



**BIOOBTENCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS
CELULÓSICOS DE CAÑA DE AZÚCAR.
(*Saccharum officinarum*)**

JAVIER ALONSO HERRERA CUADROS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER		No Clasificación
BIBLIOTECA		B 10751
No Adquisición	Fecha F. c. l. b. o	
	24 SET. 2001	
No Inventario	Precio	Dpto Solicitante
100512		

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CENTRO DE INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2001**

**BIOOBTENCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS
CELULÓSICOS DE CAÑA DE AZÚCAR.
(*Saccharum officinarum*)**


JAVIER ALONSO HERRERA CUADROS

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar al
título de Biólogo**

**Directora: Dra. GRACIELA CHALELA ALVAREZ
MSc. Dr. rer. nat.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CENTRO DE INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2001**

Nota de aceptación



Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Bucaramanga, Agosto del 2.001

BIBLIOTECA UIS

*A mis padres Carlos y Benilda
Por su amor y comprensión.
A Carlos Alberto, Claudia patricia,
German Mauricio y Diego Andrés
Por su apoyo, colaboración y cariño.
A Jhon Sebastián, por brindarnos su alegría.
A Laura por su amor y compañía.*

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos:

A mis seres queridos, por su comprensión y apoyo incondicional.

A la doctora Graciela Chálela Alvarez, por su dirección y valiosa orientación.

Al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial, por permitir la realización del trabajo de laboratorio.

A la Universidad Industrial de Santander, porque me brindo la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente.

A Diana Marcela Abril, Química vinculada a la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC), por su amistad, amabilidad, colaboración e interés en la realización del presente trabajo.

A Carlos Alberto Herrera Cuadros, Físico, por su amistad, compañía, apoyo, preocupación y colaboración desinteresada.

A Gloria Yolanda, Nelly, por sus valiosos aportes y cooperación.

A Liliana Rojas, Nelson Moreno y Pedro, profesionales vinculados al C.D.P.A.

A cada una de las personas que colaboraron de alguna forma en la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
0 INTRODUCCION.....	20
1 MARCO TEORICO.....	26
1.1 MATERIA PRIMA: El Bagazo de Caña de Azúcar.....	26
1.1.1 Definición.....	28
1.1.2 Composición del bagazo.....	29
1.1.3 Características físicas y químicas.....	30
1.1.4 Caracterización microbiológica.....	31
1.1.5 Usos y aplicaciones del bagazo de caña de azúcar.....	31
1.2 COMPUESTOS CELULOSICOS.....	34
1.2.1 Celulosa.....	34
1.2.1.1 Actividad microbiana sobre la celulosa.....	38
1.2.2 Hemicelulosa.....	41
1.2.3 Lignina.....	42
1.3 MICROORGANISMOS.....	44
1.3.1 Generalidades.....	44
1.3.2 Morfología.....	45
1.3.3 Reproducción.....	45
1.3.4 Hongos Filamentosos.....	47
1.3.5 Hongos no filamentosos (levaduras).....	49
1.3.5.1 Fases de la gemación.....	51
1.3.5.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52

1.3.5.2.1	Generalidades.....	52
1.3.5.2.2	Ciclo de vida.....	54
1.4	ENZIMAS	54
1.4.1	Clasificación de las enzimas.....	54
1.4.1.1	Hidrolasas.....	55
1.4.1.1.1	Celulasas.....	56
1.5	MEDIOS DE CULTIVO	62
1.5.1	Clasificación.....	62
1.5.2	Efectos ambientales sobre el sustrato.....	63
1.5.2.1	Ambiente químico.....	63
1.5.2.1.1	Composición del Medio.....	63
1.5.2.1.2	Efectos del pH.....	64
1.5.2.2	Ambiente físico.....	65
1.5.2.2.1	Efecto de la temperatura.....	65
1.5.2.2.2	Efecto de la Luz.....	66
1.6	BIORREACTOR.....	66
1.6.1	Métodos de cultivo.....	67
1.6.1.1	Biorreactor continuo en dos fases.....	69
1.7	FERMENTACIÓN.....	69
1.7.1	Fermentación en estado sólido.....	69
1.7.1.1	Ventajas de la fermentación sólida respecto a la fermentación líquida.....	71
1.7.1.2	Hidrólisis ácida.....	72
1.7.1.3	Hidrólisis enzimática.....	73
1.7.2	Fermentación en estado semisólido.....	74

1.7.3 Fermentación directa.....	78
1.7.4 Fermentación alcohólica.....	78
1.7.4.1 Bioquímica del proceso.....	79
1.8 ALCOHOLES.....	81
1.8.1 Obtención de alcohol.....	81
1.8.2 Reacciones de los alcoholes.....	82
1.8.3 Bioproducto.....	83
1.8.3.1 Etanol.....	84
1.8.3.1.1 Obtención de etanol.....	84
1.8.3.1.2 Importancia.....	86
1.8.3.1.3 Aplicaciones.....	86
1.8.3.1.4 El etanol como combustible.....	87
1.8.3.1.5 Economía del etanol.....	90
2 DESARROLLO METODOLOGICO.....	92
2.1 MATERIA PRIMA.....	93
2.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.....	93
2.2.1 Propagación de microorganismos.....	93
2.2.2 Elección de los microorganismos.....	94
2.2.3 Respuesta y adaptación a los medios de cultivo.....	94
2.2.3.1 Selección del medio adecuado para <i>Trichoderma viride</i>	95
2.2.3.1.1 AGAR MALTA	95
2.2.3.1.2 AGAR CEBADA :.....	96
2.2.3.1.3 AGAR CEBADA + LACTOSUERO	96
2.2.3.1.4 AGAR AVENA	97

2.2.3.1.5	AGAR PAPA DEXTROSA	97
2.2.3.2	Selección del medio adecuado para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
2.2.3.2.1	AGAR MALTA	98
2.2.3.2.2	MEDIO + EXTRACTO DE LEVADURA	98
2.2.3.2.3	MEDIO + GLUCOSA	99
2.2.3.2.4	MEDIO + MELAZA	99
2.2.4	Mantenimiento de cepas.....	99
2.2.5	Adaptación de cepas.....	100
2.3	DESCRIPCIÓN DEL BIOPROCESO.....	100
2.3.1	Pretratamiento de la materia prima.....	100
2.3.2	Fisiología de los microorganismos.....	100
2.3.2.1	Determinación de la concentración de microorganismos.....	102
2.3.2.2	Determinación del crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , con y sin aireación.....	102
2.3.2.3	Determinación del crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , variando la concentración de nutrientes.....	103
2.3.2.4	Determinación de la concentración de glucosa.....	103
2.3.2.5	Determinación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , variando la fuente de carbono.....	105
2.3.2.6	Determinación de la concentración de etanol.....	106
2.3.3	Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i>	108
2.4	Ensayo Experimental I.....	109
2.4.1	Fase de Hidrólisis.....	109
2.5	Ensayo Experimental II.....	110
2.5.1	Fase de Hidrólisis.....	110
2.5.2	Fase de fermentación.....	111

2.6	Ensayo Experimental III.....	112
2.6.1	Fase de hidrólisis.....	112
2.6.2	Fase de fermentación.....	114
2.7	Ensayo Experimental IV.....	114
2.7.1	Fase de hidrólisis.....	114
2.7.2	Fase de fermentación.....	116
2.8	Diseño Experimental Final.....	118
3	ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	121
3.1	CLASIFICACION TAXONOMICA	122
3.2	AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	123
3.2.1	Identificación y elección de los microorganismos.....	123
3.2.1.1	Hongo Filamentoso.....	123
3.2.1.1.1	Descripción Macroscópica	124
3.2.1.1.2	Descripción Microscópica	124
3.2.1.1.3	Clasificación Taxonómica	125
3.2.1.2	Hongo no Filamentoso.....	126
3.2.1.2.1	Descripción Macroscópica	126
3.2.1.2.2	Descripción Microscópica	127
3.2.1.2.3	Clasificación taxonómica	127
3.2.2	Respuesta a los medios de cultivo.....	127
3.2.2.1	Selección del medio de mantenimiento para <i>Trichoderma viride</i>	127
3.2.2.2	Selección del medio de mantenimiento para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130
3.2.3	Adaptación de cepas.....	130
3.3	ANALISIS DEL BIOPROCESO	131

3.3.1	Pretratamiento de la materia prima.....	131
3.3.2	Concentración de microorganismos.....	131
3.3.3	Crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , con y sin aireación.....	132
3.3.4	Crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , variando la concentración de nutrientes.....	132
3.3.5	Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , variando la fuente de carbono.....	133
3.3.6	Cinética de crecimiento <i>Trichoderma viride</i>	133
3.4	Ensayo Experimental I.....	134
3.4.1	Fase de hidrólisis.....	134
3.5	Ensayo Experimental II.....	135
3.5.1	Fase de hidrólisis.....	135
3.5.2	Fase de fermentación.....	136
3.6	Ensayo Experimental III.....	138
3.6.1	Fase de hidrólisis.....	138
3.6.2	Fase de fermentación.....	139
3.7	Ensayo Experimental IV.....	142
3.7.1	Fase de hidrólisis.....	142
3.7.2	Fase de fermentación.....	148
3.8	Diseño Experimental Final.....	149
4	CONCLUSIONES.....	152
5	RECOMENDACIONES.....	155
	BIBLIOGRAFÍA.....	157
	ANEXOS.....	167

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes orgánicos del bagazo de caña de azúcar.	29
Cuadro 2. Componentes elementales del bagazo de caña de azúcar.	30
Cuadro 3. Comparación del bagazo de caña de azúcar y del petróleo como posibles fuentes de combustión.	33
Cuadro 4. Composición de los sustratos celulósicos.	43
Cuadro 5. Composición química de algunos desperdicios celulósicos, en porcentaje de peso seco.	43
Cuadro 6. Comparación entre el proceso continuo y el de batch, para la producción de biomasa a partir de melazas.	68
Cuadro 7. Producción de enzimas en cultivos semisólidos.	77
Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas del etanol y la gasolina como combustible en motores de automóvil.	89
Cuadro 9. Preparación de la muestra para la medición de glucosa.	105
Cuadro 10. Diseño experimental para la fase de hidrólisis.	112
Cuadro 11. Características físicas y químicas del bagazo de caña de azúcar.	122
Cuadro 12. Características de <i>Trichoderma viride</i> , variando los medios de cultivo.	129
Cuadro 13. Crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , variando la concentración de nutrientes.	132
Cuadro 14. Determinación de la concentración de alcohol.	137
Cuadro 15. Variación del pH durante la fase de hidrólisis.	138
Cuadro 16. Determinación de la producción de alcohol a las 24 horas.	140

Cuadro 17.Determinación de la producción de alcohol a las 48 Horas.....	140
Cuadro 18.Determinación de la producción de alcohol a las 72 Horas.....	141
Cuadro 19.Determinación de la producción de alcohol a las 96 Horas.....	142
Cuadro 20.Variación de la concentración de glucosa (g/L).	143
Cuadro 21.Determinación del porcentaje de degradación de sustrato.....	144
Cuadro 22.Producción de alcohol a las 48 horas.....	148
Cuadro 23.Producción de alcohol a las 72 horas.....	148
Cuadro 24.Determinación de la concentración de alcohol en el sistema continuo.	150
Cuadro 25. Datos de la cinética de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i>	170
Cuadro 26. Concentración de alcohol en el volumen de destilado obtenido.....	171

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de la caña de azúcar.....	26
Figura 2. Estructura molecular del polímero de celulosa.....	35
Figura 3. Disposición de las microfibrillas de la pared celular.....	37
Figura 4. Degradación natural de la celulosa en los tallos y hojas de maíz.....	38
Figura 5. Microfotografía de la estructura de <i>Trichoderma viride</i>	48
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
Figura 7. Modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos de celulosa-celulasa.....	56
Figura 8. Formación de celobiosa y glucosa por el sistema celulasa de <i>Trichoderma viride</i> , con y sin b-glucanasa.....	58
Figura 9. Sistema continuo de dos fases: Hidrólisis – Fermentación.....	70
Figura 10. Transformación de la fuente de carbono en etanol, vía EMP.....	80
Figura 11. Representación esquemática de la estructura de los alcoholes.....	81
Figura 12. Principales reacciones de los alcoholes.....	83
Figura 13. Producción de etanol a partir de lignocelulosa por medio de hidrólisis enzimática.....	85
Figura 14. Etapas del proceso de Bioobtención de alcohol mediante residuos celulósicos.....	92
Figura 15. Etapas generales para la preparación de un medio de cultivo.....	94
Figura 16. Diagrama general del bioproceso experimental.....	101
Figura 17. Determinación del crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , variando la concentración de nutrientes.....	104

Figura 18. Cinética de crecimiento <i>Trichoderma viride</i>	108
Figura 19. Biorreactores utilizados para la adaptación de <i>Trichoderma viride</i>	109
Figura 20. Influencia del oxígeno sobre la adaptación de <i>Trichoderma viride</i>	111
Figura 21. Reducción del tamaño de partícula del sustrato.....	113
Figura 22. Variación del sustrato en estado fermentado y no fermentado	117
Figura 23. Montaje del Sistema Continuo.....	118
Figura 24. Biorreactor de la fase de fermentación.....	120
Figura 25. Trozos de caña de azúcar.....	121
Figura 26. Observación de <i>Trichoderma viride</i>	124
Figura 27. Conidias de <i>Trichoderma viride</i>	125
Figura 28. Observación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	126
Figura 29. Adaptación de <i>Trichoderma viride</i> en Agar Malta.....	128
Figura 30. Adaptación de <i>Trichoderma viride</i> en Agar Avena.....	128
Figura 31. Crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> , variando la concentración de nutrientes.....	133
Figura 32. Variación del crecimiento de <i>Trichoderma viride</i>	134
Figura 33. Variación de la concentración de glucosa sintetizada y asimilada por <i>Trichoderma viride</i>	136
Figura 34. Muestras de los filtrados obtenidos.....	137
Figura 35. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A1.....	144
Figura 36. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A2.....	145
Figura 37. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A3.....	146
Figura 38. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento B1.....	146
Figura 39. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento B2.....	147
Figura 40. Determinación de la concentración de Alcohol % en Volumen.....	151
Figura 41. Microcultivo de <i>Trichoderma viride</i>	168

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos aislados del bagazo de caña de azúcar.....	31
Tabla 2. Lista de algunos microorganismos capaces de utilizar celulosa.....	39
Tabla 3. Obtención y elaboración de enzimas.....	55
Tabla 4. Características principales de cultivos semisólidos y sumergidos.	75
Tabla 5. Producción de etanol en Brasil.....	91
Tabla 6. Características organolépticas del bagazo molido.....	131

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Técnica para la preparación de microcultivos.....	167
Anexo B. Determinación del incremento en biomasa de <i>Trichoderma viride</i>	170
Anexo C. Determinación de la concentración de alcohol por medio del método de gravedad específica.....	171
Anexo D. Instituciones vinculadas con el cultivo y procesamiento de la caña de Azúcar.....	172

BIBLIOTECA UIS

**TITULO: BIOOBTENCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS
CELULÓSICOS DE CAÑA DE AZÚCAR. (*Saccharum officinarum*) ***

AUTOR: JAVIER ALONSO HERRERA CUADROS. **

PALABRAS CLAVES: Microorganismos, celulosa, hidrólisis, sacarosa, fermentación, etanol.

DESCRIPCIÓN.

Cada año la humanidad lanza al aire 5 millones y medio de toneladas de carbono principalmente por la quema de combustibles fósiles como el petróleo y el carbón mineral. A esto se le suma la quema de leña y de un elevado número de desechos agrícolas tal como sucede con el bagazo de caña de azúcar. Sin embargo la contaminación ambiental causada por la quema de este residuo vegetal puede evitarse si se utiliza dicho bagazo en aplicaciones industriales. La investigación realizada consistió en la producción de alcohol, tomando como materia prima residuos celulósicos de caña de azúcar, a la cual se le adicionaron microorganismos que desempeñan el papel de biocatalizadores, con el fin de obtener un producto de gran utilidad industrial y farmacéutica a la vez que se brinda un manejo adecuado a los desechos agroindustriales que se generan en el procesamiento y obtención de azúcar y panela y así de esta manera, contribuir a la reducción de la contaminación del medio ambiente.

El bioproceso se realizó por cultivo continuo, incluyó un pretratamiento de la materia prima (reducción del tamaño de partícula y pasteurización del sustrato), seguido de un proceso de fermentación en un biorreactor continuo de dos fases (Hidrólisis – fermentación), el cual consta de un reactor por cada fase del proceso. Al primer biorreactor se le adicionó la materia prima pretratada, junto con un microorganismo productor de enzimas celulolíticas *Trichoderma viride*, aislado del mismo sustrato. Luego se adicionó una cantidad determinada de agua estéril, esta solución se pasó por un biofiltro para obtener un lixiviado (rico en glucosa), al cual se le inoculó otro microorganismo con propiedades fermentativas *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente se realizó un proceso de destilación para la obtención de alcohol, cuyo nivel se determinó por el método de gravedad específica.

Durante la fase de hidrólisis se realizaron muestreos para la determinación de pH, temperatura y glucosa obtenida; luego se inoculó una concentración de microorganismos con propiedades fermentativas y al transcurrir 48 horas se tomaron muestras de 100 mL cada 24 horas, a las cuales se les realizó un proceso de destilación. La máxima concentración de alcohol fue de 6,3% y se obtuvo a las 216 horas en el sistema continuo; este producto puede ser utilizado en la industria farmacéutica, química y alimenticia o adicionalmente como combustible.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias

Escuela de Biología – UIS

Dra. Graciela Cálela

MSc. Dr. rer. nat

**TITLE: BIOOBTENTION OF ALCOHOL STARTING FROM RESIDUALS
CELLULOSIC THE SUGAR CANE.
(*Saccharum officinarum*) ***

AUTHOR: JAVIER ALONSO HERRERA CUADROS. **

KEY WORDS: Microorganisms, cellulose, hidrolisis, sucrosa, fermentation, ethanol.

DESCRIPTION.

Every year the humanity rushes to the air five million and half tons of carbon mainly for burns it of fossil fuels as the petroleum and the mineral coal. To this is added it burns of firewood and of a high number of agricultural waste just as it happens to the trash of cane of sugar. However the environmental contamination caused for it burns it of this vegetable residual it can be avoided if this trash is used in industrial applications. The carried out investigation consisted on the production of alcohol, taking as matter prevails residuals cellulosics of cane of sugar, to which were added microorganisms that play the biocatalysers part, with the purpose of obtaining a product of great industrial utility and pharmacist at the same time that you offers that you offers an appropriate handling to the agroindustrial waste that are generated in the prosecution and obtaining of sugar and the Colombian panela and that this way, to contribute to the reduction of the contamination of the environment.

The bioprocess was carried out for continuous cultivation, it included a pretreatment of the matter it prevails (reduction of the particle size and pasteurization of the sustratum), followed by a process of fermentation in a continuous biorreactor of two phases (Hidrolisis - fermentation), which consists of a bioreactor for each phase of the process. To the first biorreactor of it added it the matter pretratada it prevails, together with a microorganism producing of enzymes cellulolytics *Trichoderma viride*, isolated of the same sustratum. Then a certain quantity was added is flooded sterile, solution is you step for a biofilter to obtain a leached (rich a glucose), to which was inoculated another microorganism with properties fermentatives *Saccharomyces cerevisiae*. Later on was carried out a distillation process for the obtaining of alcohol whose level was determined by the method of specific gravity.

During the hidrólisis phase they were carried out samplings for the pH determination, temperature and obtained glucose; then a concentration of microorganisms was inoculated with properties fermentatives and when lapsing 48 hours they took samples of 100 mL every 24 hours, to which were carried out a distillation process. The maximum concentration of alcohol was of 6,3% and it was obtained at the 216 hours in the continuous system; this product can be used in the pharmaceutical industry, chemistry and nutritious or additionally as fuel.

* Project of Grade

** Faculty of Sciences

School of Biology – UIS

Dra. Graciela Chalela

MSc. Dr. Rer. nat

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de posibles soluciones a los muchos problemas que se presentan en el ámbito industrial, social, económico y ambiental, se ha demostrado que la ciencia y la tecnología están transformando la estructura económica y social de muchas naciones, convirtiéndose en instrumentos indispensables para el progreso y el desarrollo.

La interacción de la biología con la química, la física y la ingeniería permiten que la ciencia pura se articule firmemente con la ciencia aplicada, de aquí surge la *Biotecnología*, la cual es una actividad multidisciplinaria que comprende la aplicación de dichos principios, al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios. Los agentes biológicos pueden ser células microbianas, animales, vegetales y enzimas. Los bienes están referidos a cualquier producto industrial relacionado con alimentos, bebidas, productos medicinales, entre otros. Los servicios, se relacionan con actividades que mejoran el nivel de vida como la purificación de aguas y tratamiento de efluentes.

Nuestro país posee un gran potencial de recursos naturales, de manera que surge la necesidad de buscar procedimientos que ofrezcan mayores rendimientos, menos costos y una muy buena calidad. Dentro de estos recursos se encuentran los vegetales, quienes almacenan la mayor parte de la energía solar que captan en forma de hidratos de carbono; los cuales pueden presentarse de manera simple en forma de azúcares o en forma de polímeros: almidón o celulosa. Cualquier producto que contenga azúcares fermentables o hidratos de carbono, transformables en aquellos polímeros, pueden servir para obtener alcohol.

De hecho, uno de los procesos más utilizados en la biotecnología es la fermentación, proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo se transforman por acción microbiana en metabolitos y biomasa. Los microorganismos van aumentando en su concentración durante el transcurso del proceso, al mismo tiempo que el medio se va modificando para dar paso a la formación de productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas.

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de su interacción con el medio, bajo la influencia de la acción de los efectores intracelulares y extracelulares. Los efectores intracelulares están representados por la dotación genética intrínseca del organismo en cuestión y por sus mecanismos de regulación metabólica. Los efectores extracelulares comprenden las variables de naturaleza física y química que pueden estar actuando durante el proceso. Un factor extracelular importante para el desarrollo del microorganismo es la fuente de nutrientes, la cual representa el sustrato que va a ser modificado por acción microbiana.

Existe una amplia variedad de microorganismos que transforman los desechos lignocelulósicos como la paja de cereales, el bagazo, los residuos de madera y los desechos del procesamiento de frutas y verduras. Dentro de este tipo de microorganismos, las bacterias y los hongos filamentosos se destacan porque sobre ellos se ha centrado la atención en lo concerniente a la capacidad de digerir materiales celulósicos, siendo los hongos filamentosos los que presentan mayor actividad al respecto. Se ha observado que aquellos microorganismos que digieren la celulosa poseen también capacidad biodegradativa sobre las hemicelulosas, aunque necesariamente no sucede lo contrario; así los microorganismos mantienen un equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación de la fuente de carbono.

Entre los muchos cultivos agrícolas se destaca el de la caña azúcar; cuya producción se realiza a gran escala debido a su facilidad de cultivo, debido a las condiciones poco

exigentes de siembra y a su bajo costo de producción. A partir de este cultivo se obtienen productos básicos para el consumo humano como son el azúcar, la panela y la miel. Sin embargo, se obtiene también como subproducto el bagazo de caña, al cual se le da poca utilidad en los trapiches tradicionales, empleándose solo como combustible en hornos y calderas, al igual que la leña y otros tipos de desechos agrícolas.

La quema del bagazo se une a la incineración de combustibles fósiles como el petróleo y el carbón mineral, actividad que arroja una enorme carga residual de compuestos de carbono, azufre y nitrógeno que llevan a la contaminación del medio ambiente. Sin embargo la contaminación ambiental causada por el bagazo, como residuo vegetal puede evitarse si se utiliza en aplicaciones industriales.

El bagazo está constituido por un gran porcentaje de celulosa, polisacárido precursor de muchos productos de gran importancia en el ámbito industrial, alimenticio, agronómico, farmacéutico y combustible entre otros. Por medio de un tratamiento adecuado se puede obtener gran cantidad de glucosa que puede ser fermentada para obtener finalmente compuestos orgánicos como el alcohol.

Estas circunstancias estimulan a incrementar la eficiencia productiva y con ello aprovechar mejor los productos orgánicos que se derivan directa o indirectamente del sector agrícola; de esta manera lo que antes se consideraba desperdicio ahora debe valorarse como materia prima para su aprovechamiento alimenticio o industrial.

Es así como el presente trabajo se enfoca en la obtención de alcohol por liberación de la glucosa presente en el bagazo de la caña de azúcar, como una alternativa biotecnológica que brinda la posibilidad de reducir los costos de producción del alcohol y al mismo tiempo disminuir la carga residual de residuos agrícolas, mediante la utilización de las biomásas combustibles renovables en sustitución de carburantes fósiles, contribuyendo a la conservación del equilibrio de la naturaleza. Para tal fin, *Trichoderma viride* y

Saccharomyces cerevisiae fueron los microorganismos nativos seleccionados para realizar la biotransformación de la celulosa a glucosa, con la obtención final de alcohol.

OBJETIVOS

GENERAL

Obtención de alcohol a partir de caña de azúcar, mediada por microorganismos autóctonos fermentadores.

ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener una materia prima de bajo costo (Etanol), tomando como fuente de producción desechos agrícolas.
- ✓ Aislar y seleccionar los microorganismos con mayor capacidad de hidrolizar la celulosa a glucosa, junto con los de mayor eficiencia para la fermentación alcohólica.
- ✓ Establecer las condiciones apropiadas para cada una de las fases de hidrólisis y fermentación.
- ✓ Reducir costos en la producción de compuestos orgánicos que pueden ser obtenidos con mediadores microbianos en un periodo de tiempo corto.

1 MARCO TEORICO

1.1 MATERIA PRIMA: EL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR



Figura 1. Cultivo de la caña de azúcar.

La caña de azúcar es una planta perenne originaria de la India, corresponde a las gramíneas asignada a la especie *Saccharum officinarum* de la cual se conocen diferentes variedades, tiene una riqueza muy variada en azúcar que va de 13 – 17% y de jugo de 83 – 90%.

El tallo de la caña está constituido por:

- **Corteza:** Formada por una capa doble de tejido epitelial con fibras duras o esclerenquimatosas
- **Tejido Medular:** Es la parte interna del tallo y está compuesta por los tejidos fibroso y esponjoso

-Tejido Fibroso: Formado por haces fibrovasculares, en cuyo interior están los canales para la circulación de los nutrientes de la planta. Este tejido esta formado principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; es la parte de la caña utilizada en la fabricación de papel.

-Tejido Esponjoso o Parénquima: Formado por las células que contienen el jugo azucarado. La presión en los molinos hace que estas células se rompan y dejen en libertad el jugo. Cuando cesa la presión, este tejido recupera parte de su volumen absorbiendo aire.

La caña de azúcar junto con el maíz pertenece a las plantas C₄, además de que está científicamente reconocida, junto al sorgo rojo, como una de las plantas que hace una mejor transformación de la energía solar en su ciclo de vida. (22)

El cultivo de caña de azúcar se realiza principalmente en suelos arcillosos, el primer cultivo de estaca dura aproximadamente 18 meses para su corte, para sacar la estaca; los siguientes duran al rededor de 15 meses. Se recomienda que el cultivo no sea tan tupido, pues de esta manera no alcanza buen diámetro; también se requiere una fertilización con 10:20:20 por cosecha; el cultivo aguanta toda clase de lluvia que se presente, pero es muy susceptible al verano, en tal caso requiere de un sistema de riego bien tecnificado. La cachaza, material sólido flotante se recocina para obtener la melaza, la cual se adiciona a otros desechos agrícolas y se uso como complemento alimenticio para animales.

El vástago se corta en su parte inferior, dejando una forma de estaca, para que crezca nuevamente para una próxima cosecha; este es llevado al trapiche, en camión, carreta o en un animal de carga. La primera fase es la extracción de jugo de la caña, donde el bagazo se comprime en una serie de molinos de rodillos grandes, así se separa el jugo de la fibra.

Se limpia superficialmente el jugo (tierra, fibras pequeñas, otras partes de la planta), luego se lleva a una serie de calderas para el procesamiento de la obtención de la panela.

Del jugo clarificado de la caña de azúcar se obtiene: ✓

- ▲ Miel, por evaporación de agua, aproximadamente 65%. ✓
- ▲ Melaza, extracción de azúcar, aproximadamente 50% ✓

En México se produce alcohol a partir de ellas, pero en otros países las mieles se emplean desde hace bastantes años para producir proteína microbiana. ✓

La melaza es una mezcla de azúcares invertidos, sacarosa, sales, ingredientes no azucarados del jugo de caña y productos formados durante el procesamiento para la obtención del azúcar.

Estas constituyen una de las materias primas más importantes para la fabricación del etanol; los azúcares más importantes en las destilerías son las hexosas, las cuales son fermentables directamente por la levadura produciendo etanol y desprendimiento de anhídrido carbónico.

Es un cultivo de gran facilidad, por su rápido ciclo vegetativo, bajo costo y es fácilmente adaptable en regiones tropicales y cálidas, aproximadamente 30°C.

Entre las enfermedades de los cultivos de Caña de Azúcar, se tienen las siguientes:

- ☛ Escaldadura de la hoja,
- ☛ Marchitamiento causado por el virus baciliforme de la caña de azúcar,
- ☛ Síndrome de la hoja amarilla,
- ☛ Enfermedad por invasión del insecto *Caligo illioneus*. (15)

1.1.1 Definición. El bagazo es el subproducto de la molienda de la caña, que se define como un residuo fibroso de la caña luego de la extracción del jugo de sacarosa; constituye aproximadamente el 15% del peso de la caña y físicamente es un manojo de hebras fibrosas de la corteza mezcladas con haces de fibra y polvillo de médula.

El bagazo fresco es un extraordinario medio de cultivo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, y por ello la extracción de la materia soluble debe hacerse tan pronto sale de los molinos.

Se usa frecuentemente como sustrato de procesos biotecnológicos, el jugo se utiliza para la obtención de ácidos carboxílicos.

A temperatura ambiente los microorganismos más activos son las levaduras y las bacterias mesófilas, las cuales convierten los azúcares en proteínas, alcoholes, ácido acético y dióxido de carbono principalmente. Las reacciones del metabolismo microbiano modifican el ambiente del bagazo almacenado (cambios en el pH, aumento de la temperatura, disminución del oxígeno, agotamiento de azúcares), lo cual induce el desarrollo de otros microorganismos mejor adaptados a las nuevas condiciones, como los bacilos productores de ácido láctico (*Lactobacillus* spp), y hongos filamentosos celulolíticos. (26)

1.1.2 Composición del bagazo. El bagazo de caña de azúcar esta constituido por componentes orgánicos, sólidos no solubles como tierra, piedras, sustancias coloidales, además de sólidos solubles como ceras, pectinas y ácidos grasos. (Cuadros 1 y 2)

Cuadro 1. Componentes orgánicos del bagazo de caña de azúcar. (93)

COMPUESTO	COMPOSICIÓN (%)
Celulosa	45-50
Hemicelulosa	20-25
Lignina y otros residuos no hidrolizables	20-25
Ceniza, azúcares y otros compuestos	5-10

Algunos de los compuestos que constituyen el bagazo de caña son solubles en agua caliente, otros en solución de alcohol-benceno y la gran mayoría son solubles en NaOH al 1%. (93)

Cuadro 2. Componentes elementales del bagazo de caña de azúcar.

COMPUESTO	COMPOSICIÓN %
Carbono (C)	45.0
Hidrógeno (H ₂)	6.5
Oxígeno (O ₂)	44.0
Ceniza (A)	2.5

1.1.3 Características físicas y químicas. La composición física del bagazo es aproximadamente constante a pesar de las diferentes clases de cañas que se emplean para la molienda; la humedad promedio es de 45% en peso, tiene un peso volumétrico variable reportándose valores que oscilan desde 50 Kg/m³ hasta 96 Kg/m³ en base seca, el bagazo contiene azúcares residuales en una proporción del 3 al 5% constituyendo un rico substrato para el crecimiento y desarrollo de microorganismos.

Está formado por células de distinto tamaño y morfología; constituido por dos tipos de fibras longitudinales de diámetros diferentes: las fibras corticales de la parte externa, cuya función principal es la de servir de sostén y las fibras medulares ó haces fibrovasculares; químicamente las dos fibras son prácticamente iguales aunque el grado de condensación de lignina es mayor en las corticales.

La médula es un tejido esponjoso que une estas fibras y que en la planta viva forma las paredes de las células donde se depositan los jugos de las plantas.

La composición cambia con la variedad de la caña, el terreno, el clima, etc. Contiene ácidos orgánicos (succínico, málico cítrico y glicólico), aminoácidos (leucina, glicocola, etc.), y sustancias minerales, entre las cuales predomina la sílice, estos componentes no están repartidos uniformemente, en el exterior contiene ceras y colorantes y en el interior partes fibro-vasculares rodeadas por el parénquima que encierra el jugo sacarino. (75)

1.1.4 Caracterización microbiológica. La tabla 1, enuncia los tipos de microorganismos frecuentemente encontrados en el bagazo de caña de azúcar, además de los microorganismos propios del bagazo se pueden presentar algunos que se encuentran en el suelo y son arrastrados por el sustrato.

Tabla 1. Microorganismos aislados del bagazo de caña de azúcar. (99)

HONGOS	BACTERIAS
Pichia spp.	Bacillus spp.
Debaryomyces spp.	Staphylococcus spp.
Hansenula spp.	Micrococcus spp.
Aspergillus spp.	Streptococcus spp.
Cladosporium spp.	Streptomyces spp.
Candida spp.	Clostridium spp.

