

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

**“USO DE RESIDUOS CELULÓSICOS DE LA AGROINDUSTRIA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”**

MARIO ALEJANDRO VEGA MARÍN

DIRECTORA: LCDA. VERÓNICA LUNA

QUITO, 2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Lcda. Verónica Luna por su guía, apoyo y tutoría, gracias a los cuales logré culminar el presente trabajo; así mismo por su confianza en mí depositada.

A la Dra. Josefina Egas y la Lcda. Letty García, lectoras del proyecto, quienes gracias a su soporte académico me ayudó a la elaboración de este trabajo.

A todo el personal de DiserLab que colaboraron en el desarrollo del proyecto.

A las personas que directa o indirectamente fueron un soporte y ayuda para haber culminado esta etapa en mi vida académica.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo

A mis padres, por su ejemplo y apoyo en toda mi vida

A mis hermanos, por estar siempre presente cuando los necesité

A los maestros de la Escuela de Bioanálisis, y en especial a los profesores de la licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada, por impartir sus enseñanzas y conocimientos.

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PAG.
Resumen	1
Summary	2
CAPÍTULO I	
1.1 Introducción	3
1.2 Objetivos	
1.2.1 Objetivo general	5
1.2.2 Objetivo específico	5
CAPÍTULO II	
Marco Teórico	
2.1 Etanol	6
2.2 Materia prima para la elaboración del etanol	7
2.2.1 Materia orgánica con alto contenido de azúcar	8
2.2.2 Materia orgánica con alto contenido de almidón	9
2.2.3 Materia orgánica con alto contenido de celulosa	9
2.3 Composición de la materia celulósica	10
2.3.1 Lignina	11
2.3.2 Hemicelulosa	11
2.3.3 Celulosa	12
2.4 Organismos celulolíticos	13
2.5 Enzimas celulasas	15
2.5.1 Endo β glucanasas	17
2.5.2 Exo β glucanasas	17
2.5.3 β glucosidasas	18
2.6 Obtención de alcohol a partir de residuos lignocelulósicos	18
2.6.1 Deslignificación	19

2.6.2 Hidrólisis de la celulosa	20
2.7 Fermentación alcohólica	21
2.7.1 Ciclo de Embden-Meyerhoff	22
2.8 Levaduras	25
2.8.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
CAPÍTULO III	
Materiales y Métodos	
3.1 Localización de los laboratorios	32
3.2 Materiales y reactivos	32
3.3 Reactivación de cepas de hongos celulolíticos	33
3.3.1 Metodología	33
3.4 Selección de cepa celulolítica	34
3.4.1 Preselección de cepas celulolíticas (Evaluación cualitativa)	34
3.4.1.1 Metodología	34
3.4.2. Selección de cepas celulolíticas por diferencia de peso de papel filtro	36
3.4.2.1 Metodología	36
3.4.2.2 Tratamientos	36
3.4.2.3 Variables	37
3.4.2.4 Análisis estadístico	37
3.5 Selección de un medio de cultivo para la producción de celulasas	38
3.5.1 Metodología	38
3.5.2 Tratamientos	39
3.5.3 Variables	39
3.5.4 Análisis estadístico	40
3.6 Hidrólisis de los sustratos	41
3.6.1 Metodología	41
3.6.2 Tratamientos	41
3.6.3 Variables	42
3.6.4 Análisis estadístico	42
3.7 Fermentación alcohólica	43

3.7.1 Fermentación alcohólica por lotes	43
3.7.1.1 Metodología	43
3.7.1.2 Tratamientos	44
3.7.1.3 Variables	44
3.7.1.4 Análisis estadístico	45
3.7.2 Fermentación alcohólica por sacarificación y fermentación simultánea	46
3.7.2.1 Metodología	46
3.7.2.2 Tratamientos	47
3.7.2.3 Variables	47
3.7.2.4 Análisis estadístico	47
CAPÍTULO IV	
Resultados	
4.1 Reactivación de cepas de hongos celulolíticos	49
4.2 Selección de cepa celulolítica	50
4.2.1 Preselección de cepas celulolíticas (Evaluación cualitativa)	50
4.2.2 Selección de cepas celulolíticas por diferencia de peso del papel filtro	51
4.3 Selección de un medio de cultivo para la producción de enzimas celulasas en base a la cantidad de glucosa producida	54
4.4 Hidrólisis de los sustratos	58
4.5 Fermentación alcohólica	65
4.5.1 Fermentación alcohólica por lotes	65
4.5.2 Fermentación alcohólica por sacarificación y fermentación simultánea	70
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
FOTOGRAFÍAS	85
ANEXOS	93

RESUMEN

La materia orgánica con alto contenido de celulosa ofrece gran potencial, como materia prima, para la elaboración de varios productos de interés industrial. Sin embargo su uso está restringido principalmente para la industria papelera y elaboración de carbón vegetal. La falta de uso de esta materia se debe principalmente a la recalcitrancia de la materia celulósica para lograr transformarla en sus componentes primarios, y a los costos que suponen transformarlos mediante procesos químicos. Una manera de utilizar esta materia, es usando procesos biológicos, puntualmente procesos enzimáticos que resultan mucho más baratos que los procesos químicos, con la ventaja de que no producen contaminación alguna. Un uso que se puede dar a la materia celulósica, y como alternativa ambiental utilizar residuos agroindustriales, es la elaboración de biocombustibles, como el bioetanol, para solucionar en parte el agotamiento de los recursos energéticos basados en petróleo, y enfrentar los problemas de contaminación ambiental.

Con el objetivo de producir enzimas celulasas que sean capaces de hidrolizar materia orgánica con alto contenido de celulosa, se evaluó las cepas celulolíticas que se conservan en el cepario del laboratorio de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis para que puedan ser utilizadas para la hidrólisis de la celulosa. Las cepas evaluadas fueron de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Se las preseleccionó mediante su crecimiento en un medio mínimo que contenía papel filtro como única fuente de carbono. La selección de la mejor cepa celulolítica se realizó por la degradación de papel filtro medido por la diferencia de peso del mismo lograda con los sobrenadantes de cada cepa preseleccionada. El medio de cultivo para la elaboración de celulasas se eligió mediante la evaluación de sustratos celulósicos, los que se adicionaron en diferentes concentraciones al medio Mandels modificado y así se determinó el sustrato, la concentración y el tiempo de fermentación necesarias para la síntesis de celulasas. También se realizó una evaluación para determinar las mejores condiciones para la hidrólisis de los sustratos celulósicos. Para la elaboración de bioetanol se ensayaron dos técnicas: una fermentación alcohólica por

lotes, y una sacarificación y fermentación simultánea (SFS), y se determinó que la técnica de SFS es la que produce una mayor concentración de bioetanol.

ABSTRACT

The organic matter with high content of cellulose offers great potential, like raw material, for the elaboration of several products of industrial interest. Nevertheless its use is restricted mainly for the paper industry and elaboration of charcoal. The lack of use of this matter is due mainly to the recalcitrancy of the cellulose matter to manage to transform it into its primary components, and to the costs that suppose to transform them by means of chemical processes. A way to use this matter is using biological processes, like enzymatic processes that are much cheaper than the chemical processes, with the advantage of that do not produce contamination. A use that can be given the cellulose matter, and like environmental alternative to use agro-industrial residues, is the elaboration of biocombustibles, like bioetanol, to partly solve the exhaustion of the power resources based on petroleum, and to face the problems of environmental contamination.

With the objective of producing enzymes cellulases that are able to hidrolize organic matter with high content of cellulose, the cellulolitics strains that are conserved in cepario of the laboratorio de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis were evaluated, so that they can be used for hydrolysis of the cellulose. The evaluated strains were of *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. One preselected them by means of his growth in minimum media that contained paper filter like unique carbon source. The selection of the best cellulolytic strain was realised by the degradation of paper filter measured by the difference of obtained weight of the same with the sobrenadantes of each preselected strain. The media of culture for the elaboration of cellulases were chosen by the evaluation of cellulose substrates, those that were added in different concentrations from modified the Mandels media and thus it determined the substrate, the concentration and the necessary time of fermentation for the synthesis of cellulases. Also an evaluation was realised to determine the best conditions for hydrolysis of the cellulose substrates. For the elaboration of bioetanol two techniques were used: an alcoholic fermentation by lots,

and a saccharification and simultaneous fermentation (SSF), and determined that the SSF technique is the one that produces the larger concentration of bioetanol.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El etanol ha sido utilizado, desde la antigüedad, para el consumo humano, en la fabricación de bebidas alcohólicas, también es usado en la industria química, en la farmacéutica y automotriz como combustible o como aditivo para mejorar la calidad de los combustibles fósiles.

Como combustible el etanol ha sido usado desde los inicios del automovilismo, por varias razones, entre las que se pueden citar: los excedentes de etanol y escaso desarrollo de la industria petroquímica en la Europa de finales del siglo XIX, los problemas energéticos causados en la Segunda Guerra Mundial, especialmente en países con escasos recursos de petróleo; después de este conflicto la industria petrolera experimentó un gran desarrollo provocando que el etanol sea mucho más caro que la gasolina. En 1.973, con la primera crisis del petróleo, se retomó el interés por sustituir los combustibles fósiles con otras fuentes de energía alternativa.

El primer país que dio el gran paso para la producción de biocombustibles fue Brasil, en el año de 1.975, cuando lanzó su denominado Programa Proalcohol. El programa pretendía sustituir la gasolina por etanol producido a partir de la fermentación del jugo de la caña de azúcar.

Estados Unidos también ha adoptado un programa que consiste en transformar los excedentes de cereales en etanol para utilizarlos en mezclas con la gasolina.

Otra circunstancia que determinó el creciente interés por la materia orgánica como fuente de energía es la disponibilidad de enormes excedentes agrícolas generados por las industrias en muchos países, especialmente los más industrializados. (16, 34,35)

Actualmente el bioetanol es el biocombustible de mayor producción a nivel mundial. En el año 2.004 se elaboraron mundialmente más de 40.000 millones de litros de etanol (15)

Para la elaboración de bioetanol utilizando desechos orgánicos, es necesario usar enzimas que descompongan el componente mayor del desecho orgánico: celulosa en caso de material celulósico, almidón en el caso de cereales, lactosa en el caso de residuos lecheros, etc.; en azúcares simples, para después efectuar una fermentación alcohólica.

Los mismos desechos pueden ser usados para la elaboración de enzimas, aprovechando al máximo toda su materia prima.

La fermentación alcohólica para obtener biocombustibles es prácticamente igual a la realizada para consumo humano, pero incluye un proceso de destilación para conseguir el etanol absoluto, que es la calidad que se requiere para utilizarlo como combustible.

El etanol puede ser usado en mezclas con gasolinas en concentraciones del 5 o 10%, llamadas E5 o E10 respectivamente, que no necesitan de modificaciones en los motores de los automóviles. Para usar el bioetanol en concentraciones mayores del 10%, o como único combustible el motor requiere una modificación. Además se puede utilizar el etanol para la elaboración de aditivos para la gasolina. (10, 33)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Utilizar residuos celulósicos de la agroindustria como materia prima para la producción de bioetanol, con el uso de enzimas celulasas producidas a partir de un hongo celulolítico del banco de cepas del laboratorio de Microbiología Agrícola de la PUCE.

1.2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar el aislado que presenta mejor actividad celulolítica a partir de la de la colección de hongos del laboratorio de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis
- Producir enzimas celulasas mediante fermentación sumergida del hongo celulolítico seleccionado utilizando los residuos agroindustriales como materia prima.
- Hidrolizar la celulosa de los residuos agroindustriales con las enzimas celulasas producidas.
- Determinar la cantidad de alcohol que se puede producir utilizando dos métodos de fermentación: sacarificación y fermentación simultánea y un sistema de fermentación discontinua, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como levadura etanológica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ETANOL

El etanol, también llamado alcohol etílico, tiene la fórmula empírica C_2H_5OH , es un monohidróxilo y es el común de los alcoholes. Se caracteriza por ser líquido, incoloro volátil, inflamable, soluble en agua, tiene un punto de ebullición de $78.3^{\circ}C$ y un punto de fusión a $-130^{\circ}C$.

El etanol es un producto químico obtenido de la fermentación de los azúcares que se encuentran en la materia vegetal con alto contenido de carbohidratos, tales como caña de azúcar, cebada, trigo, maíz, frutas, papas, madera, residuos forestales, entre otros, con el uso de microorganismos etanologénicos, especialmente levaduras. Este proceso comprende una serie de reacciones bioquímicas, catalizadas por enzimas, que transforman los azúcares presentes en etanol, dióxido de carbono y energía.⁽¹⁰⁾

También es posible obtener etanol artificialmente, al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y la posterior hidrólisis; sin embargo este producto no puede usarse en la preparación de alimentos, bebidas alcohólicas, ni medicamentos.

El etanol se utiliza industrialmente para la obtención de acetaldehído, vinagre, butadieno, cloruro de etilo y nitrocelulosa, entre otros productos. Además se usa como disolvente en síntesis de fármacos, plásticos, cosméticos, etc. De igual forma se emplea como antiséptico en cirugía, en la preservación de especímenes fisiológicos y patológicos y como combustible y derivados.

El etanol puede ser usado como combustible único en motores específicos para tal efecto, o en cualquier proporción con naftas de origen fósil desde el 10% hasta el 85%, con motores de tecnología FFV (flexible fuel vehicle), en la que los automóviles disponen de un sensor que detecta la relación etanol/gasolina y en función de dicha mezcla ajustan la carburación del motor.

Además el etanol puede ser agregado en la gasolina en bajas concentraciones que van del 5 al 10%, incluso llegando al 25% sin que los motores de encendido necesiten algún tipo de modificación ^(16, 35)

Otra alternativa para el uso del bioetanol es para la fabricación de aditivos para la gasolina, en lugar de usarlos como sustituto de la misma.

Con el uso de las gasolinas sin plomo se vio afectado el número de octanos de la gasolina. Para recuperar el octanaje y reducir las emisiones contaminantes es necesario añadir aditivos oxigenantes tales como: metanol, etanol, terbutil alcohol (TBA) o el metil-terbutil-éter (MTBE), siendo este último el más usado a pesar de ser el que causa mayor impacto ambiental responsable de contaminación de suelos y aguas subterráneas.

En los últimos tiempos el etil-terbutil éter (ETBE) está siendo utilizado en mayor proporción como aditivo antidetonante de la gasolina que el MTBE (metil-terbutil éter), por ser sus emisiones de hidrocarburos menos tóxicas, debido a que el acetaldehído es mucho menos tóxico que el formaldehído. Además el ETBE es menos soluble en agua que el MTEB lo que reduce la posibilidad de contaminar las aguas. ^(16, 33, 37)

2.2 MATERIA PRIMA PARA LA ELABORACIÓN DEL ETANOL

El etanol puede obtenerse mediante una síntesis a partir del petróleo o mediante una fermentación de materia orgánica. Sin embargo la fermentación de materia orgánica es el

proceso que se utiliza con más frecuencia para la obtención del etanol, siendo un 93% del etanol producido con esta técnica, y apenas un 7 % producido sintéticamente. (2, 27, 37)

Para la elaboración de etanol mediante un proceso de fermentación se necesita de materia orgánica con alto contenido de azúcares, o polisacáridos, que puedan ser usados como fuente de alimento por microorganismos específicos y en el proceso se elaboran etanol y otros co-productos.

La materia orgánica se puede clasificar de acuerdo a su procedencia en: materia orgánica natural, es decir la que se da en la naturaleza sin intervención del ser humano, aunque su uso extendido supondría un peligro ya que se podría originar una degradación de los ecosistemas; materia orgánica residual, la que resulta de la actividad agroindustrial o agroalimenticia; residuos sólidos urbanos que resultan de la recolección en ciudades de la fracción orgánica de los desechos urbanos; y los cultivos energéticos, que son cultivos con fines no alimenticios y son destinados exclusivamente a la producción de etanol.

Otra clasificación puede ser de acuerdo al tipo y cantidad de carbohidratos en su composición: materia orgánica con alto contenido de azúcar, materia orgánica con alto contenido de almidón, y materia orgánica con alto contenido de celulosa. (17, 35)

2.2.1 Materia Orgánica con alto contenido de azúcar

Esta materia orgánica contiene un alto contenido de azúcares simples y fermentables como son la glucosa, fructosa, sacarosa. Es utilizada generalmente para la alimentación del hombre ya que es fácilmente asimilable por el organismo.

Entre las materias orgánicas más importantes se puede citar la caña de azúcar, frutas, melazas, azúcar de remolacha, etc.

La ventaja de este tipo de materia radica en que no se necesita de tratamientos previos para obtener los azúcares simples para realizar la fermentación alcohólica, estos se encuentran presentes. El uso de esta materia orgánica está causando problemas alimentarios ya que por destinarse grandes extensiones de territorio al cultivo de este tipo de materia para producir bioetanol los costos de los alimentos suben, a más de reducirse la disponibilidad de los mismos. Además se incrementan los monocultivos con el consiguiente aumento de la cantidad de pesticidas, herbicidas y fertilizantes químicos, lo que contamina el suelo y aguas subterráneas. (16, 40, 46)

2.2.2 Materia Orgánica con alto contenido de almidón

Esta materia prima contiene un alto porcentaje de almidón en su estructura, por lo tanto es necesario realizar un pretratamiento para obtener los azúcares simples fermentables para realizar la fermentación alcohólica.

