A mis padres: Germán y Carmencita
A mis hermanos: Germán, Sonia Isabel, Gloria Patricia, Sergio Iván y Nelson Fernando
A mi esposa: Andrea Jackeline
A mis hijos: Sara Catalina y Sergio Alejandro
A mis sobrinos: Camilo, María Paula, Nicolás, Sebastián y Hugo.
A mis tías: Elsa, Edilia e Isabel
A mis tíos: José Antonio y Gilma
A mis suegros: Alberto y Efigenia
A mi gran amigo: Horacio bigotes del Carmen
A Faustino

A todos ellos por su apoyo, paciencia y amor incondicional

FRANK CARLOS VARGAS TANGUA

A Dios por darme la fuerza, voluntad y sabiduría por permitirme alcanzar una meta más en mi vida.
A mis padres, y hermanos por brindarme su apoyo y su cariño.
A mi esposa, que con su silencio, paciencia y tolerancia permitió que pudiera concluir este proyecto. Gracias amor por regalarme este tiempo tan valioso para ti.

WILLIAM GUERRERO SALAZAR

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander.

A la Doctora YAHAIRA COMBARIZZA Directora de la Especialización en Química Ambiental de la UIS.

Al Ingeniero JAIRO PUENTE BRUGES, inspirador de ésta investigación.

A la Directora del Proyecto, Doctora GRACIELA CHALELA ALVAREZ por su invaluable orientación y apoyo científico y humano.

Al centro de Investigaciones CEIAM de la UIS, en especial a su Directora científica JANETH QUINTERO LÓPEZ.

A la Fundación Universitaria de San Gil UNISANGIL, por su apoyo financiero, y técnico y por el respaldo incondicional a los autores.

A María Del Pilar Velazco por toda su colaboración en el laboratorio CYMBIA de la UNAB.

A los estudiantes de MICROBIOLOGÍA de la FACULTAD DE CIENCIAS NATUARLES E INGENIERÍA de UNISANGIL por su dedicación y apoyo.

A RAFAEL ANTONIO ESTUPIÑAN, por su gran colaboración en el laboratorio de química de UNISANGIL.

A OLITH ANTONIO ARDILA, por su gran ayuda en el tema estadístico.

Al PADRE ARIEL y al PADRE GILBERTO por su apoyo moral y espiritual.

A todos muchas gracias, por su apoyo fue posible el feliz término de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1. ENTORNO DE LOS BIOCOMBUSTIBLES	18
1.1 BIOETANOL ACUERDOS Y NORMAS	21
1.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	22
1.2.1 Aspectos sociopolíticos	22
1.2.2 Disponibilidad de sustratos	23
1.3 FUENTES DE BIOMASA PARA LA FERMENTACIÓN	24
1.3.1 Biomasa forestal	25
1.3.2 Biomasa Agrícola	26
1.3.3 Basados en materiales lignocelulósicos	29
1.4 PRODUCTOS POTENCIALES A BASE DE LIGNINA	31
1.5 PRODUCCIÓN DE PANELA Y GENERACIÓN DE BAGAZO	32
1.5.1 Características físico – químicas del bagazo	33
1.6 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	35
1.6.1 Estructura y composición de la biomasa celulósica	36
1.7 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES	38
1.7.1 Sacarificación y fermentación simultanea (SSF)	39
1.7.2 Co-fermentación de azúcares C ₆ hexosas y C ₅ pentosas	39
1.7.3 Bioproceso consolidado	40
1.7.4 Conversión química de los azúcares y productos de fermentación	40

1.7.5	Conversión bioquímica de los azúcares y productos de fermentación	41
1.8	FRACCIONAMIENTO Y PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA	41
1.8.1	Fraccionamiento de los componentes de la biomasa	41
1.8.2	Pretratamiento de las fracciones de biomasa	42
1.8.3	Procesado de las fracciones de biomasa y de sus productos intermedios	44
1.8.3.1	Hidrólisis enzimática del almidón	44
1.8.3.2	Hidrólisis química de la celulosa	44
1.8.3.3	Hidrólisis enzimática de la celulosa	45
1.8.3.4	Despolimerización de la lignina	46
1.8.4	Pretratamiento del material lignocelulósico	47
1.8.4.1	Pretratamientos físicos	47
1.8.4.2	Pretratamientos físico – químicos	48
1.8.4.3	Pretratamientos químicos	49
1.8.4.4	Pretratamientos biológicos	50
1.9	SISTEMA CELULOSA	51
1.9.1	Sistema celulosa complejo	52
1.9.2	Hidrólisis enzimática de material lignocelulósico	53
1.10	MICROBIOLOGÍA DE LA TRANSFORMACIÓN DE RESIDUOS CELULÓSICOS EN AZÚCARES FERMENTABLES	54
1.10.1	Consortios microbianos	55
1.10.2	Fisiología de microorganismos celulolíticos	56
1.10.3	Medios de cultivos utilizados en el aislamiento de microorganismos	61
1.10.3.1	Componentes de los medios de cultivos microbianos	62
1.10.4	Medio de Fermentación en Estado Sólido	63
2.	METODOLOGÍA	64

2.1	FASE 1. ORGANIZACIÓN DE RECURSOS E INICIO DE ACTIVIDADES	64
2.2	FASE 2. PRE – OPERATIVA	64
2.3	FASE 3. OPERATIVA	65
2.4	FASE 4. VALIDACIÓN TÉCNICA	66
2.5	FASE 5. SOCIALIZACIÓN Y DIVULGACIÓN	66
3.	RESULTADOS PREVIOS AL PRETRATAMIENTO	68
3.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	68
3.2.1	Cultivo y selección de microorganismos	68
3.2.2	Resultados del proceso con Bacterias	72
3.2.3	Resultados del proceso con Hongos filamentosos	76
3.3	Resultados del análisis físico – químico del bagazo posterior al Pre-tratamiento biológico	81
4.	CONCLUSIONES	82
	BIBLIOGRAFÍA	87
	ANEXOS	94

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Clasificación de la Biomasa Vegetal	24
Cuadro 2. Análisis inmediato (% base seca.)	33
Cuadro 3. Análisis elemental (% base seca.)	33
Cuadro 4. Análisis sólidos (% base seca.)	34
Cuadro 5. Análisis celulosa (% base seca.)	36
Cuadro 6. Resultados del análisis físico – químico del bagazo previo al Pretratamiento biológico	68
Cuadro 7. Caracterización macroscópica bacteriana.	69
Cuadro 8. Caracterización macroscópica de los hongos filamentosos.	70
Cuadro 9. Registro fotográfico y principales características de los hongos Cultivados y seleccionados.	71
Cuadro 10. Conteo de cepas bacterianas aisladas del bagazo de caña panelera.	73
Cuadro 11. Análisis de varianza cepas de bacterias.	73
Cuadro 12. Cepas Bacterianas Elegidas para Prueba de compatibilidad.	74
Cuadro 13. Prueba de Compatibilidad cepas bacterianas para trabajar en consorcio.	75
Cuadro 14. Molish, Fehling, Seliwanoff, Multistix en soluciones o extractos provenientes de los medios de cultivo en FES para las cepas bacterianas 4.1 y 7.1	75
Cuadro 15. Conteos de esporas para las cepas de hongos filamentosos.	76
Cuadro 16. Análisis de varianza cepas de hongos filamentosos a 27°C y a 37°C.	78
Cuadro 17. Test de rango múltiple.	79
Cuadro 18. Prueba de Compatibilidad para Hongos Filamentosos.	79
Cuadro 19. Prueba de Molish, Fehling cualitativo, Seliwanoff y Multistix G10 aplicadas medios de cultivo en FES para los Hongos Filamentosos 3:1, 3:4 y 3:7.	81
Cuadro 20. Resultados del análisis físico – químico del bagazo posterior al Pretratamiento biológico.	81
Cuadro 21 Comparativo de la Eficiencia del Proceso	83

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructuras químicas de las principales subunidades constituyentes de las ligninas.	30
Figura 2. Principales características estructurales de las ligninas.	30
Figura 3. Esquema de Una familia de Productos Basados en la Lignina.	31
Figura 4. Proceso metodológico.	67
Figura 5. Registro fotográfico de los cultivos de bacterias para caracterización macroscópica.	69
Figura 6. Registro fotográfico de cultivos de hongos filamentosos para caracterización macroscópica.	70
Figura 7. Cepas bacterianas en UFC / ml	73
Figura 8. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas bacterianas.	75
Figura 9. Conteo de esporas a 27°C	77
Figura 10. Conteo de esporas a 37°C	77
Figura 11. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas de hongos filamentosos.	80
Figura 12. Registro fotográfico del desarrollo de los Medios de Cultivo de FES.	80
Figura 13. Registro fotográfico del lugar de almacenamiento de bagazo de caña para la toma de muestra en el trapiche.	95

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Géneros de bacterias y hongos aerobios y anaerobios para la obtención de la transformación de la celulosa.	91
ANEXO B. Materiales y métodos.	92
ANEXO C. Resultados de los Análisis Físico Químicos del Bagazo antes del Pretratamiento Microbiano.	125
ANEXO D. Resultados de los Análisis Físico Químicos del Bagazo después del Pretratamiento Microbiano.	127

TITULO: TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DEL BAGAZO DE CAÑA PANELERA EN AZÚCARES FERMENTABLES ÚTILES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL*

FRANK CARLOS VARGAS TANGUA, WILLIAM GUERRERO SALAZAR**

Palabras Claves: Pretratamiento Microbiano, Celulosa, Bagazo, Hongos Lignocelulolíticos, FES, Caña panelera.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la potencialidad del bagazo de caña panelera pretratada con microorganismos aislados y seleccionados del mismo, para la producción de azúcares fermentables útiles para la producción de etanol, se probaron once (11) diferentes cepas bacterianas y siete (7) diferentes cepas de hongos filamentosos en cuatro (4) medios de cultivos en diferentes condiciones con el fin de obtener la mayor fracción solubilizada de los componentes lignocelulósicos presentes. El bagazo se trató en un medio de Fermentación en Estado Sólido FES con un contenido de humedad del 41,83% a 37°C en consorcio, con una duración de 7 días de pretratamiento. El pretratamiento se realizó con los grupos de cepas mejor adaptadas y compatibles, teniendo como criterio las pruebas cualitativas de Molisch, Fehling y Seliwanoff y las pruebas cuantitativas para azúcares fermentables Multistix G10 con carácter selectivo y Fehling cuantitativo. Se encontró que la mejor condición para el pretratamiento es a pH de 3,2 y temperatura de 37°C, con concentraciones de inóculo mayores a $2,0 \cdot 10^6$ esporas fúngicas/ml. En estas condiciones se solubilizó el 40,36%, 52% y 99,45 % de la celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente y se generó una concentración de azúcares reductores por prueba de Multistix G10 que se encuentra en un rango entre los 500 mg/ml y 2000 mg/ml. Los datos se validaron estadísticamente con un test de varianza ANOVA y un test de separación de medias de Tukey. La producción de azúcares reductores, las condiciones del pretratamiento biológico y la alta fracción de solubles obtenidas (55,94%) convierten al bagazo de caña panelera en una biomasa con potencial para la generación de azúcares reductores y solubles.

* Trabajo de monografía para optar al título de especialista en química ambiental.

** Escuela de química, programa de especialización en química ambiental. Directora Dra. Graciela Chalela Álvarez.

TITLE: MICROBIAL TRANSFORMATION SUGARCANE BAGASSE INTO FERMENTABLE SUGARS USEFUL FOR OBTAINING BIOETHANOL

FRANK CARLOS VARGAS TANGUA, WILLIAM GUERRERO SALAZAR**

Keywords: Microbial pretreatment, pulp, bagasse, solid state fermentation, sugarcane and lignocellulolytic fungi.

ABSTRACT

Having as aim evaluate the potential of the bagasse of sugar cane pretreated with microorganisms isolated and selected of the same one for the production of fermentable sugars useful for the production of ethanol, there were proved eleven (11) different bacterial strains and seven (7) different strains of filamentous fungi in four (4) culture media in different. The bagasse treated itself in a way of solid-state fermentation with a content of dampness of 41,83 % to 37°C in consortium, with a duration of 7 days of pretreatment. The pretreatment carried out with the groups and compatible of better adapted strains, taking as a criterion the qualitative tests of Molisch, Fehling and Seliwanoff and the quantitative tests for fermentables sugars Multistix G10 with selective character and quantitative Fehling. One thought that the best condition for the pretreatment is to pH of 3.2 and temperature of 37°C, with concentrations of inoculate spores fungi major to 2×10^6 . In these conditions solubilized 40,36 %, 52% and 99,45 % of the cellulose, hemicellulose and lignin respectively and generated a reducing sugar concentration Multistix test G10 which is in a range between 500 mg/ml and 2000 mg/ml, conditions in order to obtain the major solubilized fraction of the lignocellulosic present components.

The data were statistically validated with ANOVA test and mean separation test of Tukey. The production of reducing sugars, biological pretreatment conditions and high soluble fraction obtained (55.94%) converted to sugarcane bagasse in a potential biomass for the generation of reducing and soluble sugars.

* * Chemistry School, Environmental Chemical, Especialization Program. Management. Dra. Graciela Chalela Álvarez.

INTRODUCCIÓN

Las posibilidades biotecnológicas del uso de microorganismos como transformadores de biomasa para la obtención de azúcares reductores industrialmente útiles, como alternativa a las actualmente utilizadas de carácter químico, físico o mecánico son cuantificables en especial las que se derivan de su habilidad bioquímica para utilizar vías metabólicas eficientes.

La disponibilidad de bagazo en Colombia actualmente se estima en algo más de 200 millones de ton (50% humedad) y su uso más generalizado es como combustible y más recientemente se utiliza de forma creciente para la cogeneración de energía.

Uno de los principales inconvenientes de la utilización del bagazo de caña panelera para la obtención de etanol, se relaciona con los bajos rendimientos del proceso y altos costos de producción requeridos para desarrollar la tecnología, en donde se ha demostrado que la aplicación de pretratamientos mejora notablemente la eficiencia del sistema.

Los pretratamientos que se realizan a la biomasa lignocelulósica como la del bagazo buscan reducir la cristalinidad de la misma, disociar el complejo lignina – celulosa, aumentar el área superficial y disminuir o eliminar la presencia de sustancias que interfieran, inhiban o dificulten su hidrólisis y posterior fermentación.¹

La esencia o asunto básico a tratar dentro del desarrollo del presente proyecto de grado gira en torno a la evaluación de la eficiencia de un pretratamiento biológico que emplea microorganismos propios de la caña panelera en la conversión de sus fibras en azúcares solubles útiles para la producción de bioetanol.

La consecuencia lógica de lo expuesto no puede ser otra que proponer un estudio que, sin pretender cubrir todos los vacíos de conocimiento existentes, contribuya en alguna medida a la identificación de tratamientos biológicos en el pretratamiento del bagazo de caña para la obtención de azúcares reductores.

En tal sentido, el problema de investigación radica en establecer, a lo largo del estudio, los microorganismos que sean viables en el desarrollo de un método biológico para el pretratamiento y conversión de las fibras del bagazo de caña panelera en azúcares solubles útiles para la producción de bioetanol y los procedimientos a desarrollarse para permitir dicha acción.

En términos generales la investigación se justifica al permitir establecer soluciones desde la química ambiental a las deficiencias en los procesos productivos, con el ánimo de mejorarlos y evitar efectos secundarios y nocivos sobre los recursos naturales, situación que se mantiene acorde con la filosofía de la producción más limpia y así no sólo desarrollar tecnologías encaminadas al tratamiento de vertimientos, residuos y emisiones, sino, innovar en el proceso mismo, para mitigar la generación y concentración de tales residuos.

¹ HAMELINCK et al 2005; SUN y CHENG 2002, En: PERNALETE, Zoyeris, PIÑA, Francibel et al, Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniaco: efecto de la humedad del bagazo y la carga del amoniaco, 2008, Bioagro 20(1):3-10.

Así las cosas, será preciso iniciar, para conocimiento global de quienes accedan al presente trabajo, con un breve, pero concreto marco conceptual que recoja los elementos teóricos que ayudan a definir el objeto de estudio que es principalmente la biomasa de origen vegetal como bagazo de caña panelera y ofrezca una comparación entre los diferentes métodos diferentes al biológico usados con el mismo fin, complementado con una revisión sobre los tipos de microorganismos útiles o potenciales, considerando los aspectos bioquímicos y metabólicos que permiten comprender el potencial de su uso para la producción experimental de azúcares reductores.

Es importante para la investigación, y con fines académicos, enunciar las características estructurales del bagazo de caña panelera y esbozar las variables de análisis físico – químico para medir indirectamente la actividad enzimática microbiana, así como los métodos para su medición, para que quienes nos consulten puedan asimilar este tema sin necesidad de poseer la suficiente experiencia bioquímica, pues al fin y al cabo se trata una temática de las ciencias naturales desde la óptica ambiental.

Tal vez el aspecto neural del proyecto comienza con la fase experimental que se presenta y ordena en dos aspectos trascendentales, uno de ellos se relaciona con la investigación microbiológica que se realizó para obtener los microorganismos útiles y seleccionar aquellos con mayor capacidad celulolítica revisando la posibilidad de usar consorcios, el segundo aspecto estuvo referido al análisis físico químico de la biomasa utilizada, el bagazo de caña panelera, en dos momentos, previo y posterior al pretratamiento microbiano.

Con el análisis de cifras y sus consideraciones estadísticas se valoraron los datos obtenidos durante el proceso, los que posibilitaron contar con bases sólidas que permitan formular en una segunda instancia una discusión y análisis de la eficiencia comparativa.

Experimentalmente se aportan datos que permiten relacionar la capacidad metabólica celulolítica de los grupos de microorganismos a saber: bacterias y hongos filamentosos, así como un análisis de las condiciones de operatividad que relaciona la temperatura y el pH con el crecimiento en medios de cultivos comerciales y modificados con extracto de bagazo de caña panelera.

Dentro del análisis experimental se muestra la aplicación estadística del análisis de varianza y determinación de medias de Tukey, como un esfuerzo por valorar los datos obtenidos durante el proceso

Se concluye con una discusión de los resultados que relacionan las respuestas de cada una de las pruebas experimentales de pretratamiento microbiano en condiciones similares de operación que usan hongos filamentosos y bacterias celulolíticas.

1. ENTORNO DE LOS BIOCOMBUSTIBLES

El bioetanol es un alcohol etílico deshidratado producido a partir de la fermentación de elementos de la biomasa que sean ricos en componentes azucarados, amiláceos y, lignocelulósicos.

Utilizando como oxigenante de la gasolina un 10% de etanol, en “Colombia se requerirían 1,5 millones de litros día para suplir la demanda nacional o 675 000 litros diarios de alcohol carburante para cumplir con las especificaciones legales en ciudades de más de 500 000 habitantes”².

“A escala nacional se consumen en gasolina entre las principales ciudades del país 42 457 barriles día y a nivel nacional 93 857 barriles día. Si se oxigenaran las gasolinas con el 10% de etanol se requerirían inicialmente para suplir la demanda de las principales ciudades 4 245,7 barriles día y 9 345,7 barriles día para la demanda nacional”³.

“No obstante, es necesario cubrir las ciudades del país con más de 500 000 habitantes, de ahí la estimación inicial de la creación de 3 destilerías, con capacidad de 300 000 litros día, para cubrir la demanda actual y 5 destilerías para cubrir la demanda proyectada”⁴.

Para analizar el material vegetal óptimo para la producción de alcoholes el factor más importante es el contenido de azúcares totales, que corresponde al material que es posible fermentar, de ahí la potencialidad de la caña de azúcar o caña panelera.

Adicional a ser la caña una de las materias primas más eficientes para la conversión de la energía solar en biomasa, “Colombia cuenta con una gran cultura cañera por lo que se ha decido inicialmente, producir el etanol a partir de la caña de azúcar”⁵.

En el mercado internacional se encuentran numerosos casos de países que han tenido experiencias beneficiosas a partir del etanol. En Estados Unidos el etanol se ha convertido en un importante oxigenante para la gasolina, aumentando la capacidad de las refinerías, reduciendo la polución y proporcionándole un estímulo a la población rural de Norteamérica, “El etanol a base de maíz en Estados Unidos ha permitido Incrementar el ingreso del campo en USD\$4,5 billones anualmente, Ha generado 195 200 nuevos empleos, Aumenta la generación de impuestos en USD\$450 millones, mejora en USD\$2 billones la balanza comercial, genera USD\$3,6 billones de ahorro al tesoro federal”⁶.

Igualmente exitoso es el caso de Brasil, que ha sido el país pionero en América del Sur en la producción de etanol. “Hoy, Brasil tiene la tecnología y el equipamiento capaz de mantener una producción anual de 16 000 millones de litros y exporta tecnología, equipamientos y servicios”⁷.

² Plan de negocios. Proyectos de alcoholes carburantes. http://www.agrocadenas.gov.co/biocombustibles/documentos/otros/Proyecto_alcohol_carburante.pdf. Bogotá. Colombia. Febrero 2003.

³ Ibid., p. 7.

⁴ Ibid., p. 7.

⁵ Ibid., p. 8.

⁶ Ibid., p. 9.

⁷ Ibid., p. 9.

“El programa de alcoholes en Brasil significó la creación de 250 000 empleos directos y unos 2 millones de empleos indirectos, logrando incrementos en las remuneraciones del sector agrícola y la instauración de importantes beneficios sociales para los trabajadores y sus familias”⁸.

Adicionalmente, países como “República Dominicana, Perú, Ecuador y Panamá adelantan proyectos para adoptar la mezcla de etanol como oxigenante para las gasolinas de sus respectivos países”⁹.

Al mezclarse con la gasolina el etanol permite obtener un número superior de octanos, contribuye a la reducción de la emisión de gases efecto invernadero y tóxicos, reduce la importación de combustibles como la gasolina, estimula la producción agrícola y la generación de empleo.

En relación con los estudios adelantados por agrocadenas¹⁰, específicamente en los proyectos de alcoholes carburantes, el negocio de mezclar, inicialmente, la gasolina con el 10% de alcohol etanol, beneficiaría al estado colombiano, sobre el supuesto de cinco complejos agroindustriales, en: inversión en 63 mil nuevos empleos (USD\$ 7,1 millones al año), inversión en bienestar y salud social (USD\$ 4,6 millones al año), ingresos por impuestos de los complejos industriales (USD\$11,3 millones anuales), beneficios sociales (al generar herramientas para erradicación de cultivos ilícitos y reducción de violencia), mejora en la balanza comercial al reducir importaciones (USD\$15 millones anuales), inversión de infraestructura en el campo, ingresos para la industria colombiana (como mínimo el 50% de las plantas se producirían con industria local). La cadena productiva generará un incremento del 2,5% en el producto interno agrícola, el comercio exterior se beneficiará por la exportación de 1,5 millones de barriles de gasolina que serán sustituidos por el etanol, aumento de reservas petroleras, reducción del 27% en emisiones de monóxido de carbono, (de un 20% en hidrocarburos sin quemar y de 6 millones de toneladas anuales de bióxido de carbono-CO₂). Elementos responsables de la formación de smog en las ciudades y del efecto invernadero.

Uno de los frenos más importantes al desarrollo y expansión generalizada del empleo de los biocarburantes, según el mismo estudio¹¹, ha sido su elevado costo de producción. No obstante, ello no significa que no se puedan producir mejoras, que principalmente se obtendrán a través incremento del tamaño de las plantas, la mejora y la introducción y sustitución de los cultivos tradicionales por cultivos específicos, así como de una mayor eficiencia y experiencia en el proceso.

El costo más importante es el de la materia prima agraria, por lo que no existe un único tipo de producción de etanol, sino que dependiendo de la materia prima empleada encontraremos diferentes cifras de costos.

El referente mundial en la producción de bioetanol como carburante es Brasil. “Los datos fiables disponibles por la IEA (2004) para este país arrojan un costo de 0,34\$ para un

⁸ Ibid., p. 9.

⁹ Ibid., p. 10.

¹⁰ Ibid., p. 10.

¹¹ Desarrollo agroindustrial de los combustibles en Castilla y León. PREMIO COLECCIÓN DE ESTUDIOS DEL CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE CASTILLA Y LEÓN. Edición 2006. www.cescyl.es/publicaciones/coleccion.php.

contenido energético equivalente a un litro de gasolina. Estas cifras pueden ser hoy incluso más bajas gracias a las mejoras en la tecnología productiva, la valorización de algunos subproductos, la puesta en marcha de plantas de última generación, o la mejora en la eficiencia de motores de vehículos flexibles¹².

Las estimaciones del costo de producción de bioetanol en Europa presentan importantes oscilaciones dependiendo de varios factores. “Las más importantes son el país donde se lleva a cabo la producción, el tamaño de planta, la materia prima empleada, y el origen geográfico de esta. La IEA (2004) estima unos costos para Alemania de 0,48\$ por litro (0,71\$ en coste equivalente)”¹³.

El bioetanol puede usarse como combustible para el transporte, “en porcentajes que oscilan entre el 5% para vehículos no adaptados, hasta el 85% para los denominados vehículos de carburante flexible, también llamados vehículos flexifuel, flexibles o FFV (*flexible fuel vehicles*), que pueden utilizar indistintamente gasolinas o bioetanol), o el 100% para vehículos que utilizan exclusivamente bioetanol”¹⁴.

“La creciente demanda del etanol podrá conducir los niveles de producción anual en el mundo de 35 billones de litros (US\$12 miles de millones) a 50 billones en los próximos 10 años”¹⁵.

El actual nivel de precios del petróleo ha puesto a esta producción como una alternativa más económica que los derivados del petróleo, no solamente en Brasil sino en todos aquellos países cuyos climas permiten la producción masiva a partir de caña. “En este sentido, en la India se ha producido un importante despegue en la producción y uso de este combustible donde su presencia en la formulación de las gasolinas tradicionales es obligatoria en un porcentaje del 5%”¹⁶.

El programa Brasileño del alcohol combustible existe hace más de veinte años y demostró tres ventajas evidentes en relación al uso de los derivados de petróleo. La primera está vinculada al desarrollo tecnológico y a la estrategia de suministro; la segunda, tiene relación con el desempeño de la economía y el nivel de empleo; la tercera es de carácter ambiental (ASOCIACAO, DAS Industrias de azúcar e de alcohol do estado de Sao Paulo – AIAA, 1997).

El reconocimiento y aceptación del etanol como un aditivo que oxigene los combustibles corrientemente utilizados en los automotores se ha extendido, en los últimos 5 a 6 años, más allá de los Estados Unidos y Brasil. “Es así como se han desarrollado actividades evaluativas, legislativas, económicas y de investigación en varios países de Asia, África, Europa, Latinoamérica y Australia, buscando iniciar y aumentar el uso del etanol como carburante (Shete, N., 2003)”¹⁷.

¹² Ibid., p. 12.

¹³ Ibid., p. 13.

¹⁴ Ibid., p. 13.

¹⁵ BRICEÑO, B. Carlos. ASPECTOS ESTRUCTURALES Y DE ENTORNO QUE ENMARCAN LOS PROYECTOS E INVERSIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN COLOMBIA. <http://www.cengicana.org/Portal/SubOtrasAreas/Etanol/Presentaciones/ArticuloProduccionBioetanolColombia.pdf>. Bogotá, Colombia.

¹⁶ Desarrollo agroindustrial de los combustibles en Castilla y León. Op. cit., p. 19.

¹⁷ BRICEÑO, Op. cit., p. 35.

“Los aspectos de mayor impacto en los proyectos de producción de etanol son la materia prima y su disponibilidad permanente, la tecnología utilizada (fermentación, deshidratación, concentración de efluentes, etc.), los efluentes producidos, la energía requerida, la automatización y los costos de inversión”¹⁸.

En este sentido, “los productores de etanol en cada país, deberán evaluar las nuevas oportunidades que vendrán con la demanda del producto y la competencia entre tecnologías, materias primas, tratamiento de efluentes, desarrollo de derivados y subproductos y reducción de costos de inversión, procesos y calidad”¹⁹.

1.1 BIOETANOL ACUERDOS Y NORMAS

En Colombia durante los últimos diez años se adelantaron estudios técnico – económicos y ambientales para evaluar la factibilidad de entrar en la era del bioetanol y ante el gobierno nacional y los departamentales se concretaron solicitudes sobre aspectos jurídicos y comerciales. Con el establecimiento de un programa nacional se buscó concretar oportunidades para: cultivadores de caña, maíz, yuca, sorgo, papa y remolacha, firmas de Ingeniería, constructores, instaladores, ambientalistas, transportadores, reducción efectiva de emisiones de CO₂, apertura a los biocombustibles, seguridad jurídica para inversionistas privados, legislación concreta y reglamentaciones técnica, ambiental y de precios, estímulos tributarios (IVA, impuesto global y sobretasa).

Por medio de la “Ley 788 de 2002, se exonera al alcohol carburante del pago de los impuestos actuales de la gasolina: impuesto global, impuesto al valor agregado (IVA), sobretasa (Artículos 31 y 88)”²⁰.

Sobre la fijación de las características de calidad del alcohol y las gasolinas oxigenadas y la fijación del porcentaje alcohólico mínimo del alcohol anhidro (99.5%), el “Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y el Ministerio de Minas y Energías presentaron la resolución 0447 de 2003”²¹.

Por medio de la “resolución 181710 de diciembre 23 de 2003, se fija un precio máximo y se ajusta anualmente: 70% por la variación del IPP. 30% restante, con base en la devaluación anual”²².

En la actualidad, la caña panelera se utiliza con fines de producción de alcohol carburante, en éste sentido en Colombia se aplican normas como la Ley 693 de 2001 sobre el uso de alcoholes carburantes, se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo, destacando las acciones que han de cumplirse para proteger el recurso natural y evitar los efectos negativos de la actividad, a través de programas de prevención, mitigación y compensación de impactos.

¹⁸ Ibid., p. 35.

¹⁹ Ibid., p. 36.

²⁰ Ibid., p. 36.

²¹ Ibid., p. 36.

²² Ibid., p. 37.

1.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

1.2.1 Aspectos Socio políticos. En la última década los aspectos socio ambientales han adquirido importancia, como la seguridad alimentaria y la contaminación ambiental generada por los subproductos de los procesos industriales y más recientemente de los agroindustriales.

En la mayoría de países de Latinoamérica se evidencian aumentos considerables en la demanda de productos culturalmente utilizados para la alimentación humana con fines de transformación para la obtención de combustibles, situación que ha conducido entre otras cosas a un fuerte aumento de los precios de los productos que forman parte de la canasta familiar en éstos países (trigo, soya y maíz principalmente); en este aspecto, Jacques Diouf, director general del Programa Alimentario Mundial de las Naciones Unidas, señala que: “los factores que han conducido a esta repentina subida de los precios, a saber, una bajada de la producción en los productos agrícolas debida entre otras al cambio climático, niveles de existencias o reservas sumamente bajos, un consumo más elevado de las economías emergentes como China y la India, el altísimo costo de la energía y el transporte y, sobre todo la demanda, cada vez más alta, de producción de biocombustibles”²³.

Con la oscilación en el precio del petróleo, la mayor preocupación por la seguridad energética y los efectos del calentamiento global, han ido creando las condiciones para explorar otras fuentes de energía.

En ese contexto, surge con creciente interés la posibilidad de usar productos agropecuarios como materia prima para la producción de biocombustibles. Sin embargo, el desarrollo de esta iniciativa a gran escala en los países de la región conlleva una situación de alta complejidad, en el que deben intervenir numerosas variables de orden económico, político, tecnológico, social, y principalmente las disponibilidades de suelos y cultivos con ventajas competitivas para estos fines.

En el mismo sentido, La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), subrayó que “el aumento mundial de la producción de biocombustibles amenazaba el acceso a los productos alimenticios de las poblaciones pobres del Tercer Mundo. A corto plazo, es muy probable que la expansión rápida de combustibles verdes, a nivel mundial, tenga efectos importantes en la agricultura de América Latina”²⁴.

Igualmente, se ha comprobado que “la producción de biocombustibles se hace en detrimento de los cultivos de plantas comestibles utilizando las reservas de agua, desviando tierras y capitales, lo que origina un aumento de precios de los productos alimenticios, y pondrá en peligro el acceso a los víveres a los sectores más desfavorecidos”²⁵. “Las desastrosas consecuencias sociales de esta política son

²³ THE ASSOCIATED PRESS, «La communauté internationale confrontée à une sérieuse crise alimentaire», 14 de abril de 2008.

²⁴ REUTERS, «La FAO met en garde contre les biocarburants», 15 de abril de 2008.

²⁵ Ibid., p. 41.

fácilmente previsible cuando se sabe que la inseguridad alimentaria ya afecta a 854 millones de personas”²⁶.

En relación con los informes suministrados por la FAO y La Organización Mundial del Comercio, Colombia no forma parte del grupo de países de América Latina con alto riesgo por desabastecimiento de comida.

En este sentido, y según el ministro de Agricultura y Desarrollo Rural, “el país está blindado ante la silenciosa embestida de la crisis alimentaria actual, resultante primordialmente del aumento en los precios internacionales de los últimos 16 meses: 135 por ciento del arroz, 116 por ciento del trigo, 93 por ciento de la soya y 41 por ciento del maíz”²⁷.

“El blindaje alimentario nacional se deriva de un nivel de autosuficiencia del 90 por ciento. El consumo nacional de productos agropecuarios es de 33,1 millones de toneladas. El país se abastece con 25 millones de toneladas producidas localmente y 8,1 millones de toneladas que se importan. De las importaciones totales, sobresalen 4,8 millones de ton. que no son alimentos, pues corresponden a cebada cervecera, además de maíz amarillo y preparaciones empleadas en el sustento animal por la industria de pollo y cerdo”²⁸.

En este sentido es importante destacar que dicho blindaje debe ser fortalecido, con el desarrollo e implementación de una serie de estrategias que permitan la competitividad del sector, entre las que se destaca el desarrollo de la ciencia y tecnología que permitan ser más eficientes y competitivos los sistemas productivos actuales, ya que de lo contrario el incremento de precios de las materias primas e insumos requeridos por el sector agropecuario nacional, pueden llegar a motivar en un momento dado un alza de precios significativo en los alimentos en el territorio.

1.2.2 Disponibilidad de Substratos. El maíz es la materia prima empleada más comúnmente en EE.UU. La EIA (2004) se estima un costo por litro en el entorno de 0,29\$ (costo equivalente al litro de gasolina de 0,43\$), para la producción en nuevas plantas con una capacidad en el entorno de las 200 000 toneladas al año.

En el contexto Europeo, el trigo es la principal materia prima utilizada; el maíz es la materia prima básica en los Estados Unidos (MacDonald, *et al*, 2001), mientras que es la melaza o miel de caña, la predominante en el continente sudamericano, especialmente en países como Brasil, donde se dan características óptimas para el cultivo de la caña de azúcar (Rosillo Calle y Cortez, 1996).