1.1.5 Usos y aplicaciones del bagazo de caña de azúcar:

- ⌘ Dentro de las aplicaciones del bagazo de caña de azúcar se tienen los siguientes:
- ⌘ Materia prima para la elaboración de papel.
- ⌘ Materia prima para procesos de compostaje (adicionando estiércol fresco de ganado lechero, por medio de un sistema de fermentación termofílica.)
- ⌘ Sustrato para la producción de hongos comestibles y abonos.
- ⌘ Materia prima para la producción de proteína unicelular y complementos alimenticios para animales (Piensos)
- ⌘ Matriz para muros y estructuras de concreto (sustituto de la gravilla)

- ⌘ Elaboración de polvo de bagazo para mezclas de fundición.
- ⌘ Materia prima para la manufactura de planchas aislantes.
- ⌘ Materia prima para la fabricación de tableros y para el relleno de muebles.
- ⌘ Producción de dextranas.
- ⌘ Producción industrial de proteína a partir de celulosa
- ⌘ Fabricación de cartón prensado y madera artificial.
- ⌘ Producción de lignosulfonatos para emulsificantes.
- ⌘ Obtención de Carboximetil – celulosa
- ⌘ Materia prima para la fabricación de aislantes y resinas moldeables.
- ⌘ Fuente energética en los hornos y calderas, con aditivos tales como, guadua, leña, cascarilla de arroz y café, carbón mineral, caucho, y ACPM. (11, 21, 24, 26, 46, 63, 93, 101)

La estructura física (granulometría) del bagazo es una característica muy importante, ya que el incremento de la “finura” del bagazo aumenta el área superficial de contacto combustible-comburente, lo que facilita la reacción química de combustión; pero por otra parte las partículas más finas tienden a ser arrastradas por el flujo de gases, lográndose solamente una combustión parcial, lo que lleva al incremento de las pérdidas de calor por in-combustión mecánica volátil, lo que afecta la eficiencia del generador. Esto es una dificultad que queda resuelta con el quemador de partículas sólidas o quemador a la llama. (89)

También este lo compactan mediante cola (proteína animal), y almidón, para producir energía calórica y de esta manera evitar la pérdida de materia volátil. (21)

A continuación en el cuadro 3, se pueden comparar los productos de la combustión generados por el bagazo de caña y petróleo.

Cuadro 3. Comparación del bagazo de caña de azúcar y del petróleo como posibles fuentes de combustión. (93)

COMBUSTIBLE	CONSUMO (tm)	GENERACIÓN CO ₂ (tm)	GENERACION SO ₂ (tm)
Petróleo	3.7 10 ⁶	10.7 10 ⁶	1.85 10 ⁶
Bagazo	21 10 ⁶	18.5 10 ⁶	-

Como se aprecia la cantidad de bagazo consumida es mucho mayor que la de petróleo, lo cual está dado por el hecho de que el calor específico de combustión del bagazo es aproximadamente seis veces menor al del petróleo equivalente.

En la tabla anterior se aprecia que la cantidad de CO₂, emitida a la atmósfera cuando se quema bagazo es casi dos veces superior a la cantidad que se emitiría si se utilizara el hidrocarburo. Esta comparación puede ser engañosa, ya que mientras el petróleo hace un bajo aporte de este gas, el bagazo como biomasa combustible mantiene un equilibrio, ya que durante su crecimiento la planta de caña de azúcar absorbe una cantidad similar a la que aporta cuando se quema en los hornos, por lo que la ventaja desde el punto de vista de la contaminación atmosférica, en especial en la contribución al calentamiento global producido por el efecto invernadero, es evidente.

En lo referente a la generación de SO₂ la comparación es muy favorable para el bagazo, dada la muy escasa presencia de azufre en su composición elemental. En cuanto a la generación de NO₂ podría presentarse un brusco incremento cuando la temperatura sobrepasa los 1300°C, aunque este fenómeno no se presenta en los hornos tradicionales. (Ésta información es basada en simulaciones realizadas)

Un aspecto negativo a tener en cuenta cuando se utiliza el bagazo como combustible es la emisión de partículas sólidas, las cuales abandonan la chimenea y pueden ser arrastradas por los vientos a grandes distancias, cayendo más tarde sobre núcleos poblacionales. (93)

En la actualidad la hoja seca de la caña de azúcar (paja), tiene las siguientes aplicaciones:

- ☞ Como alimento animal.
- ☞ Como recubrimiento de los campos de caña después de realizada la cosecha, para la conservación de la humedad del suelo y para evitar el crecimiento de malezas.
- ☞ Ofrece buenas perspectivas para ser utilizada como combustible de forma masiva. (22)

Para tener una idea del amplio empleo que puede tener la paja de caña en el campo energético se señalan a continuación algunos ejemplos significativos:

- ♪ Sustitución del petróleo en la producción de azúcar refinada y derivados de la caña.
- ♪ Sustitución de la leña y del bagazo como combustible y así destinar este último a otros usos.
- ♪ Incrementar la cogeneración eléctrica en las centrales azucareros. (21)

1.2 COMPUESTOS CELULOSICOS

Los principales compuestos celulósicos son: Celulosa, Hemicelulosa y Lignina.

1.2.1 Celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n . La celulosa existe en las plantas superiores, en las algas, en muchos tipos de hongos y en los quistes de algunos protozoarios.

La celulosa constituye el principal componente de las plantas y uno de los recursos renovables más abundantes en el mundo puesto que por medio de la fotosíntesis se regenera constantemente. En 1969, Bellemy señaló que la celulosa contiene casi el 50% del carbono orgánico fijado a partir de la fotosíntesis, grandes cantidades de materiales lignocelulósicos se generan como desperdicios de la explotación comercial de las plantas o sea a través de la recolección de cosechas, de la manufactura del azúcar, de la cosecha de cereales y de la manufactura de madera y papel. La estructura de la Celulosa fue establecida por Aspinnall /70 y Bikales - Segal /71. (Figura 2)

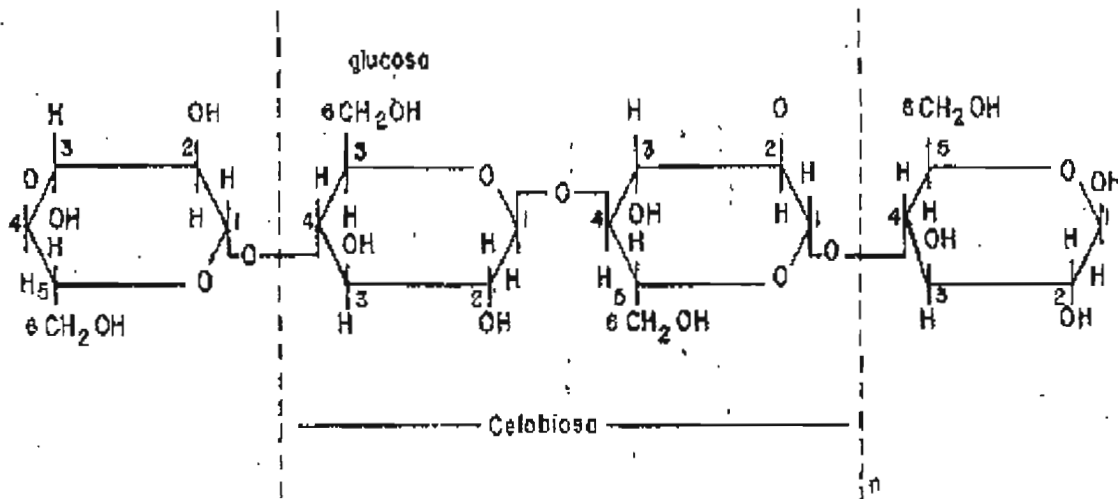


Figura 2. Estructura molecular del polímero de celulosa.

En la naturaleza la descomposición de estos materiales es un proceso microbiológico relativamente lento, puesto que el polímero de lignina que encierra los organelos celulósicos es particularmente resistente a la degradación microbiana. Se pueden citar dos ejemplos de degradación anoxigénica de la celulosa; los protozoarios simbióticos del intestino del comejen y la microbiota del rumen del ganado vacuno.

Aunque la celulosa posee elevada afinidad por el agua, es completamente insoluble en ella. Las fibrillas de celulosa se hallan aglutinadas por una matriz de otros tres materiales:

- ✦ La hemicelulosa: Son polímeros de pentosas, de la D-xilosa con enlaces β (1-4), y posee cadenas laterales de arabinosa.
- ✦ La pectina: Polímero de metil-D-galacturonato.
- ✦ La extensina: Glucoproteína unida covalentemente a las fibrillas de celulosa.

Por otro lado, la celulosa constituye entre el 20-30% del peso seco de las paredes primarias y es especialmente abundante en paredes secundarias donde puede alcanzar el 40-50%. La celulosa se obtiene como residuo insoluble tras la extracción de las pectinas y las hemicelulosas de la pared celular.

Las cadenas de este D-glucano se agregan entre sí por puentes de hidrógeno formando estructuras llamadas "microfibrillas". Unas 32 moléculas lineales se asocian para formar una fibrilla elemental y 20 fibrillas elementales constituyen una microfibrilla; éstas forman cadenas lineales de hasta 3.000 unidades de glucosa que están dispuestas al azar en la pared celular de la planta conformando a la celulosa Amorfa; ó bien agrupadas en microfibrillas, unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Vander Waals constituyen la celulosa Cristalina; este polímero es sintetizado por las células en crecimiento y su función es la de conferirle rigidez y contribuir al soporte de las células. (Figura 3)

En la pared celular la celulosa probablemente está organizada en unidades discretas separadas por un espacio, el cual en el tejido maduro de las plantas está comúnmente lleno de lignina.

La celulosa de las paredes secundarias presenta un grado de polimerización alto y homogéneo y una orientación de las microfibrillas muy precisa, mientras que la de las paredes primarias tiene un menor grado de polimerización, es más heterogénea y la orientación de las fibrillas no es tan precisa. (28)

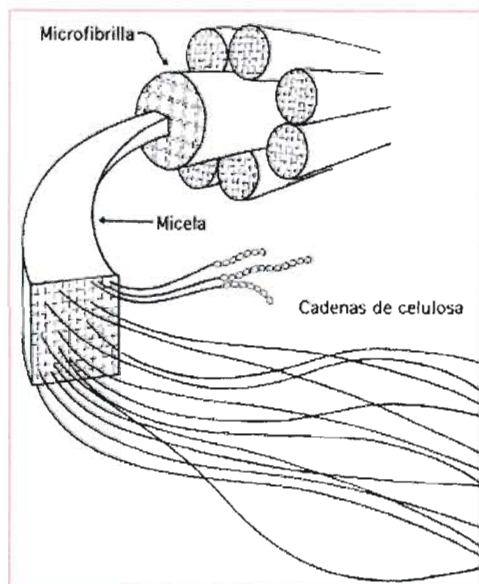


Figura 3. Disposición de las microfibrillas de la pared celular.

A pesar del bajo poder de descomposición de los mesófilos, Tansey mostró en 1971 que la actividad de cierto número de termófilos era bastante mayor que la de los mesófilos activos; la actividad de los termófilos oxigénicos en la descomposición de la materiales lignocelulósicos resulta obvia si se toman en cuenta las altas temperaturas que se registran en los montones del compostaje, que llegan a menudo a encenderse debido a esta actividad termofílica. (Figura 4)

Los residuos celulósicos se clasifican de acuerdo a su origen:

- ♣ Agrícola: bagazo, paja, residuos de mazorcas, olote, hojas, etc.
- ♣ Desperdicios del procesamiento de alimentos: cáscara de frutas, pedazos de vegetal, pulpa, etc.
- ♣ Desperdicios de madera: aserrín, astillas, corteza, etc.
- ♣ Municipal: Basura, residuos de papel.

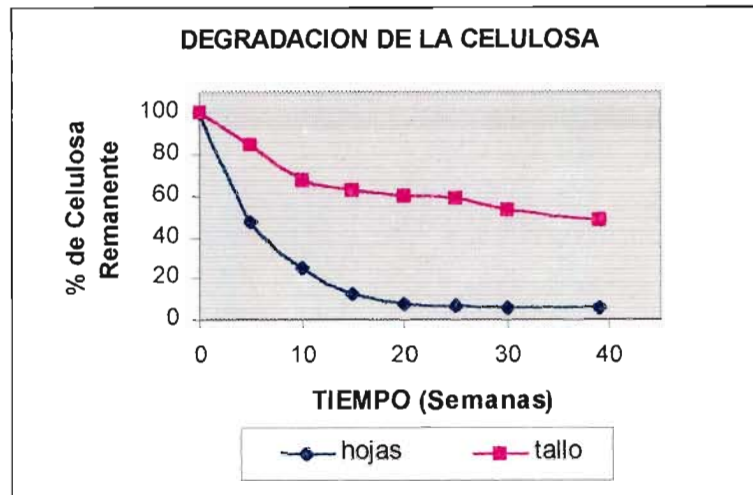


Figura 4. Degradación natural de la celulosa en los tallos y hojas de maíz. (86)

El porcentaje de celulosa en plantas varía del 40% en algunas maderas, a 95% en el algodón. (92)

El contenido de celulosa de las plantas superiores nunca es fijo y la concentración cambia con la edad y el tipo de planta, el carbohidrato es especialmente abundante en los materiales leñosos, en paja, rastrojos y hojas. Los tejidos suculentos son comúnmente pobres en celulosa, pero la concentración aumenta mientras la planta madura. En pastos jóvenes y leguminosas por ejemplo, la celulosa puede ocupar una parte tan pequeña como el 15% del peso seco, pero el valor puede ser mayor al 50% en materiales leñosos; un valor de concentración entre el 15 y el 45% incluye a la mayoría de las especies de cultivo, siendo el extremo más bajo característico de plantas más jóvenes.

1.2.1.1 *Actividad microbiana sobre la celulosa.* La aplicación de nitrógeno inorgánico aumenta la descomposición de la celulosa en el suelo y tanto las sales de amonio como las de nitrato sirven como buenas fuentes de este elemento; en apariencia el suministro de fósforo es usualmente adecuado para la digestión microbológica de la celulosa. Por otro lado, una deficiencia de fósforo en algunas localidades puede ser responsable de una baja actividad microbiana para la descomposición del polisacárido.

En cultivos con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido; bajo las condiciones ácidas la desaparición de la celulosa se debe principalmente a los hongos filamentosos. Aunque el proceso es rápido, a pH menor de 5.0 y ocasionalmente por debajo de 4.0 los suelos con bajas concentraciones del ión hidrógeno, degradan la celulosa más fácilmente. (56)

Muchos microorganismos se desarrollan lentamente en medios que contienen celulosa purificada como única fuente de carbono, pero en material estéril los mismos organismos utilizan vigorosamente el polisacárido. (69)

Si una población puede desarrollar un gran tamaño a expensas de algún otro nutriente carbonado disponible, la microbiota puede adaptarse a la celulosa una vez que el suministro del segundo nutriente se hace limitante, siendo el efecto neto un incremento en la hidrólisis de la celulosa. (56)

Entre la gran variedad de microorganismos degradadores de la celulosa, los hongos juegan un papel muy importante. (Tabla 2)

Tabla 2. Lista de algunos microorganismos capaces de utilizar celulosa. (86)

HONGOS	
Alternaria spp.	Polyporus spp.
Aspergillus spp.	Rhizoctonia spp.
Chaetomium spp.	Rhizopus spp.
Coprinus spp.	Trametes spp.
Fomes spp.	Trichoderma spp.
Fusarium spp.	Trichothecium spp.
Myrothecium spp.	Verticillium spp.
Penicillium spp.	Zygorhynchus spp.

También bacterias del tipo de *Cytophaga* y *Sporocytophaga*; otras mixobacterias, *Angiococcus* y *Polyangium*, también se desarrollan en la celulosa.

En sustratos cercanos al valor neutro, es decir, pH de 6.5 a 7.0, la población activa contiene tanto vibrios como hongos. En sustratos con acidez un poco más alta, entre 5.7 y 6.2 hay menos vibrios y más *Cytophaga*; en sustratos con acidez mayor a pH 5.5, la biota es dominada por los hongos filamentosos.

Aun cuando son puestos en cultivo puro, los vibrios celulolíticos tienen su óptimo en un pH de 7.1 a 7.6 y no crecen a pH de 6.0 mientras que las *Cytophaga* se desarrolla en concentraciones de ión hidrógeno ligeramente más altas.

En suelos aireados con altas concentraciones de ión hidrógeno solamente los hongos filamentosos responden a tales tratamientos.

En ocasiones la celulosa se degrada más rápidamente en cultivos mixtos que en cultivos puros, aun cuando los organismos asociados sean incapaces de atacar al polisacárido. La población secundaria probablemente favorece a la microbiota primaria destruyendo los productos de la descomposición y previniendo así que los desechos metabólicos causen inhibiciones o elaboren enzimas inducibles.

La celulolisis sin O₂ es lenta sin tomar en cuenta el grupo de microorganismos de que se trate.

Los fermentadores anoxigénicos de la celulosa más comunes en la naturaleza parecen ser los miembros del género *Clostridium*. Estas bacterias se encuentran en suelos, estiércol, lodo de ríos y aguas negras; muchas especies de *Clostridium* son celulolíticas, una capacidad no muy rara en el género.

Un termofilo común es *Clostridium thermocellum*, un anoxigénico formador de endosporas que produce ácido acético, etanol, CO₂, H₂ y requiere bajos potenciales de óxido reducción para su proliferación.

La temperatura óptima para la degradación de la celulosa por Clostridios termofilos es de 55 a 65°C y sin crecimiento por arriba de los 68°C. El pH óptimo está alrededor del valor neutro.

La celulasa cataliza la conversión de celulosa insoluble a mono o disacáridos sencillos solubles en agua, una reacción característica de toda la microbiota celulolítica. Los pasos que siguen a la hidrólisis inicial de la celulosa varían con los organismos individuales responsables, siendo metabolizados los azúcares simples a CO₂ por los oxigénicos y los ácidos orgánicos por los anoxigénicos.(86)

1.2.2 Hemicelulosa. El término "hemicelulosa" fue propuesto para designar un grupo de polisacáridos considerados precursores de la celulosa. A pesar de que hoy se sabe que esto no es cierto, el término ha seguido utilizándose. Actualmente se define a las hemicelulosas como "polisacáridos no-celulósicos de la pared celular distintos a las pectinas".

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos extraíbles de la pared celular con agentes alcalinos y que presentan dos características estructurales comunes:

- (a) Están formados por un eje principal plano de azúcares, unidos casi siempre por enlaces $\beta(1-4)$, del que pueden salir ramificaciones generalmente cortas.
- (b) Poseen alguna característica estructural que les impide formar agregados con las cadenas de celulosa. Sin embargo, sí pueden co-cristalizar con las cadenas de celulosa, probablemente mediante puentes de hidrógeno entre los grupos -CH₂OH de la celulosa y los oxígenos glicosídicos de las hemicelulosas. (70, 71)

En la naturaleza se encuentran dos tipos de hemicelulosas, las poliurónidas, que poseen residuos de ácido urónico y las celulosanas, las cuales no contienen este compuesto, comprenden a los polisacáridos de bajo peso molecular, de diversos tipos de azúcares. La mayoría de las hemicelulosas son básicamente, polímeros lineales de cadena corta formados por numerosos y diversos tipos de azúcares; los principales azúcares en hemicelulosas son D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, ácido 4-metil-D-glucorónico y ácido D-glucorónico. La cantidad de hemicelulosa de los materiales celulósicos naturales varía entre un 10 y 30%.

1.2.3 Lignina. Se encuentra en la pared celular en íntima relación con la celulosa y aparentemente este constituyente vegetal hace más lenta la velocidad de destrucción de la celulosa; la influencia de la lignina es para reducir la susceptibilidad de la celulosa a la descomposición.

La lignina es un complejo formado por un polímero tridimensional de residuos de fenilpropano, está depositado en un estado amorfo alrededor de las microfibrillas de celulosa de la pared celular de la planta y el contenido en residuos celulósicos varía entre el 15 y 30%.

Su función principal es servir como elemento de soporte y rigidez a la planta, es el componente más recalcitrante de la pared celular de la planta. El aumento del porcentaje de lignina reduce la disponibilidad del sustrato y por lo tanto el área disponible para la penetración y actividad enzimática. Además de estos tres componentes presentan pequeñas cantidades de resinas y gomas, proteínas, grasas y minerales.

A continuación se señalan aspectos importantes relacionados con la composición de los sustratos celulósicos y la composición química de los desperdicios celulósicos. (Cuadros 4 y 5 respectivamente)

Cuadro 4. Composición de los sustratos celulósicos. (6)

SUSTRATOS	CELULOSA %	HEMICELULOSA %	LIGNINA %
Madera (Angiospermas)	40-55	24-40	18-25
Madera (Gimnospermas)	45-50	25-35	25-35
Hierbas	25-40	25-50	10-30
Hojas	15-20	80-85	
Periódicos	40-55	25-40	18-30
Residuos de la fabricación de papel	60-80	20-30	2-10

Cuadro 5. Composición química de algunos desperdicios celulósicos, en porcentaje de peso seco. (73)

COMPONENTE	BAGAZO	PAJA DE TRIGO	MADERA	PAPEL
Celulosa	46	34	44-50	70
Hemicelulosa	25	25	20-26	2-5
Lignina	20	13	7-12	10
Sílice, grasa				
Ceras, cenizas	9	28	Balance	15
Total	100	100	100	100

Los tratamientos microbiológicos tienen grandes ventajas con respecto a los químicos y físicos como la alta especificidad en la degradación de la lignina, generación mínima de desperdicios y subproductos, bajos requerimientos de energía y además no requieren la eliminación, recuperación de reactivos, y no contaminan el ambiente.

La lignina resiste la hidrólisis ácida con bajas o altas concentraciones de ácido y permanece como un residuo insoluble después de la hidrólisis. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la degradación de la lignina está relacionado con intermediarios altamente reactivos, producidos por enzimas peroxidasas y catalasas. La hidrólisis completa de la celulosa consiste en el rompimiento de los enlaces entre las moléculas de glucosa; a cada unidad se le añade una molécula de agua, produciendo el azúcar glucosa. Lo mismo sucede con las hemicelulosas. el ácido actúa únicamente como catalizador.

Luego del proceso de hidrólisis, se procede a la posterior neutralización del ácido antes de la fermentación. (92)

Para producir proteína microbiana de los desperdicios celulósicos, se presentan diversas alternativas generales basadas en los tres componentes principales. (73)

1.3 MICROORGANISMOS

Los microorganismos intervienen en una forma muy especial en cada proceso del que hacen parte, debido a su ubicuidad, a su diversidad metabólica y a su alta velocidad enzimática.

1.3.1 Generalidades. Los hongos constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos eucarióticos, heterótrofos no fotosintéticos, con pared celular. Basándose en la apariencia macroscópica de la colonia se pueden diferenciar dos tipos de hongos, si producen colonias opacas, cremosas o pastosas se denominan levaduras; si producen crecimientos aéreos, velludos, algodonosos o pulverulentos se llaman hongos filamentosos.

Los hongos generalmente poseen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y algunas se cultivan para obtener sus amilasas, pectinasas, proteinasas y lipasas.

Ciertos hongos elaboran sustancias que son inhibidoras para otros organismos, tales como: La Penicilina por *Penicillium chrysogenum*, la Clavina por *Aspergillus clavatus*.

Algunos de estos compuestos químicos son micostáticos, los cuales también inhiben el crecimiento de otros microorganismos, tal ocurre con el ácido sórbico, propionatos, acetatos y otros que son específicamente funguicidas.

El crecimiento de los hongos filamentosos es lento, comparado con el de las bacterias y levaduras, debido a esto cuando las condiciones son favorables al desarrollo de todos estos microorganismos, los hongos están en condiciones desfavorables de competencia.

1.3.2 Morfología. El conjunto de elementos que constituyen un hongo se denomina talo, el talo puede ser unicelular (levaduras), en hongos filamentosos el talo incluye una parte vegetativa, el micelio compuesto por hifas, una parte reproductora conidias, esporas.

Las hifas son tubos que contienen núcleos y citoplasma pueden presentar septos (micelio tabicado), o no (micelio no tabicado). Pueden existir elementos de resistencia como los esclerocios que son masas endurecidas de tejido fúngico presentes en algunos géneros de Ascomycetes y Basidiomycetes. Producen enzimas adaptativas o inductivas por la presencia de un complejo inductor.

1.3.3 Reproducción. Los hongos se pueden reproducir asexual y/o sexualmente, en algunas especies coexisten las dos formas de reproducción en el mismo organismo que se denomina entonces holomorfo: el cual tiene a la vez una forma de multiplicación asexual, el anamorfo o estado imperfecto y una sexual, el teleomorfo o estado perfecto.

La reproducción asexual puede ocurrir por propagación vegetativa a partir de fragmentos de micelio, o por formación de esporas de distinto tipo. Los hongos imperfectos son típicamente tabicados, y forman solo esporas asexuales.

Esporas Asexuales: Se producen en gran cantidad, son pequeñas, ligeras y resistentes a la desecación, el aire como el agua las disemina fácilmente, originándose nuevos hongos en donde encuentre condiciones favorables. Hay diferentes tipos de esporas asexuadas:

- Chlamidosporas
- Conidias
- Blastosporas
- Artrosporas u Oidios
- Esporangiosporas

Las conidias se desprenden ó crecen en hifas fértiles especiales denominadas conidioforos. Los cuales generalmente son abiertos, no están incluidos en ningún receptáculo especial – contrario a lo que sucede con las esporas-; las conidias también se distinguen por ser lisos o rugosos y mono- bi o multicelulares, estos crecen individualmente en los conidioforos, formando cabezas de esporas de disposición y complejidad diversa.

Las conidias de algunos mohos se desprenden del conidioforo por gemación y continúan multiplicándose de esta forma, por lo que se asemejan a las levaduras.

La reproducción sexual se caracteriza por la unión de dos núcleos que da lugar a esporas sexuales como: zigosporas, ascosporas, oosporas y basidiosporas.

Los hongos pueden ser homotálicos si poseen en el mismo micelio núcleos complementarios que pueden conjugarse o heterotálicos cuando requieren núcleos provenientes de micelios diferentes.

En general la reproducción asexual es más importante para la propagación de la especie, en muchos hongos la reproducción sexual se da solo una vez al año; hay un grupo de hongos a los que no se les conoce reproducción sexual los Deuteromycetes, también existe otro grupo que no forma esporas de ningún tipo y solo se reproduce por fragmentación del micelio (*Micelia sterilia*), Mohos.

1.3.4 Hongos Filamentosos. Presentan tabiques transversales que dividen la hifa en varias celdillas, estas aumentan su longitud por división de la célula apical o por divisiones de las células intermedias. La gran mayoría de ellos presenta un aspecto algodonoso ó aterciopelado, presentando hifas multicelulares y filamentosas.

Se clasifican como: Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Fungi imperfecti ó Deuteromycetes.

Debido al tipo de hongos utilizados, se hará mención solo a *Trichoderma viride* y a *Saccharomyces cerevisiae*.

Clase Deuteromycetes: De particular interés, carecen de esporas sexuales, con pocas excepciones.

Orden Moniliales: Presentan conidioforos libres que surgen del micelio irregularmente.

Familia Moniliáceae: Micelio claro y sin coloración, observándose algunos con tonalidades débiles o muy fuertes.

Género: *Trichoderma viride*. (Figura 5)

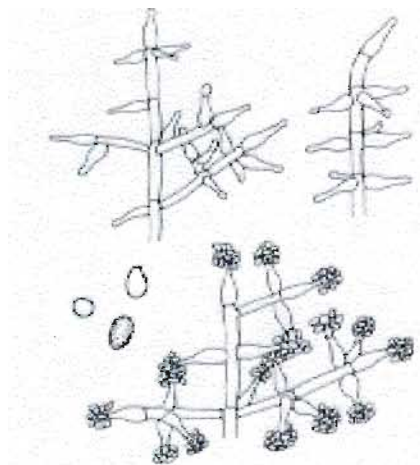


Figura 5. Microfotografía de la estructura de *Trichoderma viride*.

Trichoderma viride, hongo celulolítico cuyas colonias presentan usualmente un crecimiento rápido, que se desarrollan a temperaturas que oscilan entre los 20 – 28°C y máximo 37°C. Inicialmente las hialinas pueden llegar a tener un diámetro de 4.5-7.5 cm en 5 días aproximadamente, tornándose de color blanquecino a verde, micelio septado, los conidioforos en forma de penachos piramidalmente frondosos, las fiálides colocadas en racimos en forma de botella en grupos de 2 a 4, más o menos delgadas y frecuentemente dobladas con longitudes entre 8-14 x 2.5-3.0 μ .

Las conidias monocelulares verdes, brillantes, esféricas o ligeramente ovales agrupados en el ápice del conidioforo, ampliamente globosas o rara vez elipsoidales de 3.6–4.5 μ de diámetro; algunas presentan cabeza conidial mucoides son ásperas y rugosas. Comúnmente las clamidosporas son intercalares y a veces son terminales, globosas; las hialinas son lisas y/o rugosas. (4, 40, 100)

Se diferencian de las esporangiosporas porque no se forman dentro de sacos denominados esporangios, la formación de conidias puede ser de forma individual, aislada o en grupos concatenados producidos en cadena, la formación puede ser Basipetal – el conidio más joven está en la base-; o Acropetal. –el conidio más joven está en el ápice- (41)

Se reporta el carácter celulolítico de la especie *Trichoderma viride*, éste microorganismo presenta rápido crecimiento y alta actividad celulolítica en presencia de celulosa y carboximetilcelulosa como única fuente de carbono, su crecimiento sobre paja de caña se caracteriza por un micelio abundante.(25)

Entre otras, estas son algunas de las actividades que puede presentar *Trichoderma viride*:

- ✦ Agente de control biológico de algunos hongos que causan enfermedades en plantas y animales, de depredadores microbianos.
- ✦ Útil como control biológico en cultivos de rosas y claveles.
- ✦ Produce amilasas y proteasas, tomando como fuente de carbono almidón de maíz, maltosa, glucosa, sacarosa y lactosa.
- ✦ Obtiene trazas de ácido cítrico, como producto de su metabolismo primario.
- ✦ Biodegrada pesticidas.
- ✦ Participa en la transformación de hidrocarburos clorados (proceso de dehidrohalogenación)
- ✦ Causa alteraciones de frutas, hortalizas y causa la podredumbre de los cítricos. (moho verde)
- ✦ Constituye una seria plaga en los cultivos de hongos comestibles y medicinales.
- ✦ Solo en raras ocasiones *Trichoderma viride* se puede aislar de lesiones humanas. Peritonitis. (4, 23, 48, 55, 65, 83, 104)

1.3.5 Hongos no filamentosos (levaduras): Hongos verdaderos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular, algunas presentan reproducción asexual exclusivamente, no tienen estadios perfectos y se les conoce como miembros de los Fungi imperfecto (Deuteromycetes); otras forman esporas sexuales resultantes de la cariogamia y

la meiosis, son las levaduras perfectas debido a que presentan reproducción sexual y asexual, mostrando relación directa con Ascomycetes y Basidiomycetes.

Los nombres de los microorganismos usualmente provienen del latín y el griego, e indican algunas características de dicho microorganismo, así en el caso de las levaduras:

Saccharo = En griego significa azúcar,

-myces = (sufijo), deriva de una palabra griega que significa hongo;

cerevisiae= Palabra latina que significa de la cerveza. Sin embargo muchos organismos reciben su nombre completo o parte de él en honor al científico que los estudió o describió por primera vez. (8)

Schwan asignó y mantuvo el término de levadura, “Zuckerpilz” u hongos del azúcar, del cual se originó el nombre de *Saccharomyces*.(91)

Las levaduras se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza y son diseminadas por insectos, viento y agua; se aíslan del suelo, viñedos, huertos, superficie de frutas como uvas y manzanas, hojas, flores y otras partes de la planta.

La forma de la levadura varía según la especie, pueden ser esféricas, ovoideas, alimonadas, piriformes, cilíndricas, triangulares o alargadas.

En general las células de las levaduras son más grandes que las bacterias, varían considerablemente de tamaño según la especie, nutrición, edad, además de otros factores. Sin embargo, algunas están asociadas a enfermedades en plantas y animales; otras descomponen los alimentos o deterioran materiales textiles. (102)

La mayoría se reproducen asexualmente por gemación polar o multipolar, durante este proceso se forma una protuberancia (blastosporas), con crecimiento central aumentando de tamaño, hasta que finalmente se desprende formando otra levadura.

BIOOBTENCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS CELULÓSICOS DE CAÑA DE AZÚCAR

También se pueden reproducir por fisión binaria, la levadura se hincha o alarga; el núcleo se divide y se forman dos células hijas. (90)

1.3.5.1 *Fases de la gemación:*

- ⇒ Comienza con la desintegración de la pared celular y formación de un poro,
- ⇒ A través del poro sale parte del protoplasto de la célula madre con uno o más núcleos,
- ⇒ La célula hija (yema), crece hasta alcanzar el tamaño aproximado de la célula madre sin ampliación del poro,
- ⇒ Separación por estrechamiento del tabique formado. (76)

Las levaduras utilizan la fuente de carbono como precursor energético y plástico; como fuente energética se produce la total degradación del compuesto de carbono a través del ciclo de Krebs obteniéndose la energía necesaria para la síntesis molecular de la célula, como fuente plástica, la levadura utiliza los esqueletos carbonados de los carbohidratos contenidos en las melazas, y los transforma, entre otros, en proteína microbiana contenida en la biomasa del cultivo.