La materia orgánica con alto contenido de almidón incluyen todos los cereales como son el maíz, arroz, centeno, cebada, etcétera, así como algunos tubérculos como papa y yuca.

La materia con alto contenido de almidón tiene la misma desventaja que la materia orgánica con alto contenido de azúcares al provocar incremento de los precios en los alimentos, ya que también se destinan grandes extensiones de terreno para el cultivo de esta materia con el único fin de elaborar bioetanol, lo que causa encarecimiento y menor disponibilidad de alimentos. Así mismo se incrementa el uso de monocultivos con los consiguientes daños a la tierra y aguas subterráneas. (9, 16, 46)

2.2.3 Materia con alto contenido de celulosa

Es la materia más abundante en la naturaleza, y su uso tiene cada vez más interés global. Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por fotosíntesis, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra

Sin embargo utilizar celulosa todavía plantea retos tecnológicos para hidrolizar todos los polisacáridos y poder aprovechar la totalidad de azúcares de su estructura.

Entre las principales fuentes de materia orgánica con alto contenido de celulosa están: los residuos agroindustriales tales como bagazos, aserrín, hojas, ramas de plantas; residuos madereros o residuos primarios de bosques; residuos municipales y residuos de papel.

El uso de este tipo de materia tiene algunas ventajas, entre ellas la solución parcial de la acumulación de residuos que causan contaminación, además de aprovechar esta materia residual y no utilizar materia que puede ser destinada a alimentación.

Así mismo, como la materia orgánica con alto contenido de almidón, se necesita de un pretratamiento para obtener los azúcares simples fermentables. Sin embargo estos pretratamientos son mucho más difíciles y complicados que los que se realiza con el almidón, por la composición de la lignocelulosa.^(9, 16, 26, 28, 34)

2.3 COMPOSICIÓN DE LA MATERIA CELULÓSICA

La materia lignocelulósica representa aproximadamente la mitad de materia orgánica existente sobre la tierra. Se estima que su producción anual está por las 5×10^{10} toneladas ⁽²⁷⁾.

La materia celulósica está compuesta en un 90% aproximadamente por la llamada lignocelulosa, que es una unión de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y una molécula bastante compleja llamada lignina; y el restante 10% de otras moléculas que no forman parte de la pared celular, como ácidos, ésteres, fenoles, terpenos, etc. que pueden tener una influencia significativa en los procesos de degradación o hidrólisis.

La celulosa está unida estrechamente con la hemicelulosa y la lignina que actúa a manera de pegamento. Estos compuestos varían en porcentaje de acuerdo al residuo celulósico.

2.3.1 Lignina

La lignina es una molécula muy compleja. Es un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), en la que se ha llegado a una polimerización no controlada que hace que la lignina no tenga una estructura ni composición definida, ni siquiera en una misma especie vegetal.

La polimerización de los precursores en la formación de la pared celular se produce mediante la sucesión de una etapa enzimática y una química. En la etapa enzimática los precursores son oxidados por peroxidasas formando radicales fenoxilo que en la etapa química reaccionan al azar entre ellos. En este proceso se originan una gran variedad de formas resonantes que pueden reaccionar unas con otras. Es por esta razón que no existe una única estructura de la lignina. (12, 26, 34)

La unión de los diversos polímeros pueden ser de dos tipos: de tipo condensado mediante enlaces Carbono-Carbono, y tipo no condensado, con un enlace aril-alquil éter en las que intervienen tanto los anillos aromáticos como las cadenas propílicas.

La lignina es un polímero que actúa a manera de pegamento manteniendo unidas las fibras de celulosa y hemicelulosa a través de enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes; así mismo, confiere rigidez a las paredes de las células vegetales y protege contra ataques microbianos y agresiones mecánicas. (25, 26)

2.3.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa difiere en cada especie de planta. Es un heteropolisacárido formado principalmente por mananos, galactanos y xilanos. Estas moléculas de anhidroazúcares

están unidas por enlaces glucosídicos tipo β (1-4) y cuando forman ramificaciones pueden unirse entre sí a través de enlaces tipo β (1-3). Por este tipo de uniones y ramificaciones en estado natural solo existe en la forma `amorfa`. Forman polisacáridos de tamaño considerablemente más cortos que la celulosa, su grado de polimerización es de máximo 200. Por su composición son susceptibles de hincharse y dispersarse fácilmente en el agua.

Existen dos tipos de hemicelulosas que se encuentran tanto en las maderas duras como en las maderas blandas: los xilanos y los glucomananos. Los xilanos son un polímero de unidades de β -xilopiranosas unidas por enlaces β -(1-4) que presentan ligeras ramificaciones. Los glucomananos son polímeros de glucosa y manosa unidas por enlaces β -(1-4) con predominio de manosas.

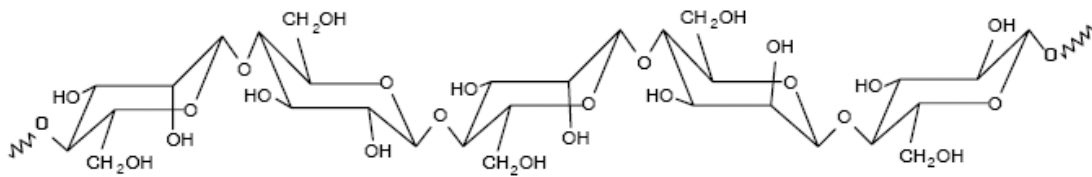


Figura 1. Estructura del glucomonano (Tomado de Oliva José (34))

Su función, junto con la lignina, es de suministrar unión a la lignina con la celulosa

2.3.3 Celulosa

La celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares de los vegetales, aunque también puede ser sintetizado por algunas bacterias, protozoos y hongos filamentosos. Es un polímero formado por cadenas lineales de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos de tipo β (1-4). Posee un peso molecular muy elevado, pudiendo oscilar entre 50 000 hasta aproximadamente 2 500 000 Daltons ^(15, 27)

El grado de polimerización es el número de azúcares (moléculas de glucosa) que conforman la cadena y puede oscilar entre 50 y 15.000 dependiendo del material celulósico. Estas moléculas de glucosa están con una conformación de silla, que es la conformación más estable en la naturaleza, giradas 180° una respecto a la otra. Por esta razón, estereoquímicamente, la celulosa está formada por cadenas de celobiosa. Esta composición química de la fibra de celulosa es la que la hace muy resistente a los ataques físicos, químicos y enzimáticos. (2, 15, 27, 28)

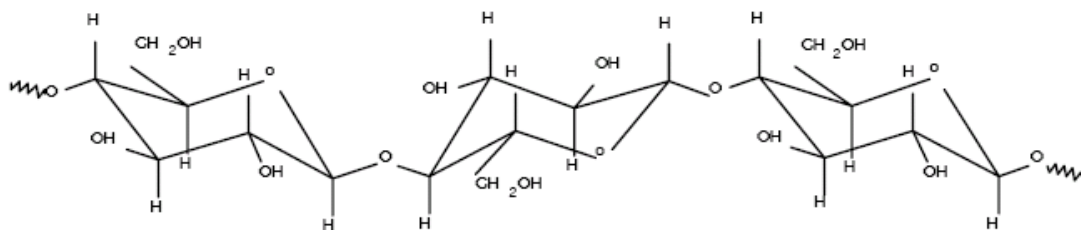


Figura 2. Estructura de la celulosa (Tomado de Oliva José (34))

Estudios con la técnica de difracción por rayos X demuestran que la celulosa se presenta de dos diferentes maneras. Una llamada estructura cristalina en la que las moléculas de glucosa están altamente ordenadas y unidas entre sí a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals formando fibras elementales o microfibras de 500 a 1000 angstroms de longitud. (27)

Otra llamada celulosa `amorfa´ donde las moléculas de glucosa están menos ordenadas, que no están unidas con puentes de hidrógeno o fuerzas de Van Der Waals, lo que les confiere la propiedad de ser más flexibles y por lo tanto son más fácilmente hidrolizables.

La proporción en la que estos 2 tipos de celulosa se encuentran en la materia orgánica depende mucho del origen de la celulosa, además del tratamiento que se realice a la celulosa para usarla con fines biotecnológicos.

2.4 ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Existen muchos microorganismos que tienen la capacidad de degradar los compuestos celulósicos de manera natural, aunque son pocos en donde los cultivos filtrados poseen actividad celulolítica.

Los rendimientos en celulasas que se obtienen empleando hongos son superiores a los que se consiguen con bacterias, razón por la cual la mayor parte de investigaciones se enfocan a la producción del complejo enzimático a partir de hongos, especialmente del género *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Streptomyces*, entre otros. (36, 44)

Se pueden clasificar en dos grupos de microorganismos celulolíticos de acuerdo a su capacidad metabólica de utilizar oxígeno:

El primer grupo son microorganismos anaeróbicos (bacterias y hongos) que se encuentran en aguas residuales, en el rumen y tracto digestivo de ciertos animales herbívoros y de algunos insectos. Entre algunos de estos microorganismos están las bacterias del género *Clostridium* y *Ruminococcus*. Mientras que algunos hongos identificados como celulolíticos son: *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllamyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces sp.* y *Piromyces sp.*

En el segundo grupo se encuentran microorganismos aerobios habitantes principalmente del suelo: hojarasca, abono, maderas en descomposición, etc. Algunas de las bacterias de este grupo son *Cellulomonas* y *Streptomyces*; mientras que algunos de los hongos celulolíticos aerobios caracterizados son, entre otros, *Aspergillus sp*, *Fusarium solani*, *Penicillium sp*, *Trichoderma sp.*

Para realizar la degradación de la celulosa los microorganismos deben poseer un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, pero que en realidad es un complejo de varias enzimas con distintas actividades enzimáticas, cuya acción conjunta es necesaria para realizar la degradación de la celulosa.

Existen microorganismos que producen únicamente celulasas o únicamente xilanasas, sin embargo la gran mayoría de microorganismos producen tanto celulasas como xilanasas.

La producción de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos regulación. No siempre se producen estas enzimas en los microorganismos celulolíticos, es imprescindible que exista un “detonante” que active dicha secreción. Los activadores de la producción de enzimas celulasas son principalmente la fuente de carbono. Si el medio donde se desarrollan estos microorganismos posee suficiente cantidad de azúcares simples no producirá el complejo enzimático, pues no lo necesita. No obstante si el medio no posee una fuente de carbono simple y posee celulosa el microorganismo producirá el complejo enzimático necesario para degradar la celulosa y obtener azúcares simples para su desarrollo.

Los microorganismos capaces de hidrolizar, o degradar la celulosa cristalina secretan un conjunto de celulasas que actúan sinérgicamente y con cierta especificidad, es decir cada tipo de celulasa producida tiene un sustrato específico y de esta manera actúan sinérgicamente. Dicho conjunto se denomina sistema o complejo celulasa. Esta última denominación es confusa ya que sólo en ciertas bacterias anaerobias las enzimas celulolíticas se agrupan en complejos multienzimáticos extracelulares. (25, 27)

La comparación entre los datos proporcionados por los diferentes autores sobre la producción de enzimas siempre es difícil, y aún más en el caso de la producción del complejo celulasa, ya que los ensayos de medidas de actividad no están estandarizados y cada método de análisis individual responden solo a ciertas enzimas. Aun así parece ser que es en los cultivos del hongo del genero *Trichoderma* donde se produce los más altos niveles de actividad celulolítica. (44)

2.5 ENZIMAS CELULASAS

Las enzimas, genéricamente, son catalizadores biológicos que aceleran la velocidad en que se produce una reacción metabólica sin que en la molécula se produzca algún cambio o se altere, tampoco se consume en la reacción. Estas propiedades las ejercen en condiciones que son compatibles con la vida, como funcionar a temperaturas por debajo de 70°C, a un pH alrededor de 7 y a una presión de una atmósfera.

El incremento que ejercen sobre la velocidad de una reacción es enorme y va de 10^6 a 10^{12} veces con respecto a la reacción en ausencia del catalizador. Otra cualidad es su altísima especificidad.

Químicamente son proteínas globulares, algunas con estructura cuaternaria. Para actuar necesitan conservar su estructura nativa, en la que se destaca un lugar que se denomina *sitio activo* de la enzima, un arreglo geométrico formado por un número reducido de residuos aminoácidos complementarios a los grupos químicos de su sustrato específico. Algunos de estos residuos participan en la unión con el sustrato, llamado sitio de fijación o unión del sustrato. Otros residuos del sitio activo son los encargados directamente de la transformación del sustrato en producto. Este sitio es llamado sitio catalítico. Es por esta razón que las enzimas tienen la característica de ser específica. (24)

Las enzimas necesitan de un pH y una temperatura adecuados para trabajar óptimamente. Estos valores varían de una enzima a otra, pero los valores adecuados van a permitir que la estructura del sitio activo sea la más adecuada para la catálisis.

Las enzimas celulasas de bacterias anaeróbicas actúan a través de un complejo multimérico asociado a la célula, en el que una proteína no catalítica sirve de andamio a las varias subunidades enzimáticas mediante interacciones proteína-proteína de tipo cohesina-dockerina. A este complejo se le conoce como *celulosota*.

Las enzimas celulasas producidas por bacterias y hongos aerobios son solubles y actúan de forma independiente. (28, 38)

Las enzimas celulasas son enzimas glicosil hidrolasas, utilizan dos mecanismos de hidrólisis para romper el enlace glicosídico y generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición β , llamado mecanismo de retención; y la otra reacción en la que va a perder su posición β , llamado mecanismo de inversión.

El complejo enzimático celulasa esta constituido por al menos catorce componentes o enzimas pertenecientes al grupo de las carbohidrolasas. De acuerdo al sitio en donde van a romper la fibrilla de celulosa las enzimas celulasas se dividen en tres grupos: endo β glucanasas, exo β glucanasas y β glucosidasas.

2.5.1 Endo β glucanasas

Estas enzimas son 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) y van a actuar rompiendo al azar los enlaces β glucosídicos internos de la celulosa dando como resultado la liberación de oligosacáridos de varios tamaños con nuevos extremos terminales que van a ser atacados por las exoglucanasas. Como resultado de la hidrólisis de las endoglucanas existe una rápida reducción del grado de polimerización, y un incremento de los grupos reductores, pero se obtiene baja producción de azúcares reductores.

Este grupo de celulasas solamente actúa sobre la celulosa amorfa, no actúa sobre celulosa cristalina ni celobiosa, constituye aproximadamente un 20% del total del complejo enzimático y es inhibida competitivamente o no, por la celobiosa y la glucosa formada.

El mejor sustrato para medir la actividad de las endoglucanasas es la Carboximetil celulosa, que es un derivado de la celulosa. (34, 44)

2.5.2 Exo β glucanasas.

Las exoglucanasas están formadas por 2 enzimas, la 1,4- β -D-glucan glucohidrolasa (EC 3.2.1.74) o glucohidrolasas; y por la 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) o celobiohidrolasas que van a actuar sobre los extremos terminales no reductores del polímero con la liberación de glucosa y celobiosa respectivamente.

Las celobiohidrolasas tienen actividad sobre celulosa amorfa, cristalina y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre la celobiosa, y constituye aproximadamente del 50 al 80% del complejo celulolítico.

Las glucohidrolasas actúan sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y son el componente minoritario del complejo enzimático.

La acción de las exoglucanasas es fundamental para la hidrólisis de las zonas cristalinas de la celulosa. Es inhibida competitivamente o no, tanto por la celobiosa formada como por la glucosa presente en el medio. (34, 44)

2.5.3 β glucosidasas

Son enzimas β -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21) y su función es degradar las moléculas de celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular como celotetrosas y celotriosas a monómeros de glucosa. Estas enzimas son absolutamente necesarias para evitar la fuerte inhibición que la celobiosa provocaría sobre las endo y exoglucanasas si esta se acumulara en el medio de crecimiento. Las glucosidasas son inhibidas por la celobiosa y la glucosa presente en el medio (28, 34, 44, 51)

2.6 OBTENCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Se están realizando gran cantidad de estudios en todo el mundo sobre la utilización de los materiales lignocelulósicos para la producción de alcohol a escala industrial. El uso de esta materia es muy atractivo en países donde no pueden, por su tamaño, terreno, clima, etc.,

producir grandes cantidades de caña de azúcar que es la materia prima más utilizada para la producción de bioetanol. En muchas ocasiones se considera a este tipo de material como desperdicio (residuos agroindustriales, residuos orgánicos urbanos, etc.) por lo que su uso como materia prima presenta ventajas tanto económicas como ambientales.

La matriz de la lignocelulosa está compuesta por cadenas de celulosa y lignina entrelazadas por cadenas de hemicelulosa lo que hace que sea una estructura muy resistente. La obtención de alcohol a partir de masa lignocelulósica es complicada, debido principalmente a la compleja característica estructural y composición química de la materia prima. El principal reto biotecnológico es la deslignificación e hidrólisis de este material.

