

**PRODUCCIÓN ESTIMULADA DE ALCOHOL A PARTIR DE MIELES DE CAÑA  
MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO OBTENIDO DE *Rhizopus* spp.**

**ADRIANA ESTHER PUENTES VEGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2008**

**PRODUCCIÓN ESTIMULADA DE ALCOHOL A PARTIR DE MIELES DE CAÑA  
MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO OBTENIDO DE *Rhizopus* spp.**

**ADRIANA ESTHER PUENTES VEGA**

Proyecto de Grado para optar al título de Bióloga

**Director**

**EDGAR FERNANDO CASTILLO**

**Dr. Ingeniería Química**

**Co- directora**

**GRACIELA CHALELA ALVAREZ**

**MSc., Dr. rer. nat.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2008**

*A mi Familia,  
Por darme valor y fuerza.*

*A mis padres Jairo y Concepción,  
y mi hermana Johanna  
por su amor, apoyo, paciencia y  
porque a pesar de las dificultades siempre  
estuvieron alentándome para alcanzar esta meta.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Graciela Chalela Álvarez, por cambiarme la vida, con su orientación, paciencia, dedicación y especialmente con su respaldo y amistad en los momentos más difíciles.

Al Doctor Edgar Fernando Castillo, por su amabilidad y por plantear la idea que permitió la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA), de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB), por la financiación y realización de este proyecto.

A Pilar y Helga, asistentes de la Doctora Graciela Chalela en el laboratorio del CINBBYA, por su ayuda constante e incondicional en el laboratorio.

A Eduardo, coordinador del laboratorio de Procesos Industriales de Ingeniería Química de la UIS.

A Javier Fernández, por su apoyo incondicional, gran cariño y amistad.

A mis compañeros tesisistas del laboratorio del CINBBYA por contribuir con sus consejos y colaboración que llevaron a un final feliz este proyecto.

A Alex Méndez, por ser mi gran amigo y compañero del alma.

Y a todas las personas que colaboraron en la realización de este proyecto Muchas Gracias.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	1
1. JUSTIFICACIÓN	5
2. OBJETIVOS	8
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 Caña de Azúcar	10
3.1.1 Cultivo de la Caña en Colombia	13
3.2 Producción de Etanol	15
3.2.1 Vinazas	19
3.2.1.1 Compostaje	20
3.3 Enzimas	22
3.3.1 Tecnología Enzimática	26
3.3.1.1 Amilasas	28

3.3.2 Microorganismos Fuentes de Enzimas	30
3.4 Género Rhizopus	30
4. METODOLOGÍA	33
4.1 Caracterización de la miel de caña proveniente de la Hoya del Río Suárez	34
4.1.1 Descripción Microbiológica	34
4.1.1.1 Preparación de Medios de Cultivo	34
4.1.1.2 Siembra de la muestra	34
4.1.1.3 Descripción Macro y Microscópica de la Microbiota	35
4.1.2 Caracterización Físico- química	35
4.2 Aislamiento de Cepas Nativas de Rhizopus spp.	35
4.2.1 Toma de muestras	35
4.2.2 Identificación y Aislamiento de Rhizopus spp.	36
4.3 Producción del Complejo Enzimático Crudo a partir de Rhizopus spp.	36
4.3.1 Extracción del Complejo Enzimático Crudo	36
4.3.2 Determinación de los Azúcares Reductores	37

4.3.3 Determinación de Glucosa	38
4.3.4 Determinación de Amilasa	38
4.4 Fermentaciones Alcohólicas a partir de miel de caña	39
4.4.1 Activación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
4.4.2 Producción de Etanol	39
4.4.3 Destilación del Producto de la Fermentación	40
4.4.3.1 Tratamiento Estadístico de los Datos	41
4.5 Tratamiento de las Vinazas generadas en las Fermentaciones	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1 Caracterización de las mieles de caña provenientes de la Hoya del Río Suárez	42
5.1.1 Análisis Microbiológico de las mieles de caña	42
5.1.2 Análisis Físico- químico de las mieles de caña	43
5.2 Aislamiento de Cepas Nativas de <i>Rhizopus</i> spp.	44
5.3 Producción del Complejo Enzimático Crudo Obtenido de <i>Rhizopus</i> spp.	45

5.3.1 Determinación de Azúcares Reductores y Glucosa	46
5.3.2 Determinación de Amilasa	48
5.4 Fermentación Alcohólica de la miel de caña	48
5.4.1 Producción de Etanol	48
5.4.2 Destilación del Producto de la Fermentación	57
5.4.2.1 Análisis Estadístico de los Datos	59
5.4.2.1.1 Destilado obtenido (mL)	60
5.4.2.1.2 Concentración de Etanol (%v/v)	62
5.5 Tratamiento de las Vinazas	63
6. CONCLUSIONES	65
7. RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68
ANEXOS	79

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Fig. 1. Caña de Azúcar.	10
Fig. 2. Zonas de Cultivo de Caña en Colombia con Potencial para la Producción de Bioetanol (L/día).	13
Fig. 3. Formación de Etanol a partir de Glucosa por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Fig. 4. Observación microscópica de <i>S. cerevisiae</i> .	17
Fig. 5. Ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i> .	18
Fig. 6. Subproductos de la Industria de la caña de azúcar y su utilización en el compostaje.	21
Fig. 7. Modelos de Acción enzimática A. Llave y Cerradura de Fisher B. Adaptación Inducida de Koshland	23
Fig. 8. Características microscópicas de <i>Rhizopus</i> spp.	31
Fig. 9. Ciclo de vida de <i>Rhizopus</i> .	32
Fig. 10. Diagrama de la Metodología utilizada en la Investigación.	33

Fig. 11. A. y B. Observación Macroscópica de los Microorganismos aislados a partir de la miel de caña.	43
Fig. 12. Cepas del género Rhizopus.	45
Fig. 13. Fermentaciones de salvado de trigo con Rhizopus spp. para la Producción de un Complejo Enzimático Crudo.	46
Fig. 14. Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 1.	50
Fig. 15. Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 2.	51
Fig. 16. Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 3.	52
Fig. 17. Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 4.	53
Fig. 18. Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 5.	54
Fig. 19. Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 6.	55
Fig. 20. Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 7.	56
Fig. 21. Destilado obtenido (mL) en los Tratamientos.	60

Fig. 22. Concentración de Etanol (% v/v) en los Tratamientos.	62
Fig. 23. Observación del Proceso de Mezcla de Vinazas y paja de caña	64
Fig. 24. Absorbancia vs Concentración de glucosa (mg/dL).	79

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Componentes de la Caña de Azúcar.	11
Tabla 2. Subproductos de la Caña de Azúcar, Procesos de Transformación y su utilización en la Industria.	12
Tabla 3. Composición Química de la vinaza según proceda de jugo, melaza o la mezcla de ambos.	19
Tabla 4. Diseño Experimental de los Tratamientos para Producción de Etanol y sus Concentraciones.	40
Tabla 5. Microorganismos Nativos de las mieles de caña	42
Tabla 6. Características Físico químicas de la miel de caña.	44
Tabla 7. Actividad de la Amilasa en los complejos enzimáticos.	48
Tabla 8. Azúcares Reductores (g/100mL) en los Tratamientos a través del Tiempo de Fermentación.	49
Tabla 9. Resultados del Etanol destilado y su Concentración en los Tratamientos.	58

Tabla 10. Resultados del Test de Tukey.	61
Tabla 11. Resultados del Test de Duncan.	61
Tabla 12. Composición Química de las Vinazas.	63

## RESUMEN

**TITULO: PRODUCCIÓN ESTIMULADA DE ALCOHOL A PARTIR DE MIELES DE CAÑA MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO OBTENIDO DE *Rhizopus* spp.\***

**AUTOR: ADRIANA ESTHER PUENTES VEGA \*\***

**PALABRAS CLAVES:** Mieles de caña, *Rhizopus* spp., Complejo enzimático crudo, amilasa, etanol.

En la actualidad la comunidad internacional realiza grandes esfuerzos para disminuir su dependencia a los combustibles fósiles tradicionales buscando fuentes de energía renovables como por ejemplo la biomasa vegetal y ambientalmente más limpias como los biocombustibles; las mieles provenientes de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) presentan un alto contenido de azúcares fermentables, que posicionan a este sustrato entre los más importantes para la producción de bioetanol mediante el uso de levaduras particularmente *Saccharomyces cerevesiae*.

La presente investigación plantea el aumento en la producción de etanol mediante la obtención de un complejo enzimático crudo producido por la fermentación sobre salvado de trigo de cepas nativas de *Rhizopus* spp. y su utilización en procesos fermentativos de mieles de caña, así como la comparación frente a un complejo enzimático comercializado por la empresa Alltech, y otro producto de una investigación anterior desarrollado por el CINBBYA de la UNAB. Los resultados mostraron un aumento en la producción de etanol para las fermentaciones con adición de los complejos enzimáticos de aproximadamente un 4% v/v con respecto a un tratamiento control sin enzima. Los complejos enzimáticos de mayor rendimiento son el complejo enzimático comercial Alltech y el complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp. en concentraciones de 60 ppm.

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, UIS, Director Edgar Fernando Castillo, Codirectora Graciela Chalela Álvarez.

## ABSTRACT

**TITLE: STIMULATED PRODUCTION OF ALCOHOL COMING FROM CANE'S HONEY BY AN ENZYMATIC COMPLEX OBTAINED FROM *Rhizopus* spp \***

**AUTHOR: ADRIANA ESTHER PUENTES VEGA \*\***

**KEYWORDS:** Cane's Honey, *Rhizopus* spp., enzymatic crud complex, amylase, ethanol.

Actually the international community is making huge efforts to stop their dependence from the traditional fossil combustible looking for renewable energy sources as for example vegetable biomass or cleaner sources for the environment like combustibles which are crated biologically. The honey which comes from the sugar cane (*Saccharum officinarum*) has a big quantity of fermentable sugar which possessions it as one of the most important substrates for the production of bioethanol by the using of particular yeast (*Saccharomyces cerevesiae*). This investigation establishes an increase of ethanol's production obtaining an enzymatic crud complex produced by the fermentation over wheat bran of the underground parts of *Rhizopus* spp, and their utilization over fermentative processes of cane's honey and also its comparison towards an enzymatic complex commercialized by Alltech, and another product of a previous investigation developed by CINBBYA from UNAB.

The results showed an increase of the production of ethanol for the fermentations with addition of the enzymatic complex of approximately 4% v/v in comparison with the control treatment without enzymes. The enzymatic crud complex of better performance belongs to the enzymatic complex of Alltech and the enzymatic crud complex of *Rhizopus* spp with concentrations of 60ppm.

\*Degree Project

\*\* Science Faculty, Biology School, UIS, director Edgar Fernando Castillo, Codirector Graciela Chalela Álvarez.

## INTRODUCCIÓN

Una de las áreas tecnológicas aplicadas que más rápidamente avanza actualmente es la biotecnología; esta integra a la bioquímica y la microbiología en el uso de agentes biológicos de distinta naturaleza, desde plantas y animales hasta microorganismos para obtener productos de utilidad en muy diversos campos: farmacéutico, diagnóstico, agrícola, alimentario, ambiental, etc.; la política de desarrollo internacional la considera como pieza clave y fundamental para el progreso industrial y económico de las naciones (Becker, *et al.*, 1999).

La industria biotecnológica ha tenido gran repercusión en la medicina, agricultura, la generación de energía y la producción de alimentos, de allí que sea considerada como la gran revolución técnica de este siglo, la cual ha logrado una serie de avances tendientes a la disminución de precios de los procesos industriales, ahorro de energía, eliminación de residuos contaminantes y sustitución de productos y aditivos en la alimentación humana y animal. Entre estos avances se destaca la producción de biomasa, de enzimas solubles e inmovilizadas, de ácidos aminados, de biocombustibles, de saborizantes y otros productos. (Glazer, 1998).

La actualidad mundial enfrenta el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos, en su mayoría combustibles no renovables de origen fósil, a esta problemática se suma el acelerado aumento en el consumo de energía; hechos que direccionan el ejercicio investigativo hacia la búsqueda de una alternativa energética de origen renovable que supla eficientemente la demanda mundial (Chum, *et al*, 2001; Roehr, 2001).

La biomasa de más de 300 especies vegetales, entre las que podemos nombrar la soya, la colza, la palma africana, el girasol, el maíz, el sorgo, la yuca, la remolacha, la caña de azúcar, el bagazo, etc., puede ser procesada de múltiples formas para la obtención de una amplia variedad de productos energéticos, como el etanol, el biodiesel, el metanol, el hidrógeno, el butanol, entre otros, posiciona a los combustibles de origen biológico como los principales sustituyentes parciales de los energéticos fósiles tradicionales como el petróleo y el carbón (Macedo, 1996; Ballesteros, 1997; Sánchez, 2005; Vidmantiene, *et al.*, 2005).

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), es una planta de la familia Poaceae caracterizada por sus tallos gruesos, blandos y jugosos, los cuales presentan una variedad de colores que pueden ir desde el amarillo pálido a púrpura oscuro, combinaciones de estos y rayas multicolores. Muchas de estas plantas tienen alto contenido de azúcares, elevada pureza en sus jugos y bajo contenido de fibra y almidón. Se puede distinguir gran variabilidad para muchos caracteres económicos y botánicos, incluyendo el contenido de sacarosa y la resistencia a las enfermedades, pero son uniformes en cuanto a su baja adaptabilidad al estrés ambiental y por ser un excelente cultivo para producir energía debido a su elevado nivel de eficiencia en el proceso fotosintético, condición que lo ubica como la primera opción para la producción de alcohol carburante a partir de uno de sus principales derivados, las mieles, ricas principalmente en sacarosa y otros azúcares. (Domingos, 1995; Sánchez, 2004; Suárez, *et al.*, 2005; Xavier, 2007).

En Colombia la producción de alcohol se destina principalmente como base para bebidas alcohólicas, pero también un alto porcentaje es utilizado como alcohol antiséptico, como solvente y últimamente como aditivo para la gasolina, la cual precisa mezclarse con oxigenantes que proporcionen un aumento en su octanaje otorgándole una mayor combustión, logrando disminuir las emisiones

contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente, tales como el benceno, el tolueno, el etilbenceno, el xileno y el monóxido de carbono, causantes de la contaminación ambiental y del fenómeno de calentamiento global; por lo tanto optimizar el proceso mediante el aprovechamiento máximo de la materia prima más utilizada, las mieles de caña, ha sido objetivo de muchas investigaciones (Ballesteros, 1997; Ancillotti, *et al.*, 1998; Calero, *et al.*, 2003; Ocampo, 2004).

La falta de una tecnología desarrollada en nuestro entorno que permita satisfacer las necesidades de la industria colombiana de alcohol, hace necesario el estudio y la optimización de los procesos biotecnológicos existentes, que permitan el total aprovechamiento de los recursos agroindustriales.

El uso de enzimas para hacer más eficiente el proceso de producción de etanol ha adquirido gran importancia; complejos enzimáticos producidos por especies del hongo *Rhizopus*, como resultado de su fermentación sobre sustratos sólidos ricos en celulosa y almidón, como el salvado de trigo, el amaranto, la cascarilla de arroz, entre otros, han logrado el beneficio esperado, incrementando la productividad del proceso, resultando un aumento en cantidad y concentración de alcohol (Sheehan, 1999; Acevedo, *et al.*, 2003; Hoyos, *et al.*, 2004).

La utilización de este complejo enzimático crudo como facilitador de la fermentación alcohólica, otorgará a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo encargado de fermentar las mieles de caña, una nutrición más completa, convirtiendo azúcares antes no fermentables en fermentables, lo cual llevará a aumentar la producción de etanol y a disminuir los residuos de carbohidratos sin fermentar que hacen parte de la carga orgánica de las vinazas

generadas en el proceso de fermentación, las cuales representan un problema ambiental considerable, logrando como resultado un proceso más óptimo, viable económicamente y amable con el medio ambiente, los cuales son los principales objetivos perseguidos por esta investigación (Acevedo, *et al.*, 2003).

La presente tesis tiene como hipótesis que, el uso de un extracto crudo a partir de cepas nativas de *Rhizopus* spp. puede ser una alternativa más rentable y eficiente, con relación al producto comercial disponible (Allzyme).

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos 20 años la mayoría de países han realizado grandes esfuerzos a fin de disminuir su dependencia del petróleo; como consecuencia se trabaja en el desarrollo de fuentes renovables de energía que se posicionen como una alternativa viable frente a los combustibles fósiles tradicionales. Paralelamente la creciente preocupación por la conservación del medio ambiente se evidencia en legislaciones puntuales que obligan a la utilización de combustibles menos contaminantes que los actuales. Así mediante la Ley 693 de 2001 el Gobierno Nacional reglamentó las normas sobre uso de alcoholes carburantes, la fijación de estímulos para producción, comercialización y consumo de estos y estableció la mezcla de gasolina con 10% de alcohol carburante a partir de Septiembre 27 de 2005 para las áreas metropolitanas de Barranquilla, Bogotá, Cali y Medellín y de Septiembre 16 de 2006 para las áreas metropolitanas de Bucaramanga, Cartagena, Cúcuta y Pereira (Colombia. Ministerio de Minas y Energía, 2003).

El bioalcohol representa una fuente de energía renovable, menos contaminante, con una gran potencialidad y variedad en cuanto a materias primas entre las que encontramos la biomasa lignocelulósica que incluye residuos agrícolas, forestales y sólidos urbanos, que comprenden aproximadamente el 50% de la biomasa mundial, originando una producción más limpia, eficiente y rentable en comparación con el combustible de origen petroquímico utilizado en la actualidad (Macedo, 1996; Moreira, *et al.*, 1999; Chum, 2001; Roehr, 2001; Sánchez, 2005; Xavier, 2007).