El catabolismo de los carbohidratos es anoxigénico (fermentación), u oxigénico (respiración). El proceso más típico de crecimiento anoxigénico es la fermentación alcohólica, cuyos productos finales son alcohol etílico y dióxido de carbono. (106)

En general las levaduras se desarrollan mejor en medios ácidos, pH ajustado entre 3.5 y 3.8, umbral donde se inhiben casi todas las bacterias. Las levaduras además de nitrógeno y azufre requieren de otros minerales para su desarrollo, tales como potasio, magnesio, sodio y calcio. (102)

Las bacterias suelen contener una mayor cantidad de proteína, pero tanto su producción a escala industrial, como su recuperación, están por debajo a los que se obtienen con relación al empleo de las levaduras; las levaduras suelen cultivarse a escala industrial a partir de las melazas de caña y los derivados del petróleo.

Estas han servido para la elaboración de alimentos nutritivos como el pan y de bebidas fermentadas a partir de jugos de frutas. Las levaduras son fuente de otras enzimas de importancia comercial como lactasas, invertasas y catalasas. (38)

1.3.5.2 *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de estas levaduras son redondas, ovaladas o alargadas; de diferente diámetro que van de 3 a 5 μm de diámetro y pueden formar pseudomicelio. Pertenece a la clase Ascomycetes, denominadas como levaduras verdaderas, las cuales se reproducen por gemación multipolar o por formación de ascosporas; comprende especies macroscópicas (pueden ser comestibles) y microscópicas. En el orden Eumicetales se reconoce la familia Saccharomycetaceae, la cual se caracteriza por producir esporas de varias formas.

1.3.5.2.1 Generalidades. Se reproducen asexualmente por gemación polar o multipolar, proceso durante el cual se forma en la periferia de la célula una protuberancia que aumenta de tamaño hasta que finalmente se desprende de la pared celular, constituyendo una nueva levadura y sexualmente por producción de ascosporas que pueden seguir a la conjugación pero pueden también desarrollarse a partir de células diplóides cuando estas presentan la fase vegetativa.

Las levaduras poseen metabolismo fermentativo u oxidativo ó ambos tipos a la vez; las levaduras oxidativas pueden crecer formando una película o velo sobre la superficie de los líquidos y las levaduras fermentativas suelen crecer en masa suspendidas en el líquido.

En *Saccharomyces cerevisiae* el diámetro oscila de 2 a 8 μm , se utiliza en muchas industrias alimenticias, con cepas especializadas para la fabricación de pan, fermentación

superficial o profunda de cervezas, vinos y para la producción de alcohol, glicerina o invertasa.

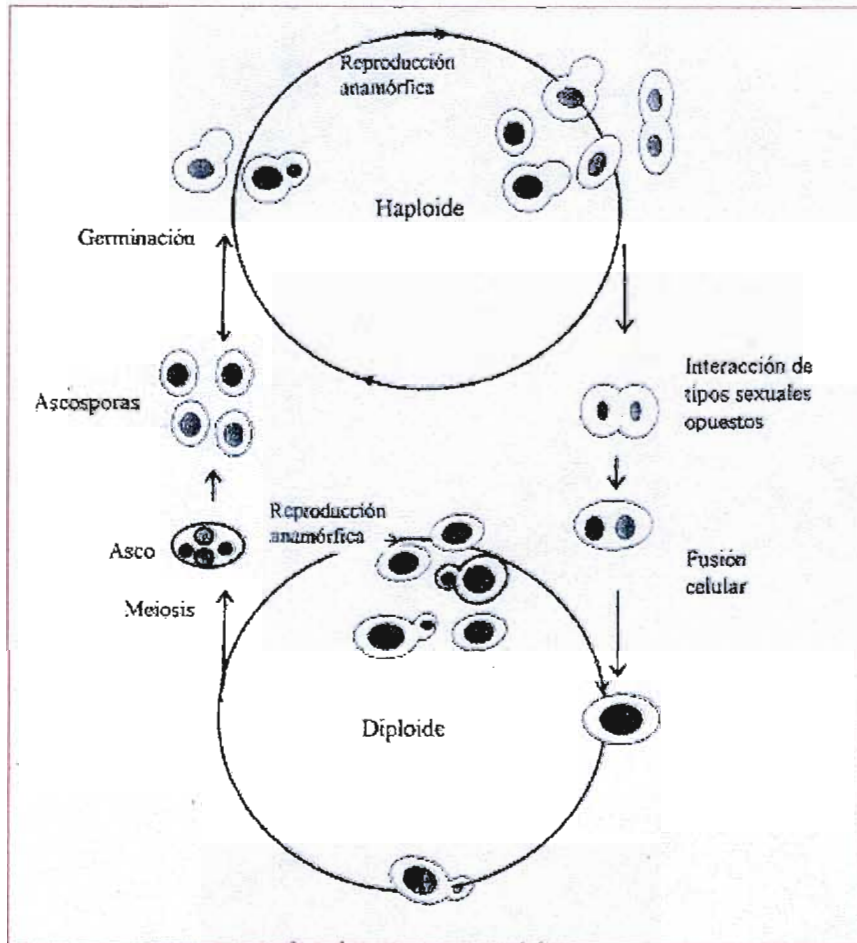


Figura 6. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae se aísla de productos vegetales, lácteos y en general de productos como vino y cerveza, hace parte de la microbiota normal del tracto digestivo y cavidad bucal en humanos; su crecimiento es rápido en la mayoría de medios a temperaturas entre 25 y 37 °C.

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* el re-oxidante es el acetaldehído y la mayor parte del piruvato generado a partir de la glucosa se convierte en etanol.

1.3.5.2.2 Ciclo de vida. (Figura 6). A partir de una célula diploide, se obtiene una célula denominada asco, la cual contiene 4 gametos que toman el nombre de ascosporas, presentando dos ascosporas de cada tipo sexual; las ascosporas poseen algún tipo de resistencia a las condiciones ambientales. (102)

1.4 ENZIMAS

Potencialmente cada organismo vivo es una fuente para obtener enzimas aplicables a la tecnología. Las enzimas se pueden obtener a partir de tres fuentes principalmente: animal, vegetal y microbiana.

Actualmente las enzimas de fuente microbiana son las más utilizadas industrialmente por las siguientes razones:

- ✔ Bajo costo de producción
- ✔ Condiciones ambientales no restringidas;
- ✔ Tiempo requerido para la producción corto;
- ✔ Es posible la producción en masa.

1.4.1 Clasificación de las enzimas. Son también llamadas catalizadores biológicos y son proteínas que aumentan la velocidad de reacción, son de tipo especie específicas y químico-selectivas. (Tabla 3)

Teniendo en cuenta la función que realizan cada una de las enzimas, se pueden clasificar en los siguientes grupos: Oxidoreductasas, Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas, y Ligasas.

1.4.1.1 *Hidrolasas*. Generalmente son los enzimas más estables y no necesitan coenzimas, catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos como C=O, C-N, C-C; sus nombres comunes se forman añadiendo el sufijo -asa al nombre del sustrato, ejemplo: lipasas, peptidasas, amilasas, celulasas, fosfatasas, ureasas, etc. También pertenecen a este grupo la pepsina, tripsina y quimiotripsina.

Tabla 3. Obtención y elaboración de enzimas. (77)

ORIGEN	PROCESAMIENTO
Animal y Vegetal	Trituración de tejido especializado, Formación de papilla, Extracción de solventes.
Microbiano	Selección del microorganismo, Selección del medio de cultivo, Separación de la biomasa

El medio de cultivo debe estar óptimamente equilibrado, se caracteriza por poseer las condiciones esenciales para que el microorganismo pueda desarrollarse y permanecer activo metabólicamente. Para inactivar enzimas se utilizan, cambios extremos de pH y de temperatura.

Las enzimas microbianas pueden clasificarse en dos categorías:

- ⌚ Enzimas Intracelulares o endoenzimas: Permanecen en el interior de la célula, donde llevan a cabo su función, su aislamiento es difícil ya que son altamente inestables cuando se separan de su medio natural. Participan principalmente en reacciones de síntesis.

- ⌘ Enzimas Extracelulares o exoenzimas: Se sintetizan en el interior de la célula y se vierten después al medio de cultivo. Catalizan reacciones de hidrólisis o de degradación. (77)

1.4.1.1.1 Celulasas. De particular interés y dentro de las hidrolasas se encuentran las enzimas celulolíticas. Las Celulasas son agentes clarificantes, también se pueden usar como auxiliares digestivos para degradar la celulosa de los alimentos como ajo y champiñones.

El sistema catalítico que requiere un microorganismo para convertir la celulosa a azúcares simples que penetren la célula, consiste en un complejo enzimático que incluye característicamente tres tipos de enzimas: (Figura 7)

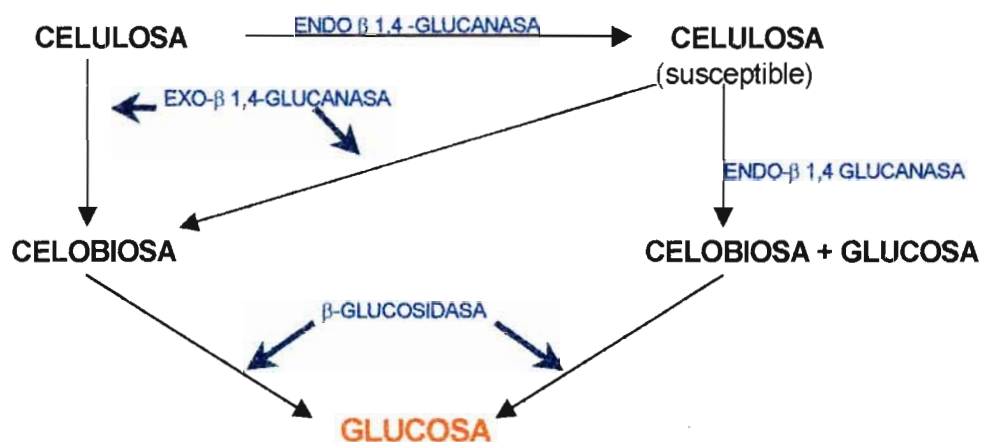


Figura 7. Modo de acción de la celulasa en sistemas enzimáticos de celulosa-celulasa. (105)

- ♪ Una enzima hasta ahora poco caracterizada llamada C_1 , Exo- β -1,4-gluconasa, celobiohidrolasa, avicelasa, necesaria para actuar sobre la celulosa cristalina, separando los dímeros de celobiosa en los extremos no reductores de la cadena.

- ♪ β -(1-4) glucanasa o como se le llama algunas veces, C_x , Endo- β -1,4- glucanasa , endocelulosa, carboximetil celulasa, rompe las cadenas de celulosa hasta convertirlas en oligosacaridos y trisacáridos como celotriosa y dímeros como celobiosa
- ♪ β -1,4-glucosidasa. Celobiasa, rompe oligosacaridos con bajo nivel de polimerización para dar glucosa. (6)

El rompimiento total del polímero requiere la acción conjunta de estos catalizadores, aunque estas enzimas a veces tienen sustratos comunes. C_1 actúa sobre celulosa no degradada (o natural), las enzimas C_1 de muchos organismos estudiados hasta la fecha tienen poca o ninguna actividad sobre el polisacárido parcialmente degradado o en los oligómeros.

Esta enzima se encuentra en las especies verdaderamente celulolíticas, aunque muchas más especies puedan utilizar la molécula parcialmente descompuesta porque tienen C_x . Es común encontrar que una sola población excrete más de una enzima C_1 , representando proteínas que tienen estructuras que difieren poco, pero probablemente funcionan de la misma manera.

Las β -(1-4) glucanasas conocidas comúnmente como enzimas C_x no hidrolizan a la celulosa nativa pero en cambio rompen los polímeros parcialmente degradados.

Este tipo de enzima, ampliamente distribuida entre hongos y bacterias, la mayoría de estas glucanasas actúan en moléculas que contienen muchas unidades de glucosa además de los oligómeros tales como la celotetraosa y ocasionalmente celotriosa. (Figura 8)

Por otra parte, la velocidad de hidrólisis es más lenta en los oligómeros que en las moléculas de pesos moleculares más altos.

Esta hidrólisis, que incluye la adición de agua al sustrato insoluble, rompe los enlaces entre los complejos de azúcar de la cadena. Los productos solubles (usualmente celobiosa y los oligómeros correspondientes), se forman finalmente, pero los productos finales definitivos parecen depender del microorganismo. Como con C_1 , una sola especie puede excretar varias proteínas de diferente estructura, sin importar que todas funcionen de la misma manera. La β -glucanasa fúngica es usada para la manufactura del café instantáneo; está degrada el mucílago del café y previene la gelatinización del café concentrado.

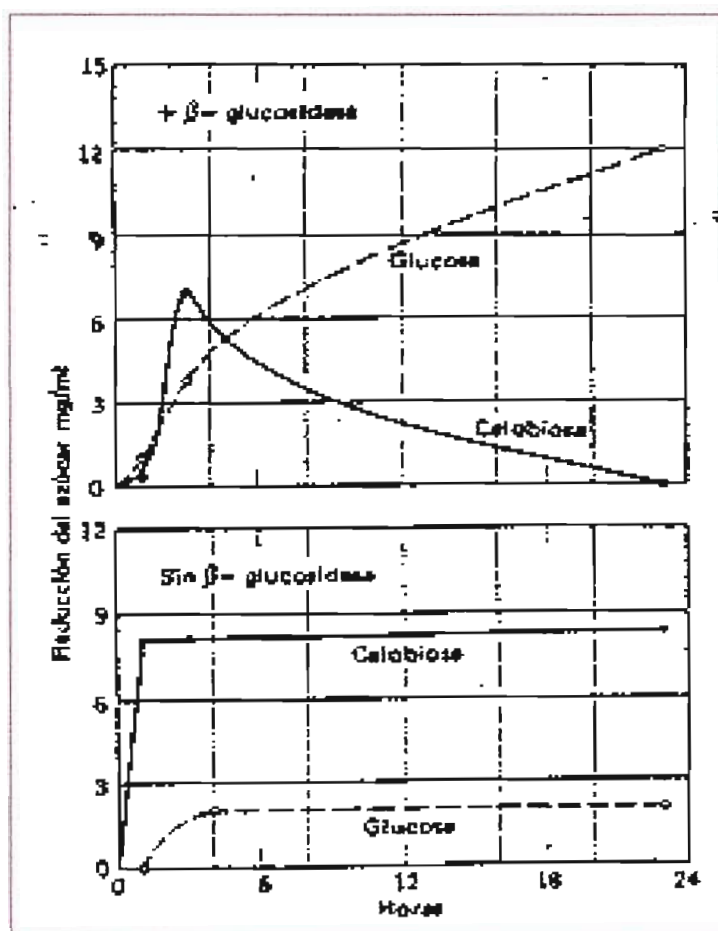


Figura 8. Formación de celobiosa y glucosa por el sistema celulasa de *Trichoderma viride*, con y sin b-glucanasa. (72)

Se conocen dos formas de rompimiento entre las glucanasas: una en el que los enlaces entre las unidades de glucosa dentro de la larga cadena se rompen más o menos al azar, y una segunda en la cual la enzima actúa sólo en las uniones cercanas al extremo de la cadena; el primer tipo de rompimiento produce celobiosa, varios oligómeros y algunas veces glucosa cuando el polímero se rompe al azar, este tipo de catalizador es conocido como una endoenzima. El último tipo de rompimiento libera solamente el fragmento que se separa secuencialmente a partir del extremo del complejo sustrato, y este fragmento (y por lo tanto el producto), es usualmente celobiosa; tal catalizador es conocido como una exoenzima.

Las acciones exo y endo (esto es, actuando desde el final e internamente entre unidades repetidas), son características no sólo de las glucanasas sino también de enzimas que actúan en otros polisacáridos aun en otras clases de polímeros y esta designación no debe confundirse con aquella aplicada a los sitios intracelulares o extracelulares en los cuales funcionan las enzimas en relación con la célula que las produjo.

El oligómero o aun la celobiosa que se forma finalmente a partir de la celulosa debe ser descompuesto antes de que la célula pueda usar el carbono para propósitos energéticos o de síntesis. Esta última fase en la transformación de la celulosa o glucosa es catalizada por la β -glucosidasa, una enzima que hidroliza la celobiosa, celotriosa y otros oligómeros de bajo peso molecular a glucosa.

Celobiasa es el nombre antiguo de la β -glucosidasa, pero el término es inapropiado pues la celobiosa no es el único sustrato.

Las mezclas que contienen C_1 y β -(1-4) glucanasas con frecuencia actúan más fácilmente en celulosa nativa que sólo la enzima C_1 . Aún no está claro en que forma una enzima acelera la reacción catalizada por la segunda, y por esto no es muy evidente cómo funciona C_1 en la celulosa nativa. Aún más, algunos organismos pueden excretar una sola enzima capaz de liberar celobiosa como el único producto en la hidrólisis del polímero no degradado combinando de este modo las funciones de C_1 y la glucanasa.

Muchas otras evidencias confirman que el patrón de degradación de la celulosa no es el mismo en todos los heterótrofos por ejemplo, algunas bacterias no sólo rompen la celobiosa hidrolíticamente para producir dos moléculas de glucosa, sino la convierten a fosfato de celobiosa siendo este último transformado a glucosa y glucosa fosfato.

El complejo celulolítico es inducible en la mayoría de los microorganismos y se sintetiza en presencia de celulosa o carbohidratos que son estructuralmente similares al polisacárido o a sus productos que contienen azúcar. Los inductores incluyen al polisacárido, celobiosa y algunos otros carbohidratos simples que contienen glucosa en la molécula.

Los organismos activos poseen una sola manera de regular la cantidad del sistema enzimático que producen, un rasgo de considerable importancia ecológica pues una alta producción de los catalizadores liberaría grandes cantidades de azúcares que a su vez estimularían a los heterótrofos cercanos permitiéndoles competir con la población celulolítica.

Este mecanismo regulador es conocido como “represión catabólica”, proceso por el cual los productores de la reacción reprimen o inhiben la síntesis de más moléculas de enzima de modo que si la velocidad de formación del producto excede en gran manera la tasa de utilización o asimilación por la célula, se suprime la síntesis de más enzima. Así, cuando aumenta la concentración de glucosa o celobiosa que se libera del polímero, la velocidad de formación de la enzima disminuye.

La celulasa se inhibe por la melanina constituyente de las paredes de ciertos microorganismos y probablemente por otras sustancias orgánicas complejas o coloides.(72)

El rendimiento de la producción de celulasas depende de la concentración de celulosa en el inductor.

La producción de celulasas por microorganismos ha venido jugando un papel cada vez más importante en el ámbito industrial, estas enzimas se utilizan principalmente en las industrias de alimentos y en industrias farmacéuticas como agentes clarificantes. A partir de los últimos 20 años se ha incrementado la investigación de hongos y bacterias, con características celulolíticas para estudiar una mayor producción de celulasas, de tal manera que ello conlleve a la sacarificación por métodos enzimáticos de los residuos celulósicos.

Muchos hongos son celulolíticos y la mayoría de estos producen celulasas cuando crecen en presencia de celulosa. Sin embargo, son relativamente pocos los que producen sobrenadantes que degraden apreciablemente la celulosa cristalina; se ha estudiado la concentración óptima de celulosa, así como el efecto de fuentes orgánicas nitrogenadas. (28)

Se usan celulasas fúngicas en conjunción con pectinasas y amilasas en el procesamiento de cereales, en la producción de jugos de frutas, en la fermentación de alimentos, en la producción de vino y en la fermentación de alcohol. También pueden ser usadas para el mejoramiento del sabor de vegetales de baja calidad, para aumentar el sabor de los champiñones, promover la extracción de productos naturales y mejorar la textura de los alimentos.

Generalmente *Aspergillus niger* es la fuente de celulasa destinada para el uso con los alimentos y *Trichoderma viride* se usa para aplicaciones sin alimentos, aunque las dos enzimas pueden cumplir muchas tareas. Estas enzimas se concentran y se purifican parcialmente antes de sacarlas al comercio como polvo seco.

La celulasa de uso extendido en muchos laboratorios del mundo, proviene de un proceso de cultivos semisólidos de *Trichoderma viride* sobre salvado de trigo, este proceso al parecer ha tenido ventajas económicas frente al sistema de cultivo sumergido, el interés en este último sistema ha sido marcado, en virtud de que las condiciones ambientales requeridas, son de fácil control. (86)

Solamente las celulasas extracelulares pueden ser utilizadas comercialmente, tales celulasas pueden ser excretadas tanto por bacterias (*Cellulomonas* spp.), como por hongos. (*Trichoderma viride*, *T. koningii* y *Sporotrichum pulverulentum*)

Las Hemicelulasas se utilizan para degradar pentosanos de la harina de trigo, con el objeto de mejorar la calidad del pan. (6)

Durante el procesamiento de frutas se añaden mezclas de pectinasas, hemicelulasas y celulasas obtenidas a partir de microorganismos, las cuales sirven para mejorar la extracción del zumo, color, aroma y sabor; así como para reducir el tiempo de fermentación y clarificación. Las celulasas y pectinasas se usan en la extracción del aceite de palma.

1.5 MEDIOS DE CULTIVO

Los microorganismos requieren un ambiente propicio que les brinde las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo; dependiendo de la finalidad que se tenga estos medios pueden variar en su naturaleza, composición, volumen, etc. (49)

1.5.1 Clasificación. Los medios de cultivo se pueden clasificar en:

- ♣ Medio de Mantenimiento: Sustrato en el cual el microorganismo permanece activo metabólicamente, el medio le brinda todos los requerimientos.
- ♣ Medio de Adaptación: (Preinoculo), Puede ser el mismo medio de producción, es el 10% del volumen total, el cual permite solo el crecimiento del microorganismo, este debe incubarse de 48-72 horas.
- ♣ Medio de Producción: Sustrato que sirve de inductor para que el microorganismo sintetice, secrete o excrete determinada enzima. (54, 58)

1.5.2 Efectos ambientales sobre el sustrato. Los principales factores no biológicos que afectan el desarrollo del microorganismo, se pueden clasificar como:

1.5.2.1 *Ambiente químico.* Las reacciones químicas incluyendo algunas catalizadas por enzimas, dependen de las condiciones medioambientales, de la concentración del sustrato, de la temperatura, del pH y de la humedad entre otras. La morfología de los microorganismos puede ser influenciada por la composición y el tipo de medio. (103) ✓

1.5.2.1.1 *Composición del Medio.* Se reportó la influencia de la peptona en la excreción de celulasas por hongos filamentosos, encontrándose el mejor crecimiento en cultivos con peptona a una concentración de 10 g/l, no siendo posible separar el crecimiento provocado por la peptona del aportado por el bagazo solamente, por lo que éste es una expresión de ambos. Sin embargo, el crecimiento con peptona solamente fue inferior a la combinación bagazo y peptona. (18)

También se logró la inducción de celulasas en cultivos de hongos filamentosos desarrollados sobre glucosa y que esto era debido a impurezas de la glucosa, posteriormente se demostró que la impureza con carácter inductor era un disacárido llamado Soforosa (β 1,2-D-glucopiranosil-D-glucosa), presente en un 0.0058%, lo que coincide con otros autores.

Además se han señalado como inductores de celulasas a los azúcares Celobiosa, Gentobiosa y Lactosa, pareciendo la Celobiosa el inductor natural, aunque la Soforosa la supera unas 2000 veces más.

Se reportó en el hongo filamentoso *Trichoderma viride* el efecto del disacárido Soforosa, en relación con una mayor expresión de celulasas y por consiguiente, mayor crecimiento de este microorganismo en presencia de celulosa; la presencia de piruvato también se ha reportado en una bacteria celulolítica, pero no en levaduras. La adición de 1mg de acetato y fumarato, respectivamente, tuvo cierto efecto sobre el crecimiento de los cultivos aunque no tan marcado como con Gentiobiosa. (81)

El efecto de las enzimas también depende de la presencia o ausencia de iones específicos o ligandos, los cuales actúan en el metabolismo microbiano como coenzimas.

1.5.2.1.2 Efectos del pH. Tiene menos efecto sobre las actividades biológicas que la temperatura, debido a que la célula está razonablemente bien adaptada para regular su concentración interna de iones hidrógeno frente a las condiciones externas adversas, aunque la energía de mantenimiento que se requiere para hacerlo resulta obviamente afectada. Además el pH externo probablemente tiene un efecto importante sobre la estructura y permeabilidad de la membrana externa.

Existe un rango bastante amplio de pH en el cual varía muy poco la velocidad de crecimiento, este es frecuentemente alrededor de 7.0 para bacterias y de 4.0 a 5.0 para hongos.

La presencia de amonio en el medio de cultivo contribuye a la formación de ácidos y el pH disminuye; la presencia de urea ayuda a alcalinizar el pH.

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes, se procede a ajustar el pH al valor deseado, añadiendo NaOH 0.1N ó HCl 0.1N al medio según sea la necesidad; una vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio.

Una vez ajustado el pH del medio, éste sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para después evolucionar nuevamente durante el curso del cultivo; de forma que habitualmente se irá acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del microorganismo. (52)

El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones:

- ♣ Valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos.

- ♣ Si la evolución del pH del medio lo hace disminuir por debajo de 3.5 se puede producir su licuefacción.
- ♣ El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.
- ♣ El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del microorganismo.
- ♣ El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia, la actividad de muchos enzimas puede variar.

El principio de la fermentación de los hidratos de carbono (basado en los estudios sobre de las levaduras llevados a cabo por Pasteur, hace más de 100 años), indica que la acción de muchas especies de microorganismos sobre un sustrato hidrocarbonado produce la acidificación del medio. (75)

El pH de las enzimas puede variar desde pH 2.0 (pepsina), a 10 (fosfatasa alcalina), para la mayoría de las enzimas el pH óptimo oscila en el valor neutro. Las enzimas de los hongos filamentosos (Mohos), a menudo presentan un pH óptimo ligeramente ácido, mientras las de las levaduras presentan un pH cercano al neutro.

1.5.2.2 *Ambiente físico.* Entre los factores físicos que presentan mayor incidencia sobre el crecimiento del microorganismo se pueden considerar los siguientes:

1.5.2.2.1 *Efecto de la temperatura.* Todas las reacciones químicas dependen de la temperatura. Aunado a los cambios en la composición de la microbiota inducidos por la temperatura, el calor aumenta la velocidad de transformación del sustrato a causa del efecto directo de la temperatura sobre la acción enzimática.

La aireación también incide sobre la composición de la microbiota activa, con los oxigénicos dominando los medios oxigenados y siendo favorecidas las bacterias anoxigénicas por decrementos en las presiones parciales de O₂.

El oxígeno desaparece a altos niveles de humedad del suelo, por lo que el drenaje deficiente va asociado con la proliferación de bacterias celulolíticas anoxigénicas mientras que el número de hongos y actinomicetos que utilizan la celulosa disminuye. En niveles moderados de humedad las condiciones conducen al crecimiento de hongos celulolíticos y bacterias oxigénicas aunque ciertas variedades toleran humedad subóptima.

1.5.2.2.2 Efecto de la Luz. Se ha determinado que para algunos microorganismos este fenómeno físico estimula la esporulación y el crecimiento, se considera como un factor importante en la obtención de biomasa fúngica. (51)

1.6 BIORREACTOR

Aparato en el cual se lleva a cabo la transformación de un determinado sustrato, está mediada por la acción de los microorganismos o por las enzimas sintetizadas por el microorganismo.

Los biorreactores se emplean ampliamente tanto en la industria de alimentos como en fermentación; estos facilitan la formación de productos ya sea de algún metabolito ó para la obtención de biomasa o para la transformación del sustrato en procesos de degradación.

Las tareas que realiza un biorreactor se pueden resumir como:

- ♪ Conservar las células microbianas o de plantas o de animales uniformemente distribuidas en todo el volumen a fin de prevenir la sedimentación o flotación
- ♪ Mantener constante y homogénea la temperatura
- ♪ Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes

- ♪ Suministrar oxígeno que satisfaga el consumo o adicionar la mezcla CO_2/H_2
- ♪ Mantener el cultivo axénico una vez que todo el sistema ha sido esterilizado e inoculado con el microorganismo deseado. (37, 102)

1.6.1 Métodos de cultivo. Los métodos de cultivo para procesos industriales bien sea a escala piloto ó para escalado son:

- 🏠 En Batch o por cochadas
- 🏠 Semicontinuo
- 🏠 Continuo.(83)

De particular interés es en la presente investigación el continuo, por tal razón se hará referencia al mismo.

Las técnicas de cultivo continuo se han desarrollado en las últimas décadas, existen dos formas básicas de cultivos continuo el cultivo de flujo tapón y el quimiostato.

El sistema de flujo tapón simula un cultivo por lotes y no ofrece ventajas de control ambiental diferentes de las aplicadas a ese tipo de cultivo; en el cultivo de flujo tapón ideal, el cultivo se transporta sin mezclarse a través de un tubo o canal.

Un quimiostato consiste en un tanque agitado con una suspensión de microorganismos perfectamente mezclada y homogénea, a la que se alimenta con medio fresco a un flujo constante; el caldo de fermentación se extrae a la misma velocidad, de modo que el volumen permanece constante.

Las ventajas de los cultivos continuos se fundamentan principalmente en:

La velocidad de crecimiento puede establecerse (dentro de los límites del mismo organismo), de acuerdo con las necesidades del experimento. Se puede seleccionar un estado metabólico particular y el control de éste.

Se pueden obtener células en un estado definido independientemente del tiempo. Con equipo de laboratorio se pueden producir grandes cantidades de material celular definido.

Los procesos de producción han ido cambiando constantemente, este cambio ha dependido del mejoramiento de la preparación de las melazas, de su clarificación, de la aplicación de procesos continuos en lugar de proceso “batch”, de la modernización de los sistemas de aireación, de la separación y filtración de las levaduras.

En la producción fúngica, el cultivo continuo presenta algunas ventajas sobre el cultivo batch; estas diferencias se aprecian claramente en el cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación entre el proceso continuo y el de batch, para la producción de biomasa a partir de melazas. (92)

PROCESO	BATCH	CONTINUO
Producción máxima en 168 h (ton)	225	300
Número de fermentaciones necesarias	10	8
Volumen total de fermentación (m ³)	675	540
Kg de levadura/m ³ de volumen (por semana)	340	565
Kg de levadura/h (promedio)	1360	1815
Horas-hombre/ton (planta solamente)	7.0	3.8
Número de tanques adicionales	9	0
KWh consumidos/ton de levadura	500	430

1.6.1.1 **Biorreactor continuo en dos fases.** El biorreactor continuo en dos fases Hidrólisis – Fermentación (Figura 9), consta de una reactor por cada fase del proceso. Cada reactor tiene una capacidad de 2 litros; construido en vidrio, su diseño presenta unas tapas esmeriladas cada una de ellas consta de cuatro accesos; dos para la entrada y salida de gases, una para el suministro de inóculo y de medio nuevo y otra para monitoreo de muestras. Entre los reactores se encuentra el biofiltro, de 1 litro de capacidad en vidrio con tapa esmerilada y unido con los reactores por medio de conectadores provistos de válvulas de paso tipo bureta. Dentro del biofiltro se encuentra primero el prefiltro que es una malla circular en alambre que soporta una capa de fibra de vidrio de 3 mm de espesor con el fin de retener las partículas más grandes como las dextranas y el micelio de *Trichoderma viride*; a 4 cm del prefiltro se encuentra el filtro de membrana de 0.2 micras el cual retiene las unidades reproductoras de *Trichoderma viride*, las conidias, garantizando la esterilización de los hidrolizados de celulosa que van al reactor de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Para disminuir el tiempo de filtración y aumentar su eficiencia el biofiltro posee un desprendimiento lateral para la conexión a la bomba de vacío con su respectiva trampa, otra ventaja del biofiltro es su fácil remoción para el cambio de las membranas en caso de que se taponen sin necesidad de interrumpir el proceso conjunto de hidrólisis – fermentación.

1.7 FERMENTACIÓN

Existen 3 sistemas para realizar una fermentación; en estado líquido o sumergido, en estado sólido y en estado semisólido.

1.7.1 Fermentación en estado sólido. Es aquella en la cual el sustrato se humedece con una delgada capa de agua, de tal manera que está no se encuentra en exceso, manteniéndose fibrosa en estado sólido.