(12, 15, 18, 47)

En general el proceso de obtención de bioetanol consta de tres etapas: Deslignificación, hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, y la fermentación de las hexosas y pentosas

2.6.1 Deslignificación

El objetivo de la deslignificación es deshacer la matriz de lignocelulosa para liberar la celulosa y reducir el grado de cristalinidad de la misma para realizar la hidrólisis posterior. Además, en esta etapa gran parte de la hemicelulosa se hidroliza y la lignina se separa o incluso puede llegar a descomponerse, dependiendo de la clase de pretratamiento que se haya realizado.

La deslignificación es el paso más importante y el más complicado de resolver, ya que de éste depende el éxito de la hidrólisis enzimática. Los pretratamientos utilizados son de tipo químico, físico, biológico o una combinación de los anteriores. (15, 35, 47)

Los pretratamientos físicos van desde la trituración mecánica, en la cual una combinación de astillado y molienda va a reducir el tamaño de la partícula, reduce la cristalinidad de la celulosa y aumenta la superficie física exponeable lo que facilita la hidrólisis posterior; hasta

la radiación de alta energía en la que se van a romper los enlaces β -glucosídicos y los enlaces covalentes y de hidrógeno que se encuentran entre la celulosa y lignina. (15, 34)

Los pretratamientos químicos utilizan agentes como ácidos, álcalis o agentes oxidantes, lo que va a solubilizar la fracción de lignina y a modificar la estructura de la celulosa para que sea más efectiva la acción de las enzimas. Entre los pretratamientos químicos están la oxidación húmeda, tratamientos con ozono, hidrólisis con álcalis o ácidos, etc. Sin embargo estos tratamientos necesitan que los biorreactores donde se realiza los tratamientos sean materiales resistentes a altas temperaturas y a la corrosión que produce estos compuestos. (15, 34)

Los tratamientos biológicos utilizan determinados microorganismos que producen enzimas específicas (ligninasas) que degradan la lignina y la hemicelulosa, dejando al descubierto la celulosa para su posterior ataque enzimático

Los microorganismos usados son los hongos de la podredumbre blanca (hongos que rompen la estructura de la lignina), blanda (microorganismos que modifican la estructura de la lignina) o marrón, siendo los de la podredumbre blanca como los más efectivos para realizar estos pretratamientos. Este pretratamiento biológico presenta ventajas como bajos requerimientos energéticos, además de las condiciones ambientales amigables con la que se da el proceso. A pesar de esto tiene el gran inconveniente que la tasa de hidrólisis es demasiado lenta. (34)

2.6.2 Hidrólisis de la celulosa

En esta etapa se consiguen los azúcares fermentables simples con el uso de enzimas obtenidas de plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente de ciertos microorganismos o, en algunos casos, mediante una hidrólisis ácida la cual emplea catalizadores ácidos, un proceso totalmente químico.

Las enzimas que se utilizan para realizar la despolimerización se extraen, por lo general, de los hongos de los géneros *Trichoderma*, *Fusarium* y *Phanerochaete*, los que han sido más estudiados por la capacidad de producir grandes cantidades del complejo enzimático.

La hidrólisis de la celulosa es una reacción catalítica heterogénea, en la que intervienen un reactivo insoluble, la celulosa, junto con un catalizador soluble, el complejo celulasa. La velocidad de la hidrólisis está determinada por dos factores importantes, la estructura, amorfa o cristalina, de la celulosa y la unión que tenga esta con la enzima, así como el modo de actuación del complejo enzimático. (27, 34)

Durante la reacción enzimática se puede observar tres etapas o fases. En la primera fase que ocurre prácticamente en el instante de juntar la enzima con el sustrato, la concentración de enzima libre cae bruscamente, ya que la mayor parte de la enzima libre se junta con las moléculas específicas del sustrato, formando así el complejo enzima-sustrato.

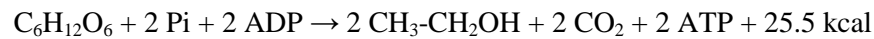
En la segunda fase se llega a la máxima actividad enzimática, ya que al transformar la molécula del sustrato, la enzima puede unirse a otra molécula del sustrato para formar así otro complejo enzima-sustrato. Es en esta etapa donde se consigue el mayor nivel de glucosa producida, y ésta dura hasta que la concentración de sustrato en el medio sea superior que la concentración de enzima.

La última fase, que suele ocupar la mayor parte de tiempo de reacción, se produce cuando la concentración de sustrato es mucho menor, por lo que la velocidad de reacción disminuye considerablemente. (2, 24, 27)

2.7 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En la fermentación alcohólica se emplean microorganismos que utilicen la glucosa, y otros azúcares simples, para la elaboración de alcohol como producto final de su metabolismo.

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, la cual necesita de enzimas para su completo funcionamiento. A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glucólisis (vía Embden-Meyerhoff) de tal forma que puede verse cómo participa inicialmente una molécula de hexosa:



Se puede ver que la fermentación alcohólica es, desde el punto de vista energético, una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. La fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO₂.

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). ⁽²⁴⁾

2.7.1 Ciclo de Embden-Meyerhoff o Glucólisis ⁽²⁴⁾

La glucólisis fue la primera vía metabólica observada en un extracto libre de células, un gran hallazgo a principios del siglo. Se supone que fue la primera vía de las células primitivas iniciadoras del proceso de evolución celular.

La esencia del proceso es sugerida por su propio nombre: rompimiento de algo dulce, de acuerdo a su etimología griega: *glicos* que significa dulce; y *lisis* que significa romper o degradar.

La glucólisis se produce en 11 pasos. El primer paso se da cuando el grupo hidroxilo de la molécula de glucosa reacciona con un grupo fosfato para formar un fosfoéster, en donde el ATP proporciona tanto el grupo fosfato como la energía para la reacción de la fosforilación. La reacción es exergónica, por lo que el equilibrio de la reacción se desplaza

hacia la derecha, sin embargo el contenido energético no es lo suficientemente alto para que la reacción ocurra espontáneamente a la velocidad requerida por las células. Pero por medio de catálisis enzimática se acelera la reacción y prácticamente toda la glucosa que entra en la célula es transformada a su derivado fosforilado.

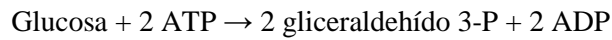
El paso de la fosforilación es importante por 2 razones. La primera es que activa a la glucosa para su posterior ruptura, y la segunda es que asegura que la molécula de glucosa sea atrapada efectivamente dentro de la célula, debido a que el grupo fosfato, altamente polar, evita que la molécula de glucosa regrese nuevamente a través de la membrana plasmática.

La segunda reacción implica la conversión de la glucosa (aldohexosa) en la cetoheptosa, la fructosa 6-P, que deja libre el grupo oxhidrilo del carbono 1 para que sea fosforilado de igual manera que en el paso 1. Esto genera un azúcar bis-fosforilado, la fructosa 1,6-bisfosfato (paso 3). La diferencia entre el anhidrido del ATP y la unión fosfoéster del carbono 1, produce una reacción altamente exergónica y prácticamente irreversible en la dirección glucolítica.

Enseguida se produce la cuarta etapa, que es la ruptura de la bifosfohexosa o ruptura de la glucosa, la que es catalizada por la enzima aldolasa, reacción que da el nombre a la vía metabólica. Esta reacción reversible da como resultado dos azúcares de tres átomos de carbono: el fosfato de dihidroxiacetona y el gliceraldehído 3-fosfato.

Las dos triosas formadas comparten la misma relación una con respecto a la otra, de igual forma que lo hacen la glucosa 6-P y la fructosa 6-P; por ello no es sorprendente que el fosfato de dihidroxiacetona y el gliceraldehído 3-P se interconviertan fácilmente. Debido a que el gliceraldehído 3-fosfato es el único compuesto realmente oxidable en las siguientes fases de la glucolisis, la interconversión de estas dos triosas permite que el fosfato de dihidroxiacetona sea catabolizado por su interconversión a gliceraldehído 3-fosfato.

Esta primera fase de la glucólisis se puede resumir de la siguiente manera:

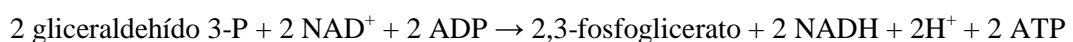


La oxidación del gliceraldehído 3-fosfato ocurre en los pasos 6 y 7. Ésta es de vital importancia, ya que en términos del rendimiento energético de la glucólisis, estas reacciones representan el único sitio de la vía en que se da la oxidación de una molécula, en condiciones anaeróbicas, con la liberación de suficiente energía para formar el 50% de ATP obtenido en la conversión celular de glucosa a lactato.

La reacción de oxidación del gliceraldehído 3-fosfato ocurre con la formación de una unión fosfoanhídrido en el carbono 1, produciéndose el 1.3-bifosfoglicerato, molécula que permite la síntesis de un ATP por la transferencia directa de un fosfato de alta energía al ADP. La enzima que cataliza la reacción es la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Energéticamente, el aspecto esencial de la secuencia total es que una reacción termodinámicamente desfavorable, como es la formación de un anhídrido entre el ácido carboxílico y el fosfato inorgánico, es impulsada por una reacción termodinámicamente favorable, como lo es la oxidación de un aldehído. Las dos reacciones son acopladas por un intermediario tioéster, compuesto que retiene mucha de la energía libre de la reacción oxidativa, que de otra manera sería liberada como calor.

La segunda fase de la glucólisis se puede resumir de la siguiente manera:

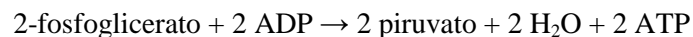


Como se concluye de la ecuación, por cada molécula de glucosa se producen 2 moléculas de 3-fosfoglicerato, 2 moléculas de NADH + H y dos moléculas de ATP, necesarias para la

activación inicial de la glucosa en los pasos 1 y 3, por lo que el rendimiento neto de ATP es 0 hasta este punto de la glucólisis.

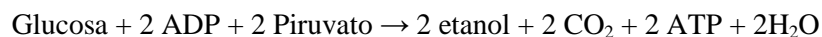
La producción de otra molécula de ATP a partir del 3-fosfoglicerato depende del grupo fosfato del carbono 3, que en este punto se encuentra ligado como unión fosfoéster. En esta última fase la unión éster se convierte en una unión fosfoenol de alta energía, por medio de un rearrreglo interno de la molécula. Para ello el grupo fosfato del carbono 3 se traslada al carbono 2, seguido de la liberación de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato, produciendo fosfoenol-piruvato (PEP).

Para resumir la tercera fase de la glucólisis, la reacción de las dos moléculas de 3 átomos de carbono derivados de la glucosa es:



La etapa final para la fermentación alcohólica es la descarboxilación del piruvato formado para producir el acetaldehído, un compuesto de dos átomos de carbono, que se convierte en el aceptor de electrones. La reducción del acetaldehído produce etanol. Las reacciones que involucran la producción de etanol son dos: la descarboxilación del piruvato y la reducción posterior del acetaldehído ⁽²⁴⁾

Un resumen total del proceso:



2.8 LEVADURAS

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, así como especies inocuas, algunas de ellas

gran utilidad en la industria. Las levaduras son microorganismos pertenecientes al reino fungi, eucariotes con predominio de una fase unicelular en su ciclo de vida.

Su reproducción puede ser asexual o sexual. La reproducción asexual es por gemación polar o multilateral, proceso durante el cual se forma en la periferia de la célula una protuberancia con crecimiento centrífugo: la yema que aumenta de tamaño hasta que finalmente se desprende de la pared celular, constituyendo nuevas levaduras. En ciertas levaduras la yema crece en un saliente tubuliforme que sobresale de la célula madre. El material nuclear replicado se divide entre las células madre e hijas. Unas pocas especies se multiplican por escisión y una especie por una combinación de escisión y gemación.

La reproducción sexual de las levaduras “verdaderas” (Ascomicetos) se realiza por ascosporas, sirviendo la propia célula de asca. En la mayoría de las especies la formación de ascosporas va precedida de la conjugación de dos células pero algunas pueden producir ascosporas o células hijas. El número de ascosporas por asca y el aspecto de las mismas son característicos de cada especie. Las ascosporas pueden diferenciarse por su color, por el aspecto liso o rugoso de sus paredes y por su forma (redonda, oval, arriñonada, en forma de sombrero hemisférica, angular, fusiforme o en forma de aguja).

Las levaduras “falsas” que no producen ascosporas u otras especies sexuales, pertenecen a los Deuteromicetos. Las células de algunas levaduras se convierten en clamidosporas al formarse una pared gruesa alrededor de la célula. (7, 49)

Las levaduras son hongos unicelulares, de forma muy variable: esféricas, ovoides, piriformes, cilíndricas, triangulares o incluso alargadas en forma de micelio verdadero o falso, con un tamaño que varía entre 2,5 – 10 micras de ancho y 4,5 - 21 micras de largo. Son microorganismos anaerobios facultativos. En la forma aerobia producen dióxido de carbono, agua y una producción relativamente alta de nueva levadura, mientras que en la forma anaerobia fermenta el azúcar en alcohol y dióxido de carbono y tiene un crecimiento más lento con menor producción de nueva levadura.

Las levaduras pueden habitar el suelo, mucosas, en la superficie de vegetales, entre muchas otras superficies. La mayoría son mesófilas, con una temperatura de crecimiento entre 24 y 48 °C. Son capaces de soportar un amplio rango de pH el cual está comprendido entre 2,5 y 8, cualidad que sirve para aislarlas de otros microorganismos. Son incapaces de moverse por lo que únicamente pueden ser arrastrados a través de corrientes de aire o en fluidos o por insectos. (49)

Un 75-80% de la célula de levadura es agua, aunque la base de su peso en seco, la célula en crecimiento activo contiene aproximadamente 40% de proteína, la mayoría en forma de enzimas (de las que se han identificado más de un millar) que están localizadas en la pared celular y unida a las membranas; aproximadamente 34% de polisacáridos, principalmente en la pared celular y como material de reserva alimenticia; 7% de minerales (llamados contenido en ceniza); 5% de fosfolípidos; 3% de triglicéridos; 0.5% de DNA, vitamina y fibra.

El citosol o citoplasma está delimitado por una cubierta celular que consta de membrana celular, espacio periplásmico y pared. La pared celular puede tener un espesor de 150-300 nm, según la cepa y condiciones de desarrollo y es metabólicamente activa, contiene enzimas capaces de permitir la transferencia macromolecular al interior de la célula. La membrana y el espacio periplásmico tienen ambos 10 nm de grosor. Hasta el 85% del peso seco de la pared celular se atribuyen a dos polisacáridos estructurales que están presentes en cantidades aproximadamente iguales y son:

- B-Glucanos, polímeros de glucosa que se encuentran en las capas internas de la pared y son responsables de la forma celular y rigidez de la pared.
- Manoproteína (o mananos), polímeros de manosa unidos covalentemente a cadenas peptídicas que forman la pared externa de la pared, responsables de la porosidad y de la comunicación con el medio ambiente que lo rodea.

Además de los dos polímeros principales, la quitina, un polímero de N-acetilglucosamina, está presente en pequeñas cantidades, aproximadamente 1% sobre peso seco. La quitina es un componente mayoritario de muchas paredes fúngicas que le confiere rigidez, aunque parece concentrarse en las cicatrices que dejan las yemas en la pared de las levaduras de las células madres cuando estas se reproducen por gemación. En la pared matriz, también están presentes pequeñas cantidades de proteínas, lípidos y fosfatos inorgánicos.

La pared celular de las levaduras son hidrofóbicas debida a los lípidos de la pared externa y a los grupos fosforilados del complejo manoproteínas. Esta hidrofobicidad esta determinada por sus circunstancias ambientales.

El orgánulo más destacado de la célula de la levadura es la vacuola la cual es rica en gránulos de volutina (polimetafosfato) durante los periodos de inactividad metabólica. Estos gránulos densos desaparecen al reanudar el desarrollo activo. La vacuola también actúa como almacén de enzimas líticas implantadas en el reciclado de macromoléculas celulares.

El segundo gran orgánulo es el núcleo, que está típicamente envuelto por una unidad de membrana doble con poros. El núcleo tiene de 1.5 a 2.0 μm de diámetro, mientras que los poros son del orden de 0.1 μm de diámetro.

El nucléolo es el lugar de síntesis y organización de los ribosomas citoplásmicos (80S). Los cromosomas de la levadura son muy pequeños y difícilmente diferenciales. Aún así, existen indicaciones conflictivas respecto al número de cromosomas de la célula diploides. Las primeras teorías indicaban que tenía ocho, pero esto no concuerda con la información obtenida en la investigación genética, que ha demostrado que el núcleo de la célula haploide posee al menos 17 grupos enlazados, conectando el plasmolema con la membrana nuclear y hasta sacos aplanados (cisternas), dependiendo la forma verdadera del retículo endoplasmático, de las condiciones y edad de la célula.

El citoplasma también contiene el aparato de Golgi y dictiosoma, que está también delimitado por una unidad de doble membrana. Está implicado en el crecimiento de la pared celular y en determinadas fases del ciclo celular, es difícil de diferenciar del retículo endoplásmico (RE).