Siguiendo este orden de ideas una alternativa frente a los energéticos actuales debe cumplir con características como la de producir contaminación mínima, no provenir de fuentes fósiles y por lo tanto disminuir la adición neta de dióxido de carbono en la atmósfera el cual aumenta el efecto invernadero; debe también ser fácilmente almacenable, renovable y sobre todo se debe producir empleando tecnología de factibilidad probada y en cantidad suficiente para suplir la demanda (CORPODIB, 2002).

Dentro de este contexto se sitúa la presente investigación, la cual se inclina por la producción y utilización en la fermentación alcohólica de mieles de caña de complejos enzimáticos producidos por microorganismos, entre los cuales se destacan cepas nativas de *Rhizopus* spp., que se caracteriza por la producción de lipasas, macerasas, fitasas, rodanasas, hidrolasas, proteasas, amilasas, amiloglucosidasas, alcohol deshidrogenasas, y dextranasas, las cuales actúan sobre los polisacáridos convirtiéndolos en azúcares fermentables, mejorando el rendimiento del proceso de producción de alcohol y disminuyendo la carga orgánica presente en las vinazas, subproducto del bioproceso de fermentación alcohólica (Acevedo, *et al.*, 2003; Hoyos, *et al.*, 2004)

Asimismo establece parámetros directos de comparación en cuanto a la actividad enzimática, más específicamente las Amilasas y rendimiento del proceso entre un complejo enzimático crudo sintetizado por cepas nativas de especies de *Rhizopus* frente a la actividad de complejos enzimáticos comerciales producidos por industrias biotecnológicas internacionales que han dado muy buenos resultados, pero el costo después de las evaluaciones no las hace de interés económico (Carrera J. 2005), con el fin de proponer iniciativas reales de independencia tecnológica, aprovechando la microbiota nativa mediante su caracterización, aislamiento y utilización en bioprocesos industriales, definiendo líneas de

investigación y desarrollo de tecnologías propias, más económicas y efectivas (Chalela, 2007) .

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

- Obtener un complejo enzimático crudo a partir de *Rhizopus* spp. y su utilización para estimular la eficiencia de producción de etanol mediante la fermentación de mieles de caña con *Saccharomyces cerevisiae*, a escala de laboratorio.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar una caracterización físico-química y una descripción microbiológica de las mieles de caña provenientes de la región de la Hoya del Río Suárez, a utilizar como materia prima en el bioproceso, para identificar las propiedades y la microbiota nativa.
- Aislar e identificar cepas nativas de *Rhizopus* spp., a partir de diferentes sustratos como aire, suelo, frutas utilizando medios modificados, que induzcan el crecimiento del hongo.
- Obtener un complejo enzimático crudo a partir de las cepas aisladas de *Rhizopus* spp. sobre medios de cultivo preparados para estimular su producción, en fermentación en estado sólido, asegurando su mantenimiento y productividad.

- Evaluar la actividad enzimática del complejo enzimático crudo producido, comparándolo con un complejo enzimático comercial de la empresa Alltech y un complejo enzimático producido anteriormente en el Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente.
- Evaluar la producción de Etanol obtenido con la adición del complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp. y compararlo con una fermentación alcohólica control sin adición de enzima.
- Realizar una caracterización general de las vinazas obtenidas en los bioprocesos fermentativos de las mieles de caña y proponer un tratamiento biológico que permita disminuir el impacto ambiental de estas.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Caña de Azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Figura1), es uno de los principales cultivos agroindustriales a nivel mundial, debido al uso directo e indirecto de los productos y subproductos en la alimentación humana y animal, además es un cultivo conservacionista y cumple un papel importante como mejorador de las condiciones físicas de los suelos. Este es un cultivo permanente, que se cosecha en períodos que oscilan entre 12 y 24 meses (Domingos, 1995).

**Figura 1.** Caña de Azúcar (Tomado de Chalela, 2007)



La caña de azúcar pertenece al Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Liliopsida, Orden Poales, Familia Poaceae, Género Saccharum, Especie *Saccharum officinarum*.

El metabolismo fotosintético de esta planta C4, le confiere una alta eficiencia en la conversión de la energía radiante en energía química, con tasas fotosintéticas calculadas aproximadamente en 100 mg de CO<sub>2</sub> fijado por dm<sup>2</sup> de área foliar por hora (Domingos, 1995). Esta extraordinaria capacidad, que en buenas condiciones de cultivo produce volúmenes superiores a las 100 t/ha de tallos y si se incluyen las hojas y puntas, que no se emplean para la producción de azúcar, el volumen de biomasa vegetal se eleva en 20%. Por esto, el cultivo de la caña de azúcar representa un aporte ecológico de importancia como vía para aliviar el calentamiento de la atmósfera que se origina a través del llamado "efecto invernadero" (Suárez y Morín, 2005).

Los parámetros ambientales que más afectan los procesos de bioconversión de energía de la caña de azúcar son: luz (intensidad y cantidad), concentración de CO<sub>2</sub>, disponibilidad de agua y nutrientes y temperatura; este último es de los factores climáticos, mas importante para la producción de caña de azúcar. La planta, generalmente, es tolerante a altas temperaturas, produciéndose en regiones con temperatura media de 47°C; en temperaturas más bajas (menos de 21°C), disminuye el crecimiento y se promueve la acumulación de sacarosa (Domingos, 1995). La composición química de los tallos y hojas de la caña de azúcar se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Componentes de la Caña de Azúcar (Tomado de Noa, 1982. Modificado por la Autora)

Componentes	Materia Seca	Azúcares Totales	Sacarosa	Fibra	Cenizas	Agua	Otros
Tallos	29%	15.4%	14.1%	12.2%	0.5%	71%	0.8%
Puntas y Hojas	26%	0.2%	--	19.8%	2.3%	74%	2.4%

Muchos de los subproductos de la caña de azúcar tienen una amplia aplicación industrial (Tabla 2); el hecho de que la caña de azúcar haya sido utilizada durante más de 400 años como materia prima para la producción de azúcar, convirtió en un paradigma industrial la síntesis de sacarosa como la característica más importante de esta planta. La industria de los biocombustibles se ha convertido en uno de los principales destinos de los subproductos de la caña ya que alrededor de las dos terceras partes de los casi 250 millones de toneladas de caña que se producen cada año en el mundo se destinan a la producción de alcohol etílico para combustible automotor, tanto en forma directa, como para aditivo de la gasolina (Fundação Cargill, 1987; ICIDCA, 1999; Spillman, 2003; Suárez, *et al.*, 2005).

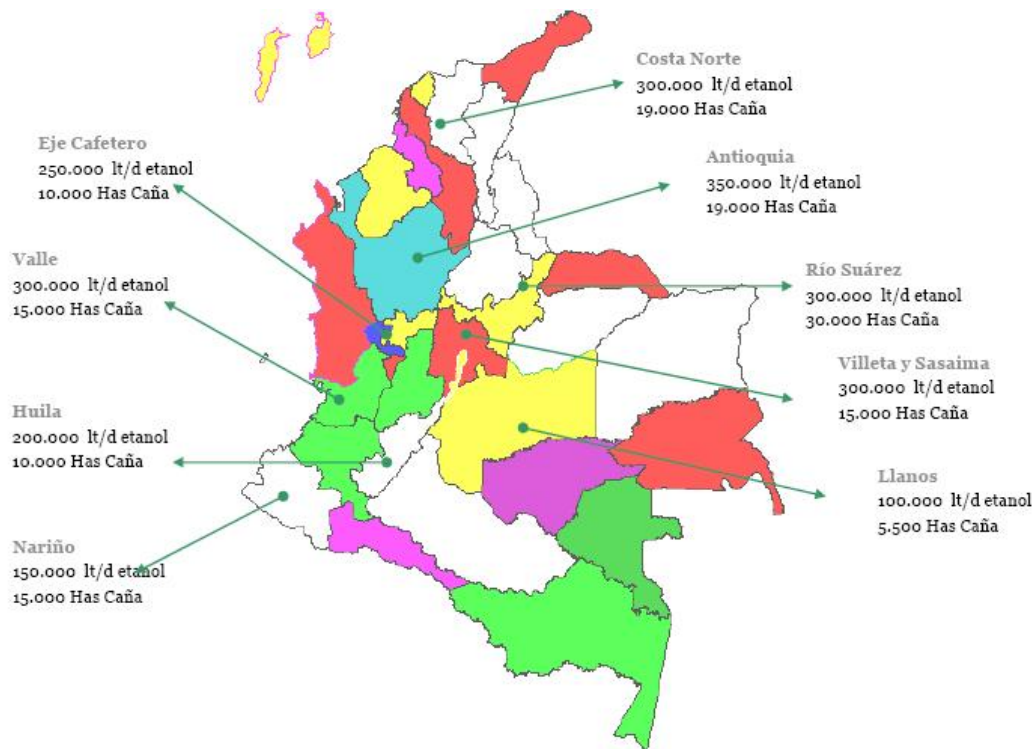
**Tabla 2.** Subproductos de la Caña de Azúcar, Procesos de Transformación y su utilización en la Industria (Tomado de Suárez y Morín, 2005. Modificado por la Autora)

Producto	Proceso		Utilización
	Químico	Biotecnológico	
Sacarosa	x		Industria alimentaria
Glucosa	x		Ind. alimentaria y farmacéutica
Fructosa	x		Ind. alimentaria y farmacéutica
Alcohol etílico		x	Combustible, bebidas, ind. Química
Levaduras		x	Panadería, Bebidas
L-Lisina		x	Piensos y alimentos
Acido cítrico		x	Ind. Alimentaria y farmacéutica
Acido láctico		x	Ind. química y farmacéutica
Acido acético		x	Varias industrias
Acido oxálico	x		Ind. química y construcciones

### 3.1.1 Cultivo de caña en Colombia

Su cultivo en Colombia es considerado la segunda agroindustria rural en importancia después del cultivo del café y representa cerca del 20% de los cultivos permanentes del país. La región del país con mayor número de hectáreas cultivadas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es el Valle del Río Cauca (Figura 2) con más de 200.000 Hectáreas, destinadas a la producción de azúcar y 15.000 Hectáreas proyectadas como materia prima para la producción de biocombustibles. En otras zonas del país como los departamentos de Santander, Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Tolima, Huila, Cauca, Caldas, Nariño y Norte de Santander se cultiva la caña principalmente para la producción de panela (Calero, *et al.*, 2003; Bustos, 2006; Kafarov *et al.*, 2006).

**Figura 2.** Zonas de Cultivo de Caña en Colombia con Potencial para la Producción de Bioetanol (L/día) (Tomado de Kafarov, *et al.*, 2006)



La zona conocida como la Hoya del Río Suárez (Figura 2), en donde convergen municipios del Sur de Santander (Puente Nacional, Barbosa y Güepesa) y del norte de Boyacá (Moniquirá, Togüi, San José de Pare, Chitaraque y Santana), son los principales productores de caña panelera en el oriente del país, donde se constituye en el principal cultivo, siendo uno de los renglones agroindustriales de mayor tradición, convirtiéndose por lo tanto, en la base económica de la zona (Bustos, 2006; Zambrano, 2005). Esta región se ha visto enfrentada a una problemática socio- económica, ya que la agroindustria de la panela se ha visto afectada por la fluctuación de los precios que originan incertidumbre en torno a la rentabilidad de la actividad productiva. También es importante anotar la extensa cadena de comercialización que eleva el precio al consumidor final. La calidad de la panela se ve afectada por la falta de uniformidad en cuanto a peso y tamaño, color, características físico químicas y microbiológicas, sistemas de empaque y almacenamiento que inciden en la estandarización del producto para así fortalecer procesos de mercadeo institucional (Zambrano, 2005; Mojica, *et al.*, 2004).

Debido a que la región de la hoya del río Suárez presenta una gran potencialidad con referencia a la mano de obra disponible, la materia prima como la caña panelera (Figura 2), fue escogida por inversionistas privados como una de las nueve regiones para crear un complejo agroindustrial para realizar el montaje de plantas de alcohol carburante. Además de considerar el abastecimiento de materias primas básicas y de gran consumo para utilizar en el proceso industrial de producción de alcohol, también se consideró la cercanía que tiene la región de la Hoya del Río Suárez como zona estratégica con la capital de la república y además con las ciudades de Tunja y Bucaramanga, para la adquisición de los diferentes materiales que sean necesarios para el proyecto (Calero, *et al.*, 2003).

Un punto muy importante a tener en cuenta dentro de la producción de alcohol son las vinazas generadas en el proceso, debido a que son contaminantes de las fuentes hídricas, por su pH bajo y el contenido de materia orgánica elevado de 6.5

a 7.5%, entre otros; por lo tanto es necesario la búsqueda de alternativas de manejo de estos subproductos (Ocampo, 2004; Gómez *et al.*, 2000;)

Se ha despertado interés general por realizar aquellos proyectos de investigación que aumenten la eficiencia en la producción de etanol usando como materia prima las mieles derivadas de las variedades de caña sembradas en la región de la hoya del río Suárez, pero a la vez aquellos que minimicen el impacto ambiental del bioproceso global de la fermentación.

### **3.2 Producción de etanol**

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico por el cual microorganismos como las levaduras, entre ellas diversas variedades microbianas de *Saccharomyces cerevisiae*, transforman los sustratos ricos en azúcares en Etanol y CO<sub>2</sub>. Para que esta tenga lugar, el sustrato a fermentar debe manejarse en condiciones limitantes de oxígeno. (Zambonelli, 1988; Glazer, 1998; Mandigan, 1999).

Las variables que intervienen en el proceso fermentativo son: (Ward, 1989; Mandigan, 1999)

- **Concentración de azúcar:** Este es el factor más importante pues incide directamente en la velocidad de fermentación y en la concentración alcohólica la cual influye en la actividad de la levadura. Una concentración de 10 a 18% es la más adecuada. Un aumento en la concentración, aumenta el tiempo de fermentación y una concentración muy baja no resulta económica.
- **pH del mosto:** La fermentación se efectúa satisfactoriamente cuando el pH del mosto se encuentra entre 4 y 5. Este pH es el óptimo para la

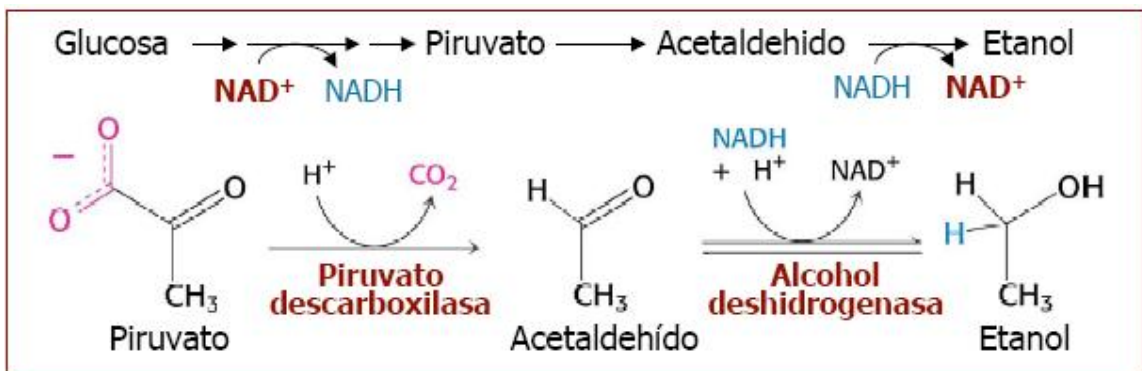
multiplicación de la levadura y evita la contaminación del sustrato por bacterias y hongos filamentosos.

- Temperatura: La temperatura de crecimiento de la levadura, es en general 25 – 30°C, en un máximo comprendido entre 34 – 47°C.
- Tiempo de fermentación: La fermentación se lleva a cabo sobre las 50 horas o menos, dependiendo de la temperatura, concentración inicial y reducción de azúcares.

En condiciones oxigénicas las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto ya que se consigue 1g de levadura por cada 4g de azúcares consumidos. En condiciones anoxigénicas las levaduras realizan la fermentación alcohólica, es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, CO<sub>2</sub>, energía y vinazas. En estas condiciones el rendimiento en biomasa es de tan sólo 1g de levadura por cada 100g de azúcares consumidos (Mesas, *et al.*, 1999).

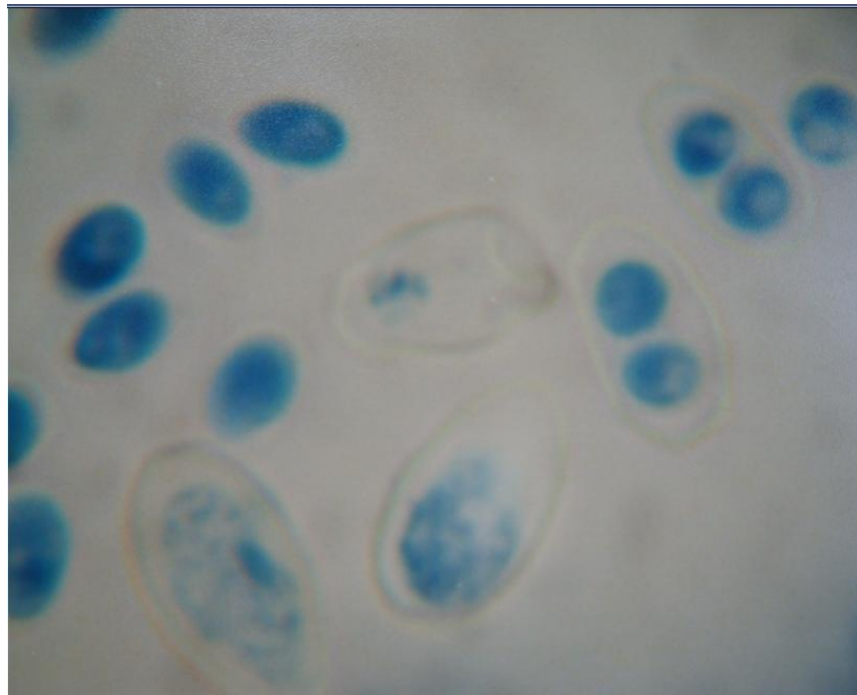
La vía por medio de la cual las levaduras metabolizan los azúcares transformándolos en etanol y CO<sub>2</sub> se conoce con el nombre de vía Embden-Meyerhof- Parnas (Figura 3) (Bruchmann, 1980).