Es el mejor método para la producción de proteínas biocatalíticas, las principales propiedades que presenta el sistema son las siguientes:

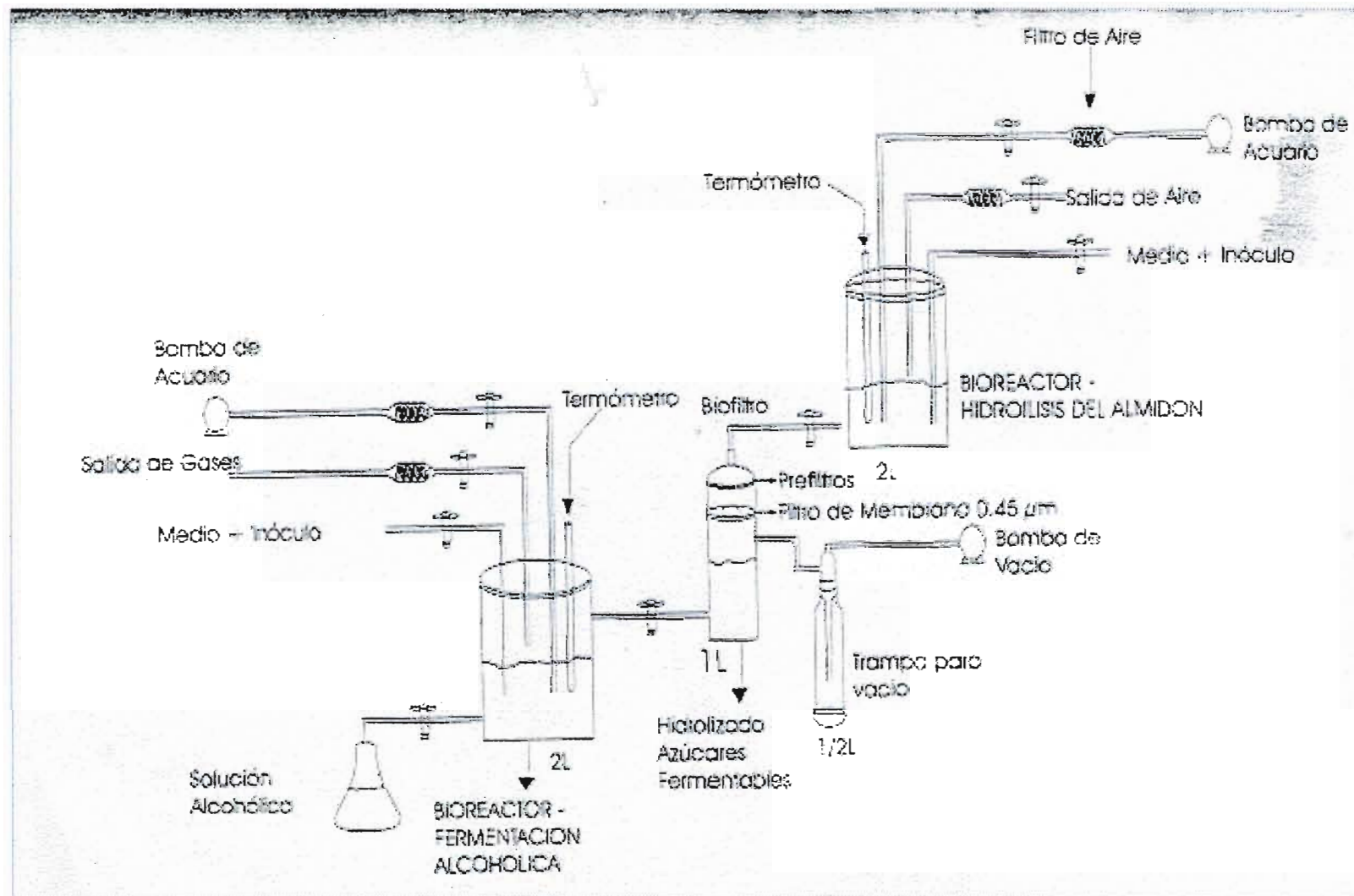


Figura 9. Sistema continuo de dos fases: Hidrólisis – Fermentación.

Javier Alonso Herrera Cuadros

Matriz sólida porosa o no porosa; esta puede consumirse durante el proceso de fermentación o puede servir de soporte para la multiplicación del microorganismo, el cual utiliza de la matriz solo aquello que él requiere.

La matriz debe contener agua para que suceda el proceso, la matriz y la actividad del agua permiten una relación de área por unidad de volumen bastante alta, permitiendo que se emitan vapores debido a los cambios de temperatura, lo cual ayuda a la multiplicación microbiana.

Presión de gases, los gases que se producen debido al metabolismo, permiten un buen intercambio de oxígeno cada vez que haya un volteo periódico con presiones relativamente bajas: el oxígeno puede penetrar más fácilmente.

Propiedades mecánicas; una matriz sólida permite que sea atacada por todas las partes expuestas.

La materia prima no debe contener sustancias que impidan el crecimiento microbiano, debe presentar facilidad de difusión de los elementos nutricionales, se debe reducir el tamaño de partícula para que haya mayor disponibilidad de área para que actúen los microorganismos, además debe ser sometida a análisis para determinar la ausencia de sustancias tóxicas.

1.7.1.1 *Ventajas de la fermentación sólida respecto a la fermentación líquida;*

- ▣ Facilita la aireación, mejor transferencia de oxígeno
- ▣ Disminuye el riesgo de contaminación bacteriana
- ▣ Las enzimas sintetizadas tienen mayor eficiencia, ya que no se diluyen
- ▣ El tratamiento de lixiviados es menor, por lo que los costos se reducen
- ▣ El producto se recupera fácilmente ya que no está diluido.

La principal desventaja, es que el tiempo de fermentación es mayor que en la de estado líquido. (61)

Frecuentemente no es posible utilizar la celulosa directamente como fuente de carbono, de forma que ha de ser hidrolizada primero química o enzimáticamente. El jarabe de azúcares formado de la hidrólisis de la celulosa ha sido utilizado para la fermentación de etanol, y también se está considerando la producción de butanol, acetona e isopropanol por fermentación.(6)

1.7.1.2 *Hidrólisis ácida. (Sacarificación).* Este procedimiento consiste en sacarificar un material celulósico a altas presiones y temperaturas en un medio acuoso con una baja concentración de ácido, aun cuando no hay datos experimentales publicados se producen directamente de melazas y mieles.

En este proceso se utilizan principalmente los ácidos Clorhídrico al 4%, el Sulfúrico al 72-75% y el fosfórico al 85%; y la temperatura que requiere este procedimiento oscila entre 200-240°C durante algunas horas dependiendo del ácido, esta metodología es altamente corrosiva y contaminante. En este tipo de tratamiento las principales variables además de la temperatura son:

- ☞ Tipo de material celulósico (composición)
- ☞ Tamaño de partícula (área de contacto)
- ☞ Concentración de material celulósico
- ☞ Concentración de ácido (generalmente H₂SO₄)
- ☞ Tiempo de hidrólisis.

El producto (azúcares fermentables), se emplea para producir edulcorantes, proteína unicelular, etanol y otros productos.(3, 31, 32, 33, 82, 85)

1.7.1.3 *Hidrólisis enzimática*. Esta alternativa se basa en la utilización de enzimas para que efectúen la hidrólisis de la celulosa. El proceso consiste en la producción de la celulasa, su purificación y su aplicación al desperdicio celulósico. Un tratamiento que consta de dos pasos: la glucosa que se forma se elimina rápidamente, puede ser por medio de filtración. La glucosa se empieza a formar aproximadamente a las 48 horas y el porcentaje obtenido es aproximadamente del 60%.(71)

La producción de celulasa se ha desarrollado alrededor del hongo *Trichoderma viride* y otras especies. Las condiciones de cultivo varían de acuerdo al microorganismo y al sustrato. En la mayor parte de los experimentos conocidos la celulasa se produce en “Batch”; la purificación de la enzima presenta algunos problemas y por ello en muchas ocasiones se utiliza de manera directa el caldo de fermentación el cual se adiciona directamente al residuo celulósico.

Para la hidrólisis enzimática es necesario emplear un sistema de recuperación de la enzima para establecer una recirculación de la enzima y de la celulosa no hidrolizada, los resultados que se obtienen son de aproximadamente del 80 al 90% de conversión, en 48 horas a un pH de 4.8 y temperatura de 50°C. Este procedimiento presenta la necesidad de un tratamiento preliminar para una mejor utilización del desperdicio celulósico. Los métodos de dicho tratamiento preliminar incluyen:

- 👑 Reducción de tamaño por diferentes procesos
- 👑 Tratamiento preliminar químico (álcali para remover lignina o ácido para producir azúcares)
- 👑 Oxidación por diferentes métodos
- 👑 Combinación de los anteriores.

El proceso de sacarificación por hidrólisis enzimática presenta ventajas tecnológicas y de operación en cuanto a que la temperatura y pH de operación son de bajo orden.

1.7.2 Fermentación en estado semisólido. Se refiere al crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos sin la presencia de agua libre; hay que aclarar que el cultivo semisólido es diferente a la fermentación de sustrato sólido, el cual se efectúa en suspensiones de alta concentración de sólidos. Este tipo de cultivo ha venido siendo utilizado en los países orientales para la producción de algunos alimentos fermentados a partir de soya, maní, yuca y arroz entre otros. Varios estudios han sido referenciados sobre la producción de celulasas, etanol y micotoxinas, la bioconversión de residuos lignocelulósicos, enriquecimiento proteico de yuca y mejoramiento de la calidad nutricional de alimentos fermentados.

En la mayoría de los procesos antes señalados intervienen enzimas extracelulares, las cuales pudieran obtenerse mediante operaciones sencillas de separación y secado. Debe entenderse que un sistema semisólido es más complejo que el sumergido en virtud de que la interrelación ambiente-sustrato-microorganismo tienen diversas limitaciones físicas y en consecuencia el sistema reaccionante presenta gradientes de pH, temperatura, humedad, etc., que afectan críticamente al sistema. Estas limitaciones físicas se acentúan en cultivos semisólidos estáticos.

Por lo general en los cultivos semisólidos el sustrato presenta forma granular y fibrosa, lo cual ayuda a mantener una porosidad adecuada que permite la difusión de oxígeno y cambios de temperatura en la zona de reacción, cuando el mezclado es posible las limitaciones físicas se reducen drásticamente.

Sin embargo, la transferencia de masa en el interior de la partícula continúa siendo, usualmente el paso limitante en cuanto a velocidad de crecimiento y asimilación de sustrato.

Cuando se compara un sistema semisólido con el sumergido, se observan marcadas ventajas en el primero en cuanto a energía requerida para mezclado y aireación, problema de contaminación, requerimiento de agua, complejidad del proceso y generación de efluentes orgánicos (Tabla 4)

Sin embargo el factor predominante es el económico, el cual suele depender de la capacidad de elaboración del producto en el sistema en cuestión.

Tabla 4. Características principales de cultivos semisólidos y sumergidos. (13)

CRITERIO	CULTIVO SEMISÓLIDO	CULTIVO SUMERGIDO
Espacio físico	Amplio	Poco
Mano de obra	Mucha	Poca
Energía para aireación	Baja	Alta
Energía para mezclado	Baja	Alta
Problema de contaminación	Poco	Alto
Agua requerida	Poca	Alta
Operaciones de recuperación de enzima	Varias	Varias
Tipo de proceso	-	-
Generación de aguas residuales	Sencillo	Complejo
Contaminantes *	Pocos	Alta

Los cultivos semisólidos se llevan a cabo en bandejas, lechos fijos, tambores rotatorios, etc.; en general el material se coloca en forma aséptica en las bandejas y se incuban a una temperatura apropiada. En lo que respecta al seguimiento directo del crecimiento del microorganismo, se presenta un inconveniente el cual se fundamenta en lo heterogéneo del sistema y evidentemente en lo difícil de tomar muestras; en efecto hay que tomar varias muestras de diferentes partes del fermentador y obtener así un promedio estadísticamente confiable; por lo general este sistema de muestreo hace engorrosa la operación.

Lo que se aconseja es trabajar con biorreactores pequeños e individuales y desmontar uno de ellos cada vez que se desee medir los parámetros como pH, conteo total, enzimas, proteínas, etc.

En particular no es fácil tomar muestras representativas para los ensayos analíticos, especialmente en el ámbito de laboratorio; es por ello que se ha propuesto medir el crecimiento usando una técnica indirecta, como es la determinación continua de dióxido de carbono presente en los gases efluentes del sistema de fermentación.

El dióxido de carbono proveniente de un sistema de cultivo puede detectarse mediante el uso de la técnica conductométrica, lo cual consiste en absorber el gas en cuestión sobre soluciones valoradas de hidróxido de sodio y determinar con el tiempo el cambio de conductancia.

Esta técnica ha servido para determinar la tasa específica de crecimiento de *Aspergillus niger* sobre harina de yuca granulada; técnicas similares a ésta han sido recomendadas para estudiar el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, sobre cultivo semisólido de arroz. (Cuadro 7)

En general, los extractos crudos de amilasas, proteasas, celulasas y pectinasas pueden obtenerse utilizando parcialmente este sistema de cultivo; los extractos crudos pueden ser luego purificados, utilizando las técnicas convencionales utilizadas para las enzimas obtenidas a través de los métodos sumergidos.

En este proceso se emplean las siguientes etapas:

- 👑 Acondicionamiento del sustrato
- 👑 Esterilización y/o pasteurización
- 👑 Inoculación
- 👑 Incubación

Cuadro 7. Producción de enzimas en cultivos semisólidos. (13)

ENZIMAS	MICROORGANISMOS	SUSTRATOS
Amiloglucosidasa	<i>Rhizopus</i> spp.	Salvado de trigo
Amilasas	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Arroz
Celulasas	<i>Trichoderma viride</i>	Salvado de trigo
Proteasas	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo
	<i>Aspergillus oryzae</i>	
Pectinasas	<i>Aspergillus soyae</i>	Salvado de trigo

👑 Extracción acuosa

👑 Filtración y Almacenamiento.

En algunos casos el sustrato fermentado se utiliza directamente sin la extracción de la enzima, como suele ocurrir en los procesos de producción de bebidas fermentadas a partir de materiales amiláceos. (13)

1.7.3 Fermentación directa. La otra alternativa de uso de desechos celulósicos es la de fermentarlos directamente con un microorganismo que tenga actividad celulolítica. Un proceso que utiliza bagazo, desarrollado en la Universidad de Louisiana, presenta características específicas de interés para los países productores de azúcar. El proceso emplea un cultivo mixto de una bacteria celulolítica, *Cellulomonas* spp y una levadura, donde se obtiene una proteína microbiana de alta calidad y no tóxica. Este proceso tiene la particularidad que requiere de un tratamiento químico previo a la fermentación, por el momento el tratamiento alcalino es el que da los mejores resultados. (36, 92)

1.7.4 Fermentación alcohólica. Proceso metabólico caracterizado por la degradación de los carbohidratos, aprovechamiento bioquímico que se realiza bajo condiciones controladas, se hace necesaria la acción de un microorganismo de características apropiadas para realizar el proceso. Los microorganismos van aumentando su concentración en el transcurso del proceso, al mismo tiempo que los residuos sólidos orgánicos se van modificando y se forman productos nuevos, como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas, procesos que ocurren simultáneamente. Cuando empiezan la reproducción de los microorganismos la temperatura aumenta rápidamente. ✓

Durante la fermentación suceden cambios de temperatura; la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* debe iniciarse entre 28-32°C y durante el proceso debe mantenerse entre 33-35°C como máximo ya que una temperatura superior puede causar inhibición en el proceso. La fermentación continúa hasta que la solución contiene un alto porcentaje de alcohol (12%), concentración en la cual la enzima se desnaturaliza y la fermentación se detiene.

Una de las fermentaciones industriales mejor conocidas y de mayor importancia es la que produce alcohol etílico, al actuar las levaduras sobre los azúcares. Pasteur demostró en 1857, que por cada 100 partes de sacarosa utilizada como fuente de carbono, éstas rendían 105.4 partes de azúcares invertidos, las que a su vez producían 51.1 partes de etanol, 49.4 partes de dióxido de carbono, 3.2 partes de glicerina, 0.7 partes de ácido succínico y 1.0 parte de otras sustancias orgánicas.

A partir de 1 mol de glucosa, se producen dos moles de piruvato; la producción de etanol puede re-oxidar las 2 moles de NADH que se producen en la reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa.



La producción de ATP proporciona energía para que se desarrollen y multipliquen las levaduras.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* actualmente se emplean para la producción de vinos, aguardientes, ron, cerveza y etanol propiamente. Todas estas cepas deben ser tolerantes a altas concentraciones de azúcares y poseer la capacidad de producir considerable cantidad de etanol, al cual deben ser relativamente resistentes en comparación con otros microorganismos.

En los países europeos se ha ido reemplazando a *Saccharomyces cerevisiae* por *Zymomonas mobilis* (bacilo Gram -, anoxigénico), para la producción de alcohol, donde se aprecia un aumento en la cantidad de producto obtenido y como consecuencia se disminuye la producción de desechos (vinazas).

1.7.4.1 *Bioquímica del proceso.* En el metabolismo de las hexosas, generalmente se conocen tres vías principales, las cuales se enuncian a continuación:

- ♪ Embden – Meyerhof – Parnas.(EMP)
- ♪ Warburg –Dickens. (HMP)
- ♪ Entner – Doudoroff. (ED)

La vía comúnmente empleada por los microorganismos es la de EMP, ya que la HMP (hexosa monofosfato), se toma básicamente para la obtención de precursores para la síntesis de la propia célula (*Leuconostoc spp*).

La de Entner Duoderoff esta limitada al género *Pseudomonas*, que convierte la glucosa en dos moléculas de piruvato que se introducen en el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. (75)

La transformación de la fuente de carbono en etanol, se realiza en condiciones anoxigénicas y es llevada a cabo a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas, cuyo esquema general se representa en la Figura 10.

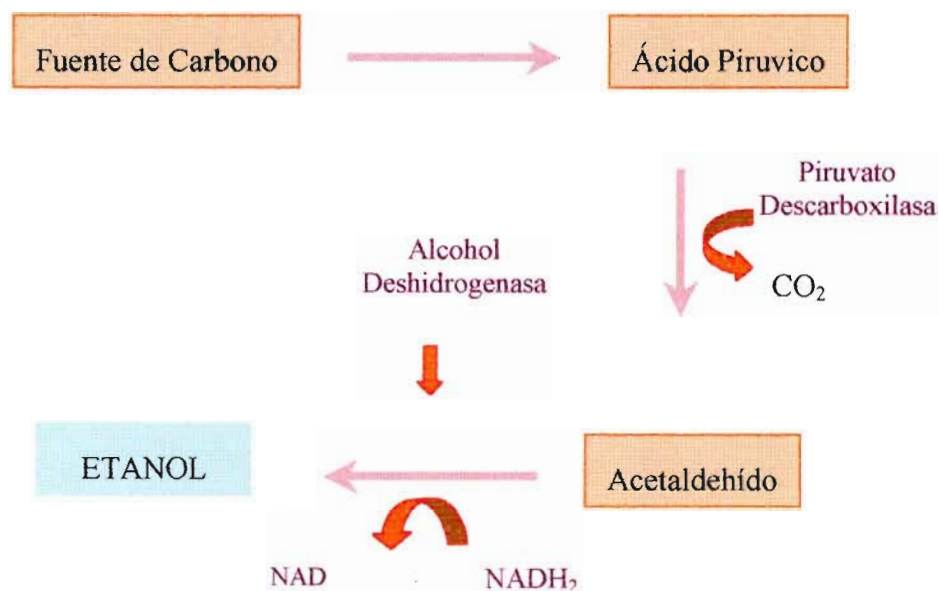


Figura 10. Transformación de la fuente de carbono en etanol, vía EMP. (28)

La elección de microorganismos para la fermentación etílica depende en cierta medida, del tipo de carbohidratos empleados como fuente de carbono. La producción de etanol a partir de almidones y otros materiales sacaroideos utiliza cepas selectas de *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de utilizar lactosa del suero de la leche, o algún producto lácteo desproteínizado se inocular *Candida pseudotropicalis*; si se emplea licor sulfítico la especie elegida es *Candida utilis*, debido a su capacidad para fermentar pentosas.

Los carbohidratos son tradicionalmente las fuentes de energía en las industrias de fermentación. Por razones económicas la glucosa o la sacarosa pura rara vez se utilizan como única fuente de carbono excepto en los procesos que exigen un control exacto de la fermentación. La melaza un subproducto de la producción de azúcar, es una de las fuentes más baratas de carbohidratos. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. Sin embargo, la composición de las melazas varía dependiendo de la materia prima utilizada para la producción de azúcar.

1.8 ALCOHOLES.

Son compuestos orgánicos que se derivan de los hidrocarburos por sustitución de uno o más átomos de hidrógeno (H), por el grupo hidroxilo (OH). Según el número de grupos OH, se dividen en mono, di ó polivalentes; también se pueden clasificar según la posición de los grupos OH en: Primarios, Secundarios y Terciarios. (Figura 11)

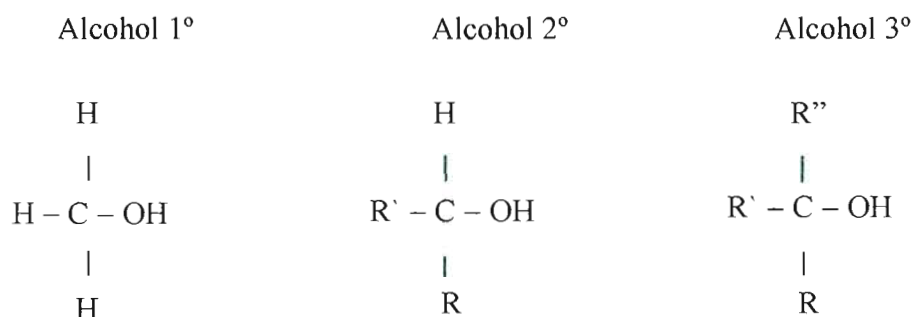


Figura 11. Representación esquemática de la estructura de los alcoholes. (28)

1.8.1 Obtención de alcohol. Se distinguen tres grupos de biomasa susceptibles de ser convertidos en alcohol y se puede seleccionar cualquier producto que contenga azúcares (carbohidratos) fácilmente fermentables:

- ✓ **Materias Celulósicas:** Pueden ser tratadas química o enzimáticamente, como: madera, bagazo de caña de azúcar, residuos de paja de trigo y de maíz, líquidos residuales de la producción de papel y pulpa de remolacha.
- ✓ **Materias Amiláceas:** Maíz, Cebada, Avena, Arroz, Centeno, Malta y Trigo; de tubérculos (bore, yuca y papa), y raíces por medio de hidrólisis ácida.
- ✓ **Materias Azucaradas:** Como los mostos y los jugos de algunas frutas (uvas, manzanas, peras y cerezas entre otras), remolacha y caña de azúcar, y como Sorgo azucarado, Algarrobo, Mandioca y melaza.

Cuando se trabaja con biomasa que contiene almidón, se suele someter ésta, además, a una cocción, con objeto de gelatinizarla, es decir, impregnarla bien de agua para obtener una masa homogénea.

La celulosa generalmente se trata con diversos agentes químicos (ácidos principalmente), o con enzimas que permiten solubilizarla y separarla de la lignina, sustancia no fermentable.

1.8.2 Reacciones de los alcoholes. Las reacciones de los alcoholes se pueden dar por la ruptura de los siguientes enlaces C---OH, remoción del grupo ...-OH, eliminación de ...-H.

✕ Ruptura de enlace C-OH:

- Reacciones con halogenuros de hidrógeno,
- Reacciones con trihalogenuros de fósforo,
- Deshidratación

✕ Ruptura de enlace RO-H

- Reacciones con metales activos
- Formación de esteres

- Oxidación.

Por oxidación los alcoholes primarios dan aldehídos y posteriormente ácidos carboxílicos: (Figura 12). Los alcoholes secundarios dan cetonas y ácidos con menor número de átomos de carbono o anhídrido carbónico. Por deshidratación en presencia de H_2SO_4 ó H_3PO_4 diluidos, los alcoholes se convierten en ésteres. Cuando se trabaja con ácido sulfúrico concentrado y en caliente, la deshidratación produce alquenos.

De 100 Kg de glucosa se obtienen 51,1 Kg de etanol y 48,9 Kg de dióxido de carbono. En la práctica, el rendimiento real en etanol es menor que el valor teórico, ya que aproximadamente un 5% de glucosa la utiliza el microorganismo para producir nuevas células y otros productos de su metabolismo.

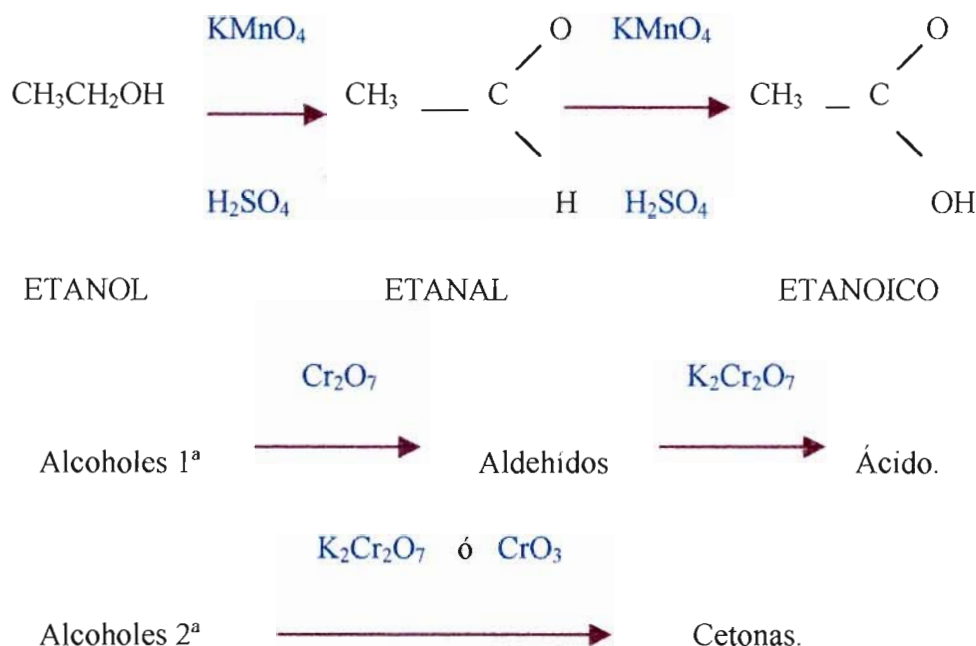


Figura 12. Principales reacciones de los alcoholes

1.8.3 Bioproducto. Es necesario tener en cuenta algunos aspectos en los referente al producto que va ha ser obtenido por medio de las transformaciones microbianas:

- g Utilidad comercial: El producto obtenido debe tener un uso, que satisfaga muchas necesidades.
- g Rentabilidad: El producto obtenido no debe superar los costos acarreados por métodos convencionales.
- g Protección ambiental: Este proceso no debe ser un foco secundario, adicional a la contaminación del medio ambiente.
- g Competencia: El valor comercial del bioproducto debe ser semejante al precio de los existentes en el mercado. (7)

1.8.3.1 *Etanol* (C_2H_5OH): El alcohol etílico es denominado el “Alcohol de granos”. Es el principal producto de la fermentación alcohólica, su extracción se hace por medio de destilación fraccionada de los mostos fermentados. Líquido incoloro, volátil, de olor penetrante y sabor picante. Es soluble en agua, en otros alcoholes, en éter, en benceno y muchos otros líquidos orgánicos a temperatura ambiente. (Figura 13)

1.8.3.1.1 Obtención de etanol. A continuación se enuncian algunas de las diferentes fuentes de obtención del etanol:

La obtención de alcohol a partir de compuestos azucarados se realiza por medio de microorganismos, los cuales requieren condiciones anoxigénicas para llevar a cabo dicho proceso. Los microorganismos más aplicados en el ámbito industrial son los siguientes: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida* spp, *Kloeckera* spp, *Torulopsis* spp, *Mucor* spp, y bacterias como *Zymomonas mobilis* entre otros. (64)

En el ámbito de los ingenios azucareros el alcohol se obtiene de melaza de caña de azúcar o melaza de remolacha, además utilizan algunas mezclas como miel más agua y miel más vinazas.

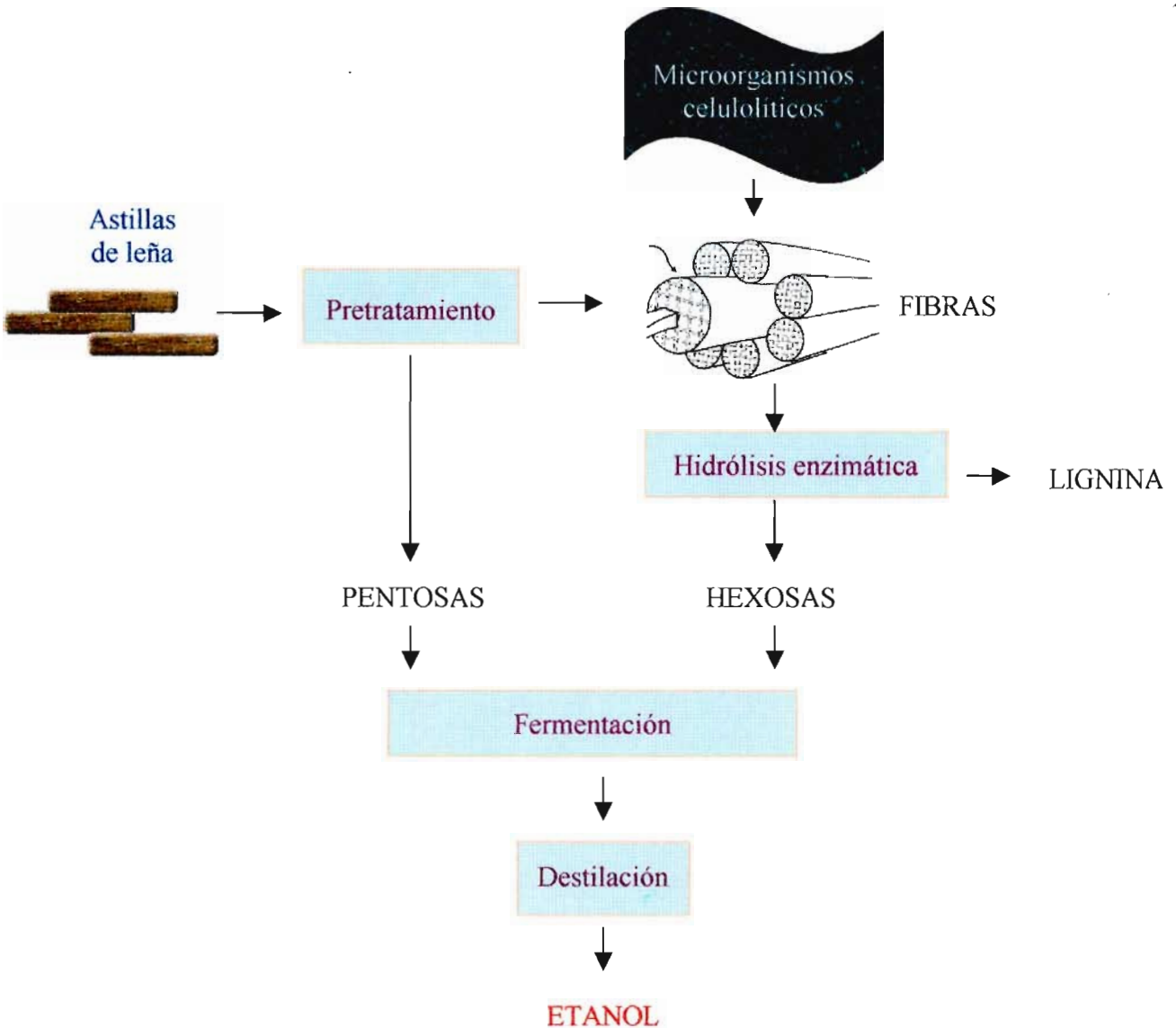


Figura 13. Producción de etanol a partir de lignocelulosa por medio de hidrólisis enzimática. (45)

Químicamente se puede obtener alcohol mediante la hidratación del etileno por medio del ácido sulfúrico, este proceso requiere ciertas condiciones de presión y temperatura relativamente altas, lo cual eleva los costos de producción y por esta razón no se utiliza comercialmente, ya que no es rentable.

También se puede obtener mediante la hidratación del acetileno, con un proceso adicional de hidrogenación del etanol. (12)

1.8.3.1.2 Importancia. La importancia de la producción de alcohol aumenta actualmente debido a la problemática en relación con los recursos renovables y al desarrollo de la industria química. La tecnología actual exige el empleo de ideas nuevas para lograr el máximo incremento de la eficiencia en la actividad productiva con la finalidad principal de disminuir los costos de producción.

La utilización de esquemas alternativos de producción permite el procesamiento de la caña para obtener junto con el azúcar, mayor cantidad de bagazo, mieles intermedias y jugos para fermentar en cantidades que están en dependencia de la demanda, como resultado de situaciones de mercadeo o de necesidades locales de estos subproductos y productos intermedios. Tradicionalmente el alcohol se ha utilizado en bebidas, industria farmacéutica, química y de alimentos.(22)

1.8.3.1.3 Aplicaciones. Se emplea en las bebidas fermentadas como cerveza, vinos, aguardientes y licores en general. En química farmacéutica se emplea para preparar las diluciones, las tinturas y como antiséptico, en la industria como combustible, disolvente, como extractor y anticongelante entre otros. Por sus propiedades de solvente se usa para hacer resinas y barnices; también se utiliza en la síntesis de éter etílico y de vinagre.

Los Romanos y los Griegos que utilizaban vinagre diluido como bebida refrescante, producían vinagre dejando el vino abierto al aire.

Los primeros vinagres fabricados industrialmente eran producidos en vasijas planas abiertas, los cuales eran procesos lentos, en los que flotaba una película de bacterias sobre la superficie del vino; entre estos microorganismos se destacan, *Gluconobacter* spp, el cual oxida el etanol ha ácido acético únicamente y *Acetobacter*, que oxida primero el etanol ha ácido acético y luego a CO₂ y H₂O.

La producción de ácido acético es una oxidación incompleta debido a que el poder reductor que se produce se transfiere al oxígeno. Actualmente se utiliza el sistema de fermentador sumergido. (6)

El Alcohol Etilico al 70%, es más eficiente como desinfectante, éstos destruyen todos los microorganismos excepto las endosporas; al 100% carece de acción germicida, éste actúa precipitando proteínas del germen exclusivamente en medio acuoso. También se usa como antiséptico profiláctico previo a la introducción de agujas, al combinarlo con antisépticos de otros grupos se potencia su acción germicida. (59)

A partir del etanol más acetaldehído se pueden producir aditivos oxigenados para combustibles de automotores, los cuales reducen la generación de humos, manteniendo el poder detonante del combustible y disminuyen la temperatura de autoencendido.