Las mitocondrias están libremente dispersadas por el citoplasma y como en otras células eucariotas contiene sus propios ribosomas (70S) y son los puntos de producción del adenosín trifosfato (ATP) ⁽⁴⁹⁾

2.8.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un hongo ascomiceto que se encuentra naturalmente en las uvas y muchos otros frutos. Es una levadura que mide aproximadamente 4-8 μm , su rango óptimo de pH para el crecimiento es de 4.5 a 5.5. Esta levadura es utilizada desde la antigüedad en la industria para la fabricación de pan, cerveza y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación.

Esta levadura puede utilizar distintas fuentes de carbono para su metabolismo. Estas fuentes varían desde los carbohidratos, aminoácidos, etanol, glicerol. Los carbohidratos que puede utilizar son monosacáridos de seis carbonos, como por ejemplo la glucosa, fructosa y manosa. Además logra utilizar disacáridos como la maltosa y la sacarosa y trisacáridos como la rafinosa. Sin embargo *saccharomyces* no puede metabolizar monosacáridos de 5 átomos de carbono. ^(4, 14, 50)

Cuando existe gran cantidad de azúcares en el medio de crecimiento de esta levadura la tendencia es producir etanol mediante una fermentación alcohólica llevando a cabo la glucólisis, o el ciclo de Embden-Meyerhoff.

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica y gradualmente incrementan su resistencia al estrés; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa. (14, 51)

Esta levadura ha sido de las más estudiadas científicamente y ha permitido elucidar los procesos básicos de la fisiología celular de los organismos eucariotes, ya que tiene una complejidad ligeramente superior a la de la bacteria pero comparte con ella muchas de sus características. Además de su rápido crecimiento, la dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones.

Otra ventaja adicional consiste en que se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión. Ello ha permitido estudios a escala genómica como la expresión génica, así como su manipulación de los casi 6200 genes que codifica el genoma de levadura, logrando introducir genes de otras especies eucariotes para su estudio, síntesis de sustancias extrañas a las producidas por *Saccharomyces cerevisiae*, y/o mejoramiento de sus funciones, como por ejemplo la introducción de genes que permitan a la levadura utilizar carbohidratos de 5 átomos de carbono y así mejorar su eficiencia y productividad a la hora de producir etanol. (50)

Se aprovecha del metabolismo de la levadura cuando esta se encuentra en medios ricos en azúcares simples para utilizarlos en la industria alimenticia. Además del uso de *Saccharomyces* en la fabricación de pan y bebidas alcohólicas, y como probiótico en la alimentación de animales. La forma de administrar va desde una masa fermentada producida en el rancho, subproductos de la levadura o productos comerciales a base de levaduras. Los beneficios de la administración de *Saccharomyces* es que proporciona vitaminas del complejo B, minerales, proteínas (las que son de alta calidad, equivalentes a la soya) y aminoácidos. (14, 50, 52)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DE LOS LABORATORIOS

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica Del Ecuador.

3.2 MATERIALES Y REACTIVOS

- Cajas Petri
- Asas bacteriológicas
- Pinzas bacteriológicas
- Mecheros
- Tubos de ensayo de tapa rosca
- Pipetas serológicas
- Pipetas automáticas
- Embudos
- Vasos de Erlenmeyer
- Frascos Schott
- Cámara de Neubauer
- Autoclave Market Forge

- Agitador orbital Barnstead Max Q 2000
- Agitador orbital LW Scientific 2100A
- Balanza automática ADAM ACB plus-300
- Espectrofotómetro Mannheim Boehringer 4010
- Refractómetro REFRACTO 30 PX Mettler-Toledo
- Microondas Panasonic
- Incubadora Precision
- Centrífuga Dynac
- Baño María Memmert
- Vortex
- Estufa
- Sustratos (aserrín de laurel y bagazo de caña de maíz)
- Papel filtro Macherey Nagel (MN) # 615
- Kit comercial para determinación de glucosa DiaSys
- Medio Mínimo Czapeck líquido
- Buffer citrato
- Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Medio Mandels-Weber modificado
- Medio de cultivo para la fermentación alcohólica (según Ballesteros y Oliva)
- Enzima celulasa producida
- Solución de glucosa obtenida de la hidrólisis de los sustratos
- Levadura etanológica *Saccharomyces cerevisiae*
- Cepas celulolíticas

3.3 REACTIVACIÓN DE CEPAS DE HONGOS CELULOLÍTICOS.

3.3.1 Metodología

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron suministradas por el laboratorio de Microbiología Agrícola de la PUCE.

Para la reactivación de las cepas mantenidas en congelación, fue necesario el cultivo del hongo en Agar Papa Dextrosa, PDA, durante 8-10 días a temperatura ambiente hasta ver abundante esporulación.

Se realizaron subcultivos en agar PDA tanto en cajas Petri (para realizar los ensayos), como en tubos con agar inclinado. Los cultivos obtenidos se conservaron en refrigeración.

3.4 SELECCIÓN DE CEPA CELULOLÍTICA

3.4.1 Preselección de cepas celulolíticas (Evaluación cualitativa)

3.4.1.1 Metodología

Una vez que el hongo se desarrolló en la caja Petri durante 8 días a temperatura ambiente, en condiciones de total asepsia, se le añadió una cantidad aproximada de 5 mL de un total de 30 mL de solución salina estéril.

A continuación, mediante un asa se raspó suavemente toda la superficie del agar para desprender las conidias del medio. Una vez realizado este proceso se trasvasó la solución al frasco que contenía el resto de solución salina.

Esta suspensión se la homogenizó perfectamente en un vortex, y posteriormente se realizó un conteo de esporas mediante la cámara de Neubauer, para obtener la concentración de esporas por mililitro.

El conteo de esporas se realizó por triplicado para confirmar su concentración (Anexo 1).

Como sustrato celulósico se utilizó papel filtro Macherey Nagel (MN) # 615. Se prepararon tiras de papel de tamaño 1 x 5 cm.

El medio de cultivo utilizado fue el medio mínimo Czapeck (Anexo 2), en donde la fuente de carbono se reemplazó con el papel filtro.

Para el ensayo de la degradación del papel filtro se colocó 9 mL de medio mínimo Czapeck líquido en cada tubo de ensayo con una tira de 1 x 5 cm. de papel filtro MN como única fuente de carbono, se autoclavó por 20 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

Posteriormente se inoculó a cada tubo con 1 mL de una suspensión de esporas de aproximadamente 1×10^6 conidias/mL (Foto 1). Se trabajó por triplicado con cada cepa a evaluar.

Los tubos fueron incubados durante 20 días a temperatura ambiente en un agitador orbital a 120 rpm. Durante este tiempo se observó cada 5 días la degradación del papel filtro y el crecimiento micelial (Foto 2).

Se registraron estos cambios para clasificar la cepa de acuerdo a su capacidad degradadora en:

- +++ Abundante crecimiento y/o degradación del papel filtro
- ++ Moderado crecimiento y/o degradación del papel filtro
- + Poco crecimiento y/o degradación del papel filtro

- SC No existió crecimiento ni degradación del papel filtro

3.4.2 Selección de cepas celulolíticas por diferencia de peso de papel filtro.

3.4.2.1 Metodología

La selección de la cepa celulolítica con la cual se trabajó se realizó a partir de los sobrenadantes obtenidos del cultivo de cada cepa preseleccionada en el procedimiento anterior (Foto 6-7). Los sobrenadantes se consiguieron centrifugando el medio de cultivo a 3000 rpm durante 15 minutos.

Se colocó 2 mL de sobrenadante con 2 mL de buffer citrato (Anexo 3) en un tubo que contenía una tira de papel filtro previamente secado hasta peso constante y se incubó a baño María durante 5 días.

Posteriormente se lavó el papel filtro con agua destilada y se volvió a secar hasta peso constante.

La cepa seleccionada fue la que presentó mayor capacidad de disminuir el peso del papel filtro.

3.4.2.2 Tratamientos

- Tto. 1: cepa T6 de *Trichoderma aureoviride*.
- Tto. 2: cepa T7 de *Trichoderma spp.*
- Tto. 3: cepa T8 de *Trichoderma atroviride*.
- Tto. 4: cepa T12 de *Trichoderma hamatum*.

- Tto. 5: cepa 130-60 de *Aspergillus spp.*
- Tto. 6: cepa 437-40 de *Aspergillus sporocarpia.*

3.4.2.3 Variables

Diferencia de peso del papel filtro

3.4.2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de la diferencia de pesos del papel filtro se examinaron mediante estadística descriptiva (cálculo de media, desviación estándar, error estándar, intervalo de confianza, coeficiente de variación)

Se realizó un análisis de variancia ADEVA para una significancia de 0.05. Este análisis se procesó en el programa estadístico Infostat

3.4.2.4.1 Diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron con 3 repeticiones en cada uno de los tratamientos.

3.4.2.4.2 Esquema del ADEVA

Cuadro 1. Esquema del ADEVA en la selección de la cepa celulolítica

Fuentes de Variación	gL
Total	17
Repeticiones	2
Tratamientos	5
Error experimental	10

3.4.2.4.3 Coeficiente de variación

Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje

3.4.2.4.4 Prueba de significación

Se calculó mediante la prueba de Tukey al 5 % para los tratamientos

3.5 SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE CELULASAS

3.5.1 Metodología

Para la producción de enzimas celulasas se realizó fermentaciones sumergidas con el Medio Mandels-Weber modificado (Anexo 4) empleando los sustratos: bagazo de caña de maíz y aserrín de laurel pretratados a concentraciones de 1.5% y 2.5% como única fuente de carbono.

El pretratamiento escogido fue de tipo físico, el cual consistió en una molienda con un molino de rodillos. Este pretratamiento fue realizado en la Facultad de Ingeniería Química de la Escuela Politécnica Nacional.

Después de la molienda los sustratos fueron distribuidos en fundas de polipropileno, se sellaron y fueron autoclavadas durante 20 minutos a 121°C a 15lbs de presión y conservadas en refrigeración hasta el momento de su uso.

En frascos de 500 mL de capacidad se dispensaron 270 mL del medio de cultivo, con cada uno de los sustratos en sus diferentes concentraciones como fuente de carbono. Los frascos se esterilizaron a 121°C por 20 minutos a 15lbs de presión y luego se inoculó cada frasco con 30 mL de una suspensión de esporas del hongo celulolítico seleccionado en el ítem

anterior (*Trichoderma atroviride*, cepa T8). La cantidad de esporas por mL fue de aproximadamente 1×10^6 conidias/mL.

La determinación de la concentración de esporas se realizó mediante un conteo de esporas en una cámara de Neubauer (Anexo 1). El conteo se realizó por triplicado para confirmar que el inóculo tenga la concentración deseada.

La fermentación se realizó durante 15 días a temperatura ambiente en frascos con agitación constante en un agitador orbital a 150 rpm (Foto 8).

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras diarias de 4 mL de cada medio y estas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el sobrenadante que se utilizó para las determinaciones de glucosa.

La determinación de glucosa se realizó con el método de glucosa oxidasa-peroxidasa. El Kit para esta determinación fue de la casa comercial DiaSys Diagnostic System y la determinación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Anexo 5)

El medio de cultivo escogido para la producción de enzimas celulasas fue aquel medio que presentó mayor producción de glucosa.

3.5.2 Tratamientos

- T1 = Bagazo 1.5 g/dL
- T2 = Bagazo 2.5 g/dL
- T3 = Aserrín 1.5 g/dL
- T4 = Aserrín 2.5 g/dL

3.5.3 Variables

Producción de glucosa

3.5.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de la cantidad de glucosa en cada medio de cultivo se examinaron mediante estadística descriptiva (cálculo de media, desviación estándar, error estándar, intervalo de confianza, coeficiente de variación)

Se realizó un análisis de variancia ADEVA para una significancia de 0.05. Este análisis se procesó en el programa estadístico Infostat

3.5.4.1 Diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron con 3 repeticiones a cada uno de los sustratos

3.5.4.2 Esquema del ADEVA

Cuadro 2. Esquema del ADEVA en la producción de glucosa

Fuentes de Variación	gL
Total	11
Repeticiones	2
Tratamientos	3
Error experimental	6

3.5.4.3 Coeficiente de variación

Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje

3.5.4.4 Prueba de significación

Se calculó mediante la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos

3.6 HIDRÓLISIS DE LOS SUSTRATOS (BAGAZO DE CAÑA DE MAÍZ Y ASERRÍN DE LAUREL)

3.6.1 Metodología

La hidrólisis de cada sustrato se realizó utilizando la enzima celulasa producida en el medio Mandels modificado con el sustrato y concentración seleccionado en el ítem anterior, es decir bagazo de caña de maíz a una concentración de 1,5 g/dL

Para efectuar la hidrólisis se colocó en un frasco de 500 mL de capacidad el sustrato a hidrolizar (bagazo o aserrín) en diferentes concentraciones: 1.5, 2.5, y 3.5 g/dL, en relación a la cantidad de sobrenadante utilizado. Los frascos se autoclavaron por 15 minutos a 121°C a 15 lbs de presión.

Una vez esterilizados los frascos con los sustratos se añadió a cada uno 100 mL de sobrenadante junto con 100 mL de buffer citrato (Foto 10).

Los frascos fueron incubados a 40°C con una agitación constante de 150 rpm durante siete días. Se tomaron muestras diarias de 3 mL y estas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos con el fin de obtener la solución de glucosa obtenida de la hidrólisis de la celulosa y poder realizar la cuantificación de glucosa (Foto 11).

3.6.2 Tratamientos

- T1 = Bagazo 1.5 g/dL
- T2 = Bagazo 2.5 g/dL
- T3 = Bagazo 3.5 g/dL

- T4 = Aserrín 1.5 g/dL

- T5 = Aserrín 2.5 g/dL
- T6 = Aserrín 3.5 g/dL

3.6.3 Variables

Producción de glucosa proveniente de hidrólisis de los sustratos

3.6.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de la cantidad de glucosa proveniente de la hidrólisis de la celulosa de cada sustrato se examinaron mediante estadística descriptiva (cálculo de media, desviación estándar, error estándar, intervalo de confianza, coeficiente de variación)

Se realizó un análisis de variancia ADEVA para una significancia de 0.05. Este análisis se procesó en el programa estadístico Infostat

3.6.4.1 Diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron con 3 repeticiones de cada sustrato

3.6.4.2 Esquema del ADEVA de la hidrólisis de los sustratos.

Cuadro 3. Esquema del ADEVA en la producción de glucosa proveniente de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz.

Fuentes de Variación	gL
Total	8
Repeticiones	2
Tratamientos	2
Error experimental	4

3.5.5.3 Coeficiente de variación

Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje

3.5.5.4 Prueba de significación

Se calculó la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos

3.7 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Se realizaron dos técnicas para la fermentación alcohólica. La primera fue una fermentación discontinua por lotes en la cual se utilizó la solución de glucosa obtenida de la hidrólisis de los sustratos. La segunda técnica utilizada fue la llamada sacarificación y fermentación simultánea (SFS) en donde en el mismo reactor se coloca los sustratos a hidrolizar, la enzima celulasa, el medio de cultivo de la levadura etanológica y la levadura.

3.7.1 Fermentación alcohólica por lotes

3.7.1.1 Metodología

En primer lugar se debió realizar la hidrólisis de cada sustrato. En el ítem anterior se determinó las mejores condiciones para realizar la hidrólisis de cada sustrato. Una vez obtenida la solución azucarada de cada sustrato, esta se cuantificó y se procedió a realizar la fermentación alcohólica por lote.

En vasos de Erlenmeyer de 200 mL de capacidad se colocó la solución azucarada en 4 diferentes concentraciones: 10, 13, 16, 19 % v/v. Estas cantidades de solución estaban proporcionadas al total del medio de fermentación. Los frascos se autoclavaron por 15 minutos a 121°C a 15 lbs de presión.

Una vez esterilizados los frascos con la solución azucarada se añadió el medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo 6), un inóculo del 10 % de una suspensión de esporas de aproximadamente 1×10^7 esporas/mL de la levadura. El volumen total final fue de 100 mL (Foto 13).

La levadura de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada es una cepa cervecera. Esta fue reactivada en agar PDA durante 4 días (Foto 12).

La fermentación se realizó a 35 °C en agitación constante a 150 rpm por 4 días.

La cuantificación de alcohol se determinó mediante un refractómetro en los laboratorios de la Escuela de Química de la PUCE. Se estableció la concentración de la solución de glucosa a la que se obtiene mayor producción de alcohol.

3.7.1.2 Tratamientos

Tratamiento	Porcentaje de solución azucarada del bagazo de caña de maíz
T1	10%
T2	13%
T3	16%
T4	19%
Tratamiento	Porcentaje de solución azucarada del aserrín
T5	10%
T6	13%
T7	16%
T8	19%

3.7.1.3 Variables

Producción de alcohol proveniente de la solución de glucosa obtenida de la hidrólisis de los sustratos.