**Figura 3.** Formación de Etanol a partir de Glucosa por *Saccharomyces cerevisiae* (Tomado de Salgado, 2007)



*Saccharomyces cerevisiae*, es un hongo unicelular, perteneciente al Dominio Eukarya, Phylum Ascomycota, Clase Hemiascomycetes, Orden Saccharomycetales y Familia Saccharomycetaceae, que presenta células alargadas, globosas o elipsoides con gemaciones o blastosporas laterales multilaterales (Figura 4). Presenta reproducción asexual por gemación cuando se encuentra en su forma haploide (n), y de manera sexual cuando a partir de un cigoto (2n) se forma un Asco que contiene cuatro ascosporas haploides (Figura 5). Este microorganismo se ha estudiado ampliamente como modelo simple de la célula eucariota (González, et al., 2000).

**Figura 4.** Observación microscópica de *S. cerevisiae*. Nótese las células vegetativas y los Ascos con ascosporas. Coloración azul de Lactofenol. (40x)  
(Tomado de Chalela, G., 2007)





### 3.2.1 Vinazas

Las vinazas son un subproducto de la fabricación de alcohol que se produce en una proporción de 13:1, es decir, por cada litro de alcohol se obtienen 13L de vinaza.

De acuerdo con Ferreira y Montenegro (1987) esta proporción puede variar entre 10:1 y 15:1. Recientemente se han desarrollado cambios en el proceso de fabricación de alcohol para obtener vinaza más concentrada; en Colombia, por ejemplo, la Industria de Licores del Valle produce 2.5L de vinaza con 55% de sólidos totales por cada litro de alcohol producido.

Las vinazas contienen principalmente materia orgánica, potasio (K), azufre (S), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y calcio (Ca); sin embargo, esta composición es variable según provenga de melaza, jugo o la mezcla de ambos. De acuerdo con análisis realizados en Brasil (Gloria *et al.*, 1983), la vinaza proveniente de melaza presenta los mayores contenidos de materia orgánica y elementos minerales (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición química de la vinaza según proceda de jugo, melaza o la mezcla de ambos (Tomado de Orlando, 1991)

Propiedad	Jugo	Melaza	Mixto de melaza y jugo
N (kg/m <sup>3</sup> )	0.28	0.77	0.46
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	0.20	0.19	0.24
K <sub>2</sub> O (kg/m <sup>3</sup> )	1.47	6.00	3.60
CaO (kg/m <sup>3</sup> )	0.46	2.45	1.18
MgO (kg/m <sup>3</sup> )	0.29	1.04	0.53
SO <sub>4</sub> (kg /m <sup>3</sup> )	1.32	3.73	2.67
Materia orgánica (kg/m <sup>3</sup> )	23.44	52.04	32.63
Fe (ppm)	69	80	78
Cu (kg/m <sup>3</sup> )	7	5	21
Zn (kg/m <sup>3</sup> )	2	3	19
Mn (kg/m <sup>3</sup> )	7	8	6
pH	3.7	4.4	4.1

Se estima que por una tonelada de caña destinada para la producción de azúcar se obtienen alrededor de 45Kg de melaza que pueden producir 12L de alcohol (Orlando, 1991) y entre 30 y 156L de vinaza según los contenidos de sólidos totales.

Como respuesta al preocupante deterioro ambiental ocasionado por las vinazas producto de la actividad fermentativa de las mieles de caña se realizan procesos de compostaje. En este sentido, se han logrado algunos avances en la fabricación de un abono orgánico granulado preparado a partir de una mezcla de cachaza y cenizas enriquecida con vinaza (Quintero, 2004).

### **3.2.1.1 Compostaje**

El Compostaje se puede definir como una biotecnología donde es posible ejercer un control sobre los procesos de biodegradación de la materia orgánica.

La biodegradación es consecuencia de la actividad de los microorganismos que crecen y se reproducen en los materiales orgánicos en descomposición. La consecuencia final de estas actividades vitales es la transformación de los materiales orgánicos originales en otras formas químicas. Los productos finales de esta degradación dependerán de los tipos de metabolismo y de los grupos fisiológicos que hayan intervenido. Es por estas razones, que los controles que se puedan ejercer, siempre estarán enfocados a favorecer el predominio de determinados metabolismos y en consecuencia a determinados grupos fisiológicos (Chalela, 2007).

De la Molienda de la caña de azúcar resulta un residuo fibroso llamado bagazo rico en material celulósico y con algún valor nutricional para nutrición animal o vegetal. De la etapa de clarificación en la que el jugo de caña extraído es sometido a un proceso de decantación, resulta un precipitado que luego de filtrado con

bagacillo como medio filtrante, se obtiene un producto de 70 a 80% de humedad llamado cachaza (Figura 6) (Chalela, 2007).

**Figura 6.** Subproductos de la Industria de la caña de azúcar y su utilización en el compostaje (Tomado de Chalela, 2007)



El compost o bioabono, es el producto de un proceso de descomposición o degradación aeróbica termofílica de los materiales de desechos orgánicos, por la acción de una población mixta de microorganismos, como bacterias y hongos actinomicetos, en un ambiente cálido, húmedo y aireado, que permiten la obtención de humus entre aproximadamente seis (6) a siete (7) semanas.

Como resultado, sube la temperatura de la pila, acelerando por tanto el proceso básico de degradación natural, que normalmente ocurre con lentitud en desechos orgánicos que caen sobre la superficie del suelo.

### 3.3 Enzimas

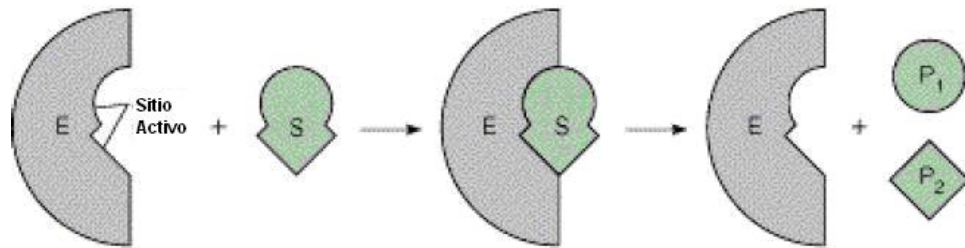
Las enzimas son catalizadores orgánicos de naturaleza proteica, que aceleran la velocidad de las reacciones termodinámicamente posibles, como las de síntesis, hidrólisis e isomerización (Rosas, 2003).

Al ser catalizadores, las enzimas son eficientes en pequeñas cantidades, no se modifican durante las reacciones y no afectan el equilibrio de estas. Son componentes del citoplasma donde se sintetizan y su principal característica es la especificidad; de manera que cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Esta característica depende de la estructura química de la proteína (Chalela, et al, 1989).

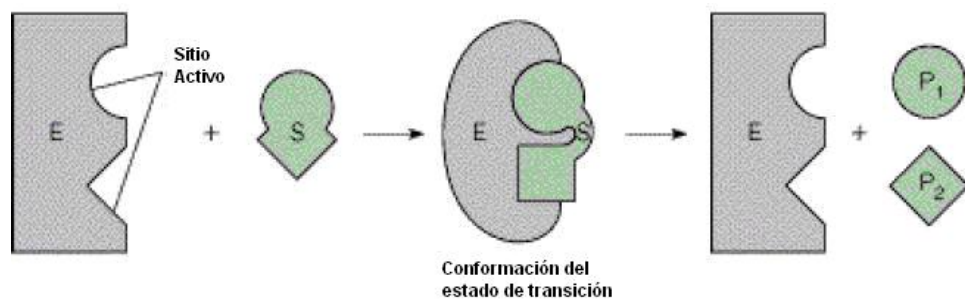
La mayoría de las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos son catalizadas por enzimas. En una reacción que es catalizada por una enzima la sustancia sobre la que actúa la enzima se conoce como sustrato; este se une a una región concreta de la enzima, llamado centro activo, el cual comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y de un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción. En 1894 Fisher propuso la hipótesis llave y cerradura para explicar el mecanismo de acción de las enzimas en el cual el centro activo es rígido (Figura 7A), y en 1958 Koshland propuso el modelo adaptación inducida en donde el centro activo es modificado y adquiere la forma rígida complementaria solo después de unirse al sustrato (Figura 7B) (Murray, *et al.*, 1997; Mathews, et al., 2002; Wilches, 1993).

**Figura 7.** Modelos de Acción enzimática A. Llave y Cerradura de Fisher  
 B. Adaptación Inducida de Koshland (Tomado de Mathews, *et al.*, 2002.  
 Modificado por la Autora)

**A.**



**B.**



La actividad enzimática es sensible a cambios en factores externos tales como:  
 (Wilches, 1993; Murray, et al, 1997)

- pH: Debido a que la conformación de las proteínas depende en parte de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación es la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado pH óptimo. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad.
- Temperatura: En las reacciones catalizadas los aumentos de temperatura tal como sucede en las reacciones químicas en general, aceleran las

reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Sin embargo, por ser proteínas, después de cierta temperatura, esta se comienza a desnaturalizar por el calor. Por lo tanto también se presenta una temperatura óptima en la cual la actividad catalítica es máxima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica.

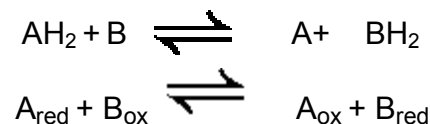
- Cofactores: Algunas enzimas para cumplir su función requieren la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis, son los denominados cofactores, los cuales son iones inorgánicos como el  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , o las coenzimas que son moléculas orgánicas, como por ejemplo, la vitamina B que participa en la reacciones biológicas de oxidación y reducción.

La International Union of Biochemistry System (I.U.B) adoptó una clasificación enzimática basada en la reacción química catalizada o propiedad específica de cada enzima. Las características principales del sistema I.U.B para clasificar las enzimas son las siguientes: (Wilches, 1993; Nuñez, 2001)

- Las reacciones y las enzimas que las catalizan se dividen en 6 clases principales, cada una con 4 a 13 subclases.
- El nombre de la enzima tiene 2 partes: primero está el nombre del o los sustratos y luego la terminación asa.
- Información adicional de ser necesaria para aclarar el tipo de reacción, se puede señalar en paréntesis.
- A cada enzima se le ha asignado un número clave sistemático (E.C.) que caracteriza el tipo de reacción según la clase (primer dígito), subclase (segundo dígito) y subclase (tercer dígito). El cuarto dígito es para la enzima específica.

Las seis clases de enzimas se presentan a continuación utilizando ejemplos de cada una de ellas: (Wilches, 1993; Núñez, 2001)

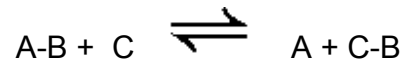
1. Oxidoreductasas: Son las que catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e<sup>-</sup>) de un sustrato a otro, según la reacción general:



Ejemplo: Alcohol + NAD<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  Aldehído o Cetona + NADH + H<sup>+</sup>

Reacción catalizada por la enzima 1.1.1.1 Alcohol:NAD oxidoreductasa (alcohol deshidrogenasa)

2. Transferasas: Son las que catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro según la reacción:



Ejemplo: ATP + D- hexosa  $\rightleftharpoons$  ADP+ D- hexosa-6-fosfato

La enzima que cataliza la reacción es 2.7.1.1 ATP:D-6-hexosa-6-fosfotransferasa (hexocinasa)

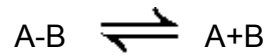
3. Hidrolasas: Son las que catalizan las reacciones de hidrólisis.



Ejemplo: Un β-D-galactósido + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  un alcohol + D-galactosa

Reacción catalizada por la enzima 3.2.1.23 β-D-Galactósido galactohidrolasa (β-galactosidasa)

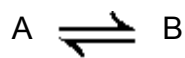
4. Liasas: Aquellas que catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos:



Ejemplo: Una cetosa -1-fosfato  $\rightleftharpoons$  fosfato de dihidroxiacetona + un aldehído

La reacción es catalizada por la enzima 4.1.2.7 Cetosa-1-fosfato aldehído-liasa (aldolasa).

5. Isomerasas: Aquellas que catalizan la interconversión de isómeros:



Ejemplo: D-Gliceraldehído-3-fosfato  $\rightleftharpoons$  fosfato de dihidroxiacetona

Reacción catalizada por la enzima 5.3.1.1 D-gliceraldehído-3-fosfato cetol isomerasa (triosafosfato isomerasa).

6. Ligasas: Enzimas que catalizan la unión de dos sustratos acoplada a una hidrólisis de un enlace pirofosfórico en el ATP o un compuesto similar. Están incluidas las enzimas que catalizan las reacciones que forman enlaces C-O, C-S, C-N y C-C:



Ejemplo: ATP acetil-CoA + CO<sub>2</sub>  $\rightleftharpoons$  ADP + Pi + malonil-CoA

La reacción es catalizada por la enzima 6.4.1.2 Acetil-CoA: CO<sub>2</sub> ligasa (ADP) (acetil-CoA carboxilasa).

### 3.3.1 Tecnología enzimática

El área de tecnología enzimática incluye el extenso campo de las fermentaciones, así como la mejora genética de microorganismos de aplicación en biotecnología y la producción de proteínas y enzimas, para su utilización en industrias como la de

alimentos, la farmacéutica, la química, entre otras (Gasesa *et al.*, 1990; Chaplin, *et al.*, 1992; Pandey, *et al.*, 2005)

La tecnología enzimática comprende: 1) el hallazgo de una fuente productora eficiente ya sea de origen microbiano, vegetal o animal, 2) el aislamiento y purificación de la enzima deseada, 3) determinar una metodología óptima de utilización, ya sea por inmovilización o recuperación, y 4) comprobar la ventaja del proceso realizado por vía enzimática en comparación al mismo sin la utilización de la enzima (Bruchman, 1980; Illanes, 1994; Wiseman, 1995; Carrera, 2002; Bell, *et al.*, 2003).

La fuente más usada y que mayor variedad de enzimas ofrece es la microbiana debido a que presenta ventajas sobre las enzimas de otras fuentes animales o vegetales, tales como la diversidad de bacterias y hongos clasificados como GRAS (Generally Recognized as Safe) por las agencias internacionales de salud y seguridad industrial, debido a que no producen toxinas ni son patógenos, lo que permite usarlos en un amplio número de industrias, además presentan una rápida multiplicación celular y factibilidad de recombinación genética mediante el uso de plásmidos que les otorgan aumentos significativos en la variedad, concentración y producción enzimática a un bajo costo, debido a su ubicuidad y al amplio rango metabólico, lo cual se traduce en la variedad de sustratos nutricionales que incluyen desechos industriales, como por ejemplo, los residuos lignocelulósicos (Glazer, *et al.* 1998).

Las enzimas microbianas se pueden clasificar de acuerdo a su localización al momento de sintetizarse en: Exoenzimas, las cuales son sintetizadas dentro de la células, pero luego son vertidas al sustrato y Endoenzimas, que permanecen al interior de la célula luego de que son sintetizadas y para su extracción es necesario someter a la célula a un tratamiento adecuado tal como ruptura

mecánica, fraccionamiento, desecación, entre otros (Bruchmann, 1980; Illanes, 1994; Wiseman, 1995; Carrera, 2002).

También se pueden clasificar en: 1) Enzimas constitutivas que como su nombre lo dice están siempre presentes en la célula (se sintetizan siempre), las cuales se necesitan en todo momento porque catalizan principalmente reacciones de obtención de energía o de obtención de carbono, como por ejemplo las enzimas que degradan la glucosa y 2) Enzimas adaptativas, que sólo se sintetizan cuando son necesarias; estas pueden ser de dos tipos: a) Enzimas represibles que son aquellas que catalizan la biosíntesis de un compuesto que puede ser, biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y que solo se sintetizan si el producto está ausente en el medio de cultivo, por ejemplo, las enzimas que catalizan la síntesis de Arginina (Arg) sólo se sintetizan si no hay Arg en el medio, cuando se sintetiza, esta reprime la biosíntesis de las enzimas que participan en su formación. b) Enzimas inducibles la cuales catalizan el uso de un compuesto como fuente de enzimas y/o como fuente de carbono, y solo se sintetizan en presencia del sustrato como por ejemplo la  $\beta$ -galactosidasa que solo se sintetiza en presencia de lactosa (Vásquez, 2004; Cruz, 2006).

En la preparación de una enzima con fines industriales, se comienza por obtener primero un extracto enzimático crudo, para su extracción se usan soluciones tampones, la separación de las células se hace por centrifugación o filtrado, así se obtiene el extracto crudo de la enzima la cual puede utilizarse directamente después de adicionarle un antiséptico (Bruchmann, 1980; Carrera, 2002).

### **3.3.1.1 Amilasas**

Las amilasas son enzimas que actúan sobre el almidón hidrolizando los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) y/o  $\alpha$ -(1,6) y poseen diversas aplicaciones en la industria,

como por ejemplo en la producción de jarabes y dextrosa sólida que contienen oligosacáridos como la maltosa y la glucosa, en cervecería, en trabajo de panadería y en la eliminación de residuos de almidón en la fabricación de textiles. Las amilasas más utilizadas en la biotecnología son la  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, amiloglucosidasa y pulunanasa, entre otras, producidas por microorganismos tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp., principalmente (Bhella, *et al.*, 1985; Chalela *et al.*, 1989; Pandey, *et al.*, 2000; Van Der Maarel, *et al.*, 2002; Tunga, *et al.*, 2003; Spier, *et al.*, 2004).