Algunos países de Europa utilizan mezclas de hidrocarburos con bencenos y alcohol etílico; hasta los primeros años de la década de los 70, había buen abastecimiento de este compuesto energético.

Desde 1.975 se establece un programa basado en la producción de alcohol etílico utilizando como materia prima desechos agrícolas. (96)

1.8.3.1.4 El etanol como combustible. El etanol tiene numerosas aplicaciones industriales, como disolvente y como combustible. Históricamente, el empleo del etanol como combustible de automóvil data de los años posteriores a la Primera Guerra Mundial, cuando en Inglaterra funcionaron automóviles con mezclas de gasolina y etanol. Posteriormente en 1935, Henry Ford fabricó un modelo de automóvil con un carburador adecuado para funcionar con etanol, gasolina o una mezcla de ambos. El alcohol se abandonó como combustible después de la Segunda Guerra Mundial, cuando el petróleo se convirtió en un producto abundante y barato.

Actualmente sin embargo, se vive precisamente una situación inversa (petróleo escaso y caro), con lo que se está convirtiendo en un hecho cada vez más importante plantearse de nuevo la posibilidad de utilizar alcohol como combustible. Así, en la actualidad son varios los países que están estudiando el empleo del etanol obtenido de la biomasa como combustible, bien como componente único, o como mezclas con gasolinas.

Para analizar las propiedades del etanol como sustituto total o parcial de la gasolina en su uso como combustible es necesario, conocer las propiedades de cada uno de estos productos y sus posibles interrelaciones en caso de mezcla. (Cuadro 8)

Los diversos estudios realizados hasta el momento respecto al uso como combustible del etanol muestran, en primer lugar, que el etanol y la gasolina no son combustibles intercambiables para un mismo vehículo.

Las modificaciones fundamentales que hay que hacer en un motor de gasolina que ha de trabajar con etanol se pueden resumir en los siguientes puntos:

- ☛ Aumento de la relación de compresión.
- ☛ Recalibrado del carburador.
- ☛ Calentamiento del aire que entra al carburador.
- ☛ Modificación del sistema de encendido.
- ☛ Uso de bujías especiales.

Realizando estos cambios (ya existen modelos Fiat y Volkswagen que utilizan exclusivamente etanol en sus motores), se ha logrado un incremento de la potencia del 15%, una mayor eficacia térmica (30%), menos emisiones de monóxido de carbono, pero a costa de un mayor consumo. (alrededor de un 20%)

Sin embargo la adición de etanol anhidro (10% en volumen), a la gasolina “Gasohol”, utilizando un motor convencional aumenta su capacidad antidetonante, lo que permite reducir la adición de componentes de plomo a la gasolina altamente contaminantes. Así mismo este hecho podría ahorrar el petróleo correspondiente al volumen de gasolina sustituido, más el correspondiente al combustible empleado en las refinerías para obtener gasolinas de un índice de octano más elevado.

Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas del etanol y la gasolina como combustible en motores de automóvil. (61)

PROPIEDAD	GASOLINA	ETANOL
Fórmula	C ₅ - C ₁₂	C ₂ H ₅ OH
Densidad (kg/l)	0,70 - 0,78	0,79
Solubilidad en agua a 20 °C (ppm)	240	infinita
Punto de ebullición (°C)	88	infinita
Relación estequiométrica aire / combustible	25 - 225	78,3
Índice de octano	95	106
Máxima compresión admisible	15:1	9:1
Poder calorífico (MJ / kg):		
Inferior	44	26,7
Superior	47,1	29,8
Calor latente de vaporización (kJ / kg)	348,8	920,9

1.8.3.1.5 Economía del etanol. El balance energético de los diversos procesos de obtención de etanol depende fundamentalmente del pretratamiento requerido para hacer el material fermentable.

El costo energético del pretratamiento depende a su vez, de la complejidad de la biomasa y es creciente en la secuencia: azúcares, almidón y celulosa.

La energía final requerida dependerá también de si se utiliza material combustible constituyente de la biomasa que se está tratando, como sustituto parcial de los aportes de energía de los combustibles fósiles que se han de emplear durante el proceso.

En este aspecto, el caso más conocido es del de Brasil, cuyo plan de sustitución de la gasolina por alcoholes se gestó como consecuencia de la crisis de 1973. La primera fase del programa se comenzó a desarrollar en 1975, pudiéndose decir actualmente que se continúa con perseverancia en el mismo. (Tabla 5)

El etanol en las gasolinas tiene como finalidad limpiar el aire, preservar el ambiente, apoyar la industria azucarera; estimular a los productores de caña de azúcar y sustituir gradualmente los combustibles fósiles por energéticos provenientes de materias renovables. Todo ello ha hecho que algunos países como Estados Unidos, Brasil, y Suecia ya han legislado sobre esta importante fuente energética alternativa a mediano plazo. (35, 53)

El uso del metanol, presenta algunos inconvenientes, ya que sus vapores son de carácter tóxico y presenta dificultad de mezclados con la gasolina.

Vehículos referidos como de “Combustible flexible” o de “Combustible variado”; tienen un sensor que identifica al combustible de tal manera que la computadora puede ajustar la máquina de acuerdo a esta condición. (35)

2

Tabla 5. Producción de etanol en Brasil. (61)

AÑO	PRODUCCIÓN (millones de litros / año)
1975	150
1978	2.500
1980	3.500
1982	5.500
1984	9.000
1986	10.000
1988	11.500
1990	11.500
1992	12.000
1994	12.500
1996	12.500

BIBLIOTECA UIS

2 DESARROLLO METODOLOGICO

Las etapas generales que se tuvieron en cuenta para la Bioobtención de alcohol a partir de residuos celulósicos de caña de azúcar, se describen en la Figura 14.

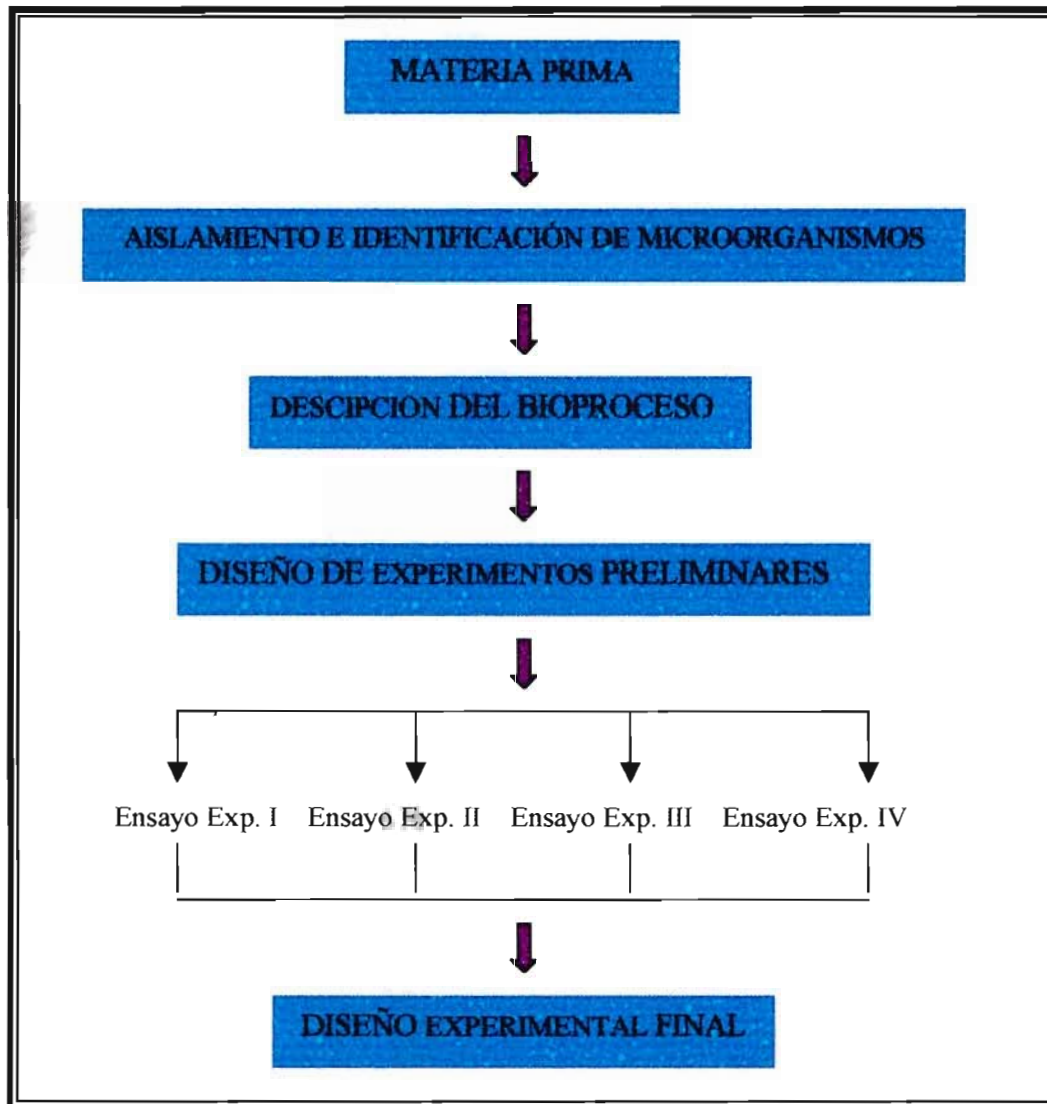


Figura 14. Etapas del proceso de Bioobtención de alcohol mediante residuos celulósicos.

La investigación se desarrolló en el CINBIN y contó con su apoyo y financiación.

2.1 MATERIA PRIMA

La materia prima que se utilizó para la biotransformación fue el bagazo de la caña de azúcar, el cual fue obtenido en los trapiches paneleros, ubicados en la vereda Guatiguara del Municipio de Piedecuesta.

2.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.

Se prepararon medios líquidos de Caldo Nutritivo para bacterias, a una concentración de 8 g/L y Caldo Malta para hongos, a una concentración de 17 g/L. Se llevaron al autoclave, luego se dejaron enfriar, cuando los medios de cultivo estuvieron a temperatura ambiente se les adiciona una muestra de sustrato, -bagazo de caña – con el fin de que proliferaran los microorganismos nativos, presentes en este sustrato.

Para realizar la identificación de los microorganismos que proliferaron en los medios de cultivo, se tuvieron en cuenta las características macroscópicas, tales como: aspecto, color, tamaño, consistencia y las características microscópicas como morfología y tamaño.

2.2.1 Propagación de microorganismos. Se prepararon medios de cultivo sólidos modificados con bagazo de caña, a los cuales se les adiciono la misma concentración de nutrientes además de Agar Agar, él cual le dió la consistencia al medio sólido. Transcurridas 72 horas se tomó una muestra de los medios líquidos y se repicó en medios sólidos. (Cajas de Petri)

Las cepas de microorganismos fueron sometidas a un proceso de adaptación al sustrato mediante siembras sucesivas en medios de cultivo modificados con bagazo de caña de azúcar.

2.2.2 Elección de los microorganismos. La elección apropiada de los microorganismos es importante para llevar un proceso a escala industrial, ya que existen numerosos microorganismos productores de alcohol. Sin embargo, algunos producen al mismo tiempo sustancias indeseables y otros presentan características inestables. Se desarrollaron ensayos preliminares con varios de los microorganismos aislados del sustrato, referenciados por una previa revisión bibliográfica.

2.2.3 Respuesta y adaptación a los medios de cultivo. Una vez crecidas las cepas en el medio de aislamiento, se tomaron las esporas con una asa de platino humedecida en medio estéril y a la llama del mechero se inocularon en la superficie de los cultivos líquidos, agitando a estos para favorecer la diseminación de las esporas; al mismo tiempo se inocularon también en medios de cultivo sólidos. (Figura 15)

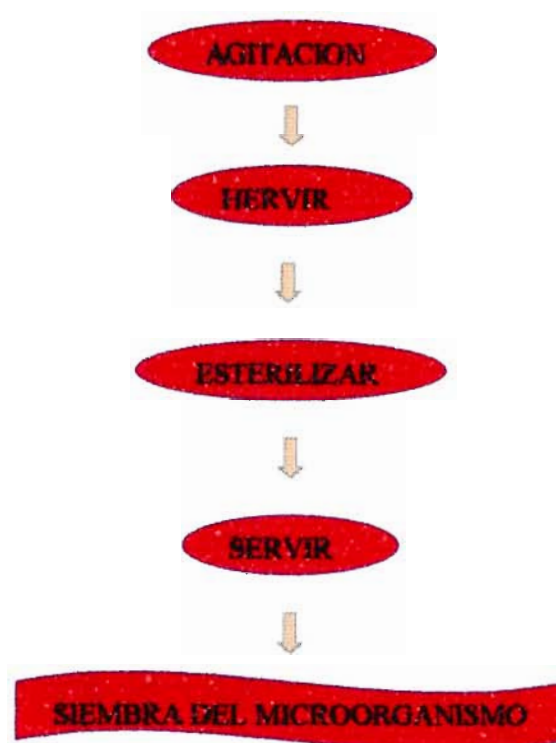


Figura 15. Etapas generales para la preparación de un medio de cultivo.

2.2.3.1 Selección del medio adecuado para *Trichoderma viride*. Se realizaron ensayos de algunos medios de cultivo sólidos para la propagación y mantenimiento de *Trichoderma viride*, variando la composición y el porcentaje de sus constituyentes, en las cepas que se repicaron se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- ☒ Adaptación y crecimiento del microorganismo.
- ☒ Color y aspecto del microorganismo.
- ☒ Dispersión por el medio de cultivo.
- ☒ Abundancia de la población.
- ☒ Nivel de contaminación de la cepa microbiana.

Los medios de adaptación utilizados en los ensayos fueron los siguientes:

2.2.3.1.1 AGAR MALTA

COMPONENTES DEL MEDIO	METODOLOGÍA
500 mL agua destilada	Se tomó un erlenmeyer, al cual se adicionaron 500 mL de agua destilada, se llevo a calentar a la estufa, cuando estuvo tibio se adicionó el Agar Malta agitándose constantemente, luego se adicionó el bagazo de caña y se espero hasta que hirviera y se llevo a esterilizar. Luego a temperatura entre 40 y 45°C se sirvió el medio en cajas de Petri.
24 g Agar Malta	
2.5 g bagazo de caña	

2.2.3.1.2 AGAR CEBADA:

COMPONENTES DEL MEDIO

450 mL agua destilada
50 mL jugo de cebada (30%)
9 g Agar Agar
2.5 g. bagazo de caña

METODOLOGÍA

Se tomó un erlenmeyer, al cual se adicionaron 450 mL de agua destilada, luego se agregaron 50 mL de un licuado de cebada más agua destilada y se llevó a calentar en la estufa, cuando estuvo tibio se adicionó el Agar Agar, este proceso se realizó agitando constantemente; luego se adicionó el bagazo de caña y se dejó en la estufa hasta que hirviera, luego se llevó a esterilizar. A continuación se sirvió en cajas de Petri, a temperatura aproximada de 45°C.

2.2.3.1.3 AGAR CEBADA + LACTOSUERO

COMPONENTES DEL MEDIO

400 mL agua destilada
50 mL jugo de cebada
50 mL lactosuero
9 g Agar Agar
2 g bagazo de caña

METODOLOGÍA

Se tomó un erlenmeyer, al cual se adicionaron 400 mL de agua destilada luego se agrego un licuado de cebada más lactosuero y se agitó constantemente, luego se llevó a calentar a la estufa, cuando estuvo tibio se adicionó Agar Agar; luego se adicionó el bagazo de caña y se dejó hasta que hirviera, para luego llevar a esterilizar. A continuación se vertió en cajas de Petri a una temperatura aproximada de 45°C.

2.2.3.1.4 AGAR AVENA

COMPONENTES DEL MEDIO

450 mL agua destilada
 50 mL jugo de avena (7%)
 9 g Agar Agar
 3 g bagazo de caña

METODOLOGÍA

Se tomó un erlenmeyer, al cual se le adicionaron 450 mL de agua destilada, luego se agregó un licuado de avena más agua destilada, se llevo a calentar en la estufa, agitando constantemente, cuando estuvo tibio se adicionó el Agar Agar, luego se agrego el bagazo de caña y se dejó hasta que hirviera, para llevarlo a esterilizar. Luego a temperatura entre 40 y 45°C se sirvió en cajas de Petri.

2.2.3.1.5 AGAR PAPA DEXTROSA

COMPONENTES DEL MEDIO

250 mL agua destilada
 250 mL filtrado de Papa
 9 g Agar Agar
 3 g bagazo de caña

METODOLOGÍA

Se tomó un erlenmeyer al cual se adicionaron 250 mL de agua destilada, luego se agregó un filtrado de papa con previa cocción se llevo a calentar en la estufa, cuando estuvo tibio se adicionó Agar Agar y agitando constantemente se adicionó el bagazo de caña y se dejó hasta que hirviera, luego se llevó a esterilizar. A continuación se vertió en cajas de Petri a una temperatura aproximada de 45°C.

2.2.3.2 Selección del medio adecuado para *Saccharomyces cerevisiae*. Se prepararon medios de cultivo líquidos y sólidos para observar en cual de ellos se presentaba mayor adaptación y mejor crecimiento del microorganismo.

2.2.3.2.1 **AGAR MALTA.** Para llevar a cabo el repique de los microorganismos, se utilizó un asa de punta redonda previamente esterilizada, la siembra se hizo por agotamiento lo cual permitió el buen desarrollo de colonias aisladas.

COMPONENTES DEL MEDIO

METODOLOGÍA

250 mL agua destilada

12 g Agar Malta

Se tomó un erlenmeyer, al cual se adicionaron 250 mL de agua destilada, luego se llevó a calentar a la estufa, cuando estuvo tibio se adicionó el Agar Malta agitando constantemente hasta que hirviera y luego se llevó a esterilizar en autoclave.

2.2.3.2.2 **MEDIO + EXTRACTO DE LEVADURA**

COMPONENTES DEL MEDIO

METODOLOGÍA

200 mL agua destilada

2 g Extracto de levadura

Se tomó un recipiente de vidrio (botella con tapa), se adicionó el extracto de levadura más el agua esterilizada y se agitó muy bien hasta disolver completamente la mezcla, se selló y se llevó a esterilizar en autoclave. Cuando el medio estuvo a temperatura ambiente se inocularon las levaduras.

2.2.3.2.3 **MEDIO + GLUCOSA**

COMPONENTES DEL MEDIO

200 mL agua destilada

4 g glucosa

METODOLOGÍA

Se tomó un recipiente de vidrio (botella con tapa), con 200 mL de agua destilada, se adicionó la glucosa agitando en forma constante hasta disolverla completamente; luego se selló y se llevó a esterizar en autoclave. Se inocularon las levaduras cuando el medio estuvo a temperatura ambiente.

2.2.3.2.4 **MEDIO + MELAZA**

COMPONENTES DEL MEDIO

200 mL agua destilada

10 g melaza (5%)

METODOLOGÍA

Se tomó un recipiente de vidrio (botella con tapa), al cual se agregó 200 mL de agua destilada más melaza; se agitó muy bien hasta que se disolvió completamente la melaza, se selló y luego se llevó a esterilizar en autoclave.

Cada uno de los medios anteriormente mencionados, también se prepararon en forma de medios sólidos, adicionando la concentración determinada de Agar Agar con respecto al volumen para que tomaran consistencia.

2.2.4 Mantenimiento de cepas. Se hicieron siembras sucesivas de cada uno de los microorganismos en los medios modificados con bagazo de caña. Los medios que se tuvieron en cuenta fueron aquellos que le brindaron al microorganismo las mejores condiciones para su desarrollo y mantenimiento.

De cada una de las cepas obtenidas se realizaron repiques periódicos, con el objeto de mantener cultivos frescos para la realización de cada uno de los ensayos experimentales que hicieron parte del proceso.

2.2.5 Adaptación de cepas. Para la realización de cada uno de los ensayos experimentales los microorganismos se sembraron en medios, en los cuales el porcentaje de nutrientes era menor en comparación con los medios de mantenimiento. De esta manera el microorganismo se estimula para que sintetice celulasas, en medios que contienen los inductores enzimáticos.

2.3 DESCRIPCIÓN DEL BIOPROCESO.

Las etapas que se tuvieron en cuenta para la obtención de alcohol a partir de residuos celulósicos se describen en la Figura 16.

2.3.1 Pretratamiento de la materia prima. El bagazo fresco residuo de los trapiches paneleros aun contiene un alto contenido de glucosa, este bagazo se desmenuzó y luego se cortó en trozos pequeños, con el objeto de reducir el tamaño de partícula y aumentar el área de superficie expuesta a la acción de los microorganismos. Luego se le adicionó agua destilada y se licuó para agregarlo a los biorreactores, estos se llevaron a pasteurizar en estufa a una temperatura de 80°C durante 4 días, con el fin de inhibir la microbiota nativa la cual podrá interferir durante el proceso.

2.3.2 Fisiología de los microorganismos. El objetivo de los experimentos preliminares fue determinar las condiciones más favorables para el desarrollo de los microorganismos sobre el bagazo de caña de azúcar pretratado y el lixiviado obtenido a través del filtrado producto de la hidrólisis enzimática respectivamente.

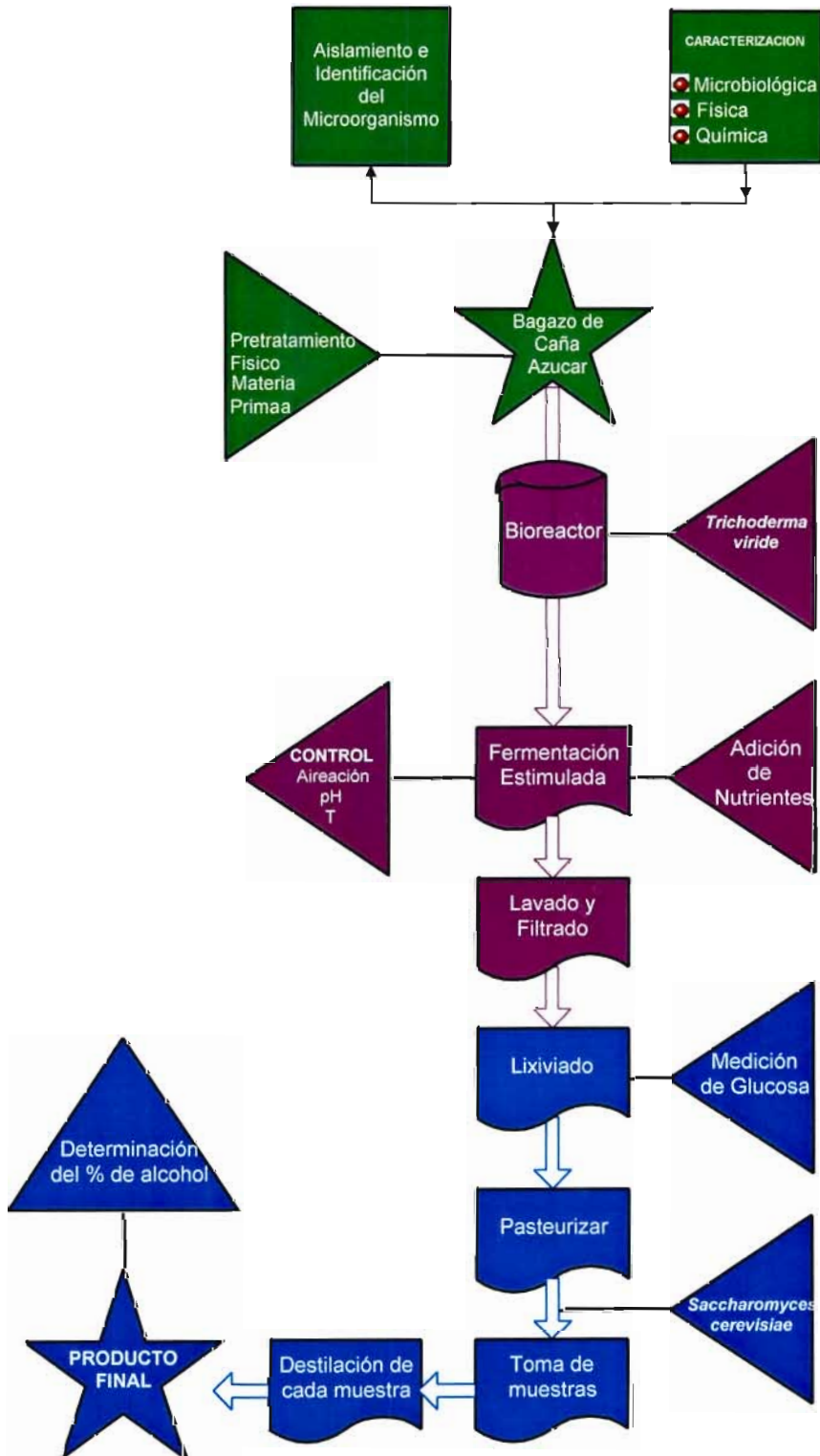


Fig. 16 Diagrama general del bioproceso experimental

2.3.2.1 *Determinación de la concentración de microorganismos.* El conteo de microorganismos se realizó mediante diluciones sucesivas de la muestra, Se llevaron a esterilizar frascos de vidrio que contenían 9 ml de solución salina al 0.85%; después de transcurrido el tiempo de incubación de la solución madre (previamente inoculada con microorganismos), ésta se agitó muy bien para obtener una solución homogénea, de la cual se tomó una alícuota de 1 ml, el cual se llevó a uno de los frascos que contienen 9 ml de solución salina. Este frasco se agitó muy bien para tomar nuevamente una alícuota de 1 ml y así sucesivamente hasta obtener una muestra bien diluida, cada uno de estos pasos se llevó a cabo con una pipeta previamente esterilizada en cada dilución.

Luego por medio de una pipeta Pasteur estéril, se tomó una muestra de cada una de las últimas diluciones y se adicionó sobre la cámara de Neubauer, se llevó al microscopio donde se realizó el conteo de las células, de arriba hacia abajo en cada uno de los 4 cuadrantes.

$$\#Cél/mL \approx \frac{\#células \times 10 \times 10^3 \times dilución}{4} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.3.2.2 *Determinación del crecimiento de *Trichoderma viride*, con y sin aireación.* Se realizaron dos montajes para determinar el mayor crecimiento en biomasa del microorganismo, los dos medios de cultivo líquido presentaban las mismas concentraciones de nutrientes melaza al 2% y nitrato de amonio al 1% en un volumen de 200 mL, a cada uno de estos medios se les inoculó la misma concentración de microorganismos; el experimento se realizó variando los tratamientos uno con aireación y el otro sin aireación. Se dejó en incubación durante 7 días y luego se llevó a cabo la determinación del crecimiento del microorganismo teniendo en cuenta la adaptación sobre el sustrato y la cantidad de biomasa obtenida mediante la determinación del peso seco.

2.3.2.3 Determinación del crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de nutrientes. A un volumen de 100 mL de solución salina se le adicionó una concentración de microorganismos, por medio del raspado con una asa metálica a una caja de cultivo, esta solución preinóculo se llevó a incubar a temperatura ambiente durante 48 horas. Se prepararon 100 mL de solución de medio variando la concentración de los nutrientes así: Melaza al 1% más nitrato de amonio al 1%; melaza al 1% más nitrato de amonio al 2%; melaza al 2% más nitrato de amonio al 1% y melaza al 3% más nitrato de amonio al 3%.

Transcurridas 48 horas se adicionaron 5 mL de la solución preinóculo a cada uno de los medios, a una concentración de 6.375×10^8 células / mL.

Luego de 48 horas adicionales se filtraron a través de gasa cada una de las muestras, se midió el pH, después se lavaron y se tomó el peso de la muestra húmeda, luego se introdujo cada una de las muestras en bolsas de papel aluminio previamente pesadas, para luego someterlas a un proceso de secado en horno a temperatura aproximada de 110°C, se tomó el peso de las muestras cada 12 horas hasta obtener un peso constante. (Figura 17)

2.3.2.4 *Determinación de la concentración de glucosa.* Para la determinación de la concentración de glucosa se tomó una muestra de 2 gramos del bagazo de caña de azúcar en tratamiento, al cual se le adicionaron 2 mL de agua destilada, después se llevó al baño maría en un termostato a 65 °C, durante 10, 15, y 30 minutos, por triplicado. Posteriormente cada una de estas mezclas fue centrifugada a 5.500 r.p.m durante 5 minutos.

Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de un volumen determinado, para obtener la concentración de glucosa mediante el método GOD / POD, el cual se define a continuación:

Principio. La glucosa se transforma por la glucosa oxidasa (GOD), en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa (POD), oxida al cromógeno 4-aminofenazona / fenol convirtiéndolo en un compuesto de color rojo.

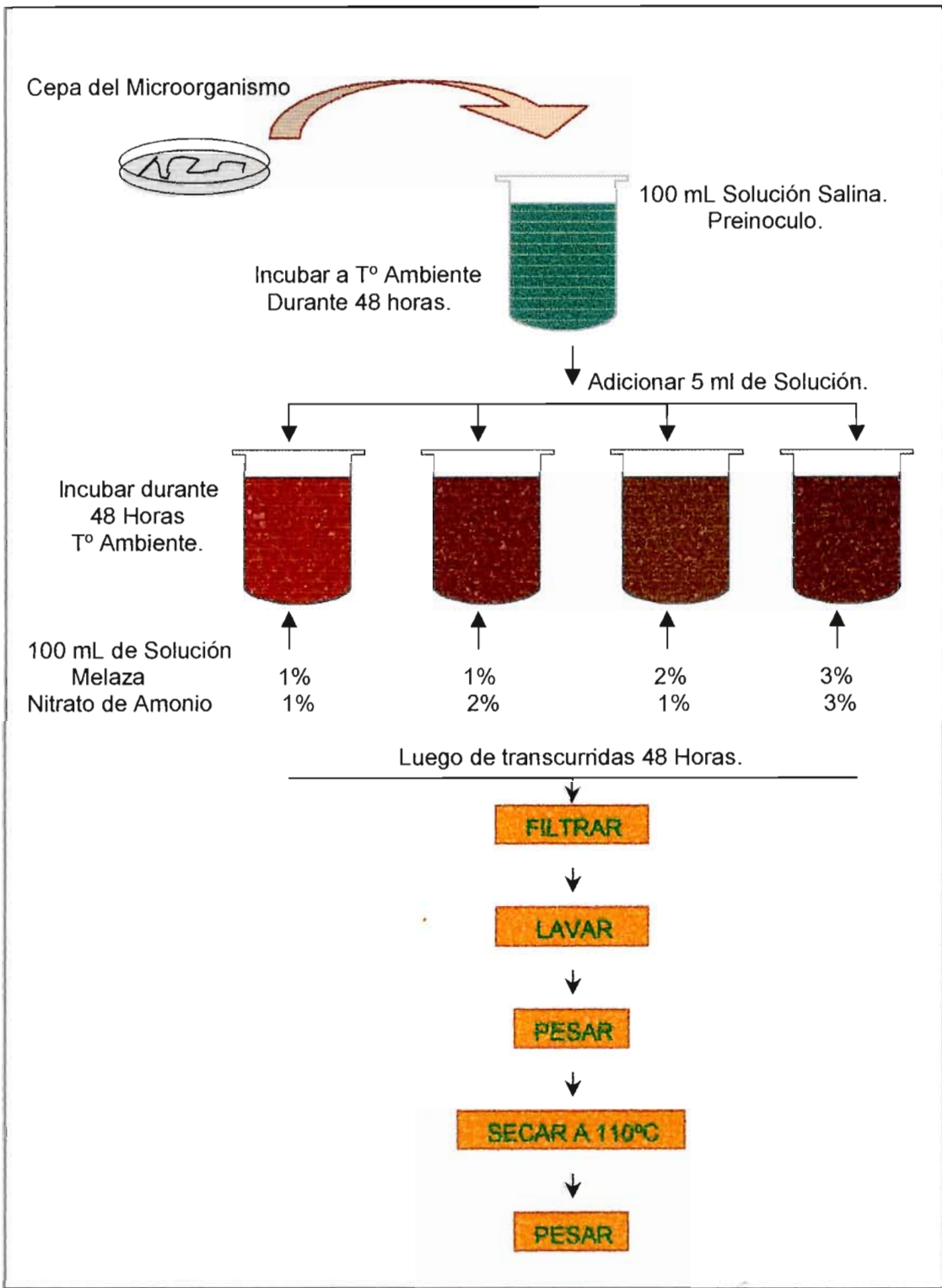


Figura 17. Determinación del crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de nutrientes

Cuadro 9. Preparación de la muestra para la medición de glucosa.

	Blanco	Patrón	Muestra
Muestra	---	---	10λ
Patrón	---	10λ	--
Reactivo	1 mL	1 mL	1 mL

Mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos o dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego leer al espectrofotómetro la absorbancia de la muestra y del patrón frente al blanco a una longitud de onda de 505 nanómetros. Donde se tuvo en cuenta que 1λ equivale a 1μL-. Para realizar los cálculos se tuvo en cuenta la Ecuación 2.

$$\frac{A_{MUESTRA}}{A_{PATRON}} \times \begin{cases} 100 = \text{Glucosa mg/dL} \\ 5.55 = \text{Glucosa mmol/dL} \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

2.3.2.5 Determinación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, variando la fuente de carbono. Se prepararon 200 mL de solución de glucosa al 5% más urea al 0.1%, al mismo tiempo se acondicionaron 200 mL de solución de melaza al 4% más urea al 0.1%, estos medios se llevaron a esterilizar y a cada uno de ellos se adicionó una solución previamente inoculada con levaduras a la misma concentración. Se procedió a instalar un sistema de aireación por medio de bombas de acuario y se dejó a temperatura ambiente durante 72 horas, luego se hizo conteo de microorganismos utilizando la cámara de Neubauer.