En áreas tropicales y subtropicales se está desarrollando para un aprovechamiento energético en la producción de bioetanol el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta*), una planta de origen tropical o subtropical que presenta elevados rendimientos. Al tratarse de cultivos poco exigentes, cabe esperar una importante expansión de los mismos en estas áreas.

²⁶ ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. L'état de l'insécurité alimentaire dans le monde 2006 (Roma: FAO, 2006), p. 8.

²⁷ ESPINOZA FENWARTH A. Colombia y la crisis de alimentos. En : Portafolio.com.co. El portal de economía y negocios. Bogotá. 2008.

²⁸ *Ibid.*, p. 12.

1.3 FUENTES DE BIOMASA PARA LA FERMENTACIÓN

Un aspecto fundamental inherente del concepto de bioproceso industrial es la utilización por parte de ésta de materias primas renovables, lo que en su conjunto se denomina biomasa. La biomasa es el resultado del crecimiento de organismos fotosintéticos, que realizan la fijación del CO₂ atmosférico en forma de compuestos orgánicos y biopolímeros a expensas de la energía solar. “Una de las características principales de la utilización de la biomasa es que, al contrario de lo que ocurre con los productos derivados de las materias primas fósiles (no renovables), presenta un balance de CO₂ neutro desde el punto de vista medioambiental”²⁹. Es decir, que la cantidad de CO₂ que se libera a la atmósfera al final del ciclo de vida de los bioproductos es idéntica a la cantidad de CO₂ previamente captada durante la formación de la biomasa.

La biomasa puede ser de origen terrestre (plantas y sus derivados) o marino (algas y microorganismos fotosintéticos). La utilización y explotación de la biomasa marina, si bien presenta un enorme potencial futuro, es en la actualidad meramente testimonial y no supone una alternativa real a la biomasa terrestre. Por ello, este capítulo se centrará exclusivamente en la biomasa vegetal terrestre, es decir, en la biomasa derivada del crecimiento de las plantas y de los materiales derivados de éstas.

Cuadro 1. Clasificación de la Biomasa Vegetal

Biomasa vegetal			
Biomasa Forestal		Biomasa agrícola	
Primaria	Madera de bosque uso específico.	Primaria	Cultivos de uso específico no alimentario.
	Madera derivada de operaciones de limpieza y mantenimiento de bosques.		Residuos primarios de cultivos alimentarios.
	Residuos derivados de la explotación maderera.		Hierbas y pastos.
Secundaria	Residuos de industrias de primera y segunda transformación de la madera.	Secundaria	Residuos de industrias agroalimentarias.
	Residuos de industrias de pasta de papel y papeleras.		Residuos de explotaciones ganaderas.
Terciaria	Residuos urbanos de madera.	Terciaria	Residuos sólidos urbanos (fracción orgánica).
	Residuos urbanos celulósicos.		Fangos de depuradoras de aguas residuales.

Fuente: Adaptado de Gateway to a More Sustainable Future.

La biomasa vegetal, según su origen, se puede clasificar en dos grandes grupos: “biomasa forestal y biomasa agrícola. Cada una de ellas, a su vez, puede ser dividida en tres subgrupos (primaria, secundaria y terciaria), de acuerdo con el punto de la cadena productiva del cual se deriva”³⁰. “La biomasa primaria corresponde a la obtenida directamente de las explotaciones forestales o agrícolas; la secundaria corresponde a los

²⁹ WHITE BIOTECHNOLOGY: “Gateway to a More Sustainable Future” EuropaBio, Bruselas, Bélgica. 2003 www.europabio.org/documents/100403/Innenseiten_final_screen.pdf.

³⁰ PERLACK, R.D., WRIGHT, L.L., TURHOLLOW, A.F., GRAHAM, R.L., STOKES, B.J. y ERBACH, D.C. “Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton supply”. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, Estados Unidos. 2005 www.feedstockreview.ornl.gov/pdf/billion_ton_vision.pdf.

residuos de biomasa que se generan en las industrias transformadoras de las materias primas primarias; y la terciaria hace referencia a los residuos urbanos, generados por la actividad humana”³¹.

1.3.1 Biomasa forestal. Aparte de los usos tradicionales de la madera como materia prima para las industrias madereras, del papel y de la pasta de papel, la biomasa forestal se utiliza fundamentalmente en la producción de bioenergía, mediante su combustión.

La biomasa forestal está constituida fundamentalmente por los materiales lignocelulósicos de naturaleza fibrosa que forman parte de la pared celular que recubre las células vegetales, en cuya composición se distinguen tres tipos de biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un polisacárido lineal constituido por unidades de glucosa (hexosa); las hemicelulosas son heteropolisacáridos constituidos por diversos monosacáridos, entre los que predomina la xilosa (pentosa); la lignina es un polímero entrecruzado constituido por unidades básicas de naturaleza variada, entre las que predominan los grupos aromáticos fenólicos.

El aprovechamiento de la biomasa forestal lignocelulósica en el ámbito de la biorrefinería requiere en primer lugar la separación de la misma en sus tres componentes básicos. A partir de aquí, cada componente debe seguir caminos separados. “La fracción de celulosa debe ser hidrolizada enzimáticamente en sus unidades básicas (glucosa), que sirvan posteriormente como sustrato para fermentaciones. La fracción de hemicelulosa puede ser tratada químicamente para producir furfural y sus derivados, o bien, al igual que la celulosa, ser hidrolizada enzimáticamente en sus monosacáridos y ser utilizada como sustrato de fermentaciones. La fracción de lignina puede ser despolimerizada para aprovechar los compuestos aromáticos o puede ser gasificada a gas de síntesis”³².

Dentro de la biomasa de origen forestal se pueden establecer los siguientes grupos:

- **Madera de bosques de uso específico.** Las explotaciones forestales están fundamentalmente dirigidas a la industria maderera y del papel y pasta de papel, por lo que éstas quedarían en principio excluidas de su utilización en bioprocesos. Sí podrían, en cambio, considerarse aquellas explotaciones cuyo destino es la producción de leña y biomasa para generación de energía. “Dentro de este grupo se incluirían los denominados cultivos forestales de rotación corta (*short rotation*), que hacen referencia al cultivo de árboles (normalmente álamos, chopos, sauces, arces) en disposiciones extremadamente densas, recolectados a intervalos de 3-4 años y regenerados a partir de los tocones, con una esperanza de supervivencia de al menos 5 rotaciones”³³.

- **Madera derivada de operaciones de limpieza y mantenimiento de montes.** “Los bosques, tanto los que tienen un uso maderero o de otra índole, como los que no son económicamente explotados (áreas protegidas o recreativas), necesitan operaciones periódicas de limpieza y mantenimiento, que mantengan su buena salud y ayuden a evitar

³¹ WRIGHT, L.L., BOUNDY, B., PERLACK, R.D., DAVIS, S. Y SAULSBURY, B. “Biomass Energy Data Book: Edition 1”. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, Estados Unidos. 2006 cta.ornl.gov/bedb/pdf/Biomass_Energy_Data_Book.pdf.

³² Ibid., p. 23.

³³ “GROWING SHORT ROTATION COPPICE”. Department of Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), Reino Unido. 2002 www.defra.gov.uk/erdp/pdfs/ecs/src-guide.pdf.

sucesos como los incendios forestales³⁴. Entre estas operaciones se pueden incluir actividades como la eliminación de árboles dañados o enfermos, el desbroce del exceso de masa vegetal y la creación de cortafuegos.

Todas estas actividades generan importantes cantidades de biomasa que podrían ser susceptibles de ser utilizadas como materia prima en bioprocesos.

- **Residuos derivados de la explotación maderera.** El aprovechamiento maderero de la masa arbórea se circunscribe a los troncos de los árboles, quedando el resto de partes la mayoría de las veces desaprovechadas y abandonadas en los mismos lugares en que se generan, a causa de su no rentabilidad. “Estos residuos, que corresponden básicamente a la biomasa perteneciente a las copas de los árboles, que incluye ramas de diversos tamaños y calibres y la masa foliar, se obtienen tras las operaciones de corta, saca y transporte a pista³⁵. Para mejorar las condiciones de transporte y obtener un producto más manejable y de granulometría homogénea, es necesario realizar tratamientos *in situ* como el astillado y la compactación.

- **Residuos de industrias de primera y segunda transformación de la madera.** “Dentro del primer grupo se incluirían los aserraderos e industrias madereras, y dentro del segundo las industrias que utilizan esos productos primarios, como la industria del mueble, de embalajes y auxiliar de la construcción. Los residuos que generan este tipo de industrias constituyen un conjunto de materiales heterogéneos tales como astillas, cortezas, serrín, recortes, cilindros, finos y otros³⁶. Su tratamiento y manejo se realiza en las mismas instalaciones donde se producen, existiendo equipos adecuados para ello.

- **Residuos de industrias de pasta de papel y papeleras.** “En la manufactura de los productos del papel, la madera es convertida en fibra utilizando diversas tecnologías químicas y mecánicas de procesado. La aplicación de la tecnología más frecuente (*Kraft pulping*) convierte aproximadamente la mitad de la madera en fibra, mientras que la otra mitad se convierte en el denominado licor negro, un subproducto que contiene la fibra de madera no utilizada (rica en lignina) y diversos productos químicos valiosos³⁷. Generalmente, estas instalaciones queman el licor negro para producir energía para alimentar parte de sus propias necesidades energéticas. Este licor negro podría utilizarse en la biorrefinería como materia prima para la obtención de productos tales como adhesivos naturales y compuestos aromáticos, y para la producción de gas de síntesis mediante tecnologías de gasificación.

- **Residuos urbanos de madera y celulósicos.** Los residuos incluidos en este apartado corresponden a los residuos sólidos urbanos de madera, tales como muebles y desechos de construcción y demolición, y de celulosa, como residuos de papel y cartón.

1.3.2 Biomasa agrícola. En un sentido amplio, la biomasa agrícola es la producida en terrenos de uso agrícola. La mayor parte corresponde a los cultivos dedicados a alimentación humana y animal que, por razones obvias, no puede ser utilizada como

³⁴ PERLACK. Op. cit., p. 17.

³⁵ ESPAÑA. Plan de Energías Renovables, 2005-2010. Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía (IDAE), Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. España. 2005 www.idae.es/central.asp?m=p013&t=3#.

³⁶ ESPAÑA. Plan de Energías Renovables, 2005-2010. Op. cit., p. 19.

³⁷ PERLACK. Op. cit., p. 17.

materia prima para bioprocesos industriales, salvo los posibles excedentes generados en ese tipo de cultivos que no puedan ser dedicados para tales fines. “Por tanto, en este apartado se hará referencia únicamente a los denominados cultivos no alimentarios, a los residuos primarios de los cultivos alimentarios, a las hierbas y pastos, y a los diversos residuos que se generan a partir de la biomasa primaria a lo largo de la cadena de producción y consumo”³⁸.

La biomasa agrícola constituye un conjunto heterogéneo de materiales de naturaleza y composición diversos, entre los que se incluyen almidón, azúcares, celulosa y lignocelulosa, grasas y aceites, proteína y otros. Ello implica que su procesado debe seguir rutas y tecnologías diversas dependientes del tipo de material considerado, cuestión que claramente la diferencia de la biomasa forestal, que presenta una elevada homogeneidad (materiales lignocelulósicos). Sin embargo, este aspecto que, por un lado puede dificultar su manejo y procesado, supone por otro lado una gran ventaja, ya que debe permitir una mayor diversificación de los bioproductos potencialmente obtenibles, en comparación con la biomasa forestal.

Dentro de la biomasa de origen agrícola se pueden establecer los siguientes grupos:

- **Cultivos de uso específico no alimentario.** En este contexto, el concepto no alimentario no significa que sean cultivos no aptos para su uso en alimentación humana o animal, sino que, aun siéndolo en muchos casos, se les da un destino distinto del alimentario. “Así, por ejemplo, en este grupo se pueden encontrar cultivos que se pueden emplear en alimentación humana (maíz y otros cereales, legumbres, semillas oleaginosas, caña de azúcar, remolacha azucarera) o animal (alfalfa), así como otros de uso exclusivo no alimentario (cardo). Los denominados cultivos energéticos, es decir, cultivos destinados a la producción de biocombustibles y energía”³⁹, también se incluirían en este grupo. Los cultivos no alimentarios pueden ser herbáceos o leñosos, incluyéndose en este último grupo los cultivos forestales de rotación corta que, si bien por su naturaleza son de tipo forestal, algunos autores los incluyen dentro de los cultivos agrícolas por realizarse generalmente en terrenos de uso agrícola.

Los cultivos no alimentarios se pueden clasificar en diversos grupos según distintos criterios. Uno de los criterios quizás más ilustrativos sea el del tipo de materia prima predominante y de mayor valor en la biomasa vegetal. De acuerdo con este criterio se podrían establecer los siguientes grupos: cultivos de almidón, de azúcar, oleaginosos, fibrosos y otros cultivos. En los primeros se pueden distinguir dos tipos, los cereales (maíz, trigo, cebada, avena, sorgo) y la patata; en los segundos se encuentran la caña de azúcar y la remolacha azucarera; los oleaginosos son cultivos que producen semillas ricas en aceites vegetales, tales como la soja, la colza, el lino y el girasol; entretanto, los fibrosos, son cultivos que se caracterizan por la naturaleza fibrosa de las plantas (tallos), y que tradicionalmente han sido utilizados en la industria textil; y entre los otros cultivos se incluyen los no fácilmente clasificables en los grupos anteriores, entre los que se destacan el cardo y la alfalfa.

³⁸ Ibid., p. 18.

³⁹ ESPAÑA. Plan de Energías Renovables, 2005-2010. Op. cit., p. 21.

Una completa y valiosa información sobre los cultivos no alimentarios (o cultivos industriales) se puede encontrar en la página web de IENICA (Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications⁴⁰), proyecto financiado por la DG Research de la Comisión Europea.

“Un aspecto importante que puede ser de gran interés es la posibilidad de modificar genéticamente algunos de estos cultivos (maíz, soja) para mejorar algunos aspectos relacionados con su explotación e incrementar su interés comercial (resistencia a pesticidas y a plagas, incremento de productividad, modificaciones en su composición, etc.)”⁴¹. En estos casos, la utilización no alimentaria de los cultivos genéticamente modificados o transgénicos podría suponer una gran ventaja en su desarrollo y uso, ya que previsiblemente contaría con una mejor aceptación de la opinión pública, y podría beneficiarse de un marco legislativo mucho menos restrictivo que el existente para los usos alimentarios.

- **Residuos primarios de cultivos alimentarios.** Este apartado hace referencia a los residuos y subproductos vegetales que se obtienen en los cultivos alimentarios y que están formados por aquellas partes de la planta que quedan tras retirar las fracciones de interés alimentario. Se puede distinguir entre residuos leñosos, los procedentes de las podas de olivos, frutales y viñedos, y residuos herbáceos, principalmente la paja de cereales y el cañote de maíz⁴². En ambos casos, su composición es principalmente lignocelulósica, y presentan un marcado carácter estacional. Actualmente, sus usos principales son como forraje para alimentación animal y para fines energéticos, además de la fracción que se deja en los mismos campos de cultivo para favorecer su recuperación y sostenibilidad. Su abundancia y bajo coste hacen de ellos una de las materias primas de biomasa con mayor potencial de aprovechamiento en las futuras biofactorias.

- **Hierbas y pastos.** En este grupo se incluyen las hierbas, pastos y plantas herbáceas verdes que tradicionalmente se han utilizado como forraje en alimentación animal. “También se pueden incluir los cereales en sus fases tempranas, cuando son verdes y aún no han producido el grano. Se componen principalmente de una fracción sólida fibrosa (lignocelulosa) y de otra líquida rica en proteína y pigmentos. Alternativamente se pueden también emplear tras un proceso de fermentación parcial (*silage*), tras el cual la fracción soluble se enriquece en azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Este tipo de biomasa es el que se emplea en la denominada biofactoria verde”⁴³.

- **Residuos y subproductos de industrias agroalimentarias.** Corresponden a los residuos y subproductos de naturaleza y composición variada que se generan en las industrias de envasado, transformación y elaboración de alimentos. Entre ellas se podrían citar las industrias aceiteras (orujo y alpechín), conserveras (restos de vegetales y frutas),

⁴⁰ IENICA (Interactive European Network for Industrial Crops and their Application). www.ienica.net.

⁴¹ PASTER, M., PELLEGRINO, J.L. Y CAROLE, T.M. “Industrial Bioproducts: Today and Tomorrow”. Department of Energy, Estados Unidos. 2003. www.biomass.govtools.us/pdfs/BioProductsOpportunitiesReportFinal.pdf.

⁴² ESPAÑA. Plan de Energías Renovables, 2005-2010. Op. cit., p. 23.

⁴³ FOWLER, P.A., MCLAUCHLIN, A.R. Y HALL, L.M. “The Potential Industrial Uses of Forage Grasses Including Miscanthus”. The National Non-Food Crops Centre (NNFCC), Reino Unido. 2003.

de vinos (raspón, hollejo y semillas de uva), de cereales y derivados (cáscaras), cerveceras (grano y malta residuales), azucareras (melazas), molienda húmeda del maíz (licor de maceración del maíz *-corn steep liquor-*, germen, gluten), de frutos secos (cáscaras), queserías (lactosuero). Sus usos principales en la actualidad son el compostaje y la aplicación agrícola directa, la alimentación animal y la producción de alcohol.

- **Residuos de explotaciones ganaderas.** Proceden de las deyecciones del ganado, fundamentalmente el estiércol y los purines, que pueden utilizarse además de como abono y compostaje, para la generación de biogás.

- **Residuos sólidos urbanos (fracción orgánica).** Son los residuos de naturaleza orgánica resultantes de la actividad humana, tales como restos de comida, de jardinería y otros materiales fermentables. Se utilizan en compostaje y para generar biogás.

- **Fangos de depuradoras de aguas residuales.** Son residuos producidos en los procesos de depuración de aguas residuales urbanas, y que pueden ser empleados en la generación de biogás para su aprovechamiento energético.

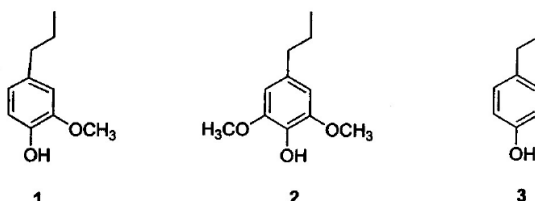
Idealmente, las futuras biofactorias integradas deberían tener la capacidad de utilizar todas las fuentes de biomasa descritas en este capítulo. Sin embargo, por razones de índole económico (rentabilidad), de disponibilidad y de eficiencia, no todas esas fuentes de biomasa serán igualmente consideradas. Entre ellas, las que pueden presentar un mayor potencial e interés son las denominadas fuentes primarias de biomasa, interés que podría ser extensible a algunas de las fuentes secundarias (residuos de industrias madereras, del papel y pasta de papel y algunas agroalimentarias). Por el contrario, no parece muy probable que las fuentes terciarias presenten gran interés de cara a su empleo en biofactorias.

1.3.3 Basados en materiales lignocelulósicos. Dependiendo de la biomasa fuente los materiales lignocelulósicos están principalmente compuestos de celulosa (30-60%), hemicelulosas (20-40%) y lignina (10-30%). Los dos primeros son hidratos de carbono estructurales (en contraposición al resto, tales como la sacarosa, que son hidratos de carbono de almacenamiento) mientras que la lignina es un polímero fenólico. Existen diferentes ligninas en función de la composición porcentual de sus subunidades constituyentes. En las figuras 1 y 2 pueden verse, respectivamente, las estructuras químicas de las principales subunidades constituyentes de las ligninas así como sus principales características estructurales.

Las ligninas (del latín *lignum*, madera) son biopolímeros aromáticos ramificados y reticulados que consisten en subunidades derivadas de fenilpropano [guayacilpropano (1 grupo metoxi en posición orto con respecto al grupo OH del anillo aromático), siringilpropano (2 grupos metoxi, uno en cada posición orto con respecto al grupo OH del anillo aromático) y p-hidroxifenilpropano (sin grupos metoxi)] con un átomo de oxígeno (en forma de grupo OH o de enlace O-C) en la posición para y con de 0 a dos grupo metoxi en las posiciones orto con respecto a dicho átomo oxígeno. A su vez, estas posiciones orto pueden estar C- u O-sustituidas con sustituyentes diferentes del grupo metoxi. Las subunidades de fenilpropano están conectadas entre sí por enlaces $-\beta\text{-O-4}$, $\beta\text{-}\beta$, $\beta\text{-5}$, $\beta\text{-1}$ y 5-5 , de los cuales el más común es $-\beta\text{-O-4}$, o, alternativamente, existe formando parte de

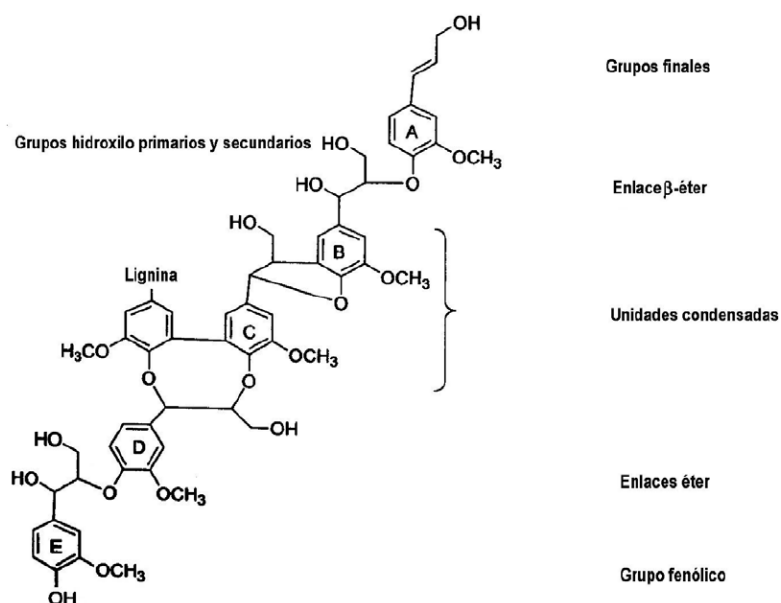
una serie de grupos finales característicos (por ejemplo, unidades de cinamaldehído). En la estructura de las ligninas también existen grupos quinoide. De una manera muy resumida las ligninas también pueden definirse como biopolímeros fenólicos.

Figura 1. Estructuras químicas de las principales subunidades constituyentes de las ligninas. (1) guayacilpropano. (2) siringilpropano. (3) p-hidroxifenilpropano.



Fuente: E.K. Pye, in "Biorefineries – Industrial Processes and Products, Satus Quo and Future Directions

Figura 2. Principales características estructurales de las ligninas



Fuente: E.K. Pye, in "Biorefineries – Industrial Processes and Products, Satus Quo and Future Directions

Los diferentes procesos para obtener pasta papelera a partir de la madera dan lugar a la obtención de ligninas con diferentes características. Todos ellos dan lugar a una alteración de la estructura original de la lignina excepto el más reciente Organosolv.

Así, por ejemplo, según E.K. Pye⁴⁴, la lignina procedente del proceso Kraft que usa una combinación de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio para deslignificar la madera, es una

⁴⁴ E.K. Pye, in "Biorefineries – Industrial Processes and Products, Satus Quo and Future Directions. Vol. 2", Chapter 5, pp 165-200, Birgit Kamm, R. Gruber and Michael Kamm Eds, Wiley-VCH GmbH % Co. KGaA, Weinheim, 2006. ISBN: 3-257-31027-4.

lignina parcialmente despolimerizada en la que se han introducido grupos tiol en una concentración de aproximadamente 2-3% en peso, y la del método del sulfito porta grupos sulfónicos dando lugar a los lignosulfonatos. La lignina procedente del proceso Organosolv es una lignina no derivatizada de alta pureza, significativa reactividad química, baja polidispersidad y bajo peso molecular. En este procedimiento, la madera se trata con una disolución acuosa de un disolvente (etanol, proceso Alcell; ácido acético, proceso Acetosolv; ácido fórmico, proceso Formacell; metanol, proceso Organocell) a altas temperaturas y presiones (195°C, 28 atm en el proceso Alcell).

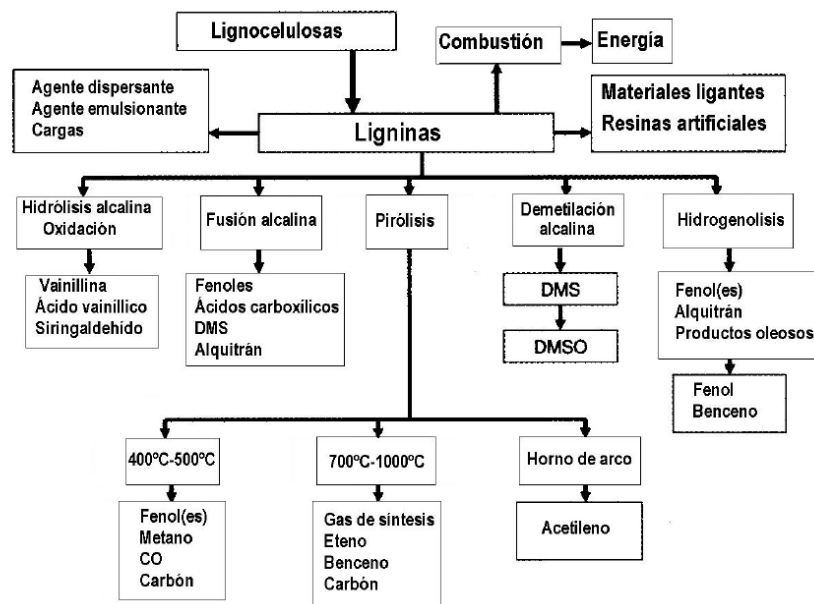
1.4 PRODUCTOS POTENCIALES A BASE DE LIGNINA

Los procedimientos para valorizar las ligninas podrían dividirse en los siguientes grupos:

- **Utilización de polímeros:** adhesivos para materiales derivados de la madera, aditivo para cementos para aumentar la resistencia y la durabilidad a baja temperatura, etc.;
- **Uso como componente de polímeros:** correaccionante para la obtención de polímeros y resinas;
- **Fraccionamiento en moléculas de bajo peso molecular:** generación de vainillita a partir de lignosulfonatos de maderas blandas (proceso ya existente a nivel comercial); producción de dimetilsulfóxido; y
- **Degradación completa por pirólisis** para obtener gas, productos oleosos y carbón.

La figura 3., muestra un esquema de una familia de productos químicos basados en ligninas. “La demetilación alcalina vía sulfuros se usa para la producción de sulfuro de dimetilo (DMS) a partir del cual puede obtenerse dimetilsulfóxido (DMSO). Por adición de NaS y NaOH a 250-290°C pueden obtenerse hasta un 33% de sustancias fenólicas”⁴⁵.

Figura 3. Esquema de Una familia de Productos Basados en la Lignina



Fuente: F. Enquist et al.; *Tappi*. 45, 128 (1962).

⁴⁵ F. ENQUIST et al.; *Tappi*. 45, 128 (1962).

1.5 PRODUCCIÓN DE PANELA Y LA GENERACIÓN DE BAGAZO

La panela es la base del sustento de miles de familias campesinas, quienes producen en unidades de pequeña escala, con mano de obra familiar y afrontan muchas dificultades para modernizar su producción y expandir sus mercados. Sólo un pequeño segmento de la producción se desarrolla de forma industrial y el resto se realiza en establecimientos pequeños con capacidades de producción inferiores a los 300 kilogramos de panela por hora.

“Colombia es un importante productor de panela (el segundo en el mundo después de la India) y el mayor consumidor per cápita del mundo (37,4 Kg/Hab), aunque por su carácter de producto no transable, la producción se orienta casi completamente al mercado interno, lo cual no le permite ampliar su demanda fácilmente y se ve expuesto a la competencia del azúcar, los edulcorantes sintéticos y las bebidas artificiales”⁴⁶.

Teniendo en cuenta que el cultivo de caña es una de las actividades agrícolas de mayor importancia socioeconómica en Colombia, en donde “ocupa el segundo lugar en extensión cultivada después del café, 61% dedicado a la producción de panela, el 32% a la producción de azúcar y el 7% a mieles, guarapos y forrajes”⁴⁷.

Se estima que “existen cerca de 70 000 unidades agrícolas que cultivan la caña panelera y 15 000 trapiches en los que se elabora panela y miel de caña. Además, genera anualmente más de 25 millones de jornales y se vinculan a esta actividad alrededor de 350 000 personas, es decir el 12% de la población rural económicamente activa, siendo así el segundo renglón generador de empleo después del café”⁴⁸.

Según cifras de la FAO, 26 países en el mundo producen panela. Colombia es el segundo productor después de la India, con un volumen que representa el 10,3% de la producción mundial. Sin embargo, en términos de consumo por habitante, Colombia ocupa el primer lugar con un consumo de 31,2 Kg de panela por habitante al año, cifra que supera de lejos al promedio mundial de 2,1 Kg/Hab y del mayor productor mundial, la India, cuyo consumo fue de 8,4 Kg/Hab.

“En Colombia, la producción de caña panelera se concentra básicamente, en los departamentos de Santander, Boyacá y Cundinamarca, los cuales absorben más del 50% del total producido”⁴⁹. Es un producto eminentemente de economía campesina, el cual se produce en casi todo el país durante todo el año. Constituye la economía básica de 236 municipios, en doce departamentos.⁵⁰

La historia del cultivo de caña en el departamento de Santander, se remonta al año 1939, época en la cual un buen número de campesinos santandereanos derivaron su sustento de la venta de panela, que se elaboraba de manera rústica en viejos trapiches. Muchas

⁴⁶ COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Observatorio agrocadenas. La cadena agroindustrial de la panela en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1992 – 2005. Bogotá, 2005. p 23.

⁴⁷ MARTÍNEZ, H. Acevedo, X. Características y estructura de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Bogotá, Colombia. Mayo de 2003.

⁴⁸ RODRÍGUEZ B., Gonzalo. La panela en Colombia frente al nuevo milenio. En Corpoica- Fedepanela, Manual de Caña de Azúcar, 2000.

⁴⁹ MARTÍNEZ, Op. cit., p. 35.

⁵⁰ Ibid., p. 37.

tierras de Bucaramanga, Piedecuesta, Rio negro, Floridablanca, Girón y especialmente la zona conocida como la Hoya del Río Suárez, en donde convergen municipios del Sur de Santander y el norte de Boyacá, se cultivaron con caña. De hecho, en esta última zona se estima una producción que oscila entre 45.000 y 60.000 hectáreas sembradas.⁵¹

Actualmente y según la cadena agroindustrial de la panela, “el desarrollo de nuevos productos derivados de la industria panelera avanza lentamente, especialmente en lo concerniente a los usos alternativos de la caña (alimentación animal, alcohol carburante) y de la panela (insumo de la industria de alimentos, farmacéutica, cosméticos, etc.)”⁵², todo esto si se tiene en cuenta que entre el 20 y el 30% de la caña procesada corresponde a bagazo⁵³, convirtiéndose éste en materia prima para obtener nuevos productos.

1.5.1 Características físico químicas del bagazo. El bagazo es un material fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que presenta relativamente baja densidad y un alto contenido de humedad, en las condiciones en que se obtiene del proceso de molienda de la caña.

“El contenido en cenizas del bagazo natural puede considerarse moderado, ubicándose entre 2 y 5 % en base seca. Sin embargo, como consecuencia directa de la mecanización de la cosecha, y sobre todo en época de lluvia, este parámetro puede elevarse considerablemente, llegándose a reportar valores extremos de 12 a 15 %”⁵⁴. En los cuadros 2, 3, 4 y 5 se muestran las características fundamentales del bagazo de caña.

Cuadro 2. Análisis inmediato (% base seca).

Característica	%
Carbono fijo	41,9
Volátiles	46,36
Cenizas (815 ^o)	11,74

Fuente: MERENCIO D, GIRALDO G. Aproximación experimental a la combustión del bagazo de caña en lecho fluidizado.

Cuadro 3. Análisis elemental (% base seca).

Característica	%
Carbono	42,54
Hidrógeno	5,17
Nitrógeno	0,63
Azufre	0,30
Oxígeno	39,62

Fuente: MERENCIO D, GIRALDO G. Aproximación experimental a la combustión del bagazo de caña en lecho fluidizado.

⁵¹ http://www.banrep.gov.co/documentos/publicaciones/pdf/sant_1.pdf

⁵² Ibid. p. 23.

⁵³ VELASQUEZ ARREDONDO H, AGUDELO SANTAMARIA A, ALVAREZ GONZÁLEZ J. Mejorando la producción de panela. En : Revista de agroecología LEISA. Vol 21. 2005.

⁵⁴ MERENCIO D, GIRALDO G. Aproximación experimental a la combustión del bagazo de caña en lecho fluidizado. España. p 4.

Cuadro 4. Análisis sólidos (% base seca)

Lignocelulósicos	45%
Sólidos insolubles	2-3%
Sólidos solubles	2-3%
Humedad	50%

Fuente: Vaz Rossell Carlos Eduardo. Grupo energía – proyecto etanol.

Cuadro 5. Análisis celulosa (% base seca)

	Bagazo integral	Fibra	Medula
Celulosa%	46,6	47,7	41,2
Hemicelulosa%	25,2	25	26
Lignina%	20,7	19,5	21,7

Fuente: Vaz Rossell Carlos Eduardo. Grupo energía – proyecto etanol.

1.6 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La celulosa y la hemicelulosa son los principales componentes de las paredes celulares de las plantas y los materiales biológicos más abundantes sobre la tierra. Estos compuestos polisacáridos están conformados por azúcares; estos últimos pueden ser obtenidos mediante hidrólisis enzimática. Algunos residuos urbanos, industriales, agroindustriales y otros, contienen una cantidad significativa de estos compuestos. Sin embargo, muchos de ellos son desechados o incinerados, contribuyendo a las emisiones de dióxido de carbono⁵⁵, y por lo tanto al calentamiento global.

En este contexto, “los materiales ricos en celulosa son una alternativa ante la fuerte disminución de combustibles fósiles que se da hoy día en el mundo⁵⁶”, por su composición pueden ser tratados físicoquímica o biológicamente previos a la hidrólisis enzimática para la producción de azúcares fermentables, materia prima para biocombustibles⁵⁷. “Los residuos lignocelulósicos constituyen una fuente de energía renovable y abundante, y no afectan la disponibilidad de alimentos. Además, pueden utilizarse en la producción de alimentos para animales y productos químicos⁵⁸”.

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelería, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierba, frutas, paja, etc.) así como residuos sólidos urbanos. “Se ha estimado un valor de 6 para la relación salida/entrada de energía en el caso de la producción de etanol a partir de biomasa⁵⁹”, es decir, la relación entre la energía liberada durante la combustión de alcohol y la energía necesaria para su producción considerando todo el ciclo de vida del producto desde la

⁵⁵ VEGA JM, CASTILLO FY, CÁRDENAS F. La bioconversión de la energía. Madrid: Pirámide; 1983.