3.7.1.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de la cantidad de alcohol proveniente de la solución de glucosa obtenida de la hidrólisis de los sustratos se examinaron mediante estadística descriptiva (cálculo de media, desviación estándar, error estándar, intervalo de confianza, coeficiente de variación)

Se realizó un análisis de variancia ADEVA para una significancia de 0.05. Este análisis se procesó en el programa estadístico Infostat

3.7.1.4.1 Diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron con 3 repeticiones de cada sustrato

3.7.1.4.2 Esquema del ADEVA de la fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis de los sustratos.

Cuadro 5. Esquema del ADEVA de la fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis de los sustratos. 2010.

Fuentes de Variación	gL
Total	11
Repeticiones	2
Tratamientos	3
Error experimental	6

3.7.1.4.3 Coeficiente de variación

Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje

3.7.1.4.4 Prueba de significación

Se calculó mediante la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos

3.7.2 Fermentación alcohólica por sacarificación y fermentación simultánea (SFS)

3.7.2.1 Metodología

Se trabajó con las mejores condiciones de hidrólisis determinadas en el ítem 3.5. Sin embargo, se probó varias concentraciones del complejo sustrato-enzima celulasa con el medio de fermentación para conocer la concentración adecuada de dicho complejo.

En vasos de Erlenmeyer de 200 mL de capacidad, esterilizados previamente, se colocó el sustrato a hidrolizar con la enzima y el buffer. Este complejo fue evaluado en concentraciones de 10, 15, 20 y 25 % v/v. en relación al volumen total del medio de cultivo.

Se añadió a cada Erlenmeyer el medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo 6), un inóculo del 10% de una suspensión de esporas de aproximadamente 1×10^7 esporas/mL de la levadura. El volumen final fue de 100 mL (Foto 14).

La fermentación se realizó a 40 °C en agitación constante a 150 rpm por 7 días (Foto 15).

La cuantificación de alcohol se determinó mediante un refractómetro en los laboratorios de la Escuela de Química de la PUCE. Se estableció la mejor concentración del complejo sustrato-enzima celulasa en donde se obtiene mayor producción de alcohol.

3.7.2.2 Tratamientos

Tratamiento	Porcentaje de concentración complejo enzima-sustrato bagazo caña de maíz
T1	10%
T2	15%
T3	20%
T4	25%
Tratamiento	Porcentaje de concentración complejo enzima-sustrato aserrín
T5	10%
T6	15%
T7	20%
T8	25%

3.7.2.3 Variables

Producción de alcohol proveniente de la sacarificación y fermentación simultánea de cada sustrato

3.7.2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de la cantidad de alcohol proveniente de la sacarificación y fermentación simultánea de cada sustrato se examinaron mediante estadística descriptiva (cálculo de media, desviación estándar, error estándar, intervalo de confianza, coeficiente de variación)

Se realizó un análisis de variancia ADEVA para una significancia de 0.05. Este análisis se procesó en el programa estadístico Infostat

3.7.2.4.1 Diseño experimental

Los datos obtenidos se analizaron con 3 repeticiones de cada sustrato

3.7.2.4.2 *Esquema del ADEVA de la fermentación alcohólica por sacarificación y fermentación simultánea a partir los sustratos.*

Cuadro 7. Esquema del ADEVA de la fermentación alcohólica por sacarificación y fermentación simultánea de los sustratos. 2010.

Fuentes de Variación	gL
Total	11
Repeticiones	2
Tratamientos	3
Error experimental	6

3.7.2.4.3 *Coefficiente de variación*

Se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje

3.7.2.4.4 *Prueba de significación*

Se calculó mediante la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS DE HONGOS CELULOLÍTICOS.

Se reactivó cepas de hongos celulíticos que estaban en congelación. Las cepas reactivadas fueron:

- *Trichoderma spp.:*
 - *Trichoderma virens*. T1
 - *Trichoderma virens*. T3
 - *Trichoderma harzianum*. T4
 - *Trichoderma harzianum*. T5
 - *Trichoderma aureoviride*. T6
 - *Trichoderma spp.* T7
 - *Trichoderma atroviride*. T8
 - *Trichoderma inhamatum*. T10
 - *Trichoderma hamatum*. T11
 - *Trichoderma hamatum*. T12
- *Aspergillus:*
 - *Aspergillus sporocarpia* 437-40
 - *Aspergillus versicolor* 538-041
 - *Aspergillus spp.* 130-60
- *Penicillium janthinellum* 130-60
- *Fusarium spp.* 527-029

Trichoderma spp. T2 y T9 no fue posible reactivarlas.

4.2 SELECCIÓN DE CEPA CELULOLÍTICA

4.2.1 Preselección de cepas celulolíticas (Evaluación cualitativa)

Las cepas preseleccionadas de acuerdo al crecimiento y degradación del papel filtro en medio mínimo Czapeck fueron las siguientes:

- *Trichoderma aureoviride*. T6
- *Trichoderma spp* T7
- *Trichoderma atroviride* T8
- *Trichoderma hamatum* T12
- *Aspergillus sporocarpia* 437-40
- *Aspergillus spp.* 130-60

Cuadro 9. Resultados de la evaluación cualitativa de la degradación del papel filtro de las cepas de hongos celulolíticos evaluados. 2010.

Cepa	Degradación del papel filtro			
	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20
<i>Trichoderma virens</i> . T1	SC	+	+	+
<i>Trichoderma harzianum</i> . T3	SC	SC	SC	SC
<i>Trichoderma harzianum</i> . T4	+	+	+	+
<i>Trichoderma harzianum</i> . T5	SC	SC	SC	SC
<i>Trichoderma aureoviride</i> . T6	+	++	+++	+++
<i>Trichoderma spp.</i> T7	+	++	+++	+++
<i>Trichoderma atroviride</i> . T8	+	++	+++	+++
<i>Trichoderma inhamatum</i> . T10	SC	+	+	+
<i>Trichoderma hamatum</i> . T11	+	+	+	+
<i>Trichoderma hamatum</i> . T12	+	+	++	++
<i>Penicillium janthinellum</i> 130-60	+	+	+	+
<i>Fusarium spp.</i> 527-029	SC	+	+	+
<i>Aspergillus sporocarpia</i> 437-40	+	+	++	++
<i>Aspergillus versicolor</i> 538-041	SC	SC	SC	SC
<i>Aspergillus spp.</i> 130-60	+	++	+++	+++

SC: sin crecimiento

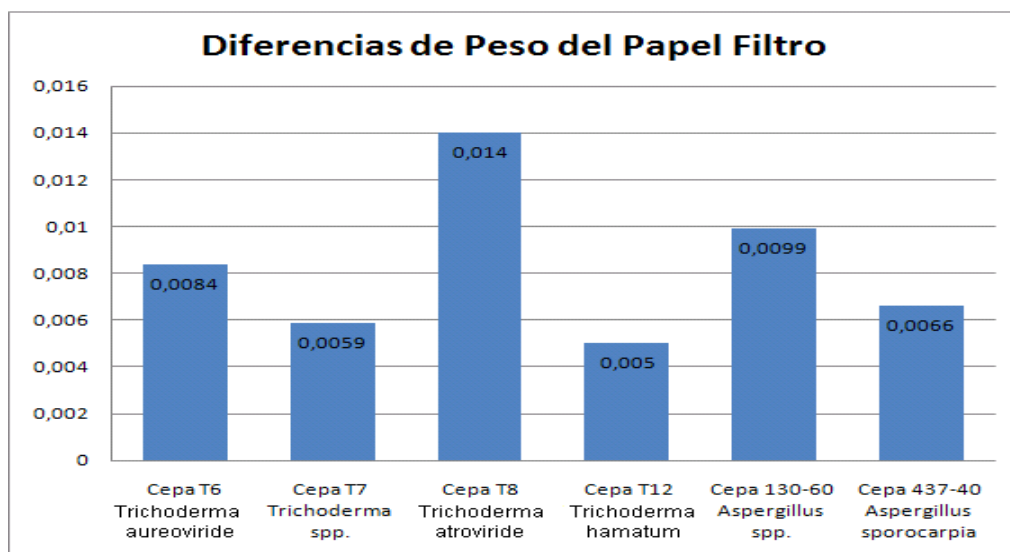
4.2.2 Selección de cepas celulolíticas por diferencia de peso de papel filtro.

La diferencia de peso del papel filtro, después de 5 días de incubación a baño María de las cepas evaluadas se presentan en el cuadro 10

Cuadro 10. Evaluación de pérdida de peso de papel filtro de las cepas evaluadas. 2010.

Cepa	Repeticiones	Peso Seco de Papel filtro		Diferencia de peso	Promedio de diferencia de pesos (gr.)
		Antes	Después		
Control	R1	0,1125	0,1121	0,0003	0,00023
	R2	0,1095	0,1093	0,0002	
	R3	0,1086	0,1084	0,0002	
T6	R1	0,1084	0,0999	0,0085	0,0084
	R2	0,1122	0,1038	0,0084	
	R3	0,11	0,1018	0,0082	
T7	R1	0,109	0,1033	0,0057	0,0059
	R2	0,1079	0,1019	0,006	
	R3	0,1075	0,1016	0,0059	
T8	R1	0,1091	0,0952	0,0139	0,014
	R2	0,1082	0,0939	0,0143	
	R3	0,1077	0,094	0,0137	
T12	R1	0,1158	0,1103	0,0055	0,005
	R2	0,1042	0,0994	0,0048	
	R3	0,1054	0,1006	0,0048	
130-60	R1	0,1082	0,0982	0,01	0,0099
	R2	0,1075	0,0979	0,0096	
	R3	0,1098	0,0997	0,0101	
437-40	R1	0,1043	0,098	0,0063	0,0066
	R2	0,1123	0,1055	0,0068	
	R3	0,1126	0,1059	0,0067	

Gráfico 1. Diferencia de pesos del papel filtro lograda con cada cepa evaluada. 2010.



Cuadro 11. Análisis de varianza para la diferencia de pesos del papel filtro. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM
Total	17	
Repeticiones	2	1,4
Tratamientos	5	3,2
Error experimental	10	8,6
Promedio		0,0083
CV (%)		3,54

En el análisis de varianza de la diferencia de peso del papel filtro (cuadro 11), se observó que hay alta significación estadística para tratamientos y no significación para repeticiones.

El promedio general fue de 0.0083 gramos y un coeficiente de variación de 3.54 % que es aceptable para este tipo de experimentos.

Cuadro 12. Prueba de Tukey al 5 % para la diferencia de pesos del papel filtro. 2010.

Tratamientos	Descripción	Rango
Tto. 1	Cepa T6 <i>Trichoderma aureoviride</i> .	0,0084 c
Tto. 2	Cepa T7 <i>Trichoderma spp.</i>	0,0059 d
Tto. 3	Cepa T8 <i>Trichoderma atroviride</i> .	0,0140 a
Tto. 4	Cepa T12 <i>Trichoderma hamatum</i> .	0,0050 e
Tto. 5	Cepa 130-60 <i>Aspergillus spp.</i>	0,0099 b
Tto. 6	Cepa 437-40 <i>Aspergillus sporocarpia</i>	0,0066 d

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió la cepa que tiene mayor capacidad de degradar el papel filtro, es decir la mayor capacidad de reducir el peso del papel filtro.

En el cuadro 12 al realizar la prueba de Tukey al 5 % se observa cinco rangos de significación ubicándose en el primer rango el tratamiento 3 que corresponde a la cepa de *Trichoderma atroviride* T8 con un promedio de 0.0140 gr., en el segundo rango al tratamiento 5 que corresponde a la cepa de *Aspergillus spp.* 130-60, en el tercer rango al tratamiento 1 que corresponde a la cepa de *Trichoderma aureoviride* T6, en el cuarto rango al tratamiento 2 y el tratamiento 6 que corresponde a la cepa de *Trichoderma spp.* T7 y *Aspergillus sporocarpia* 437-40 respectivamente, y en el quinto y último rango al tratamiento 4 que corresponde a la cepa de *Trichoderma hamatum* T12

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% la cepa T8 de *Trichoderma atroviride* es la que presenta mejor capacidad de degradar el papel filtro, por lo que es esta cepa la que se seleccionó para la producción de enzimas celulasas.

4.3 SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULASAS EN BASE A LA CANTIDAD DE GLUCOSA PRODUCIDA.

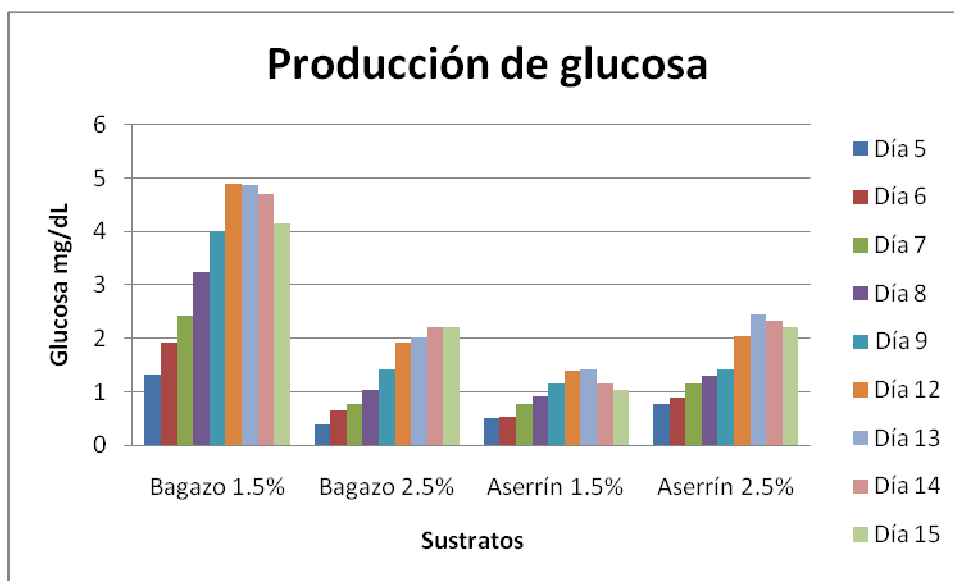
La selección del sustrato apropiado a la concentración adecuada se basó en la producción de glucosa liberada en cada uno de los 15 días en la que se llevó a cabo la fermentación.

En el cuadro 13 se presenta la cantidad de glucosa liberada en cada sustrato evaluado. Se muestran únicamente el promedio de las tres repeticiones.

Cuadro 13. Cuantificación de glucosa en los medios evaluados. 2010.

<i>Día</i>	<i>Promedio glucosa en mg/dL</i>			
	Bagazo 1,5 %	Bagazo 2,5 %	Aserrín 1,5 %	Aserrín 2,5 %
0	0,1313	0	0	0
1	0,387	0,129	0,1307	0,1307
2	0,5227	0,2613	0,386	0,5147
5	1,307	0,392	0,5107	0,766
6	1,923	0,641	0,5163	0,9043
7	2,4267	0,766	0,775	1,163
8	3,23	1,0337	0,9077	1,2967
9	4,0053	1,421	1,158	1,4153
12	4,8903	1,93	1,3943	2,0277
13	4,8553	2,0993	1,41	2,436
14	4,6873	2,2137	1,158	2,317
15	4,1503	2,205	1,0373	2,205

Gráfico 2. Producción de glucosa a partir de los diferentes sustratos utilizados en el medio Mandels modificado. 2010



Cuadro 14. Análisis de varianza para la producción de glucosa. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM								
		día 5	día 6	día 7	día 8	día 9	día 12	día 13	día 14	día 15
Total	11									
Repeticiones	2	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,09	0,02	0,01	0,09
Tratamientos	3	0,5	1,22	1,85	3,55	5,41	7,47	6,83	6,67	5
Error experimental	6	0,03	0,03	0,01	0,05	0,05	0,02	0,04	0,06	0,04
Promedio		0,74	1	1,282	1,617	1,999	2,56	2,681	2,594	2,399
CV (%)		23	18,3	8,62	13,87	10,69	5,56	7,9	9,72	8,14

En el análisis de varianza de la producción de glucosa (cuadro 14), se observó que hay alta significación estadística para tratamientos y no significación para repeticiones en todos los días medidos. Los días 0 al 4 no se tomaron en cuenta debido a que la producción de glucosa fue demasiado baja.

El promedio de la producción de glucosa del día 5 con 0.74 mg/dL fue el más bajo, mientras que el día con mayor promedio de producción de glucosa fue el día 13 con 2.681mg/dL. Sin embargo los días 12 y 14 muestran similares cantidades de glucosa producida: 2.56 mg/dL y 2.594 mg/dL respectivamente. Todos los coeficientes de variación son aceptables para este tipo de ensayos.

Cuadro 15. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de glucosa. 2010.

Tto.	DESCRIPCION	RANGOS				
		día 5	día 6	día 7	día 8	día 9
1	Bagazo 1.5 g/dL	1,31 a	1,92 a	2,43 a	3,23 a	4,01 a
2	Bagazo 2.5 g/dL	0,39 b	0,64 b	0,77 c	1,03 b	1,42 b
3	Aserrín 1.5 g/dL	0,51 b	0,52 b	0,78 c	0,91 b	1,16 b
4	Aserrín 2.5 g/dL	0,77 b	0,9 b	1,16 b	1,3 b	1,42 b

Cuadro 16. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de glucosa. 2010.