2.3.2.6 *Determinación de la concentración de etanol.* Algunos de los métodos más utilizados para determinar la concentración de etanol son los siguientes: determinación mediante gravedad específica, cromatografía de gases, espectroscopia de absorción atómica y un método muy exacto con la enzima alcohol deshidrogenasa. A continuación se describe la metodología aplicada en este trabajo de investigación.

La concentración de etanol fue determinada mediante el método de gravedad específica por picnómetro, de acuerdo a la metodología de la A.O.A.C. 9.012/80 (107). Su fundamento es determinar el peso del volumen de la solución en tratamiento, previamente destilada, tomando como referencia el peso del volumen de agua destilada, hallando así el peso específico de la muestra. (densidad a 25°C y a presión atmosférica)

Una vez calculada la densidad de cada una de las muestras es relacionada con el gradiente de temperatura existente entre el ambiente y el medio interno de la muestra, para de esta manera determinar cuantitativamente la concentración de la muestra analizada, en el caso particular la de etanol. La relación de dichas temperaturas con la densidad de la muestra se encuentran referenciadas en tablas del cálculo del grado de alcohol, tabla 52.003 de la A.O.A.C. (107)

En seguida se detalla el procedimiento aplicado para la obtención del valor de densidad de la solución en tratamiento.

Se tomó una muestra de solución en tratamiento de 100 mL, obtenida del biorreactor de fermentación, esta fue sometida a un proceso de destilación, obteniendo un volumen final de solución destilada entre 15 y 25 mL, de la cual se tomó una alícuota que se depositó en un picnómetro.

Con el fin de determinar la densidad de la solución en tratamiento se realizó la razón entre su peso y el peso del agua destilada, así:

1. Peso del picnómetro vacío.
2. Peso del picnómetro más agua destilada.

3. Peso del picnómetro más la solución en tratamiento.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la Ecuación 3, donde la masa y el peso de la solución en tratamiento y del agua destilada son iguales, debido en primer lugar a que la densidad del agua destilada se toma igual a la unidad, y en segundo lugar a que esta ecuación es independiente de la aceleración de la gravedad:

$$\rho_{MUESTRA} \approx \frac{W_{MUESTRA}}{W_{AGUA}} \quad \text{Ecuación 3}$$

2 – 1 = Peso del agua destilada. (W_{AGUA})

3 – 1 = Peso de la solución en tratamiento. ($W_{MUESTRA}$)

El porcentaje de alcohol en el filtrado del biorreactor de fermentación, se calculó a partir de los datos de densidad del volumen obtenido durante la destilación, mediante la Ecuación 4.

$$C_i \dots \approx \frac{V_F \times C_F}{V_i} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde = C_i : Concentración inicial de alcohol en el filtrado obtenido.

C_F : Concentración de alcohol en el volumen de destilado obtenido.

V_i : Volumen de filtrado llevado a destilar. (100 mL)

V_F : Volumen de destilado obtenido. (mL)

2.3.3 Cinética de crecimiento de *Trichoderma viride*. Se planteó realizar la determinación del crecimiento y desarrollo del microorganismo durante un periodo de 10 días. Luego se procedió a colocar un biorreactor por cada día, cada biorreactor con un volumen de 200 mL a una concentración de nitrato de amonio al 1%, más avena al 5% y se agregaron 5 gramos de bagazo, estos biorreactores se llevaron a esterilizar.

Luego se adicionó a cada uno de los biorreactores un volumen de 10 mL de una solución previamente inoculada con microorganismos. Se descarto un biorreactor por día para llevar a cabo la toma de muestras, cada una de ellas se filtraron, luego se lavaron y se llevaron a secar al horno a una temperatura de 110°C aproximadamente, hasta obtener un peso constante. El montaje se trabajó por duplicado. (Figura 18)

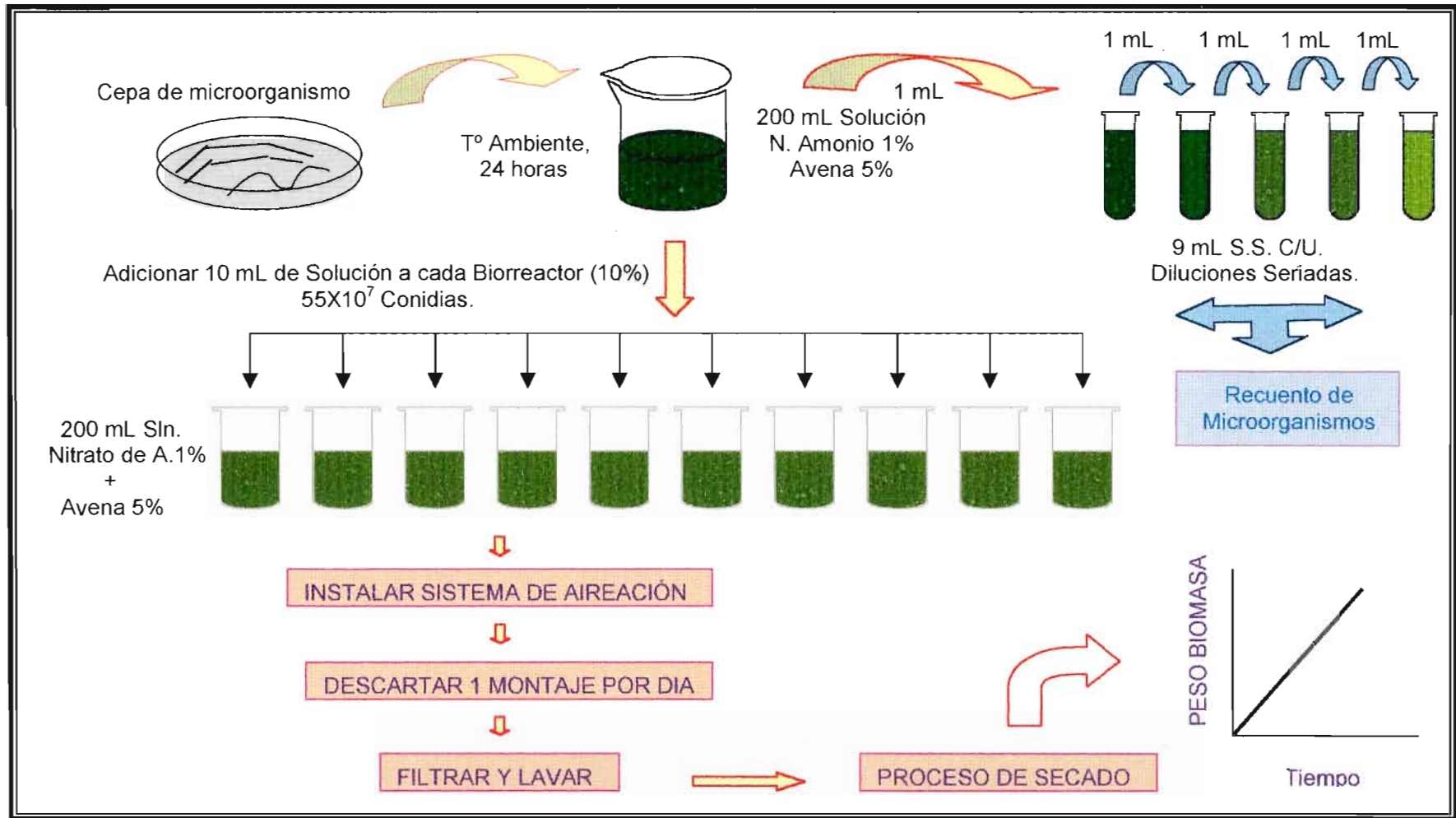


Figura 18. Cinética de Crecimiento *Trichoderma viride*.

2.4 ENSAYO EXPERIMENTAL I

Adaptación de *Trichoderma viride* sobre bagazo de caña de azúcar.

2.4.1 Fase de Hidrólisis. Se preparó una solución de 600 mL de agua destilada con infusión de Avena al 3% más Nitrato de Amonio al 1%, este medio se llevó a esterilizar en el autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos. Luego a temperatura ambiente mediante el raspado con asa metálica de punta redonda estéril a 3 cajas de medio de cultivo de *Trichoderma viride* se realizó la inoculación al medio líquido, el cual se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 48 horas.



Figura 19. Biorreactores utilizados para la adaptación de *Trichoderma viride*.

Se pesaron las siguientes cantidades de sustrato 10, 20, 40 y 50 gramos de bagazo de caña de azúcar, estas cantidades se adicionaron independientemente en 2 frascos de vidrio con capacidad de 3L y 2 frascos de vidrio con capacidad de 1L respectivamente. (Estos fueron los biorreactores en el laboratorio)

Con previo conteo de microorganismos se adicionó la solución de preinóculo en un volumen de 100 mL, en los biorreactores pequeños y 200 mL en los biorreactores grandes.

Transcurridos 15 días se adicionó a cada uno de los biorreactores un volumen de 200 mL de agua destilada tibia, (aproximadamente 50°C) y se obtuvo un filtrado del cual se tomó un volumen de 2 mL para determinar la concentración de glucosa. El volumen restante del filtrado aun contenía un gran número de conidias, este se llevó a centrifugar y la concentración obtenida se adicionó a otros montajes paralelos.

2.5 ENSAYO EXPERIMENTAL II

Influencia del oxígeno en el crecimiento de *Trichoderma viride*.

2.5.1 Fase de Hidrólisis. En una cubeta plástica se depositaron 400 gramos de bagazo de caña de azúcar, los cuales se humedecieron con una solución de agua destilada más nitrato de amonio al 1%, luego se añadieron nutrientes en una solución de nitrato de amonio al 1% más melaza al 4%, solución previamente inoculada con el microorganismo, se mezcló todo muy bien, finalmente este montaje se cubrió con gasa más algodón y se introdujo en una bolsa plástica.

Transcurridos 2 días se instaló a este montaje un sistema de aireación por medio de bombas de acuario, cada 4 días periódicamente se adicionó una solución de nutrientes previamente inoculada con *Trichoderma viride*.



Figura 20. Influencia del oxígeno sobre la adaptación de *Trichoderma viride*.

2.5.2 Fase de fermentación. Se tomaron 50 gramos de bagazo de caña de azúcar en tratamiento, a los cuales se le adicionó un volumen de 100 ml de agua destilada tibia, este proceso se realizó aproximadamente cada 12 días para la medición de glucosa formada. Para el último muestreo se tomaron 200 gramos de sustrato y se adicionaron 400 ml de agua destilada tibia, se agitó muy bien hasta homogenizar esta mezcla, luego se filtró a través de gasa y se obtuvo un lixiviado, del cual se tomó una alícuota para determinar la concentración de glucosa. El filtrado sobrante fue pasteurizado en el termostato durante 15 minutos a 80°C.

Se realizó un conteo de levaduras de la solución de preinoculo, (previamente preparada) y cuando el filtrado estuvo a temperatura ambiente se le inocularon levaduras en solución, en un volumen del 10% respecto del volumen total del filtrado.

Transcurridas 48 horas se tomaron muestras de 100 ml cada 24 horas y cada una de estas muestras se llevó a destilar.

2.6 ENSAYO EXPERIMENTAL III.

Determinación del crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de microorganismos y la concentración de nutrientes. (Diseño Experimental.)

2.6.1 Fase de hidrólisis. Se procedió a licuar bagazo de caña de azúcar con agua destilada, con el objetivo de reducir el tamaño de partícula, quedando mayor superficie expuesta para la acción del microorganismo, luego se realizó un montaje tomando como base el siguiente diseño experimental 2^o. Cada tratamiento contiene 100 gramos de bagazo de caña de azúcar molido, estos se depositaron en cubetas que se cubrieron luego con plásticos de color negro.

Diseño Experimental 2^o X_1 = Concentración de microorganismos, Número de conidias

X_2 = Concentración de nutrientes, melaza / Nitrato de amonio.

Cuadro 10. Diseño experimental para la fase de hidrólisis.

TRATAMIENTO	NUMERO DE CONIDIAS	[%C/N]
1	1.15×10^8	1 - 2
2	4.9×10^6	1 - 2
3	1.15×10^8	2 - 1
4	4.9×10^6	2 - 1
5	1.15×10^7	1 - 1
6	1.15×10^7	3 - 3
7	AGUA DESTILADA	
8	----	----

Los tratamientos 5 y 6 se tomaron como los ensayos control, luego los valores que se tuvieron en cuenta son intermedios a los propuestos en los tratamientos iniciales.

Los tratamientos 7 y 8, se tomaron como otros controles, a uno de los cuales se le adiciono únicamente agua destilada y al otro no se le hizo adición de nutrientes, ni tampoco se hizo adición de microorganismos, respectivamente.

Se prepararon soluciones de nutrientes con diferentes concentraciones así: 500 mL de solución de melaza al 2% más nitrato de amonio al 1%; 500 mL de solución de melaza al 1% más nitrato de amonio al 2%; 200 mL de solución de melaza al 1% más nitrato de amonio al 1%; 200 mL de solución de melaza al 3% más nitrato de amonio al 3%; 250 mL de agua destilada y 200 mL de solución salina al 0.85%. Estas soluciones se prepararon con el objetivo de adicionar nutrientes cada 2 días, a cada uno de los tratamientos anteriormente mencionados.



Figura 21. Reducción del tamaño de partícula del sustrato.

2.6.2 Fase de fermentación. Transcurridos aproximadamente 35 días se procedió a realizar filtrados a través gasa; con el fin de retener esporas, hifas, además de astillas de bagazo. De este filtrado se tomó una alícuota para determinar la concentración de glucosa. El resto del filtrado se pasteurizó a 80°C durante 15 minutos, se hizo conteo de levaduras del medio líquido; luego a temperatura ambiente se inoculo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se tomaron muestras de 100 mL de cada uno de los tratamientos a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente. A cada una de las muestras que se tomaron, se les realizó un proceso de destilación, para finalmente determinar el porcentaje de alcohol, por medio del olor y luego fue verificado mediante el método de gravedad específica por picnómetro cuyos datos son referenciados en las tablas de cálculo del grado de alcohol.

2.7 ENSAYO EXPERIMENTAL IV.

Influencia que ejerce la variación del sustrato en estado fermentado y no fermentado.

2.7.1 Fase de hidrólisis. Se procedió a licuar bagazo de caña de azúcar con agua destilada, este se adicionó en una ponchera y se cubrió con plástico, luego se dejaron transcurrir 48 horas y se tomó una muestra de sustrato.

Se realizó nuevamente el procedimiento anterior utilizando bagazo de caña fresco **A** y el sustrato fermentado **B**, se realizó el siguiente procedimiento:

Se tomaron muestras de 300 gramos de sustrato **A** y se adicionaron en 3 biorreactores (frascos de vidrio con capacidad de 3000 mL), y en otros 2 biorreactores se adicionaron 300 gramos del sustrato **B**, luego se llevaron a esterilizar en una incubadora a 70°C con una humedad relativa entre 80-90, durante 72 horas.

Se preparó Agar Avena, constituido por 12 gramos de Avena, 4 gramos de Agar Agar, 250 mL de agua destilada y 2 gramos de urea, se procedió a hacer siembras del microorganismo en este medio de cultivo.

Se preparó una solución de 200 mL con urea al 1% más extracto de malta al 1.5%, se llevo a esterilizar y luego a temperatura ambiente se inoculó *Trichoderma viride*, esta fue la solución de preinóculo, se dejó en incubación durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo se tomaron 2 frascos con sustrato **A** y los otros 2 frascos de sustrato **B** y se les adicionaron 50 mL de solución de preinóculo, se procedió a rotular cada uno de los biorreactores de la siguiente forma:

A₁ A₂ B₁ B₂

El biorreactor restante se inoculó con otra solución de preinóculo, que contenía conidias suspendidas de *Trichoderma harzianum*, en solución de urea al 1% A₃.

Se procedió a instalar a cada uno de los biorreactores un sistema de aireación por medio de bombas de acuario. Luego se tomaron muestras del sustrato en cada uno de los biorreactores:

- ☞ Para medir pH (en relación 2:2, gramos de sustrato y mL de agua destilada respectivamente)
- ☞ La concentración de glucosa (3 muestras en relación 1:1, se llevaron a temperatura de 68°C, en tiempos de 15, 20 y 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 5.500 r.p.m., durante 5 minutos; se tomó muestra del sobrenadante para llevar a cabo la determinación de la glucosa.)

Se extrajo el lixiviado que se fue formando en cada biorreactor, este se llevó a pasteurizar a 68°C durante 20 minutos y luego se llevó a punto de congelación en el refrigerador.

Se adicionaron 400 mL de agua destilada a temperatura aproximada de 50°C a cada uno de los 5 biorreactores, estas muestras se filtraron a través de gasa haciendo presión para sustraer todo el líquido posible, se extrajo una muestra de cada uno de los tratamientos para medir el pH y la concentración de glucosa.

Luego se halló la diferencia entre el peso del bagazo inicial y el peso final del sustrato en tratamiento.

Adicionalmente se agregaron los lixiviados refrigerados a cada uno de los filtrados obtenidos respectivamente, luego se llevaron a pasteurizar a 67°C, durante 20 minutos. (Figura 22)

2.7.2 Fase de fermentación. Se prepararon soluciones con 250 mL de agua destilada más 12 gramos de Agar Malta y se llevaron a esterilizar, luego se realizaron siembras continuas de la levadura. Se preparó una solución preinóculo de melaza al 4% más urea al 0.1%. Esta se llevó a esterilizar y luego se inoculó con levadura, adicionalmente se instaló el sistema de aireación y transcurridas 48 horas se realizó un conteo de microorganismos.

A continuación se adicionó a cada uno de los filtrados previamente pasteurizados, esta solución de levaduras suspendidas en un porcentaje del 10% del volumen total.

Se tomaron muestras de 100 mL a las 48 y 72 horas, luego se les realizó un proceso de destilación.

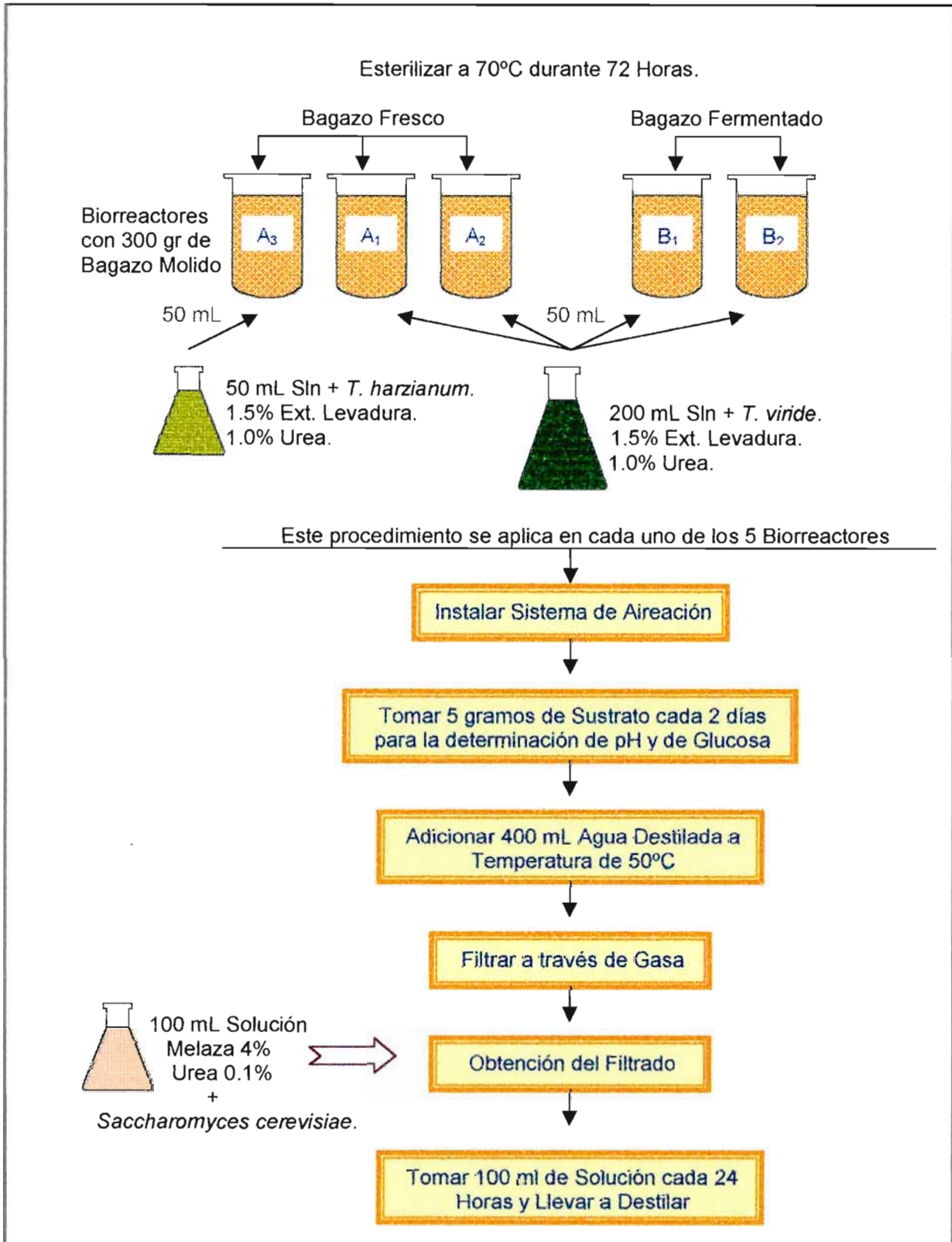


Figura 22. Variación del sustrato en estado fermentado y no fermentado.

2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL FINAL.

SISTEMA CONTINUO

En el experimento se realizaron los siguientes pasos:

El primer paso es la hidrólisis de la celulosa mediada por *Trichoderma viride*, en un tiempo de 168 horas aproximadamente, luego se filtraron 1500 mL de hidrolizado que fue eliminado por *Trichoderma viride*, más agua destilada tibia, con el fin de esterilizar el lixiviado que será el medio de fermentación de la glucosa en el siguiente paso. Este último paso se realizó en el biorreactor de fermentación que contenía *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de adaptación modificado con glucosa al 1%, este con el fin de eliminar la fase de adaptación y arrancar en fase de crecimiento exponencial para la producción de etanol. (Figura 23)



Figura 23. Montaje del Sistema Continuo.

Se licuaron 300 gramos de bagazo de caña de azúcar más agua destilada, estos se dejaron en un recipiente cubierto durante 24 horas, luego se adicionaron en el biorreactor 1 del montaje de sistema continuo, este se llevó a esterilizar en una estufa a una temperatura aproximada de 75°C durante 120 horas manteniendo un ambiente húmedo. También se llevó a esterilizar el resto del material de vidrio que constituye el sistema.

Se preparó medio de cultivo líquido a una concentración de 1% de urea más 1.5% de extracto de malta, para inocular *Trichoderma viride*; este se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 48 horas.

Transcurridas 96 horas, se sacó el biorreactor de la estufa (horno), se dejó enfriar y a temperatura ambiente se inocularon los microorganismos suspendidos en la solución de preinoculo, a la cual se había realizado un previo conteo de microorganismos. 7 días después se adicionó un volumen de 400 mililitros de agua destilada tibia en el biorreactor 1, para realizar el lavado y obtener el lixiviado.

Se abrieron las llaves de paso ubicadas entre el primer biorreactor y la trampa de vacío, este filtrado se dejó pasar hasta el biorreactor de fermentación el cual contenía una solución de glucosa al 1% inoculada con levaduras en un volumen del 10% respecto al volumen total del filtrado obtenido. El biorreactor de la fase de fermentación se mantuvo en una incubadora, la cual presentaba un sistema térmico acondicionado de bombillas de 60 vatios de potencia brindando una temperatura aproximada de 35°C. (Figura 24)

En condiciones asépticas y usando mechero se tomaron muestras de 100 ml cada 24 horas a partir de la adición del filtrado al biorreactor, el procedimiento se realizó durante 10 días. A cada una de las muestras se les practicó el proceso de destilación.

La determinación de la concentración de alcohol se realizó por medio de la metodología descrita en la sección 2.3.2.6.

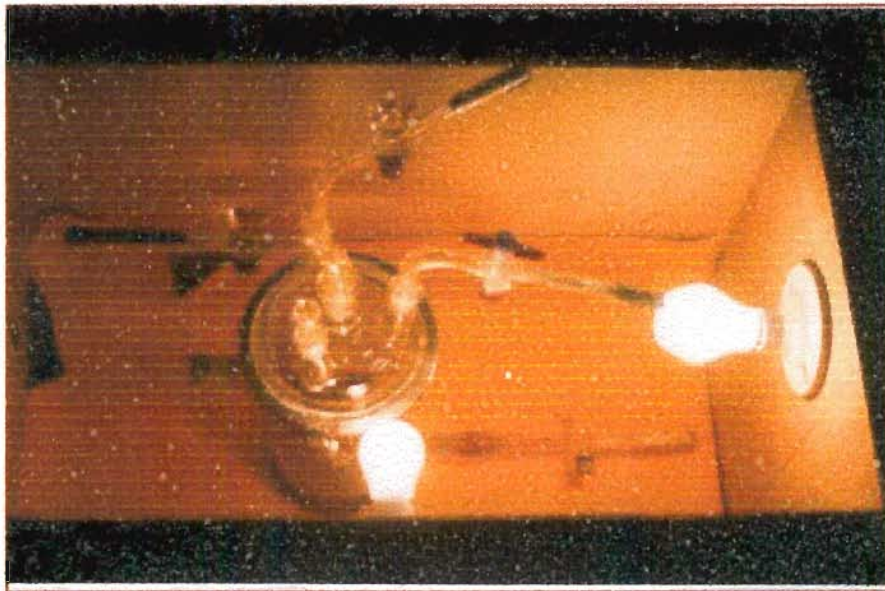


Figura 24. Biorreactor de la fase de fermentación.

BIOTECNOLOGIA ULS

3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

El análisis de resultados se enfoca a la determinación de las condiciones más favorables para la obtención de etanol a partir del desdoblamiento del polímero de lignocelulosa, constituyente del bagazo de caña de azúcar (Figura 25), mediante un proceso mediado por los microorganismos *Trichoderma viride* y *Saccharomyces cerevisiae*, de acuerdo con la metodología descrita.

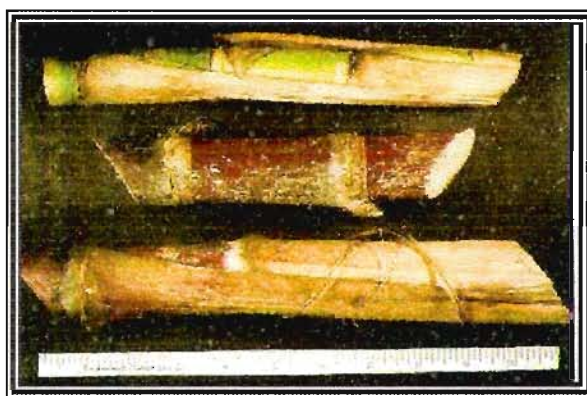


Figura 25. Trozos de caña de azúcar.

El bagazo de caña de azúcar se tomó como materia prima por su composición química, sus bajos costos de producción, su permanente disponibilidad y por su problemática ambiental.

La problemática ambiental se relaciona con la contaminación que se origina durante su combustión en el trapiche donde se utiliza como fuente de energía. Sin embargo también se debe considerar que el bagazo fresco, aún contiene una alta concentración de sacarosa, la cual es un sustrato propicio para el desarrollo y proliferación de una gran cantidad de insectos y de microorganismos.

3.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

La caña de azúcar presenta la siguiente clasificación taxonómica.

Dominio:	Eucharya
Tipo:	Fanerógama
Subtipo:	Angiosperma
Clase:	Monocotiledónea
Orden:	Glumales
Familia:	Gramíneas
Género:	Saccharum
Especie:	officinarum.

En el cuadro 11 se presenta la caracterización fisicoquímica del bagazo de caña de azúcar sin tratar.

Cuadro 11. Características físicas y químicas del bagazo de caña de azúcar.

	<i>HUMEDAD</i>	<i>PROTEINA</i>	<i>LIGNINA</i>	<i>HOLOCELULOSA</i>	<i>CELULOSA</i>
Bagazo sin tratar	8,41-8,46	0,6-0,8	17,23-17,67	68,31	44,51

3.2 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO

Algunos de los microorganismos aislados de la caña de azúcar fueron los siguientes; *Trichoderma viride*, *Rhizopus stolonifer*, *Streptomyces* spp, *Bacillus* spp, *Nitrococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Azotobacter* spp, *Gluconobacter* spp, *Zymomonas* spp, *Cellulomonas* spp, *Saccharomyces boullardii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Cabe mencionar que la cepa del microorganismo *Trichoderma viride*, aislada del bagazo de caña luego de numerosas siembras, fue el encargado de realizar la hidrólisis de dicho sustrato.

3.2.1 Identificación y elección de los microorganismos. Para la elección de los microorganismos se tomaron como base algunas referencias bibliográficas de trabajos similares, esto soportado con numerosos ensayos preliminares nos indicó que estos microorganismos eran los más adecuados para llevar a cabo el presente trabajo. A continuación se realiza una descripción microbiológica de cada uno de los microorganismos seleccionados.

3.2.1.1 Hongo Filamentoso. Las características que presentó *Trichoderma viride* durante el proceso de obtención de glucosa se describen a continuación:

3.2.1.1.1 **Descripción Macroscópica.** (Figura 26)



Figura 26. Observación de *Trichoderma viride*. (3 días después de sembrado)

Color: Verde, con tonalidades amarillas y blancas.

Aspecto: Algodonoso, Aterciopelado.

3.2.1.1.2 **Descripción Microscópica.** En la siguiente fotografía se observa gran cantidad de conidias de forma ovalada y color verde, algunas sobrepuestas. También se observan numerosas esporas con tubo germinativo el cual se presenta a las 48 horas; las hifas presentan septos. (Figura 27)

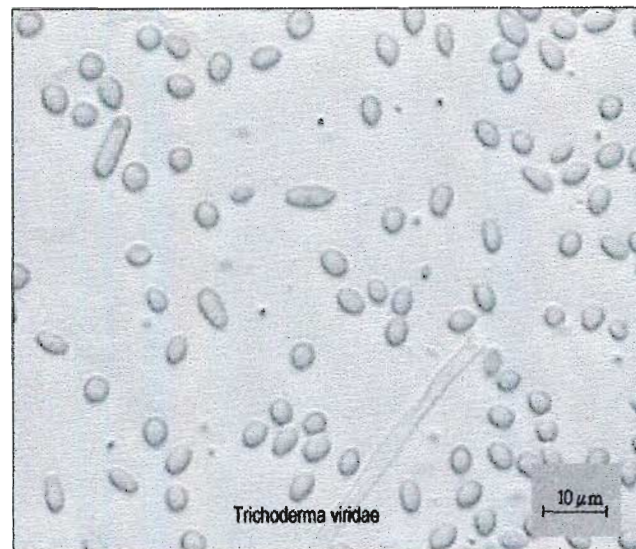


Figura 27. Conidias de *Trichoderma viride*.

3.2.1.1.3 Clasificación Taxonómica.

Dominio:	Eucharya
Clase:	Deuteromycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Moniliaceae
Género:	Trichoderma
Especie:	viride

3.2.1.2 Hongo no Filamentoso. Las características que presentó *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de obtención de alcohol se describen a continuación:

3.2.1.2.1 **Descripción Macroscópica.** (Figura 28)

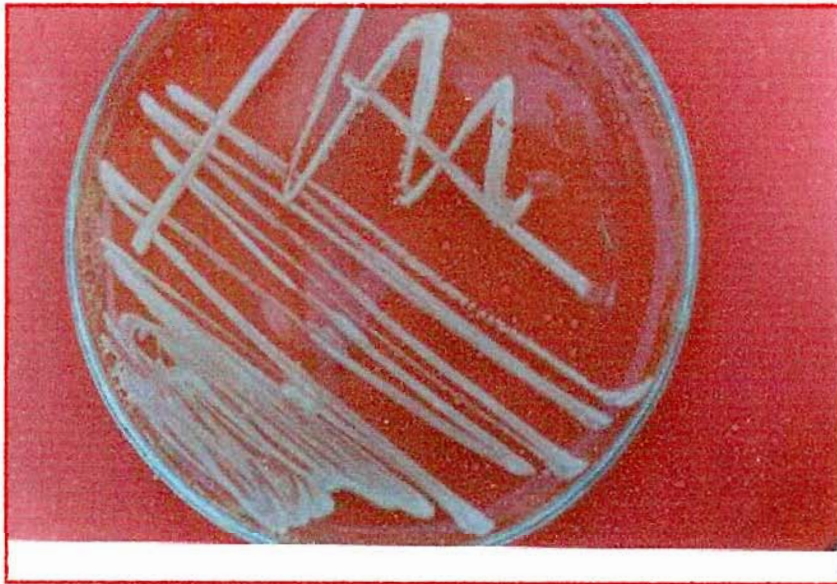


Figura 28. Observación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Color:	Beige
Tamaño:	Grande
Borde:	Irregular
Brillo:	Brillante
Aspecto:	Elevada, convexo

3.2.1.2.2 **Descripción Microscópica.** Se observa gran cantidad de células semiredondas que presentan blastosporas y que se agrupan formando una estructura hexagonal.

3.2.1.2.3 **Clasificación taxonómica**

Clase:	Ascomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	Saccharomyces
Especie:	cerevisiae.