⁵⁶ KUHAD RC, SINGH A, ERIKSSON KE. Microorganisms enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. Adv Biochem Eng Biotechnol. 1997; 57: 45-125.

⁵⁷ DETROY RW, JULIAN G. Biomass conversion: Fermentation chemicals and fuels. CRC. crit. Rev Microbiol. 1982; 10:203-228.

⁵⁸ BHAT MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotech Adv. 2000; 18(5):355-383.

⁵⁹ Berg C (2001) *World Fuel Ethanol. Analysis and Outlook*. www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html

extracción de las materias primas y los insumos requeridos, pasando por su transporte, hasta el proceso de transformación hasta bioetanol.

Lo anterior hace a esta materia prima muy atractiva, “en especial en países que no cuentan con la facilidad de producir grandes cantidades de caña de azúcar. El valor de esta relación para el etanol producido a partir de almidón de maíz es de 1,1-1,2”⁶⁰ “y a partir de caña de azúcar es de 8”⁶¹. El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos compuesta de celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa.

El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse.

En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado.

Por las anteriores razones, dentro de las materias primas para la producción de alcohol carburante se encuentra el aprovechamiento del residuo generado durante las actividades agroindustriales de extracción de jugos de caña panelera y/o azucarera o bagazo. Por la cantidad generada, la capacidad de renovación sostenible y por el contenido de fibras a partir de las cuales se puede obtener azúcares fermentables, el bagazo es una opción de bajo costo y abundante en los ingenios y trapiches.

El aprovechamiento de los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica permitiría utilizar paja de cereales, residuos forestales, así como el empleo de determinadas variedades forestales de rápido crecimiento, como materia prima en la elaboración de bioetanol. Teniendo en cuenta que el 90% de la producción mundial de biomasa es lignocelulósica, la producción de bioetanol se amplía considerablemente. Además esta materia prima tiene un menor costo y no entra en competencia con los mercados alimentarios.⁶²

La disponibilidad de bagazo actualmente se estima en algo más de 200 millones de toneladas (50% humedad) y su uso más generalizado es como combustible y más recientemente se utiliza de forma creciente para la cogeneración de energía. “La operación eficiente y con buenas prácticas permite a su vez en determinadas condiciones, generar hasta un 30% de bagazo sobrante del cual se puede disponer para numerosas

⁶⁰ Prakash R, Henham A, Bhat IK (1998) Net energy and gross pollution from bioethanol production in India. *Fuel* 77: 1629-1633.

⁶¹ Berg. Op. cit., p. 123.

⁶² Desarrollo agroindustrial de los combustibles en Castilla y León. Op. cit., p. 65.

aplicaciones industriales de gran valor agregado. La mayor disponibilidad corresponde a Asia (40%) seguidos por Sur América (22,9%) y Centro América (18%)⁶³.

Estudios recientes que cuentan con el soporte de la práctica industrial, demuestran la viabilidad de satisfacer las demandas energéticas de las centrales azucareras con prácticamente la mitad del bagazo que se produce (Villar, et al., 1986; Gravitis, et al., 2000; Chum and Overend, 2001). “Por lo tanto se puede afirmar que el sobrante del bagazo constituye una alternativa como materia prima de otros artículos; gracias a sus propiedades el bagazo es un material de interés industrial”⁶⁴.

1.6.1 Estructura y Composición de la Biomasa Celulósica. La vida en la tierra depende de la fotosíntesis, lo que produce biomasa vegetal que tiene a la celulosa como el mayor componente. El ciclo del carbono está estrechamente vinculado a la acción de los microorganismos que utilizan celulosa, muchos de los cuales están presentes en el suelo y en el tracto digestivo de los rumiantes.

Así la utilización microbiana de la celulosa es responsable de la degradación de una de las biomásas más abundantes en la biosfera y tiene ahora un interés especial en términos del análisis del ciclo del carbono frente a los problemas ambientales a nivel global.

La utilización microbiana de la celulosa es un componente integral de los procesos aerobios y anaerobio de digestión y de compostaje.

La biomasa vegetal es la única fuente predecible de combustible y de materiales disponibles para la humanidad. Los materiales celulósicos son particularmente atractivos en éste contexto debido a su relativo bajo costo y disponibilidad. El impedimento tecnológico central para su utilización masiva, es precisamente la carencia de una tecnología de bajo costo, para superar las dificultades de biodegradación o rompimiento de la biomasa celulósica.

“Una estrategia promisoriosa para superar este impedimento, involucra la producción de enzimas celulolíticas, hidrólisis de la biomasa y la fermentación de los azúcares resultantes o de los productos deseados en un proceso sencillo vía microorganismos celulolíticos o consorcios, tal tecnología se conoce hoy en día como Bioproceso Consolidado (CBP) que ofrece una significativa reducción de los costos en especial si se logran desarrollar microorganismos que posean las características deseadas”⁶⁵.

La celulosa se encuentra principalmente en las paredes celulares de la plantas, aunque también es producida por algunos animales (por ejemplo por los tunicados) y por algunas bacterias. “A pesar de la enorme diferencia en la composición y en la estructura anatómica de las paredes celulares en los diferentes grupos o taxas, un contenido alto de

⁶³ RODRÍGUEZ. N. EL BAGAZO Y LAS FIBRAS ANUALES: PRESENTE Y FUTURO PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN. Congreso iberoamericano de investigación en celulosa y papel 2000. <http://ciadicyp.unam.edu.ar/trabajos/trabajos/variados/Fernandez-95-C9-Cu.pdf>. La Habana, Cuba.

⁶⁴ PARSONS, C. RAMITH, E. DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR EL BAGAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR

⁶⁵ LEE R. LYND. Et al, 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. P.N.A.S, Chemical and Biochemical Engineering, Thrayer School of Engineering and department of Biological Science, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire.

celulosa, típicamente ubicado en el rango del 35 al 50% del peso seco de las plantas es una característica uniforme⁶⁶.

“En muy pocos casos la celulosa se encuentra en estado puro, en la mayoría de los casos las fibras de celulosa se encuentran embebidas en una matriz conformada por otros biopolímeros principalmente hemicelulosa y lignina los cuales constituyen del 20 al 35% y del 5 al 30% del peso seco de las plantas respectivamente⁶⁷; “aunque estas interacciones con la matriz varían con relación al tipo de célula vegetal y con la madurez de la planta⁶⁸”.

La celulosa tiene una característica estructural dominante que limita el grado de utilización de la misma totalmente, especialmente en la biomasa no tratada.

Teniendo en cuenta su estructura química, se define como un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4 (β -1,4). La configuración β , le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales se presentan unidas entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas. Estas regiones, conocidas como regiones cristalinas, son altamente ordenadas y le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático.

Así, “una característica importante de la celulosa, relativamente inusual en el mundo de los polisacáridos es su estructura cristalina, la celulosa se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales (cadenas lineales de residuos glucosilo), los cuales experimentan un auto ensamblaje en el propio sitio de biosíntesis⁶⁹. “Existe evidencia de que la hemicelulosa asociada regula éste proceso de agregación⁷⁰”.

Aproximadamente 30 moléculas individuales de celulosa son ensambladas en una larga unidad conocida como fibrillas elementarias (protofibrillas), las cuales a su vez están empaquetadas en unidades largas llamadas microfibrillas y estas se asocian conformando una fibra de celulosa.

Este tipo de arreglo o empaquetamiento tan especial de las cadenas dentro de las fibrillas elementarias ha sido ampliamente inferido a partir de los estudios y pruebas con difracción de rayos X, y de los datos de los modelos estadísticos que calculan la estructura basada en su energía conformacional mínima.

La naturaleza cristalina de la celulosa implica un orden estructural en el cual todos los átomos están arreglados en una posición discreta una con respecto de la otra. Una característica importante de éste arreglo cristalino es que los componentes moleculares de las microfibrillas individuales están empaquetados tan estrechamente como para evitar

⁶⁶ LYND, Op. Cit., p. 777–793.

⁶⁷ MARCHESSAULT, R. H., AND P. R. SUNDARARAJAN. 1993. Cellulose, p. 11–95 *In* G. O. Aspinall (ed.), The polysaccharides, vol. 2. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

⁶⁸ WILSON, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues, p. 1–32. *In* H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (ed.), forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy—Crop Science Society of America—Soil Science Society of America, Madison, Wisc.

⁶⁹ BROWN, R. M., JR., AND I. M. SAXENA. 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.* 38:57–67.

⁷⁰ ATALLA, R. H., J. M. HACKNEY, I. UHLIN, AND N. S. THOMPSON. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 15:109–112.

o prevenir la penetración no únicamente de las enzimas sino de moléculas aún más pequeñas como el agua.

Aunque la celulosa forma una estructura cristalina, las fibras de celulosa en la naturaleza no son puramente cristalinas.

“El grado inicial o la naturaleza cristalina de la celulosa es variable y ha permitido el surgimiento del concepto “distribución de orden lateral” de la cristalinidad, lo cual representa a una población de fibras de celulosa en términos estadísticos como un continuum desde una fibra puramente cristalina a una fibra amorfa con un rango muy amplio de variación característico entre las dos”⁷¹.

“La mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, del cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas”⁷². Las primeras hidrolizan los enlaces $\beta(1,4)$ de la cadena de celulosa a partir de los extremos no reductores o reductores liberando celobiosa o inclusive glucosa, mientras las endoglucanasas rompen estos mismos enlaces en forma aleatoria dentro de la cadena. Desafortunadamente, las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, por lo que se agrega β -glucosidasa de otra fuente para complementar la acción de las celulasas de este hongo. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

1.7 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES

Según Biorefining Processes⁷³, la fermentación se encuentra en el centro del concepto de biorrefinería, ya que es la ruta primaria para generar productos químicos a partir de los azúcares obtenidos en la denominada plataforma de azúcares. La fermentación es un proceso biológico por el cual microorganismos convierten azúcares sencillos en compuestos químicos de bajo peso molecular, tales como ácidos orgánicos y compuestos neutros. Estos microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, levaduras y hongos, son capaces de utilizar los azúcares para producir la energía y los compuestos químicos que necesitan para vivir y reproducirse, y, al mismo tiempo, generar subproductos como dióxido de carbono, ácidos orgánicos, hidrógeno, etanol y otros. Las fermentaciones industriales se realizan en grandes depósitos de temperatura controlada denominados fermentadores. Los azúcares se mezclan con agua para formar el caldo de fermentación, en el cual se ajusta la concentración de azúcares para satisfacer las necesidades del microorganismo. Asimismo, deben añadirse otros nutrientes, como una fuente de nitrógeno apropiada, para posibilitar y favorecer el proceso.

La fermentación comienza cuando el caldo es inoculado con el microorganismo y transcurre paralelamente al crecimiento de éste, finalizando cuando todos los azúcares fermentables han sido consumidos, o cuando los productos o subproductos de la fermentación inhiben o matan a los microorganismos. Los rendimientos de los productos de las fermentaciones en relación al azúcar inicial nunca son del 100%, ya que una fracción más o menos importante del azúcar fermentable es utilizada por el organismo

⁷¹ MARCHESSAULT, R. H., AND J. A. HOWSMON. 1957. Experimental evaluation of the lateral order distribution in cellulose. *Text. Res. J.* 27:30–41

⁷² LYND LR, WEIMER PJ, VAN ZYL WH, PRETORIOUS IS (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66: 506-577.

⁷³ BIOREFINING PROCESSES. Fermentation of 6-Carbon Sugars and Starches. Wisconsin Biorefining Development Initiative, EE.UU. www.wisbiorefine.org.

para su propio crecimiento y para sintetizar otros productos. En los casos más favorables se han descrito rendimientos cercanos al 90%, pero lo más normal son rendimientos más modestos, del orden del 50%. Otra desventaja de las fermentaciones es que la concentración final de los productos en el caldo de fermentación es relativamente baja, lo que supone una dificultad añadida durante la purificación de los mismos.

Sin embargo, la gran ventaja de los procesos de fermentación es que las reacciones son altamente específicas y que pueden controlarse hacia la formación de productos químicos de alto valor. Mediante las tecnologías de fermentación se pueden obtener tanto productos químicos de base, tales como el ácido láctico, el ácido cítrico, aminoácidos y 1,3-propanodiol, como especialidades químicas, incluyendo antibióticos, vitaminas y enzimas.

1.7.1 Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). “Las fases de sacarificación y fermentación tradicionalmente se han realizado de un modo separado y consecutivo, configurando un proceso denominado hidrólisis y fermentación separadas (SHF, *separate hydrolysis and fermentation*)”⁷⁴. “Un paso adelante en la configuración del sistema vino de la posibilidad de realizar ambas fases simultáneamente. Es lo que se denomina sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, *simultaneous saccharification and fermentation*)”⁷⁵, y se consigue mediante la adición al caldo de fermentación de las enzimas hidrolíticas requeridas seguida de la inoculación en el mismo del microorganismo, de modo que éste pueda fermentar los azúcares según van siendo liberados de la biomasa por la acción enzimática.

La SSF presenta la ventaja de simplificar el proceso, ya que se reduce el número de reactores necesarios. Además, y de mayor importancia, evita el problema de la inhibición por producto asociada a la actividad enzimática. Durante el proceso de sacarificación enzimática, la acumulación de glucosa causa inhibición de la enzima β -glucosidasa, que deja de hidrolizar la celobiosa, con lo que esta se acumula también en el medio. Este aumento en la concentración de celobiosa origina, a su vez, el cese o inhibición de la hidrólisis de celulosa, afectando muy negativamente a la eficiencia del proceso de sacarificación. La SSF, al evitar la acumulación de los azúcares fermentables, que son transformados por los microorganismos inmediatamente tras su liberación, impide que ocurra esa inhibición por producto y consigue incrementar el rendimiento y eficiencia total del proceso.

1.7.2 Co-fermentación de azúcares C6 (hexosas) y C5 (pentosas). Así como los azúcares derivados de las materias primas de almidón son de un sólo tipo (glucosa) y, por ello, son totalmente utilizables por ciertos microorganismos (levaduras) perfectamente adaptados para tal fin, la utilización de los azúcares que se obtienen a partir de la biomasa lignocelulósica presentan ciertos problemas técnicos. La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa que forman parte de la biomasa lignocelulósica genera una mezcla de hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), siendo las levaduras convencionales incapaces de metabolizar estas últimas, lo que redundará en una significativa merma de la eficiencia y rentabilidad del proceso. En respuesta a esta

⁷⁴ LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H. Y PRETORIUS, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.

⁷⁵ BIOREFINING PROCESSES. Op. cit., p. 37.

situación, mediante el empleo de tecnologías de ingeniería metabólica se han creado nuevas cepas de microorganismos recombinantes, tales como la bacteria *Zymomonas mobilis*, a las que a su capacidad natural de fermentar la glucosa se ha añadido la capacidad de fermentar también las pentosas.

Al igual que lo descrito en el apartado anterior sobre la SSF, “si al caldo de fermentación se añaden las enzimas necesarias para realizar la hidrólisis de la lignocelulosa, la sacarificación y la co-fermentación de los dos tipos de azúcares ocurren de un modo simultáneo, dando lugar a un proceso denominado SSCF (*simultaneous saccharification and co-fermentation*)”⁷⁶. Este proceso se encuentra en sus fases iniciales de desarrollo y necesita todavía mejorar considerablemente su eficiencia.

1.7.3 Bioproceso consolidado. El punto final de la integración de los procesos de sacarificación y fermentación supone que las enzimas hidrolíticas (celulasas) sean producidas *in situ* por el mismo microorganismo responsable de realizar la fermentación de los azúcares, de modo que la totalidad de los procesos (síntesis de celulasas, sacarificación y co-fermentación de azúcares C5 y C6) sean realizados simultáneamente en un único paso y en un único reactor (intensificación de procesos, uno de los objetivos incluidos en la Agenda de Investigación Estratégica de la Plataforma Europea de Química Sostenible, SUSCHEM). A esta configuración se le ha denominado bioprocesado consolidado (CBP, *consolidated bioprocessing*)⁷⁷.

1.7.4 Conversión química de los azúcares y productos de fermentación. La utilización de carbohidratos (azúcares) de bajo peso molecular para la producción de productos químicos resulta de gran interés tanto desde el punto de vista ecológico como también el económico. Por su parte, los azúcares glucosa (obtenida de la celulosa y almidón), fructosa (a partir de glucosa o de inulina), xilosa (de hemicelulosas) constituyen materias primas de gran versatilidad para multitud de aplicaciones industriales pues son baratos y accesibles a gran escala. Es por ello que, aparte de las rutas biotecnológicas ya mencionadas, los procesos químicos catalíticos presentan un potencial inmenso para funcionalizar los azúcares y establecer una industria química de productos derivados.

Las tecnologías son todas las actualmente empleadas para la fabricación de compuestos químicos orgánicos, entre las que, a modo de ejemplo, se mencionarán:

- Reducción, ya por hidrogenación catalítica como en la producción de sorbitol a partir de glucosa con Ni Raney como catalizador a 100-150 atm y 100-150°C, ya por vía electroquímica. El desarrollo de nuevos catalizadores y materiales electródicos es fundamental para mejorar selectividades y compatibilidad medioambiental.
- Hidrólisis. Por ejemplo en medio ácido como en la obtención de ácido levulínico a partir de hexosas y en la obtención de furfural a partir de las pentosas de la hemicelulosa.

⁷⁶ R. GARCÍA, M. BESSON AND P. GALEZOT, *Applied Catalysis A: General* **127**, 165-176 (1995).

⁷⁷ LYND, Op. cit., p. 506-577.

- Oxidación, ya catalítica en presencia de catalizadores metálicos sólidos, como en el caso de los ácidos glucónico, lactobiónico y maltobiónico, ya electroquímica. Al igual que en la reducción, el desarrollo de nuevos catalizadores y materiales electrónicos es fundamental para mejorar selectividades y compatibilidad medioambiental.

- Introducción de nuevos grupos funcionales mediante, por ejemplo, reacciones de sustitución. Mediante éstas es posible, por ejemplo, derivatizar biopolímeros como el almidón o la celulosa para modificar sus propiedades y ampliar sus aplicaciones.

1.7.5 Conversión bioquímica de los azúcares y productos de fermentación. La utilización de tecnologías de biocatálisis puede contribuir significativamente a ampliar el catálogo de productos químicos que pueden ser producidos en una biorrefinería, partiendo para ello bien de los azúcares obtenidos de la biomasa o bien de los productos primarios de fermentación. El mismo proceso de sacarificación enzimática es ya de hecho un proceso biocatalítico de despolimerización de polisacáridos.

La biocatálisis es la aplicación de biocatalizadores o enzimas para la síntesis, interconversión o degradación de productos químicos. Los biocatalizadores se caracterizan por su elevada especificidad y actividad, lo que implica que los procesos por ellos catalizados requieren generalmente un menor consumo de materias primas y generan menores cantidades de subproductos y residuos que los procesos químicos correspondientes. Además, los procesos biocatalíticos se suelen realizar a temperaturas y presiones mucho más reducidas que los procesos químicos por lo que necesitan un menor aporte energético. Todas estas propiedades hacen que, en conjunto, los procesos biocatalíticos presenten grandes ventajas desde el punto de vista de la sostenibilidad.

Entre todas estas propiedades es de destacar especialmente la elevada especificidad de las reacciones biocatalíticas, que las hace de especial interés a nivel industrial. Al contrario que las síntesis químicas convencionales, en las que generalmente se obtiene una mezcla de los diferentes estereoisómeros del producto, las reacciones catalizadas enzimáticamente específicamente generan un único isómero del producto.

“Algunos ejemplos de reacciones de interés catalizadas por enzimas y que se utilizan actualmente incluyen las síntesis de intermediarios de antibióticos semisintéticos (ácido 7-amino-cefalosporánico), acrilamida y ácido acrílico, ácido (S)-2-cloropropiónico y poliésteres”⁷⁸.

1.8 FRACCIONAMIENTO Y PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA

1.8.1 Fraccionamiento de los componentes de la biomasa. El fraccionamiento se refiere exclusivamente al que debe realizarse sobre los cultivos agrícolas, cuando se recolecta íntegramente la cosecha completa. Otros tipos de biomasa (forestal, residuos primarios) son muy homogéneos en su composición, no requiriendo este paso.

⁷⁸ THE ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), Report (2001). “The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability”. OECD, París, Francia. www1.oecd.org/publications/e-book/9301061e.pdf.

El ejemplo más representativo sería la recolección de la cosecha completa de cereales. Esta biomasa está constituida por dos fracciones: el grano, rico en almidón, y la paja, de composición lignocelulósica. “La importancia de su separación radica en los caminos divergentes que debe seguir cada una de estas fracciones en su procesado posterior. El fraccionamiento se realiza mecánicamente, generalmente mediante sistemas de separación por densidad en lechos fluidizados por aire, aprovechando la mayor densidad del grano con respecto a la fracción lignocelulósica”⁷⁹. “El otro gran ejemplo de necesidad de fraccionamiento es el de la biomasa herbácea verde, al contrario de lo anteriormente explicado, en este caso el fraccionamiento se realiza sobre la biomasa húmeda, mediante operaciones de trituración, prensado, extrusión y filtración, obteniéndose finalmente una fracción fibrosa (lignocelulósica) y otra líquida rica en proteína, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y pigmentos”⁸⁰.

1.8.2 Pretratamiento de las fracciones de biomasa

• **Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.** La razón de esta operación es eliminar la capa de hemicelulosa y lignina que recubre a las fibras de celulosa con objeto de facilitar su hidrólisis a glucosa. Diversos procedimientos de pretratamiento, tales como los métodos basados en el empleo de ácidos diluidos, de agua caliente presurizada o de vapor de agua a presión, persiguen este objetivo a través de la hidrólisis de una cantidad significativa de la fracción de hemicelulosa de la biomasa. Otros procesos de pretratamiento, como los métodos basados en el uso de álcalis, son generalmente más efectivos en la solubilización de una mayor fracción de lignina, aunque dejando gran parte de la hemicelulosa en una forma polimérica insoluble. En todos los casos, únicamente una fracción muy reducida de la celulosa resulta hidrolizada tras el pretratamiento, pero queda mucho más accesible a su posterior hidrólisis.

La separación de la lignina de los materiales lignocelulósicos es paso previo para la obtención de carbohidratos (celulosa + hemicelulosas) para su posterior transformación en productos químicos. En la producción de papel a partir de la madera es preciso eliminar la mayor parte de la lignina, por lo que las industrias del sector ya poseen procesos bien desarrollados para este fin.

Un proceso antiguo para el tratamiento de la madera, empleado desde los tiempos de la Segunda Guerra Mundial consiste en la hidrólisis ácida de la madera. Se utiliza ácido sulfúrico diluido o concentrado a temperaturas entre 120°C y 170°C. El residuo sólido que se obtiene contiene algunos compuestos celulósicos y la mayoría de la lignina inicial. Otros procesos emplean ácido clorhídrico para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, generalmente en concentraciones del 35-50% a temperaturas entre 100 y 170°C.

⁷⁹ HOSKINSON, R.L., HESS, J.R., FOUST, T.D., MCKEAN, W.T. Y LEWIS, M. S. (2001) Fractionation of Higher Value Crop Residue Components for Conversion into Bioenergy and Industrial Products. Paper number 016077, 2001 ASAE Annual Meeting. American Society of Agricultural and Biological Engineers, Michigan, EE.UU.

⁸⁰ FOWLER, P.A., MCLAUCHLIN, A.R. Y HALL, L.M. (2003) The Potential Industrial Uses of Forage Grasses Including Miscanthus. The National Non-Food Crops Centre (NNFCC), Reino Unido. www.nnfcc.co.uk/nnfcclibrary/cropreport/download.cfm?id=27.

El proceso más común en la actualidad para eliminar la lignina de la madera es el proceso Kraft que consiste en tratar la madera en forma de escamas con una mezcla hidróxido de sodio y sulfuro de sodio a alta temperatura. Una variante de este proceso, empleado más en Europa que en Estados Unidos, consiste en tratar la madera con sales de sulfito para convertir la lignina en compuestos solubles, los lignosulfonatos. En el proceso se degradan también carbohidratos que generan un licor agotado que contiene azúcares monoméricos y oligoméricos fermentables. Algunas plantas de procesamiento de la madera en Europa y Estados Unidos fermentan los azúcares presentes en el licor agotado para producir etanol.

La lignina Kraft y los lignosulfonatos presentan una amplia variedad de aplicaciones como polímeros. Aunque los carbohidratos justifican más del 70% del peso seco de los materiales lignocelulósicos, muchos de ellos se encuentran en forma que no puede fermentarse⁸¹.

“Es preciso un pretratamiento, químico, mecánico, biológico, o una combinación de los mismos. En principio los rendimientos obtenidos son bastante bajos, lo que disminuye su interés económico. Sin embargo, desde 1970 vienen realizándose esfuerzos en I+D para desarrollar procesos de pretratamiento en los materiales lignocelulósicos basados en la utilización de disolventes”⁸². El objetivo es emplear disolventes apropiados que pudieran permear en la estructura del material lignocelulósico y destruir su estructura cristalina, provocando así un aumento de la reactividad del material que facilite su hidrólisis. Un método para disolver la lignocelulosa se fundamenta en utilizar etilendiamina (25-30%) y agua más óxido de cadmio (4,5-5,2%) a temperatura ambiente. Este tratamiento hace que la lignocelulosa sea altamente reactiva generando glucosa con elevados rendimientos por hidrólisis enzimática. En el pretratamiento de la lignocelulosa se han utilizado otros disolventes como butanol, amoníaco etc. En general el empleo de estas sustancias para hacer la lignocelulosa más susceptible a procesos biológicos se denomina “proceso organosolv”⁸³.

“Otro proceso de pretratamiento es el AFEX (*amonía freeze explosion*), que ha sido desarrollado para diferentes alimentaciones, incluyendo alfalfa, paja de trigo, hierba, etc. Esta tecnología emplea amoníaco líquido a temperaturas entre 50 y 90°C y elevada presión para permear la biomasa lignocelulósica”⁸⁴. Se produce entonces un desmoronamiento de la estructura de la biomasa generando un material que es mucho más fácil de tratar por degradación microbiológica o enzimática. El proceso AFEX seguido de un tratamiento con celulasas y hemicelulasas produce elevados rendimientos de azúcares a partir de diferentes materias primas y con bajas concentraciones de enzimas. La mayoría del amoníaco empleado en el proceso AFEX puede recuperarse y reutilizarse. Aún se encuentra en fase de desarrollo.

⁸¹ BIOMASS PROGRAM TECHNOLOGIES. Energy Efficiency and Renewable Energy, Department of Energy, EE.UU. www1.eere.energy.gov/biomass/technologies.html.

⁸² LADISCH, M. R., DYCK K., Cellulose to sugars: New path gives quantitative yield *Science* **201**: 743-745- 1979.

⁸³ HOLTZAPPLE, M.T., HUMPREY A. E., Effect of Organosolv Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Poplar. *Biotech and Bioenergy* **6**: 161-173, 1984.

⁸⁴ DALE B. E., MOREIRA M. A freeze explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. Pp 31-43 in Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, vol 12, C.D. Scott eds., New York; Willey&Sons. (1983).

“Otro pretratamiento prometedor consiste en la utilización de agua líquida comprimida a temperaturas superiores a 200°C”⁸⁵, “aunque todavía faltan datos para asegurar que es completamente efectivo y competitivo. Sin embargo, a priori presenta una serie de ventajas potenciales como son: la presurización de la madera a 45-50 atmósferas con la consiguiente descompresión, desliga la estructura de la madera”⁸⁶. “Este método puede emplearse con diferentes alimentaciones y constituye la base de numerosos procesos para desintegrar la biomasa lignocelulósica”⁸⁷. La tecnología se ha desarrollado a escala de planta piloto pero no a escala industrial.

1.8.3 Procesado de las fracciones de biomasa y de sus productos intermedios

1.8.3.1 Hidrólisis enzimática del almidón. Los primeros procesos de hidrólisis del almidón se realizaban químicamente, mediante la utilización de ácidos y temperaturas elevadas (150-200°C). “Estos procedimientos, sin embargo, han sido sustituidos a partir de los años 60 del siglo pasado por otros basados en la utilización de enzimas, principalmente a causa de su mayor rendimiento en glucosa. El proceso se realiza en dos fases, denominadas licuefacción y sacarificación”⁸⁸. La harina de cereal obtenida tras la molienda se introduce en primer lugar en un tanque de licuefacción, donde se mezcla con agua a alta temperatura (88°C) y con la enzima α -amilasa. Esta enzima ataca al almidón al azar, produciendo maltosa (dímero de glucosa) y oligómeros superiores. Después de la licuefacción, la masa resultante se calienta brevemente a 110°C y a continuación se enfría a 60°C, realizándose seguidamente la sacarificación mediante la adición de la enzima glucoamilasa.

La glucoamilasa actúa sobre el extremo no reductor de las moléculas de maltosa y oligómeros superiores, liberando glucosa. En el almidón, además de los enlaces $\alpha(1-4)$, existen puntos de ramificación unidos mediante enlaces $\alpha(1-6)$, que no pueden ser atacados por ninguna de las dos enzimas anteriores. Sin embargo, estos enlaces pueden hidrolizarse mediante una tercera enzima, la pululanasa, que probablemente se encuentra presente como componente minoritario en las preparaciones enzimáticas comerciales. El resultado es la conversión casi completa del almidón en glucosa.

1.8.3.2 Hidrólisis química de la celulosa. La hidrólisis de celulosa para dar sus correspondientes azúcares se puede catalizar químicamente por acción de distintos ácidos, tales como los ácidos sulfúrico, clorhídrico y nítrico. Dado que el ácido sulfúrico es un reactivo barato resulta el más común en este tipo de procesos. En principio, la biomasa se impregna con una disolución diluida de este ácido y se trata a temperaturas entre 140 y 260°C. La alimentación se mezcla con ácido diluido reciclado (1,5-3% dependiendo de la alimentación y de la necesidad de neutralización). El proceso de biorrefino consiste en

⁸⁵ WALSUM VAN, ALLEN S. G., SPENCER M.J., Conversion of Lignocellulosic Pretreated with Hot Compressed Liquid Water to Ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 57/58:157-170. (1996).

⁸⁶ BUNGAY, H ENERGY. *The biomass Options.* New York: John Wiley&Sons. (1981).

⁸⁷ CARRASCO, J.E., SAIZ M. C., NAVARRO A., Effects of Dilute Acid and Steam Explosion Pretreatments on the Cellulose Structure and kinetics of Cellulose Fraction Hydrolysis by Dilute Acids in Lignocellulosic Materials. *Biochem Biotechnol* 45/46:23-34, (1994).

⁸⁸ MCALOON, A., TAYLOR, F., YEE, W., IBSEN, K. Y WOOLEY, R. (2000) Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. National Renewable Energy Laboratory, Department of Energy, EE.UU. www.nrel.gov/docs/fy01osti/28893.pdf.

dos etapas en serie en las que se persigue máximo rendimiento con la mínima generación de productos de degradación. El objetivo de la primera etapa es hidrolizar la mayor parte de la materia en sus intermedios solubles. Suele producirse a una temperatura en torno a 190°C. La segunda etapa opera con la misma concentración de catalizador a 215°C con el objetivo de tratar la fracción de celulosa más resistente. Los productos volátiles se recogen, los residuos sólidos se separan mediante un separador gravitatorio y el ácido se recupera para poder reutilizarlo en el sistema.

También es posible usar ácidos concentrados a temperaturas inferiores (120-140°C). El ácido concentrado rompe los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa convirtiéndola en una masa amorfa. Una vez la celulosa ha sido descristalizada, forma una gelatina homogénea con el ácido. En este punto la celulosa es extremadamente susceptible a la hidrólisis. Al diluir con agua a temperaturas moderadas se hidroliza rápidamente dando glucosa. En estos procesos se obtienen elevados rendimientos de azúcares acompañados de una pequeña proporción de productos de degradación. La rentabilidad económica del proceso depende del éxito en recuperar el ácido a bajo costo.

1.8.3.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa. “La hidrólisis enzimática de la celulosa se realiza mediante un grupo de enzimas denominadas celulasas”⁸⁹. Sin embargo, la celulosa se encuentra de modo natural recubierta por una capa de hemicelulosa y lignina que la protege de la hidrólisis, por lo que es necesario un tratamiento previo de la lignocelulosa para facilitar la acción de las celulasas. La enzima conocida como celulasa es en realidad un sistema complejo de enzimas que actúan conjunta y sinérgicamente sobre la celulosa nativa, causando su descristalización e hidrólisis. Actualmente, se conocen tres clases principales de celulasas:

- Endoglucanasas, que hidrolizan al azar enlaces internos de cadenas solubles o insolubles de celulosa.
- Exoglucanasas, que liberan monómeros (glucanohidrolasa) o dímeros (celobiohidrolasa) de glucosa del extremo de las cadenas de celulosa; y
- β - Glucosidasas, que liberan D-glucosa a partir de los dímeros de celobiosa y de celodextrinas solubles.

En la actualidad se encuentran comercialmente disponibles preparaciones enzimáticas de celulasas para diversas aplicaciones, muchas de las cuales no implican una hidrólisis extensiva de la celulosa, al contrario que lo requerido para su uso en biorrefinerías. Son, por tanto, preparaciones que no están optimizadas para esta finalidad. Por otro lado, su disponibilidad no es lo suficientemente elevada, lo que influye directamente en su alto costo. En ambos aspectos existe, por tanto, un amplio margen de mejora.

⁸⁹ Biomass Program Technologies. Op. cit., p. 56–77.

1.8.3.4 Despolimerización de la lignina. La lignina se encuentra presente en la biomasa lignocelulósica en una proporción en torno al 15-30%. Constituye una parte fundamental de la biomasa que ayuda a mantener unida la matriz celulosa/hemicelulosa aportando flexibilidad a la misma. La estructura molecular de los polímeros constituyentes de la lignina consiste mayoritariamente en anillos aromáticos con grupos metoxi, hidroxilo y propilo, entre otros, que se encuentran distribuidos al azar de forma desorganizada. Estos se encuentran interconectados mediante polisacáridos. La lignina se obtiene por procesos de deslignificación y tiene diversos usos como tal. Sin embargo, las estructuras aromáticas que constituyen la lignina presentan gran potencial como productos químicos intermedios. El problema reside en que la separación y recuperación de estas estructuras es bastante complicada.

La tecnología de deslignificación ha sido y es ampliamente utilizada en industrias como la de producción de papel y de pasta papelera, siendo bien conocidos los procesos Kraft, con sulfito o con sosa. El objetivo de estas tecnologías reside en la eliminación de la lignina de la madera u otros materiales lignocelulósicos como la paja. La mayoría de esta lignina se obtiene como componente mayoritario de los llamados licores negros ("black liquor") y se utiliza para quemar directamente. Supone entonces un combustible de bajo valor.

Hay que considerar que la lignina se encuentra fuertemente modificada según sea el proceso por el cual se haya obtenido. Por ejemplo en el proceso con sulfito se encuentra en forma de lignosulfonatos, en el proceso Kraft la lignina original se convierte en fragmentos de tiolignina de menor peso molecular. El proceso con sosa origina que la lignina se divida en fragmentos más pequeños químicamente no modificados. Algunas compañías han desarrollado tecnologías específicas para recuperar parcialmente la lignina de estos licores y dar aplicaciones a las distintas formas de lignina diferentes a la de combustible (por ejemplo, lignosulfonatos como tensoactivos y dispersantes, alimentación animal u horticultura, lignina Kraft como refuerzo de gomas, sustituto de carbón negro o materia prima para metilsulfonatos, lignina del proceso con sosa para nutrición animal...).

El futuro de la lignina se centra en ser fuente de compuestos aromáticos. El primer paso para convertir la lignina en productos de mayor valor añadido, consiste en su despolimerización con objeto de disminuir su peso molecular. En la actualidad, se están estudiando procesos que para ello emplean bases (KOH, NaOH, Ca(OH)₂) en autoclaves agitados y reactores de flujo pistón a temperaturas moderadas y empleando tiempos de reacción relativamente cortos⁹⁰.

⁹⁰ SMOOK G.A., Handbook for Pulp and Paper Technologies 2nd. Ed. Joint Textbook Committee of the Paper Industry, TAP-PI Atlanta, USA, and CPPA, Montreal Canada.

1.8.4 PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos cuya composición incluye celulosa y lignina enlazadas por cadenas de hemicelulosa. “El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático o microbiano. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse”⁹¹.

“El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten de menos del 20% de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90%⁹². Para el pretratamiento se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de acuerdo a la clasificación de Sun y Cheng”⁹³. “Sin embargo, ninguno de los métodos de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas”⁹⁴. Esto justifica la realización de análisis detallados de estas tecnologías en cada caso en particular.

La síntesis de procesos puede aportar las herramientas necesarias para descartar las opciones con menos perspectivas en forma preliminar, teniendo en cuenta nuevos procedimientos, esquemas y alternativas que se planteen en la etapa de diseño.

Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se forman, junto con los azúcares fermentables, gran cantidad de compuestos que pueden inhibir la fermentación subsiguiente.

Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes de los ácidos orgánicos esterificados a la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Así mismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina (Lynd, 1996; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, b). Por eso, y dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizados, es necesario llevar a cabo la destoxificación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación.

Actualmente se reconocen métodos físicos, físico – químicos, químicos y biológicos, para desarrollar el pretratamiento de la lignocelulosa.

1.8.4.1 Pretratamientos Físicos

- **Pulverizado Mecánico.** En éste procedimiento el material pretratado que generalmente son residuos de madera y forestales (paja, madera dura) desechos de maíz, bagazo de caña, alfalfa consiste en la reducción a astillas, trituración y molienda,

⁹¹ SANCHEZ J., CARDONA C. Producción biotecnológica de alcohol carburante 1: Obtención a partir de diferentes materias primas. 2005

⁹² LYND, Op. cit., p. 403-465.

⁹³ SUN Y, CHENG J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.

⁹⁴ CLAASSEN PAM, VAN LIER JB, LÓPEZ CONTRERAS AM, VAN NIEL EWJ, SIJTSMA L, STAMS AJM, DE VRIES SS, WEUSTHUIS RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.

ésta actividad se realiza en molinos vibratorios de bolas para dar tamaños finales aproximados de 0,2 a 2 mm, o molinos de cuchillas o matillos que dan tamaños finales de 3 a 6 mm.⁹⁵

- **Pirólisis.** Es el procesamiento de sustratos tales como: madera y algodón de desecho que se realiza a temperaturas mayores a los 300°C con formación de productos volátiles y carbón, los residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis suave con ácido sulfúrico para producir entre el 80 al 85 % de azúcares reductores (> 50% de glucosa), puede realizarse al vacío.⁹⁶

1.8.4.2 Pretratamientos Físico – químicos.

- **Explosión a vapor.** Este pretratamiento se realiza para romper bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto, se realiza utilizando vapor saturado a 160 – 260°C, p= 0,69 – 4,85 Mpa, por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica, éste sistema permite altas concentraciones de sólidos, la hidrólisis se logra en un 80 – 100% en hemicelulosa, destruye parte de la xilosa obtenida, se forman inhibidores, por tanto se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con ácido sulfúrico, dióxido de azufre o dióxido de carbono mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores, reduce el tamaño de los sustratos con un menor gasto energético comparado con la pulverización, durante el proceso ocurre cierta despolimerización de la celulosa, la lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.⁹⁷
- **Agua Líquida Caliente.** Se trata del rompimiento del bagazo de caña con agua caliente presurizada, a temperaturas que oscilan entre los 170 y los 230°C en un tiempo comprendido entre 1 y 46 minutos, se parte de concentraciones de sólidos menores al 20%, durante el procesamiento ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La hidrólisis está en el orden del 80 al 100% de la hemicelulosa con producción de más del 50% de oligómeros; la lignina sufre una solubilización parcial de entre el 20 al 50%, la conversión de la celulosa es mayor del 90% con baja o nula formación de inhibidores.⁹⁸
- **Explosión de Fibra con Amoniaco.** Se utiliza para romper materiales herbáceos (paja de trigo y cebada cascarilla de arroz, desechos de maíz), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y bagazo, durante el tratamiento se aplica una dosis de 1 a 2 kilogramos de amoniaco por kilogramo de biomasa seca a 90°C por 30 minutos. Se requiere la recuperación del amoniaco, no produce inhibidores. La conversión de la celulosa durante la hidrólisis es mayor al 90%, especialmente cuando el sustrato es bagazo o hierba de bermuda. Para la biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente ya que la conversión de la celulosa es inferior al 50%. Se presenta cierta despolimerización de la celulosa y la hidrólisis de la hemicelulosa está entre el 0 y el 60% dependiendo de la humedad, con producción de oligómeros en un 90% y ocurre cierta solubilización de la lignina aproximadamente entre el 10 y el 20%.⁹⁹

⁹⁵ Sun y Cheng, Rivers y Emert, Cadoche y López. En: Sanchez O. Op. cit., p.5.

⁹⁶ Ibid., p. 5.

⁹⁷ Ibid., p. 5.

⁹⁸ Ibid., p. 5.

⁹⁹ Ibid., p. 5.

- **Explosión con CO₂.** Se utiliza para el rompimiento de sustratos como alfalfa, mezcla de papel reciclado y bagazo de caña usando para ello una dosis de 4 kilogramos de CO₂ por kilogramo de fibra a una presión de 5,62 Mpa, el resultado es la conversión de la celulosa a glucosa durante la hidrólisis mayor al 75% y no forma compuestos inhibitorios.¹⁰⁰

1.8.4.3 Pretratamientos Químicos.

- **Ozonólisis.** Este pretratamiento rompe fibras de paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuate, pino, paja de algodón y aserrín de álamo, se utiliza ozono que desarrolla una reacción a temperatura y presión ambiental con degradación principalmente de lignina y conversión de la celulosa al 75% y no se forman inhibidores.¹⁰¹
- **Hidrólisis con Acido Diluido.** Este procedimiento permite romper desechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, pastos y paja de trigo, se utiliza ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico al 1- 5 % en un proceso de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a temperatura de entre 160 – 200°C o en procesos por lotes a alta carga de sólidos (10 -40%) a temperatura de entre 120 – 160°C a presiones cercanas a 1 Mpa. Durante el proceso se obtiene una hidrólisis de entre el 80 al 100 % de la hemicelulosa y altas conversiones de Xilano a xilosa, la alta temperatura del proceso es favorable para la hidrólisis de la celulosa y se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática, ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.¹⁰²
- **Hidrólisis con ácido concentrado.** Este proceso permite el rompimiento de fibras de bagazo de caña y aserrín de madera dura; se utiliza ácido sulfúrico al 10-30% a 170-190°C en una relación 1:1,6 sólido – líquido, ácido paracético 21 -60% en un sistema tipo silo. Durante el proceso se requiere la recuperación del ácido y son necesarios tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido.¹⁰³
- **Hidrólisis Alcalina.** Este tratamiento permite la hidrólisis de madera dura, pajas con bajo contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña y hojas de caña de azúcar, se utiliza hidróxido de sodio diluido a 60°C por 24 horas, durante el proceso se consigue la remoción de la lignina entre un 24 y un 55% para la madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, es difícil la remoción para maderas blandas con contenidos mayores al 26% en lignina. Se presenta una hidrólisis de la hemicelulosa mayor al 50% y un sustancial hinchamiento de la celulosa y su conversión en un 78% en paja de arroz y 67.1% en bagazo de caña. La conversión durante la hidrólisis de la celulosa en un proceso convencional es aproximadamente del 54% con hidróxido de sodio más peróxido de hidrógeno y de 65% en hojas de caña de azúcar.¹⁰⁴
- **Deslignificación Oxidativa.** Proceso utilizado para el rompimiento del bagazo de caña con peróxidasa y peróxido de hidrógeno al 2% y a 20°C por 8 horas que termina en

¹⁰⁰ Ibid., p. 5.

¹⁰¹ Ibid., p. 6.

¹⁰² Ibid., p. 6.

¹⁰³ Ibid., p. 6.

¹⁰⁴ Ibid., p. 6.

la solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa y la conversión de la celulosa durante la hidrólisis es del 95%.¹⁰⁵

- **Proceso Organosolv.** Con éste proceso es posible la hidrólisis de la lignina de madera de álamo usando solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. Se logra el rompimiento de las uniones de hemicelulosa, se solubiliza casi totalmente la lignina, hidrólisis casi total de la hemicelulosa, altos rendimientos de xilosa y es necesario remover los solventes del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.¹⁰⁶

1.8.4.4 Pretratamiento Biológico.

- **Pretratamiento con Hongos.** Se ha utilizado para el aprovechamiento de paja de trigo y desechos de maíz, usando para ello hongos de la pudrición blanca, blanda y parda que tienen producción de celulasas por fermentación en sustrato sólido. Durante el proceso los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin –peróxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas, es un proceso muy lento llevado a cabo por hongos tales como: *Pleurotus ostreatus* que convierte el 35% de la paja de trigo en azúcares en cinco semanas y hongos de la pudrición parda que degradan celulosa y hongos de la pudrición blanca, blanda que degradan celulosa y lignina.¹⁰⁷

- **Enzimas celulolíticas.** Al estudiar las enzimas celulasas que utilizan naturalmente los hongos y bacterias para degradar la celulosa, se ha encontrado que la hidrólisis (degradación) de este polímero es muy compleja. Por eso, ha sido necesario investigar las estructuras y funciones de estas enzimas para conocer con mayor detalle los mecanismos enzimáticos involucrados en la degradación de la celulosa.

Si se revisa la estructura y la composición de los sustratos celulósicos naturales, principalmente los materiales celulares de las plantas, se observa que están compuestos de polisacáridos heterogéneos y entrelazados con una importante variación en el grado de cristalinidad en la hemicelulosa y las pectinas embebidas en la lignina. Los microorganismos producen enzimas múltiples para degradar los materiales de que están compuestos las plantas, a éste grupo de enzimas se les denomina sistema enzimático. La función de éstas se ha considerado en términos de su acción sobre las fibras de celulosa específicamente, sin embargo, hoy es considerada la actividad de éstos sistemas enzimáticos sobre la hemicelulosa y se conoce que éstas son comúnmente producidas por microorganismos celulolíticos, incluye a los complejos enzimáticos celulolíticos de bacterias aerobias y a sistemas no complejos enzimáticos de hongos y bacterias anaerobias. Para los microorganismos que realizan la hidrólisis y el metabolismo de celulosa insoluble, las celulasas extracelulares deben ser producidas libres o asociadas a las células.

¹⁰⁵ Ibid., p. 6.

¹⁰⁶ Ibid., p. 6.

¹⁰⁷ Ibid., p. 6.

1.9 SISTEMA CELULASA

Según Lee R. Lynd, Paul J. Weimer¹⁰⁸, en su artículo *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*, los componentes del sistema celulasa primero fueron clasificados basados en sus modos de acción catalítica y han sido más recientemente clasificados basados en sus propiedades estructurales, tres tipos mayores de actividad enzimática se han encontrado: a) Endoglucanasas o 1-4 beta -D- glucan 4 glucanohidrolasas. b) Exoglucanasas, incluyendo a 1-4 beta - D- glucan - glucanohidrolasa, también conocidas como celodextrinasas y 1-4 beta - D- glucan - celobiohidrolasas y c) beta glucosidasas o beta glucósido - glucohidrolasas.

Las endoglucanasas cortan al interior de la biomasa amorfa que forman las cadenas de polisacárido de celulosa generando oligosacáridos de varias longitudes y consecuentemente nuevos extremos terminales en la cadena.

Las exoglucanasas actúan a continuación en los extremos terminales reductores y no reductores del polisacárido de celulosa liberando glucosa si el ataque lo realiza la enzima glucanohidrolasa o celobiosa si lo realiza la enzima celobiohidrolasas como los mayores productos.

Las exoglucanasas también pueden actuar sobre la celulosa microcristalina, presumiblemente desnudando las cadenas de celulosa desde la estructura microcristalina.

Las beta glucosidasas hidrolizan celodextrinas solubles y celobiosa a glucosa. Las celulasas se distinguen de otras, glucosa - hidrolasas por su habilidad para hidrolizar enlaces beta 1-4 glucosídicos en la celulosa entre otros residuos glucosídicos. El rompimiento enzimático de los enlaces beta 1-4 glucosídicos en la celulosa procede a través de un mecanismo de hidrólisis ácida, usando un protón de un donador o una base. Los productos de la hidrólisis pueden resultar en la inversión o en la retención (mecanismo de doble reemplazo) de la configuración anomérica del carbono 1 en el extremo reductor.

La insoluble y recalcitrante naturaleza de la celulosa representa un reto para el sistema celulasa. Una característica general de la mayoría de las celulasas es su estructura modular a menudo incluyendo un módulo catalítico y un módulo de enlace al carbohidrato llamados C.B.M. El efecto C.B.M. de adherencia a la superficie de la celulosa, presumiblemente facilita la hidrólisis de la celulosa acercando el dominio catalítico del complejo enzimático aproximando al sustrato la celulosa insoluble, la presencia de C.B.Ms es particularmente importante para la iniciación del proceso y los siguientes eventos mediados por la exoglucanasa.

El sistema celulosa exhibe una alta actividad colectiva que es más que la sumatoria de las actividades individuales de las enzimas que lo conforman, a este fenómeno se le conoce como sinergismo, se han reportado cuatro formas de sinergismo: 1) Una sinergia Exo - Endo entre las exoglucanasas y las endoglucanasas. 2) una sinergia Exo - Exo entre las exoglucanasas que produce desde los terminales reductores y no reductores de las cadenas de celulosa. 3) La sinergia entre Exoglucanasas y beta glucosidasas que

¹⁰⁸ Lee R. Lynd, Paul J. Weimer. Op. cit., p.1-73.

remueven la celobiosa y las celodextrinas como producto de la actividad de las dos primeras enzimas y 4) Una sinergia intramolecular entre el dominio catalítico y los C.B.Ms.

El sistema celulasa no es tan sólo una aglomeración de enzimas que representa a los tres grupos de enzimas con o sin CBMs, actúa de una manera coordinada para hacer más eficiente la hidrólisis de la celulosa. Los microorganismos han adoptado diferentes acercamientos para ser eficaces en la hidrólisis de la celulosa, la cual de forma natural está presente en partículas insolubles o embebidas dentro de una matriz de hemicelulosa y lignina. Los hongos filamentosos celulolíticos y bacterias actinomycetes tienen la habilidad para penetrar el substrato celulósico usando para ello hifas alargadas que se extienden, así a menudo presentando su sistema celulolítico en cavidades dentro de las partículas de celulosa.

La producción de celulosa libre con o sin CBMs puede ser suficiente para ocasionar una hidrólisis eficiente bajo estas condiciones. Las enzimas en éste sistema celulasa no forman un complejo de alto peso molecular estable y por lo tanto son llamados sistemas no complejos.

En comparación, las bacterias anaeróbicas carecen de la habilidad de penetrar de forma efectiva el material celulósico y quizá haya tenido que encontrar mecanismos alternativos para degradar la celulosa y tener acceso a los productos de la hidrólisis de la celulosa en presencia de otros microorganismos competidores y con una disponibilidad limitada de ATP para la síntesis de la celulasa, esto permitió el desarrollo de sistemas de celulasa complejos llamados Celulosomas y en los cuales su posición al interior de las células que producen celulasa es en el sitio de la hidrólisis, así como se observa en el género *Clostridium* y en las bacterias del rumen.

1.9.1 Sistema Celulasa No Complejo. Las celulasas que provienen de los hongos aerobios han sido más estudiadas que cualquier celulasa de cualquier otro grupo fisiológico y las celulasas fúngicas están presentes y dominan las aplicaciones industriales de las celulasas.

De esta forma, y según lo expuesto por Lynd *et al.*, 2002; Zhang y Lynd, 2004¹⁰⁹, la mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, del cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas. Las primeras hidrolizan los enlaces β (1,4) de la cadena de celulosa a partir de los extremos no reductores o reductores liberando celobiosa o inclusive glucosa, mientras las endoglucanasas rompen estos mismos enlaces en forma aleatoria dentro de la cadena. Desafortunadamente, las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, por lo que se agrega β -glucosidasa de otra fuente para complementar la acción de las celulasas de este hongo. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

Trichoderma reesei produce al menos dos exoglucanasas (CBHI y CBHII), cinco endoglucanasas (EGI, II, III, IV y la V) y dos beta glucosidasas (BGLI y BGLII). Los esfuerzos que se han realizado en las últimas décadas para incrementar la eficiencia de la celulasa han resultado en la generación de cepas microbianas que producen arriba de

¹⁰⁹ Lee R. Lynd, Paul J. Weimer. Op. cit., p.1-73.

0,33 gramos de proteína/gramo de carbohidrato utilizable. La necesidad de las dos exoglucanasas (celobiohidrolasas) ha sido atribuida a su particular preferencia por los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa de la celulosa microcristalina. Esta idea también ha sido soportada por la sinergia exo-exo observada entre estas dos enzimas, los procesos de cristalografía han elucidado la estructura tridimensional de las dos celobiohidrolasas. CBI contiene 4 anillos o curvas que dan origen a un túnel con una longitud de 50 Å; CBII contiene en la superficie dos anillos o curvas que dan origen a un túnel de 20 Å, estos túneles demuestran ser esenciales a las celobiohidrolasas en el proceso de escindir las cadenas de celulosa desde los terminales reductores y no reductores. La estructura tridimensional de CBHI ha confirmado que la celobiosa es el mayor producto hidrolítico mientras la cadena de celulosa pasa a través del túnel. Ocasionalmente, la celotriosa o la glucosa son liberadas durante los estados iniciales de la hidrólisis. La estructura de EGI (naturalmente relacionada a CBHII) también ha sido determinada ó explicada, revela la presencia de anillos o curvas cortas que crean o generan una muesca o canal más que un túnel, la muesca presumiblemente permite la entrada de las cadenas de celulosa para el próximo clivaje o escisión. Un canal similar se observó en la estructura de EGIII, una endoglucanasa que carece de CBM.

La actividad celobiohidrolasa es esencial para la hidrólisis de la celulosa microcristalina. CBHI y CBHII son los componentes principales del sistema celulasa de *T. reesei*, representando el 60% y el 20% respectivamente del total de la proteína celulasa producida por el hongo. El importante papel de CBM en la actividad de estas dos enzimas para asegurar el enlace o unión durante el proceso ha sido demostrado claramente. Sin embargo, las dos celobiohidrolasas son muy lentas en provocar la disminución o el grado de polimerización de la celulosa. Las endoglucanasas, se pensaba eran principalmente responsables por el decrecimiento del grado de polimerización por que realizan una escisión o clivaje interno de las cadenas de celulosa en las regiones relativamente amorfas y de esta manera generar nuevas terminales de cadena susceptibles a la acción de las celobiohidrolasas.

La necesidad de cinco especies de endoglucanasas en el sistema celulasa de *Trichoderma reesei* no ha sido claramente explicada.

1.9.2 Hidrólisis Enzimática de Material Lignocelulósico. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en Etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado.

- **Hidrólisis y Fermentación de material Lignocelulósico en la Obtención de Etanol.** Las etapas de hidrólisis y fermentación se pueden realizar en forma secuencial (hidrólisis y fermentación separadas, SHF por sus siglas en inglés) o llevando a cabo en una sola unidad la hidrólisis y la fermentación al mismo tiempo (sacarificación y fermentación simultáneas; SSF).

El microorganismo más utilizado para este proceso es *S. cerevisiae* que fermenta las hexosas presentes en el hidrolizado más no las pentosas. La SSF muestra mayores

rendimientos de Etanol y menores consumos energéticos, pero las temperaturas de operación no son óptimas para la hidrólisis y se requiere de mayores dosis de enzimas.

Según lo citado por Wyman *et al*¹¹⁰. En Lee R. Lynd, Paul J. Weimer¹¹¹. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, se realizaron una evaluación de los rendimientos de alcohol a partir de diferentes materiales lignocelulósicos en procesos de SSF y de SHF por lotes a 37°C con diferentes dosis de enzima y tiempos de proceso de 7-8 días. La tusa de maíz, los tallos y hojas de maíz, la paja de trigo y el pasto llorón, en su orden, alcanzaron altas tasas de hidrólisis y altos rendimientos de Etanol durante la SSF; los diferentes tipos de madera pretratada estudiados mostraron conversiones similares de celulosa a Etanol y rendimientos ligeramente inferiores a los desechos de maíz, los cuales presentaron los mayores valores (92-94%). South *et al.* (1993) llevaron a cabo ensayos de SSF en reactores por lotes adicionando celulasas a mezclas de madera dura y de álamo pretratadas con ácido diluido utilizando *S. cerevisiae*.

• **Sustancias Inhibitorias Producto del Pretratamiento del Material Lignocelulósico.** Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes, de los ácidos orgánicos esterificados a la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Así mismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina¹¹². Por eso, y dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizados, es necesario llevar a cabo la detoxificación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación.

1.10 MICROBIOLOGÍA DE LA TRANSFORMACIÓN DE RESIDUOS CELULÓSICOS EN AZÚCARES FERMENTABLES

Los microorganismos celulolíticos (que degradan celulosa) desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero. Existe una diversidad de estos microorganismos, bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos que producen las enzimas celulasas. Algunos de ellos son:

Dentro del grupo de hongos aeróbicos, el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* es uno de los más estudiados y se caracteriza por su efectividad en la degradación de la celulosa nativa y cristalina mediante su complejo celulolítico que presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa). Otra ventaja que presenta el uso de este microorganismo, es su estabilidad en reactores agitados bajo condiciones de pH ácido y a 50 °C durante 48 hs.

Entre los microorganismos, los termófilos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90 °C.

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa; pero tienen una

¹¹⁰ Ibid., p. 1-73.

¹¹¹ Lee R. Lynd, Paul J. Weimer. Op. cit., p.1-73.

¹¹² Ibid., p. 1-73.

característica particular, en especial las enzimas de *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la propia glucosa o celobiosa que producen.

En la actualidad existen disponibles numerosos preparados enzimáticos comerciales que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa, β -1,4-glucosidasa). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*.

Otros Microorganismos Útiles En La Transformación Del Bagazo son: levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoides*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces ovaru*, *Saccharomyces pastorianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus* IMB3, - *Pichia stipites*), Mohos / Hongos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Candida shehatae*), Bacterias (*Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacter mathrani*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*).

1.10.1 Consorcios Microbianos. La dinámica poblacional de cultivos mixtos y secuenciales en fermentaciones de derivados de la caña de azúcar es un problema muy interesante desde el punto de vista teórico y tecnológico.

Por cultivos mixtos o consorcios nos referimos a que se encuentran presentes desde un inicio más de una especie/estirpe de microbio y por cultivo secuencial a que serán añadidas a lo largo de la fermentación. Dichos procesos tienen un papel fundamental en la industria de bebidas fermentadas, de ahí la importancia de su estudio y modelado. Los modelos de estos procesos deben representar la dinámica de múltiples especies de microorganismos que crecen en una mezcla de sustratos.

Durante décadas la investigación en biotecnología se enfocó en cultivos puros, ahora los efectos sinérgicos en cultivos mixtos de microorganismos están siendo objeto de un creciente interés (Schink, 2002).

La dinámica del cultivo mixto de microorganismos en mezclas de sustratos es un problema muy interesante desde el punto de vista teórico y tecnológico. Hoy en día se reconoce que para entender la presencia, el crecimiento y el papel que juegan los microorganismos en los bioprocesos se necesita un enfoque de ecología microbiana (Días & Wachter, 2003)¹¹³. Los cultivos mixtos que crecen en mezclas de sustratos juegan un papel fundamental en la bioingeniería.

La producción de bioetanol, es un ejemplo de mucho interés. La materia prima usada en la fermentación para producirlo consiste típicamente en una mezcla de hexosas y pentosas. Por tanto el bioetanol es el producto de la transformación de una mezcla de sustratos mediante microorganismos.

¹¹³ DÍAS RG & WACHER RC (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latin. Microbiol.* 45 (1-2): 30-40.

Cuando un microorganismo crece en presencia de al menos dos sustratos, uno de ellos es normalmente agotado primero, lo que resulta en un cambio en la pendiente de la curva de crecimiento de biomasa. La población de levaduras usadas en la producción de bioetanol, a escala industrial, puede variar de acuerdo con las condiciones particulares del proceso de cada planta así como del estrés que el ambiente fermentativo impone a los consorcios de microorganismos. Por ello, las levaduras aisladas de una industria en particular pueden estar adaptadas a dichas condiciones y por tanto son mejores para ese proceso que una cepa comercial pura (da Silva-Filho *et al.*, 2005).

Es muy importante la identificación y el entendimiento de las interacciones que ocurren en estos consorcios de levaduras y bacterias. Los trabajos pioneros de Jacob Monod y J. B. S. Haldane han servido como un punto de inicio de importantes modelos matemáticos que dan cuenta de diferentes aspectos del crecimiento microbiano en monocultivos por lote, lote-alimentado y continuos.

Estos trabajos suponen cultivos puros. “Actualmente existe una vasta cantidad de artículos sobre modelos matemáticos de crecimiento microbiano (Nielsen *et al.*, 2003)”¹¹⁴. Sin embargo, en el ámbito de cultivos mixtos la literatura se reduce considerablemente. Por supuesto, en general, cuando la complejidad de un problema crece, la posibilidad de analizarlo en términos precisos disminuye.

En el modelado de la mayoría de estos sistemas biológicos se asume de manera implícita que son de naturaleza continua, aplicando las ecuaciones diferenciales como la herramienta para su modelado.

Las variables analizadas son denominadas estados, y son propiedades tales como la concentración de microorganismo (biomasa en g/l), concentración del producto (g/l), y concentración de sustrato (g/l); y en algunos casos concentración interna de enzimas. Sin embargo todos estos estados son muy difíciles de medir (sino es que imposible) en tiempo real. Se necesitan desarrollar modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias que contemplen entre sus estados variables que sean fácilmente monitoreables en tiempo real. Dichos modelos permitirían el desarrollo de controladores que hagan frente a las perturbaciones inherentes a estos sistemas.

“Se ha descrito como es posible inferir teóricamente la presencia de cultivos mixtos a partir de datos de biomasa total, usando una transformada ondeleta (Ibarra-Junquera *et al.*, 2006^a)”¹¹⁵. La idea central desarrollada por Ibarra-Junquera *et al.*, (2006^a) se basa en el hecho de que todo evento a nivel metabólico (cambio de sustrato) o a nivel de interacciones entre especies (crecimiento mixto con competencia o sin ella) genera la presencia de singularidades en la señal de biomasa total.

1.10.2 Fisiología De Microorganismos Celulolíticos

- **Preferencia por el sustrato.** El amplio rango de diversidad catabólica entre microorganismos es una de las características distinguibles del mundo microbiano. El

¹¹⁴ NIELSEN J, VILLADSEN J & LIDEN G (2003) Bioreaction Engineering Principles. Kluwer Academic Plenum Publishers, USA.

¹¹⁵ IBARRA-JUNQUERA V, ESCALANTE-MINAKATA P, MURGUÍA JS & ROSU HC (2006) Inferring mixed-culture growth from total biomass data in a wavelet approach. *Physica A*. 370: 777-792.

rango de esta diversidad varía ampliamente entre especies individuales, desde algunas especies altamente especializadas las cuales pueden utilizar uno o muy pocos substratos como fuente de energía hasta microorganismos altamente versátiles que pueden utilizar alrededor de 100 compuestos como la única fuente de carbono.

Según Nishise¹¹⁶, Poulsen¹¹⁷, y Rajoka¹¹⁸, en general los microbios celulolíticos se encuentran muy cerca del rango de los organismos especialistas. Ellos son principalmente degradadores de carbohidratos y generalmente son incapaces de utilizar proteínas y lípidos (o sus componentes) como una fuente de energía para su crecimiento. Los microorganismos celulolíticos nativos del suelo por ejemplo, la bacteria *Cellulomonas* y *Cytophaga* y la mayoría de los hongos, pueden generalmente utilizar una variedad de otros carbohidratos además de la celulosa.

“Las especies celulolíticas anaerobias por ejemplo, aquellas del género *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, y *Clostridium*, están más limitadas en el rango de los carbohidratos que les son útiles, y crecen sobre la celulosa y sobre sus productos hidrolíticos, pero no crecen a menudo sobre monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos basados en azúcares que no sean a base de glucosa”¹¹⁹, “*C. thermocellum* y *R. albus* usan celobiosa en lugar de glucosa cuando los dos substratos se hallan presentes”¹²⁰.

“Unas pocas bacterias anaerobias celulolíticas pueden utilizar Xilano”¹²¹. La naturaleza especialista de los microbios celulolíticos anaerobios probablemente resulte principalmente del desarrollo de una maquinaria enzimática especializada para la hidrólisis de la celulosa, el significativo esfuerzo metabólico dedicado para su síntesis y otras características peculiares para la utilización de la celulosa.

Estas características junto con el alto valor calórico y la abundancia natural de la celulosa en sí misma, aplica una presión selectiva sobre los microorganismos para su utilización en este tipo de procesos, en particular si el organismo desarrolla una estrategia para posicionarse de tal forma que pueda obtener el acceso a los productos de hidrólisis de la celulosa. Un microorganismo especialista, suficientemente bien adaptado a la utilización de la celulosa, es improbable que pase hambre en cualquier hábitat (natural o artificial), recibiendo una carga periódica de biomasa vegetal.

Algunas de las más recientes especies anaerobias celulolíticas descritas (*Anaerocellum thermophilum*¹²², *C. saccharolyticus*¹²³ y *Halocella cellulolytica*¹²⁴ muestran un espectro

¹¹⁶ NISHISE, H., A. OGAWA, Y. TANI, AND H. YAMADA. 1985. Studies on microbial, glycerol dehydrogenase. 4: glycerol dehydrogenase and glycerol dissimilation in *Cellulomonas* sp. NT3060. Agric. Biol. Chem. 9:629–636.

¹¹⁷ POULSEN, O. M., AND L. W. PETERSEN. 1988. Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:480–484.

¹¹⁸ RAJOKA, M. I., AND K. A. MALIK. 1997. Cellulase production by *Cellulomonas bizoteya* cultured in media containing different cellulosic substrates. Biores. Technol. 59:21–27

¹¹⁹ NG, T. K., AND J. G. ZEIKUS. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J. Bacteriol. 150:1391–1399.

¹²⁰ THURSTON, B., K. A. DAWSON, AND H. J. STROBEL. 1993. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. Appl. Environ. Microbiol. 59:2631–2637

¹²¹ HUNGATE, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

¹²² SVETLICHNYI, V. A., T. P. SVETLICHNAYA, N. A. CHERNYKH, AND G. A. ZAVARZIN. 1990. *Anaerocellum thermophilum*, new genus new species, an extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot springs in the valley of geysers (Russian SFSR, USSR). Mikrobiologiya 59:598–604.

más amplio de utilización de carbohidratos con compuestos tales como el almidón y diferentes monosacáridos los cuales sirven de diversos substratos. Parece haber una tendencia a tener una mayor gama de carbohidratos útiles en entornos más extremos como ambientes termófilos y halófilos, quizá como consecuencia de una menor cantidad de insumos de celulosa, posiblemente en combinación con la presencia de un número menor de especies que compiten en éstos hábitats.

Los requerimientos de nutrientes para el crecimiento de especies celulolíticas incluye la disponibilidad de nitrógeno, fósforo, y azufre más un complejo estándar de macro y micro nutrientes y varias vitaminas, (ejemplo, ácidos grasos de cuatro o cinco carbonos ramificados y volátiles en el caso de la predominante bacteria celulolítica ruminal). Aunque los nutrientes adicionales presentes en los medios de cultivos complejos (ejemplo, peptonas, y extracto de levaduras), no se requieren usualmente, ellos a menudo estimulan el crecimiento de cepas de individuos, en algunas ocasiones dramáticamente.

- **Formación y Adhesión de Los Complejos Celulosa-Enzima –Microbio.** El catabolismo de la celulosa involucra ambas condiciones: la despolimerización enzimática de la celulosa insoluble y la utilización celular de los productos de la hidrólisis, hay dos estrategias principales para la utilización de la celulosa cristalina, las bacterias aeróbicas y los hongos no adhieren (o adhieren únicamente débilmente) a la celulosa produciendo celulasas no complejas y oxidación de los productos hidrolíticos a CO₂ y agua.

Los hongos y bacterias anaeróbicas despliegan una gran tendencia (en algunos casos como un requerimiento) a adherir a la celulosa y producen un complejo celulasa primario que se ejemplifica por el organelo celulosoma y producen una variedad de fermentaciones y de productos finales, estas dos estrategias no son completamente dicotómicas, ya que diversas especies muestran o expresan diferentes combinaciones de estas características.

“La hidrólisis de la celulosa requiere la unión previa de las enzimas a la celulosa, bien sea conformando, un complejo binario enzima – substrato o un complejo terciario celulosa-enzima- microbio (CEM). Algunas células con sistemas no complejos (ejemplo la cepa *Cellulomonas sp* NRCC 2406”¹²⁵ “muestra una tendencia a adherir a la celulosa aunque tal contacto no parece ser necesario para la utilización de la celulosa”¹²⁶.

“En el hongo *T. reesei*, una considerable actividad celulasa está localizada en la superficie de la hifa de crecimiento”¹²⁷, “y crece en maíz en un reactor de lecho fluidizado como una biopelícula de 30 micras de diámetro, la cual presumiblemente mantiene el contacto de

¹²³ RAINEY, F. A., A. M. DONNISON, P. H. JANSSEN, D. SAUL, A. RODRIGO, P. L. BERGQUIST, R. M. DANIEL, E. STACKEBRANDT, AND H. W. MORGAN. 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov.: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. FEMS Microbiol. Lett. 120:263–266.

¹²⁴ SIMANKOVA, M. V., N. A. CHERNYCH, G. A. OSIPOV, AND G. A. ZAVARZIN. 1993. *Halocella cellulolytica*, gen. nov. sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. Syst. Appl. Microbiol. 16:385–389.

¹²⁵ VLADUT-TALOR, M., T. KAURI, AND D. J. KUSHNER. 1986. Effects of cellulose on growth, enzyme production and ultrastructure of a *Cellulomonas* species. Arch. Microbiol. 144:191–195.

¹²⁶ KAURI, T., AND D. J. KUSHNER. 1985. Role of contact in bacterial degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Ecol. 31:301–306.

¹²⁷ BUSTO, M. D., N. ORTEGA, AND M. PEREZ-MATEOS. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. Biores. Technol. 57:187–192.

las hifas con la celulosa”¹²⁸. Durante la degradación de las paredes celulares de las plantas están en estrecha proximidad al sustrato incluso si aquellas no están estrictamente adheridas y en éste medio ambiente confinado la pérdida de enzimas y de productos hidrolíticos debida a la difusión y a la convección es probablemente limitada.

Para las bacterias anaeróbicas, la adhesión de las células a la celulosa es mucho más común, y para algunas especies parece ser un requerimiento para lograr una rápida y eficiente hidrólisis. En diversas especies, por ejemplo, *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, y *F. succinogenes*, la actividad celulolítica extracelular puede ser fácilmente analizada en cultivos estacionarios y los sobrenadantes y los cultivos han servido como un punto de partida para el aislamiento de docenas de enzimas celulasas.

“Sin embargo, la adhesión defectuosa del mutante *C. thermocellum*, despliega una hidrólisis substancialmente reducida y estos mutantes son a menudo inestables regresando al fenotipo adherente”¹²⁹.

En las fases tempranas del crecimiento en cultivo estacionario, *C. thermocellum*¹³⁰, y *C. cellulolyticum*¹³¹, se encuentran en estrecho contacto con la celulosa, y la adhesión de *C. thermocellum* ha sido explicada por la presencia de un módulo de unión a la celulosa dentro del complejo celulosoma¹³², los cuales están anclados a las celdas a través de la modificación de la cohesina tipo II en el dominio terminal de la proteína estructural¹³³.

Entre las bacterias ruminales, la adhesión parece ser incluso más pronunciada que en los clostridios *F. succinogenes* los cuales producen una serie de proteínas de unión o enlace con la celulosa, algunas de las cuales tienen actividad endoglucanasa¹³⁴ y una fina glicoproteína glicocalix que resulta en una fuerte adhesión a la celulosa¹³⁵.

Al igual que con *C. thermocellum*, la adhesión defectuosa del mutante de *F. succinogenes* S85 muestra poca o ninguna actividad para degradar la celulosa y revierte rápidamente al fenotipo adherente¹³⁶. *R. flavefaciens* y *R. albus*, producen un espeso y tenaz glicocalix¹³⁷, para la *F. succinogenes* y para el ruminococo la inhibición de la adhesión célula – celulosa o el desprendimiento de las células reduce o impide

¹²⁸ TENDERDY, R. P., W. H. RHO, AND A. M. MOHAGHEGHI. 1991. Liquid fluidized bed starter culture of *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Biochem. Biotechnol. 27:195–204.

¹²⁹ BAYER, E. A., R. KENIG, AND R. LAMED. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. J. Bacteriol. 156:818–827.

¹³⁰ NG, T. K., P. J. WEIMER, AND J. G. ZEIKUS. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. Arch. Microbiol. 114:1–7.

¹³¹ GELHAYE, E., H. PETITDEMANGE, AND R. GAY. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. J. Bacteriol. 175:3452–3458.

¹³² BAYER, E. A., R. KENIG, AND R. LAMED. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. J. Bacteriol. 156:818–827.

¹³³ SHOHAM, Y., R. LAMED, AND E. A. BAYER. 1999. The celulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends Microbiol. 7:275–281.

¹³⁴ MIRON, J., AND C. W. FORSBERG. 1999. Characterisation of cellulose-binding proteins that are involved in the adhesion mechanism of *Fibrobacter intestinalis* DR7. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:491–497.

¹³⁵ KUDO, H., K.-J. CHENG, AND J. W. COSTERTON. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. Can. J. Microbiol. 33:267–271.

¹³⁶ GONG, J. H., AND C. W. FORSBERG. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 and adherence-defective mutants to cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 55:3039–3044.

¹³⁷ COSTERTON, J. W., K. J. CHENG, G. G. GESEY, T. I. LADD, J. C. NICKEL, M. DASGUPTA, AND T. J. MARRIE. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41:435–464.

completamente la adherencia impidiendo la utilización de la celulosa¹³⁸, por lo tanto, la adherencia parece ser una estrategia importante para la utilización de la celulosa entre las bacterias anaeróbicas y el complejo ternario CEM es probablemente el mayor agente de la celulolisis.

El papel de las celulasas libres de células es menos claro que el papel de la celulasas que hace parte del complejo CEM. Mientras que las enzimas libres de células pueden ser capaces de hidrolizar la celulosa en un ensayo in vitro, estas enzimas pueden competir en un cultivo microbiano con celulasas adherentes a las células.

Durante el crecimiento continuo de *F. succinogenes*¹³⁹ y *R. flavefaciens*¹⁴⁰ en celulosa – limitada quimiostato, ambas actividades: CMCasa y Avicelasa fueron esencialmente indetectables en los sobrenadantes del cultivo a pesar de las altas tasas de remoción de celulosa del cultivo. Es poco probable que la falta de celulosa libre de células se haya debido a la adsorción de celulasas extracelulares de la celulosa, por que las partículas de la superficie de la celulosa fueron completamente colonizadas por las bacterias y sus glycocalis, no dejando un margen para una mayor absorción de enzimas libres. Entre los anaerobios celulolíticos no hay demostración experimental que hasta la fecha la celulosa secretada haga parte de una actividad celulolítica de un activo crecimiento continuo, con la excepción de *Clostridium stercorarium*¹⁴¹.

La habilidad para digerir la celulosa está ampliamente distribuida entre varios géneros del dominio bacteria y en varios grupos fúngicos del dominio Eucaria dentro de las eubacterias hay una concentración considerable de capacidades celulolíticas entre los ordenes predominantes aeróbicos Actinomycetales (Phylum Actinobacteria) y el orden Clostridiales anaeróbicos (Phylum Firmicutes), la utilización de la celulosa por parte de los hongos está muy distribuida desde los protistas Chytridomycetes hasta los avanzados basidiomicetes.

La capacidad celulolítica también se ha registrado para al menos 700 especies de Zygomycetes, algunos miembros del género Mucor del cual es bien conocido su habilidad para utilizar substratos solubles. Del mismo modo diversas subdivisiones de Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes, incluye géneros de Bulgaria, Chaetomium, y Helotium; Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Geotrichum, Myrothecium, Paecilomyces, Penicillium y trichoderma (Deuteromycetes); Bacterias gram positivas aerobias Cellulomonas y Thermobifida al igual que Cytophaga y Sporocytophaga.

De acuerdo con Lynd Lee 2002, se han desarrollado ensayos con diferentes géneros de bacterias y hongos aerobios y anaerobios para la obtención de la transformación de la celulosa o de los complejos lignocelulósicos entre los cuales se destacan como microorganismos aerobios los siguientes: *Acidothemus cellulolitycus* gram positivo termofílico, *Bacillus pumilis* gram positivo mesofílico endosporado, *Caldibacillus*

¹³⁸ KUDO, H., K.-J. CHENG, AND J. W. COSTERTON. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. Can. J. Microbiol. 33:267–271.

¹³⁹ WEIMER, P. J. 1993. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. Arch. Microbiol. 160:288–294.

¹⁴⁰ SHI, Y., AND P. J. WEIMER. 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 58:2583–2591.

¹⁴¹ BRONNENMEIER, K. AND W. L. STAUDENBAUER. 1988. Resolution of *Clostridium stercorarium* cellulase by fast protein liquid chromatography (FPLC). Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:432–436.

cellovorans, termofílico endosporado gram positivo, *cellulomonas flavigena*, gram positiva termofílica, *Cellvibrio fulvus* gram negativo mesofílico, *Erwinia carotovora* gram negativa mesofílica flagelar, *Pseudomonas fluorescens* gram negativa, mesofílica flagelar, *Streptomyces reticuli* gram positiva, mesofílica, entre otras y los géneros anaerobios que se señalan en la siguiente en el anexo A. Géneros de bacterias y hongos aerobios y anaerobios para la obtención de la transformación de la celulosa.

Ante este panorama nutrido de métodos y de grupos microbianos de alto impacto ambiental, un incipiente desarrollo de procesos limpios y la necesidad de hacer más eficiente la conversión de biomasa en bioetanol, se requiere avanzar en el conocimiento de métodos más seguros ambientalmente y viables industrialmente, posiblemente los medios biológicos representen esa oportunidad.

1.10.3 Medios de Cultivo utilizados en el Aislamiento de Microorganismos. Los medios para el cultivo de microorganismos contienen las sustancias necesarias para soportar el crecimiento de los mismos. Debido a la diversidad de los microorganismos y a sus diversas vías metabólicas hay numerosos medios, así una pequeña modificación en la composición de un medio de cultivo resulta en el crecimiento de un microorganismo abiertamente distinto al que se requería.

Cuando los métodos para el cultivo de microorganismos fueron desarrollados en el siglo XIX principalmente por Robert Koch y sus colegas, tejidos de plantas y animales fueron utilizados como una fuente de nutrientes para soportar el crecimiento microbiano. Uno de los mayores descubrimientos llevados a cabo por Fanny Hesse en el laboratorio de Koch, consistió en que el agar podía ser usado para dar forma y solidificar al medio de cultivo en el cual el microorganismo podría crecer. Entonces extractos de plantas y de tejidos animales fueron preparados como caldos y mezclados con agar para formar una gran variedad de medios de cultivo. Virtualmente cualquier órgano de planta o animal fue considerado útil en la preparación de infusiones para enriquecer a los medios de cultivo, han incluido desde: carne de corazón, cerebro de ternero, carne de hígado por citar algunos ejemplos. Esta clase de infusiones aún forman parte de los componentes principales de los medios de cultivo que hoy son ampliamente utilizados, tales como: las infusiones de cerebro y corazón y el caldo de hígado con agar.

La composición de cada medio de cultivo describe los ingredientes que forman parte del medio, las cantidades y el pH. Se lista en orden decreciente aquellos ingredientes. Los componentes sólidos son listados mostrando el peso en gramos o miligramos a ser adicionados, seguido por los componentes líquidos mostrando los volúmenes que deben ser incluidos en el medio.

El medio para el cultivo de los microorganismos tiene una fuente de carbono que debe ser incorporado a la biomasa, para los microorganismos autótrofos la fuente de carbono bastante a menudo es el dióxido de carbono, el cual puede ser incorporado en forma de bicarbonato dentro del medio. Los carbohidratos tales como la glucosa u otro compuesto orgánico tales como el acetato, los lípidos, proteínas, hidrocarburos y otros compuestos orgánicos están incluidos en el medio como una fuente de carbono para los microorganismos heterótrofos. Estas fuentes de carbono también pueden actuar como una fuente de energía a través de reacciones de oxidación – reducción. Otros componentes tales como los iones de amonio, iones nitrito, azufre elemental y el hierro reducido pueden

ser usados como una fuente de energía para el cultivo de los microorganismos autótrofos, el nitrógeno también se requiere para el crecimiento microbiano y podría ser suplido como compuestos nitrogenados inorgánicos, pero más comúnmente se sule a través de proteínas, peptonas o aminoácidos. Los elementos tales como el fosfato y metales tales como el magnesio y el hierro son también componentes necesarios de los medios de cultivo microbiológicos. El fosfato puede servir como una solución buffer para mantener el pH del medio dentro de los límites en los cuales los microorganismos lo toleran, suele ser necesario adicionar factores de crecimiento al medio de cultivo.

1.10.3.1 Componentes de los Medios de Cultivo Microbiano.

- **Agar.** Es el componente solidificante más comúnmente utilizado en la fabricación de los medios de cultivo. El agar es un extracto polisacárido obtenido a partir del alga marina *Agar agar*, se desnaturaliza a los 84°C y se solidifica a los 38°C. Las concentraciones de agar de 15.0 gramos/litro son comúnmente utilizadas para la fabricación de medios de cultivo sólido. A menores concentraciones se utiliza para producir medios semisólidos o casi líquidos.
- **Peptonas.** Muchos medios de cultivo complejos que en los cuales no todos los componentes químicos específicos son conocidos, contienen peptonas como una fuente de nitrógeno, las peptonas son proteínas hidrolizadas formadas por digestión enzimática o ácida. La caseína es a menudo utilizada como un substrato proteico para la formación de peptonas, pero otras sustancias tales como: carne de soya son también comúnmente empleadas como fuentes de peptonas.
- **Extractos de Plantas y de Carne.** Las infusiones de carne y de plantas son extractos acuosos que son comúnmente utilizados como una fuente de nutrientes para el cultivo de microorganismos. Tales infusiones contienen aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, carbohidratos, vitaminas y minerales y trazas de metales. Los extractos de tejido animal contienen relativamente altas concentraciones de componentes de proteína soluble en agua y glicógeno. Los extractos de tejidos de plantas contienen relativamente altas concentraciones de carbohidratos.
- **Factores de Crecimiento.** Muchos microorganismos tienen requerimientos específicos en términos de sus factores de crecimiento los cuales deben ser incluidos en los medios de cultivo para lograr un cultivo exitoso, vitaminas aminoácidos, ácidos grasos, trazas de metales y componentes de la sangre son a menudo utilizados con éste fin. La incorporación de factores de crecimiento a los medios de cultivo se realiza con el fin de enriquecer el medio que significa aumentar el número de especies particulares de microorganismos. A menudo se utiliza una mezcla de factores de crecimiento en los medios de cultivo. La hidrólisis ácida de la caseína comúnmente se utiliza como una fuente de aminoácidos. El extracto de células de levadura también se emplea como fuente de aminoácidos y vitaminas para el cultivo de microorganismos. Muchos medios particularmente aquellos empleados en el laboratorio clínico contienen sangre o componentes de la sangre que sirven como nutrientes esenciales.

El factor de crecimiento heme y el factor v NAD, a menudo son suplidos por adición de la hemoglobina.

- **Componentes Selectivos.** Muchos medios de cultivo contienen componentes selectivos que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados y favorecen el crecimiento de los microorganismos de interés. Los medios de cultivo selectivo son utilizados específicamente para el aislamiento de microorganismos específicos a partir de poblaciones mezcladas. En muchos medios de cultivo para el estudio de los microorganismos en la naturaleza, estos compuestos son incluidos como la única fuente de carbono, nitrógeno, así que tan sólo unos pocos tipos de microorganismos pueden crecer. Los compuestos tóxicos selectivos son también con frecuencia usados para seleccionar microorganismos en un cultivo de una especie en particular. El aislamiento de patógenos a partir de una muestra fecal por ejemplo, donde hay una alta abundancia de microorganismos no patógenos requiere medios de cultivo selectivos. A menudo se utilizan compuestos químicos antimicrobianos como compuestos que incorporan el potencial selectivo que favorece el desarrollo de sólo los organismos tolerantes al mismo dada su capacidad genética o metabólica. Estos compuestos generalmente suprimen el crecimiento de la microbiota no deseada mientras que permite el desarrollo de los microorganismos deseados. Sales biliares, selenito, tetrionato, telurito, acida, feniletanol, lauril sulfato de sodio, cloruro de sodio en altas concentraciones, y varios tipos de colorantes, tales como: eosina, cristal violeta, y azul de metileno, son utilizados con éste fin.

Los agentes antimicrobianos utilizados para suprimir un tipo específico de microorganismo incluyen a la ampicilina, cloranfenicol, colistin, cicloheximida, gentamicina, kanamicina, ácido nalidixico, sulfadiazina y vancomicina, aplicados sólo o en varias combinaciones de antimicrobiales que son efectivos para suprimir alguna clase de microorganismo tal como una bacteria entérica.

- **pH Buffers.** Estos compuestos mantienen el pH del medio dentro de los rangos adecuados para el desarrollo de los microorganismos, se mantiene por la inclusión de compuestos que deben ser aplicados con precisión, ya que el cambio de pH es muy sensible a los cambios de estos buffers y los microorganismos responden muy sensiblemente al mismo.

1.10.4 Medio de Fermentación en Estado Sólido. El término indica el cultivo aerobio o anaerobio de microorganismos que crecen en la superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Esta matriz puede estar constituida por un sustrato humidificado o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos.

Por lo general los cultivos de microorganismos en medio sólido se realiza utilizando sustratos agrícolas como el bagazo de caña al cual se le agrega una solución de sales y una suspensión de esporas de hongo como inoculante; se puede utilizar un soporte artificial en donde los nutrientes están disueltos en una solución nutritiva absorbida sobre un soporte sólido.

Los principales parámetros físicos químicos que afectan la fisiología y bioquímica de los microorganismos durante su crecimiento en fase sólida son la humedad, la actividad del agua, la aireación y la transferencia de oxígeno, la regulación de la temperatura y del pH. De otra parte juega un papel muy importante el tipo de microorganismo y la cantidad de inóculo.

2. METODOLOGÍA

La metodología que se aplicó para el desarrollo del proyecto se enfocó en el desarrollo de 5 fases complementarias, conformadas por diferentes áreas que interactúan permanentemente a través de canales de información establecidos dentro de la estructura organizacional del proyecto, que permitieron una realimentación permanente de cada uno de los procesos desarrollados en las áreas de trabajo; éstas fases fueron:

Fase 1. Organización de recursos e inicio de actividades

Fase 2. Pre – operativa

Fase 3. Operación

Fase 4. Validación técnica

Fase 5. Socialización y divulgación

Se estimó un tiempo de ejecución de 5 meses.

2.1 FASE 1. ORGANIZACIÓN DE RECURSOS E INICIO DE ACTIVIDADES

Comprendió las actividades relacionadas con la organización del trabajo, la localización del sitio de muestreo (trapiche), selección del sustrato y descripción de equipos requeridos para el desarrollo del trabajo.

Se determinó el lugar posible para la selección de las muestras de bagazo considerando los trapiches que transforman la variedad República Dominicana (RD).

Se consideraron las condiciones de almacenamiento del bagazo, tiempo transcurrido desde la molienda, condiciones ambientales, temperatura, humedad relativa.

Se describieron los diferentes equipos, materiales y reactivos, para el procesamiento de la información ambiental y de laboratorio registradas.

2.2 FASE 2. PRE – OPERATIVA

En la cual se establecieron las diferentes actividades que permitieron determinar la composición físico - química del sustrato (bagazo) y la preparación de éste para realizar las pruebas de laboratorio (picado y tamizado). En esta fase se destacaron las siguientes actividades:

- **Logística.** Este periodo de tiempo se destinó para:

Acordar con el laboratorio del CEIAM de la UIS las condiciones en las cuales se llevarían a cabo los análisis de laboratorio para la determinación de la composición físico –química del bagazo de caña panelera objeto de éste proyecto.

Acordar con el laboratorio del CEIAM de la UIS, el protocolo y la cadena de custodia que finalmente se realizó para obtener y procesar las muestras de sustrato a analizar.

Acordar con la Directora de proyecto de monografía, las condiciones de toma de muestra en campo (trapiche) y procesamiento para el trabajo microbiológico en el laboratorio.

Determinar los métodos de cultivo microbiano utilizados, considerando el tipo de biorreactor (FES) utilizado en el pretratamiento.

Adquirir los recursos físicos y técnicos para el desarrollo de las pruebas que se realizaron en cumplimiento de los objetivos de éste proyecto.

- **Revisión conceptual**

Se estudiaron los métodos para procesar el substrato para el análisis físico-químico, incluido el sugerido por el CEIAM de la UIS.

Se recopiló y estudió la información sobre: Pretratamientos microbianos de complejos lignocelulósicos, posteriormente se estudiaron las características de las fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Adicionalmente se estudió la composición y fisiología de los complejos enzimáticos microbianos aerobios, se estudiaron las características de los microorganismos aerobios celulolíticos y se estudió el sistema de fermentación en fase sólida (FES).

- **Preparación del substrato.** Se realizó la preparación de la muestra de bagazo de caña panelera para obtener una muestra homogénea, realizando un secado a condiciones ambientales por 7 días, hasta reducir su humedad a niveles que oscilan entre el 20 y el 25%, posterior picado y tamizado para homogenizar a partículas no mayores a 2 mm, envasado en bolsas plásticas de cierre hermético y conservación bajo refrigeración (2 - 5°C) hasta el momento de su uso para el pretratamiento microbiológico y el análisis físico-químico.

2.3 FASE 3. OPERATIVA

Esta fase se destacó por:

- **Análisis físico-químico del bagazo.** Se realizaron los análisis de las variables: contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina, solubles, nitrógeno y azúcares fermentables, previo proceso de pretratamiento y posterior a él para comparar su composición sin pretratamiento microbiológico y con pretratamiento.

Se obtuvo la composición de celulosa determinando la Fibra neutro detergente FND, la hemicelulosa determinando la fibra ácido detergente FAD y la lignina por determinación de la lignina ácido detergente LAD, según Goering y Van Soest (1970).

- **Selección de los microorganismos y experimentación ex situ.** En ésta etapa se ejecutaron las siguientes actividades:

Selección de los microorganismos que se encontraron en la muestra de bagazo de caña panelera obtenido del trapiche Ward CIMPA utilizando para ello medios de cultivo con características químicas especiales.

Posteriormente se describieron e identificaron las características de los microorganismos que crecieron en el medio de cultivo especial y de las condiciones físicas y químicas de crecimiento (pH, Temperatura), determinando el tipo de microorganismo, hongo o bacteria individual o el consorcio obtenido en el medio selectivo, que se estimaron útiles en la biotransformación del sustrato durante el pretratamiento del bagazo de caña panelera, los cuales se cultivaron y aislaron los microorganismos útiles en la transformación del bagazo de caña panelera en hexosas y pentosas obtenido(s) en los medios selectivos.

Seguidamente se elaboró el medio para la fermentación en fase sólida (FES) a ser utilizado para el pretratamiento microbiológico.

Se llevó a cabo el proceso de pre-tratamiento durante 7 días, controlando las variables pH y Temperatura de la muestra preparada de bagazo de caña panelera en FES en presencia de los microorganismos previamente seleccionados y su posterior análisis físico químico.

Se evaluó la eficiencia en la conversión de celulosa, hemicelulosa y lignina en azúcares reductores hexosas y pentosas por pretratamiento biológico de las fibras del bagazo de caña panelera variedad RD por acción de microorganismos aislados del bagazo de caña panelera, comparando los resultados iniciales de composición físico –química contra los resultados físicos –químicos obtenidos posterior al pretratamiento microbiológico.

Se establecieron las condiciones de operatividad (evolución de las variables pH y temperatura) del proceso desde la literatura preexistente, que inciden en el bioproceso para la generación de azúcares reductores.

2.4 FASE 4. VALIDACIÓN TÉCNICA

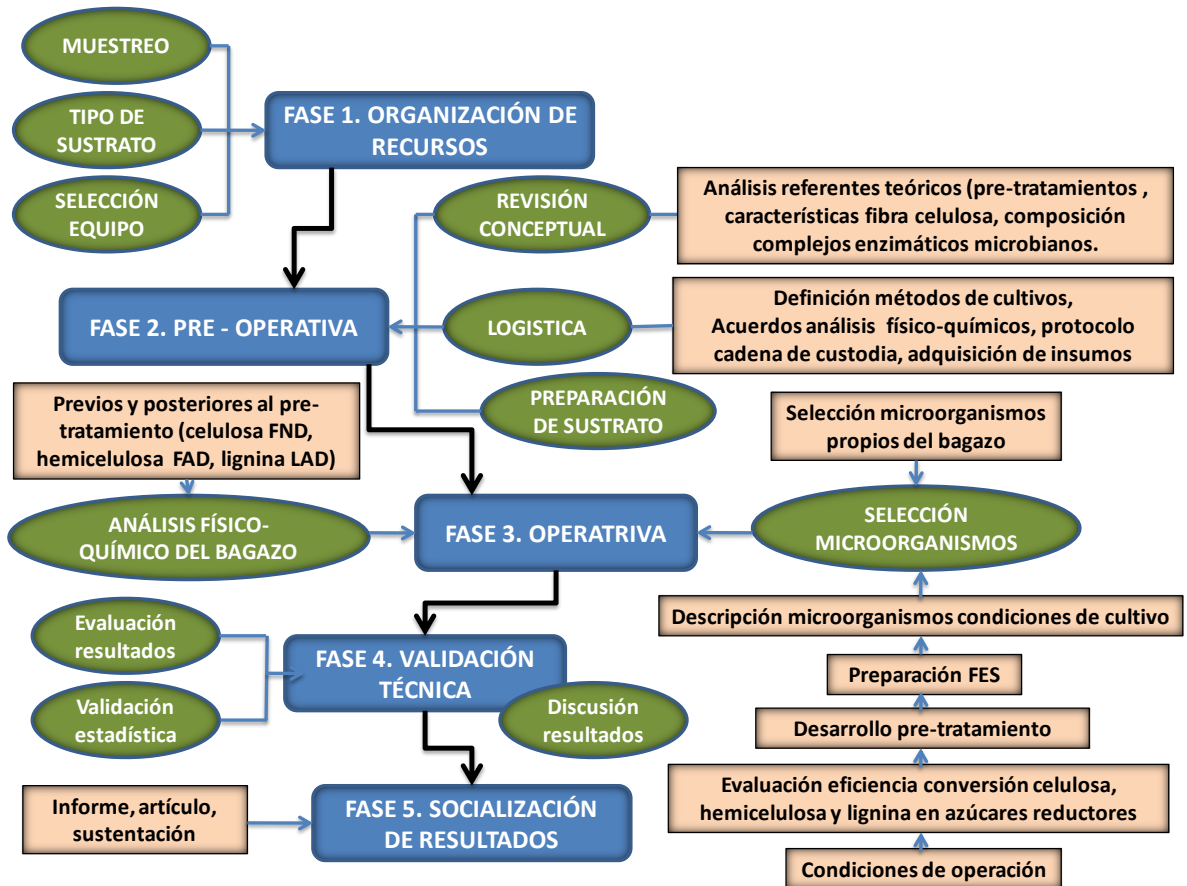
En esta fase se realizó la evaluación de los resultados a través de las siguientes actividades: validación estadística de los datos obtenidos durante las pruebas, (usando para ello: análisis de varianza y separación de medias según la prueba Tukey), análisis de la información obtenida, y discusión de los datos obtenidos para el pretratamiento microbiológico frente a otros pretratamientos utilizados, para por ultimo poder concluir los resultados encontrados.

2.5 FASE 5. SOCIALIZACIÓN Y DIVULGACIÓN

Se redactó un informe técnico, que se presenta ante la universidad. Este contiene la documentación recolectada a través de la realización de cada una de las etapas del proyecto.

La figura 4. Proceso metodológico, representa cada una de las fases descritas, en donde se destacan las principales actividades ejecutadas en cada una de ellas.

Figura 4. Proceso metodológico.



3. RESULTADOS

Este capítulo describe los resultados obtenidos luego de haber realizado el respectivo trabajo de campo y los subsecuentes análisis de laboratorio, la metodología implementada cumplió los requisitos señalados en el proyecto de investigación, entre tanto, los procedimientos empleados para la toma de muestras y los métodos microbiológicos y físico – químicos utilizados en el desarrollo de los análisis del bagazo de caña se relacionan en el Anexo B. Materiales, métodos y procedimientos, en donde se destacan los elementos recomendados por Van Soest y la norma SM 4 500B.

Se resalta que en los materiales y métodos empleados siguieron protocolos para el desarrollo de cada una de las fases metodológicas propuestas, los que específicamente se relacionaron con: toma de muestras, procesos de esterilización, preparación de los medios de cultivo tanto para bacterias como para hongos, aislamiento de bacterias y hongos, montajes de fermentación en estado sólido, y el conteo de variables por siembra invertida

3.1 PREVIOS AL PRETRATAMIENTO

Los resultados de los parámetros de interés, se han adaptado en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados del análisis físico –químico del bagazo previo al pretratamiento biológico.

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADOS MUESTRA		TÉCNICA ANÁLISIS	MÉTODO
		BASE HUMEDAD	BASE SECA		
Humedad	%	21,53		Gravimétrico	NTC529
Sólidos Totales	%		78,48	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Ceniza	%		3,17	Gravimétrico	AOAC 7,009/84 94205/90
Sólidos volátiles	%		96,83	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Carbono fijo	%		3,08	Gravimétrico	
Material volátil	%		93,73	Gravimétrico	ASTM D 3175-07
Nitrógeno total	%		0,45	Kjeldahl	NTC 1556
Proteína bruta	%		2,79	Kjeldahl	NTC 1556
Celulosa	%		38,82	Gravimétrico	Kurschner Y Hoffer
Lignina	%		29,51	Gravimétrico	Klason
Holocelulosa	%		59,82	Gravimétrico	Jayme –Wise
Hemicelulosa	%		21	Gravimétrico	
pH	%	5.67		Potenciométrica	

Fuente: Adaptado resultados laboratorio CEIAM, ver anexo C.

3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.2.1 Cultivo y selección de microorganismos. La caracterización de bacterias aisladas del bagazo de la caña panelera se realizó en medios modificados con extracto de bagazo de caña panelera al 10% en agar nutritivo, ver cuadro 7.

Cuadro 7. Caracterización macroscópica bacteriana.

CAJ A No	CEP A	FORMA		BORDES			DIÁMETRO			ASPECTO					TEXTURA			COLOR	ALTUR A
		CIRCULA R	IRREGULA R	ENTERO S	RAMIFICAD O	ONDULADO S	5mm	2- 3mm	1-2 mm	RUGOS A	MUCOS A	SEC A	OPAC A	BRILLANT E	ALGODONOS A	TERROS A	OTRA		
1AN	1.1		1			1		30%	1		1			1			BLANCO	5 mm	
1AN	1.2		1			1		25%	1	1			1			ATERCIOPELADO	BLANCO	1 mm	
1AN	1.3	1		1				5%	1		1			1			BLANCO	0.1 mm	
2 AN	2.1	1			1			5%	1		1	1		1			BLANCO	0.3 mm	
2 AN	2.2	1				1		90%	1	1		1				ATERCIOPELADO	BLANCO	0.5 mm	
3 AN	3.1		1			1		90%	1	1		1		1			BLANCO	8 mm	
3 AN	3.2	1				1		1%	1			1		1			BLANCO	0.1 mm	
3 AN	3.3	1				1		5%	1		1		1	1			BLANCO	0.5 mm	
4 AN	4.1		1			1		90%	1	1		1				ATERCIOPELADO	BLANCO	0.2 mm	
4 AN	4.2	1			1			5%	1		1			1			BLANCO	0.1 mm	
5 AN	5.1		1			1		98%	1		1	1		1			BLANCO	12 mm	
5 AN	5.2	1			1			5%	1		1			1			BLANCO	0.5 mm	
6 AN	6.1		1					99%	1		1	1		1			BLANCO	8 mm	
6 AN	6.2	1			1			5%	1		1			1			BLANCO	0.5 mm	
7 AN	7.1		1			1		97%	1		1	1				ATERCIOPELADO	BLANCO	0.1 mm	
7 AN	7.2	1				1		4%	1		1	1		1			BLANCO	0.5 mm	
8 AN	8.1		1			1		100%	1	1		1		1			BLANCO	0.5 mm	
8 AN	8.2	1		1				0.1%	1		1				1		BLANCO	0.1 mm	
9 AN	9.1		1	1				80%	1	1			1			ATERCIOPELADO	BLANCO	0.5 mm	
10 AN	10.1		1	1				30%	1	1		1		1			BLANCO	1 mm	
10 AN	10.2		1	1				60%	1	1		1		1			BLANCO	1 mm	
11AN	11.1		1			1		85%	1			1		1			CAFÉ	1 mm	
TOTAL		10	12	5	4	12			22	8	12	13	3	16	1				

Figura 5. Registro fotográfico de los cultivos de bacterias para caracterización macroscópica, descritas en el cuadro 7.



Entretanto, la caracterización de hongos filamentosos, se realizó en medios de cultivo modificados con extracto de bagazo de caña Panelera al 10% en medios de cultivo AEM, ASD y ARB.



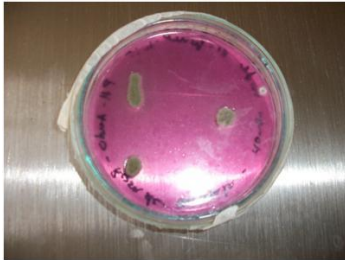





Cuadro 8. Caracterización macroscópica de los hongos filamentosos.


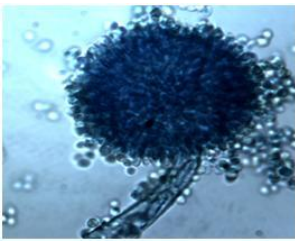

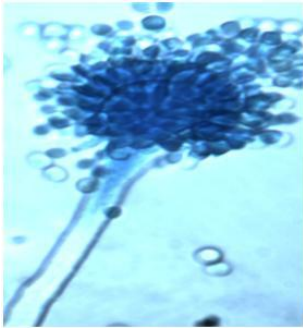

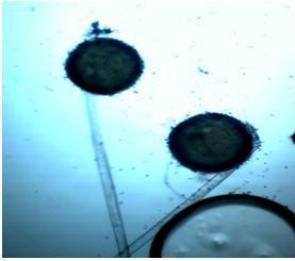

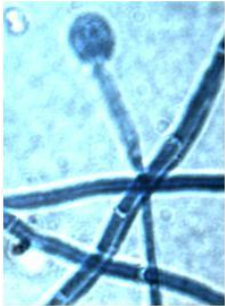
CAJA No	CEPA	pH	AGAR	TAMAÑO			FORMA		BORDES		ELEVACION		DIAMETRO (mm)				VEL. CRECIMIENTO (CAJA/DIA)		SUPERFICIE		ASPECTO			TEXTURA				COLOR		
				GRANDE	MEDIANO	PEQUEÑO	CIRCULAR	IRREGULAR	ENTERO	ONDULADO	ALTA	BAJA	5	2 A 3	1 A 2	1	1/2	3/4	LISA	RUGOSA	SECA	OPACA	BRILLANTE	ALGODONOSO	FILAMENTOSO	PULVERULENTO	CREMOSO	DURA	ANVERSO	REVERSO
1	1	N	M			1	1			1	1				1		1				1						1	Blanco	Blanco	
1	2	N	M	1				1		1		1			1			1	1			1						Blanco	Blanco	
2	1	A	M	1				1		1		1						1	1			1					Blanco esp negras	Blanco esp negras		
2	2	A	M		1				1			1												1			Amarillo	Amarillo		
3	1	A	M			1																1					Blanco	Blanco		
3	2	A	M		1																			1			Blanco	Amarillo		
4	1	A	S	1																		1					Blanco	Amarillo		
4	2	A	S	1																					1		Amarillo	Café		
5	1	N	S	1																		1					Negro	Café amarillo		
5	2	N	S		1																	1					Blanco	Blanco		
5	3	N	S			1																		1			Verdoso	Blanco		
6	1	A	RB			1			1		1	1			1	1					1					1	Naranja	Naranja		
6	2	A	RB	1				1		1		1			1		1	1				1					Blanco	Blanco		
6	3	A	RB			1			1			1			1	1							1				Verde claro	No identifica		
6	4	A	RB			1		1		1		1			1		1			1					1		Verde oscuro	No identifica		
6	5	A	RB			1	1		1		1		1		1	1								1			Rojo	Rojo		
7	1	N	RB			1		1		1		1			1	1											Verde claro	No identifica		
TOTAL				6	3	8	2	7	8	2	3	7	3	2	5	3	1	6	6	4	3	1	6	7	2	1	3	4		

Figura 6. Registro fotográfico de cultivos de hongos filamentosos para caracterización macroscópica, descritas en el cuadro 8.



Cuadro 9. Registro fotográfico y principales características de los hongos cultivados y seleccionados.

Hongo No. identificación	Observación macroscópica	Observación microscópica 100X	Breve descripción
Hongo 1. <i>Mucor sp</i>			Esporangios oscuros; se ven tallos curvados. Se ven tallos largos sin ramificar y tallos cortos ramificados de forma simpodial que en ocasiones se curvan hacia abajo presenta anchas hifas- Características de las esporangiosporas: de pared lisa, elipsoidales.
Hongo 2 <i>Penicillium sp</i>			Cuerpo fructífero asexual del grupo de los Plectomycetes, se pueden observar el conidióforo, el fiálide, la métula y la hifa basal.
Hongo 3. <i>Aspergillus sp</i>			Se puede observar hifas tabiculares y conidióforos cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa, cabezas conidial lisa de una pared redonda, dispuesta en forma radial, estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, de color café a negro, hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza.
Hongo 4. <i>Aspergillus sp</i>			Hongo negro, algodonoso con esporas negras

Hongo No. identificación	Observación macroscópica	Observación microscópica 100X	Breve descripción
Hongo 5. <i>Aspergillus sp</i>			Cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, radiales; estipes rugosos, de color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Conidios globoso, ligeramente rugosos.
Hongo 6 <i>Aspergillus Sp</i>			Hongo filamentoso, donde sobresalen del micelio las Cabezas conidiales redondeadas, en columnas compactas; Vesículas de forma esférica; métulas ocupando la mitad o dos tercios de la vesícula. Conidios lisos, globosos.
Hongo 7 <i>Aspergillus Sp</i>			Hongo amarillo, algodonoso, sin borde.
Hongo 8			Blanco, algodonoso

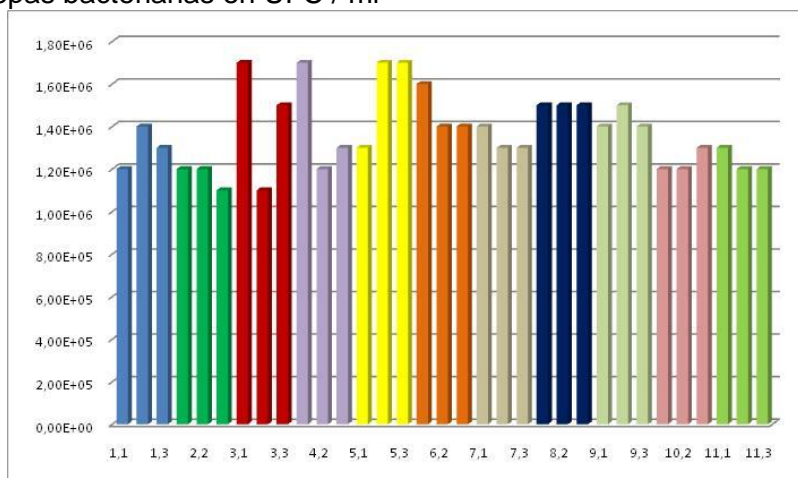
3.2.2 Resultados del proceso con Bacterias. El cultivo de bacterias aisladas del bagazo de la caña panelera para su caracterización se realizó en medios modificados con extracto de bagazo de caña panelera al 10% en agar nutritivo.

Cuadro 10. Conteo de cepas bacterianas aisladas del bagazo de caña panelera.

CEPA	UFC/ml	CEPA	UFC/ml	CEPA	UFC/ml	CEPA	UFC/ml	CEPA	UFC/ml	CEPA	UFC/ml
1.1	1.2*10 ⁶	3.1	1.7*10 ⁶	5.1	1.3*10 ⁶	7.1	1.4*10 ⁶	9.1	1.4*10 ⁶	11.1	1.3*10 ⁶
1.2	1.4*10 ⁶	3.2	1.1*10 ⁶	5.2	1.7*10 ⁶	7.2	1.3*10 ⁶	9.2	1.5*10 ⁶	11.2	1.2*10 ⁶
1.3	1.3*10 ⁶	3.3	1.5*10 ⁶	5.3	1.7*10 ⁶	7.3	1.3*10 ⁶	9.3	1.4*10 ⁶	11.3	1.2*10 ⁶
2.1	1.2*10 ⁶	4.1	1.7*10 ⁶	6.1	1.6*10 ⁶	8.1	1.5*10 ⁶	10.1	1.2*10 ⁶		
2.2	1.2*10 ⁶	4.2	1.2*10 ⁶	6.2	1.4*10 ⁶	8.2	1.5*10 ⁶	10.2	1.2*10 ⁶		
2.3	1.1*10 ⁶	4.3	1.3*10 ⁶	6.3	1.4*10 ⁶	8.3	1.5*10 ⁶	10.3	1.3*10 ⁶		

Las cepas bacterianas relacionadas en el cuadro 11. Cepas bacterianas para prueba de compatibilidad, corresponden al tercer repique de cepas bacterianas cultivadas y aisladas por triplicado en medio de cultivo Agar Nutritivo modificado con bagazo de caña panelera al 10% en cajas de petri. El pH del medio de cultivo fue de 6,2 e incubadas a temperatura ambiente correspondiente a 27°C en laboratorio.

Figura 7. Cepas bacterianas en UFC / ml



Para la selección de las cepas se analizó el comportamiento de cada una de ellas, y se le realizó un análisis estadístico, fundamentado en análisis de varianza ANOVA y una separación de medias de TUKEY, los que determinaron que no existían diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%; lo que permitió seleccionar las cepas teniendo en cuenta su concentración y su crecimiento en cajas de petri.

Cuadro 11. Análisis de varianza cepas de bacterias

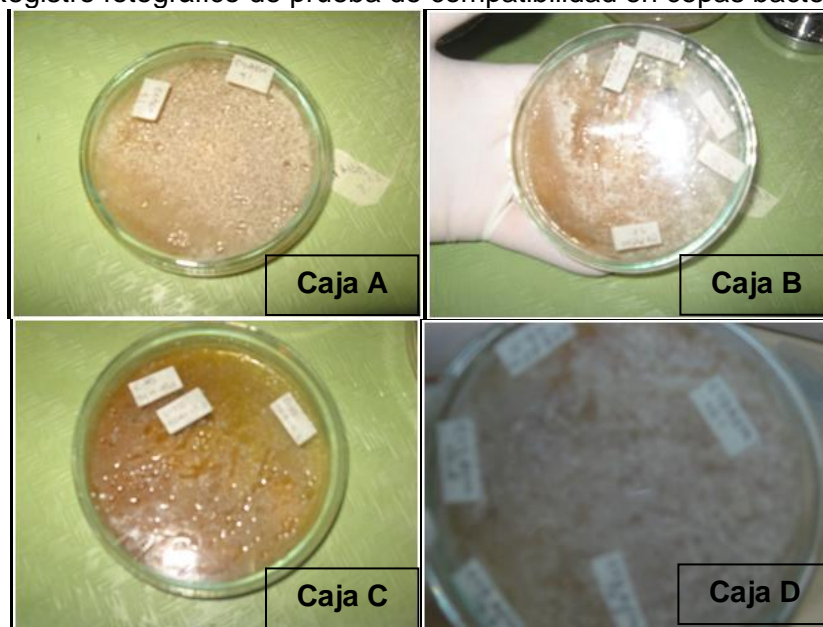
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	476.363.636.364	10	47.636.363.636	2	0	2
Dentro de los grupos	513.333.333.333	22	23.333.333.333			
Total	989.696.969.697	32				

Cuadro 12. Cepas Bacterianas Elegidas para Prueba de compatibilidad.

Cepa Seleccionada	Porcentaje de crecimiento*	UFC o Conteo de Viables
3.1	90	$1.7 \cdot 10^6$
4.1	90	$1.7 \cdot 10^6$
5.1	98	$1.3 \cdot 10^6$
6.1	99	$1.6 \cdot 10^6$
7.1	97	$1.4 \cdot 10^6$
8.1	100	$1.5 \cdot 10^6$
11.1	85	$1.3 \cdot 10^6$

La figura 8. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas bacterianas, evidencia el crecimiento compatible e incompatible entre las cepas bacterianas cultivadas. En la caja A, se cultivaron en consorcio 2 cepas de interés para analizar su crecimiento a 24 y 48 horas, y poder determinar su compatibilidad; entretanto, para la caja C se consideraron 3 diferentes capas bacterianas y para las caja B y D cinco cepas.

Figura 8. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas bacterianas.



Las anteriores cepas bacterianas se seleccionaron como potenciales para la prueba de compatibilidad y posible cultivo en FES en consideración a su rápido y extenso crecimiento en las cajas de petri en 48 horas en medio de cultivo de Agar Nutritivo modificado al 10% con extracto de bagazo de caña panelera, a temperatura ambiente y con un pH de 6,2 (como lo muestra el cuadro 7), y al resultado del conteo de

* Ver cuadro 7. Caracterización macroscópica bacteriana.

viables, sin embargo, se les practicó una prueba de compatibilidad para el trabajo en consorcio y los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 13. Prueba de Compatibilidad cepas bacterianas para trabajar en consorcio.

CEPAS	3.1	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	11.1
3.1		No	No	No	No	No	No
4.1	No		No	No	Si	No	No
5.1	No	No		No	No	No	No
6.1	No	No	No		No	No	No
7.1	No	Si	No	No		No	No
8.1	No	No	No	No	No		No
11.1	No	No	No	No	No	No	

De la prueba de compatibilidad realizada a las cepas señaladas se observó que sólo las cepas 4.1 y 7.1 resultaron compatibles en su crecimiento en medio de cultivo de Agar Nutritivo modificado al 10% con extracto de bagazo de caña panelera a 48 horas, con temperatura ambiente y pH 6,2.

De acuerdo con éste resultado las cepas mencionadas como compatibles a saber: cepas 4.1 y 7.1, se seleccionaron para la prueba o cultivo en FES y con el fin de poder establecer la presencia de azúcares por Molish (cualitativo), azúcares reductores por Fehling A y B cualitativo y en diluciones seriadas, Seliwanoff cualitativo, selectiva de Multistix G10 y para medir su efectividad en la formación de azúcares fermentables hexosas.

De los FES realizados a 7 días de duración, con las cepas bacterianas seleccionadas se obtuvieron soluciones de bagazo de caña por lavado con 100 ml de agua destilada y desmineralizada, filtrada con algodón y gasa y filtrada por segunda vez con papel de filtro marca MUNKTELL, de referencia 3hw con diámetro 110 mm, para realizar las pruebas que se señalan en el cuadro 14.

Cuadro 14. Molish, Fehling, Seliwanoff, Multistix en soluciones o extractos provenientes de los medios de cultivo en FES para las cepas bacterianas 4.1 y 7.1

Replica 1				
Cepa	Molisch (cualitativo)	Fehling (cualitativo)	Seliwanoff (cualitativo)	Multistix G10 mg/dl
4.1	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 100
7.1	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 100
Consortio	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 250
Replica 2				
Cepa	Molisch (cualitativo)	Fehling (cualitativo)	Seliwanoff (cualitativo)	Multistix G10 mg/dl
4.1	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 250
7.1	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 250
Consortio	Positiva al 0,1 %	+	-	Menor a 250

El mayor valor obtenido en la prueba cuantitativa para azúcares reductores se consideró como criterio para determinar cuál prueba debía ser enviada para análisis físico – químico, debido al número de análisis autorizados para la presente investigación por la Escuela de química de la UIS.

En consideración y de acuerdo con los resultados relacionados en el cuadro 13. Molish, Fehling, Seliwanoff, Multistix en soluciones o extractos provenientes de los medios de cultivo en FES para las cepas bacterianas 4.1 y 7.1, se determinó no enviar estas muestras para análisis físico químico al laboratorio del CEIAM de la UIS ya que la concentración de glucosa por Multistix, obtenida posterior al pretratamiento no resultó ser mayor a la concentración obtenida en FES para las preparaciones de hongos filamentosos (ver cuadro 17)

3.2.3 Resultado del proceso con Hongos Filamentosos. El cuadro 14, relaciona el conteo de esporas en Cámara de Neubauer para las Cepas de Hongos Filamentosos cultivados y aislados en los medios de cultivo AEM (Agar Extracto Malta), ASD (Agar Saboreaud Dextrosa) y ARB (Agar Rosa Bengala) por duplicado a concentración comercial y modificados con extracto bagazo de caña panelera al 10%, incubados a temperatura ambiente y a 37 °C y a pH comprendido entre 5.2 y 5.5.

Cuadro 15. Conteos de esporas para las cepas de hongos filamentosos.

Replica 1												
Cepa	AEM. No de Esporas en 10 ⁶				ASD No de Esporas en 10 ⁶				ARB No de Esporas en 10 ⁶			
	Comercial		Modificado al 10%		Comercial		Modificado al 10%		Comercial		Modificado al 10%	
	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C
1	1.8	1.9	1.9	2.0	1.3	1.3	1.5	1.6	2.1	2.2	2.1	2.3
2	1.7	1.8	1.9	2.1	1.3	1.5	1.5	1.8	2.0	2.0	2.2	2.3
3	1.7	1.8	1.8	2.0	1.4	1.5	1.5	1.8	1.9	1.9	2.1	2.6
4	1.7	1.8	1.8	1.9	1.3	1.4	1.5	1.8	2.0	2.1	2.2	2.5
5	1.6	1.8	1.9	2.0	1.3	1.4	1.6	1.7	2.0	2.1	2.3	2.6
6	1.8	2.0	1.9	2.1	1.3	1.5	1.5	1.6	2.0	2.1	2.3	2.5
7	1.5	1.6	1.9	2.1	1.3	1.5	1.7	1.9	1.9	2.1	2.2	2.3
Replica 2												
Cepa	AEM. No de Esporas en 10 ⁶				ASD No de Esporas en 10 ⁶				ARB No de Esporas en 10 ⁶			
	Comercial		Modificado al 10%		Comercial		Modificado al 10%		Comercial		Modificado al 10%	
	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C
1	1.8	1.9	1.8	1.8	1.3	1.3	1.4	1.6	2.1	2.2	2.0	2.1
2	1.5	1.4	1.9	1.9	1.3	1.5	1.1	1.8	2.0	2.1	2.2	2.3
3	1.3	1.4	1.6	2.0	1.5	1.7	1.2	1.7	1.9	1.9	2.0	2.2
4	1.6	1.5	1.7	1.6	1.1	1.4	1.3	1.6	1.8	2.1	2.1	2.3
5	1.6	1.7	1.7	1.8	1.1	1.3	1.2	1.5	1.8	1.9	2.3	2.6
6	1.4	1.6	1.6	2.1	1.3	1.5	1.4	1.6	1.8	2.0	2.1	2.4
7	1.5	1.7	1.8	2.1	1.2	1.4	1.5	1.9	1.9	2.2	2.0	2.1

De acuerdo con los resultados de los conteos de esporas de los hongos filamentosos cultivados, se seleccionaron las cepas cultivadas y aisladas en medio Agar Rosa Bengala (ARB) modificado al 10% con extracto de bagazo de caña panelera para adelantar las pruebas de compatibilidad y se decidió trabajar a una temperatura de 37°C para las pruebas o cultivo en FES a 7 días, dado el número mayor de esporas reportados para el medio ARB tanto en medio comercial como en medio modificado al 10%. Estos Hongos se sometieron a la prueba de compatibilidad y los resultados se muestran a continuación.

Figura 9. Conteo de esporas a 27°C

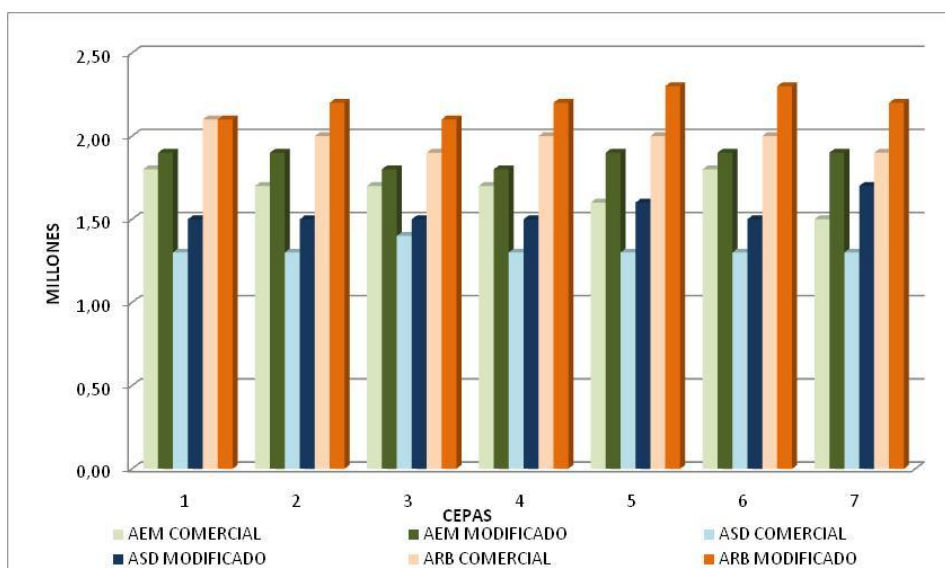
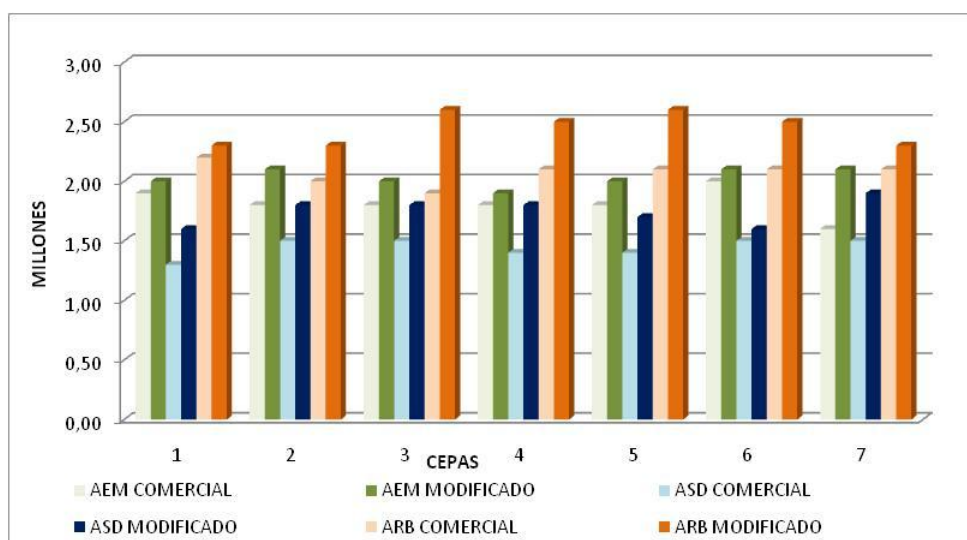


Figura 10. Conteo esporas a 37°C



En el análisis de varianza para hongos filamentosos correspondiente a la réplica 1 y 2 a 27°C y a 37°C, se puede determinar que no existen diferencias significativas entre las cepas del mismo medio de cultivo, entre tanto existe diferencia significativa entre las poblaciones desarrolladas de cada cepa en los diferentes medios de cultivo.

Cuadro 16. Análisis de varianza cepas de Hongos filamentosos a 27°C y a 37°C.

Replica 1 a 27°C

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,007142857	6	0,001190476	0,1765	0,979799599	2,661304523
Columnas	1,161071429	3	0,38702381	57,371	2,06089E-09	3,159907598
Error	0,121428571	18	0,006746032			
Total	1,289642857	27				

Replica 2 a 27°C

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,097142857	6	0,016190476	0,7907	0,588891555	2,661304523
Columnas	1,003928571	3	0,334642857	16,343	2,22835E-05	3,159907598
Error	0,368571429	18	0,02047619			
Total	1,469642857	27				

Replica 1 a 37°C

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,038571429	6	0,006428571	0,5827	0,739553151	2,661304523
Columnas	1,231428571	3	0,41047619	37,209	6,32782E-08	3,159907598
Error	0,198571429	18	0,011031746			
Total	1,468571429	27				

Replica 2 a 37°C

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,167142857	6	0,027857143	1,08	0,410607105	2,661304523
Columnas	0,758214286	3	0,252738095	9,7985	0,000469776	3,159907598
Error	0,464285714	18	0,025793651			
Total	1,389642857	27				

Una vez se ha reconocido que las diferencias significativas están sujetas al medio de cultivo y no a la cepa, se relacionaron cada una de las cepas contra el medio en el que se registró el mayor número de esporas por mililitro, correspondiendo al medio Agar rosa bengala modificado al 10% e incubado a 37°C. El cuadro 17. Test de rango Múltiple, señala estadísticamente al medio 4 como un medio que varía de forma significativa frente a los demás medios de cultivo. Este aspecto es compatible con el crecimiento observado en dicho medio.

Cuadro 17. Test de rango Múltiple

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
Col_3	7	1,31429	X
Col_4	7	1,54286	X
Col_1	7	1,68571	X
Col_2	7	1,87143	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Col_1 - Col_2	*-0,185714	0,0807462
Col_1 - Col_3	*0,371429	0,0807462
Col_1 - Col_4	*0,142857	0,0807462
Col_2 - Col_3	*0,557143	0,0807462
Col_2 - Col_4	*0,328571	0,0807462
Col_3 - Col_4	*-0,228571	0,0807462

* denotes a statistically significant difference.

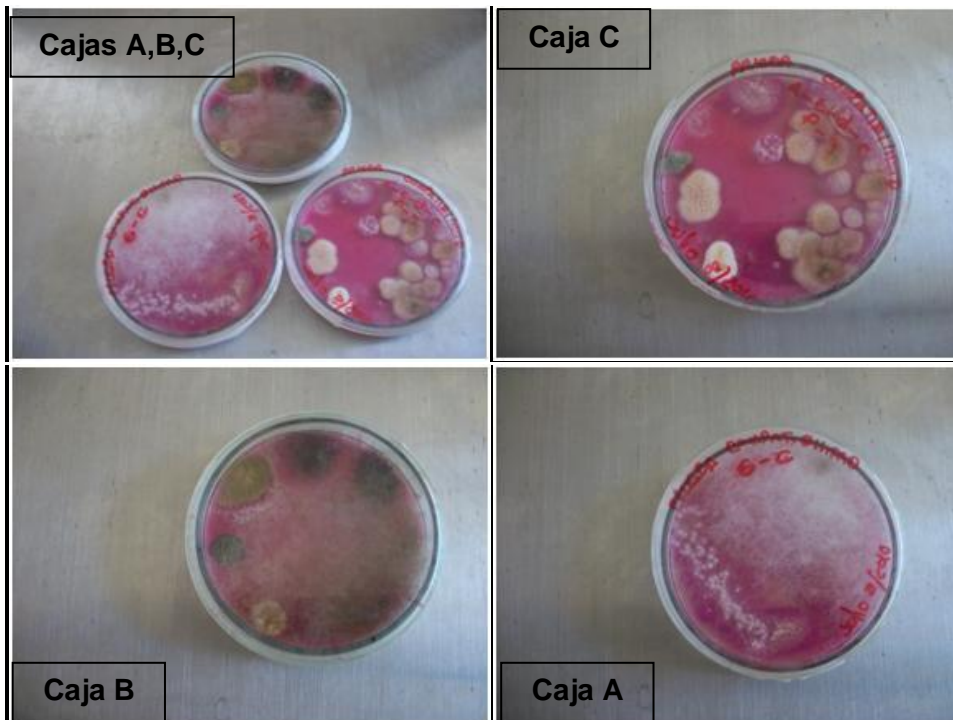
Cuadro 18. Prueba de Compatibilidad para Hongos Filamentosos.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7
1		NO	NO	NO	NO	NO	NO
2	NO		NO	NO	NO	NO	NO
3	SI	NO		SI	NO	NO	SI
4	NO	NO	SI		NO	NO	NO
5	NO	NO	NO	NO		NO	NO
6	NO	NO	NO	NO	NO		NO
7	NO	NO	SI	NO	NO	NO	

Realizada la prueba de compatibilidad para las cepas de hongos filamentosos se seleccionaron las parejas de prueba 3:1, 3:4 y 3:7 que fueron compatibles entre sí y se probaron en FES, todas las cepas tuvieron concentraciones de inóculo superiores a 2.0×10^6 esporas por mililitro como puede observarse en el cuadro 13.

La figura 11. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas de hongos filamentosos, evidencia el crecimiento compatible e incompatible entre las cepas fúngicas cultivadas. En la caja A, se cultivaron en consorcio 2 cepas de interés para analizar su crecimiento a 24 y 48 horas, y poder determinar su compatibilidad; entretanto, para la caja B se consideraron 2 diferentes capas fúngicas y para la caja C las siete cepas.

La figura 11. Registro fotográfico de prueba de compatibilidad en cepas de hongos filamentosos



De los FES realizados con las cepas fúngicas seleccionadas se obtuvieron soluciones de bagazo de caña por lavado con 100 ml de agua destilada y desmineralizada, filtrada con algodón y gasa y filtrada por segunda vez con papel de filtro marca MUNKTELL, de referencia 3hw con diámetro 110 mm, para realizar las pruebas que se enuncian en el cuadro 16.

Figura 12. Registro fotográfico del desarrollo de los Medios de Cultivo de FES.



Cuadro 19. Prueba de Molish, Fehling cualitativo, Seliwanoff y Multistix G10 aplicadas medios de cultivo en FES para los Hongos Filamentosos 3:1, 3:4 y 3:7.

Replica 1				
Cepa	Molisch (cualitativo)	Fehling (cualitativo)	Seliwanoff (cualitativo)	Multistix G10 mg/dl
3:1	Positiva al 0,01 %	+	-	500
3:4	Positiva al 0,01 %	+	-	2 000 o más
3:7	Positiva al 0,01 %	+	-	500
Replica 2				
Cepa (consorcio)	Molisch (cualitativo)	Fehling (cualitativo)	Seliwanoff (cualitativo)	Multistix G10 mg/dl
3:1	Positiva al 0,01 %	+	-	500
3:4	Positiva al 0,01 %	+	-	2 000 o más
3:7	Positiva al 0,01 %	+	-	1 000

De los resultados anteriores se determinó analizar físico –químicamente la muestra de bagazo sometido a cultivo en FES e inoculada con el consorcio de las cepas de hongo filamentoso 3:4 para comparación con la muestra control, en razón de su mayor concentración en la prueba Multistix.

3.3 Resultados del análisis físico –químico del bagazo posterior al pretratamiento biológico

Cuadro 20. Resultados del análisis físico-químico del bagazo posterior al pretratamiento biológico.

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADOS MUESTRA		TÉCNICA ANÁLISIS	MÉTODO
		BASE HUMEDAD	BASE SECA		
Humedad	%	41,83		Gravimétrico	NTC529
Sólidos Totales	%		58,17	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Ceniza	%		0,44	Gravimétrico	AOAC 7,009/84 94205/90
Sólidos volátiles	%		99,56	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Carbono fijo	%		0,15	Gravimétrico	
Material volátil	%		99,41	Gravimétrico	ASTM D 3175-07
Nitrógeno total	%		6,09	Kjeldahl	NTC 1556
Proteína bruta	%		38,03	Kjeldahl	NTC 1556
Celulosa	%		23,15	Gravimétrico	Kurschner Y Hoffer
Lignina	%		0,16	Gravimétrico	Klason
Holocelulosa	%		33,23	Gravimétrico	Jayme -Wise
Hemicelulosa	%		10,08	Gravimétrico	
pH	%	3,24		Potenciometría	

Fuente: Adaptado resultados laboratorio CEIAM, ver anexo D.

CONCLUSIONES

- El aislamiento y caracterización de microorganismos a partir del bagazo de caña panelera permite usar el potencial biotecnológico de las poblaciones de bacterias y hongos presentes en el bagazo de caña panelera. El proceso biotecnológico que se deriva permite emplear la capacidad lignocelulolítica de los microorganismos aislados.
- Se obtuvieron once (11) cepas bacterianas, de las cuales las de mayores crecimientos en número y en diámetro en las cajas de petri fueron seleccionadas para los análisis cualitativos y cuantitativos de azúcares reductores, sin embargo, producto de las pruebas en FES para la cuantificación de azúcares reductores en Multistix, estas mostraron valores no mayores (menos de 250 mg/dl) a los obtenidos en iguales condiciones para los hongos filamentosos (mayor a 2 000 mg/dl), por lo cual no se consideraron para su análisis de parámetros físico químicos. Sin embargo, es muy probable que si se prueban en FES y se analiza su eficiencia en la degradación de las fracciones lignocelulósicas muestren resultados de interés con miras a establecer consorcios con hongos filamentosos y con levaduras, en esta investigación no se realizaron debido al alcance de la misma.
- Los medios de cultivo para las bacterias y los hongos corresponden a medios modificados con extracto de bagazo de caña, éste aspecto permitió un mejoramiento en el desarrollo de los microorganismos con miras a su utilidad como lignocelulolíticos. El porcentaje del 10% de modificación del medio de cultivo, está relacionado con la mejor condición para el aumento del inóculo, aspecto crucial para el desarrollo en FES.
- Se probaron tres (3) medios de cultivo útiles para el desarrollo de hongos, y fueron probados en las concentraciones comerciales y modificados con extracto de bagazo de caña, el interés estuvo en identificar el mejor medio de cultivo que permite el mayor desarrollo y producción de esporas, también se probaron dos temperaturas (27°C y 37°C) para cada uno de los medios relacionadas con las condiciones típicas en las que se almacena el bagazo de caña en los trapiches Ward CIMPA.
- Se obtuvieron por aislamiento a partir del bagazo de caña panelera variedad RD, en medios de cultivo modificados, el grupo de bacterias relacionadas en el cuadro 12 con potencial lignocelulolítico. A los consorcios bacterianos establecidos por las pruebas de compatibilidad a saber: cepas 4.1 y 7.1 se les midió su capacidad de producir azúcares fermentables arrojando valores por el método de Multistix G10 menores a 250mg/ml.
- Las Cepas bacterianas 3.1, 4.1, 5.2 y 5.3 obtuvieron las concentraciones mayores de inóculo en UFC, y deben ser probadas en medios FES individuales para establecer su potencial lignocelulolítico y establecer su capacidad de trabajar en consorcio con levaduras o con hongos filamentosos en medios especiales y modificados con extracto de bagazo de caña panelera.

- Se obtuvieron por aislamiento a partir del bagazo de caña panelera variedad RD, en medios de cultivo modificados, el grupo de hongos filamentosos relacionados en el cuadro 15 con potencial lignocelulolítico. A los consorcios fúngicos establecidos por las pruebas de compatibilidad a saber: cepas 3, 1, 4, y 7 se les midió su capacidad de producir azúcares fermentables en los siguientes consorcios: 3:1, 3:4, y 3:7 relacionados en el cuadro 19 arrojando valores por el método de Multistix G10 de 500, 2000 y 1000 mg/ml, respectivamente, en tal sentido el consorcio 3:4 fue seleccionado para el pretratamiento, las mediciones de Fehling cuantitativo y los análisis físico-químicos de su composición.
- El consorcio con mayor producción de azúcares fermentables por Multistix G10 a saber: la asociación de las cepas 3:4 arrojó un valor de 6,89 g/l posterior al pretratamiento usando para cuantificar el método de Fehling cuantitativo. Estas cepas actuando en consorcio fueron muy útiles en la biotransformación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina, en su solubilización que alcanzó un porcentaje total del 55,94%, como se deriva de la interpretación de los resultados físico - químico.
- Es necesario destacar que el consorcio 3:4 tiene una alta potencialidad como lignolítico, afirmación sustentada en el informe de análisis del CEIAM de la UIS que señala una solubilización de la fracción de lignina del 99,45%. Este resultado debe llevar al diseño de pruebas para confirmar su potencial en otros bagazos de caña de otras variedades o en biomasas con alto contenido de lignina, probablemente de interés industrial como alternativa para el blanqueamiento de la pulpa de papel.
- La prueba de varianza y la prueba de Tukey establecieron que no se presentan diferencias significativas entre las cepas fúngicas para el mismo medio de cultivo, pero en cambio existen diferencias significativas entre las poblaciones desarrolladas de cada cepa fúngica en los diferentes medios de cultivo. Este resultado permitió justificar la selección de las cepas con mejor crecimiento y desarrollo para FES como se señaló en el cuadro 17. Test de rango múltiple.
- La eficiencia del proceso de pretratamiento se mide en función de la fracción de solubilidad del material lignocelulósico presente; por esta razón se hizo necesario realizar diferentes análisis al material antes del pretratamiento, en especial los que determinaron el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina, solubles, contenido de nitrógeno y el contenido de azúcares reductores por el método de Fehling cuantitativo dada la dificultad técnica para realizar el método DNS previsto.
- De acuerdo con la información del cuadro 21 se pudo establecer que la composición química del bagazo no tratado, señala un 38,82 % de celulosa, el pretratamiento microbiano buscaba reducir éste porcentaje, ya que teóricamente es la principal fuente de azúcares reductores; interpretando que su reducción corresponde al trabajo enzimático de los hongos sobre la fibra, que produce a su vez, una reducción del grado de cristalinidad, de los datos se puede inferir que el pretratamiento con hongos filamentosos logró éste objetivo reduciendo en un 40,36% el contenido inicial sin tratar y generando solubles que pueden ser útiles en los procesos

industriales para la generación de etanol, superior al valor reportado por Pernalet et al, 2008 usando PDA.

Cuadro 21. Comparativo de la Eficiencia del Proceso

Parámetro	%Teórico	% Sin Pretratamiento	% Con Pretratamiento	% Fracción solubilizada	% reducción
%Celulosa	46,6	38,82	23,15	15,67	40,36
%Hemicelulosa	25,2	21	10,08	10,92	52
%Lignina	20,7	29,51	0,16	29,35	99,45
%Azúcares Reductores Multistix G10		100 -500 mg/ml	500-2000 mg/ml		
Fehling Cuantitativo UNISANGIL		2,1 mg/l	6,89g/l		
Total				55,94	

- La hidrólisis obtenida de la fracción de celulosa por hongos filamentosos en éste estudio es menor a la hidrólisis reportada por Rivers y Emert, 1988 y Lynd et al, 2002, quienes obtuvieron valores para hidrólisis de la celulosa en un 67.1% usando hidrólisis alcalina con NaOH a 60°C, sin embargo no reportan datos sobre la hidrólisis de las fracciones de hemicelulosa y lignina.
- Se esperaba una reducción de los porcentajes de hemicelulosa por hidrólisis del pretratamiento; los resultados permiten establecer que se redujo al menos en un 52% por acción microbiana de los hongos filamentosos, este resultado es importante porque se constituye en la fuente de azúcares C₅.
- Pernalet et al 2008, reporta un porcentaje de solubilización de la hemicelulosa igual al 57,3 % posterior a un pretratamiento del bagazo de caña de azúcar tratado por presurización y despresurización amoniacal PDA que es un valor muy cercano al obtenido con el pretratamiento con hongos filamentosos del 52% y que a su vez es inferior al conseguido por Sung y Cheng, 2002, quienes reportaron hidrólisis de la hemicelulosa entre el 80 y el 100% con ácido diluido, sulfúrico, clorhídrico o nítrico al 1,5%, pero con una mínima despolimerización de la celulosa y nula de la lignina, la temperatura para el proceso llega a los 200°C, parámetros de solubilización ampliamente superados con el pre-tratamiento biológico con hongos filamentosos.
- En el mismo sentido Cusenz y Millar 1997 y Texeira 1999, reportan hidrólisis de la hemicelulosa con ácido concentrado al 30% y Sun y Cheng, 2002, reportaron hidrólisis total de la hemicelulosa por deslignificación oxidativa usando peroxidasa y peróxido de hidrógeno al 2%.
- Para el caso de la lignina se esperaba que la mayor parte se hidrolizara durante el pretratamiento, los datos de los resultados permiten confirmar lo esperado, el porcentaje inicial de la muestra corresponde al 29,51% y la lignina cuantificado posterior al pre-tratamiento con hongos filamentosos fue de 0,16%, presentándose en

la práctica una reducción del 99,45% o biotransformación total de la lignina por efecto de la actividad microbiana, superando lo publicado por Pernalet et al, 2008, que asume una mínima variación para el parámetro después de PDA y a lo reportado por Sun y Cheng, 2002, quienes reportaron hidrólisis de la lignina en un 50% por deslignificación oxidativa usando peroxidasa y peróxido de hidrógeno al 2%; los mismos autores reportan que la lignina no se solubiliza por explosión a vapor; y Lynd et al, 1996, reportaron una solubilización parcial de la lignina de entre el 20 y el 50% usando agua líquida caliente a 230°C y presurizada.

- Estos resultados, permiten señalar que el pretratamiento con hongos filamentosos genera, porcentajes importantes de eficiencia en la solubilización de la fibra compleja polimérica hasta solubles, que pueden ser útiles en los procesos industriales y que se relacionan con el aprovechamiento de las fibras lignocelulósicas del bagazo de caña, el cual, en la mayoría de los casos iguala o supera en la eficiencia de la transformación a los pretratamientos químicos, físicos y físico químicos en forma integral.

- Es notoria la constante del comportamiento degradativo de los pretratamientos químicos y físicos en el sentido de que si se obtiene una importante solubilización de una de las fracciones lignocelulósicas, una o las dos restantes fracciones no experimentan reducciones considerables, comparativamente con el pretratamiento microbiano que usa hongos filamentosos que arrojaron valores de solubilidad del 40.36, 52 y 99,45% de celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente, sin requerimientos mayores en un medio FES, en condiciones de pH ácido y a temperatura de 37°C.

- La demostración de la producción de azúcares reductores se determinó por el método de Multistix G10 y Fehling cuantitativo, ante la dificultad técnica del laboratorio de análisis para montar el método 3,5 DNS debido a la carencia del reactivo de DNS.

- Se esperaba que la hidrólisis de las fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina liberaran azúcares reductores que pudieran ser detectadas en los análisis cualitativos y cuantitativos para azúcares; durante los ensayos realizados se logró establecer que las muestras relacionadas en los cuadros 14 y 19 para bacterias y hongos respectivamente, en los cuales, los resultados de las pruebas de Molish, Fehling cualitativo, Seliwanoff, fueron positivos para la presencia de azúcares reductores y el ensayo con el método Multistix G10, reportan valores de glucosa superiores a 2 000 mg/dl, en el caso de hongos filamentosos. La prueba confirmativa realizada consistió en una prueba de Fehling cuantitativo desarrollada en el laboratorio académico de química analítica de UNISANGIL, reportando un valor para la muestra pretratada de 6,89 g/l, en relación con el valor obtenido sin pretratamiento que fue de 2,1 g/l, presentándose un incremento de 4,79 g/l de azúcares reductores correspondiendo a un incremento del 30,47 %, datos que se buscó validar por el CEIAM de la UIS por el método de Fehling cuantitativo, sin embargo por razones ajenas a nuestra competencia y propias del laboratorio no fue posible realizar.

- No obstante, Pernelete et al 2008, reporta que la generación de azúcares reductores por PDA es muy bajo. Entretanto, Ferrer et al, 2002, reportaron producciones de azúcares reductores por hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 6%, con concentraciones que variaron de 2,58 a 20,45 g/l con un promedio de 10,53 g/l medido por el método del DNS.
- Se debe corroborar la información obtenida por el método de Multistix G10 y precisar el valor obtenido por Fehling para azúcares reductores realizado en el laboratorio de análisis de UNISANGIL, con la prueba 3,5 DNS, que a la vez debe servir para identificar la cepa y la condición más potencial para FES y como criterio para definir la realización de los análisis físico químicos completos de la muestra de bagazo.
- Durante los ensayos no estaba prevista la realización de análisis para demostrar la presencia de inhibidores microbianos de la actividad enzimática que se esperan como productos fenólicos solubilizados de la lignina, mención especial, ya que la lignina se degradó casi totalmente. Se puede acotar que probablemente la concentración de la sustancia inhibidora no alcanzó niveles de concentración críticos para la actividad enzimática o que el tiempo de residencia de la prueba es muy corta para alcanzar dicha concentración. En el mismo sentido debe ser considerada la inhibición por los ácidos orgánicos esterificados de la hemicelulosa.
- Se debe diseñar una prueba en la que se estime la concentración del inhibidor y determinar la concentración a la cual la actividad enzimática es afectada por el inhibidor en condiciones particulares de temperatura, pH, concentración de inóculo, lo anterior, probablemente usando un biorreactor en el que se pueda correr el proceso en cultivo continuo o discontinuo y en el que se pueda garantizar el control del aporte de aire en el sistema.
- Deben considerarse diseños experimentales que permitan probar consorcios microbianos celulolíticos usando las cepas aisladas en la presente investigación y en los cuales se pueda medir la actividad celulolítica del complejo enzimático (endoglucanasa y exoglucanasa) de hongos filamentosos, así como probar diferentes porcentajes de modificación de medios.
- Vale la pena anotar que de acuerdo con los resultados de los análisis físicos – químicos, el bagazo resultante del proceso de biotransformación microbiana en medio FES, se revela como un abono potencial, en razón de su alto contenido de nitrógeno total y de materia orgánica.

BIBLIOGRAFÍA

ATALLA, R. H., J. M. HACKNEY, I. UHLIN, AND N. S. THOMPSON. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**:109–112.

BAYER, E. A., R. KENIG, AND R. LAMED. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* **156**:818–827.

BERG C (2001) *World Fuel Ethanol. Analysis and Outlook.* www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html

BHAT MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotech Adv.* 2000; **18**(5):355-383.

BIOMASS PROGRAM TECHNOLOGIES. Energy Efficiency and Renewable Energy, Department of Energy, EE.UU. www1.eere.energy.gov/biomass/technologies.html.

BIOREFINING PROCESSES. Fermentation of 6-Carbon Sugars and Starches. Wisconsin Biorefining Development Initiative, EE.UU. www.wisbiorefine.org.

BRICEÑO, B. Carlos. ASPECTOS ESTRUCTURALES Y DE ENTORNO QUE ENMARCAN LOS PROYECTOS E INVERSIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN COLOMBIA. <http://www.cengicana.org/Portal/SubOtrasAreas/Etanol/Presentaciones/ArticuloProduccionBioetanolColombia.pdf>. Bogotá, Colombia.

BRONNENMEIER, K. AND W. L. STAUDENBAUER. 1988. Resolution of *Clostridium stercorarium* cellulase by fast protein liquid chromatography (FPLC). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:432–436.

BROWN, R. M., JR., AND I. M. SAXENA. 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.* **38**:57–67.

BUNGAY., H ENERGY. The biomass Options. New York: John Wiley&Sons. (1981).

BUSTO, M. D., N. ORTEGA, AND M. PEREZ-MATEOS. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. *Biores. Technol.* **57**:187–192.

CARRASCO., J.E., SAIZ M. C., NAVARRO A., Effects of Dilute Acid and Steam Explosion Pretreatments on the Cellulose Structure and kinetics of Cellulose Fraction Hydrolysis by Dilute Acids in Lignocellulosic Materials. *Biochem Biotechnol* **45/46**:23-34, (1994).

CLAASSEN PAM, VAN LIER JB, LÓPEZ CONTRERAS AM, VAN NIEL EWJ, SIJTSMA L, STAMS AJM, DE VRIES SS, WEUSTHUIS RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Observatorio agrocadenas. La cadena agroindustrial de la panela en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1992 – 2005. Bogotá, 2005. p 23.

COLOMBIA. Plan de negocios. Proyectos de alcoholes carburantes. http://www.agrocadenas.gov.co/biocombustibles/documentos/otros/Proyecto_alcohol_c carburante.pdf. Bogotá. Colombia. Febrero 2003.

COSTERTON, J. W., K. J. CHENG, G. G. GEESEY, T. I. LADD, J. C. NICKEL, M. DASGUPTA, AND T. J. MARRIE. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435–464.

DALE B. E., MOREIRA M. A freeze explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. Pp 31-43 in Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, vol 12, C.D. Scott eds., New York; Willey&Sons. (1983).

DANIEL, E. STACKEBRANDT, AND H. W. MORGAN. 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:263–266.

DETROY RW, JULIAN G. Biomass conversion: Fermentation chemicals and fuels. *CRC. crit. Rev Microbiol.* 1982; 10:203-228.

DÍAS RG & WACHER RC (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latin. Microbiol.* 45 (1-2): 30-40.

E.K. Pye, in “Biorefineries – Industrial Processes and Products, Satus Quo and Future Directions. Vol. 2”, Chapter 5, pp 165-200, Birgit Kamm, R. Gruber and Michael Kamm Eds, Wiley-VCH GmbH % Co. KGaA, Weinheim, 2006. ISBN: 3-257-31027-4.

ESPAÑA. Desarrollo agroindustrial de los combustibles en Castilla y león. PREMIO COLECCIÓN DE ESTUDIOS DEL CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE CASTILLA Y LEÓN. Edición 2006.

ESPAÑA. Plan de Energías Renovables, 2005-2010. Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía (IDAE), Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. España. 2005 www.idae.es/central.asp?m=p013&t=3#.

ESPINOZA FENWARTH A. Colombia y la crisis de alimentos. En : Portafolio.com.co. El portal de economía y negocios. Bogotá. 2008.

F. ENQUIST et al.; *Tappi.* 45, 128 (1962).

FOWLER, P.A., MCLAUCHLIN, A.R. Y HALL, L.M. (2003) The Potential Industrial Uses of Forage Grasses Including Miscanthus. The National Non-Food Crops Centre (NNFCC), Reino Unido. www.nnfcc.co.uk/nnfcclibrary/cropreport/download.cfm?id=27.

GELHAYE, E., H. PETITDEMANGE, AND R. GAY. 1993. Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* 175:3452–3458.

GONG, J. H., AND C. W. FORSBERG. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 and adherence-defective mutants to cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3039–3044.

GROWING SHORT ROTATION COPPICE. Department of Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), Reino Unido. 2002 www.defra.gov.uk/erdp/pdfs/ecs/src-guide.pdf.

HOLTZAPPLE, M.T., HUMPREY A. E., Effect of Organosolv Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Poplar. *Biotech and Bioenergy* 6: 161-173, 1984.

HOSKINSON, R.L., HESS, J.R., FOUST, T.D., MCKEAN, W.T. Y LEWIS, M. S. (2001) Fractionation of Higher Value Crop Residue Components for Conversion into Bioenergy and Industrial Products. Paper number 016077, 2001 ASAE Annual Meeting. American Society of Agricultural and Biological Engineers, Michigan, EE.UU.

HUNGATE, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

IBARRA-JUNQUERA V, ESCALANTE-MINAKATA P, MURGUÍA JS & ROSU HC (2006) Inferring mixed-culture growth from total biomass data in a wavelet approach. *Physica A.* 370: 777-792.

IENICA (Interactive European Network for Industrial Crops and their Application). www.ienica.net.

KAURI, T., AND D. J. KUSHNER. 1985. Role of contact in bacterial degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:301–306.

KUDO, H., K.-J. CHENG, AND J. W. COSTERTON. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33:267–271.

KUHAD RC, SINGH A, ERIKSSON KE. Microorganisms enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1997; 57: 45-125.

LADISCH, M. R., DYCK K., Cellulose to sugars: New path gives quantitative yield *Science* 201: 743-745- 1979.

LEE R. LYND. Et al, 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. P.N.A.S, Chemical and Biochemical Engineering, Thayer School of Engineering and department of Biological Science, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H. Y PRETORIUS, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.

MARCHESSAULT, R. H., AND J. A. HOWSMON. 1957. Experimental evaluation of the lateral order distribution in cellulose. *Text. Res. J.* 27:30–41

MARCHESSAULT, R. H., AND P. R. SUNDARARAJAN. 1993. Cellulose, p. 11–95 *In*G. O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides*, vol. 2. Academic Press, Inc., NewYork, N.Y.

MARTÍNEZ, H. Acevedo, X. Características y estructura de la cadena agroindustrial de la panela en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Bogotá, Colombia. Mayo de 2003.

MCALOON, A., TAYLOR, F., YEE, W., IBSEN, K. Y WOOLEY, R. (2000) Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. National Renewable Energy Laboratory, Department of Energy, EE.UU. www.nrel.gov/docs/fy01osti/28893.pdf.

MERENCIO D, GIRALDO G. Aproximación experimental a la combustión del bagazo de caña en lecho fluidizado. España. p 4.

MIRON, J., AND C. W. FORSBERG. 1999. Characterisation of cellulose-binding proteins that are involved in the adhesion mechanism of *Fibrobacter intestinalis* DR7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:491–497.

NG, T. K., AND J. G. ZEIKUS. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* 150:1391–1399.

NG, T. K., P. J. WEIMER, AND J. G. ZEIKUS. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 114:1–7.

NIELSEN J, VILLADSEN J & LIDEN G (2003) *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic Plenum Publishers, USA.

NISHISE, H., A. OGAWA, Y. TANI, AND H. YAMADA. 1985. Studies on microbial, glycerol dehydrogenase. 4: glycerol dehydrogenase and glycerol dissimilation in *Cellulomonas* sp. NT3060. *Agric. Biol. Chem.* 9:629–636.

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. L'état de l'insécurité alimentaire dans le monde 2006 (Roma: FAO, 2006), p. 8.

PARSONS, C. RAMITH, E. DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR EL BAGAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR PASTER, M., PELLEGRINO, J.L. Y CAROLE, T.M. "Industrial Bioproducts: Today and Tomorrow". Department of Energy, Estados Unidos. 2003. www.biomass.govtools.us/pdfs/BioProductsOpportunitiesReportFinal.pdf.

PERLACK, R.D., WRIGHT, L.L., TURHOLLOW, A.F., GRAHAM, R.L., STOKES, B.J. y ERBACH, D.C. "Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton supply". Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, Estados Unidos. 2005 www.feedstockreview.ornl.gov/pdf/billion_ton_vision.pdf.

POULSEN, O. M., AND L. W. PETERSEN. 1988. Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:480–484.

PRAKASH R, HENHAM A, BHAT IK (1998) Net energy and gross pollution from bioethanol production in India. *Fuel* 77: 1629-1633.

R. GARCÍA, M. BESSON AND P. GALEZOT, *Applied Catalysis A: General* 127, 165-176 (1995).

RAINEY, F. A., A. M. DONNISON, P. H. JANSSEN, D. SAUL, A. RODRIGO, P. L. BERGQUIST, R. M.

RAJOKA, M. I., AND K. A. MALIK. 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Biores. Technol.* 59:21–27

REUTERS, «La FAO met en garde contre les biocarburants», 15 de abril de 2008.

RODRÍGUEZ B., GONZALO. La panela en Colombia frente al nuevo milenio. En Corpoica-Fedepanela, Manual de Caña de Azúcar, 2000.

RODRÍGUEZ. N. EL BAGAZO Y LAS FIBRAS ANUALES: PRESENTE Y FUTURO PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN. Congreso iberoamericano de investigación en celulosa y papel 2000. <http://ciadicyp.unam.edu.ar/trabajos/trabajos/varios/Fernandez-95-C9-Cu.pdf>. La Habana, Cuba.

SANCHEZ J., CARDONA C. Producción biotecnológica de alcohol carburante 1: Obtención a partir de diferentes materias primas. 2005

SHI, Y., AND P. J. WEIMER. 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2583–2591.

SHOHAM, Y., R. LAMED, AND E. A. BAYER. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* 7:275–281.

SIMANKOVA, M. V., N. A. CHERNYCH, G. A. OSIPOV, AND G. A. ZAVARZIN. 1993. *Halocella cellulolytica*, gen. nov. sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:385–389.

SMOOK G.A., Handbook for Pulp and Paper Technologies 2nd. Ed. Joint Textbook Committee of the Paper Industry, TAP-PI Atlanta, USA, and CPPA, Montreal Canada.

SUN Y, CHENG J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.

SVETLICHNYI, V. A., T. P. SVETLICHNAYA, N. A. CHERNYKH, AND G. A. ZAVARZIN. 1990. *Anaerocellum thermophilum*, new genus new species, an extremely thermophilic cellulolytic eubacterium isolated from hot springs in the valley of geysers (Russian SFSR, USSR). *Mikrobiologiya* 59:598–604.

TENGERDY, R. P., W. H. RHO, AND A. M. MOHAGHEGHI. 1991. Liquid fluidized bed starter culture of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 27:195–204.

THE ASSOCIATED PRESS, «La communauté internationale confrontée à une sérieuse crise alimentaire», 14 de abril de 2008.

THE ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), Report (2001). “The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability”. OECD, París, Francia. www1.oecd.org/publications/e-book/9301061e.pdf.

THURSTON, B., K. A. DAWSON, AND H. J. STROBEL. 1993. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2631–2637

VEGA JM, CASTILLO FY, CÁRDENAS F. La bioconversión de la energía. Madrid: Pirámide; 1983.

VELASQUEZ ARREDONDO H, AGUDELO SANTAMARIA A, ALVAREZ GONZÁLEZ J. Mejorando la producción de panela. En : Revista de agroecología LEISA. Vol 21. 2005.

VLADUT-TALOR, M., T. KAURI, AND D. J. KUSHNER. 1986. Effects of cellulose on growth, enzyme production and ultrastructure of a *Cellulomonas* species. *Arch. Microbiol.* 144:191–195.

WALSUM VAN, ALLEN S. G., SPENCER M.J., Conversion of Lignocellulosic Pretreated with Hot Compressed Liquid Water to Ethanol. *Appl Biochem Biothechnol.* 57/58:157-170. (1996).

WEIMER, P. J. 1993. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. *Arch. Microbiol.* 160:288–294.

WHITE BIOTECHNOLOGY: “Gateway to a More Sustainable Future” EuropaBio, Bruselas, Bélgica. 2003
www.europabio.org/documents/100403/Innenseiten_final_screen.pdf.

WILSON, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues, p. 1–32. *In* H. G.Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (ed.), forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy—Crop Science Society of America—Soil Science Society of America, Madison, Wisc.

WRIGHT, L.L., BOUNDY, B., PERLACK, R.D., DAVIS, S. Y SAULSBURY, B. “Biomass Energy Data Book: Edition 1”. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, Estados Unidos. 2006
cta.ornl.gov/bedb/pdf/Biomass_Energy_Data_Book.pdf.

ANEXO A. Géneros de bacterias y hongos aerobios y anaerobios para la obtención de la transformación de la celulosa

LYNND ET AL.

TABLE I. Major morphological features of cellulolytic bacteria

Oxygen relationship	Genus	Representative species ^a	Gram reaction	Morphology	Growth temp. ^b	Resting state	Motility	Features of cellulase system	References	
Aerobic	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	+	Rod	Thermo			Noncomplexed, cell free	48	
	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	+	Rod	Meso	Endospore	Flagellar	Noncomplexed, cell free	220	
	<i>Caldivacillus</i>	<i>C. celovonens</i>	+	Rod	Thermo	Endospore		Noncomplexed, cell free	48	
	<i>Cellulomonas^c</i>	<i>C. flavigena</i> , <i>C. uda</i>	+	Rod	Thermo	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	25, 26, 493	
	<i>Cellobrio</i>	<i>C. fulvus</i> , <i>C. gibbus</i>	-	Curved rod	Meso	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	612	
	<i>Cytophaga</i>	<i>C. hutchinsonii</i>	-	Rod	Meso	None	Gliding	Noncomplexed?, cell free?	322, 384	
	<i>Erwinia</i>	<i>E. carotovora</i>	-	Rod	Meso	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	29	
	<i>Micromonospora</i>	<i>M. chalybea</i>	+	Filamentous rod	Meso	Spore ^d	Nonmotile	Noncomplexed, cell free	200, 215	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	-	Rod	Meso	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	331	
	<i>Sporocytophaga</i>	<i>S. myxococcoides</i>	-	Rod	Meso	Spore ^d	Gliding	Noncomplexed, cell free	697	
	<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>	-	Rod	Thermo				11, 48	
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. reticuli</i>	+	Filamentous rod	Meso	Spore ^d	Nonmotile	Noncomplexed, cell free	715	
	<i>Thermobifida</i>	<i>T. fusca</i>	+	Filamentous rod	Thermo	Spore ^d	Nonmotile	Noncomplexed, cell free	777	
	Anaerobic	<i>Acetivibrio</i>	<i>D. cellulolyticus</i>	-	Curved rod	Meso	None	Nonmotile	Complexed	327, 387, 589
		<i>Anaerocellum</i>	<i>D. thermophilum</i>	+	Rod	Thermo	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	659
<i>Buysvibrio</i>		<i>B. fibrosovens</i>	+	Curved rod	Meso	None	Flagellar	Noncomplexed	294	
<i>Caldicellulosiraptor</i>		<i>C. saccharolyticum</i>	-	Rod	Thermo	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	549	
<i>Clostridium</i>		<i>C. thermoacellum</i> , <i>C. cellulolyticum</i>	+	Rod	Thermo, meso	Endospore	Flagellar	Complexed, mostly cell bound ^e	392, 415, 485, 532, 613	
<i>Eubacterium</i>		<i>E. cellulovorans</i>	+	Rod	Meso	None	Nonmotile		699	
<i>Ferribacterium</i>		<i>F. islandicum</i>	-	Rod	Thermo	None	Flagellar		292	
<i>Fibrobacter</i>		<i>F. succinogenes</i>	-	Rod	Meso	None	Nonmotile	Complexed, cell bound	88, 294, 463, 645	
<i>Halocella</i>		<i>H. cellulolytica</i>	-	Rod	Meso	None	Flagellar	Noncomplexed, cell free	622	
<i>Ruminococcus</i>		<i>R. albus</i> , <i>R. flavefaciens</i>	+	Coccus	Meso	None	Nonmotile	Complexed, cell bound	88, 294	
<i>Spirochaeta</i>		<i>S. thermophila</i>	+	Spiral	Thermo	None		Noncomplexed, cell free	8, 48	
<i>Thermotoga</i>		<i>T. neapolitana</i>	-	Rod	Thermo				48	

^a Not all strains of the indicated species are cellulolytic, and some less active or less studied cellulolytic species within these genera are not listed.

^b Meso, mesophilic; Thermo, thermophilic.

^c Most strains can also grow anaerobically.

^d Unlike true endospores, these spores have only moderate resistance to environmental stress.

^e Except for *C. necroaurum* (81, 83, 606).

MICROBIOL. MOL. BIOL.

ANEXO B. Materiales, métodos y procedimientos

1. TOMA DE MUESTRA

- **LUGAR:** municipio de Valle de San José, vereda los Cinchos, finca los Cinchos, trapiche Valle de San Luis.
- **DESCRIPCIÓN:** se realizó una visita al trapiche para conocer el proceso de molienda y obtención de azúcares para la producción de panela, que se lleva a cabo y posteriormente se procedió a tomar una muestra de bagazo que tenía 2 semanas de almacenado.

La muestra se tomó de la parte central del almacenamiento de bagazo con el ánimo de obtener el material con menores posibilidades de contacto con el medio y así evitar problemas de contaminación. La temperatura y humedad relativa del material seleccionado fue de 37 °C y 77,7 % respectivamente.

La muestra se guardó en bolsas plásticas estériles y sellada con cinta adhesiva de tal forma que se mantuvieran las características iniciales y así poder transportarla al laboratorio para posterior análisis físico químico y microbiológico.

La muestra de bagazo fue guardada a temperatura ambiente en el laboratorio de microbiología.

Para el trabajo de laboratorio se tomó una muestra de bagazo con una humedad relativa del 77,7 % y una temperatura de 29,1 °C y se fragmentaron 500 gr de bagazo en partes entre un (1) mm y dos (2) mm para realizar análisis físico químicos y microbiológicos iniciales.

Esta muestra fue conservada en una Incubadora STABIL THERM – DRY TYPE BACTERIOLOGICAL INCUBATOR – Gravity Convection, GS Blue M. Electric a unit of General Signal; a temperatura ambiente.

Figura 13. Registro fotográfico del lugar de almacenamiento de bagazo de caña para la toma de muestra en el trapiche.



2. MÉTODOS FÍSICOS

2.1 PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

Se preparó la autoclave llenándola de agua hasta la parrilla 1 o 2 cm arriba de la misma.

Se envolvieron los materiales a esterilizar en papel aluminio, asegurándolos con cinta de enmascarar y debidamente marcadas.

Se depositaron en la autoclave de forma organizada.

Se cerró la autoclave teniendo en cuenta que la tapa tenga todo el perímetro a la misma distancia de la base, se revisó que la salida de escape de vapor estuvieran en su sitio, se verificó que la tapa estuviera cerrada correctamente, se revisó que el manómetro al iniciar estuviera en ceros (libras de presión) y en los primeros minutos se colocó la perilla de control de temperatura al máximo.

Se dejó que la temperatura llegara a 121 °C y se mantuvo durante 20 minutos, luego de este tiempo, se llevó la perrilla de control de temperatura al mínimo, se apagó la autoclave y se subió la válvula de escape de vapor y se dejó por 7 minutos.

Se abrió la autoclave, se sacaron los materiales, se marcaron y se depositaron en la nevera para su uso.

Este procedimiento se repitió cotidianamente para cada procesamiento de muestras.

3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CULTIVO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS

3.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO CON EXTRACTO DE BAGAZO DE CAÑA PANELERA UTILIZANDO AGAR NUTRITIVO

3.1.1 Materiales:

- Agar Nutritivo
- Papel filtro
- Alcohol
- Barras agitadoras
- 1000 ml de agua destilada.
- Autoclave
- Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Vasos precipitados de 200 ml
- Morteros con pistilo
- Papel crack
- Papel aluminio
- Cinta de enmascarar
- Isopos
- Cajas de petri
- Espátulas
- Asas redondas

3.1.2 Procedimiento:

- Se midieron 250 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml y se selló.
- Se midieron 100 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se midieron 10 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se esterilizaron los materiales a utilizar en la autoclave.
- Se pesaron 10 gr de bagazo en la balanza electrónica.
- Se maceraron los 10 gr de bagazo agregando agua destilada estéril poco a poco.
- Se filtró la muestra.
- Se preparó 250 ml de medio de cultivo agar extracto malta.
- Se adicionó al medio comercial la muestra ya filtrada.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se dividió el medio de cultivo modificado (agar Nutritivo/ extracto de bagazo) en dos Erlenmeyer de 250ml en cantidades iguales denominándose medio 1 y medio 2.
- Al medio 1 se le agregó NaOH 0.01 N para llevarla a un pH neutro.
- Al medio 2 se le agregó HCl al 0.3 N. para llevarla a un pH ácido.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- Se sirvió el medio en las cajas de petri (dos cajas de medio de cultivo ácido y dos cajas de medio de cultivo neutro).
- Se preparó el inóculo pesando 1g de bagazo y se adicionó en 10 ml de agua destilada y esterilizada.
- Se agitó con el agitador magnético.
- Se realizó la siembra en las cajas de petri correspondientes.
- Se realizó una siembra masiva en medio de cultivo neutro y una siembra masiva en medio de cultivo ácido.
- Se realizó una siembra en profundidad en medio de cultivo neutro y una siembra en profundidad en medio de cultivo ácido.
- Se sellaron las cajas y se conservaron a temperatura ambiente.

3.2 CONTEO DE VIABLES POR UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Para calcular el número de bacterias vivas por cada mililitro de la muestra, se puede emplear el recuento en placa por el método de las diluciones seriadas en tubo cuya técnica es la siguiente:

3.2.1 Materiales:

- Muestra
- Cuatro tubos rotulados con numeración correlativa, conteniendo 9 ml de agua destilada estéril c/u o solución salina estéril para efectuar las diluciones
- Cinco pipetas de 1 ml (estériles). Para cada dilución se debe emplear una pipeta limpia y estéril.
- Cuatro placas de petri, estériles, rotuladas con las respectivas diluciones (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000).
- Un matraz conteniendo 100 ml de agar peptona licuado y enfriado a 45°C hasta el momento de su empleo (para evitar la solidificación).

3.2.2 Procedimiento:

- Agitar totalmente la muestra de agua y con una pipeta estéril extraer un ml y transvasarlo al tubo No 1 que contiene 9 ml de agua estéril: se obtiene la dilución 1/10.
- Agitar totalmente el tubo No 1 y con la segunda pipeta extraer un (1) ml de esta dilución 1/10 y depositarlo en la placa rotulada 1:10. Con esta misma pipeta se extrae nuevamente 1 ml de la dilución 1:10 y se transvasa al tubo No 2. Se obtiene una dilución 1:100.
- Agitar totalmente el No 2, y con la tercera pipeta extraer 1 ml de esta dilución 1:100 y depositarlo en la placa rotulada 1:100. Con ésta misma pipeta extraer nuevamente 1ml de la dilución 1:100 y transvasar al tubo No 3. Se obtiene la dilución 1:1000.
- Agitar totalmente el tubo No 3 y con la cuarta pipeta extraer 1 ml de dilución 1:1000 y depositarlo en la placa rotulada 1:1000. Con esta misma pipeta extraer nuevamente 1 ml de la dilución 1:1000 y transvasarla al tubo No 4. Se obtiene así la dilución 1:10.000.
- Agitar totalmente el tubo No 4 y con la quinta pipeta extraer 1 ml de esta dilución 1:10.000. Depositarlo en la placa rotulada 1:10.000
- Agregar en forma aséptica, aproximadamente 20 ml de agar fundido y enfriado a 45°C a cada una de las placas de Petri con las diferentes diluciones de agua y mezclar bien por suaves movimientos de inclinación y rotación de las placas.
- Dejar enfriar el agar, invertir las placas e incubar a 37°C durante 24 horas.

3.2.3 Resultados e interpretación. El número de colonias irá en disminución en las placas sembradas con las diluciones más altas.

Para efectuar el recuento de colonias se descartan las placas que contiene menos de 30 o más de 300 colonias, ya que es posible que los recuentos a partir de ellas no sean exactos. Se cuentan las colonias en cada una de las placas que quedan. Cada colonia se supone que representa un solo organismo de la muestra original. En cada caso se multiplica este recuento de placa individual por la dilución de la muestra de esa placa, obteniéndose así el número de gérmenes por 1 ml de muestra original. Como resultado final, se calcula el promedio de cada una de las muestras.

4. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CULTIVO Y AISLAMIENTO DE HONGOS Y HONGOS FILAMENTOSOS

4.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO CON EXTRACTO DE BAGAZO DE CAÑA PANELERA UTILIZANDO AGAR EXTRACTO MALTA

4.1.1 Materiales:

- Agar extracto malta
- Papel filtro
- Alcohol
- Barras agitadoras
- 1000 ml de agua destilada.
- Autoclave
- Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Vasos precipitados de 200 ml
- Morteros con pistilo
- Papel crack
- Papel aluminio
- Cinta de enmascarar
- Isopos
- Cajas de petri
- Espátulas
- Asas redondas

4.1.2 Procedimiento:

- Se midieron 250 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml y se selló.
- Se midieron 100 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se midieron 10 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se esterilizaron los materiales a utilizar en la autoclave.
- Se pesaron 10 gr de bagazo en la balanza electrónica.
- Se maceraron los 10 gr de bagazo agregando agua destilada estéril poco a poco.
- Se filtró la muestra.
- Se prepararon 250 ml de medio de cultivo agar extracto malta.
- Se adicionó al medio comercial la muestra ya filtrada.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se dividió el medio de cultivo modificado (agar extracto malta/ extracto de bagazo) en dos erlenmeyer de 250 ml en cantidades iguales denominándose medio 1 y medio 2.
- Al medio 1 se le agregó NaOH 0.01 N. para llevarla a un pH neutro.
- Al medio 2 se le agregó HCl al 0.3 N. para llevarla a un pH ácido.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- Se sirvió el medio en las cajas de petri (dos cajas de medio de cultivo ácido y dos cajas de medio de cultivo neutro).
- Se preparó el inóculo pesando 1g de bagazo y se adicionó en 10 ml de agua destilada y esterilizada.
- Se agitó con el agitador magnético.
- Se realizó la siembra en las cajas de petri correspondientes.
- Se realizó una siembra masiva en medio de cultivo neutro y una siembra masiva en medio de cultivo ácido.
- Se realizó una siembra en profundidad en medio de cultivo neutro y una siembra en profundidad en medio de cultivo ácido.
- Se sellaron las cajas y se conservaron a temperatura ambiente.

5.2 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO CON EXTRACTO DE BAGAZO DE CAÑA PANELERA UTILIZANDO AGAR SABOREAUD DEXTROSA

5.2.1 MATERIALES:

- Agar Saboreaud
- Papel filtro
- Alcohol
- Barras agitadoras
- 1000 ml de agua destilada.
- Autoclave
- Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Vasos precipitados 200 ml
- Morteros con pistilo
- Papel crack
- Papel aluminio
- Cinta de enmascarar
- Isopos
- Cajas de petri
- Espátulas
- Asas redondas

5.2.2 PROCEDIMIENTO:

- Se midieron 250 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 250 ml y se selló.
- Se midieron 100 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se midieron 10 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se esterilizaron los materiales a utilizar en la autoclave.
- Se pesaron 10 gr de bagazo en la balanza electrónica.
- Se maceraron los 10 gr de bagazo agregando agua destilada estéril poco a poco.
- Se filtró la muestra.
- Se prepararon 250 ml de medio de cultivo Agar Saboreaud.
- Se adicionó al medio comercial la muestra ya filtrada.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se dividió el medio de cultivo modificado (Agar Saboreaud / extracto de bagazo) en dos erlenmeyer de 250ml en cantidades iguales denominándose medio 1 y medio 2.
- Al medio 1 se le agregó NaOH 0.01 N. para llevarla a un pH neutro.
- Al medio 2 se le agregó HCl al 0.3 N. para llevarla a un pH ácido.
- Se llevó al autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se sirvió el medio en las cajas de petri (dos cajas de medio de cultivo con pH ácido y dos cajas de medio de cultivo con pH neutro).
- Se preparó el inóculo pesando 1g de bagazo y se adicionó en 10 ml de agua destilada y esterilizada.
- Se agitó con el agitador magnético.

- Se realizó la siembra en las cajas de petri correspondientes.
- Se realizó una siembra masiva en medio de cultivo neutro y una siembra masiva en medio de cultivo ácido.
- Se realizó una siembra en profundidad en medio de cultivo neutro y una siembra en profundidad en medio de cultivo ácido.
- Se sellaron las cajas y se conservaron a temperatura ambiente.

5.3 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO CON EXTRACTO DE BAGAZO DE CAÑA PANELERA UTILIZANDO AGAR ROSA BENGALA

5.3.1 MATERIALES:

- Agar Rosa Bengala
- Papel filtro
- Alcohol
- Barras agitadoras
- 1 000 ml de agua destilada.
- Autoclave
- Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Vasos precipitados de 200 ml
- Morteros con pistilo
- Papel crack
- Papel aluminio
- Cinta de enmascarar
- Isopos
- Cajas de petri
- Espátulas
- Asas redondas

5.3.2 PROCEDIMIENTO:

- Se midieron 250 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml y se selló.
- Se midieron 100 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se midieron 10 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 250 ml y se selló.
- Se esterilizaron los materiales a utilizar en la autoclave.
- Se pesaron 10 gr de bagazo en la balanza electrónica.
- Se maceraron los 10 gr de bagazo agregando agua destilada estéril poco a poco.
- Se filtró la muestra.
- Se prepararon 250 ml de medio de cultivo Agar Rosa Bengala.
- Se adicionó al medio comercial la muestra ya filtrada.
- Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se dividió el medio de cultivo modificado (agar rosa de bengala/extracto de bagazo) en dos erlenmeyer de 250ml en cantidades iguales denominándose medio 1 y medio 2.
- Al medio 1 se dejó tal cual se preparó, pues las condiciones iniciales del medio tenían un pH neutro.
- Al medio 2 se le agregó HCl al 0.3 N. para llevarla a un pH ácido de 4.
- Se llevó al autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se sirvió el medio en las cajas de petri (dos cajas de medio de cultivo ácido y dos cajas de medio de cultivo neutro).

- Se preparó el inóculo pesando 1g de bagazo y se adicionó en 10 ml de agua destilada y esterilizada.
- Se agitó con el agitador magnético.
- Se realizó la siembra en las cajas de petri correspondientes.
- Se realizó una siembra masiva en medio de cultivo neutro y una siembra masiva en medio de cultivo ácido.
- Se realizó una siembra en profundidad en medio de cultivo neutro y una siembra en profundidad en medio de cultivo ácido.
- Se sellaron las cajas y se conservaron a temperatura ambiente.

5.4 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS QUE CRECIERON EN EL MEDIO (AEM-ASD-ARB) MODIFICADOS CON EXTRACTO DE BAGAZO DE CAÑA PANELERA

5.4.1 MATERIALES:

- Asas de punta recta
- Agar Malta
- Agar Saboreaud
- Agar Rosa de Bengala
- Cajas de petri
- Laminillas
- Porta objetos
- Auto clave
- Guantes
- Tapabocas
- Alcohol
- Tubos de ensayo

5.4.2 PROCEDIMIENTO:

- Se observaron las cajas que se habían cultivado en preparación de medio de cultivo modificado con bagazo utilizando Agar Saboreaud, Agar Rosa de Bengala y Agar Extracto Malta, para determinar si hubo crecimiento de microorganismos y hacer una descripción macroscópica de estos.
- Se seleccionaron los hongos que presentaron un mejor desarrollo en agar Extracto Malta.
- Se seleccionaron los hongos que presentaron un mejor desarrollo en agar Rosa de Bengala.
- Se seleccionaron los hongos que presentaron un mejor desarrollo en agar Saboreaud.
- Se escogieron los hongos con mejor crecimiento y que presentaban menos contaminación para su posterior purificación y se descartaron las levaduras que se desarrollaron en el agar extracto de malta dado que en teoría hay un comportamiento altamente más favorable para los hongos miceliales en la transformación de azúcares complejos.
- Se esterilizaron los materiales a utilizar en la autoclave.
- Se calentaron los medios de cultivo que estaban en la nevera por una anterior preparación y se esterilizaron en la autoclave.
- Se esterilizó el mesón con hipoclorito de sodio y alcohol.
- Se marcaron las cajas de petri, para saber cuáles eran los hongos a aislar.
- Se realizó el aislamiento de los hongos teniendo en cuenta los siguientes pasos: flamear el asa al rojo vivo y dejar enfriar, destapar la caja de petri y flamearla, tomar el inóculo, flamear la caja y cerrar, hacer una punción en el Agar, sellar la caja con cinta de enmascarar, marcar la caja con el nombre del hongo, envolver cada caja en papel crack y dejarla a temperatura ambiente.

- Este procedimiento se aplicó para cada uno de los hongos seleccionados y se hizo sobre el Agar en el que inicialmente crecieron.
- Se realizó un cultivo sobre portaobjetos siguiendo el procedimiento descrito a continuación: se cortaron dos círculos pequeños de un medio sólido adecuado (Agar Rosa de Bengala), que ha sido vertido en una cápsula de Petri, hasta una altura de 2,5 cm. Los círculos fueron cortados con la ayuda de un tubo de ensayo estéril sin reborde (lo que permite obtener un taco redondo), colocar un portaobjetos estéril sobre una caja de petri estéril e introducir el círculo de Agar rosa de Bengala sobre el portaobjetos, con un asa de punta recta, inocular los cuatro cuadrantes del taco de Agar Rosa de Bengala con el microorganismo a identificar, colocar un cubreobjetos estéril sobre la superficie del círculo de Agar Rosa de Bengala, tapar la caja de Petri que contiene el cultivo e incubar a temperatura ambiente, finalizado el período de incubación, retirar el cubreobjetos (este proceso se realizó en una cabina de seguridad biológica), y se colocó en un portaobjetos que contenía azul de lactofenol.

5.5 MONTAJE EN MEDIO FERMENTACIÓN ESTADO SÓLIDO (FES)

5.5.1 MATERIALES:

- 15 vasos de precipitado
- Cámara Neubauer
- Microscopio
- Cuchillo
- Bagazo
- Micro pipeta
- Alcohol
- 8 asas rectas
- Espátula
- Pipeta
- 7 erlenmeyer estériles de 250 ml
- Hipoclorito de sodio
- 1 000 ml de agua destilada
- Autoclave
- Agar Rosa de Bengala
- Cinta de enmascarar
- 19 cajas de petri
- Porta objetos
- Laminillas
- Papel crack

5.5.2 PROCEDIMIENTO:

- Finalizado el período de incubación, se retiró el cubreobjetos, y se colocó en un portaobjetos que contenía azul de lactofenol.
- Se observó el desarrollo que presentó cada cultivo y se determinó que hongos estaban totalmente puros y cuales presentaban contaminación.
- Se compararon las características de cada hongo con las de la cepa original, para afirmar que el hongo aislado fuera el mismo.
- Los hongos que se encontraban puros se almacenaron y fueron rotulados e identificados como: hongo 1, hongo 2, hongo 3, hongo 4, hongo 5, hongo 6 y hongo 7.
- Los hongos que presentaban contaminación se les realizó nuevamente el proceso de purificación.
- Se preparó un inóculo de cada uno de los hongos seleccionados para proceder a observar y contar microscópicamente utilizando un Montaje en Cámara de Neubauer.

Se hace un montaje con bagazo como sustrato para Fermentación en Estado Sólido en erlenmeyer teniendo en cuenta los siguientes pasos:

- Se realizó en erlenmeyer, utilizando como sustrato bagazo el cual fue el 10% del total del volumen del recipiente a utilizar, se adicionaron nutrientes que el sustrato como tal no posee, los cuales deben ser adicionados al sustrato por impregnación.
- En cuanto al inóculo éste se adicionó en proporción 1% (v/v) con relación al sustrato.
- Se llevó a fermentar teniendo en cuenta una temperatura entre 27 y 37°C, para garantizar la actividad enzimática y una agitación manual o mecánica periódicamente para favorecer la oxigenación y degradación uniforme del sustrato.
- Se realizan observaciones periódicas (cada 24 horas), para establecer cambios en el sustrato.
- Se tomó una muestra al finalizar el proceso para realizar los análisis físico-químicos pertinentes.

6. DETERMINACIÓN DEL INÓCULO

Para realizar la preparación del inóculo se tuvo en cuenta:

- Se prepara un inóculo iniciador de la fermentación, que para el caso de los hongos está en el orden de $1 \cdot 10^6$ esporas fúngicas.
- Para ello el cultivo debe estar puro y haberse confirmado su capacidad degradativa (producción de enzimas), su adaptación al sustrato a fermentar y su compatibilidad con otros microorganismos, si se utiliza un pool.
- Para lograr el conteo se debe realizar una suspensión de esporas en un volumen conocido de agua destilada estéril y proceder a su observación en la Cámara de Neubauer.

6.1 CONTEO EN CÁMARA DE NEWBAUER.

Se procedió a realizar la observación y conteo microscópico por medio del Montaje en Cámara de Neubauer de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se limpió la cámara y la laminilla de cuarzo suavemente con alcohol.
- Se revisó la laminilla de cuarzo que no debe estar desbordada o quebrada.
- Se colocó la laminilla de cuarzo sobre la cámara en forma vertical, esta debe quedar centrada.
- Se procedió a llenar la cámara. Este paso es muy importante y definitivo en la distribución de las células. Es recomendable llenarla con micro pipeta pequeña.
- El llenado fue continuo en un sólo intento.
- La cámara no puede quedar seca esto se detecta porque en las esquinas del recuadro de llenado se ven porciones secas. Tampoco se debe inundar, la apariencia en la cámara es de líquido abundante en las terminaciones del recuadro.
- Se realizó conteo en la cámara de Neubauer teniendo en cuenta el siguiente procedimiento: se llevó la cámara al microscopio y se enfocó el cuadro de conteo con el ocular de 4X para contar las células grandes en los cuadrantes de las esquinas, así:

Observación en 4X. Si las células que va a contar son pequeñas como son las levaduras, bacterias, etc. ubicarse en la cuadrícula central y pasar al ocular de 10X. Se visualizará de la siguiente manera:

En esta cuadrícula se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos, generalmente se cuentan los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio.

Vista de la cuadrícula con el ocular 10X. Para realizar el conteo se pasa al ocular de 40X, donde se visualiza cada uno de los campos y con ayuda de el carro del microscopio se desplaza la cuadrícula hasta contar en todos los cuadros. El conteo en estos campos de la cámara se conoce como AP (alto poder). Con el lente de 40X cada cuadro se ve de la siguiente manera:

Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Se recomienda realizar el conteo siguiendo las flechas para evitar que se cuenten las células dos veces o no que no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen.

6.2 Cálculo de la suspensión de esporas:

Se deben tener en cuenta las siguientes formulas matemáticas:

6.2.1 Para concentración de células pequeñas (esporas/ml):

Esporas/ml = # de esporas en los 5 grupos/5 x 50000 x 1/factor de dilución x ml de solución.

6.2.2 Para concentración de células grandes (esporas/ml):

Esporas/ml = # de esporas en los 4 cuadrados/4 x 10000 x 1/factor de dilución x ml de solución.

7. MÉTODOS FÍSICO QUÍMICOS REALIZADOS AL BAGAZO

7.1 DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA POR DETERGENTE NEUTRO, FND, SEGÚN VAN SOEST.

El método está basado en la solubilidad de un agente tensioactivo, por medio de una solución neutra.

El contenido soluble se define como soluble de detergente neutro (NDS).

El residuo es compuesto por los componentes fibrosos de las células hemicelulosa de la planta, de lignina, de sustancias minerales insolubles y algunas proteínas de las paredes de la célula.

7.1.1 Reactivos:

- Solución de detergente neutro Borato de sodio decahidratado, 6.81 g. EDTA etileno diamino tetracetato, 18.61 g. Sodio lauril sulfato neutro, 30 g.
- Ethoxyethanol, 10 ml. Fosfato disódico anhidro, 4.56 g. Agua destilada, 1000 ml. Verter el borato de sodio y EDTA disódico en un vaso y disolver con una parte de agua destilada mientras se calienta. Agregar lauril sulfato y 2-ethoxyethanol. Disolver por separado fosfato disódico en agua destilada, calentando hasta obtener la solución completa. Mezclar las soluciones con el agua restante. Controlar el pH: rango admisible entre 6.9 y 7.1.
- n-octanol (alcohol octílico).
- Sulfito de sodio anhidro.
- Acetona.

7.1.2 Procedimiento:

- Moler la muestra seca, apertura malla de tamiz: 1 mm.
- Pesarse en un crisol 1 g de muestra molida, (1 mm), precisión + 1mg.
- Agregar 100 ml de solución de detergente neutro a temperatura ambiente y 0.5 g de sulfito de sodio con algunas gotas de n-octanol.
- Calentar hasta hervir y recircular por 60 minutos.
- Filtrar y lavar 3 veces con agua hirviendo y luego 2 veces con acetona fría.
- Secar 8 horas a 105°C. Enfriar en un desecador.
- Pesarse.
- Calcular la fibra detergente neutro: $FND \% = \frac{\text{peso del crisol} + \text{peso del residuo} - \text{peso del crisol}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$. Detergente neutro soluble: $NDS\% = FND\%$.
- Colocar en mufla a 550° por 2 horas. Enfriar en desecador.
- Pesarse.
- Calcular la ceniza insoluble en detergente neutro: pérdida por incineración x 100 peso de la muestra.

7.2 DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA POR DETERGENTE ÁCIDO, FAD, SEGÚN VAN SOEST

El método está basado en la solubilidad de un agente tensioactivo, por medio de una solución ácida.

El residuo fibroso está compuesto por celulosa, lignina y por las sustancias minerales insolubles en un ambiente ácido, esto se define como FAD.

La diferencia en FND (fibra detergente neutra) y FAD (fibra detergente ácida) generalmente está determinado por las hemicelulosas.

7.2.1 Reactivos:

- Solución de detergente ácido. Cetil Trimetil Amonio Bromuro, grado técnico, 20 g.
- Ácido sulfúrico 1N (49.04g/l) 1 l. Disolver el tensioactivo en el ácido, agitando, para facilitar la disolución.
- n-octanol (alcohol octílico).
- Acetona.

7.2.2 Procedimiento:

- Moler la muestra seca, apertura malla de tamiz: 1 mm.
- Pesar en un crisol 1 g de muestra molida, (1 mm), precisión +1mg.
- Agregar 100 ml de solución de detergente ácido a temperatura ambiente y algunas gotas de n-octanol.
- Calentar hasta hervir y recircular por 60 minutos.
- Filtrar y lavar 3 veces con agua hirviendo y luego 2 veces con acetona fría.
- Secar 8 horas a 105°C. Enfriar en desecador.
- Pesar.
- Calcular la fibra detergente ácida: $FAD\% = \frac{\text{peso del crisol} + \text{peso del residuo} - \text{peso del crisol}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$
- Colocar en mufla a 550°C por 2 horas. Enfriar en desecador.
- Pesar.
- Calcular la ceniza insoluble en detergente ácido: pérdida por incineración x 100 peso de la muestra.

7.3 PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO TOTAL

7.3.1 Objetivo. Determinar la concentración de nitrógeno presente en la muestra para luego ser transformado a través de un factor en proteína.

7.3.2 Alcance y campo de aplicación. El método es aplicable a alimentos en general.

7.3.3 Fundamento. El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en: a) Acido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o b) Acido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

7.3.4 Referencias.

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.
- FAO Food and Nutrition Paper 14/7 Roma, 1986

7.3.5 Material y equipo:

- Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg.
- Equipo Kjeldahl
- Manto calefactor
- pHmetro
- Material usual de laboratorio.

7.3.6 Reactivos:

- Acido sulfúrico concentrado, p.a.
- Sulfato de potasio o sulfato de sodio, p.a.
- Sulfato cúprico, p.a.
- Solución de hidróxido de sodio al 15 %. Disolver 150 g de NaOH y completar a 1 litro.
- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N. Tomar 2.7 ml de H₂SO₄ concentración. y completar a 1 litro, luego estandarizar con Na₂CO₃ anhidro p.a.
- Solución de hidróxido de sodio al 30 %. Disolver 300 g de NaOH y completar a 1 litro.
- Solución indicadora de rojo de metilo al 1 % en etanol. Disolver 1 g de rojo de metilo en 100 ml de etanol (95 %).
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Tomar 4 g de NaOH y enrasar a 1 litro con agua recientemente hervida y enfriada. Valorar con ácido succínico.
- Acido bórico al 3 %. Disolver 30 g de ácido bórico y completar a 1 litro.
- Indicador de Tashiro: rojo de metilo al 0.1 % y azul de metileno al 0.1 % en relación de 2:1, en alcohol etílico.

- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N. Tomar 8.3 ml de HCl concentración. y enrasar a 1 litro. Valorar con Na₂CO₃ anhidro.

7.3.7 Procedimiento:

- Realizar la muestra en duplicado.
- Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.
- Pesar al 0.1 mg. alrededor de 1 g de muestra homogeneizada (m) en un matraz de digestión Kjeldahl.
- Agregar 3 perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0.5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Conectar el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %. El disco poroso produce la división de los humos en finas burbujas con el fin de facilitar la absorción y para que tenga una duración prolongada debe ser limpiado con regularidad antes del uso. Los depósitos de sulfito sódico se eliminan con ácido clorhídrico.
- Cuando la solución de hidróxido de sodio al 15 % adicionada de fenolftaleína contenida en la trampa de absorción permanece incolora debe ser cambiada (aprox. 3 análisis).
- Calentar en manta calefactora y una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 min. más. Si la muestra tiende a formar espuma agregar ácido esteárico o gotas de silicona antiespumante y comenzar el calentamiento lentamente.
- Enfriar y agregar 200 ml de agua.
- Conectar el matraz al aparato de destilación, agregar lentamente 100 mL de NaOH al 30 % por el embudo, y cerrar la llave.
- Destilar no menos de 150 ml en un matraz que lleve sumergido el extremo del refrigerante o tubo colector en: a) 50 ml de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, 4 a 5 gotas de rojo de metilo y 50 ml de agua destilada. Asegurar un exceso de H₂SO₄ para que se pueda realizar la retrotitulación. Titular el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo o b) 50 ml de ácido bórico al 3 %. Titular con ácido clorhídrico 0.1 N hasta pH 4.6 mediante un medidor de pH calibrado con soluciones tampón pH 4 y pH 7, o en presencia del indicador de Tashiro hasta pH 4.6
- Cada cierto tiempo es necesario verificar la hermeticidad del equipo de destilación usando 10 mL de una solución de sulfato de amonio 0.1 N (6.6077 g/L), 100 ml de agua destilada y 1 a 2 gotas de hidróxido de sodio al 30 % para liberar el amoníaco, así como también verificar la recuperación destruyendo la materia orgánica de 0.25 g de L(-)-Tirosina. El contenido teórico en nitrógeno de este producto es de 7.73 %. Debe recuperarse un 99.7 %

7.3.8 Cálculo y expresión de resultados.

$$7.1.- \% N = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$

$$7.2.- \% \text{ Proteína} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times \text{factor}}{m \times 1000}$$

Donde:

V: 50 mL H₂SO₄ 0.1 N - gasto NaOH 0.1 N o gasto de HCl 0.1 N

m : masa de la muestra, en gramos.

Factores:

- 6.25: para carne, pescado, huevo, leguminosas y proteínas en general
- 5.7: para cereales y derivados de soya
- 6.38: leche
- 5.55: gelatina
- 5.95: arroz

7.3.9 Repetibilidad del método. La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas una después de otra, por el mismo analista, no debe exceder 0.06 % de Nitrógeno o 0.38 % de proteína.

En la planilla de resultados se indicará método utilizado, identificación de la muestra, peso de muestra, gastos de titulación, factor utilizado y resultados obtenidos de la muestras en duplicado con 2 decimales.

8. DETERMINACIÓN DE pH

8.1 NORMA SM 4500-B.

8.1.1 Objetivo. Determinar el pH de una muestra de agua, para conocer la intensidad de su carácter ácido o básico.

8.1.2 Muestras probadas. Esta prueba se realiza a muestras de APN, ARI y ARD.

8.1.3 Definiciones. La medida del pH es muy importante en la química del agua y es uno de los ensayos más frecuentemente usados. El pH da una medida de la acidez o alcalinidad de un agua residual doméstica o industrial. La acidez depende de la presencia de ácidos inorgánicos fuertes o débiles, sales de bases fuertes y sales de metales pesados. La alcalinidad depende de la presencia de carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, sílice libre, silicatos solubles, fosfatos y boratos, sales de bases orgánicas e inorgánicas débiles.

8.1.4 Contenido.

8.1.4.1 Muestreo, preservación y almacenamiento. Se recomienda hacer la determinación del pH en el sitio del muestreo, si esto no es posible, tome una muestra representativa de agua de 50 mL en un recipiente de vidrio o plástico, protéjala del sol y antes de 2 horas determínele el pH.

8.2 MÉTODO POTENCIOMÉTRICO.

- **Principio.** La diferencia de potencial que existe entre un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia (calomel KCl saturado) sumergidos en una misma solución, es una función lineal del pH de ésta

La medida de esta diferencia de potencial se efectúa con ayuda de un pHmetro en el cual el cuadrante del galvanómetro está directamente graduado en unidades de pH.

- **Interferencias.** El electrodo de vidrio está relativamente libre de interferencias por color, turbiedad, materia coloidal, oxidantes, reductores y salinidad alta, excepto por un error de sodio a $\text{pH} > 10$. Este error se reduce usando electrodos especiales llamados de "error de sodio". Las medidas de pH son afectadas por la temperatura en dos formas: a) Efectos mecánicos que son causados por cambios en las propiedades de los electrodos, b) Efectos químicos causados por cambios en el equilibrio.

En el primer caso, la pendiente Nernstiana aumenta al aumentar la temperatura y el electrodo gasta tiempo para alcanzar el equilibrio térmico. Esto puede causar un pH inestable en un período largo de tiempo. Debido a que el equilibrio químico afecta el

pH, los buffers de pH patrón, tienen un pH especificado a una temperatura determinada. Siempre se debe informar la temperatura a la cual el pH se midió.

8.2.1 Equipos

- Medidor de pH o potenciómetro
- Vasos de precipitados de polietileno o de teflón

8.2.2 Reactivos:

- Buffer de pH = 7
- Buffer de pH = 4

8.2.3 Procedimientos

8.2.3.1 Calibración con dos Soluciones Buffer

- Seleccionar dos soluciones buffer de tal forma que el pH de la muestra esté dentro del valor de éstos. La primera de pH = 7,0 (isopotencial) y la segunda de un pH cerca al pH esperado en la muestra (pH = 4 ó pH = 10).
- Lavar primero el electrodo o los electrodos con agua destilada y luego colocar el electrodo en el buffer pH = 7,0.
- Esperar que se estabilice el aparato.
- Lavar primero el electrodo o los electrodos con agua destilada y luego colocar el electrodo en el segundo buffer.
- Cuando la lectura sea estable, colocar el valor especificado del pH del segundo buffer teniendo en cuenta el manual de instrucciones del aparato.
- Si todas las etapas están ejecutadas correctamente y la pendiente está entre 92 y 102%, proceda a la medida de pH.

8.2.3.2 Medida del pH

- Calibre el electrodo o los electrodos como se describió anteriormente.
- Lavar el electrodo o los electrodos con agua destilada y luego con la muestra.
- Colocar el electrodo o los electrodos en la muestra.
- Registrar el pH y la temperatura de la muestra cuando la lectura sea estable.
- Calibrar antes de usarlo
- Agitar las soluciones buffer y las muestras durante la determinación del pH.
- Lavar el electrodo o los electrodos al terminar el trabajo.

8.2.4 Cálculos y resultados. Se leen los resultados directamente del potenciómetro.

8.2.5 Precisión y vías. Una muestra sintética de una solución buffer de Clark y Lubs de pH 7.3, se analizó electrométicamente en 30 laboratorios con una desviación estándar de +0.13 unidades de pH.

8.2.6 Normas de referencia. NORMA SM 4500-B.

9. MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

9.1 Procedimiento

- Disolver 1,6 gramos de NaOH en H₂O destilada
- Adicionar 30 gramos de tartrato de sodio y potasio
- Adicionar 1 gramo de DNS
- Aforar a 100 ml con H₂O destilada
- Almacenar en frascos ámbar a 4°C
- Se debe mantener un stock de glucosa 4 mg/ml y almacenarlo a 4°C
- A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/l) 0,25, 0,5, 1, 2 y 4
- Procedimiento:
- Tomar 0,5 ml de cada dilución y agregar 0,5 ml del reactivo de DNS
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0,5 ml de H₂O destilada a 0,5 ml del reactivo de DNS
- Agitar todas las muestras
- Colocar a ebullición todas las muestras en baño maría por 5 minutos
- Enfriar con hielo
- Adicionar 5 ml de H₂O destilada
- Agitar y dejar en reposo 15 minutos
- Leer a 540 nm
- Realizar la curva Absorbancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de concentración de 0.001 a 0.999

9.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD PARA MOLISCH

Se prepararon soluciones diluidas para extracto de bagazo de caña de azúcar para determinar la sensibilidad de la prueba de Molish, se consideraron positivas las diluciones seriadas que mostraron después del procedimiento cualitativo de Molish un anillo color violeta o morado en la interfase.

9.2.1 Procedimiento:

- Se obtuvo un macerado de 10 gramos de bagazo de caña previamente picado a tamaños menores a 2 mm diluidos en 100 ml de agua destilada.
- Se realizó filtración en embudos Buchner con algodón y gasa, filtración adicional con papel de filtro de la solución o extracto a vasos de precipitado.
- Posteriormente, partiendo del filtrado obtenido se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 y se procedió a realizar la prueba de Molish cualitativa.

9.3 PRUEBA CUALITATIVA DE MOLISCH

La prueba de Molisch es una prueba cualitativa para la presencia de carbohidratos en una muestra de composición desconocida. Para determinar la cantidad y naturaleza específica de los carbohidratos se requieren otras pruebas. Esta prueba sirve para detectar la presencia de grupos reductores presentes en la muestra. (Clark 1964)

Todos los glúcidos por acción del ácido sulfúrico concentrado se deshidratan formando compuestos furfúricos (las pentosas dan furfural y las hexosas dan hidroximetilfurfural).

Estos compuestos furfúricos reaccionan positivamente con el reactivo de Molish (solución alcohólica de alfa-naftol). (Clark 1964).

9.3.1 Procedimiento:

- Se coloca en un tubo de ensayo 1 ml de la solución problema
- Se agregan 5 gotas del reactivo de Molish y se agita
- En otro tubo de ensayo seco, se pone 1 ml de ácido sulfúrico concentrado del 90% con cuidado.
- Se inclina el tubo y se agrega el ácido sulfúrico dejando correr por la pared y sin agitar, se deja reposar.

9.4 PRUEBA DE FHELING CUALITATIVA

El reactivo de Fehling, también conocido como Licor de Fehling, es una disolución descubierta por el químico alemán Hermann von Fehling y que se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. Sirve para demostrar la presencia de glucosa, así como para detectar derivados de esta tales como la sacarosa o la fructosa.

El licor de Fehling consiste en dos soluciones acuosas:

- Sulfato de cobre cristalizado, 35 g; agua destilada, hasta 1.000 ml.
- Sal de Seignette (Tartrato mixto de Potasio y Sodio), 150 g; solución de hidróxido de sodio al 40%, 3; agua, hasta 1.000 ml.

Ambas se guardan separadas hasta el momento de su uso para evitar la precipitación del hidróxido de cobre (II).

9.4.1 Fundamento. El ensayo con el licor de Fehling se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad.

9.4.2 Lectura. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor.

Esta reacción se produce en medio alcalino fuerte, por lo que algunos compuestos no reductores como la fructosa que contiene un grupo cetona puede enolizarse a la forma aldehído dando lugar a un falso positivo.

9.4.3 Procedimiento:

- Se prepara la solución problema para análisis (obtención del filtrado del bagazo de caña).
- Se toma un volumen de 1 ml de la solución problema en un tubo de ensayo.
- Se agrega al tubo partes iguales de solución de Fehling A y Fehling B (0,5 ml).
- Se lleva al baño maría a 60°C por 5 minutos.
- Se retira el tubo a una gradilla y se observa la reacción.

9.5 PRUEBA DE SELIWANOFF

Soluciones patrón de carbohidratos: FRUCTUOSA Y GLUCOSA.

9.5.1 Procedimiento. Coloque en un tubo de ensayo 2.0 ml de la solución del carbohidrato y agregue 2 ml del reactivo de Seliwanoff, caliente en baño maría a ebullición por dos minutos. La formación de una coloración roja es prueba positiva para cetosas.

9.6 PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA GLUCOSA MULTISTIX 10 SG

9.6.1 Fundamento:

Esta prueba se basa en una doble reacción secuencial de enzimas, una enzima la glucosa oxidasa, cataliza la formación de ácido glocónico y peróxido de hidrógeno, a partir de la oxidación de la glucosa. Una segunda enzima, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con un cromógeno de yoduro de potasio, el cual es oxidado produciendo colores que van del verde al café. La prueba es específica para la glucosa. El área reactiva no reacciona con lactosa, galactosa, fructosa o metabolitos reductores.

**ANEXO C. Resultados de los Análisis Físico Químicos del Bagazo antes
Del Pretratamiento Microbiano**

INFORME DE RESULTADOS	
FECHA: 13 de Octubre de 2010	
DATOS DEL CLIENTE	
NOMBRE/EMPRESA: BIOL. FRANK VARGAS NIT: 91'071.875	
DIRECCIÓN: Calle 3 #12 ^a -15 Urbanización Bella Islas TELÉFONO: 3107601961	
DATOS GENERALES	
NOMBRE DE LA MUESTRA: BAGAZO DE CAÑA	
VARIEDAD: REPUBLICA DOMINICANA LUGAR: TRAPICHE WARD CIMPA – HOYA DEL RIO SUAREZ	
CÓDIGO:09-063	
ANALISIS FISICOQUÍMICO	

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA		TÉCNICA DE ANÁLISIS	MÉTODO
		Base humedad	Base seca		
Humedad	%	21,53		Gravimétrico	NTC529
Sólidos Totales	%		78,48	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Ceniza	%		3,17	Gravimétrico	AOAC 7,009/84 94205/90
Sólidos volátiles	%		96,83	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Carbono fijo	%		3,08	Gravimétrico	
Material Volátil	%		93,73	Gravimétrico	ASTM D 3175-07
Nitrógeno Total	%		0,45	Kjeldahl	NTC 1556

* % Libre de Extraíbles

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA		TÉCNICA DE ANÁLISIS	MÉTODO
		Base humedad	Base seca		
Proteína Bruta	%		2,79	Kjeldahl	NTC 1556
Celulosa *	%		38,82	Gravimétrico	Kurschner Y Hoffer
Lignina*	%		29,51	Gravimétrico	Klason
Holocelulosa *	%		59,82	Gravimétrico	Jayme -Wise
Hemicelulosa *	%		21,00	Gravimétrico	
pH		5,67		Potenciométrica	

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LAS MUESTRAS ANALIZADAS, NO PUEDEN SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDOS SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO.

YANETH QUINTERO LÓPEZ

Qca. Esp. Qca ambiental P.Q.1744

Directora Laboratorio CEIAM –UIS

**ANEXO D. Resultados de los Análisis Físico Químicos del Bagazo después
Del Pretratamiento Microbiano**

INFORME DE RESULTADOS	
FECHA: 13 de Octubre de 2010	
DATOS DEL CLIENTE	
NOMBRE/EMPRESA: BIOL.FRANK VARGAS NIT: 91'071.875	
DIRECCIÓN: Calle 3 #12ª – 15 Urbanización Bella Isla TELÉFONO: 3107601961	
DATOS GENERALES	
NOMBRE DE LA MUESTRA: BAGAZO PRETRATAMIENTO MICROBIOLOGICAMENTE F.E.S	
VARIEDAD: - LUGAR: -	
CÓDIGO:10-032	
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA		TÉCNICA DE ANÁLISIS	MÉTODO
		Base humedad	Base Seca		
Humedad	%	41,83		Gravimétrico	NTC529
Sólidos Totales	%		58,17	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Ceniza	%		0,44	Gravimétrico	AOAC 7,009/84 94205/90
Sólidos volátiles	%		99,56	Gravimétrico	Estándar Methods 2540
Carbono fijo	%		0,15	Gravimétrico	-
Material Volátil	%		99,41	Gravimétrico	ASTM D 3175-07
Nitrógeno Total	%		6,09	Kjeldahl	NTC 1556

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA		TÉCNICA DE ANÁLISIS	MÉTODO
		Base humedad	Base Seca		
Proteína Bruta	%		38,03	Kjeldahl	NTC 1556
Celulosa *	%		23,15	Gravimétrico	Kurschner Y Hoffer
Lignina*	%		0,16	Gravimétrico	Klason
Holocelulosa *	%		33,23	Gravimétrico	Jayne -Wise
Hemicelulosa *	%		10,08	Gravimétrico	-
pH		3,24		-	Potenciométrico

* % Libre de Extraíbles

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LAS MUESTRAS ANALIZADAS, NO PUEDEN SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDOS SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO.

YANETH QUINTERO LÓPEZ

Qca. Esp. Qca ambiental P.Q.1744

Directora Laboratorio CEIAM –UIS