Tto.	DESCRIPCION	RANGOS			
		día 12	día 13	día 14	día 15
1	Bagazo 1.5 g/dL	4,89 a	4,86 a	4,69 a	4,15 a
2	Bagazo 2.5 g/dL	1,93 b	2,02 b	2,21 b	2,21 b
3	Aserrín 1.5 g/dL	1,39 c	1,41 c	1,16 c	1,04 c
4	Aserrín 2.5 g/dL	2,03 b	2,44 b	2,32 b	2,21 b

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el medio que libera mayor cantidad de glucosa, es decir el mejor medio para la producción de las enzimas celulasas.

En los cuadros 15 y 16 se muestran los promedios de todos los días de la cantidad de glucosa producida en cada tratamiento, así como los rangos de significación de cada día.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 3 (medio Mandels modificado con aserrín 1.5 g/dL) presenta menor producción de glucosa, y este comportamiento se observa en todos los días de la fermentación, con el pico más alto en el día 13 con un promedio de 1.41 mg/dL.

El tratamiento 1 (medio Mandels modificado con bagazo 1.5g/dL) se ubica en el primer rango de significación en todos los días que se realizó la determinación, es decir presenta la mayor producción de glucosa, llegando a su máximo el día 12 con un promedio de 4.89mg/dL; por lo tanto para la producción de enzimas celulasas se realizó una fermentación sumergida con el medio Mandels modificado con bagazo a 1.5g/dL como única fuente de carbono durante 12 días.

4.4 HIDRÓLISIS DE LOS SUSTRATOS (BAGAZO DE CAÑA DE MAÍZ Y ASERRÍN DE LAUREL)

Se realizó la hidrólisis de cada sustrato con la enzima celulasa producida. Para conocer el tiempo y la concentración de sustrato apropiado para una mayor producción de glucosa se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de sustrato.

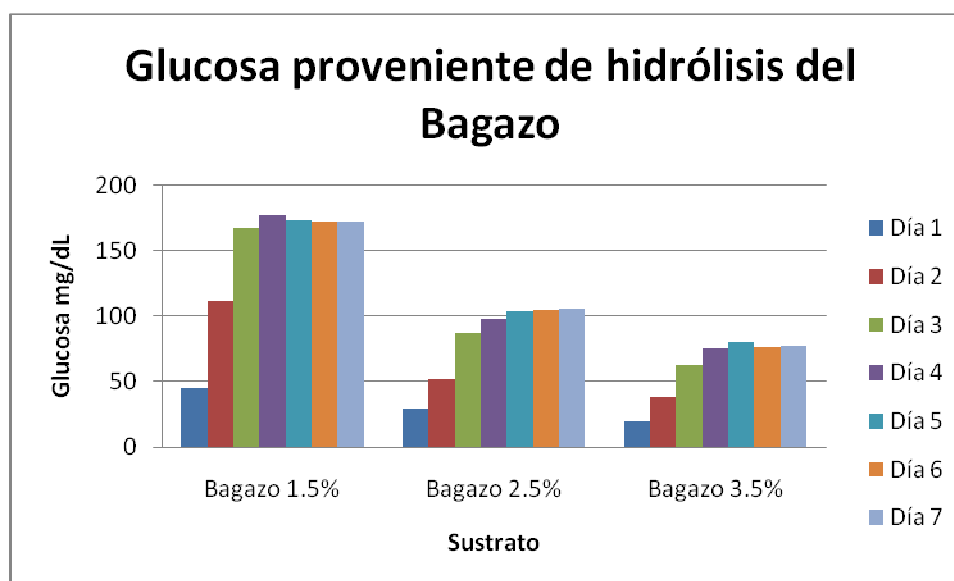
En el cuadro 17 se presenta la cantidad de glucosa liberada a partir de la degradación de la celulosa del bagazo de caña de maíz. Se muestra el promedio de las tres repeticiones.

Cuadro 17. Promedio de la cantidad de glucosa liberada a partir de la hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz. 2010.

Día	Promedio de glucosa en mg/dL		
	Bagazo 1,5 %	Bagazo 2,5 %	Bagazo 3,5 %
0	0	0	0,126
1	44,961	29,845	20,026
2	111,932	51,751	37,873
3	167,557	87,023	62,85
4	177,207	97,76	75,099
5	173,541	103,632	80,285
6	171,647	104,214	76,501
7	172,329	105,534	77,091

De acuerdo a la mayor cantidad de glucosa liberada en el medio por la degradación de la celulosa se eligió la concentración y tiempo adecuados para la hidrólisis óptima.

Gráfico 3. Producción de glucosa proveniente de hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz. 2010



Cuadro 18. Análisis de varianza para la producción de glucosa proveniente de la hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM						
		día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	día 6	día 7
Total	8							
Repeticiones	2	0,47	0,2	0,17	2,56	0,12	1,49	1,61
Tratamientos	2	473,34	4649,62	9028,2	8589,39	7064,49	7184,07	7170,44
Error experimental	4	0,47	0,86	0,5	0,95	1,28	0,16	0,24
Promedio		31,61	67,185	105,743	116,621	119,152	117,454	118,318
CV (%)		2,16	1,38	0,67	0,83	0,95	0,34	0,41

En el análisis de varianza de la producción de glucosa proveniente de la hidrólisis del bagazo de maíz, que se muestra en el cuadro 18, se observó que hay alta significación estadística para tratamientos y no significación estadística para repeticiones en todos los días. El día 0 no se tomó en cuenta debido a que la producción de glucosa fue de 0 mg/dL.

El promedio de la producción de glucosa del día 1, con 31.61 mg/dL, fue el más bajo, mientras que el día con mayor promedio de producción de glucosa fue el día 5 con 119.152 mg/dL. Todos los coeficientes de variación obtenidos son aceptables para este tipo de experimentos.

Cuadro 19. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de glucosa proveniente de hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz. 2010.

Tto.	DESCRIPCION	RANGOS			
		día 1	día 2	día 3	día 4
1	Bagazo 1.5 g/dL	44,96 a	111,93 a	167,56 a	177,01 a
2	Bagazo 2.5 g/dL	29,85 b	51,75 b	86,82 b	97,76 b
3	Bagazo 3.5 g/dL	20,03 c	37,87 c	62,85 c	75,1 c

Cuadro 20. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de glucosa proveniente de hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz. 2010

Tto.	DESCRIPCION	RANGOS		
		día 5	día 6	día 7
1	Bagazo 1.5 g/dL	173,54 a	171,65 a	172,33 a
2	Bagazo 2.5 g/dL	103,63 b	104,21 b	105,53 b
3	Bagazo 3.5 g/dL	80,29 c	76,5 c	77,09 c

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de glucosa a partir de la hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña de maíz.

En los cuadros 19 y 20 se muestran los promedios de la cantidad de glucosa producida en cada tratamiento, así como los rangos de significación de cada día.

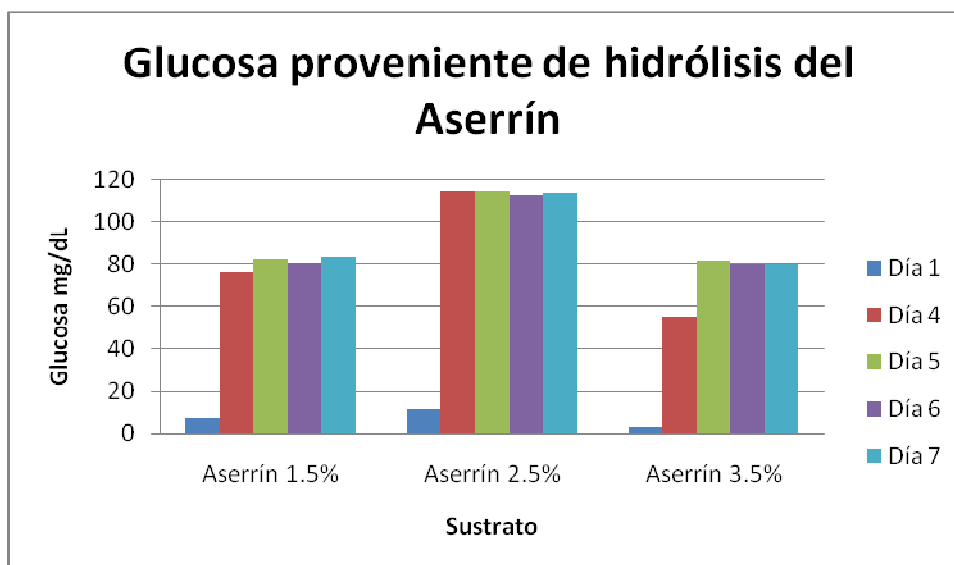
De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 1 (T1, que consiste la hidrólisis con la enzima celulasa y el bagazo de caña de maíz a una concentración de 1.5 g/dL) en el día 4 muestra la mayor producción de glucosa; por lo que para la hidrólisis del bagazo de caña de maíz se realizó utilizando una concentración de 1.5 g/dL durante 4 días.

En el cuadro 21 se presenta la cantidad de glucosa liberada a partir de la degradación de la celulosa del aserrín de laurel. Se muestra el promedio de las tres repeticiones.

Cuadro 21. Promedio de la cantidad de glucosa liberada a partir de la hidrólisis de la celulosa del aserrín de laurel. 2010.

Día	Promedio de glucosa en mg/dL		
	Aserrín 1,5 %	Aserrín 2,5 %	Aserrín 3,5 %
0	0	0	0
1	6,847	11,628	2,972
4	76,005	113,619	55,123
5	82,231	113,748	81,323
6	80,608	112,041	80,101
7	83,075	113,178	79,586

Gráfico 4. Producción de glucosa proveniente de hidrólisis de la celulosa del aserrín de laurel. 2010.



Cuadro 22. Análisis de varianza para la producción de glucosa proveniente de la hidrólisis del aserrín de laurel. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM				
		día 1	día 4	día 5	día 6	día 7
Total	8					
Repeticiones	2	0,02	0,96	3,5	0,59	1,07
Tratamientos	2	56,42	2636,27	1022,79	1004,2	1023,41
Error experimental	4	0,42	1,01	0,65	0,76	0,72
Promedio		7,149	81,582	92,434	90,916	91,946
CV (%)		9,02	1,23	0,87	0,96	0,92

En el análisis de varianza de la producción de glucosa proveniente de la hidrólisis del aserrín (cuadro 22), se observó que hay alta significación estadística para tratamientos y no significación para repeticiones en todos los días. El día 0 no se tomó en cuenta debido a que la producción de glucosa fue de 0 mg/dL.

El promedio de la producción de glucosa del día 1, con 7.149 mg/dL, fue el más bajo, mientras que el día con mayor promedio de producción de glucosa fue el día 5 con 92.434 mg/dL. Todos los coeficientes de variación obtenidos son aceptables para este tipo de experimentos.

Cuadro 23. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de glucosa proveniente de hidrólisis de la celulosa del aserrín. 2010

Tto	DESCRIPCION	RANGOS				
		día 1	día 4	día 5	día 6	día 7
4	Aserrín 1.5 g/dL	6,85 b	76,01 b	82,23 b	80,61 b	83,07 b
5	Aserrín 2.5 g/dL	11,63 a	113,62 a	113,75 a	112,04 a	113,18 a
6	Aserrín 3.5 g/dL	2,97 c	55,12 c	81,32 b	80,1 b	79,59 c

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de glucosa a partir de la hidrólisis de la celulosa del aserrín de laurel.

En el cuadro 23 se observa que el tratamiento 6 (T6) muestra la producción más baja de glucosa, aunque los datos no son muy alejados del tratamiento 4 (T4), especialmente en los días 5 y 6.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 5 (T5, que consiste la hidrólisis con la enzima celulasa y el aserrín de laurel a una concentración de 2.5 g/dL) muestra mayor producción de glucosa, así también se observa que en el día 5 se obtiene la mayor producción de glucosa; por lo que para la hidrólisis del aserrín de laurel se realizó a una concentración de 2.5 g/dL durante 5 días.

4.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

4.5.1 Fermentación alcohólica por lotes

Se realizó la fermentación alcohólica con la solución azucarada liberada de la hidrólisis de cada sustrato con la enzima celulasa producida. Para determinar el tiempo y la concentración de la solución azucarada apropiada para una mayor producción de alcohol se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de la solución azucarada.

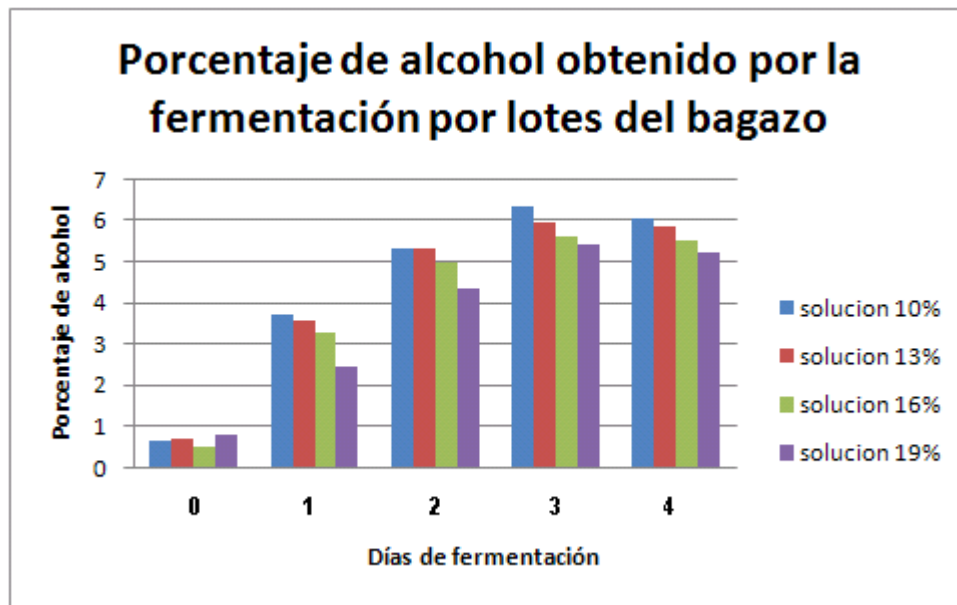
Por la mayor concentración de alcohol en el medio, se determinó el tiempo y concentración óptima de fermentación.

En el cuadro 24 se presenta el porcentaje de alcohol producido, medido con un refractómetro, de las soluciones azucaradas obtenida de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz.

Cuadro 24. Resultado del porcentaje de alcohol producido a partir de la solución azucarada obtenida de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz. 2010.

Concentración solución azucarada	Porcentaje de alcohol				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
10%	0,7	3,7	5,4	6,3	6
13%	0,7	3,6	5,3	6	5,9
16%	0,5	3,3	5	5,6	5,5
19%	0,8	2,4	4,4	5,4	5,2
Control 1: Sin levadura	0,7	1,1	1	1,4	1,5
Control 2: H ₂ O	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4

Gráfico 5. Producción de alcohol obtenido de la fermentación por lotes de la solución azucarada del bagazo de caña de maíz. 2010.



Cuadro 25. Análisis de varianza para la fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz. 2010.

Fuentes de Variación	g/L	CM				
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4
Total	11					
Repeticiones	2	0,0025	0	0	0,01	0
Tratamientos	3	0,04	1	0,6	0,49	0,41
Error experimental	6	0,0014	0,0044	0,0022	0,0042	0,0044
Promedio		0,675	3,25	5	5,8225	5,675
CV (%)		5,52	2,05	0,94	1,11	1,17

En el análisis de varianza de la producción de etanol a partir de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz, se observó que hay significación estadística para tratamientos y no significación estadística para repeticiones en todos los días.

El promedio general del día 0 fue de 0.675% de alcohol. El día de mayor rendimiento fue el día 3 con un promedio general de 5.82% de alcohol. Los coeficientes de variación obtenidos son aceptables para este tipo de ensayos.

Cuadro 26. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de etanol a partir de una fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada del bagazo de caña de maíz. 2010

Tto	Descripción	RANGOS				
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4
1	solución 10%	0,67 b	3,73 a	5,33 a	6,33 a	6,07 a
2	solución 13%	0,7 b	3,57 a	5,3 a	5,93 b	5,87 b
3	solución 16%	0,53 c	3,27 b	5 b	5,63 c	5,53 c
4	solución 19%	0,8 a	2,43 c	4,37 c	5,4 d	5,23 d

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de etanol a partir de la fermentación alcohólica por lotes del bagazo de caña de maíz.

En el cuadro 26, al realizar la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos se observó tres rangos de significación para los días 0, 1 y 2; mientras que existen 4 rangos de significación para los días 3 y 4.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 1 (T1), es decir la fermentación alcohólica con la solución azucarada proveniente de la hidrolisis del bagazo de caña de maíz al 10% presenta mayor producción de etanol. Además se observa que la mayor producción de alcohol se da en el día 3.

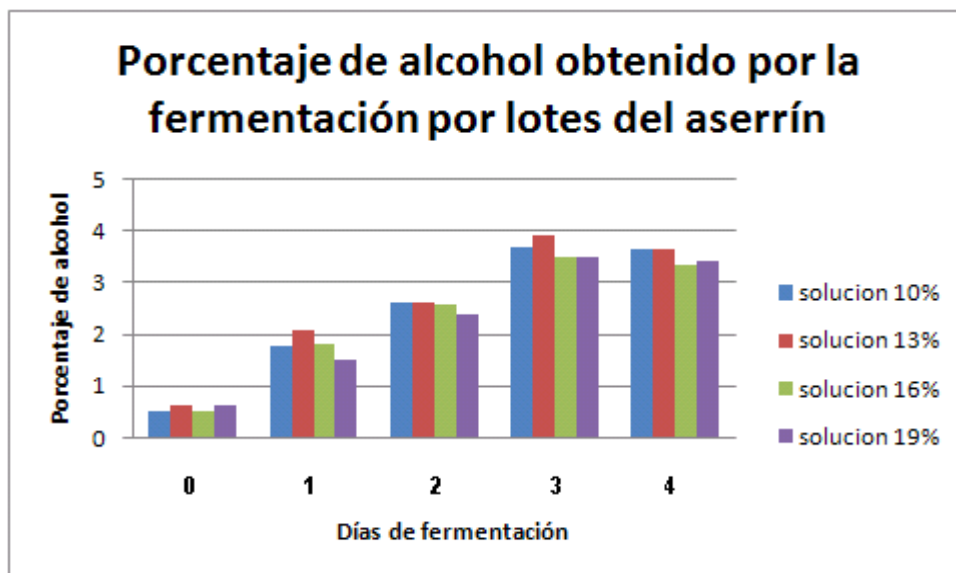
El tratamiento que produjo menor cantidad de alcohol fue el tratamiento 4 (T4), con un máximo de concentración de alcohol de 5.4 %.

En el cuadro 27 se presenta el porcentaje de alcohol producido, medido con un refractómetro, de las solución azucarada obtenida de la hidrólisis del aserrín de laurel.

Cuadro 27. Porcentaje de alcohol producido a partir de la solución azucarada obtenida de la hidrólisis del aserrín. 2010.

Concentración solución azucarada	Porcentaje de alcohol				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
10%	0,5	1,8	2,6	3,7	3,6
13%	0,6	2	2,6	3,9	3,6
16%	0,5	1,8	2,6	3,5	3,3
19%	0,6	1,5	2,4	3,5	3,4
Control 1: Sin levadura	0,7	1,1	1	1,4	1,5
Control 2: H ₂ O	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4

Gráfico 6. Producción de alcohol obtenido de la fermentación por lotes de la solución azucarada del aserrín de laurel. 2010.



Cuadro 28. Análisis de varianza para la fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis del aserrín. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM				
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4
Total	11					
Repeticiones	2	0,0083	0,01	0	0,0033	0,0025
Tratamientos	3	0,02	0,16	0,03	0,12	0,07
Error experimental	6	0,0019	0,0036	0,0022	0,0011	0,0025
Promedio		0,565	1,785	2,55	3,635	3,497
CV (%)		7,78	3,37	1,85	0,92	1,43

En el análisis de varianza de la producción de etanol a partir de la solución azucarada proveniente de la hidrólisis aserrín, se observó que hay significación estadística para tratamientos y no significación estadística para repeticiones en todos los días.

El promedio general del día 0 fue de 0.565% de alcohol. El día de mayor rendimiento es el día 3 con un promedio general de 3.635 % de alcohol. Se observa que el día 4 existe una ligera reducción en la concentración de alcohol con un promedio de 3.497%. Todos los coeficientes de variación obtenidos son aceptables para este tipo de experimentos.

Cuadro 29. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de etanol a partir de una fermentación alcohólica por lotes de la solución azucarada del aserrín. 2010

Tto.	DESCRIPCIÓN	RANGOS				
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4
5	solución 10%	0,5 b	1,77 b	2,6 a	3,67 b	3,63 a
6	solución 13%	0,63 a	2,07 a	2,63 a	3,9 a	3,63 a
7	solución 16%	0,5 b	1,8 b	2,57 a	3,5 c	3,33 b
8	solución 19%	0,63 a	1,5 c	2,4 b	3,47 c	3,4 b

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de etanol a partir de la fermentación alcohólica por lotes del bagazo de caña de maíz.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 6 (T6), es decir la fermentación alcohólica con la solución azucarada proveniente de la hidrólisis del aserrín al 13% presenta mayor producción de etanol. Además la mayor producción de alcohol se da en el día 3.

El tratamiento que produjo menor cantidad de alcohol fue el tratamiento 8 (T8), con un máximo de concentración de alcohol de 3.47 %.

4.5.2 Fermentación alcohólica por Sacarificación y fermentación simultánea (SFS)

Se realizó la fermentación alcohólica por medio de la técnica de sacarificación y fermentación simultánea con la enzima celulasa producida. Para determinar el tiempo y la concentración del complejo sustrato-enzima celulasa apropiados para una mayor producción de alcohol se realizó fermentaciones con diferentes concentraciones de dicho complejo.

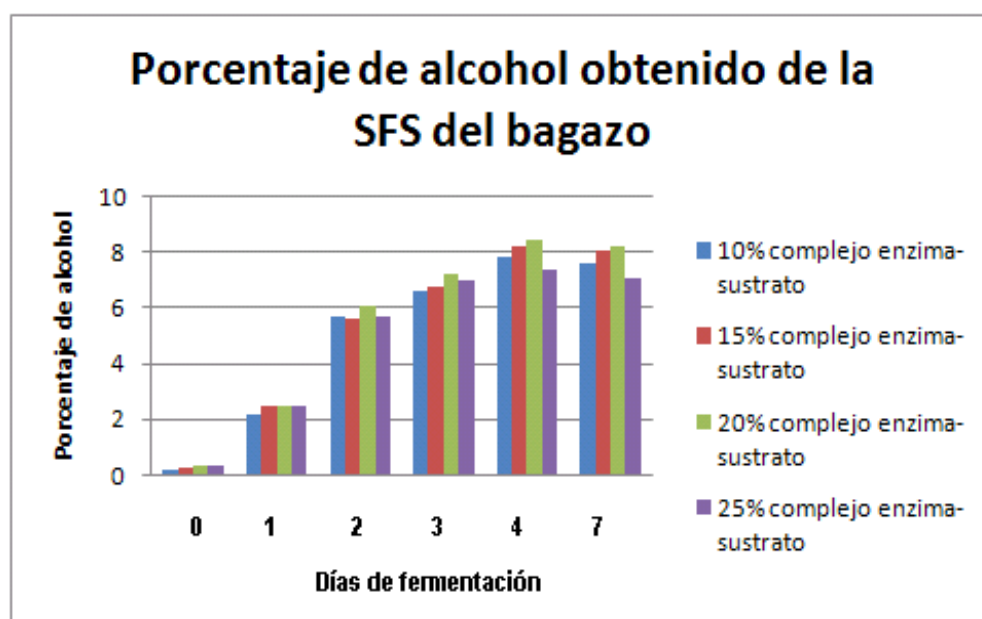
Por la mayor concentración de alcohol en el medio, se determinó el tiempo y concentración óptimo de fermentación.

En el cuadro 30 se presenta el porcentaje de alcohol producido, medido con un refractómetro, mediante sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz.

Cuadro 30. Resultado del promedio del porcentaje de alcohol producido a partir de sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz. 2010.

Concentración complejo sustrato-enzima	Porcentaje de alcohol					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7
10%	0,2	2,2	5,7	6,6	7,8	7,6
15%	0,3	2,5	5,6	6,8	8,2	8,1
20%	0,3	2,5	6,1	7,2	8,5	8,3
25%	0,3	2,4	5,7	7	7,3	7
Control 1: Sin levadura	0,2	0,4	0,7	0,5	0,7	0,9
Control 2: H ₂ O	-0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3

Gráfico 7. Producción de alcohol obtenido de la sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz. 2010.



Cuadro 31. Análisis de varianza para la obtención de alcohol por sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM					
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4	día 7
Total	11						
Repeticiones	2	0,00083	0,0025	0,00083	0,01	0,0025	0,01
Tratamientos	3	0,01	0,07	0,13	0,19	0,65	0,85
Error experimental	6	0,0042	0,0025	0,0019	0,01	0,0047	0,01
Promedio		0,2675	2,4025	5,76	6,9	7,925	7,725
CV (%)		24,21	2,08	0,77	1,43	0,87	1,12

En el análisis de varianza de la producción de etanol proveniente de la sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz, se observó que hay significación estadística para tratamientos y no significación estadística para repeticiones en todos los días.

El promedio general del día 0 fue de 0.267% de alcohol. El promedio del día 4 fue el más alto, con una concentración de 7.925 % de alcohol. En el día 7 existe una reducción en la concentración de alcohol con un promedio general de 7.725% de alcohol.

Cuadro 32. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de etanol a partir de sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz. 2010

Tto	DESCRIPCIÓN	RANGOS						
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4	día 7	
1	10% complejo enzima-sustrato	0,2 a	2,17 b	5,7 b	6,63 c	7,8 c	7,6 b	
2	15% complejo enzima-sustrato	0,3 a	2,5 a	5,6 b	6,77 b	8,17 b	8,03 a	
3	20% complejo enzima-sustrato	0,3 a	2,47 a	6,07 a	7,2 a	8,4 a	8,23 a	
4	25% complejo enzima-sustrato	0,3 a	2,47 a	5,67 b	7 a	7,33 d	7,03 c	

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de etanol a partir de la sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de maíz.

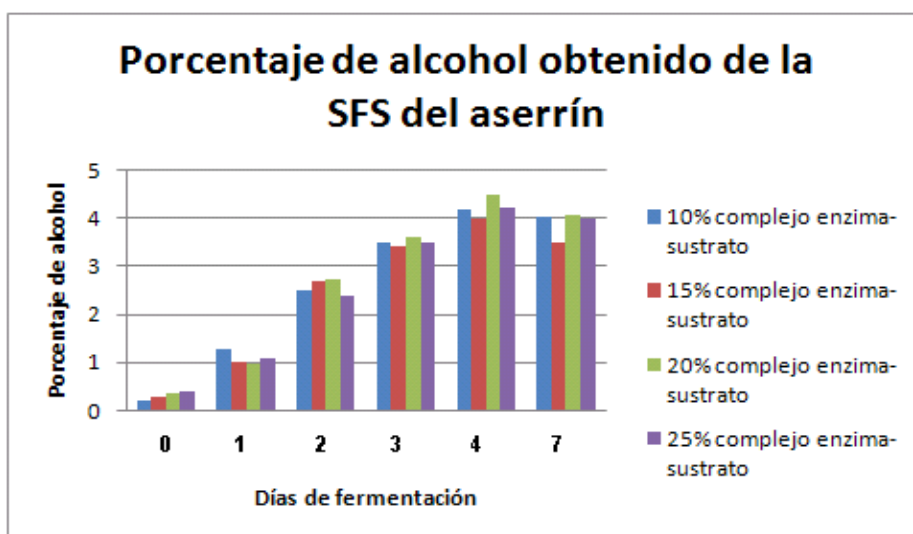
De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% el tratamiento 3 (T3), es decir la sacarificación y fermentación simultánea con el complejo bagazo-enzima en un 20% siempre está en el primer rango y presenta mayor producción de etanol. Además se concluye que la mayor producción de alcohol se da en el día 4, con un promedio de alcohol de 8.4%

En el cuadro 33 se presenta el porcentaje de alcohol producido, medido con un refractómetro, mediante sacarificación y fermentación simultánea del aserrín de laurel.

Cuadro 33. Resultado del promedio del porcentaje de alcohol producido a partir de sacarificación y fermentación simultánea del aserrín. 2010.

Concentración complejo sustrato-enzima	Porcentaje de alcohol					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7
10%	0,2	1,3	2,5	3,5	4,2	4
15%	0,3	1	2,7	3,4	4	3,5
20%	0,4	1	2,7	3,6	4,4	4,1
25%	0,4	1,1	2,3	3,5	4,2	4
Control 1: Sin levadura	0,2	0,4	0,7	0,5	0,7	0,9
Control 2: H ₂ O	-0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3

Gráfico 8. Producción de alcohol obtenido de la sacarificación y fermentación simultánea del aserrín de laurel. 2010.



Cuadro 34. Análisis de varianza para la obtención de alcohol por sacarificación y fermentación simultanea del aserrín de laurel. 2010.

Fuentes de Variación	gL	CM					
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4	día 7
Total	11						
Repeticiones	2	0,00083	0,00083	0,01	0,00083	0,0033	0,00083
Tratamientos	3	0,02	0,05	0,09	0,01	0,11	0,24
Error experimental	6	0,00083	0,0019	0,0031	0,00083	0,01	0,0031
Promedio		0,3167	1,083	2,575	3,508	4,217	3,892
CV (%)		9,12	4,07	2,15	0,82	1,77	1,42

En el análisis de varianza de la producción de etanol proveniente de la sacarificación y fermentación simultanea del aserrín, se observó que hay significación estadística para tratamientos y no significación estadística para repeticiones en todos los días.

El promedio general del día 0 fue de 0.3167 % de alcohol. El promedio del día 4 fue el más alto, con una concentración de 4.217 % de alcohol. Los coeficientes de variación obtenidos son aceptables para este tipo de experimentos.

Cuadro 35. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de etanol a partir de sacarificación y fermentación simultánea del aserrín. 2010

Tto	DESCRIPCION	RANGOS					
		día 0	día 1	día 2	día 3	día 4	día 7
5	10% complejo enzima-sustrato	0,2 c	1,27 a	2,5 b	3,5 b	4,17 b	4,03 a
6	15% complejo enzima-sustrato	0,3 b	1 b	2,7 a	3,43 b	4 c	3,47 b
7	20% complejo enzima-sustrato	0,4 a	0,97 c	2,73 a	3,6 a	4,47 a	4,07 a
8	25% complejo enzima-sustrato	0,4 a	1,1 b	2,37 b	3,5 b	4,23 b	4 a

Mediante la prueba de Tukey al 5% se eligió el tratamiento que libera mayor cantidad de etanol a partir de la sacarificación y fermentación simultánea del aserrín.

Al realizar la prueba de Tukey al 5 % para tratamientos se observa que el tratamiento 7 (T7) está en el primer rango a partir del día 2 y se mantienen así hasta el final de la fermentación. El día de mayor concentración de alcohol fue el día 4 con un promedio de alcohol de 4.47 %.

CONCLUSIONES

- La mayoría de cepas de *Trichoderma* que se almacenan en el cepario del laboratorio de Microbiología Agrícola tienen alguna actividad celulolítica.
- De acuerdo a las evaluaciones realizadas sobre papel filtro, se encontró que la cepa *Trichoderma atroviride* T8 presenta mayor actividad celulolítica que las otras cepas probadas del laboratorio.
- Los residuos agroindustriales, como el bagazo de caña de maíz y aserrín de laurel, pueden ser utilizados como sustrato en los medios de cultivo para el desarrollo de hongos celulolíticos así como para la producción industrial de enzimas celulasas.
- Para poder utilizar residuos agroindustriales es necesario realizar un pretratamiento. El pretratamiento físico de tipo molienda utilizado es un tratamiento relativamente económico y de un bajo impacto ambiental.
- El bagazo de caña de maíz a una concentración de 1.5 g/dL resultó ser la mejor concentración para la producción de enzimas celulasas.
- El tiempo óptimo para la producción de enzimas celulasas a partir de la cepa *Trichoderma atroviride* T8 es de 12 días.
- *Trichoderma* es el hongo más utilizado para la producción de enzimas celulasas por su mayor producción del complejo enzimático y por sus requerimientos nutricionales no exigentes.
- El tiempo y concentración de los sustratos para su respectiva hidrólisis enzimática varía con cada sustrato, siendo 4 días a una concentración de 1.5 g/dL para el bagazo de caña de maíz y 5 días a una concentración de 2.5 g/dL para el aserrín de laurel, y se obtiene mayor cantidad de glucosa a partir del bagazo de caña de maíz.
- Es posible hidrolizar el bagazo de caña de maíz y aserrín de laurel para la obtención de azúcares fermentables usando las enzimas celulasas producidas por cepas de *Trichoderma* para luego obtener bioetanol mediante una fermentación alcohólica.

- Los dos métodos usados para la obtención de alcohol fueron exitosos, sin embargo por medio de la sacarificación y fermentación simultánea se obtuvo mayor producción.
- Al final de la fermentación, a medida que se aumenta el tiempo de la fermentación alcohólica, el etanol disminuye su concentración, esto posiblemente se debe a la evaporación del alcohol.
- Este tipo de estudios para la obtención de energías renovables son importantes para el país, pues en Ecuador se generan grandes cantidades de residuos agroindustriales que podrían utilizarse para este objetivo a fin de reducir el consumo de combustibles fósiles y generar menor contaminación ambiental. Otros países de la región están más desarrollados en este tema.

RECOMENDACIONES

- En este estudio se utilizó la mejor cepa celulolítica que existe en el laboratorio de Microbiología Agrícola, sin embargo no significa que esta sea la cepa más adecuada para una abundante producción de enzimas celulasas. Se puede aislar cepas celulolíticas de diferentes ecosistemas como suelos de bosques, abonos, hojarascas, etc. las cuales podrían producir enzimas celulasas de una calidad superior a las celulasas usadas en este trabajo.
- Debido a que el tamaño de partícula del sustrato influye en la producción de enzimas celulasas e hidrólisis enzimática, se debería lograr un tamaño de partícula menor a la que se usó en este trabajo y que se acerque al tamaño de partícula que sugiere la bibliografía, esto es 7-8 μm .
- Se podría evaluar la producción de enzimas celulasas con otras fuentes de carbono, variando las concentraciones para encontrar un sustrato mejor para el crecimiento de la cepa, y una mejor producción de enzimas celulasas.
- Optimizar las condiciones de trabajo para la producción de enzimas celulasas, esto es: aumentar la agitación en las fermentaciones sumergidas a las recomendadas por la bibliografía (200-250 rpm); controlar y/o optimizar temperatura; tamaño adecuado de partícula de los sustratos; evaluar surfactantes, etc.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo Astrid, Godoy Rubén. “Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático rhyzozyme”. Internet. www.revistavirtualpro.com/files/TIE02_200612.pdf
Acceso: 19/08/2009
2. Aguiar, C. “Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulolíticos”. *Ciencia y tecnología alimentaria*. Volumen 3, Numero 2, México 2001
3. Aro Nina, Ilmén Marja. “ACEI of *Trichoderma reesei* Is a Repressor of Cellulase and Xylanase expression”. Internet. www.aem.asm.org/cgi/reprint/69/1/56.pdf
Acceso: 03/11/2009
4. Ayala Sarmiento; “Producción de etanol a partir del hidrolizado de sorgo empleando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en ácido poligalacturónico”. Internet. www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/6_9UAQAYalaSarmiento.pdf Acceso: 27/11/2008
5. Ballesteros, I. Oliva, J. “Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol” Internet. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewArticle/318> Acceso: 07/03/2009
6. Carrillo, Leonor. “Energía de biomasa” Internet. www.unsa.edu.ar/matbib/ebiomasa.pdf Acceso: 22/08/2009
7. Carrillo Leonor. “Microbiología Agrícola”. Internet. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap1.pdf> Acceso: 22/08/2009
8. Carrión, Molina. “Producción de etanol a partir suero leche”. Internet. www.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica3/suero.pdf Acceso: 06/12/2008
9. Clark, Dale. “Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a pilot 130 liter multistage continuous reactor separator”

- Internet. http://ppldnft.revistavirtualpro.com/ediciones/alcohol_carburante_equipos_en_fermentacion_alcoholica-2006-12-01_22 Acceso: 28/01/2010
10. CONAE. “Ficha técnica: vehículos con etanol” Internet. www.energia.inf.cu/iee-mep/www/www.conae.gob/vehiculoetanol.pdf Acceso: 12/04/2009
 11. Cruz, Lina. “Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* mediante fermentación bifásica a escala piloto”. Internet. www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf Acceso: 04/02/2009
 12. Cuervo, Laura. Folch, Luis. “Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol”. Internet. www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf Acceso: 06/12/2008
 13. Desvaux, Mickaël. “Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium”. Internet. www.aem.asm.org/cgi/reprint/66/6/2461.pdf Acceso: 28/01/2010
 14. Folch, Jorge Luis. Garay, Adriana. “La respuesta a stress de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Volumen 46 Numero 2. 2004
 15. Galindo, Álvaro. “Pretratamiento de residuos celulósicos para mejorar su digestibilidad (para la producción de proteína celular con $\text{Ca}(\text{OH})_2$)”. Internet. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=20524&docs=UAM20524.PDF> Acceso: 03/11/2009
 16. García, Juan Manuel. “Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol”. Internet. www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/Publicacion/doc/VT/vt4_Biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf Acceso: 24/11/2008
 17. García, María Cristina. “Producción de biodiesel mediante fermentación en estado sólido de compuestos lignocelulósicos derivados del bagazo de remolacha” Internet. www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/8.Produccindebiodieselmediantefermentacinenestadoslido.pdf Acceso: 03/01/2009

18. Gonzales, Andrés. “Biocombustibles de segunda generación y biodiesel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes”. Internet. www.revistaing.uniandes.edu.co/pdf/a%2028%20corr.pdf Acceso: 26/08/2009
19. Griffin, H. “Cellulase production by *Trichoderma viride* on feedlot waste”. Internet. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/.../pdf/applmicro00041-0003.pdf Acceso: 22/02/2010
20. Hernández, María. “Tendencias actuales en la producción de bioetanol”. Internet. www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf Acceso: 03/11/2009
21. Honorato, Amador. Hernández, Jorge. “Determinación de componentes Químicos de la madera de cinco especies de encino del Estado de Puebla” Internet. www.inecol.edu.mx/myb/resumeness/4.2/pdf/Honorato%20y%20Hernandez%201998.PDF Acceso: 08/04/2009
22. Izurieta, Bolívar. “Obtención de celulasas a partir de *Trichoderma viride* y su utilización para degradar papel periódico”. *Tesis Escuela Politécnica Nacional*. Quito, 1982
23. Kafarov, Viatcheslav. “Diseño de producción conjunta biodiesel-bioetanol”. Internet. www.energiaycomputacion.univalle.edu.co/edicion27/27art1.pdf Acceso: 03/01/2009
24. Laguna, José. Piña, Enrique. Bioquímica de Laguna. Mexico, Editorial El manual Moderno, 5ª edición, 2002
25. Lopatinsky, Miryam. “Obtención de bioetanol a partir de Zea Mays con aplicación de alfa-amilasa”. Internet. www.cib.espol.edu.ec/Digipath/REVISTA_CICYT/30.pdf Acceso: 12/03/2010
26. Macarrón Larumbe, Ricardo. “Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414”. Internet. www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/X/3/X3009401.pdf Acceso: 15/10/2008
27. Marquina, Domingo. “Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos”. *Tesis Universidad Complutense de Madrid*. Madrid 1991

28. Martínez, Claudia. Balcázar, Edgar. Folch, Jorge. “Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética”. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Volumen 50 Numero 4. 2008
29. Mesa Garriga, L. González Suárez, E. “Estudio de alternativas tecnológicas para la producción de alcohol carburante” Internet. www.eventos.fim.uclv.edu.cu/comec/cd/ponen/c1/c1-29.pdf Acceso: 04/04/2009
30. Munero, Pavel. González, Luis. “Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de hyphomycetes nativos de la provincia de Villa Clara”. Internet. <http://biblioteca.idict.villaclara.cu/biblioteca/articulos/ciencia/art304> Acceso: 03/01/2009
31. Nakari, Tiina. Penttila, Merja. “Production of *Trichoderma reesei* Cellulases on glucose-containing media”. Internet. www.aem.asm.org/cgi/reprint/61/10/3650.pdf Acceso: 12/03/2010
32. Nidetzky, Bernd. “Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction”. Internet. www.biochemj.org/bj/298/0705/2980705.pdf Acceso: 12/03/2010
33. Núñez, José. “Biocombustibles: bioetanol y biodiesel”. Internet. www.enciga.org/biocombustibles_bioetanol_y_biodiesel.pdf Acceso: 08/04/2009
34. Oliva Domínguez, José. “Efecto de los productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*”. Internet. www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/PROCESOS_MICROBIANOS/1 Acceso: 25/10/2008
35. Ortiz Marcos, Susana. “Buscando combustibles alternativos: el bioetanol”. Internet. www.ica.es/publicaciones/anales_get.php?id=462 Acceso: 27/10/2008
36. Ovando Chacón. “Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos”. Internet. www.redalyc.uaemex.mx/pdf/154/15404206.pdf Acceso: 19/05/2009

37. Patrouilleau, Rubén. Lacaste, Carlos. “Perspectivas de los biocombustibles en Argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica”. Internet: www.inta.gov.ar/actual/info/perspectiva_%20biocombus.pdf Acceso: 27/10/2008
38. Piñero Judith, Rivas Nilo. “Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo”. *Revista científica Universidad de Zulia*, Numero 5, Maracaibo, 2004
39. Ponce Loyola, Teresa. Pérez Avalos, Odilia. “Celulasas y xilanasas en la industria”. Internet: www.eclipse.red.cinvestav.mx/publicaciones/anuario02/biotecnologia.pdf Acceso: 09/11/2008
40. Ramírez, Olga. “Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma* sp. y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo” Internet. www.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica1/celulasas.pdf Acceso: 26/11/2008
41. Ramírez, Pablo. Cocha, Juana. “Degradación Enzimática de celulosa por Actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica” Internet. www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v10_n1/PDF/Degradación.pdf Acceso: 14/04/2009
42. Ramos, Roberto. “Determinación de Patrones electroforéticos de celulasas producidas en fermentación sumergida por *Trichoderma reesei* LM-UC4” *Biota, revista de Ciencias Biológicas*, Numero 99, Lima 1999
43. Rodríguez, Ibeth. Piñeros, Yineth. “Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma spp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato” *Vitae, revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Volumen 14 Numero 2. Medellín 2007
44. Rodríguez, Lourdes. “Hidrolisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada”. *Tesis Universidad Complutense de Madrid*. Madrid 1991
45. Romero García, Aida. “Desarrollo de una cepa etanológica a partir de *Bacillus subtilis*”. Internet. <http://pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/SusanaAidaRomero.pdf> Acceso: 26/10/2008

46. Ruiz, Roger. Vásquez, Patricia. “Hidrólisis enzimática de desechos del umarí (*Poraqueiba Sericea* Tulasne) y de la yuca (*Manihot Esculenta* Crantz)” Internet. www.unapiquitos.edu.pe/links/facultades/alimentarias/v1/4.pdf Acceso: 07/10/2008
47. Sánchez, Oscar. Cardona, Carlos. “Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas”. *Interciencia*, Numero 11. Caracas 2005
48. Sánchez, Oscar. Cardona, Carlos. “Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de procesos”. *Interciencia*, Numero 11. Caracas 2005
49. Universidad Nacional Federico Villareal. “Hongos y levaduras”. Internet. <http://www.scribd.com/doc/17103590/hongos-y-levaduras> Acceso: 23/03/2010
50. Valenzuela Lourdes. “*Saccharomyces cerevisiae*”. Internet. www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo20.pdf Acceso: 19/08/2009
51. Vilches, Laura. “Determinación de actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz”. Internet. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/vilches_p_1/t_completo.pdf Acceso: 14/04/2009
52. Wikipedia. “*Saccharomyces cerevisiae*”. Internet. http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae Acceso: 23/10/2010

FOTOGRAFÍAS



Fotografía 1. Inóculos de cepas reactivadas



Fotografía 2. Inóculos en agitación



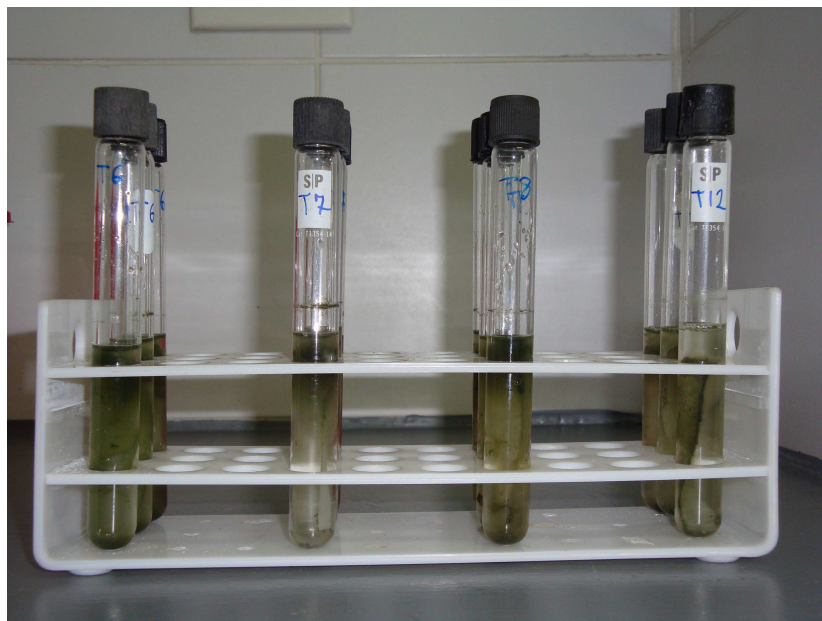
Fotografía 3. Degradación del papel filtro (Cepa 437-40 *Aspergillus sporocarpia*) después de 20 días



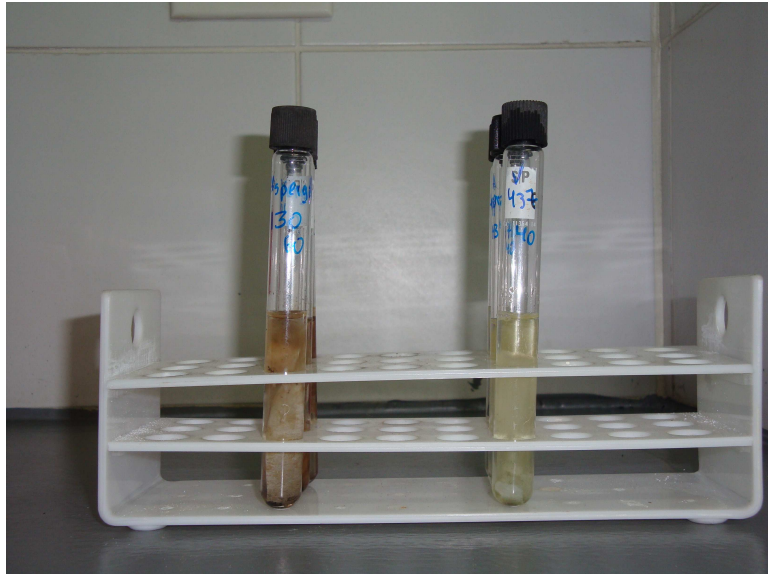
Fotografía 4. Degradación del papel filtro (Cepa 130-60 de *Aspergillus spp.*) después de 20 días



Fotografía 5. Degradación del papel filtro (Cepa T8 de *Trichoderma atroviride*) después de 20 días



Fotografía 6. Cepas preseleccionadas de *Trichoderma*



Fotografía 7. Cepas preseleccionadas de *Aspergillus*



Fotografía 8. Fermentación líquida de *Trichoderma atroviride* T8 con diferentes sustratos (Bagazo 2.5%)



Fotografía 9. Producción de Enzimas celulasas a partir de *Trichoderma atroviride* T8



Fotografía 10. Enzima celulasa y buffer citrato con sustratos a hidrolizar (Bagazo 1.5%)



Fotografía 11. Hidrólisis de los sustratos en agitación 150 rpm a 40°C



Fotografía 12. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*



Fotografía 13. Fermentación alcohólica por lote (10% solución azucarada proveniente de hidrólisis del aserrín)



Fotografía 14. Sacarificación y fermentación simultánea (celulosa y bagazo con buffer y medio de fermentación)



Fotografía 15. Sacarificación y fermentación simultánea (en agitación 150 rpm en incubadora a 40°C)

ANEXOS

ANEXO 1

CONTAJE DE ESPORAS CON CAMARA DE NEUBAUER

De la suspensión de esporas obtenida, se toma 50 µl y se llena la cámara de Neubauer. Se cuentan todas las esporas en los cinco cuadrantes centrales de la cámara y después se aplica la fórmula:

$$\text{Esporas x cm}^3 = \frac{\text{Total de esporas en los cinco cuadrantes x Factor de dilución}^*}{0.02} \text{ **} \times 1000$$

* Sólo si se usa dilución

**Dimensiones del área de recuento de la cámara: 1 mm x 1 mm x 0.1 mm x 5/25 (corresponde a los cuadrantes que se contó de los 25 cuadrantes que tiene la cámara en el centro)

ANEXO 2

COMPOSICION MEDIO CZAPECK (según Vilches Laura)

- NaNO_3 2 g/L
- KH_2PO_4 1 g/L
- KCl 0.5 g/L
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L
- Agua destilada 1000 mL

ANEXO 3

COMPOSICION BUFFER CITRATO (Según Izurieta Bolivar EPN)

Citrato Buffer 0.05M pH 4.8

- Solución A

21 gramos de ácido cítrico + 200 mL de NaOH 1 N, diluida a 1 litro

- Solución B

HCl 0.1 N

- Solución de trabajo

88.2 mL de solución A + 11.8 mL de solución B

ANEXO 4

MEDIO MANDELS-WEBER MODIFICADO (Según Izurieta Bolivar EPN)

▪ KH_2PO_4	2 g/L
▪ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g/L
▪ Urea	0.3 g/L
▪ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L
▪ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/L
▪ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.00156 g/L
▪ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00140 g/L
▪ CoCl_2	0.3 g/L
▪ Peptona	0.5 g/L
▪ Agua destilada	1000 mL
▪ pH final	4.8

ANEXO 5

ANEXO 6

MEDIO DE CULTIVO PARA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA (según Ballesteros y Oliva)

- Extracto de levadura 2.5 g/L
- Peptona 5 g/L
- NH₄Cl 2 g/L
- KH₂PO₄ 1 g/L
- MgSO₄ 0.3 g/L
- Agua destilada 1000 mL