3.2.2 Respuesta a los medios de cultivo. Se observó que cada uno de los microorganismos presenta diferente morfología dependiendo de la composición del medio de cultivo (Cuadro 12).

3.2.2.1 Selección del medio de mantenimiento para *Trichoderma viride*. La siembra del microorganismo en cada uno de los medios modificados con bagazo de caña presentó las siguientes características:



Figura 29. Adaptación de *Trichoderma viride* en Agar Malta.

Se observó que el microorganismo no colonizaba totalmente el medio de cultivo, su crecimiento parecía escaso, se observaron pequeños brotes con tonalidades de color verde intenso, dispersos aleatoriamente en la superficie del medio.

La adherencia de la masa micelial a la superficie del medio fue leve, ya que formó una especie de cubierta que se desprendía fácilmente.

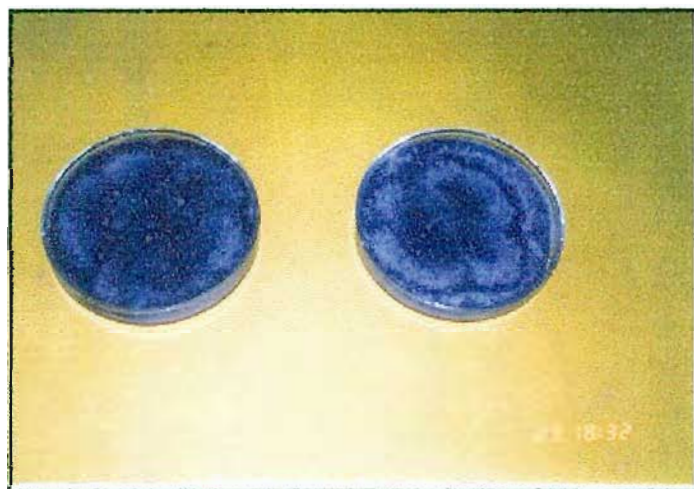


Figura 30. Adaptación de *Trichoderma viride* en Agar Avena.

Transcurridos 8 días se observó buen crecimiento del microorganismo sobre este medio de cultivo, inicialmente el medio era de color blanco pero durante su desarrollo fue adquiriendo una tonalidad verdosa. Las colonias se dispersaron por el medio tomando un aspecto algodonoso que presenta elevación, con tonalidades verde, amarillo y blanco. En el siguiente cuadro se pueden apreciar algunas de las principales características presentadas por *Trichoderma viride* en otros medios de cultivo.

Cuadro 12. Características de *Trichoderma viride*, variando los medios de cultivo.

PROPIEDADES	AGAR MALTA	AGAR CEBADA	AGAR CEBADA + LACTOSUERO	AGAR PAPA-DEXTROSA	AGAR AVENA
Forma	Agregados	Irregular	3 halos	Irregular	halos
Aspecto	Manto, cubierta	Algodonoso	Granuloso	Pulverulento	Algodonoso
Color	Verde oscuro, claro amarillo	Verde-blanco y amarillo	Tonalidades degrade entre verde-blanco	Verde oscuro	Verde-amarillo-blanco
Elevación	Poca	Elevada	Media	Poca	Elevada
Dispersión	Al borde del medio	Circular y central	Central	Al borde del medio	En todo el medio
Observaciones	El micelio se levanta fácilmente del medio	Buen crecimiento.	Las colonias se mantienen por más tiempo	Susceptible a la contaminación en corto tiempo	Mayor crecimiento, con apariencia fresca

El objetivo de la siembra del microorganismo en los diferentes medios de cultivo, modificados con bagazo de caña de azúcar fue encontrar el medio para brindar las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo del microorganismo y al mismo tiempo mantener su actividad metabólica.

3.2.2.2 Selección del medio de mantenimiento para *Saccharomyces cerevisiae*. La siembra del microorganismo en cada uno de los medios de cultivo, presentó las siguientes características:

- ♣ *Agar malta*: Se observaron colonias elevadas de aspecto mucoso y de tonalidad beige. Presentó gran crecimiento y buena adaptación en el medio de cultivo.
- ♣ *Medio extracto de levadura*: Se observaron colonias con tonalidades beige distribuidas en todo el medio, se presentó buen crecimiento y adaptación al medio de cultivo.
- ♣ *Medio glucosa*: El microorganismo presentó poco crecimiento debido a la falta de nutrientes adicionales, este medio fue susceptible a contaminación en corto tiempo.
- ♣ *Medio melaza: (+ urea)*, Se observó el mejor crecimiento del microorganismo, este medio aportó los nutrientes adicionales requeridos por el microorganismo lo cual se reflejó en la gran cantidad de biomasa obtenida.

Luego de varios aislamientos utilizando el medio melaza + urea, se logró obtener un cultivo axénico de microorganismos.

3.2.3 Adaptación de cepas. La composición de nutrientes del medio de adaptación para cada uno de los microorganismos fue la siguiente:

- ◆ *Trichoderma viride*: 1,7 g/L de Extracto de Malta + zumo de paja de bagazo 10% + 18 g/L de Agar Agar.
- ◆ *Saccharomyces cerevisiae*: Glucosa 5% + Urea 0.01%

3.3 ANALISIS DEL BIOPROCESO

La realización de cada uno de los tratamientos analizados a continuación, fueron la base del procedimiento para cada uno de los ensayos experimentales de la obtención de etanol a partir de celulosa.

3.3.1 Pretratamiento de la materia prima. Al reducir el tamaño de partícula se aumenta la superficie de contacto y se incrementa la densidad del sustrato para facilitar la acción de los microorganismos; el sustrato es rico en carbohidratos solubles y estructurales, este presentó un elevado porcentaje de fibra y deficiencia en proteína de calidad, bajo nitrógeno soluble y bajo en ácidos grasos de cadena larga. Las propiedades del sustrato presentadas antes y durante el proceso se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Características organolépticas del bagazo molido.

CARACTERÍSTICA	ANTES DEL PROCESO	DURANTE EL PROCESO
Olor	Pasto húmedo	Panela
Color	Beige claro	Se torna color café verdoso
Textura	Rígida, astillosa	Suave, menos astilloso

3.3.2 Concentración de microorganismos. Se realizaron aproximadamente de 6 a 7 diluciones de la solución inicial para realizar el conteo de microorganismos, en cada una de estas diluciones se utilizó material estéril y se homogenizó cada solución por medio de un agitador mecánico.

3.3.3 Crecimiento de *Trichoderma viride*, con y sin aireación. El mejor crecimiento se observó en el montaje con aireación, obteniéndose una mayor cantidad de biomasa. con respecto al tratamiento sin aireación. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

⌘ Tratamiento con aireación = 4.2 gramos.

⌘ Tratamiento sin aireación = 1.8 gramos.

En la practica realizada utilizando bagazo de caña de azúcar esterilizado y no esterilizado, el bagazo no esterilizado presenta contaminación con *Aspergillus niger*.

3.3.4 Crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de nutrientes. Se estableció que el parámetro decisivo en la tasa de crecimiento de *Trichoderma viride* es el pH, el cual es regulado por la composición en nutrientes del medio de cultivo.

Cuadro 13. Crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de nutrientes.

TRATAMIENTO	% [C/N]	pH _{INICIAL}	pH _{FINAL}	PESO HUMEDO (g)	PESO SECO (g)	DIFERENCIA PESO (g)
1	1-1	5.18	5.42	1.8	1.4	0.4
2	1-2	5.03	4.65	1.6	1.3	0.1
3	2-1	5.12	4.85	3.2	1.4	0.1
4	3-3	4.95	4.76	1.4	1.3	0

Los datos de pH obtenidos en los tratamientos 2, 3 y 4 disminuyen durante el proceso lo cual finalmente conlleva a una leve obtención de biomasa. El pH en el tratamiento 1, se alcaliniza en el transcurso del proceso. Es de notar, que es en este tratamiento donde se obtuvo el mayor incremento en biomasa del microorganismo. (Figura 31)

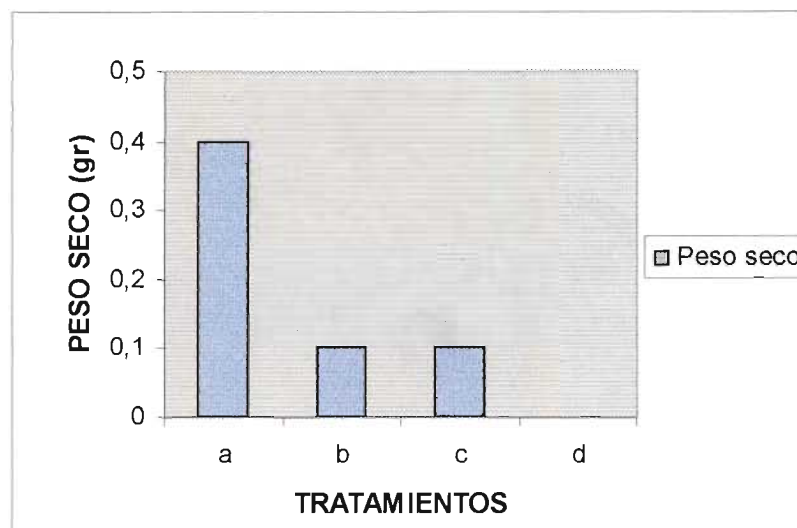


Figura 31. Crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de nutrientes.

3.3.5 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, variando la fuente de carbono. Se obtuvo el mayor crecimiento del microorganismo en la solución que contenía melaza, con una concentración de $112,5 \times 10^6$ levaduras/mL; en la solución que contenía glucosa la concentración de microorganismos fue de $112,5 \times 10^5$.

3.3.6 Cinética de crecimiento *Trichoderma viride*. Los análisis referidos a continuación se basan en las condiciones señaladas en la sección 2.3.3, correspondientes a una programación de 10 días para la toma de muestras, en donde se inoculó cada biorreactor con una concentración de 55×10^7 conidias contenidas en 10 mL. (Anexo B)

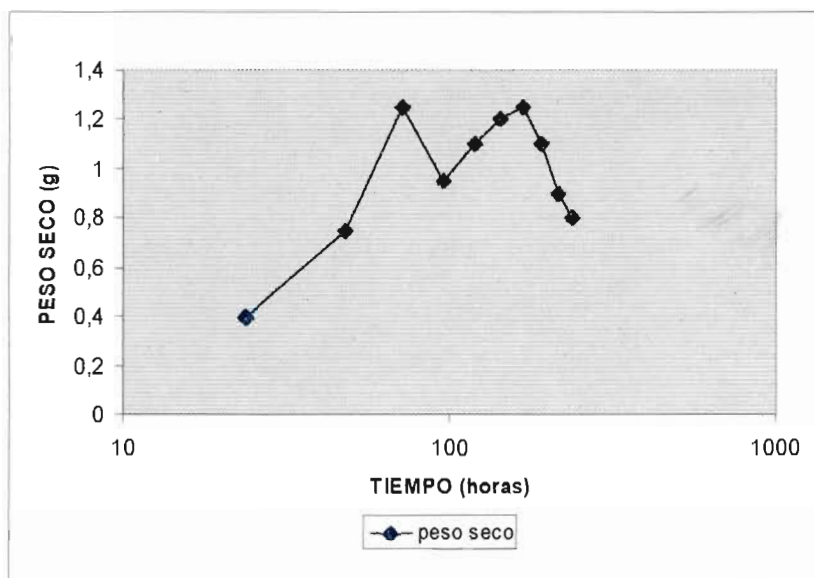


Figura 32. Variación del crecimiento de *Trichoderma viride*.

La Figura 32 representa la actividad metabólica del microorganismo, el cual toma la glucosa como principal fuente de energía inmediata.

Las dos fases logarítmicas indican que el microorganismo presenta un comportamiento “Díauxico”, posiblemente debido a los diferentes azúcares presentes en el sustrato. El microorganismo inicialmente degrada la fuente de carbono menos compleja, el almidón y luego adquiere nutrientes por medio de la degradación de la celulosa presente en el medio, como se representa en la Figura 32.

3.4 ENSAYO EXPERIMENTAL I.

Adaptación de *Trichoderma viride* sobre bagazo de caña de azúcar.

3.4.1 Fase de hidrólisis. Se observó un moderado crecimiento del microorganismo, presentando una tonalidad blanca verdosa.

En la observación microscópica se encontró una concentración $16'250.000$ conidias/mL y se apreció que la muestra presentaba dos tonalidades bien diferenciadas así:

- ☞ Blanca: Gran número de hifas ramificadas y septadas,
- ☞ Verde: Una gran cantidad de conidias de forma ovalada, algunas agrupadas, otras en cadena, algunas solitarias y la mayoría de estas con tubo germinativo.

Los valores obtenidos en la determinación de glucosa después de transcurridos 15 días fueron los siguientes:

$$\text{Muestra}_1 (10\text{gr}) = 1,91\text{mg /dL} = 19,1 \text{ p.p.m} = 0,0191\text{g/L}$$

$$\text{Muestra}_2 (20\text{gr}) = 1,07\text{mg /dL} = 10,7 \text{ p.p.m} = 0,0107\text{g/L}$$

$$\text{Muestra}_3 (40\text{gr}) = 11,26\text{mg /dL} = 112,6 \text{ p.p.m} = 0,1126\text{g/L}$$

$$\text{Muestra}_4 (50\text{gr}) = 5,40\text{mg /dL} = 54 \text{ p.p.m} = 0,054 \text{ g/L}$$

Las concentraciones obtenidas de glucosa son relativamente bajas, teniendo en cuenta la concentración en gramos por litro, esto hace suponer que el medio no presentó las condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo.

3.5 ENSAYO EXPERIMENTAL II

Influencia del oxígeno en el crecimiento de *Trichoderma viride*.

3.5.1 Fase de hidrólisis. Los primeros días de la fase de hidrólisis se percibe un olor a pasto húmedo. Cabe anotar que al tomar la muestra de bagazo tratado, este presentó un pH de 7.0.

Los valores obtenidos en las dos primeras tomas de muestra fueron los siguientes:

$$\text{MUESTRA}_1 = 100 \text{ mg/dL} = 1 \text{ g/L}$$

$$\text{MUESTRA}_2 = 87 \text{ mg/dL} = 0.87 \text{ g/L}$$

Luego de adicionar agua destilada tibia (aproximadamente 40 días después), se obtuvo el lixiviado, del cual se tomó una alícuota y se le realizó la metodología indicada para determinar la concentración de glucosa. A partir de este se obtuvo el siguiente resultado:

$$\text{MUESTRA}_3 = 64 \text{ mg/dL} = 0.64 \text{ g/L}$$

Se observó que inicialmente había una concentración de glucosa de 1 g/L, la cual va disminuyendo en concentración a medida que transcurre el tiempo, lo cual hace suponer que esta siendo utilizada por el microorganismo para sus requerimientos fisiológicos. (Figura 33). De esta manera, la concentración de glucosa obtenida es mayor comparada con el ensayo anterior, pero se puede considerar que el microorganismo aún no está ejerciendo una acción directa sobre el sustrato.

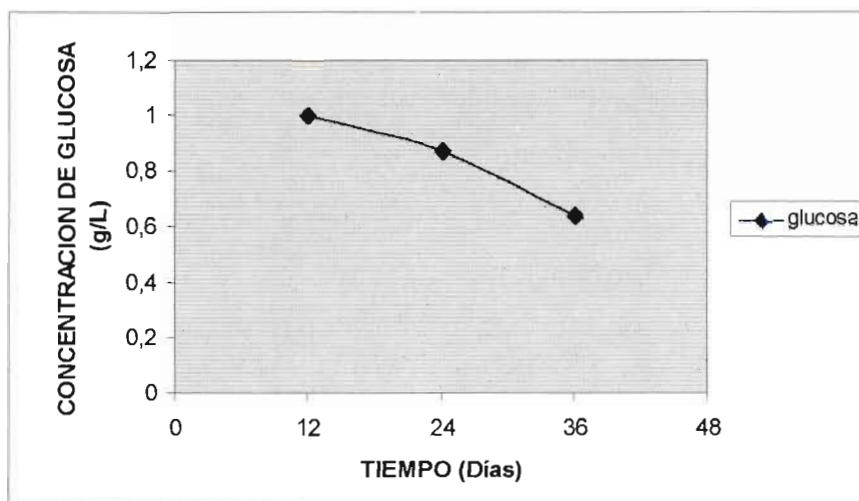


Figura 33. Variación de la concentración de glucosa sintetizada y asimilada por *Trichoderma viride*.

3.5.2 Fase de fermentación. Se obtuvo un volumen de 380 mL de filtrado al cual se le adicionó un volumen de 38 mL de medio inoculado con levadura para realizar el proceso de fermentación, el cual contenía una concentración de 5.13×10^9 células/mL. (Figura 34)



Figura 34. Muestras de los filtrados obtenidos.

Al inocular la levadura se dejaron transcurrir 24 horas. A partir de este momento se inició la toma de muestras en periodos de tiempo de 24 horas.

Cuadro 14. Determinación de la concentración de alcohol.

MUESTRA	TIEMPO (horas)	pH	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
0	0	5.82	-	-	-
1	24 – 48	4.92	0,9992331	0,53	0,11
2	48 – 72	4.37	1,0003834	0	0
3	72 – 96	4.88	1,0026840	0	0
4	140	4.95	1,0009585	0	0

* Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

En la muestra tomada a las 24 horas se obtuvo alcohol en una concentración de 0,11%, en las demás muestras obtenidas la concentración de alcohol fue de cero. La elevada concentración de microorganismos utilizó la glucosa presente para su crecimiento; esto indica que se presentó agotamiento de las fuentes carbonadas y por lo tanto se observa una caída marcada en la producción de alcohol.

3.6 ENSAYO EXPERIMENTAL III.

Determinación del crecimiento de *Trichoderma viride*, variando la concentración de microorganismos y la concentración de nutrientes.

3.6.1 Fase de hidrólisis. La concentración de microorganismos para el preinóculo fue de 348×10^6 células por mL de la solución, los valores intermedios (controles) tuvieron como fin evaluar el límite de confiabilidad de los experimentos de la matriz del diseño factorial.

Transcurridos cuatro días de la inoculación no se observó crecimiento del microorganismo, por lo que se procedió a instalar un sistema de aireación por medio de bombas de acuario para estimular dicho crecimiento.

Cuadro 15. Variación del pH durante la fase de hidrólisis.

TRATAMIENTO	pH					
	día 5	día 10	día 15	día 20	día 25	día 30
1	6.48	6.3	6.52	6.62	6.54	6.84
2	7.13	7.28	7.36	7.22	6.72	6.88
3	7	6.78	7.2	7.5	6.92	7.56
4	7.58	7.94	7.32	7.88	7.08	7.69
5	6.88	6.56	7.27	7.24	6.76	7.28
6	6.64	6.94	6.9	6.69	6.96	7.12
7	6.42	6.35	6.4	6.32	6.14	6.06
8	6.38	6.18	6.46	6.36	5.88	5.84

Javier Alonso Herrera Cuadros

De acuerdo con el Cuadro 15, los valores de pH oscila en un rango entre 5.8 y 7.5. Al realizar una observación macroscópica se observo el mayor crecimiento en el tratamiento 5, en orden descendente le siguió el montaje 2, y luego le siguió el tratamiento 6, donde se observó un crecimiento poco intenso. En los demás tratamientos el crecimiento del microorganismo fue moderado.

Como se desprende del análisis de los resultados, el microorganismo requiere de una fuente de energía inmediata que actúa como inductor del proceso de hidrólisis, este complementado con un aporte adicional de nitrógeno que le brindan las condiciones para la adaptación y la actividad metabólica al microorganismo. Los nutrientes en exceso pueden inhibir el crecimiento del microorganismo.

Se observaron fluctuaciones marcadas de pH que indican la formación de glucosa con producción adicional de ácidos, lo cual se ve reflejado en las caídas leves de pH y por consiguiente disminuye la actividad enzimática.

3.6.2 Fase de fermentación. El conteo de levaduras por mililitro arrojó una concentración de 90×10^6 , de los cuales se adicionaron 20 mL de solución a cada tratamiento, es decir un total de: 1.8×10^9 .

Los tratamientos control (7 y 8), no se tuvieron en cuenta en esta fase del proceso, debido a que no presentaron ninguna modificación en la fase anterior. Al realizar las tomas de las muestras se obtuvieron los siguientes resultados.

A las 24 horas, se obtuvo una concentración de alcohol de 0,03 % V/V, en los tratamientos 1 y 4, que contenía melaza al 1% más Nitrato de Amonio al 2% y melaza al 2% más Nitrato de Amonio al 1% respectivamente, con variada concentración de microorganismos. En los demás tratamientos no hubo producción de alcohol, esto puede ser debido a que la levadura no había completado su ciclo reproductivo. (Cuadro 16)

Cuadro 16. Determinación de la producción de alcohol a las 24 horas.

TRATAMIENTO	V _{inicial} (mL)	V _{destilado} (mL)	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
1	98	47	0.9999	0,07	0,03
2	97	43	1.0013	0	0
3	96	52	1.0007	0	0
4	95	40	0.9999	0,07	0,03
5	98	56	1.0016	0	0
6	93	50	1.0001	0	0

*Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

A las 48 horas, se obtuvo una concentración de alcohol de 0,36% V/V, en el tratamiento 5, que contenía igual concentración de nutrientes, melaza y Nitrato de Amonio al 1% y una concentración intermedia de microorganismos. En los tratamientos 1,3 y 6 la producción de alcohol fue nula, en los demás tratamientos la producción estuvo en un rango entre 0,24 y 0,27%. (Cuadro 17)

Cuadro 17. Determinación de la producción de alcohol a las 48 Horas.

TRATAMIENTO	V _{inicial} (mL)	V _{destilado} (mL)	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
1	100	54	1.0020	0	0
2	98	45	0.9991	0,60	0,27
3	99	49	1.0001	0	0
4	98	50	0.9993	0,47	0,24
5	96	53	0.9990	0,67	0,36
6	96	50	1.0008	0	0

*Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

Javier Alonso Herrera Cuadros

A las 72 horas, se obtuvo una concentración de alcohol de 0,44 % V/V, en el tratamiento 2, el cual contenía una concentración de melaza al 1% más Nitrato de Amonio al 2% con la menor concentración de microorganismos. En los demás tratamientos la concentración de alcohol permaneció relativamente constante. (Cuadros 18)

Cuadro 18. Determinación de la producción de alcohol a las 72 Horas.

TRATAMIENTO	V_{inicial} (mL)	V_{destilado} (mL)	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V9 *	ALCOHOL (%V/V)
1	94	50	1.0003	0	0
2	100	50	0.9987	0,87	0,44
3	98	52	1.0010	0	0
4	99	50	0.9994	0,40	0,2
5	99	51	0.9993	0,47	0,24
6	99	50	0.9988	0,80	0,4

*Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

A las 96 horas, se obtuvo una concentración de alcohol de 0,4 % V/V, presentado en el tratamiento 2. En los demás tratamientos la tendencia de la concentración de alcohol fue en decremento del porcentaje con respecto a las 72 horas. (Cuadro 19)

Cuadro 19. Determinación de la producción de alcohol a las 96 Horas.

TRATAMIENTO	V _{inicial} (mL)	V _{destilado} (mL)	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
1	100	50	1.0001	0	0
2	100	50	0.9988	0,80	0,4
3	95	52	1.0005	0	0
4	78	38	0.9999	0,07	0,03
5	90	45	1.0006	0	0
6	84	40	0.9996	0,27	0,11

* Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 2 con la menor concentración de microorganismos, el cual presentó un crecimiento moderado. La máxima concentración de etanol se obtuvo a las 72 horas con un porcentaje de 0,44% V/V. En los demás tratamientos las concentraciones máximas también se obtuvieron entre las 48 y 72 horas.

Un factor limitante de productividad podría ser alguna contaminación con microorganismos que compiten metabólicamente con los microorganismos inoculados.

3.7 ENSAYO EXPERIMENTAL IV.

Influencia que ejerce la variación del sustrato en estado fermentado y no fermentado.

3.7.1 Fase de hidrólisis.

☞ Transcurridas las 48 horas se percibe un olor a fermento, al tomar una muestra y realizar una observación microscópica se apreció una gran cantidad de levaduras.

☞ El sustrato A presentó un pH de 4.70 y el sustrato B un pH de 4.30.

Durante la pasteurización del sustrato se realizaron volteos periódicos mediante agitación mecánica, para alcanzar una temperatura homogénea en todo el biorreactor.

Se observaron diferentes tonalidades de los lixiviados obtenidos, el bagazo residual disminuyó en peso (se midió indirectamente la degradación de la lignocelulosa), los valores obtenidos se reportan en el cuadro 21, teniendo en cuenta que se inició con 300 gramos de sustrato y luego se extrajeron 5 gramos de éste, para realizar las diferentes pruebas tanto de pH, como de concentración de glucosa.

Cuadro 20. Variación de la concentración de glucosa (g/l).

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE GLUCOSA (g/l)											
	día	día	día	día	día	día	día	día	día	día	día	día
	4	6	8	10	12	14	16	19	23	25	30	35
A ₁	0,5	1,33	2,66	0,50	2,00	0,37	2,06	0,75	1,16	0,29	0,88	0,43
A ₂	0,82	1,83	2,83	0,83	1,83	0,75	0,25	1,00	0,66	0,74	1,63	1,07
B ₁	0,35	1,66	2,50	1,33	1,16	0,75	0,87	0,12	1,41	1,19	0,88	0,57
B ₂	3,00	0,66	1,16	1,16	1,33	3,75	0,62	0,75	1,16	1,09	1,50	0,29
A ₃	1,33	1,16	1,00	2,50	1,75	1,12	0,50	0,37	1,16	0,60	1,38	0,57

Se sustrajeron aproximadamente 70 gramos de bagazo de cada uno de los biorreactores, luego los cálculos se hicieron tomando como base 230 gramos.

Cuadro 21. Determinación del porcentaje de degradación de sustrato.

MONTAJE	PESO _{FINAL} (g)	SUSTRATO DEGRADADO (g)	% DEGRADACIÓN
A ₁	132.1	97.9	42
A ₂	123.6	106.4	46
A ₃	119.8	110.2	48
B ₁	85.4	144.6	63
B ₂	76.7	153.3	67

El mayor porcentaje de degradación de sustrato se presentó en el tratamiento del biorreactor B₂, con un valor aproximado del 67%. En los demás tratamientos el porcentaje de degradación estuvo en un rango entre el 45 y el 60%.

En las siguientes figuras se observa la variación del pH y la concentración de glucosa en el transcurso del proceso, para cada uno de los tratamientos.

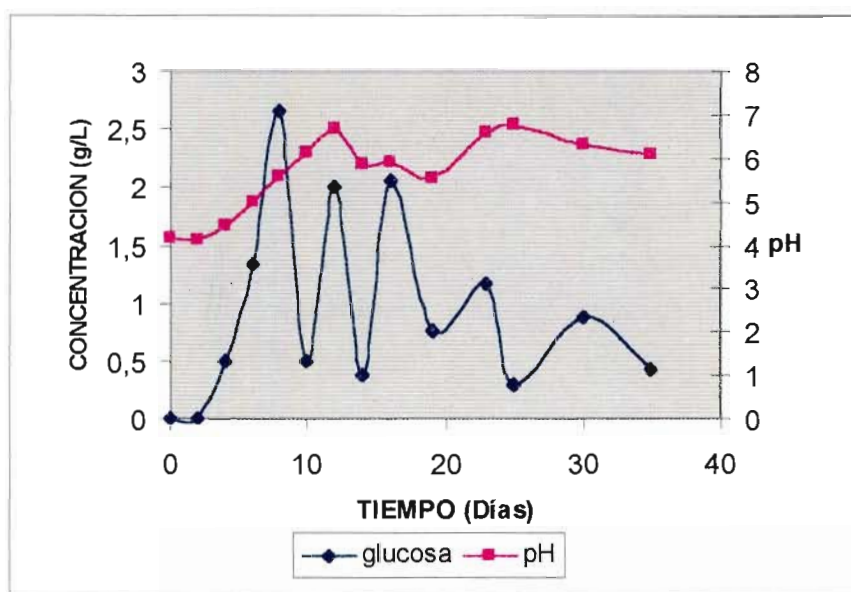


Figura 35. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A1.

En el tratamiento A₁ la máxima producción de glucosa se produjo a los 8 días, donde se obtuvo una concentración de 2.66 g/l. En el transcurso del proceso se sintetizó y se asimiló glucosa simultáneamente con tendencia decreciente. El pH se mantuvo en un rango entre 4,0 y 6,0.

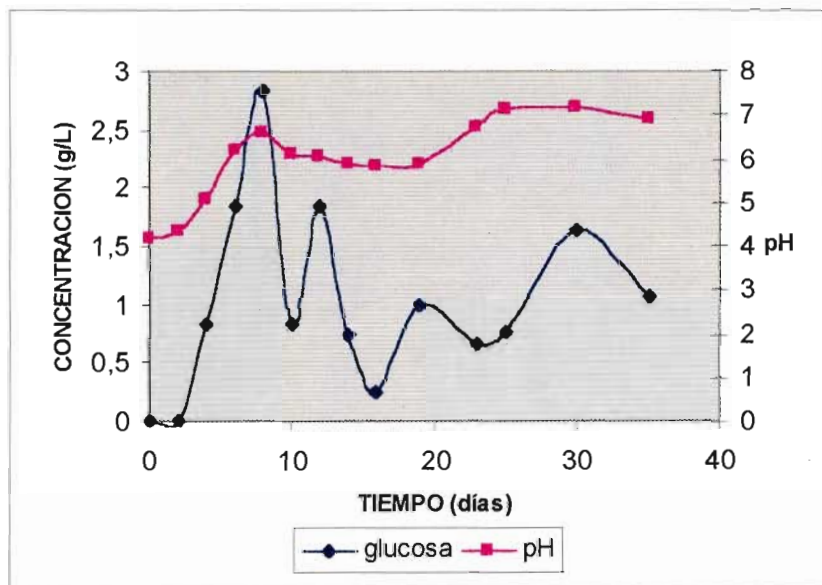


Figura 36. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A2.

En el tratamiento A₂ la máxima producción de glucosa se obtuvo a los 8 días, donde se obtuvo una concentración de 2.83 g/l. En el día 10 se observó un gran consumo de glucosa, la cual vuelve a ser sintetizada el día 12 en una concentración de 1.83 g/l. En general la tendencia es irregular. El pH varió entre 4,0 y 7,0.

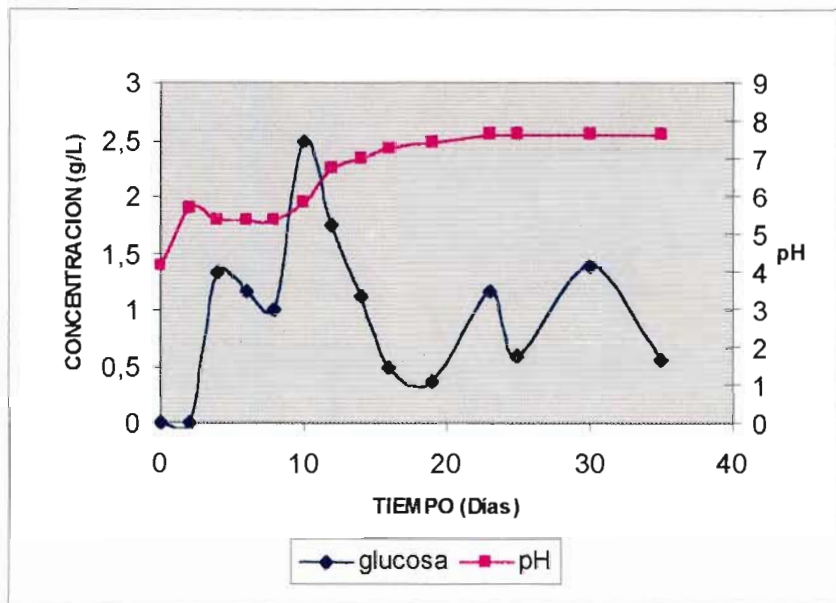


Figura 37. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento A3.

En el tratamiento A₃ la máxima producción de glucosa se observó a los 10 días, donde se obtuvo una concentración de 2.5 g/l. La concentración de glucosa presentó una tendencia de variación entre 0.5 y 1.5 g/l. El pH varió en un rango entre 4,0 y 8,0.

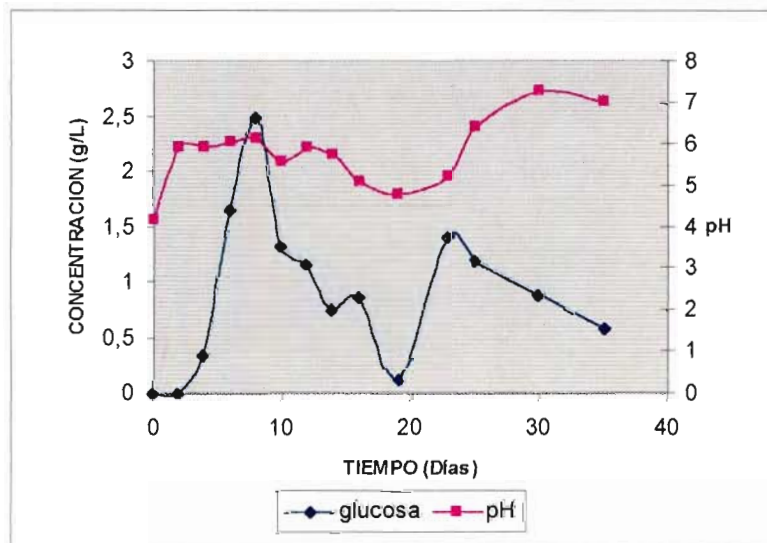


Figura 38. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento B1.