Los dos grupos más importantes de enzimas amilásicas son:

1.  $\alpha$ -Amilasa: EC 3.2.1.1  $\alpha$ -1,4-D-glucan glucanohidrolasa (endoamilasa), hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos de la amilosa, amilopectina y glicógeno, pero no actúa sobre los enlaces  $\alpha$ -1,6 glicosídicos de la cadena ramificada del almidón. La hidrólisis de la  $\alpha$ -amilasa causa una conversión en glucosa, maltosa, maltotriosa y  $\alpha$ -dextrinas (Vargas, 2002; Gupta, *et al.*, 2003; Souza, 2003; Spier, 2005).

2.  $\beta$ -Amilasa: EC 3.2.1.2,  $\alpha$ -1,4-D-glucan maltohidrolasa (amilasa sacarogénica), actúa sobre los extremos no reductores de la amilosa, amilopectina o glicógeno, hidrolizando los enlaces glicosídicos alternantes dando como resultado formas  $\beta$ -anoméricas de maltosa, pero es incapaz de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,6 glicosídicos de la amilopectina y el glicógeno. El producto de la hidrólisis de la enzima es la maltosa cuando esta actúa en una cadena lineal con un número igual de residuos de glucosa, si actúa en una cadena con un número de residuos desiguales, entre los productos finales se encontrará adicionalmente glucosa y maltotriosa (Vihinen, *et al.*, 1989; Vargas, 2002; Souza, 2003; Spier, 2005).

### **3.3.2 Microorganismos Fuentes de Enzimas**

Para inducir la producción de una enzima, en primer lugar se debe seleccionar alguno o algunos de los microorganismos productores de esta; luego de aislar una cepa productora eficiente, es necesario encontrar un medio de cultivo con las condiciones óptimas para la producción de la enzima como son el pH, la temperatura, la concentración de nutrientes, y el tiempo de producción (Bruchman, 1980; Carrera, 2002).

Para la presente investigación se eligieron cepas nativas del hongo perteneciente al género *Rhizopus*, como microorganismo productor de un complejo enzimático compuesto por: lipasas EC 3.1.1.3, fitasas EC3.3.2.8, hidrolasas EC 3.3.2.8, proteasas EC3.4.21.-, amilasas EC3.2.1.1, amiloglucosidasas EC3.2.1.3, alcohol deshidrogenasas EC1.1.1.1, y dextranasas EC3.2.1.11, las cuales actúan sobre sustancias no fermentables presentes en las mieles de caña , transformándolos en monosacáridos y aminoácidos libres, los cuales son moléculas más sencillas y por lo tanto más aprovechables por *Saccharomyces cerevisiae*, lo que dará como resultado la producción de una mayor cantidad de etanol (Roch-chu, *et al.*, 1990; Socol *et al.*, 1994; Jin, *et al.*, 1999; Acevedo *et al.*, 2003; Duvall, *et al.*, 2003; Peixoto, *et al.*, 2003; Hoyos, *et al.*, 2004; ).

### **3.4 Género *Rhizopus***

Es un hongo filamentoso cosmopolita, perteneciente al Dominio Eukarya, Phylum Zygomycetes, Orden Mucorales y Familia Mucoraceae.

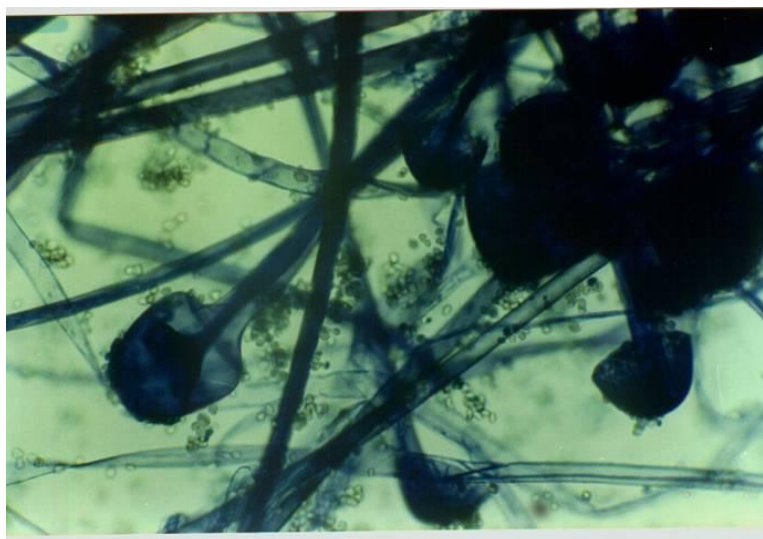
Puede ser encontrado en suelos cultivados y forestales, en frutas y vegetales en descomposición, en desechos animales, en el compost y en el aire. Además es

parásito patógeno de plantas como la papa, el algodón y de varios frutos y es un hongo oportunista (Schipper, *et al.*, 1984)

El género *Rhizopus* comprende 12 especies entre las que se destacan *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus nigricans*.

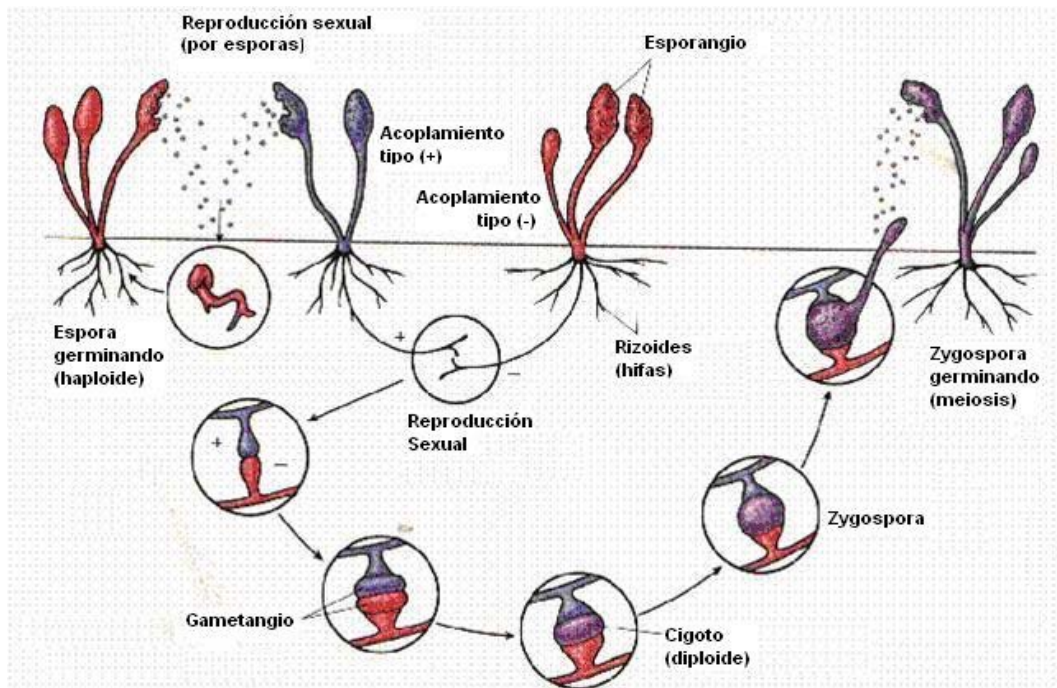
Las características microscópicas de *Rhizopus* (figura 8) son: hifas no septadas o parcialmente septadas (6 -15  $\mu\text{m}$  de diámetro), esporangióforos, rizoides, esporangios, y esporangiosporas. Los esporangióforos son de color café, y pueden estar solitarios o formando “clusters”. Los rizoides están localizados en el punto donde los estolones y los esporangióforos se encuentran. Los esporangios (40-350  $\mu\text{m}$  de diámetro) están localizados en el ápice de los esporangióforos. La apófisis es ausente o raramente aparente y la columela es irregular. Las esporangiosporas (4-11  $\mu\text{m}$  de diámetro) son unicelulares, de forma redonda a ovoide, de color café, de textura lisa o estriada (St- Germain et al, 1996).

**Figura 8.** Características microscópicas de *Rhizopus* spp. (Tomado de Chalela, G., 2007)



Las colonias de *Rhizopus* crecen rápidamente, germinando 4 días después de haber sido sembrada; la reproducción puede ser asexual cuando las esporas son liberadas por el esporangio y son transportadas por el aire a otros lugares, o sexual cuando hifas de diferentes tipos se unen formando un gametangio, el cual se une dando lugar al cigoto. El cigoto sufre meiosis y germina produciendo un nuevo esporangio (Figura 9) (Lim, 1998).

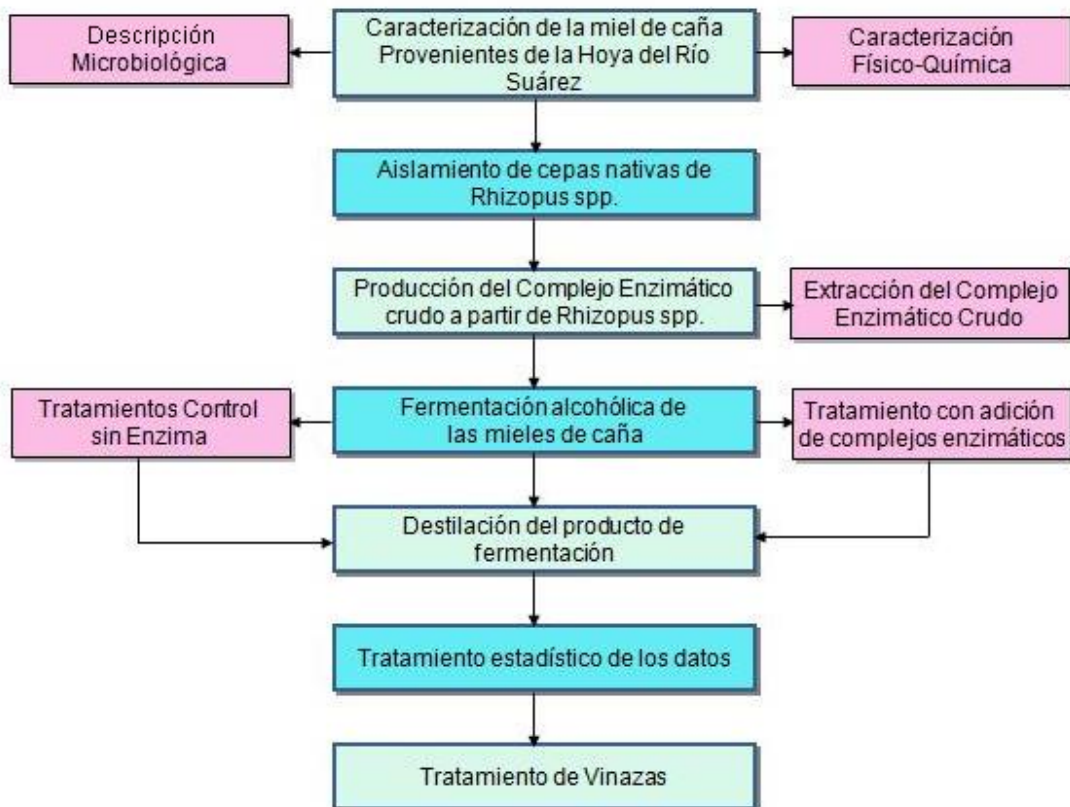
**Figura 9.** Ciclo de vida de *Rhizopus* (Tomado de Lim, 1998.  
Modificado por la Autora)



## 4. METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA), UNAB Ambiental de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB), y contó con su patrocinio ya que el trabajo forma parte de una de sus líneas de Investigación.

**Figura 10.** Diagrama de la metodología utilizada en la investigación



## **4.1 Caracterización de la miel de caña proveniente de la Hoya del Río Suárez**

A la miel de caña traída de los trapiches tipo cimpa de municipio de Barbosa, Santander, que se utilizó como sustrato para las fermentaciones alcohólicas se le realizó un análisis microbiológico y físico- químico, para determinar la microbiota nativa y conocer sus propiedades.

### **4.1.1 Descripción microbiológica**

#### **4.1.1.1 Preparación de Medios de Cultivo**

Se prepararon medios de cultivo modificados, adicionándoles miel de caña al 2%: cajas de Petri con Agar Nutritivo para la identificación de bacterias y cajas con Agar Extracto de Levadura para la determinación de los hongos presentes en la muestra.

#### **4.1.1.2 Siembra de la muestra**

Con ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una muestra de 0.5 mL de miel de caña la que se sembró en los medios preparados con anterioridad, cerca a dos mecheros encendidos para evitar la contaminación. 3 cajas de Petri Agar Nutritivo se incubaron en cámara de anaerobiosis, para determinar la posible presencia de bacterias anoxigénicas, las demás cajas se incubaron a temperatura ambiente.

#### **4.1.1.3 Descripción Macro y Microscópica de la Microbiota**

Después de 5 días de crecimiento se hizo la descripción macroscópica de las colonias presentes en los medios. Para la determinación microscópica se realizaron láminas con azul de lactofenol y coloración de Gram para su observación al microscopio.

#### **4.1.2 Caracterización Físico- química**

El pH y los grados Brix de la miel se midieron en el laboratorio utilizando un pH metro marca SCHOTT y un Refractómetro marca BRIXCO, respectivamente. Los análisis de Humedad, Proteína, Grasa, Minerales, Fibra, Carbohidratos y Valor Calórico fueron realizados por el laboratorio Servicios Integrados para la Industria de Alimentos y el Medio Ambiente (SIAMA).

#### **4.2 Aislamiento de Cepas Nativas de Rhizopus spp.**

Se prepararon medios modificados con miel al 2%, de agar papa y agar salvado de trigo, específicos para el crecimiento de especies de Rhizopus.

##### **4.2.1 Toma de muestras**

Las muestras se tomaron de la siguiente forma:

- Para aislar microorganismos del aire, 5 cajas de petri de cada uno de los medios mencionados anteriormente se abrieron por 15 minutos al ambiente.
- Se tomaron 100g de tierra de varios puntos escogidos al azar, que se mezclaron con 100 mL de solución salina y se dejaron en incubación por 48

horas a temperatura ambiente; después de este tiempo una muestra de la mezcla se sembró en los medios preparados.

- Se expusieron al ambiente alimentos como papaya y pan por 5 días; al notar un crecimiento microbiano sobre estos, se realizó una siembra en los medios de cultivo nombrados.

#### **4.2.2 Identificación y Aislamiento de *Rhizopus* spp.**

Cada una de las colonias presentes en las cajas sembradas se describió macroscópicamente; las cepas con características propias de los Mucorales, como colonias con textura algodonosa de color blanco, café o gris se observaron al microscopio (USA, 2006) y posteriormente se seleccionaron de acuerdo a su morfología microscópica (Claves Chalela, 2007); las cepas seleccionadas se aislaron una vez en medios de cultivo agar papa y agar salvado de trigo.

#### **4.3 Producción del Complejo Enzimático Crudo a partir de *Rhizopus* spp.**

Para la obtención del complejo enzimático crudo se sembraron las cepas de *Rhizopus* spp. aisladas en frascos de vidrio de 1L, con medios compuestos por salvado de trigo, extracto de levadura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sulfato de magnesio y agua destilada y se ajustó el pH a 6 con HCl 0.1 N. Para permitir el crecimiento del hongo los medios se dejaron a temperatura ambiente por 5 días (Pandey, *et al.*, 1999; Pandey, *et al.*, 2001; Szakacs, 2004; Chalela, 2007).

#### **4.3.1 Extracción del Complejo Enzimático Crudo**

Para la aplicación del método de extracción enzimática por salado (Hoyos, 2002), se adicionaron 150 mL de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0.02M en los medios cultivo, se maceraron con una varilla de vidrio y se dejaron en reposo durante 1h a temperatura ambiente; luego se filtraron a través de lienzo. El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante se recuperó para su posterior utilización en las fermentaciones (Chalela, 2007).

La metodología anterior se repitió con el complejo enzimático comercial Allzyme (Alltech, 2006).

A los complejos enzimáticos utilizados en la investigación, el obtenido de *Rhizopus* spp, el comercial Allzyme y el producido en el CINBBYA de la UNAB, se les realizó pruebas de azúcares reductores, glucosa y amilasa (Chalela, 2007).

#### **4.3.2 Determinación de los Azúcares Reductores**

Los azúcares reductores se cuantificaron por el método de Fehling Causse Bonnans. En un erlenmeyer de 250 mL se colocaron 10 mL del reactivo Fehling-Causse-Bonans, el cual fue preparado en el laboratorio, luego se agregaron 50 mL de agua destilada y se calentó hasta ebullición. Desde una bureta se dejó caer una solución de glucosa al 1%, cuando el líquido se tornó verdoso se agregaron 3 gotas de azul de metileno al 1%, y se continuó la adición de la solución patrón de glucosa hasta la aparición de un color amarillo claro. Se realizaron los cálculos para determinar el título del reactivo Fehling-Causse-Bonans. Para la determinación del porcentaje de azúcares reductores de la muestra se procedió de la misma manera reemplazando en la bureta la solución patrón de glucosa por la muestra (Montes, 1981).

#### **4.3.3 Determinación de Glucosa**

La glucosa fue determinada por el método de glucosa oxidasa/ peroxidasa. Para conocer la cantidad de glucosa es necesario tener un referente, que se obtuvo mediante la elaboración de una curva patrón con diferentes concentraciones de glucosa. Para obtener esta curva se graficó la absorbancia vs mg/dL de glucosa y se determinaron la pendiente y el intercepto, entonces se procedió a interpolar la absorbancia, para esto se utilizó Excel 2007 (Anexo A), (Chalela, 2007).

Para determinar la absorbancia de las muestras se utilizó el siguiente procedimiento: Se llevó a temperatura ambiente el Reactivo (A), se pipeteó en tubos de ensayo 10 $\mu$ L de la muestra y 1 mL de A, se agitó bien e incubó durante 5 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia en un Colorímetro a 500nm (BioSystems S.A).

#### **4.3.4 Determinación de Amilasa**

Como el complejo enzimático crudo obtenido de *Rhizopus* spp. contiene enzimas de diferentes tipos, para la presente investigación se decidió evaluar el contenido de amilasas; para su determinación la metodología usada fue: se tomó 1 mL de Reactivo que se preincuba por 3-4 minutos a una temperatura de entre 25 y 30°C, luego se adicionaron 50  $\mu$ L de la muestra, se mezcló bien, se leyó la absorbancia a 405nm luego de 1 y 2 minutos y se determinó la diferencia entre la segunda y la primera lectura, la cual se utilizó para hacer los cálculos. El anterior procedimiento se repitió a una temperatura de 37°C, donde solo se tomaron 20  $\mu$ L de la muestra ya que la actividad es directamente proporcional a la temperatura. El Reactivo utilizado en el anterior procedimiento está compuesto por: Cloro-P-Nitrofenil  $\alpha$ - maltotriosido 2.25 mmoles/L, Acetato de Calcio 6 mmoles/L, Cloruro de Sodio 70 mmoles/L, Tiotianio de Potasio 900 mmoles/L, Buffer mes pH 6 100 mmoles/L (Wiener lab., 2000).

El anterior procedimiento fue repetido con los complejos enzimáticos Allzyme y CINBBYA.

#### **4.4 Fermentaciones Alcohólicas a partir de Miel de Caña**

Esta etapa incluye la activación de la levadura y el montaje de las fermentaciones de los tratamientos a evaluar.

##### **4.4.1 Activación de *Saccharomyces cerevisiae***

Esta etapa incluye la hidratación, adición de nutrientes y aireación de la levadura; para esto se preparó un mosto con miel de caña al 5% y fosfato de amonio, el cual se pasteurizó a 80°C por 15 minutos; una vez a temperatura ambiente se hizo una inoculación con *Saccharomyces cerevisiae* facilitada por el CINBBYA, Brasil, este medio se dejó con aireación por 2 días (Chalela, 2007).

##### **4.4.2 Producción de Etanol**

En total se realizaron 7 tratamientos con 3 repeticiones de cada uno de ellos, que se encuentran descritos en la Tabla 4; cada medio de fermentación se preparó con 3L de agua destilada, adicionando la miel de caña hasta 12°Brix; además se les agregó nutrientes tales como extracto de levadura, sulfato de magnesio, sulfato de amonio y fosfato monopotásico, y un pH de 4.5; seguidamente se llevó a cabo una pasteurización a 80°C durante 15 min (Chalela, 2007). Una vez a temperatura ambiente se inocularon con 10% del mosto previamente preparado, adicionándoles los complejos enzimáticos en concentraciones de 30 y 60ppm

(Acevedo, 2003 y Chalela, 2007); un equipo de macro goteo fue colocado a cada fermentador para facilitar la toma de muestras durante el período de fermentación.

**Tabla 4.** Diseño Experimental de los Tratamientos para Producción de Etanol y sus Concentraciones

Tratamientos (T)	Concentraciones		
	30 ppm	60 ppm	0
T1. Complejo Enzimático Crudo de Rhizopus spp.	x		
T2. Complejo Enzimático Crudo de Rhizopus spp.		x	
T3. Complejo Enzimático Comercial Allzyme	x		
T4. Complejo Enzimático Comercial Allzyme		x	
T5. Complejo Enzimático CINBBYA	x		
T6. Complejo Enzimático CINBBYA		x	
T7. Control			x

Las fermentaciones se realizaron a temperatura ambiente por 48 horas; durante este período cada 6 horas se realizaron pruebas de azúcares reductores por el método de Fehling Causse Bonnans.

#### **4.4.3 Destilación del Producto de la fermentación**

Para destilar el etanol producido se utilizó un destilador fraccionado compuesto por una columna vigreux, un puente y un condensador; este tipo de destilación se utiliza para separar componentes líquidos que difieren en menos de 25° en su punto de ebullición (Chalela, 2007).

Para la determinación del porcentaje del alcohol destilado en cada una de las muestras se utilizó un alcoholímetro según Gay Lussac – Cartier a 20°C, escala 0-100°.

##### **4.4.3.1 Tratamiento estadístico de los datos**

Para observar si existían diferencias significativas en la producción de Etanol entre los tratamientos se realizó una prueba de Análisis de varianza (ANOVA); posteriormente se realizaron los Test de Tukey, Duncan y un Test de Contraste. Para la realización de las anteriores pruebas se utilizó el software SPSS 13.0.

#### **4.5 Tratamiento de las Vinazas generadas en las fermentaciones**

Se evaluó la composición química de las vinazas en el laboratorio del CINBBYA.

Como alternativa en el tratamiento de las vinazas se realizó un proceso de compostaje utilizando subproductos de la industria azucarera. Para ello se tomaron 5L de vinaza y se mezclaron con 30Kg de paja de caña finamente picada y se añadieron cepas microbianas seleccionadas, en concentración de 10% de inóculo y se colocaron en pila, protegida de la lluvia y del sol excesivo, de manera que el calor generado en el proceso pudiera ser conservado. El seguimiento del proceso de biocompostaje es objetivo de otro trabajo de investigación que se está

realizando en el CINBBYA donde se evaluarán las características del bioabono obtenido mediante el índice de germinación, usando semillas de maní forrajero (*Arachis pinto*) (Chalela, 2007).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de las mieles de caña provenientes de la Hoya del Río Suárez

#### 5.1.1 Análisis Microbiológico de las Mieles de Caña

La microbiota encontrada en la muestra de miel analizada se muestra en la tabla 5, los géneros se determinaron mediante la observación de las características macro y microscópicas.

**Tabla 5.** Microorganismos nativos de las mieles de caña

<b>HONGOS</b>	<b>BACTERIAS</b>
Aspergillus spp.	Lactobacillus spp.
Cladosporium spp.	Bacillus spp.
Alternaria spp.	Deinococcus spp.
Penicillium spp.	
Candida spp.	
Rhodotorula spp.	
Geotrichum spp.	

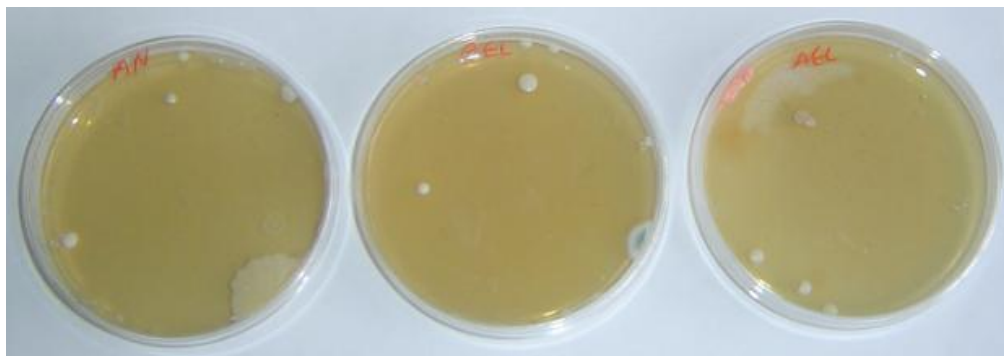
El crecimiento de las colonias de los microorganismos aislados, se pueden observar en la figura 11.

**Figura 11.** Observación Macroscópica de los Microorganismos aislados a partir de la miel de caña (A. Crecimiento de hongos, B. Bacterias y levaduras)

**A.**



**B.**



### 5.1.2 Análisis Físico- químico de las mieles de caña

Los resultados de los análisis Físico- químicos de la Miel se pueden observar en la tabla 6.

**Tabla 6.** Características Físico- químicas de la miel de caña

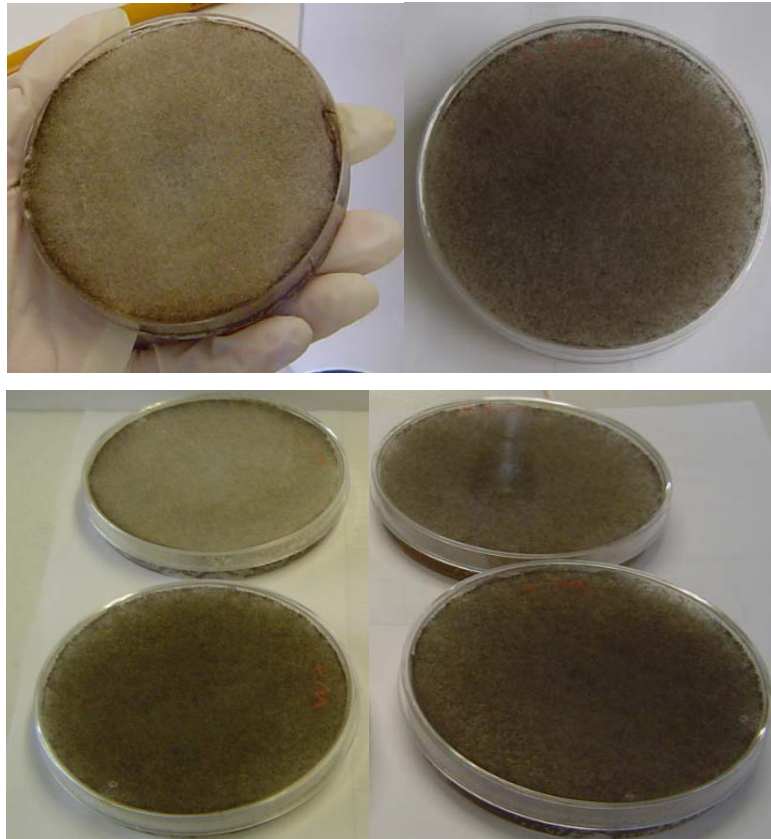
<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
pH	4.9
Humedad	21%
Proteína	0.89%
Grasa	0.10%
Minerales	1.16%
Fibra	0.16%
Carbohidratos	76.69%
Valor Calórico	311(Kcal/100g)
°Brix	90

De acuerdo a los resultados de los análisis físico químicos realizados con el fin de determinar las propiedades del sustrato a fermentar, podemos observar que este presenta un alto porcentaje de carbohidratos y °Brix, que confirman que la mieles derivadas de la caña de azúcar, poseen un alto potencial para ser utilizadas en la industria de los biocombustibles (Montes, 1981; Xavier, 2007); adicionalmente el pH se encuentra dentro del rango óptimo para el proceso fermentativo. Las demás características evaluadas están dentro de los valores esperados (Montes, 1981).

## **5.2 Aislamiento de Cepas Nativas de *Rhizopus* spp.**

Las características macroscópicas del hongo *Rhizopus* aislado de muestras de aire, suelo y alimentos se observan en la figura 12, donde se observan las colonias algodonosas, de color café y gris propias de este género.

**Figura 12.** Cepas del género *Rhizopus*



La ubicuidad de este género queda demostrada por el crecimiento homogéneo de sus colonias en todos los medios utilizados para el muestreo, hecho que facilitó la tarea de aislamiento gracias a su crecimiento invasivo que evita el desarrollo de otros microorganismos.

### **5.3 Producción del Complejo Enzimático Crudo Obtenido de *Rhizopus* spp.**

La fermentación de *Rhizopus* spp. sobre salvado de trigo se muestra en la figura 13, en la que se aprecia el crecimiento del hongo después de 48 horas.

**Figura 13.** Fermentaciones de salvado de trigo con *Rhizopus* spp. para la Producción de un Complejo Enzimático Crudo



### 5.3.1 Determinación de Azúcares Reductores y Glucosa

Para la evaluación de la síntesis del complejo enzimático a partir de la fermentación de salvado de trigo con *Rhizopus* spp. se analizaron los azúcares reductores y glucosa los cuales son indicadores del desdoblamiento del sustrato debido a la liberación de enzimas extracelulares por parte del hongo que actúan sobre el almidón y la celulosa los cuales son los componentes principales del salvado de trigo (Hoyos, 2004); lo mismo ocurre con el complejo enzimático comercial Allzyme producto de la fermentación de *Aspergillus niger* sobre salvado de trigo que contiene una mezcla de amilasas, celulasas, glucanasas, proteasas, pectinasas, fitasas y xilanasas (Alltech, 2006). El complejo enzimático CINBBYA contiene una variedad de amilasas, lipasas y proteasas.

Los resultados de azúcares reductores fueron:

Complejo enzimático crudo obtenido de *Rhizopus* spp. : 0.69 g/L

Complejo enzimático comercial Allzyme: 1.38 g/L

Complejo enzimático CINBBYA: 0.33

Los resultados de la prueba de glucosa fueron:

Complejo enzimático obtenido de *Rhizopus* spp. : 0.714 g/L

Complejo enzimático comercial "Allzyme": 1.42 g/L

Complejo enzimático CINBBYA: 0.38 g/L

Los resultados indican que la presencia de azúcares reductores y de glucosa en la muestras evidencian que la producción de enzimas fue positiva.

Al realizar la comparación de los datos de azúcares reductores y glucosa del complejo enzimático producido por *Rhizopus* spp. con los demás complejos enzimáticos, se muestra que Allzyme contiene aproximadamente dos veces más azúcares reductores que el complejo obtenido en esta investigación y tres veces más que el complejo enzimático CINBBYA, esto puede ser explicado por: el microorganismo utilizado para la obtención de los complejos no es el mismo, ya que Allzyme es producido por *Aspergillus niger* y el complejo enzimático CINBBYA es producido por *Aspergillus oryzae*, así pues la variedad de enzimas extracelulares producidas no son las mismas y no se encuentran en iguales concentraciones, otra razón es que las cepas de *Rhizopus* spp. que se utilizaron en la producción tienen las características de ser nativas, no probadas industrialmente en comparación con Allzyme que es un complejo comercializado industrialmente.

### 5.3.2 Determinación de Amilasa

La prueba de amilasa se realizó para los 3 complejos enzimáticos utilizados en esta investigación; los resultados se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Actividad de la Amilasa en los complejos enzimáticos

Extracto enzimáticos	Amilasa (U/l) 25 – 30°C	Amilasa (U/l) 37°C
Extracto enzimático Crudo de <i>Rhizopus</i> spp.	0.278	0.2
Extracto enzimático comercial Allzyme	0.05	0.05
Extracto enzimático CINBBYA	0.285	0.28

Los datos muestran que la actividad de esta enzima es mayor en el complejo enzimático CINBBYA, seguido por el complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp. y el de menor actividad amilásica es Allzyme. Como su nombre lo indica, los complejos enzimáticos están compuestos por una variedad de enzimas, por lo tanto que la actividad amilásica sea mayor los complejos CINBBYA y el obtenido en esta investigación no implica una actividad enzimática superior a Allzyme, como se evidencia y explica en los resultados de azúcares reductores y glucosa.

## 5.4 Fermentación Alcohólica de la miel de caña

### 5.4.1 Producción de Etanol

En el transcurso de las 48 horas de fermentación se hizo un registro de los 7 tratamientos mediante la determinación de los azúcares reductores para hacer un

seguimiento en el consumo de azúcares por parte de la levadura para su transformación a través de la ruta metabólica Embden- Meyerhof en etanol mediante la adición de los complejos enzimáticos a diferentes concentraciones en comparación con un control sin enzima, a fin de establecer patrones de reducción en la concentración de azúcares reductores (Acevedo, 2003; Hoyos, *et al.*, 2004; Chalela, 2007). Los resultados se muestran en la tabla 8.

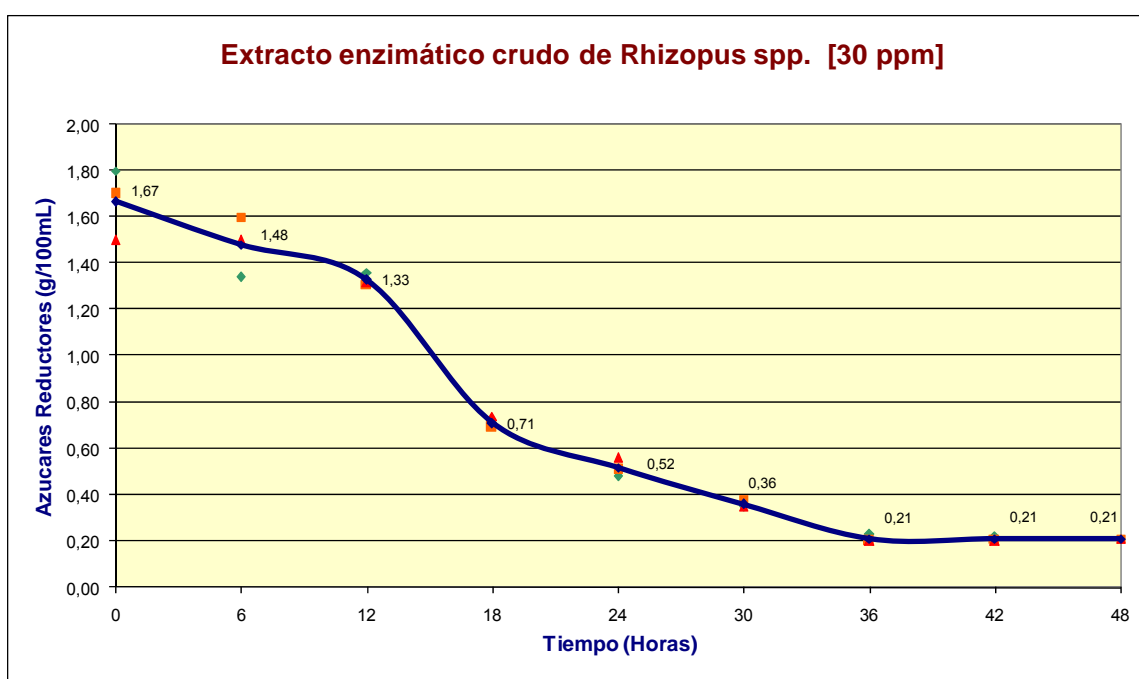
**Tabla 8.** Azúcares Reductores (g/100mL) en los Tratamientos a través del Tiempo de Fermentación (Tomado de la Autora)

Tiempo de fermentación (Horas)	T 1	T 2	T 3	T4	T5	T6	T7
0	1.6±0.15	1.72±0.01	1.5±0.26	1.75±0.02	1.44±0.03	1.65±0.02	1.7±0.17
6	1.48±0.13	1.63±0.04	1.33±0.02	1.62±0.01	1.32±0.02	1.5±0.26	1.55±0.02
12	1.33±0.03	1.3±0.03	1.16±0.03	1.34±0.02	1.14±0.02	1.35±0.03	1.22± 0.02
18	0.71±0.03	0.78±0.02	0.75±0.03	0.86±0.02	0.73±0.01	0.73±0.01	1.09±0.03
24	0.5±0.04	0.57±0.01	0.51±0.01	0.54±0.03	0.5±0.02	0.52±0.01	0.78±0.02
30	0.36±0.02	0.33±0.02	0.36±0.02	0.33±0.03	0.36±0.04	0.36±0.03	0.51±0.02
36	0.21±0.02	0.21±0.01	0.2±0.01	0.21±0.01	0.2±0.01	0.21±0.01	0.42±0.02
42	0.21±0.01	0.21±0	0.2±0	0.21±0	0.2±0	0.21±0.01	0.35±0.02
48	0.21±0	0.21±0.01	0.2±0	0.21±0	0.2±0	0.21±0	0.35±0

Los resultados indican una reducción progresiva en la concentración de los azúcares reductores hasta la 36 horas de fermentación para los tratamientos con adición de complejos enzimáticos en sus diferentes concentraciones y hasta las 42 horas para el tratamiento control, en donde la concentración final de azúcares reductores es más alta que en los tratamientos anteriores, hecho que permite inferir que la adición de complejos enzimáticos en las fermentaciones alcohólicas disminuye hasta en 6 horas el tiempo de fermentación y permiten un mayor consumo de azúcares por parte de la levadura (Acevedo, 2003).

Los resultados de la concentración de azúcares reductores se graficaron para observar el comportamiento de estos a través del tiempo de fermentación para cada uno de los tratamientos, para determinar el patrón de comportamiento de este parámetro que permitirá establecer comparaciones entre ellos.

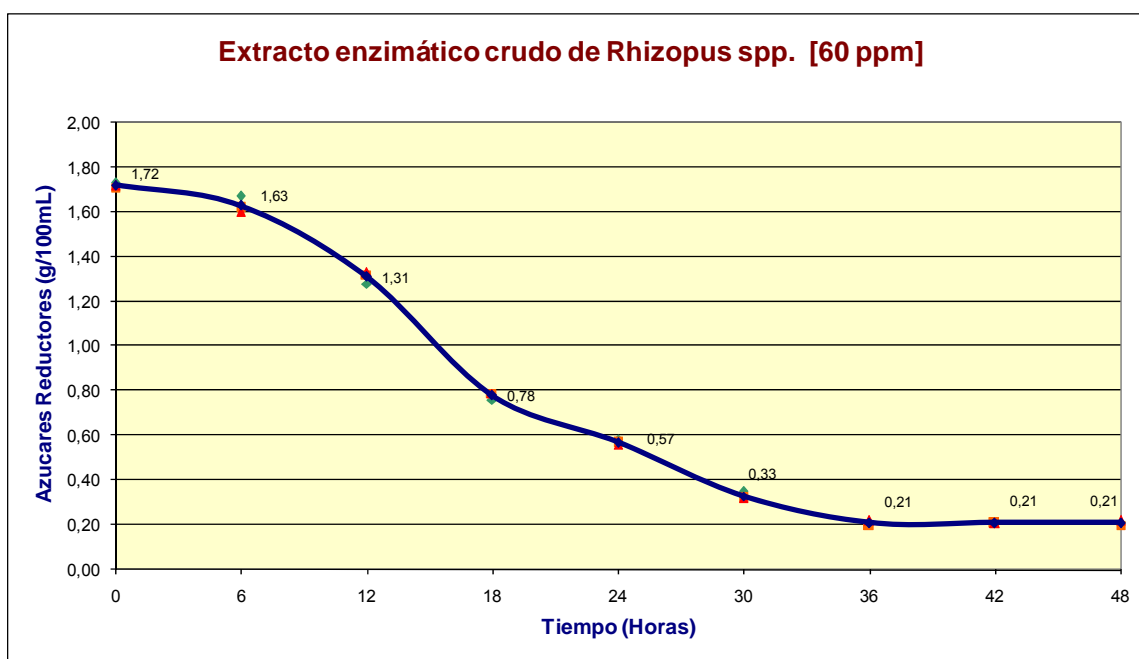
**Figura 14.** Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 1



La figura 14 muestra una tendencia progresiva en la disminución de azúcares reductores a través del tiempo de fermentación, con valores de reducción constante de aproximadamente 0.12 g/100mL, representado por un 7.5% en las primeras 12 horas seguido de una reducción mayor aproximadamente de 0.62 g/100mL que representa una disminución de 44% de los azúcares reductores iniciales, hacia la hora 18, seguida de una tendencia de disminución constante en la concentración alrededor de 0.18 g/100mL, es decir el 13%, hasta transcurridas

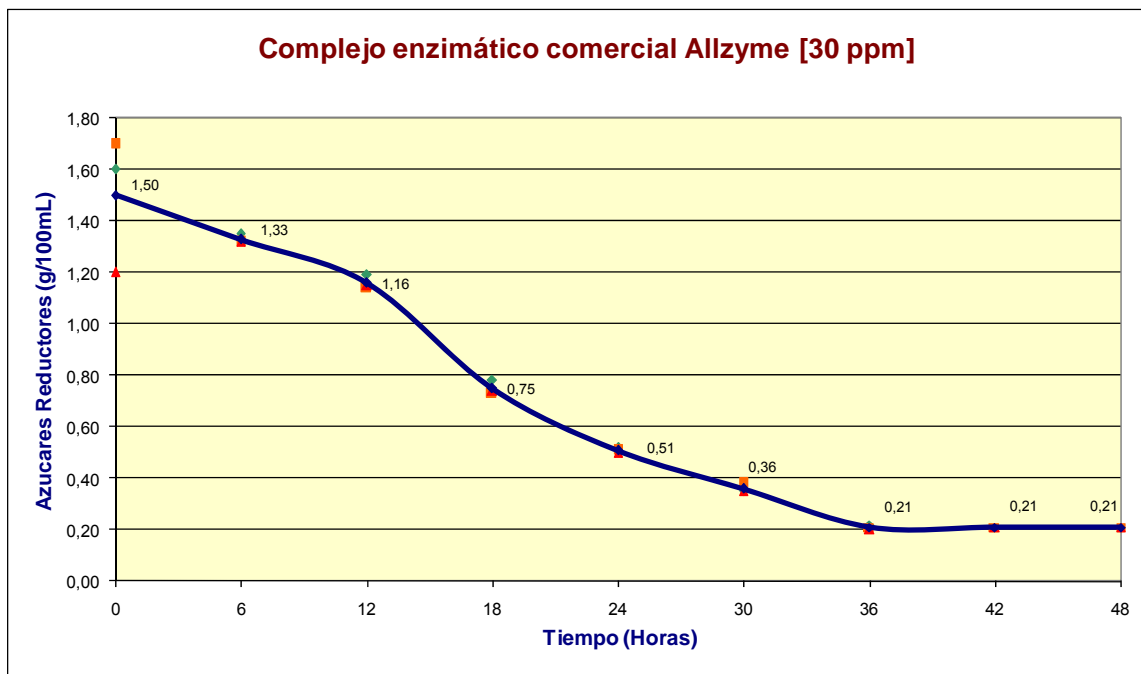
las 36 horas de fermentación, tiempo en el cual los azúcares reductores no varían. Adicionalmente en la figura 14 se pueden observar los puntos de dispersión de las 3 repeticiones realizadas para este tratamiento, las cuales están representadas por las figuras de color naranja, rojo y verde.

**Figura 15.** Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 2



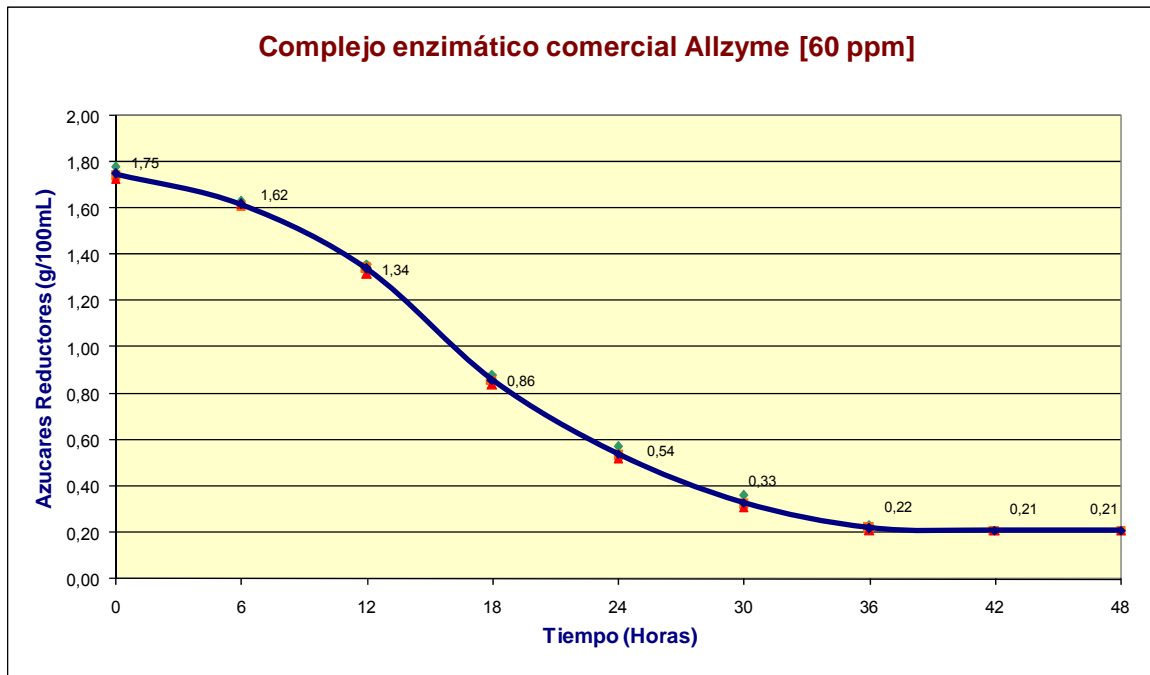
En la Figura 15, los azúcares reductores presentan una tendencia a la disminución en su concentración muy similar al patrón de comportamiento del tratamiento 1, si bien los valores no son los mismos, coinciden en la concentración de 0.21 g/mL de las 36 horas en adelante. Los puntos de dispersión de las repeticiones realizadas para este tratamiento se pueden observar en la figura 15.

**Figura 16.** Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 3



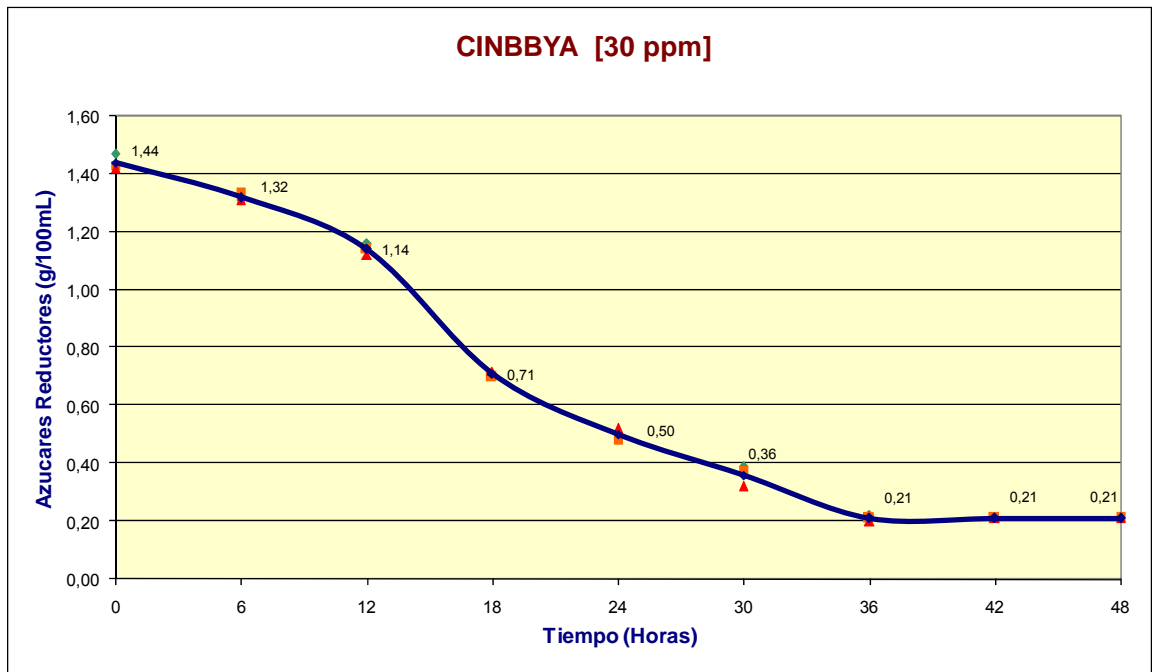
La concentración inicial de azúcares reductores mostrados en la figura 16, disminuye respecto a los tratamientos anteriores, pero mantiene los intervalos de reducción de la concentración antes establecidos para las 12, 18 y 36 horas de fermentación. Nótese que la concentración final ligeramente menor que la de los anteriores tratamientos. Es de notar en la figura 16 los puntos de dispersión de las repeticiones identificadas por las figuras naranja, rojo y verde.

**Figura 17.** Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 4



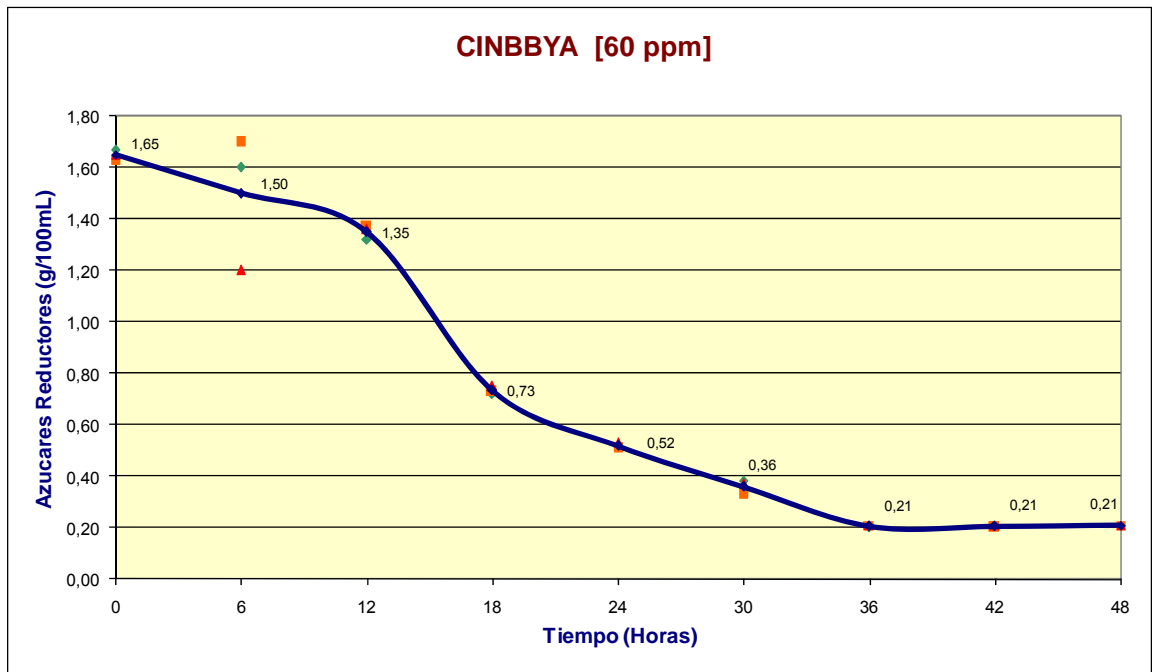
La figura 17 muestra la concentración inicial de azúcares reductores más elevada de todos los tratamientos, pero mantiene una tendencia de reducción de la concentración similar a los tratamientos anteriores para las 12, 18 y las 36 horas, tiempo en el cual se establece el final de la fermentación, ya que la concentración de azúcares reductores se mantiene constante. La concentración final es la misma que la de los tratamientos 1 y 2. Las 3 repeticiones realizadas en este tratamiento también se muestran en la figura 17, representadas por los puntos de dispersión de color rojo, naranja y verde.

**Figura 18. Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación del Tratamiento 5**



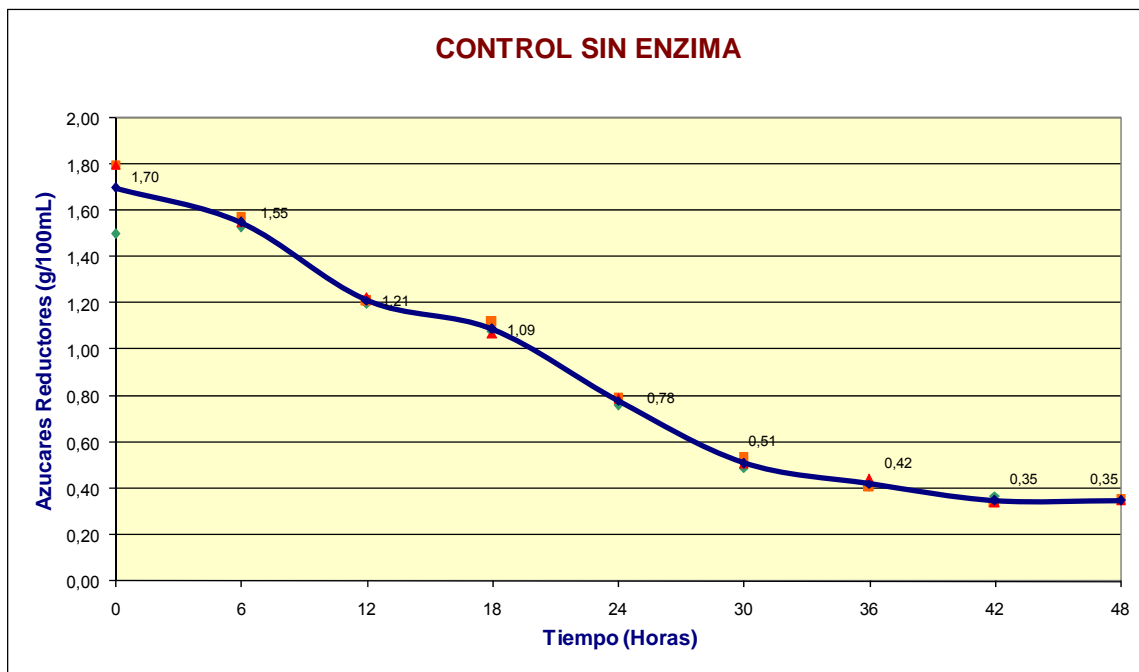
En la Figura 18, la concentración inicial de azúcares reductores es la más baja de todos los tratamientos, sin embargo el patrón de disminución a las 12, 18 y 36 horas es similar a los tratamientos anteriores; después de las 36 horas la concentración se mantiene constante en 0.2 g/100mL, indicando el final de la fermentación. Las figuras geométricas de colores naranja, rojo y verde representan los puntos de dispersión de las repeticiones de este tratamiento.

**Figura 19.** Azúcares Reductores en el Tiempo de Fermentación para el Tratamiento 6



En la figura 19 se mantiene el patrón de reducción de los azúcares reductores presente en los anteriores tratamientos; puede notarse que en esta figura también se muestran los puntos de dispersión que muestran las 3 repeticiones realizadas en este tratamiento representadas por las figuras de color naranja, rojo y verde.

**Figura 20.** Azúcares Reductores en el tiempo de fermentación del Tratamiento 7



La figura 20 evidencia un patrón de reducción de los azúcares reductores a través del tiempo de fermentación diferente a los tratamientos anteriores por mantener una disminución constante de aproximadamente 0.2 g/100mL, representado por un 8.8% de la concentración de azúcares reductores hasta las 42 horas de fermentación. Nótese los puntos de dispersión denotados como las figuras de color naranja, rojo y verde los cuales representan cada una de las repeticiones realizadas para este tratamiento.

En cuanto al comportamiento de los azúcares reductores de todos los tratamientos en el tiempo de fermentación de 48 horas, se observan valores similares en las cantidades iniciales; entre las 12 y 36 horas de fermentación, la cantidad de azúcares reductores disminuye en aproximadamente un 57% de la concentración

inicial en todos los tratamientos; transcurrido este tiempo los datos permanecen constantes hasta cumplir las 48 horas, con excepción del tratamiento 7, el cual corresponde al control, en el que los azúcares reductores siguen disminuyendo hasta las 42 horas, momento en el cual se estabilizan. De lo anterior se deduce que el comportamiento de los azúcares reductores es similar en todos los tratamientos pero el tiempo de fermentación en el control es mayor que los demás. Además puede observarse que los tratamientos con adición de complejos enzimáticos consumen más cantidad de azúcares reductores, como se observa en la tabla 6, este es debido a que la actividad de los complejos enzimáticos permite un mayor aprovechamiento de sustratos como el almidón, amilasa y maltosa entre otros, que no son asimilables por parte de las células de *Saccharomyces cerevisiae* condiciones normales del proceso (Hoyos, *et al.*, 2004).

#### **5.4.2 Destilación del Producto de la Fermentación**

Para la destilación de etanol el intervalo de temperatura del destilador se mantuvo entre 78 y 82°C, temperatura de ebullición de este alcohol. El destilado se cuantificó en mL y se realizó la medición de la concentración en % v/v, dado por el alcoholímetro según Gay Lussac- Cartier, el cual se fundamenta en la menor densidad del alcohol con respecto al agua, lo que significa que la disminución de la densidad del agua está relacionada con el volumen del alcohol presente (Simunovic, 1999), el cual corresponde a etanol producido por *Saccharomyces cerevisiae* por la ruta metabólica Embden- Meyerhof (Bruchmann, 1980; Grazel, *et al.*, 1998). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados del destilado y la Concentración de Etanol en los Tratamientos

Tratamientos	Destilado Obtenido (mL)	Concentración de Etanol (% v/v)	% Incremento de Etanol
1	245 ± 5.13	66.7 ± 1.53	2
2	305 ± 5.77	67.3 ± 1.53	4
3	271 ± 12.58	67.3 ± 2.52	2.9
4	305 ± 5.77	67.3 ± 0.58	4
5	270 ± 0	67.3 ± 0.58	2.9
6	240 ± 17.32	67.3 ± 2.08	1.9
7	184 ± 3.21	67 ± 2.64	0

El rendimiento teórico o esperado de etanol se calcula a partir de los 12°Brix calculados inicialmente para cada una de las fermentaciones, así tendríamos que estos corresponden a 12 g de azúcar/100mL, sabiendo que el rendimiento máximo de conversión de azúcares en etanol es de 0.51 g de etanol por cada g de azúcar y que la densidad de etanol es 0.789 g/mL entonces la cantidad máxima que se puede obtener es:  $[(12 \text{ g} / 100 \text{ mL}) \cdot (3000 \text{ mL}) \cdot (0.51 \text{ g etanol} / \text{g azúcar})] / (0.789 \text{ g etanol} / \text{mL}) = 232.67 \text{ mL}$  de etanol (Zoecklein, *et al.*, 2001; Muñoz, *et al.*, 2003).

Según los resultados, el tratamiento 1 correspondiente a la fermentación con el complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp [30 ppm], los 245mL destilados corresponden al 8.1% del volumen total de 3L, y la concentración de etanol corresponde a un 66.7%, lo que indica que de los 245mL del destilado, 163.4mL corresponden a etanol.

El tratamiento 2 con adición del complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp. [60 ppm], se obtiene el 10.1% de destilado respecto a los 3L de volumen inicial, la

concentración de etanol de 67.3%, lo que muestra que de los 305mL del destilado 205.26mL corresponden a etanol.

En el tratamiento 3 con adición de Allzyme [30 ppm], el destilado corresponde al 9% del volumen inicial, la concentración de etanol es de 67.3%, lo que indica que de los 271mL destilados 182.38 mL corresponden a etanol.

El tratamiento 4 que corresponde a Allzyme [60 ppm], el rendimiento de destilación y la concentración de etanol es igual que el tratamiento 2.

El tratamiento 5 con adición del complejo CINBBYA [30 ppm], se obtuvo el mismo rendimiento que en el tratamiento 3.

El tratamiento 6 que corresponde al CINBBYA [60 ppm], los 240mL destilados corresponden a 8% del volumen total, lo cual se asemeja al tratamiento 1, la concentración de etanol 67.3% es decir que de los 240mL del destilado, 161.52mL corresponde a etanol.

El tratamiento 7 correspondiente al control sin adición de enzima presenta una marcada disminución del destilado de 184mL que representan el 6.1% del volumen total de 3L, la concentración de etanol es de 67%, lo que indica que de los 184mL destilados, 123.28mL corresponden a etanol.

Los anteriores resultados nos indican que el volumen final de etanol obtenido en mL es mayor para los tratamientos con adición de los complejos enzimáticos respecto al tratamiento control, lo cual comprueba lo expuesto anteriormente sobre las ventajas que representa la adición de complejos enzimáticos para la optimización en la producción de bioetanol.

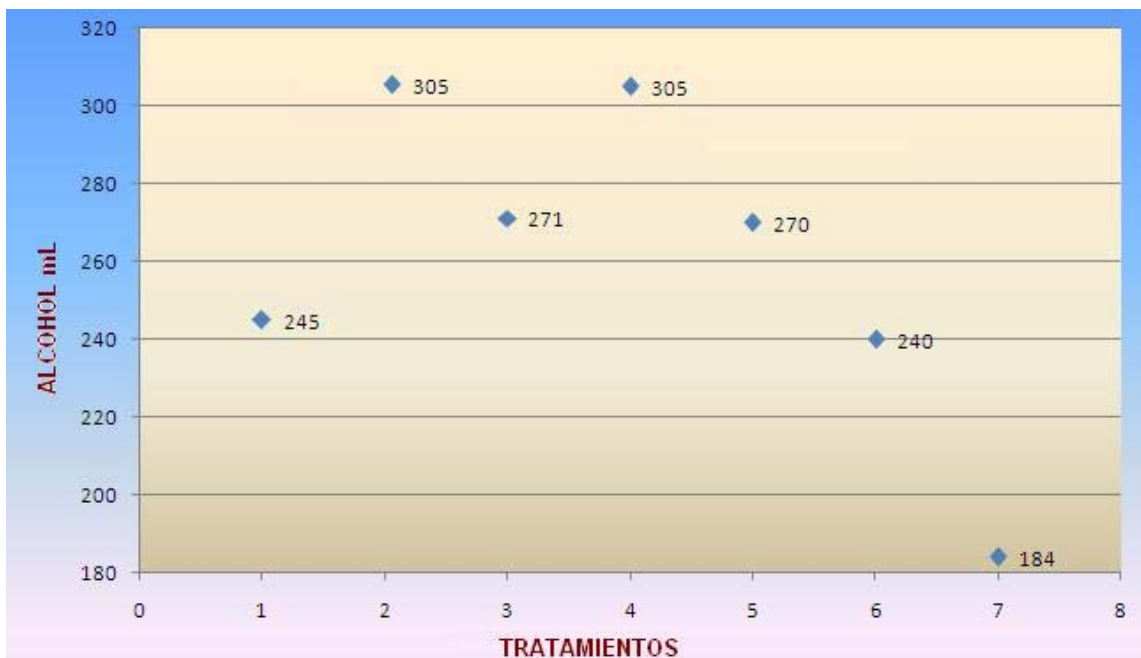
### 5.4.2.1 Análisis Estadístico de los Datos

Para realizar comparaciones entre los tratamientos se realizaron pruebas estadísticas a los datos del destilado en mL y la concentración de este (% v/v), con el fin de tener una base sólida que permita afirmar las diferencias y determinar los tratamientos de mayor rendimiento en la producción de etanol.

#### 5.4.2.1.1 Destilado obtenido (mL)

En la figura 21, se muestra la comparación de las cantidades del destilado obtenido para cada uno de los tratamientos, observándose que el tratamiento 7 es el que más baja producción presenta y los tratamientos 2 y 4 son los de más alto rendimiento.

**Figura 21.** Destilado obtenido (mL) en los Tratamientos



El resultado de la prueba de Anova aplicada a estos datos se muestra a continuación:

$$F_{(6, 20)} = 68.93 \quad P < 0.01$$

La probabilidad nos indica que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, de esto se infiere que existe una base estadística sólida que nos indica que para el parámetro de etanol destilado en mL se pueden establecer grupos entre tratamientos de acuerdo a sus rendimientos. Para esto se realizó un Test de Tukey y Duncan, los resultados obtenidos para estas pruebas se muestran en las tablas 10 y 11, respectivamente.

**Tabla 10.** Resultados del Test de Tukey

Tratamiento	N	Subset			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
7	3	183,6667			
6	3		240		
1	3		244,3333		
5	3			270	
3	3			271,6667	
2	3				306,6667
4	3				306,6667
Sig.		1	0,996	1	1

**Tabla 11.** Resultados del Test de Duncan

Tratamiento	N	Subset			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
7	3	183,6667			
6	3		240		
1	3		244,3333		
5	3			270	
3	3			271,6667	
2	3				306,6667
4	3				306,6667
Sig.		1	0,563	0,823	1

Según estos resultados se establecen los siguientes grupos: el tratamiento 1 y el 6 forman un grupo sólido estadísticamente, al igual que el tratamiento 3 con el 5, el 2 con el 4 y el tratamiento 7 se establece un grupo aparte. Los tratamientos de mayor rendimiento en la producción de etanol son los 2 y 4, los resultados indican la efectividad de los complejos enzimáticos de *Rhizopus spp.* y *Allzyme* respectivamente, en las concentraciones de 60 ppm. El Tratamiento 7 correspondiente al control es el de menor rendimiento en la producción de etanol, consolidado por una notable diferencia significativa respecto a los tratamientos con complejos enzimáticos, demostrando la ventaja de la utilización de enzimas como facilitador del bioproceso fermentativo (Hoyos, 2004; Padilla, 1996).

Por último se realizó un Test de contraste, para comparar el control con respecto a los demás tratamientos, el cual arrojó la siguiente probabilidad:

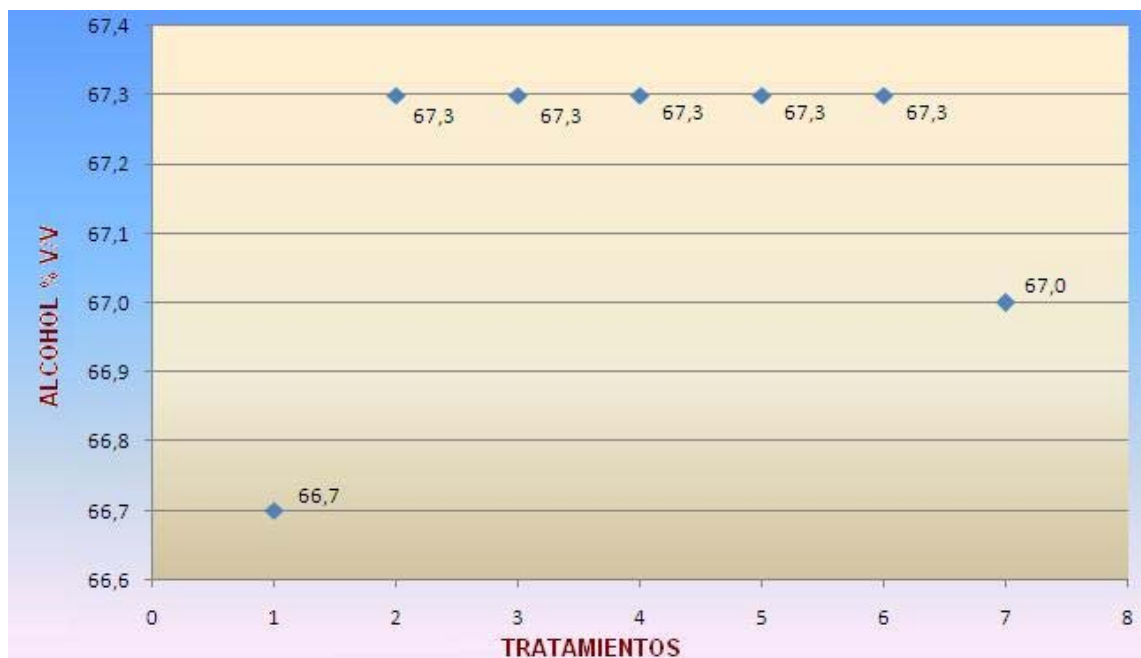
$$t_{14} = 16.032 \quad P < 0.01$$

La probabilidad corrobora lo señalado anteriormente acerca del menor rendimiento en producción de etanol de este tratamiento en comparación con las fermentaciones a las que se le adiciono complejos enzimáticos.

#### **5.4.2.1.2 Concentración de etanol (%v/v)**

Para analizar los datos de la concentración de etanol se realizó primero una gráfica comparativa entre los tratamientos, esta se puede observar en la figura 22.

**Figura 22.** Concentración de Etanol (% v/v) en los Tratamientos



Al observar la figura 20 se nota que los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 la concentración de etanol tiene el mismo valor de 67.3%; en el tratamiento 7 se observa una disminución de 0.3% respecto a las anteriores; el tratamiento 1 se presenta la más baja concentración de etanol con un valor de 66.7%

Para conocer si existían diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una Anova; el resultado obtenido es:

$$F_{(6, 20)} = 0.063 \quad P = 0.99$$

La probabilidad indica que no existen diferencias significativas en la concentración de etanol destilado en los diferentes tratamientos, hecho que puede explicarse por las condiciones homogéneas mantenidas durante el proceso de destilación en todos los tratamientos.

## 5.5 Tratamiento de las Vinazas

Los resultados de la composición química de las vinazas producidas en las fermentaciones se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Composición Química de las Vinazas

<b>Análisis</b>	<b>Resultado % p/p</b>
Sólidos Totales	60
Sólidos Volátiles	44.2
Carbono	22
Proteína Bruta	9.1
Potasio K <sub>2</sub> O	5.7
Azufre SO <sub>4</sub>	4.7
Calcio CaO	2.7
Cloro NaCl	2.2
Nitrógeno N	0.9
Magnesio MgO	0.7
Fósforo P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.2

Los resultados mantienen unos parámetros de composición similares a estudios previos de las vinazas (Gloria, *et al.*, 1983); para aprovechar estos altos contenidos de materia orgánica se aplica la vinaza en residuos de cosecha o en subproductos de la caña de azúcar, para incrementar la actividad microbiana, acelerar el proceso de descomposición y reducir el tiempo de la preparación de abonos orgánicos; aumentando igualmente los contenidos de potasio, calcio y azufre en el abono orgánico (Quintero, 2004).

La preparación del compostaje con la vinaza generada en los tratamientos de fermentación y paja de caña de azúcar se observa en la figura 23.

**Figura 23.** Observación del proceso de mezcla de Vinazas y paja de caña.



El seguimiento de las fases del compostaje y los análisis de las características del bioabono obtenido serán objeto de una investigación posterior.

## 6. CONCLUSIONES

La miel de caña proveniente de la Hoya del río Suarez utilizada en el bioproceso posee características físico químicas como pH 4.9, °Brix 90, Humedad 21%, Carbohidratos 76.69%, Fibra 0.16%, Minerales 1.16% y Proteínas 0.89%, datos que la convierten en una materia prima con gran potencial para su utilización en la producción de biocombustibles en la industria nacional.

Los tratamientos con adición de los complejos enzimáticos en sus diferentes concentraciones presentaron una concentración menor de azúcares reductores de 0.21 g/100mL al final del tiempo de fermentación con respecto al tratamiento control cuya concentración de azúcares reductores final fue de 0.35 g/100mL.

Se observó un incremento de aproximadamente 4% en el etanol producido en los diferentes tratamientos con adición de los complejos enzimáticos en comparación con el tratamiento control. Según el análisis estadístico de los datos, los tratamientos más productores de etanol fueron los formados por el complejo enzimático crudo de *Rhizopus* spp. [60 ppm] y Allzyme [60 ppm], por lo tanto se considera que estas son las mejores concentraciones para la optimización del bioproceso.

El complejo enzimático crudo producido por cepas nativas de *Rhizopus* spp. no caracterizadas industrialmente como cepas mejoradas y específicas para la producción de enzimas extracelulares, alcanzó el mismo nivel de eficiencia en

una concentración de 60 ppm en la producción de etanol de 10.1% del volumen total, en comparación con el complejo enzimático comercial, como el Allzyme probado en esta investigación, y fue superior al complejo enzimático desarrollado en una investigación anterior por el Centro de Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA) de la UNAB cuyo mayor rendimiento fue del 9% del volumen total a una concentración de 30 ppm.

La concentración de etanol del destilado producto de la fermentación de los tratamientos con adición de los complejos enzimáticos en sus diferentes concentraciones y el control sin enzima fue de aproximadamente 67.1% y no presento diferencias significativas entre ellos debido a la homogeneidad del proceso de destilación.

## 7. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones posteriores con el complejo enzimático crudo obtenido de cepas nativas de *Rhizopus* spp., para implementar su uso a escalas piloto e industrial, y de esta forma hacer posible su comercialización como un coadyudante efectivo en el proceso de fermentación alcohólica.

Utilizar otros sustratos diferentes a salvado de trigo, como cascarilla de arroz, semillas de amaranto, para producir complejos enzimáticos con cepas nativas de *Rhizopus* spp. y evaluar su rendimiento en la producción de etanol utilizando materias primas con fuentes ricas en almidón, así como también las vinazas como posibles fuente de azúcares fermentables para la levadura.

Evaluar otras enzimas presentes en el complejo enzimático crudo producto de esta investigación para obtener una descripción completa del mismo.

Hacer el seguimiento del compostaje de vinazas y paja de caña, y evaluar las características del bioabono producido.

Utilizar las vinazas como sustrato para que el complejo enzimático degrade los azúcares disponibles en las mismas y así lograr disminuir la cantidad de materia orgánica.



## BIBLIOGRAFIA

ACEVEDO, A., GODOY, R. y BOLAÑOS, G. 2003. Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. 3er. Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos.

ALLTECH, 2006. Ficha Técnica del Complejo Enzimático Allzyme® SSF.

ANCILLOTTI, F. and FATTORE V. 1998. Oxigenate fuels: Market expansion and catalytic aspects of synthesis. Fuel process. Technol. 57: 163 – 194.

BALLESTEROS, I. 1997. Desarrollo Rural y Energía Renovables: Biomasa y Biocombustibles. Seminario Energías Renovables, Madrid, España.

BECKER, J., CALDWELL, G. y ZACHGO, E. 1999. Biotecnología Curso Práctico de Laboratorio. Acribia, S.A., España, 201- 204.

BELL, D., HOARE, M. and DUNIILL, P. 2003. The Formation of Protein Precipitates and their Centrifugal Recovery. Biochemical Engineering. v. 26, 2003. p. 1-72.

BHELLA, R. and ALTOSAAR, I. 1985. Purification and Some Properties of the Extracellular  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus awamori*. Can J. Microbiol, 1985; 31. 149p.

BIOSYSTEMS S.A. Glucosa. Glucosa oxidasa/peroxidasa. Barcelona, España.

BRUCHMANN, E. 1980. Bioquímica Técnica. Zaragoza: Editorial Acribia. 233p.

BUSTOS, M. 2006. Alcohol carburante: impacto socio-económico en la región de la Hoya del Río Suárez. Observatorio de la Economía Latinoamericana, N° 57. Disponible en Internet: [www.eumed.net/coursecon/ecolat/la/](http://www.eumed.net/coursecon/ecolat/la/).

CALERO, C. y BRICEÑO, C. 2003. Proyecto Nacional de Oxigenación de las gasolinas en Colombia, Carta Trimestral. CENICAÑA. Cali. Vol.25N° 4, p. 15.

CAMPOS, D. 2001. Curso Aplicaciones de la Biotecnología Enzimática en Procesos Agroindustriales. Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú.

CARRERA, J. 2002. Biotecnología de las Enzimas. Módulos de Laboratorio. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Popayán. p. 132-145.

CHALELA, G. y ESCALANTE, H. 1989. Amilasas Alfa y Beta Microbianas. Revista ION. 11 (2): 77- 88.

CHALELA, G. 2007. Comunicación Verbal.

CHAPLIN, M. and BUCKE, C. 1992. Enzyme Technology. New York: Cambridge University Press. 264p.

CHUM, H. and OVEREND, R. 2001. Biomass and renewable fuels. Fuel Process. Technol. 71: 187 -195.

COLOMBIA. MINISTERIO DE MINAS Y ENERGIA. 2003. Resolución N°. 18 0687 de Junio 17 de 2003, Ley 693 de 2001. Bogotá. D.C.: El Ministerio. 11 p.

- CORPODIB, Corporación para el Desarrollo Industrial de la Biotecnología y Producción Limpia. 2002. Boletín Informativo N°12. Bogotá D.C.
- CRUZ, M. y HERMOSILLA, G. 2006. Fisiología Bacteriana. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. p. 15-24.
- DOMIGOS, J. 1995. Fisiologia da cana de açúcar. Universidade estadual paulista. Instituto de biociências. Campus de botucatu.
- DUVALL, A., LIU, Y. and CHEN, S. 2003. Determination of Optimal Fermentation Factors for Amylolytic Enzyme Production by *Rhizopus oryzae*. WSU/NSF Center for Multiphase Environmental Research. Washington State University.
- FERREIRA, S., e MONTENEGRO, O. 1987. Efeitos da aplicacao da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Boletín Técnico COPERSUCAR (Brasil) v.36: 1-7.
- FUNDAÇÃO CARGILL. 1987. Cana de Açúcar Cultivo e Utilização. v. 2. Campinas: Fundação Cargill. 856 p.
- GACESA, P. y HUBBLE, J. 1990. Tecnología de las enzimas. Zaragoza: Editorial Acribia. 206p.
- GLAZER, A., and NIKAIDO, H. 1998. Microbial Biotechnology. New York: W.H. Freeman and Company. 2 Ed. 643p.
- GLIKIN, G. Producción de Amilasas Fúngicas. Práctica Conceptos y Técnicas de Biotecnología I. Universidad de Buenos Aires, Argentina. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. p. 1-8.

GLORIA, N.A. DA, ORLANDO FILHO, J. 1983. Aplicacao da vinhaça como fertilizante. Boletín Técnico PLANALSUCAR (Brasil) v.5 no.1: 5-38.

GOMEZ, R. y SANTIESTEBAN, C. 2000. Vinaza. Manual de los derivados de la caña de azúcar. ICIDCA, La Habana.

GONZALEZ, A. y VALENZUELA, L. 2000. *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México. p. 1-13.

GUILLEN, F., ARRIAS, F., FAZZANO, S., LENARTOVICZ, V., MARQUES, C. and PERALTA, R. 1999. Production of Amylases by *Aspergillus tamarii*. Revista de Microbiología N° 30: 157 -162.

GUPTA, R., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. and CHAUHAN, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective. Process Biochemistry. Jan. p. 1-18.

HOYOS, J. y CARRERA J. 2004. Desarrollo de un Complejo Enzimático por Fermentación de Sustrato Sólido con *Rhizopus niveus*, para la Optimización de la Producción de Alcohol Etílico a partir de Melaza. Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol. 2 N° 1: 33-44.

HOYOS, J. 2002. Evaluación de la Concentración del Complejo Enzimático Rhyzozime en la empresa Sucromiles S.A. Palmira, Colombia.

ICIDCA, 1999. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico- Técnico, La Habana.

ILLANES, A. 1994. Biotecnología de las enzimas. Editorial Universitaria de Valparaíso, Chile: 200- 211.

JIN, B., LEEUWEN, H., PATEL, B., DOELLE, H. and YU, Q. 1999. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. *Process Biochem.* 34: 59-65.

KAFAROV, V., OJEDA, K. y SANCHEZ, E. 2006. Situación y Perspectiva de Biocombustibles en Colombia. Centro de investigaciones en Simulación y Control de Procesos. Universidad Industrial de Santander. Disponible en Internet: [www.nipeunicamp.org.br/agrener2006/palestras/Dia%2007-06-2006/kafarov.ppt](http://www.nipeunicamp.org.br/agrener2006/palestras/Dia%2007-06-2006/kafarov.ppt).

LARONE, D. 1995. *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

LIM, D. 1998. *Microbiology*. WCB/Mc Graw- Hill. Second Edition. 528p.

MACEDO, I. 1996. Combustível de Biomassa: Produção e Tecnologia, Alcool e a nova orden economica mundial. Frente Parlamentar Sucroalcooleira, Brasilia.

MADIGAN, M. 1999. *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Prentice- Hall.

MATHEWS, CK., VAN HOLDE, KE. Y AHERG KG. 2003. *Bioquímica*. Addison-Wesley. 3ª Ed. 1368p.

MESAS, J. y ALEGRE, M. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Technol. Aliment.* Vol. 2, No. 4: 174-183.

MOJICA, A y PAREDES, J. 2004. El Cultivo de la Caña Panelera y la Agroindustria Panelera en el Departamento de Santander. Centro Regional de Estudios Económicos del Banco de la República, Bucaramanga.

MONTES, L. 1981. Bromatología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 2<sup>a</sup> Ed. 491p.

MOREIRA, J. and GOLDEMBERG, J. 1999. The Alcohol Program. Energy Policy 27: 229- 245.

MUÑOZ, J., RODENAS M. y RUIZ, J. 2003. Análisis (químico) y control (digital) en la producción del vino. I.E.S Cristóbal Pérez Pastor de Tobarra (Albacete). España. 45p.

MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P. and RODWELL V. 1997. Bioquímica de Harper. México D.F.: El Manual Moderno.

NOA, H. 1982. La diversificación de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. GEPLACEA, México D.F.

NÚÑEZ, I. 2001. Enzimología. Madrid: Editorial Pirámide. 400p.

OCAMPO, A. 2004. Alcoholes carburantes. En Revista EIA. Medellín. N°1 (Febrero). 41p.

ORLANDO FILHO, J. 1991. Manejo de suelos y uso de fertilizantes para la caña de azúcar en Brasil. Boletín GEPLACEA, v.8 no.3: 1-6.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. and NIGAM, P. 1999. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. In: Current Science, v. 77. N°1 Jul.:149-161.

PANDEY, A., SOCCOL, C., RODRIGUES-LEON, J. and NIGAM, P. 2001. Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 221p.

PANDEY, A., SOCCOL, C., SOCCOL, V., SINGH, D. and MOHAN, R. 2000. Advances in Microbial Amylases. Biotechnol. Appl. Biochem.; 31:135-152.

PANDEY, A., WEBB, C., SOCCOL, C. and LARROCHE, C. 2005. Enzyme Technology. 1 Ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 760 p.

PEIXOTO, S., JORGE, J., TERENCEZI, H. and POLIZELI, M. 2003. *Rhizopus microspores var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. Int. Microbiol. 6: 269- 273.

QUINTERO, R. 2004. Perspectivas acerca del uso y manejo de vinazas aplicadas al suelo. En: Encuentro sobre vinaza, potasio y elementos menores para una agricultura sostenible. Palmira (Colombia) 13-14 mayo, 2004. Memorias. Palmira. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo (SCCS). (Disco compacto).

ROCH-CHUI, Y. and HANG, Y. 1990. Amilolytic enzymes production by *Rhizopus oryzae* grown on agricultural commodities. World journal of Microbiology and Biotechnology (6) 15- 18.

RODRÍGUEZ, B. 2000. La Panela en Colombia Frente al Nuevo Milenio. En Corpoica- Fedepanela, Manual de Caña de Azúcar.

ROEHR, M. 2001. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. Edited by M. Roehr. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

ROSAS, J. Curso de Biología Molecular Y Celular. 2003. Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos. Disponible en Internet en: <http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>.

SALGADO, J. 2007. Bioquímica Tema 9. Universidad Virtual del Estado de Guanajuato. México. p. 12. Disponible en Internet: [www.uv.es/bbm/grupoE/TemasB/Tema9-07.pdf](http://www.uv.es/bbm/grupoE/TemasB/Tema9-07.pdf).

SÁNCHEZ, O. y CARDONA, C. 2005. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia* 30: 671- 678.

SÁNCHEZ, O. y CARDONA, C. 2005. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de procesos. *Interciencia* 30: 679- 686.

SCHIPPER, M. and STALPERS, J. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. *Stud. Mycol.* 25: 20- 34.

SHEEHAN, J. and HIMMEL, M. 1999. Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnology Program* 15: 817- 827.

SIMUNOVIC, Y. 1999. Manual de Bebidas Alcohólicas y Vinagres. Subdepartamento Divulgación Técnica Servicio Agrícola y Ganadero. Chile. p. 31-34.

SOCCOL, C., ILOKI, I., MARIN, B., ROUSSOS, S. and RAIMBAULT, M. 1994. Comparative Production of Amylase and Protein Enrichment of Raw and Cooked Cassava By Rhizopus Strains in Submerged and Solid State Fermentation. Journal of Food Science and Technology. V. 3. p. 320-323.

SOCCOL, C., MARIN, B., RAIMBAULT, M. and LEBEAULT, J. 1994. Breeding and Growth of Rhizopus in Raw Cassava by Solid State Fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 41. p. 330-336.

SOUZA, E., HOFFMANN, E., CASTILHO, V., LIMA, V., BELLINI, M., CRUZ, V. e CRUZ, R. 2003. Produção e Caracterização de  $\alpha$ -Amilase Produzida por Rhizopus spp. In: Arq. Biol. Tecnol. 39 (4). p. 831-839.

SPIER, M. 2005. Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas  $\alpha$ -Amilase e Amiloglicosidase por Fermentação no Estado Sólido. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. 178p.

SPIER, M., WOICIECHOWSKI, A. and SOCCOL, C. 2004. Produção de  $\alpha$ -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro. v. 1. p. 116.

SPILLMAN, A. 2003. Raising Cane. ARS Research benefits Sugarcane Growers and Processors. Agricultural Research, 4-7.

SPSS (2003) Copyright 1989-2003 © SPSS Inc.

ST-GERMAIN, G. and R. SUMMERBELL. 1996. Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook, 1 ed. Star Publishing Company, Belmont, California.

SUÁREZ, R. y MORÍN, R. 2005. Caña de azúcar y sostenibilidad: Enfoques y experiencias cubanas. Desarrollo Alternativo A. C (DESAL).

SZAKACS, G. 2004. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, Clermont-Ferrand, France. v. 1: 20.

TUNGA, R. and TUNGA, B. 2003. Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University. 12p.

USA. 2006. Rhizopus spp. Disponible en Internet: <http://www.doctorfungus.com>.

VAN DER MAAREL, M., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J., LEEMHUIS, H. and DIJKHUIZEN, L. 2002. Properties and Applications os Starch Converting Enzymes of Alpha Amylase Family. J. Biotechnol., 94:137-155.

VARGAS, S. 2002. Selección y Evaluación de Bacterias del Género Bacillus Productoras de Amilasa en Cultivo Sumergido. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 82p.

VÁSQUEZ, E. 2004. Bioquímica y Biología Molecular en línea. Instituto de Química, Universidad Autónoma de México.

VIDMANTIENE, D., JUODEIKIENE G. and BASINSKIENE L. 2005. Technical ethanol production from waste of cereals and its products using a complex enzyme preparation. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 86, Issue 11 , P. 1732 – 1736.

- VIHINEN, M. and MÄNTSÄLÄ, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24: 329- 418.
- WAINWRIGHT, M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Zaragoza: Acribia, 228 p.
- WARD, O. 1989. Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., p. 64-67 y 233-247.
- WIENER LAB. 2000. Amilasa 405. Método Cinético a 405 nm. Sustrato CNPG3. Rosario- Argentina.
- WILCHES, M. 1993. Bioingeniería Tomo II: Principios Básicos de Bioquímica. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia. p. 151- 180.
- WISEMAN, A. 1995. Manual De Biotecnología de las Enzimas. Editorial Acribia S.A., España.
- XAVIER, M. 2007. The Brazilian Sugarcane Ethanol Experience. Competitive Enterprise Institute. N° 3: 1-11.
- ZAMBONELLI, C. 1988. Microbiologia e biotecnologia dei vini. Ed. Edagricole, Bolonia.
- ZAMBRANO, D. 2005. Diagnóstico de Sensibilidad por el Montaje de una Planta Productora de Alcohol Carburante en la Hoya del Río Suárez. Universidad de Boyacá, Centro de Investigación para el Desarrollo "CIPADE", Facultad de Ciencias e Ingeniería, Programa Ingeniería Industrial. p. 116-122.

ZOECKLEIN, B., FUGELSANG, K. y GUMP, B. 2001. Análisis y Producción de Vino. Editorial Acribia S.A., España. 640p.

## ANEXO A.

### CURVA PATRÓN PARA LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Los datos de absorbancia obtenidos con concentraciones de conocidas de glucosa para realizar una curva patrón de glucosa se muestran en la figura 24.

**Figura 24.** Absorbancia vs Concentración de glucosa (mg/dL)