En el tratamiento B₁ la máxima producción de glucosa se encontró a los 8 días, donde se obtuvo una concentración de 2.5 g/l. Entre los días 9 y 19 se observó un declive bastante marcado de la concentración de glucosa hasta obtenerse un valor de 0.12. El pH se mantuvo entre los valores de 4,0 y 7,0 con tendencia a la alcalinidad.

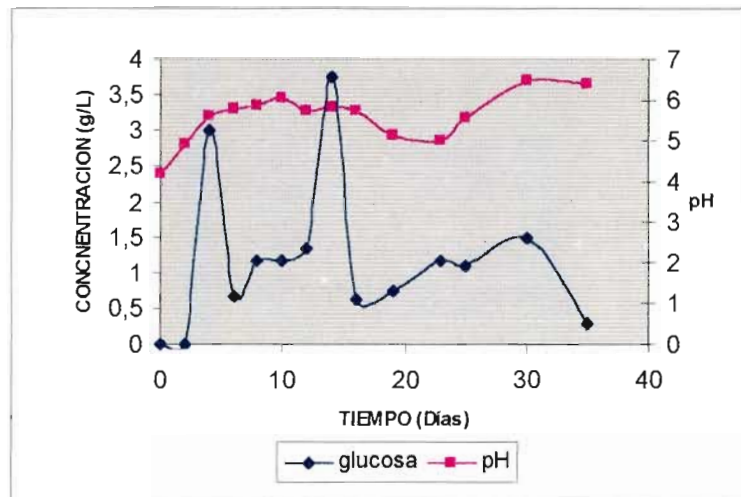


Figura 39. Variación de la concentración de glucosa y del pH en el tratamiento B2.

En el tratamiento B₂ la máxima producción de glucosa se dio a los 14 días, donde se obtuvo una concentración de 3.75 g/l. En el día 4 se obtuvo una concentración de 3 g/l, además se observó una fase de meseta entre los días 6 y 12; como lo verifica la cinética de crecimiento de *Trichoderma viride*, que duró alrededor de 10 días. El pH se mantuvo en un rango variable entre 4,0 y 6,5.

El análisis de los resultados demuestra que, las mayores concentraciones de glucosa se obtienen en un rango de pH comprendido entre 6.0 y 6.5, con valores superiores se observa una disminución marcada en la producción de glucosa. En todos los tratamientos la mayor concentración de glucosa se obtuvo aproximadamente a los 8 días de iniciado el proceso.

Durante la fase de hidrólisis se observó una variación marcada entre la síntesis y la degradación de glucosa.

3.7.2 Fase de fermentación. La concentración de microorganismos inoculados fue de 132.5×10^6 levaduras / mL. Se suministró aireación a cada biorreactor durante las 4 primeras horas del proceso. Las concentraciones de alcohol obtenidas en cada uno de los tratamientos se observa en los Cuadros 22 y 23.

Cuadro 22. Producción de alcohol a las 48 horas.

TRATAMIENTO	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
A ₁	0.9990	0,66	0,20
A ₂	0.9982	1,20	0,43
A ₃	0.9985	1,00	0,30
B ₁	0.9988	0,80	0,24
B ₂	0.9979	1,40	0,60

*Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

A las 48 horas, la máxima producción de alcohol se presentó en una concentración del 0,6%, en el tratamiento B₂. La menor concentración fue de 0,2%, en el tratamiento A₁.

Cuadro 23. Producción de alcohol a las 72 horas.

TRATAMIENTO	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (%V/V)
A ₁	0.9986	0,93	0,28
A ₂	0.9980	1,34	0,40
A ₃	0.9987	0,87	0,26
B ₁	0.9984	1,07	0,32
B ₂	0.9949	3,49	1,05

*Valor de la concentración de etanol en el volumen destilado.

A las 72 horas, se obtuvo el máximo valor en producción de alcohol durante todo el proceso, este valor fue de 1,05% valor significativo nuevamente presentado en el tratamiento B₂. En el tratamiento A₃ la tendencia de la concentración de alcohol fue en decremento del porcentaje.

A medida que transcurre el tiempo del proceso, se obtiene mayor concentración de alcohol, la producción más alta es de 1,05% V/V, la cual se obtuvo entre las 48 y 72 horas.

3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL FINAL.

SISTEMA CONTINUO.

En la solución del preinóculo se redujo la concentración de la fuente de carbono, para adaptar al microorganismo al sustrato sobre el cual iba a actuar, algunos de los azúcares presentes en el sustrato son asimilados por las levaduras y los azúcares restantes van a actuar como inductores en el crecimiento del microorganismo. Luego se procedió a realizar el montaje.

Se realizó un proceso de centrifugación a la suspensión de microorganismos con el objetivo de adicionar esta solución bien concentrada 186×10^8 conidias / mL.

El filtrado se realizó con agua tibia para asegurar el paso de los azúcares solubles. Se instaló aireación durante las 4 primeras horas, ya que el oxígeno estimula la respiración y el crecimiento celular. Transcurridas las 24 horas se procedió a tomar la primera muestra, la cual se llevó a destilar, este mismo procedimiento se aplicó respectivamente a cada una de las muestras obtenidas. Se obtuvieron los siguientes resultados de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.3.2.6, los datos y volúmenes referentes a la destilación se reportan en el Anexo C.

Cuadro 24. Determinación de la concentración de alcohol en el sistema continuo.

TIEMPO DE FERMENTACION (horas)	ALCOHOL (%V/V)
24	0
48	0
72	0
96	0,2
120	0,2
144	0,3
168	5,6
192	5,7
216	6,3
240	5,8
264	6,2

La mayor concentración de alcohol obtenida fue de 6,3%, la cual se produjo aproximadamente entre las 192 y 216 horas (9 días) de fermentación, en el montaje del sistema continuo para el cual se tuvieron en cuenta cada uno de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales. (Figura 40)

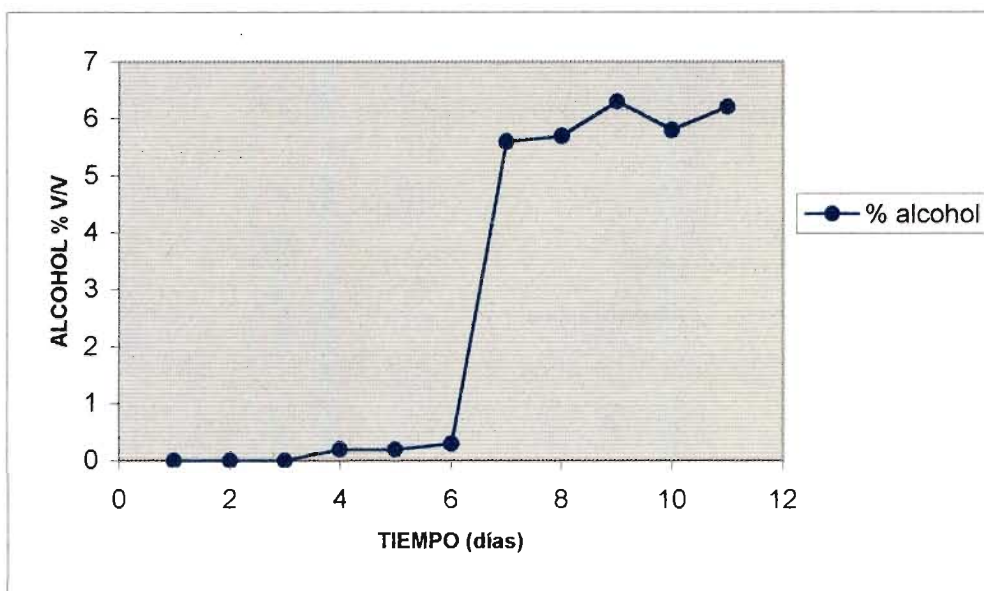


Figura 40. Determinación de la concentración de alcohol % en volumen

La concentración de alcohol % en V/V fue incrementando a partir del día 6 hasta el día 9, donde se presentó el máximo valor de la concentración de alcohol 6,3%, con respecto a todos los ensayos efectuados durante el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo.

Se apreció que a mayor temperatura de incubación, se obtuvo mayor concentración de etanol. La elevada concentración del producto final de la fermentación alcohólica es un inhibidor para los microorganismos que se presenten adicionalmente en el medio.

Como una gran alternativa se presenta el sistema continuo de dos fases: hidrólisis – fermentación, que permite el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos del bagazo de caña de azúcar para la obtención de etanol, el cual presentó los mejores resultados del presente trabajo obteniéndose un alto rendimiento expresado en una concentración de etanol del 6,3% en un periodo de tiempo de 216 horas, siendo este tratamiento el que presentó mayor eficiencia en comparación con los ensayos de monocultivo.



4 CONCLUSIONES

- ✔ El tratamiento con microorganismos autóctonos hace de este trabajo una innovación tecnológica limpia, debido a que se da uso adecuado a un desecho potencialmente contaminante y a su vez se obtiene un producto (Etanol), de aplicación industrial, farmacéutica y combustible.

- ✔ Algunos de los microorganismos aislados de la caña de azúcar fueron los siguientes: *Trichoderma viride*, *Rizopus stolonifer*, *Streptomyces* spp, *Bacillus* spp, *Nitrococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Azotobacter* spp, *Gluconobacter* spp, *Zymomonas* spp, *Cellulomonas* spp, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

- ✔ Los microorganismos seleccionados para realizar el proceso de hidrólisis y el proceso de fermentación fueron *Trichoderma viride* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente; estos microorganismos presentaron los mejores resultados durante la realización de ensayos preliminares.

- ✔ El medio de cultivo modificado con bagazo de caña de azúcar que brindó las condiciones óptimas para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de *Trichoderma viride* fue el Agar Avena al 5% más Urea al 1%.







- ✔ El medio de cultivo líquido que brindó las mejores condiciones para el mantenimiento de *Saccharomyces cerevisiae* fue el que presentaba una concentración de melaza al 5% más Urea al 1%.

BIBLIOTECA IFC

- ✔ La adición de nutrientes al medio de cultivo influye sobre el pH de la reacción; cuando se adicionó Nitrato de Amonio como fuente de nitrógeno para el microorganismo el medio se torno ácido y al adicionar Urea este se alcalinizó.
- ✔ En el proceso de pasteurización se inactivan o desnaturalizan las estructuras de los azucres fermentables creando en el medio un decrecimiento de la fuente de carbono, lo cual conlleva a que los microorganismos disminuyan su rendimiento en el proceso de fermentación.
- ✔ En la fermentación alcohólica del azúcar mediada por levaduras se obtiene como producto principal alcohol etílico aunque hay una leve formación de glicerol, el pH juega un papel muy importante durante el proceso, si el pH del medio es alcalino se incrementa la síntesis de glicerol.
- ✔ En el ensayo experimental I, después de transcurridos 15 días la máxima concentración de glucosa obtenida fue de 0,113 g/L a partir de 40 gramos de bagazo de caña de azúcar.
- ✔ En el ensayo experimental II, se partió de una concentración de glucosa de 0,64 g/L, de la cual se obtuvo después de 48 horas de fermentación una concentración de alcohol de 0,11%.
- ✔ En el ensayo experimental III, en el tratamiento 2 que presentaba una concentración de microorganismos de 10^6 y una concentración de nutrientes de carbono – nitrógeno en relación 1:2, se obtuvo una concentración de alcohol de 0,44% a las 72 horas de fermentación.

- ☛ En el ensayo experimental IV, en el tratamiento con bagazo de caña de azúcar previamente fermentado (B₂), se obtuvo la mayor concentración de glucosa 3,75 g/L a los 14 días de iniciado el proceso de hidrólisis. La mayor concentración de alcohol fue de 1,05% la cual se obtuvo a las 72 horas de fermentación con una concentración de microorganismos de 10⁶.
- ☛ La mayor concentración de alcohol obtenida fue de 6,3%; la cual se produjo a las 216 horas de fermentación en el sistema continuo de dos fases, tratamiento en el cual se obtuvo la mayor eficiencia en producción de alcohol.

5 RECOMENDACIONES

-  Realizar un pretratamiento biológico, para llevar a cabo la delignificación del sustrato por medio de un microorganismo (Actinomycetes, Streptomyces spp, Coprinus spp.) de la podredumbre blanca y de esta manera incrementar la digestibilidad de la celulosa.
-  La formación de ácidos orgánicos volátiles (acético, butírico), aldehídos o cetonas generan malos olores, para evitar el arrastre de estos ácidos se puede neutralizar la muestra con soda al 1N hasta un pH: 8.0.
-  En los procesos de obtención de alcohol por fermentación siempre se produce una mezcla alcohol - agua, luego se sugiere concentrar esta mezcla por medio de una destilación fraccionada adicional.
-  Realizar investigaciones complementarias para mejorar y optimizar el proceso de obtención de alcohol a partir del bagazo de caña de azúcar, empleando el biorreactor de sistema continuo.
-  En base a este trabajo de grado, realizar tratamientos similares con otros residuos de las plantas como lo son las hojas, los tallos y las raíces, de esta manera se daría uso adecuado a estos desechos que son potencialmente contaminantes.
-  Aumentar la temperatura a valores entre 40 y 50°C durante la fase de hidrólisis, para conseguir velocidades más altas de conversión y evitar los riesgos de contaminación.

- Basados en los resultados experimentales y obtenidos con la producción del 6,3% de alcohol, el proceso se puede optimizar en disminución de tiempo y aumento del producto.

BIBLIOGRAFIA

- 1- AGUILAR, Fabiola y DIAZ, Martha Lucia. 1998. Bioproducción de un suplemento alimenticio para bovinos a partir de pulpa de café. Escuela de Biología, Maestría en Microbiología Industrial; Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- 2- ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS. ENGINE COOLANTS, HALOGENATED. ORGANIC SOLVENTS; INDUSTRIAL CHEMICALS. Section 15. Volume 15.05. E 1100 – 86, E 346.
- 3- ARIZA G, Martha & FORERO B, Manuel. 1978. Obtención de Alcohol por Fermentación a partir del Bore. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industria de Santander. Bucaramanga.
- 4- BALCUCHO C, José Luis. 1999. Bio-producción de pienso a partir del bagazo de caña de azúcar como alimento para el ganado vacuno. Escuela de Biología. Maestría en Microbiología Industrial. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- 5- BIKALES, Norbert M. & SEGAL, León. 1971. Cellulose and Cellulose Derivatives. Part V, by John Wiley & Sonc. Inc. New York.
- 6- CRUEGER, Wulf; CRUEGER, Anneliese. 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Recuperación de Productos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. P. 132-135.
- 7- BOLIVAR G, Alix; CARREÑO, Mariela. 1997. Producción Biotecnológica de Ácido Glicolico mediante la acción metabólica de *Aspergillus niger*. Universidad Industrial de Santander, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Maestría en Microbiología Industrial. Bucaramanga.

- 8- BROCK, Thomas D; SMITH, David W; MADIGAN, Michael T. 1997. Biología de los Microorganismos, 4ª edición. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México.
- 9- BU'LOCK, J; BJORN, Kristiansen. Biotecnología Básica. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España.
- 10- BUZAS, Zs; DALLMANN, K; SAJAN, B. Influence of pH on the Growth and Ethanol Production of Free and Immbilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 882-884 (1989).
- 11- CACERES R, Amparo; 1985. Estudio Técnico-económico sobre la Obtención de Carboximetil- Celulosa a partir de Bagazo de Caña en Santander. Escuela de Ingeniería Industrial. Universidad Industria de Santander. Bucaramanga.
- 12- CAÑAS N, Liliana.1989. Determinación de la influencia de los factores de mayor incidencia en el proceso de Fermentación Alcohólica en la Empresa Licorera de Santander. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- 13- CARRIZALES, Víctor. 1981. Producción de Enzimas Extracelulares en Cultivos Semisólidos. Simposio Interamericano sobre Biotecnología de Enzimas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional de México. México.
- 14- CASTILLO, J J. 1992. Preliminary evaluation of the ethanol production from enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Ethanol from sugarcane bagasse. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. # 8, P. 425-427.
- 15- Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Cenicaña; Informe Anual de 1998.
- 16- CORREA, Jorge. 1988. Preparación, Almacenamiento y Conservación del bagazo para la industria de derivados y subproductos de la agroindustria azucarera. Colección GEPLACEA, serie de diversificación.

-
- 17- CRUEGER, Wulf; CRUEGER, Anneliese. 1993. Biotecnología Industrial. Editorial Acribia, S. A. 3ª edición. Zaragoza, España.
- 18- DÍAZ L, L; HERRERA G, A. 1983. Estudio sobre el comportamiento de levaduras del Género *Candida* spp, en presencia de materiales celulósicos de la caña de azúcar. Revista Ciencias Biológicas, 14, 2. Lab. de Fermentaciones, Dpto. de Microbiología, Fac. de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. P. 265-281.
- 19- DUEÑAS, R; R.P Tengerdý; GUTIERREZ. C, Marcela. 1995. Cellulase Production by Mixed Fungi in Solid Substrate Fermentation of Bagasse. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11 (3): 333-337.
- 20- Dynamic Interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Cel 6A and Cel 7A and cellulase at equilibrium and during Hydrolysis. 1999. Applied and Environmental Microbiology. Dec. Vol 65, #12, p 5229-5233.
- 21- ESCANDELL U, Dennis; RUBIO G, Ángel. 1998. Comprensibilidad de la paja de caña de azúcar. Cuba. Revista del Ministerio de Educación Superior de la Republica de Cuba. Editorial Feijoo. Centro Azúcar número 1, año 25 enero-abril. P.88-90.
- 22- FABELO F, José A; MARTÍNEZ M, Lourdes; CORREA C, Yania. 1998. Estudio Estadístico de la etapa de Fermentación Alcohólica para diferentes Sistemas de Sustratos. Revista del Ministerio de Educación Superior de la Republica de Cuba. Editorial Feijoo. Centro Azúcar Número 2, año 25 mayo-agosto. P.27-30.
- 23- FRAZIER, W. C. 1981. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 2ª Edición.
- 24- GOMEZ P, Cesar & PEÑA A, Ramón. 1984. Obtención de Cartón Tabla a partir de Bagazo de Caña. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

- 25- GUERRA, G & ABÍN, L; HERRERA, A. 1984. Aislamiento y Caracterización de Hongos Filamentosos Celulolíticos. Revista Ciencias Biológicas, 15, 1. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. P. 17-38.
- 26- GUTIERREZ DE PIÑERES, Jairo. 1995. Posible Aplicación del Bagazo y del Bagazo de Caña de Azúcar Calcinado en la Elaboración de Elementos Estructurales y no Estructurales del Concreto Aligerado. C6047. BIBLIOTECA UIS.
- 27- HERRERA COELLO, Nelsy; DIAZ RODRÍGUEZ, Inocencia. 1998. Los Residuos de la Industria Alcoholera como fuente de sustrato para la Producción de Proteína Unicelular. Revista del Ministerio de Educación Superior de la Republica de Cuba. Editorial Feijoo. Centro Azúcar Número 3, septiembre-diciembre. P. 16-19.
- 28- HERRERA G, Alberto; CASADO P, Gisela. 1988. Manual de practicas de Laboratorio de Microbiología Industrial. Universidad de La Habana. Cuba.
- 29- http://148.247.12.108/L_amb.htm
- 30- http://148.247.12.108/L_apr-agr.htm
- 31- http://193.145.98.203/biomasa/bio04/bio04_41.htm
- 32- http://193.145.98.203/biomasa/bio04/fig04_06.htm
- 33- <http://200.10.82.2/simbiosis/publicaciones.htm>
- 34- <http://amatl.dmcyp.udg.mx/>
- 35- <http://ambiente-ecologico.com/revist53/alnalft.htm>
- 36- <http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/bioprocessing/bioconversion.html>
- 37- http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/bioprocessing/bioprocess_intro.html
- 38- http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/bioprocessing/bioprocess_feed.html

-
- 39- <http://chandra.uam.mx/cbi/microbiologia/mic0.html>
- 40- <http://obrazky/houby/trich1.gif>
- 41- <http://staff.vscht.cz/win/kch/galerie/>
- 42- <http://sucrose.com/power.html>
- 43- <http://webserver.pue.udlap.mx/-pweshe/3.3html>
- 44- <http://www.ambiente-ecologico.com/revist65/escavo65.htm>
- 45- <http://www.cib.csic.es/-celulosa/celulosa-es.html>. 1997
- 46- <http://www.conae.gob.mx/renovables/biomasa.html>
- 47- <http://www.cubarte.cult.cu/publi/catalogo/cat.html>
- 48- <http://www.drwebsa.com.ar/aam/revvol31/v31-1-02.htm>.
- 49- <http://www.dsmz.de/media/med090.htm>
- 50- <http://www.ecouncil.ac.cr/centroam/conama/patro.htm>
- 51- <http://www.etsea.udl.es/invitro/ambiente.html>
- 52- <http://www.etsea.udl.es/invitro/ph.htm>
- 53- <http://www.excelsior.com.mx/9904/990417/nac23.html>
- 54- <http://www.gbf.de:81/dsmz/media.htm>
- 55- http://www.geocites.com/rap_al/enlace45.htm
- 56- <http://www.geocities.com/ResearchTriangle/Lab/2574/home.html>
- 57- <http://www.guegue.com.ni/free/gercat/contamin.htm>

- 58- <http://www.ideam.gov.co/geomorfologia/docs/moint.htm>
- 59- <http://www.lafacu.com/apuntes/medicina/desinfectantes/>
- 60- <http://www.lamolina.edu.pe/simbiosis/proyecto.htm>
- 61- <http://www.link.springer-ny.com/link/service/journals/00253/bibs/6046005/60460489.htm>
- 62- <http://www.pangea.org/-umitjans/incin.html>
- 63- <http://www.papeleranacional.com/bagazo.htm>
- 64- <http://www.sdcom.org/ethecon.html>
- 65- <http://www.serpiente.dgsca.unam.mx/pual/notitec4/producción.html>
- 66- <http://www.sucrose.com/harvest.html>
- 67- <http://www.sucrose.com/lcane.html>
- 68- <http://www.unex.es/botanica/hongos31.htm>
- 69- <http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/80434e/80434E06.htm>
- 70- <http://www.uv.es/-cutillas/tesis1.html#16>
- 71- <http://www.uv.es/-cutillas/tesis1.html#29>
- 72- <http://www.uv.es/-cutillas/tesis1.html#33>
- 73- <http://www.uv.es/-cutillas/tesis4.html#4>
- 74- Kinetic study on β -glucosidase catalyed reaction of *Trichoderma viride* cellulase. Applied Microbiology and Biotechnology Vol, 38, p 350-353. 1992.

75- KONEMAN, Elmer W; ALLEN, Stephen D; DOWELL, V. R. 1983. Diagnostico Microbiológico. Editorial Medica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina.

76- LECCIONES HIPERTEXTUALES DE BOTÁNICA. LOS HONGOS...

77- LEON T, AmLeto. 1997. Producción de Etanol a partir del Almidón de Papa mediante Acción Combinada con *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, y Evaluación de los Productos Intermedios formados durante el Bioproceso. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

78-LIAW, Ean-Tun; PENNER, Michael H. 1990. Substrate-Velocity Relationships for the *Trichoderma viride* Cellulase-Catalyzed Hidrolysis of Cellulose. Applied and Environmental Microbiology, Aug. Vol 56, # 8, p 2311-2318.

79- LINDER, Markus et al. 1998. Improved Immobilization of Fusion Proteins Via Cellulose-Binding Domains. Biotechnology and Bioengineering. Volumen 60, Number 5, December 5, p 642-647.

80- MAGLIONE, Giuseppe; RUSSELL, James B; WILSON, David B. 1997. Kinetics of Cellulose Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Applied and Environmental Microbiology, Feb, Vol 63, # 2, p. 665-669.

81- MALDONADO, M. I; HERRERA G, A. 1983. Efecto de algunas sustancias orgánicas sobre el crecimiento de levaduras cultivadas con carboximetilcelulosa. Revista Ciencias Biológicas, 14, 2. Lab. de Fermentaciones, Departamentos de Microbiología y Virología, Fac. de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. P. 299-309.

82- MANOSALVA, Aidaly & BADILLO, Carlos. 1979. Obtención de Alcohol Etilico a partir de la Yuca. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

83-ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo; MIGNONE, Carlos. 1994. Microbiología Industrial. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

84- MANUELITA S.A. Manual Informativo. Azúcar Alta Pureza. Km 7, Carretera a Buga. A.A. 207 Palmira. Valle del Cauca.

85- MEZA D, Julio & YAÑEZ F, Luis. 1979. Obtención de Alcohol a partir del Banano. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

86- Microbiología de la Celulosa. Capítulo 10. páginas 163 – 178.

87- MONROY H, Oscar; VINIEGRA G, Gustavo. 1981 Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos. AGT Editor, S. A. México.

88- MORA, Christian J. 1997. Bases para el Desarrollo Agropecuario del Siglo XXI, Agricultura Orgánica y Biológica. CORPOICA, Santander.

89- NIEBLAS A, Fernando R; NÚÑEZ C, Jorge L. 1998. Resultados del Análisis Granulométrico del Bagazo en varios Complejos Agroindustriales de Villa Clara. Revista del Ministerio de Educación Superior de la Republica de Cuba. Editorial Feijoo. Centro Azúcar No 3, Septiembre-Diciembre. P. 20-23.

90- PELCZAR, R.D. 1997. Microbiología, 4ª edición. Mc Graw Hill, Buenos Aires.

91- PRÄVE, Paul. FAUST, Uwe. 1984. Handbuch der Biotechnologie. 2.Auflage / studienausgabe. R. Oldenbourg Verlag München Wien

92- Producción de Proteína Microbiana a partir de la Caña de Azúcar y sus Subproductos. P. 175-193.

-
- 93- QUINTANA P, Cándido; GONZALES G, René; TURÍÑO H, Iván M; ALBERNAS J, Alex. 1998. "Impacto Ambiental debido a la Combustión de la Biomasa Cañera en la Industria Azucarera Cubana". Revista del Ministerio de Educación Superior de la Republica de Cuba. Editorial Feijoo. Centro Azúcar Número 2, año 25 mayo-agosto. P. 48-52.
- 94- QUINTERO R, Rodolfo. 1987. Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. Alambra Mexicana. S. A. Impreso en México.
- 95- REVISTA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA LUZ, Universidad del Zulia. Volumen 14/97 (1y2); Volumen 15/98 (3).
- 96- Revista de Mares ECOPETROL./ 77-78-79.
- 97- RODRÍGUEZ, V. R; Villanueva, V. G.; RIOS, L. E. 1992. Sugarcane Bagasse pith Dry pretreatment for single Cell Protein Production. En: Bioresource Technology. Vol. 39, N° 1. p 17-22. Inst. Politécnico Nacional de México.
- 98- ROYER, John C; NAKAS, J P. 1990. Interrelationship of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma longibrachiatum*. Applied and Environmental Microbiology, Aug. Vol 56, #8. p. 2535-2539.
- 99- SAIS, Tania; GARCIA, Agustín; MORALES, Aleida. 1977. Estudio de la Flora microbiana del bagazo fresco a escala semi-industrial. Centro Azúcar; Revista del consejo científico del azúcar y derivados. Universidad Central de las Villas. Cuba. Año IV # 2 Mayo-Agosto.
- 100- SAMSOM, Robert. A; HOEKSTRA, Ellen S; N. VAN OORSCHOT, Connie A. 1981. Introduction to food-Borne fungi. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands. Academy of Arts and Sciences.

101- SANABRIA R, Fernando; TAFURTH Y, Orlando. 1980. Estudio del mejoramiento de la Combustión del Bagazo de la Caña de Azúcar en los Trapiches Paneleros. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

102- REY. M, L. Marina; HERNÁNDEZ. A, Octavio. 1999. Producción de biomasa enriquecida a partir de desechos post-cosecha de Ahuyama (*Cucúrbita máxima*). Escuela de Biología. Post-grado Microbiología Industrial. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

103-CEPEDA. G, Vladimir; ZORRO. G, Ana L. 1998. Utilización Biotecnológica del Bagazo de Caña de Azúcar para la Producción de Hongos Comestibles tipo *Pleurotus ostreatus*. Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

104- WILLARD R, John, Ph. D. 1990. Tratado de Micología Médica. Tercera edición, Interamericana Mc Graw Hill. México.

105- WISEMAN, Alan. 1991. Manual de Biotecnología de los Enzimas. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza, España. P 334.

106- ZAUSHER, V. F. 1992. Estudio de la degradación microbiana de algunos desechos agrícolas y agroindustriales para la producción de biomasa. UIS, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bucaramanga.

107- HORWITZ, William. 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). p. 889-907. Washington. Estados Unidos.

Anexo A. Técnica para la preparación de microcultivos

El fin de la realización de este montaje es identificar estructuras reproductivas del microorganismo en estudio.

Materiales.

Caja de Petri, algodón, portaobjetos, cubreobjetos, cuchillo, pinzas y palillos estériles.

Reactivos.

Agar Malta, Azul de Lactofenol.

Metodología.

NOTA: Se recomienda trabajar con mechero encendido y utilizar tapabocas, además el material debe estar previamente esterilizado

- ☒ Preparar medio de cultivo de Agar Malta (...Ver sección 2.2.3.1...)
- ☒ Colocar algodón dentro de una caja de Petri, de manera extendida.
- ☒ Colocar sobre el algodón dos palillos conformando una V y sobre ellos un portaobjetos.
- ☒ Colocar tres cubreobjetos sobre los espacios libres del algodón.
- ☒ Tapar la caja de Petri y esterilizar en autoclave.
- ☒ Cortar, a temperatura ambiente, el Agar Malta en cuadros de menor área que el cubreobjeto.

- Colocar con pinzas dos cuadros de Agar Malta sobre el portaobjetos que se introdujo en la caja de Petri. (Figura 40)
- Tomar una pequeña muestra de una cepa del microorganismo joven, con un asa de aluminio de punta recta y sembrar por perforación en cada uno de los cuatro lados del cuadro de Agar.
- Cubrir con los cubreobjetos esterilizados dentro de la caja de Petri.
- Humedecer el algodón con agua destilada estéril, para brindar un ambiente húmedo al microorganismo, y tapar la caja de Petri.
- Flamear los bordes de la caja y sellar con cinta de enmascarar.
- Dejar en incubación a temperatura ambiente durante cinco días.
- Sobre un portaobjeto depositar una gota de azul de lactofenol.
- Destapar el microcultivo de la caja de Petri, levantar uno de los cubreobjetos y ubicarlo sobre el portaobjeto que contiene azul de lactofenol.
- Realizar la observación microscópica de las estructuras reproductivas.

Resultados.



Figura 41. Microcultivo de *Trichoderma viride*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA. Se observa buen crecimiento del microorganismo en cada uno de los puntos de picadura de siembra. Las colonias presentaron un color verde oscuro intenso y una buena dispersión en el borde del Agar Malta.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA. Al realizar la metodología indicada se observaron estructuras fúngicas bien definidas, tales como: varias aglomeraciones de hifas septadas, conformando la estructura del hongo; un promedio alto de conidias en germinación, tubos germinativos; gran cantidad de conidiosporas.

BIBLIOTECA UIS

Anexo B. Determinación del incremento en biomasa de *Trichoderma viride*

Cuadro 25. Cinética de crecimiento.

TRATAMIENTOS	TIEMPO DE CRECIMIENTO (días)	PESO PROMEDIO (g)
1	1	0.4
2	2	0.75
3	3	1.25
4	4	0.95
5	5	1.1
6	6	1.2
7	7	1.25
8	8	1.1
9	9	0.9
10	10	0.8

Los datos obtenidos en cada tratamiento se promediaron con su respectivo duplicado, para obtener los valores que determinaron el incremento de la biomasa del microorganismo en el transcurso del proceso.

Anexo C. Determinación de la concentración de alcohol por medio del método de gravedad específica.

TIEMPO DE FERMENTACION (horas)	VOLUMEN DESTILADO mL	DENSIDAD (g/mL a 25/25 °C)	ALCOHOL (%V/V) *	ALCOHOL (% V/V) **
24	15	1.0029	0	0
48	19	1.0019	0	0
72	19	1.0002	0	0
96	25	0.9988	0.80	0
120	18	0.9981	1.27	0,2
144	22	0.9983	1.14	0,3
168	10	0.9157	56,32	5,6
192	9	0.9002	63,19	5,7
216	9	0.8850	69,50	6,3
240	13	0.9396	44,40	5,8
264	9	0.8873	68,57	6,2

* Valor de la concentración del etanol en el volumen destilado, a partir de este valor se obtuvo la concentración del volumen inicial.

** Valor de la concentración de etanol en el volumen inicial. (100 mL)

El tiempo promedio que duró cada destilación fue de 2 horas, otro parámetro representativo en este proceso fue la temperatura, teniendo como base el punto de ebullición del etanol.

Anexo D. Instituciones vinculadas con el cultivo y procesamiento de la caña de azúcar

ATAC:	Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba.
CENICAÑA:	Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia.
CIAMSA:	Sociedad Comercializadora Internacional de Azúcares y Mieles.
CIB:	Corporación para Investigaciones Biológicas.
CIEMAT:	Centro de Investigaciones energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
CIMPA:	Centro de Investigaciones para el Mejoramiento de la Producción de Panela, Barbosa. Santander.
CINDEFI:	Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.
CONAE:	Comisión Nacional para el Ahorro de Energía.
CORPODIB:	Corporación para el Desarrollo Industrial de la Biotecnología.
DICSA:	Desarrollos Industriales y Comerciales.
ICIDCA:	Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar.
IOBB:	Organización Internacional de Biotecnología y Bioingeniería.
TECNICAÑA:	Sociedad Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar.