

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS.

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA.

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL POR DIGESTION ENZIMÁTICA DE
Aspergillus niger Y *Bacillus subtilis* EN BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR,
BAGAZO DE MALTA Y MEZCLA DE ESTOS, EN SISTEMAS DE
FERMENTACIÓN CON *Saccharomyces cerevisiae* Y *Zymomonas mobilis***

PRESENTADO POR:

MERIYIN JIBELLY CARRASCO CARNERO

FRANCISCO WILBER ZÚÑIGA ZÚÑIGA

AREQUIPA- 2016

AGRADECIMIENTO

Las palabras son cortas para expresar todas las sensaciones de gratitud primeramente hacia Dios, por la guía, las fuerzas de superación, el conocimiento, discernimiento y por habernos dado puesto en todo nuestro trayecto académico y cotidiano a aquellas personas que han sido nuestro apoyo incondicional, soporte ante todo así como la compañía durante todo este periodo de estudio. A nuestros padres de cada uno de nosotros Jimmy Carrasco, Mary Carnero, Rosa Zúñiga y Wilber Zúñiga, por habernos brindado todos los recursos necesarios para lograr concluir satisfactoriamente nuestra carrera universitaria. También a nuestros hermanos Gianella Carrasco y Giancarlo Zúñiga que han permitido que hayamos logrado cumplir esta meta con cada incentivo brindado a nosotros. Agradecidos totalmente a Hugo Apaza Aquino, nuestro amigo, asesor, motivador que hizo que nuestras ganas de aprender, investigar todo lo concerniente a biotecnología, y que además desde el primer día nos dio su apoyo incondicional y consejos para la vida diaria con el cual compartimos muchas emociones y sentimientos de una gran amistad. A nuestros compañeros de investigación Daniel Carrillo, Dane Colpaert, Brenda Valo, Marizeth Condori, Daniel Calisaya, por alentarnos con cada consejo durante la trayectoria experimental de nuestro trabajo de tesis. A la Dra. Jesus Zambrano por brindarnos todo su apoyo sin ponernos ningún impedimento en el uso de los laboratorios que requerimos para realizar la parte experimental de nuestra tesis, y por siempre estar pendiente de nuestros avances en el trabajo realizado. A la señora Sofia, encargada del laboratorio H-403 de la UCSM que nos brindó todo su apoyo y tiempo para que finalmente alcancemos nuestra meta final.

A las señoras Ana Maria y Luisa encargadas en los laboratorios del pabellón H, que nos brindaron su tiempo y paciencia en la parte experimental con respecto al uso de materiales y reactivos de nuestro trabajo de investigación. Al Dr. Ivan Paz, al Ingeniero Freddy Molina y al Dr. Jaime Cárdenas García por su tiempo, dedicación, y consejos que nos dieron para la realización de nuestro trabajo de tesis. A nuestra asesora de tesis la ingeniera Cinthia Córdova Barrios que con toda su voluntad, aliento, apoyo incondicional, amistad y que con sus admirables conocimientos, nos brindó para llevar a cabo nuestra investigación realizada, muchísimas gracias de todo corazón por la guía que fue usted y que nos dio durante el tiempo que se realizó la investigación de nuestra tesis. Por último, en general quisiéramos agradecer a todas y cada una de las personas que han estado con nosotros en la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesitamos nombrar porque tanto ellas como nosotros sabemos que desde los más profundo de nuestro corazón les agradecemos el habernos brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO.....	2
Índice de contenidos.....	3
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	10
Índice de anexos.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Hipótesis.....	16
1.2. Objetivos.....	16
1.2.1. Objetivo General.....	16
1.2.2. Objetivos Específicos.....	16
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO.....	17
2.1.La biomasa como materia prima para la obtención de combustibles líquidos.....	17
2.2.Biocombustibles de primera generación.....	18
2.3.Biocombustibles de segunda generación.....	19
2.4.Caña de azúcar.....	21
2.5.Bagazo de caña de azúcar.....	29
2.6.La cebada.....	39
2.7.La malta.....	42
2.8.Bagazo de malta.....	43
2.9.Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.....	46
2.10. Hidrólisis enzimática.....	48
2.11. <i>Aspergillus Niger</i>.....	51
2.12. <i>Bacillus subtilis</i>.....	54

2.13. Fermentación.....	58
2.14. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	60
2.15. <i>Zymomonas mobilis</i>	67
2.16. Biocombustibles y Bioetanol.....	73
2.17. Destilación.....	74

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS.....	76
3.1. Materiales.....	76
3.2. Metodología.....	77
A. Fase de Campo.....	77
a. Recolección y selección de los residuos: bagazo de caña y bagazo de malta.....	77
b. Recolección y selección de la tierra cultivo para el aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i>	77
B. Fase de Laboratorio.....	79
a. Aislamiento, identificación y caracterización de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>A. niger</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Zymomonas mobilis</i>	79
b. Caracterización de los residuos celulósicos.....	83
c. Pretratamiento de los residuos celulósicos.....	84
d. Acondicionamiento de las cepas <i>A. niger</i> y <i>B. subtilis</i> en el bagazo de caña y bagazo de malta con concentraciones de sales inductoras para la producción enzimática.....	84
e. Determinación de las cinéticas de crecimiento.....	86
f. Producción de extracto enzimático en sustratos sólidos.....	90
g. Determinación de celulasas.....	92
h. Diseño, construcción y funcionamiento del bioreactor para la obtención del extracto enzimático, digestión enzimática y fermentación.....	93
i. Inmovilización de extracto enzimático.....	95
j. Fermentación y obtención de bioetanol con <i>S. cerevisiae</i> y <i>Zymomonas mobilis</i>	96
k. Obtención y concentración del bioetanol obtenido.....	96

I. Determinación de la presencia de etanol.....	97
--	-----------

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
------------------------------------	-----------

a. Recolección y selección de residuos.....	98
b. Aislamiento de <i>Bacillus subtilis</i>.....	98
c. Pruebas bioquímicas del aislamiento de <i>B. subtilis</i>.....	99
d. Aislamiento de <i>Aspergillus niger</i>.....	101
e. Aislamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Zymomonas mobilis</i>.....	102
f. Pruebas bioquímicas del aislamiento de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i>.....	104
g. Caracterización de residuos celulósicos.....	105
h. Pretratamiento de residuos celulósicos.....	105
i. Acondicionamiento de cepas <i>A. niger</i> y <i>B. subtilis</i>.....	105
j. Determinación de las cinéticas de crecimiento de <i>A. niger</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i>.....	106
k. Evaluación del extracto enzimático obtenido a diferentes concentraciones de sales inductoras.....	110
l. Inmovilización de extracto enzimático.....	114
m. Funcionamiento del bioreactor para la digestión enzimática y fermentación.....	114
n. Obtención y concentración del bioetanol obtenido.....	115
o. Determinación cualitativa de la presencia de etanol.....	115

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	117
--------------------------	------------

CAPITULO VI

SUGERENCIAS.....	119
-------------------------	------------

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA.....	121
--------------------------	------------

CAPÍTULO VIII

ANEXOS.....	138
--------------------	------------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de aprovechamiento de la biomasa.....	17
Figura 2. Diagrama VanKrevelen de composición de materias primas y productos finales.....	20
Figura 3. Caña de azúcar.....	21
Figura 4. Forma de la hoja de la caña de azúcar.....	24
Figura 5. Bagazo de caña de azúcar.....	29
Figura 6. Polímeros del bagazo de caña de azúcar.....	32
Figura 7. Estructura química de la celulosa.....	34
Figura 8. Estructura de la Hemicelulosa.....	34
Figura 9. Estructura de la Lignina.....	35
Figura 10. Sección longitudinal de un grano de cebada.....	42
Figura 11. Malta de cebada.....	42
Figura 12. Bagazo de malta húmeda.....	44
Figura 13. Obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósicos.....	47
Figura 14. Estructura química de la celulosa.....	49
Figura 15. Micrografía de <i>A. niger</i> crecido en una placa de agar Sabouraud en aumento 100x.....	51
Figura 16. Tinción gram de <i>Bacillus subtilis</i>.....	55
Figura 17. Mecanismo de Fermentación Alcohólica.....	59
Figura 18. Transformación de glucosa a etanol.....	59
Figura 19. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	62
Figura 20. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	63
Figura 21. Vista por microscopía electrónica de <i>Z. mobilis</i>.....	68
Figura 22. Tipos de destilación (Uyazán et al, 2008).....	75
Figura 23. Tipos de muestreo.....	78
Figura 24. Toma de muestra de tierra.....	78
Figura 25. Pesado de 1gr. de muestra de tierra para aislamiento de <i>B. subtilis</i>.....	80
Figura 26. Diluciones seriadas de la tierra para sembrado en placa.....	80

Figura 27. Aislamiento de <i>A. niger</i> nativo.....	81
Figura 28. Muestra de mosto cervecero para aislamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	81
Figura 29. Preparación de mostro de uva para aislamiento de <i>Zymomona mobilis</i> nativa.....	82
Figura 30. Prueba de Durham con tubo invertido en medio CELMG para <i>Z. mobilis</i>.....	82
Figura 31. Pesado de bagazo de malta y bagazo de caña de azúcar.....	83
Figura 32. Muestras de bagazo de caña de azúcar y bagazo e malta para determinación de humedad.....	84
Figura 33. Preparación de las muestras de residuos a pretratar.....	85
Figura 34. Preparación de las placas con bagazo de caña de azúcar para la siembra de <i>A. niger</i> y <i>B. subtilis</i>.....	85
Figura 35. Siembra de <i>B. subtilis</i> en placas con bagazo de caña de azúcar.....	86
Figura 36. Armado de los sistemas para las determinación de la cinética de <i>B. subtilis</i>.....	87
Figura 37. Toma de muestras de los sistemas a 37°C.....	87
Figura 38. Toma de muestra de los sistemas a 27°C.....	88
Figura 39. Sistemas de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 17°C.....	89
Figura 40. Sistema de medición de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 37°C.....	89
Figura 41. Sistema de medición de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 27°C.....	89
Figura 42. Sistema batch de <i>B. subtilis</i> a 37°C en bagazo de caña de azúcar.....	91
Figura 43. Sistema batch de <i>A. niger</i> a 17°C en bagazo de caña de azúcar.....	91

Figura 44. Lavado del bagazo de caña de azúcar después del sistema batch con <i>Bacillus subtilis</i>.....	92
Figura 45. Lavado del bagazo de caña de azúcar después del sistema batch con <i>Aspergillus niger</i>.....	92
Figura 46. Diseño del bioreactor.....	94
Figura 47. Extracto enzimático inmovilizado de <i>A. niger</i> en pellets de alginato de calcio.....	95
Figura 48. Extracto enzimático inmovilizado de <i>B. subtilis</i> en pellets de alginato de calcio.....	95
Figura 49. Destilación y concentración del etanol a partir de la fermentación.....	97
Figura 50. Micrografía con microscopio con lente 100x de <i>B. subtilis</i>.....	98
Figura 51. Micrografía con microscopio con lente 100x de <i>B. subtilis</i>.....	99
Figura 52. A) Prueba de TSI, B) Prueba SIM, C) Prueba de Ureasa, D) Prueba Voges-Proskauer	100
Figura 53. Prueba de amilasa en Agar Almidón.....	101
Figura 54. Prueba de Manitol Salado	101
Figura 55. Identificación macroscópica de cepa en placas con medio PDA.....	102
Figura 56. Estructura microscópica de <i>A. niger</i> observadas con un lente de aumento 40x.....	102
Figura 57. Crecimiento en medio YPD (A) y micrografía con microscopio con lente 100x de <i>S. cerevisiae</i>. (B).....	103
Figura 58. . Crecimiento en CELMG (A) y micrografía con lente 100x de <i>Z. mobilis</i> (B).	104
Figura 59: Curva de crecimiento de <i>A. niger</i> en mezcla de sustratos	107
Figura 60. Curva de crecimiento de <i>A. niger</i> en bagazo de caña.....	107

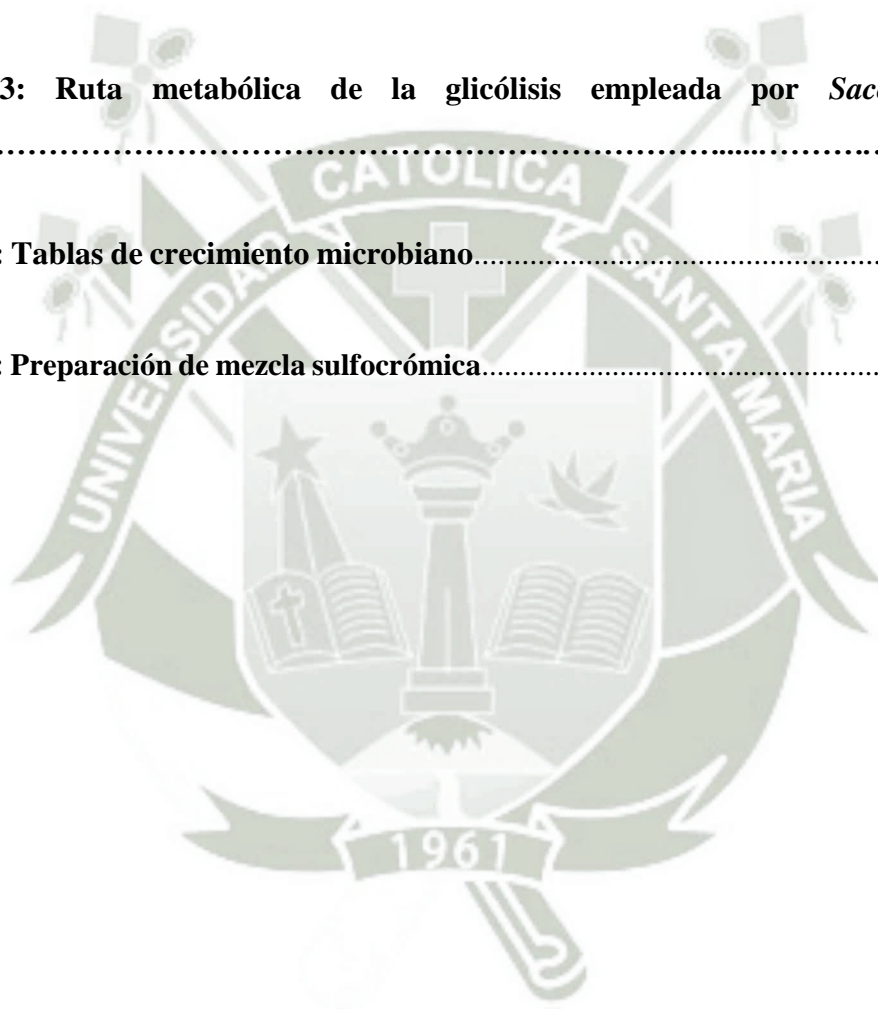
Figura 61. Curva de crecimiento de <i>A. niger</i> en bagazo de malta.....	107
Figura 62. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en bagazo de malta.....	108
Figura 63. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en bagazo de caña.....	108
Figura 64. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en mezcla de sustratos.....	109
Figura 65. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	109
Figura 66. Curva de crecimiento de <i>Z. mobilis</i>.....	110
Figura 67. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> con Trat. I, II y III en bagazo de caña.....	111
Figura 68. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> con Trat. I, II y III en bagazo de malta.....	111
Figura 69. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> con Trat. I, II y III en bagazo de caña + bagazo de malta.....	112
Figura 70. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Aspergillus niger</i> con Trat. I, II y III en bagazo de caña.....	112
Figura 71. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Aspergillus niger</i> con Trat. I, II y III en bagazo de malta.....	113
Figura 72. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de <i>Aspergillus niger</i> con Trat. I, II y III en bagazo de caña + bagazo de malta.....	113
Figura 73. Biorreactor de digestión enzimática.....	115
Figura 74. Concentración de azúcares reductores en el sistema de hidrólisis enzimática.....	115
Figura 75. Obtención de bioetanol por destilación simple.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos de cultivos para biocombustibles.....	19
Tabla 2. Clasificación científica de la caña de azúcar.....	21
Tabla 3. Valores de referencia general de los componentes de la caña.....	25
Tabla 4. Otros constituyentes de la caña presentes en el jugo.....	25
Tabla 5. Empresas Azucareras en el Perú.....	27
Tabla 6. Componentes químicos del bagazo.....	31
Tabla 7. Componentes químicos del bagazo.....	32
Tabla 8. Propiedades químicas de las fracciones del bagazo.....	38
Tabla 9. Composición aproximada de un gramo de cebada.....	40
Tabla 10. Composición química-biológica del bagazo de malta cervecero.....	45
Tabla 11. Taxonomía de <i>A. niger</i>	51
Tabla 12. Taxonomía de <i>Bacillus subtilis</i>	54
Tabla 13. Clasificación taxonómica de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	60
Tabla 14. Taxonomía de <i>Z. mobilis</i>	67
Tabla 15. Características bioquímicas de <i>Z. mobilis</i>	72
Tabla 16. Pruebas bioquímicas para identificación <i>Z. mobilis</i> . y <i>S. cerevisiae</i>	72
Tabla 17. Profundidad del muestreo según en uso del suelo.....	78
Tabla 18. Sales a diferentes concentraciones para la inducción a producción de enzimas.....	85
Tabla 19. Contenido de cada sistema para la digestión enzimática.....	96
Tabla 20. Características macroscópica de las colonias aisladas de <i>B. subtilis</i>	98
Tabla 21. Resultados de pruebas bioquímicas de <i>B. subtilis</i>	100
Tabla 22. Características macroscópicas de las colonias aisladas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z mobilis</i>	103
Tabla 23. Resultados de la identificación bioquímica de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i>	104
Tabla 24: Crecimiento Radial de <i>A. niger</i> y <i>B. subtilis</i>	106
Tabla 25: Determinación de bioetanol en destilaciones.....	116

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Manual de Bacteriología Sistémica de Bergey's, Diagrama de identificación de especies del género <i>Bacillus</i>.....	138
ANEXO 2: Ruta metabólica de Entner Doudoroff empleada por <i>Zymomonas mobilis</i>.....	139
ANEXO 3: Ruta metabólica de la glicólisis empleada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	140
ANEXO 4: Tablas de crecimiento microbiano.....	141
ANEXO 5: Preparación de mezcla sulfocrómica.....	145



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener bioetanol a través de la digestión de residuos celulósicos, tales como el bagazo de caña de azúcar y el bagazo de malta cervecera, mediante el empleo de las cepas *Bacillus subtilis*, y *Aspergillus niger*, y la posterior fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en consorcio.

Se aisló e caracterizó las cepas *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Asimismo se determinó las cinéticas de crecimiento de las cepas, donde se evaluó el crecimiento a diferentes temperaturas. Además se determinó el efecto que tienen sales inductoras sobre la producción enzimática de las cepas *B. subtilis* y *A. niger*, en que se evaluó sulfato de amonio, sulfato de magnesio y bifosfato de potasio a diferentes concentraciones.

En la obtención del extracto enzimático, se determinó como concentración óptima, una medición óptima correspondiente a 53,09 U/mL en el caso de *B. subtilis* en bagazo de malta, mientras que se obtuvo una concentración de 59,01 U/mL en el caso de *A. niger* en el sistema que empleó como sustrato una combinación entre bagazo de malta y bagazo de caña.

Posteriormente al destilar el contenido de los sistemas, se obtuvo un total de 150 mL en el sistema de bagazo de caña, 164 ml de destilado en la mezcla de los sustratos, mientras que en el sistema de bagazo de malta, fue un total de 171 mL de destilado. Por último se determinó la presencia cualitativa del bioetanol obtenido mediante la reacción óxido-reducción del etanol y el dicromato de potasio, donde indicó que, el viraje de color de la solución sulfocrómica de amarillo a verde, representa la presencia de un agente reductor, como lo es el etanol.

Palabras clave: Bagazo, caña de azúcar, malta, digestión, etanol.

ABSTRACT

The aim of this work was obtain bioethanol through digestion of cellulose residues, such as sugar cane bagasse and malt beer bagasse, by using *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* strains, and the subsequent fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* consortium.

It were isolated and identified *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* strains. Likewise, strains' growth kinetics were evaluated at different temperatures. In addition, the effect of inducer salts on enzyme production by *B. subtilis* and *A. niger* was determined, in which ammonium sulfate, magnesium sulfate and potassium hydrogen phosphate at different concentrations were evaluated.

In the obtaining the enzyme extract, it was determined as optimal concentration, optimum measurement corresponding to 53.09 U / mL in the case of *B. subtilis* in malt bagasse, while a concentration of 59.01 U / mL was obtained the case of *A. niger* in the system use as a substrate a combination of malt bagasse and sugar cane bagasse.

Subsequent, to distil the contents of the systems, a total of 150 mL was obtained in the sugar cane bagasse system, 164 ml of distillate in the mixture of substrates, while in the system bagasse malt was a total of 171 mL of distillate. Finally of it determined the qualitative presence of bioethanol obtained by oxidation-reduction of ethanol and potassium dichromate, which indicated that the color change of the chromo solution from yellow to green, represents the presence of a reducing agent reaction, as what is ethanol.

Keywords: Bagasse, sugar cane, malt, digestion, ethanol.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La utilización de combustibles fósiles como materia prima energética mundial, sus costos altos, su agotamiento, los efectos que produce como el calentamiento global y contaminación ambiental y urbana, sumado a la combustión que se produce, se está concientizando y motivando para llevar a cabo las investigaciones necesarias sobre la utilización de fuentes alternativas energéticas, fundamentalmente de las que proceden de la biomasa. En la actualidad encontramos una gama de causas internacionales que demuestran la necesidad de adelantos tecnológicos y la generación de alternativas energéticas distintas a las ya convencionales, dirigidas al uso sostenible de la biomasa, que incluyen a los residuos agrícolas, a manera de energía renovable, dando lugar a los biocombustibles en los cuales destaca el bioetanol.

En la ciudad de Arequipa, diariamente se generan entre 500 - 900T de residuos de origen vegetal, los cuales se encuentran compuestos principalmente por celulosa. En el proceso de elaboración de cerveza, se obtienen varios subproductos de los cuales el de mayor volumen es el bagazo de malta. La misma está compuesta, casi en su totalidad, por los “residuos” de la malta luego de haber obtenido el mosto para elaborar la cerveza y se caracteriza por su alto valor nutritivo debido a su contenido de fibra, proteína y buen valor energético. Por cada 10 litros de cerveza elaborada se obtienen aproximadamente 2 Kg de hez de malta y a nivel nacional unas 700 T diarias. Sin embargo, a pesar de que existe una elevada disponibilidad de este producto, en la actualidad no se está aprovechando de manera apropiada. Este producto es usado en varias partes del mundo para la alimentación de animales como ovejas, caballos, cerdos y pollos.

Así como del bagazo de caña de azúcar que es un residuo inutilizado eficientemente y que diariamente es desechado libremente al ambiente. Siendo estas las razones por las cuales se busca la minorización del consumo de combustibles fósiles, debido al agotamiento inevitable de las reservas por los altos niveles de consumo, y por otro, por la necesidad de reducir las

emisiones de gases contaminantes y de efecto invernadero que afectan el medio ambiente. Para ello una nueva fuente de energía, renovable y limpia que ayuden a reducir el consumo de aquellos y la consiguiente emisión de gases contaminantes es la producción de bioetanol mediante la aplicación de procesos biotecnológicos a estos residuos de nuestra ciudad.

En el presente trabajo se aplica un método de obtención de bioetanol, el cual incluye dos procedimientos, el primero consta de la biodegradación de los residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar y el bagazo de malta, empleando enzimas como catalizadores biológicos de origen fúngico (*Aspergillus niger*) y de origen bacteriano (*Bacillus subtilis*). El segundo procedimiento consta de fermentación alcohólica utilizando un consorcio de cepas fermentadoras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*).

Además la obtención de los catalizadores biológicos fúngicos y bacterianos, que son las enzimas producidas por cepas nativas de la región, y el empleo de materia prima como sustrato, proveniente de residuos agroindustriales locales.

El bioetanol es un componente complementario y alternativo a las gasolinas y petróleo que es producido a través de procesos biotecnológicos a partir de la fermentación de azúcares provenientes de la caña de azúcar y de la malta, respectivamente. Paralelamente la biomasa vegetal como materia prima tiene grandes ventajas sobre estos compuestos, sin embargo, debido a su naturaleza altamente recalcitrante se requieren de enzimas con grandes capacidades degradativas que permitan su uso a niveles industriales.

Por lo tanto se reeducirán los gastos en combustibles, debido a su bajo costo de obtención, al obtener un bioproducto a partir de microorganismos y empleando residuos agroindustriales como sustrato para su obtención. En nuestro país se podría producir a escala industrial el bioetanol a merced de que cuenta con gran cantidad en toneladas de estos desechos propios de nuestra región como son el bagazo de caña de azúcar y el bagazo de malta proveniente este último de la industria cervecera industrial y artesanal, de las cuales serían aprovechadas como fuente de materia prima para la obtención del bioetanol lo que sería una fuente energética barata, renovable y original que impulsaría a un progreso del Perú.

1.1. Hipótesis.

Debido a que los microorganismos que crecen en materia celulósica convierten la celulosa en azúcares simples, es posible que al llevar a cabo una previa digestión enzimática de residuos lignocelulósicos se obtenga una elevada cantidad de azúcares fermentables para una producción optimizada de bioetanol con cepas fermentadoras.

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general

Obtener bioetanol a través de la digestión de residuos celulósicos (bagazo de caña de azúcar y residuos de malta) mediante una comparación entre las cepas *Bacillus subtilis*. y *Aspergillus niger*, y por la fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en consorcio.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Aislar, identificar y caracterizar macroscópica, microscópica y bioquímicamente las cepas *Bacillus subtilis*. *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Zymomonas mobilis*
- Determinar las cinéticas de crecimiento de *B. subtilis*., *A. niger*, *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.
- Obtener el extracto enzimático a partir de *B. subtilis*. y *A. niger*.
- Inmovilizar las enzimas concentradas mediante el método de gelificación inotrópica en alginato de calcio.
- Diseñar y construir un sistema para la digestión enzimática y fermentación alcohólica.
- Obtener el bioetanol a partir de la digestión de los residuos celulósicos de bagazo de caña de azúcar y bagazo de malta y por medio de fermentación alcohólica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.

2.1. La biomasa como materia prima para la obtención de combustibles líquidos.

El problema del medio ambiente, en conjunto con diversos problemas socioeconómicos anexados al uso de materias primas combustibles de fuente mineral, ha fomentado el desenvolvimiento de distintas tecnologías suplentes para la adquisición de energía. En estos últimos años, el primordial problema es el reemplazo de la gasolina y el diesel como comburente líquidos para impulsar la división del transporte. Una alternativa probable destacaría el uso de motores de hidrógeno, pero no es factible a corto plazo. La materia prima exclusiva renovable que podría utilizarse para la adquisición de combustibles líquidos es la biomasa o la llamada materia orgánica.

La bioconversión de la biomasa en combustibles se llevar a cabo por un trayecto químico, enzimático, y a través de procedimientos con híbridos, existiendo la vía química-catalítica la cual se observa que resultados más convenientes a corto plazo. En la Figura 1 se señala las principales rutas químicas de emplear la biomasa para la obtención de combustibles de origen biológico, distinguiendo entre procedimientos de primera y segunda generación.

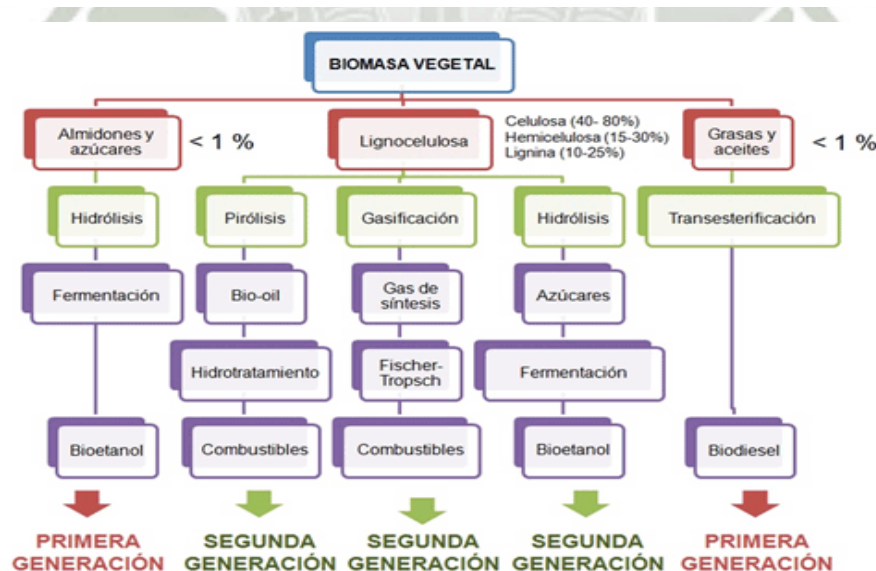


Figura 1. Procesos de aprovechamiento de la biomasa.

Fuente: Chemical Review 106 (2006)¹

2.2. Biocombustibles de primera generación.

Los primeros pasos en el desarrollo de tecnología energética basada en biomasa utilizan como materia prima componentes de fracciones muy concretas como las semillas de vegetales muy específicos. Los principales biocombustibles de la primera generación son el bioetanol y el biodiesel. El bioetanol es producido a partir del azúcar contenido en las plantas o el almidón contenido en las semillas de los cereales.² El biodiesel es producido a partir de aceites vegetales después de su conversión en los correspondientes ácidos grasos y metil ésteres.³ En España, la producción de bioetanol y biodiesel se ha llevado a cabo utilizando principalmente girasol, soja, cebada, maíz o colza.⁴ Según las previsiones europeas, en el año 2010 debería haberse sustituido un 5.75% del diesel mineral por biocombustibles⁵, lo que significaría obtener 129 mil toneladas de biodiesel al año.⁶

Teniendo en cuenta los rendimientos energéticos obtenidos con las tecnologías de primera generación y los rendimientos de producción de los terrenos españoles (equivalente a 25 hL de bioetanol por hectárea de cereal, 65hL de bioetanol por hectárea de remolacha y 1.5 toneladas de biodiesel por hectárea de colza), significaría dedicar un total de 13.200, 2350 y 390 miles de hectáreas de plantación de colza, cereales y remolacha, respectivamente.⁷

En la Tabla 1 se compara el rendimiento energético de las materias primas más extendidas para la obtención de biocarburantes. Actualmente, los esfuerzos en materia de aprovechamiento de biomasa se centran en mejorar la tecnología para conseguir una mayor eficiencia térmica, además de utilizar biomasa de orígenes cada vez más diversos, utilizando plantaciones que requieran poco agua, capaces de desarrollarse en zonas áridas y con pocas necesidades de fertilizantes.¹

Tabla 1. Rendimientos de cultivos para biocombustibles.

RENDIMIENTO DE CULTIVOS ENERGÉTICOS		
Cultivo	Rendimiento (L/ha/año)	Tipo
Caña de azúcar	9000	Bioetanol
Palma	5500	Bioetanol
Remolacha	5000	Bioetanol
Yuca	4500	Bioetanol
Sorgo dulce	4400	Biodisel
Cocotero	4200	Bioetanol
Maíz	3200	Biodisel
Higuerilla	2600	Biodisel
Aguacate	2460	Biodisel
Soja	840	Biodisel

Fuente: “Biomasa. Cultivos energéticos”, 2010.⁸

2.3. Biocombustibles de segunda generación.

La gran parte de las cuestiones e incógnitas de los biocombustibles de primera generación podrían ser solucionados a través de la técnica y ciencia de biocombustibles de segunda generación, los cuales son elaborados a partir de los desechos forestales y agrícolas y además del constituyente lignocelulósico presente en los vegetales, la cual es encontrada en fragmentos de los cereales residuales eliminados en la actualidad. La razón primordial por la que no han sido distribuidos y puestos en disposición aún, y además de sus ventajas latentes, la razón es que se necesita tecnologías que aún no se desarrollan a nivel comercial y también

los costos son notablemente mayores que los de la fabricación de combustibles biológicos de primera generación.

Una de las principales causas de esta dificultad tecnológica es la diferencia en la estructura química entre la biomasa y los combustibles fósiles: los combustibles son compuestos hidrofóbicos, mientras que la biomasa lignocelulósica es de naturaleza hidrofílica y muy rica en oxígeno.

La presencia del oxígeno causa grandes problemas en las refinerías actuales: disminuye el poder calorífico, provoca mayor corrosión y, da lugar a un combustible que no se podría mezclar con el de origen mineral. Por tanto, es necesario aumentar el índice H/C y eliminar el oxígeno, tal y como se muestra en la Figura 2.

Para ello es preciso optimizar los catalizadores necesarios para cada una de las etapas del proceso de fabricación⁹.

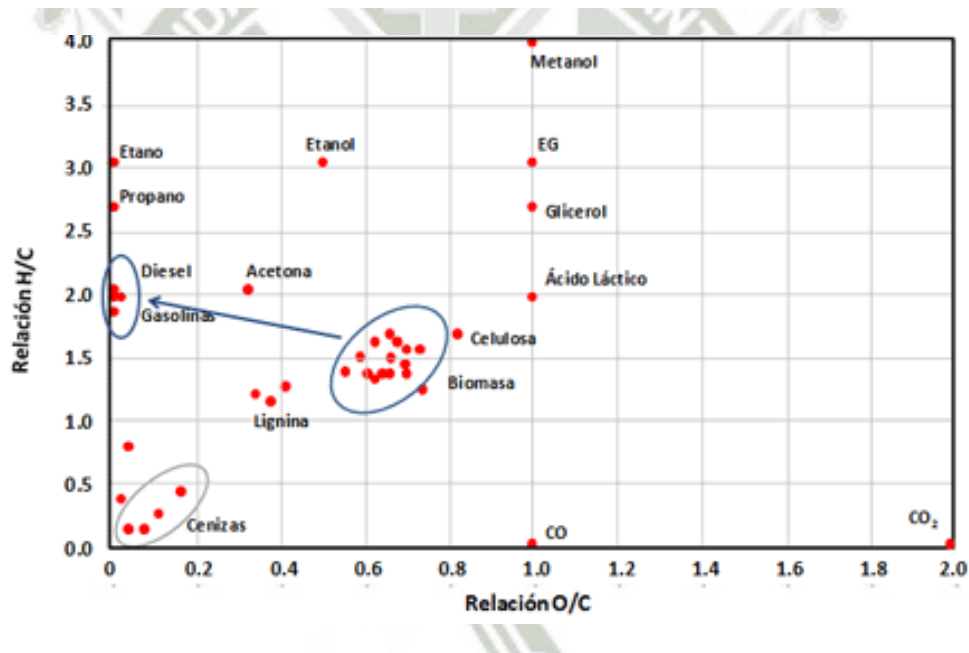


Figura 2. Diagrama VanKrevelen de composición de materias primas y productos finales.

Fuente: Topics in Catalysis, Springer 2009.⁹

2.4. Caña de azúcar.

La caña de azúcar, cuyo nombre científico es *Saccharum officinarum*, también conocida como caña miel, caña dulce (en español); sugar cane, noble cane, white salt (en inglés). Es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden crecer entre 3 y 5 metros de altura. Éstos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para la obtención de azúcar. La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales ¹⁰

Tabla 2. Clasificación científica de la caña de azúcar.

Clasificación científica	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>S. officinarum</i>

Fuente: EcuRed. Index Caña de azúcar , 2015.¹⁰



Figura 3. Caña de azúcar.

Fuente: Caña de azúcar alternativa viable para alimentación ganadera.¹¹

Son plantas cespitosas con tallos de hasta 5 ó 6 m x 2-5 cm, con numerosos entrenudos alargados vegetativamente, dulces y jugosos y duros, desnudo abajo. Vainas glabras o pelosas; ligula de 2-4 mm; láminas 1-2 m x 2-6 cm, glabras o la costilla media pelosa. Panícula 25-50 cm; pedúnculo glabro o densamente puberulento; eje glabro o peloso; entrenudos delraquis de 5 mm, glabros.

Espiguillas 3-4 mm, agudas, con tricomas de hasta 7 mm; gluma inferior glabra; lema inferior ciliada in el 1/2 superior; lema superior y arista generalmente ausentes; anteras 3, 1.5-2 mm¹².

La caña de azúcar es una planta proveniente del sureste asiático. La expansión musulmana supuso la introducción de la planta en territorios donde hasta entonces no se cultivaba. Así llegó al continente europeo, más en concreto a la zona costera entre las ciudades de Málaga y Motril, siendo esta franja la única zona de Europa donde arraigó. Posteriormente los españoles llevaron la planta, primero a las islas Canarias, y luego a América. Se dice que la primera que se llevó a América fue por Pedro de Atienza, en el segundo viaje de Colón a la Isla Española. Así, este cultivo se desarrolló en países como El Salvador, Cuba, Guatemala, Brasil, México, Argentina, Perú, Ecuador, República Dominicana, Colombia y Venezuela, que se encuentran entre los mayores productores de azúcar del mundo¹³. El jugo de su tallo es la principal fuente de azúcar. Después de cosechar la caña, pasa bajo unas cuchillas desmenuzadoras, para luego pasar al trapiche. Este jugo es depurando por una serie de filtros; a continuación, se somete a un tratamiento clarificante y de ahí se coloca en depósitos de cocción al vacío, donde se concentra el jugo; por último, se cristaliza el azúcar del jugo¹³.

2.4.1.1. Morfología de la planta:

2.4.1.1.1. Raíz.

La función principal del sistema radical es la de absorber agua y sales minerales, proporcional anclaje y almacenar materiales de reserva. La raíz primaria está ubicada en el embrión. Las raíces que se originan en el tallo, en la banda de raíces, son adventicias. Ese tipo de raíces,

que se forman en el tallo de la caña de azúcar, en otras plantas pueden originarse a partir de la hoja. Las raíces son de dos tipos: las primordiales y las permanentes¹⁴.

2.4.1.1.2. Tallo.

La caña de azúcar desarrolla dos tipos de tallos: el subterráneo, denominado rizoma, tallo hipogeo o falso tallo, que es del tipo definido o determinado. Y el tallo aéreo, que es el que se aprovecha para la extracción del azúcar

El tallo de la caña se desarrolla a partir de las yemas de otro tallo que haya sido colocado en condiciones favorables, mediante la propagación asexual o vegetativa usual. Esta se realiza por medio de los trozos de tallo (estacas, esquejes o propágulos) que contienen una o más yemas cada uno. Estas yemas pueden desarrollarse y dar paso a la formación de un tallo, que se denomina tallo primario; éste, a su vez continuando el proceso iniciado en él, movilizará las yemas de su porción basal, lo que provocará la formación de otros tallos, los llamados tallos secundarios. Este proceso se repetirá de forma interrumpida hasta que las condiciones del medio lo impidan. El factor que mayor incidencia tiene en ese proceso es la luz solar.

En el tallo aéreo encontramos tres zonas bien diferenciadas: la base, el tallo propiamente dicho, la zona apical o macolla¹⁵.

Las variedades de caña de azúcar presentan en sus tallos una gran diversidad de colores y combinaciones de estos.

El color de un tallo depende en gran medida de las condiciones en las cuales se desarrolla, ya que el color propio puede ser modificado por el ambiente, en el que la luz solar tiene un inapreciable lugar. La altitud y el clima, en general, son factores que pueden hacer cambiar el color de una variedad.

La gama de colores que presentan los tallos de la caña se debe a dos pigmentos básicos y a sus combinaciones y mezclas: el color rojo y sus diversos matices se deben al pigmento antocianina, contenido en las células epidérmicas del tallo, mientras que el color verde es provocado por la clorofila, contenida en los tejidos más profundos de aquel. De ambos pigmentos, el que mayor variación presenta en su contenido es la antocianina.

La combinación de los dos y la proporción en que ambos se encuentran, dan como resultado la amplia gama de tintes que caracterizan a la caña de azúcar

Los entrenudos del tallo de la caña de azúcar presentan diferentes formas, y entre ellas las más sobresalientes y conocidas son: cilíndrico, tumescente, abobinado, conoidal, obconoidal, curvado. En la zona final del tallo hay una yema apical que a simple vista no puede observarse, ya que se encuentra protegida por la macolla o cogollo de la caña. Esta sección del tallo es blanda y se encuentra formada por canutos en proceso de alargamiento o en una fase aún más primaria, la conocida como estado de diferenciación; por eso, esta parte del tallo, tiene una consistencia tierna, están ocultos por la vaina de hojas que los envuelve y se hallan muy apiñados ¹⁵.

2.4.1.1.3. Hoja.

La hoja de la caña de azúcar está formada por dos partes: la vaina y el limbo, separadas por la articulación de unión del limbo. El limbo o lámina, como su nombre indica, cubre completamente el tallo, extendiéndose casi por todo el entrenudo. Las hojas generalmente están dispuestas en forma alternada a lo largo de los nudos, formando así dos flancos en lados opuestos ¹⁶. En su parte superior una planta madura de caña de azúcar tiene una superficie foliar cercana a 0.5 m² y el número de hojas verdes por tallo es alrededor de 10, dependiendo de la variedad y de las condiciones de cultivo. En la unión del limbo se encuentran dos áreas triangulares llamadas ócreas o trozos ligulares. Las hojas son enumeradas según el sistema de Kuijper, definido por Casagrande (1991) ¹⁶.

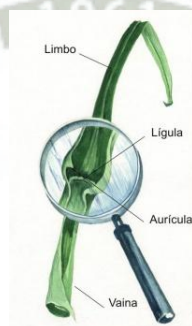


Figura 4. Forma de la hoja de la caña de azúcar.

Fuente: EcuRed. Caña de azúcar, Hoja. 2015. ¹⁵

2.4.1.1.4. Flor y su inflorescencia.

Forma espiguillas florales pequeñas agrupadas en Panículas o Panojas y rodeadas por largas fibras sedosas. En Cuba se le nombra Güín.

2.4.1.1.5. Fruto.

El fruto es en Cariopsis con semillas tan pequeñas que durante mucho tiempo se creyó que no las producía.

2.4.1.2. Constituyentes de la caña.

El tronco de la caña de azúcar está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa. En ambas partes también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas. Las proporciones de los componentes varían de acuerdo con la variedad (familia) de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, etc. Sin embargo, unos valores de referencia general pueden ser:

Tabla 3. Valores de referencia general de los componentes de la caña.

Agua	73 - 76 %
Sacarosa	8 - 15 %
Fibra	11 - 16 %

Fuente: Web de Felipe Perafán. Azúcar de caña. 2009.¹⁷

La sacarosa del jugo es cristalizada en el proceso como azúcar y la fibra constituye el bagazo una vez molida la caña.

Tabla 4. Otros constituyentes de la caña presentes en el jugo.

Glucosa	0,2 - 0,6 %
Fructosa	0,2 - 0,6 %
Sales	0,3 - 0,8 %
ácidos orgánicos	0,1 - 0,8 %
Otros	0,3 - 0,8 %

Fuente: Web de Felipe Perafán. Azúcar de caña. 2009.¹⁷

Las hojas de la caña nacen en los entrenudos del tronco. A medida que crece la caña las hojas más bajas se secan, caen y son reemplazadas por las que aparecen en los entrenudos superiores. También nacen en los entrenudos las yemas que bajo ciertas condiciones pueden llegar a dar lugar al nacimiento de otra planta ¹⁷.

2.4.1.3. Principales Aspectos de la Cadena Agro productiva de la Caña de azúcar.

La industria productiva de la caña de azúcar así como la azucarera nacional ha venido experimentando diversas etapas de crecimiento y contracción, por diversos factores: climáticos, productivos y en algunos casos modificaciones de la normatividad del sector básicamente en la tenencia de la propiedad para el caso de las empresas azucareras. Todo esto ha afectado de mayor o menor grado la producción de caña y por consiguiente la producción de azúcar en el Perú.

El sector azucarero en el Perú, tiene una gran incidencia económica y social en los valles y pueblos de la costa que dependen casi exclusivamente de la producción azucarera. El Perú ha sido históricamente uno de los principales productores y exportadores de azúcar a nivel mundial, con la reforma agraria hubo cambios sustanciales en la tenencia de las tierras trayendo consigo malas administraciones y como resultado el Perú se convirtió en importador de azúcar. A diciembre del año 2012, la producción de azúcar aportó al PBI agroindustrial con el 19.1%, unos 1,422.2 millones de nuevos soles, teniendo un crecimiento del 3.24% con respecto al mismo periodo del año 2011. La caña de azúcar considerada uno de los principales cultivos agroindustriales en el Perú, genera un aporte importante al valor bruto de la producción agropecuaria y en especial en el subsector agrícola. Es por esto que a diciembre del año 2012 el VBP agropecuaria señala un monto de 22,226 millones de nuevos soles, el subsector agrícola con 13,070 millones de nuevos y la caña de azúcar aportó aproximadamente 704.3 millones de nuevos soles, con un crecimiento del 4.9% con respecto al año 2011. El sector azucarero en el Perú, tiene una gran incidencia económica y social en los valles y pueblos de la costa que dependen casi exclusivamente de la producción azucarera. El Perú ha sido históricamente uno de los principales productores y exportadores de azúcar a nivel mundial, con la reforma agraria hubo cambios sustanciales en la tenencia de las tierras trayendo consigo malas administraciones y como resultado el Perú se convirtió en importador

de azúcar. A diciembre del año 2012, la producción de azúcar aportó al PBI agroindustrial con el 19.1%, unos 1,422.2 millones de nuevos soles, teniendo un crecimiento del 3.24% con respecto al mismo periodo del año 2011 ¹⁸.

2.4.1.4. Producción de caña de azúcar en el Perú:

Tabla 5. Empresas Azucareras en el Perú.

	NOMBRE ACTUAL DE LA EMPRESA	UBICACIÓN	NIVEL DE AVANCE DEL PROCESO DE SANEAMIENTO
Andahuasi	Empresa Agraria Azucarera Andahuasi	Lima (Huacho)	Transformada en <u>Sociedad</u> Anónima, con directorio elegido
Cartavio	Empresa Agroindustrial Cartavio S.A.	La <u>Libertad</u> (Ascope)	Ejecutada, 51% de acciones transferidas por <u>venta</u> directa al Consorcio AZUCAGRO.
Casa Grande	Empresa Agroindustrial Casagrande S.A.	La Libertad (Aiscope y Paiján)	Próxima subasta publica Internacional para transferir más del 51% de acciones a un socio estratégico.
Cayalti	Empresa Agroindustrial Cayalti S.A.	Lambayeque (Chiclayo)	Próxima subasta pública Internacional para transferir mas del 51% a un socio estratégico
Chucarapi	Central Azucarera Chucarapi y Pampa Blanca	Arequipa (Islay)	Ejecutado, 51% de acciones transferidas por venta directa al <u>Grupo</u> G. Michel.
El Ingenio	Empresa Agraria Azucarera El Ingenio S.A.	Lima (Huacho)	Ejecutada, acciones transferidas por venta directa al Grupo MUR - WONG

Laredo	Empresa Agroindustrial Laredo S.A.	La Libertad (Trujillo)	Ejecutado, mas del 51% de acciones transferidos por venta directa al Grupo Manuelita.
Paramonga	Empresa Agraria Azucarera Paramonga S.A.	Lima (Barranca)	Ejecutada, acciones transferidas por venta directa al Grupo MUR - WONG.
Paramonga	Empresa Agraria Azucarera Paramonga S.A.	Lima (Barranca)	Ejecutada, acciones transferidas por venta directa al Grupo MUR - WONG.
Pomalca	Empresa Agroindustrial Pomalca S.A.	Lambayeque (Chiclayo y <u>Lambayeque</u>)	Próxima subasta publica internacional para transferir mas del 51% a un socio estratégico.
Pucala	Empresa Agroindustrial Pucala S.A.	Lambayeque (Chiclayo)	Ejecutada, 51% de acciones transferidas por venta directa al Grupo Izaga Paramonga.
San Jacinto	Empresa Agraria Azucarera San Jacinto S.A.	Ancash (Santa)	Ejecutada y transferida por venta directa al Grupo Picaso.
Tumán	Empresa Agroindustrial Tumán S.A.	Lambayeque (Chiclayo)	Próxima oferta publica de venta para transferir mas del 51% a un socio extranjero.

Fuente: Compendio estadístico agrario OIA- MINAG. Lima – Perú Abril del 2007 ¹⁹.

2.4.1.5. Producción de caña de azúcar en Arequipa.

En Arequipa la industria representativa de producción de azúcar es la Central Azucarera Chucarapi Pampa Blanca S.A., que está ubicada en la región Sur del Perú, valle de Tambo, Provincia de Islay, departamento de Arequipa; dedicada a la Industria Agrícola. Su principal actividad es el cultivo, procesamiento y la distribución de caña de azúcar, así como la venta

de confitería y otros derivados. Azucarera Chucarapi, fue fundada en 1993, se listó en la Bolsa de Valores de Lima en Julio de 1996 ²⁰.

Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática dio a conocer que, en el quinto mes del año 2015, la producción de caña de azúcar fue de 924 mil 512 toneladas, cantidad que representó un incremento de 35,0%, en comparación a lo registrado en similar mes del año 2014 que totalizó 684 mil 752 toneladas.

De acuerdo con el Informe Técnico Perú: Panorama Económico Departamental, mayo 2015, este resultado se sustentó en las mayores áreas cosechadas y mejores rendimientos obtenidos de este cultivo.

Los departamentos que presentaron resultados favorables fueron Lambayeque (63,3%), La Libertad (44,6%), Arequipa (31,7%) y Áncash (12,1%). Sin embargo, disminuyó en el departamento de Lima (8,7%) ²¹.

2.5. Bagazo de caña de azúcar.

El Bagazo de caña se produce como consecuencia de la fabricación de azúcar y constituye un subproducto de esta producción. Es un material fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que presenta relativamente baja densidad y un alto contenido de humedad, en las condiciones en que se obtiene del proceso de molienda de la caña ²².



Figura 5. Bagazo de caña de azúcar.

Fuente: 3M Ciencia aplicada a la vida, Bagazo de caña, 2014 ²³.

En estado fresco estos bagazos contienen un 40% de agua. Suelen utilizarse como combustible de las propias azucareras. También se utilizan en la industria del papel y fibras, por la celulosa que contienen ²⁴.

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

El bagazo de caña de azúcar como todos los materiales lignocelulósicos es rico en fibra; sin embargo, debido a su compleja estructura son de difícil digestibilidad en caso de su utilización como alimento para animales rumiantes, por lo que es necesario someterlos a tratamientos que conduzcan a la disminución o eliminación de las barreras físicas y químicas, tales como la cristalinidad de la celulosa, los grupos acetilos de la hemicelulosa y los enlaces entre la hemicelulosa y la lignina.

Los tratamientos aumentarían la accesibilidad de las enzimas durante la hidrólisis permitiendo la conversión de la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables ²⁵.

La Celulosa y la lignina son los polímeros naturales más abundantes de la tierra y ellos requieren de la mayor atención de nuestro trabajo científico por sus enormes potencialidades para suministrar de forma combinada productos fibrosos y/o excelentes productos químicos y farmacéuticos en bienestar del hombre y su entorno. La celulosa es similar en todas las plantas.

La estructura de la lignina en el caso del bagazo difiere sustancialmente de la presente en las maderas, conformada por unidades fenólicas donde los principales anillos son del tipo p-hidroxicinámico y en menor proporción unidades siringílicas y guaiacílicas, su composición se relaciona más con las ligninas de las plantas anuales, y en ese sentido sus hemicelulosas son del tipo xilano todo lo cual será importante para referirnos a potencialidades y usos. La disponibilidad de bagazo actualmente se estima en algo más de 200 millones de ton (50% humedad) y su uso más generalizado es como combustible en el propio central azucarero y más recientemente se utiliza de forma creciente para la cogeneración de energía. La operación eficiente y con buenas prácticas del central azucarero permite a su vez en

determinadas condiciones generar hasta un 30% de bagazo sobrante del cual se puede disponer para numerosas aplicaciones industriales de gran valor agregado. La mayor disponibilidad corresponde a Asia (40%) seguidos por Sur América (22,9%) y Centro América (18%).

En general se acepta que actualmente solo el 16% del bagazo está industrializado y sus usos han ido evolucionando y las industrias que fueron las mayores consumidoras del bagazo industrializado hoy no experimentan significativos crecimientos pasando por un complejo período de remodelación más que de crecimiento mientras otras, resultado del constante progreso tecnológico comienzan a hacerse sentir, integrándola a los productos biotecnológicos, la salud y la alimentación entre otros ²⁶.

2.5.1. Composición.

Cuando el bagazo sale del molino posee aproximadamente la siguiente composición: Humedad (50%), sólidos solubles (5%), sólidos insolubles o fibra cruda (45%).

Además su composición química es la siguiente: Carbono: 47 %, hidrógeno: 6,5 %, oxígeno: 44 %, cenizas: 2,5 %.

2.5.2. Constitución.

Tabla 6. Componentes químicos del bagazo.

	Bagazo integral %	fracción fibra %	fracción medula
Celulosa	46.6	47.7	41.2
Pentosanos	25.2	25	26
Lignina (klason)	20.7	19.5	21.7

Fuente: EcuRed. Constitución del bagazo de caña de azúcar., 2015 ²⁷.

Tabla 7. Componentes químicos del bagazo.

Componentes	Bagazo seco %	Bagazo entero %	Fibra de bagazo	Medula de bagazo %
Celulosa	40	46	56.6	55.4
Gomas	24.4	29.3	26.11	29.3
Proteínas	1.8	-	-	-
Azúcares	-	-	-	-
Sacarosa	14	-	-	-
Glucosa	1.4	-	-	-
Ácidos	0.4	-	-	-
Grasas y ceras	0.6	3.45	2.25	3.55
Cenizas	2.4	20.4	1.3	3.02
Lignina	15	19.95	19.15	22.3

Fuente: EcuRed. Composición del bagazo de caña de azúcar, 2015 ²⁸.

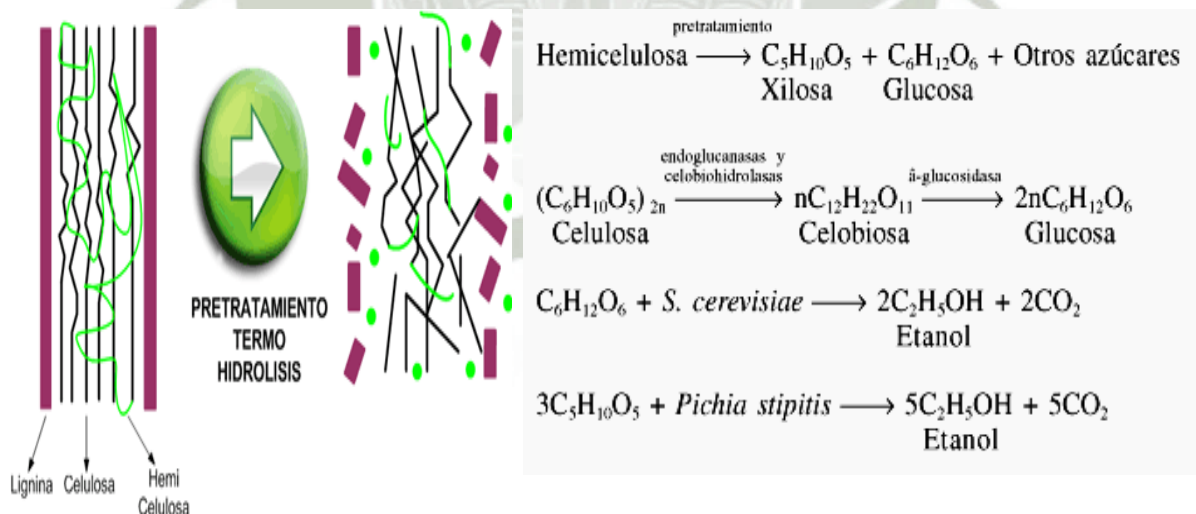


Figura 6. Polímeros del bagazo de caña de azúcar

Fuente: El bagazo de la caña de azúcar. Shaila Guadalupe Hernández García²⁷.

2.5.3. Estructura

El bagazo consta de dos partes fundamentales:

- **La fibra:** Fibras relativamente largas, derivadas principalmente de la corteza y otros haces de fibra del interior del tallo.
- **El meollo:** Se deriva del *parénquima*, parte de la planta donde se almacena el jugo que contiene el azúcar.

La longitud media de las fibras del bagazo es de 1 a 4 milímetros y su ancho varía entre 0.01 y 0.04 milímetros ²⁷.

2.5.4. Componentes principales del bagazo de caña.

Un material de interés en las paredes celulares de la planta de la madera, es el material ligninocelulósico, el cual está formado por celulosas y hemicelulosas enlazadas mediante lignina, un polímero aromático altamente oxigenado, con un esqueleto de fenilpropano que se repite. Sobre esta matriz se deposita una mezcla de compuestos de bajo peso molecular llamados extractivos.

- a) Celulosa. Es el componente más simple encontrado en el material ligninocelulósico de las plantas, es el más abundante en la biosfera. Está compuesto por un polímero de residuos de D-glucosa unidos por enlaces 4,1- β . Cada resto presenta una rotación de 180° respecto a los restos contiguos, estabilizada por puentes de hidrogeno intramoleculares. Debido a su estructura, las cadenas de celulosa se unen por puentes de hidrogeno intermoleculares formando agregados (microfibrillas). La celulosa y el almidón pueden ser hidrolizados para formar glucosa, pero sus estructuras son muy diferentes. La celulosa es una molécula que da estructura y soporte a la planta. Las cadenas de glucosa están arregladas de una manera que permite que se empaquen juntas formando un cristal que es impermeable al agua. Consecuentemente el polímero celulosa es insoluble y resistente a la hidrólisis ²⁹.

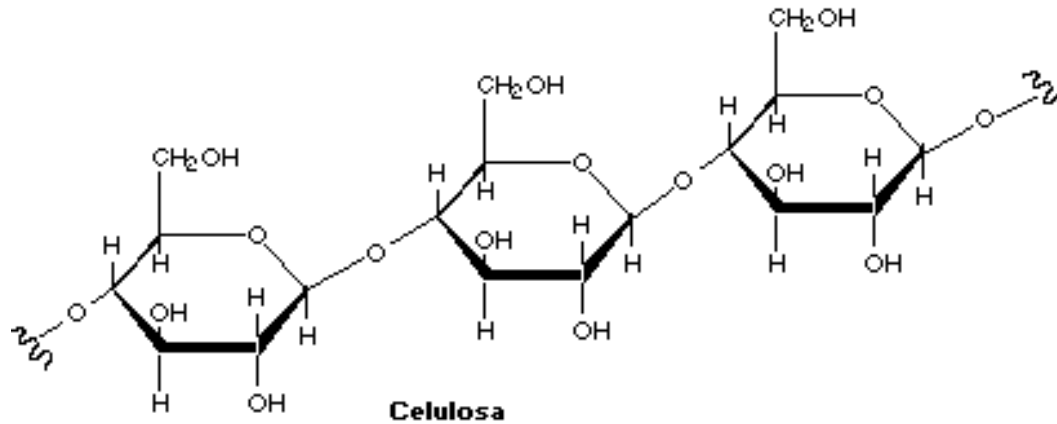


Figura 7. Estructura química de la celulosa.

Fuente: Azúcares. Biología.edu.ar ²⁹

- b) Hemicelulosa: Forman cadenas cortas y son polímeros heterogéneos que contienen tanto hexosas (azúcares de 6 carbonos como glucosa, manosa y galactosa) como pentosas (azúcares de 5 carbonos como xilosa y arabinosa). Dependiendo de la especie de la planta, estos azúcares se asocian con ácidos urónicos formando estructuras poliméricas diversas, que pueden estar relacionados cercanamente tanto con celulosa como lignina. Los tres polímeros principales son los xilanos, los mananos y los arabinogalactanos.

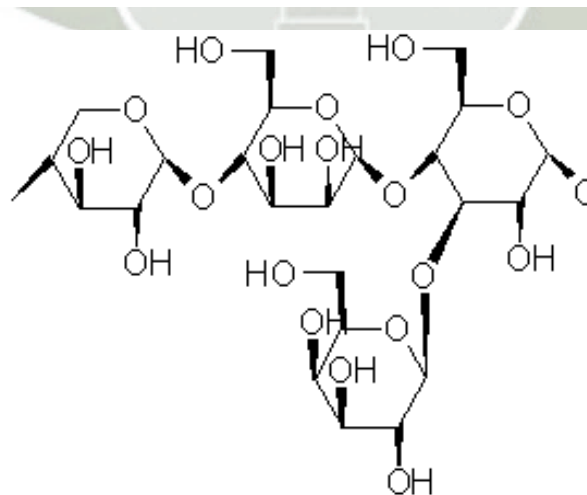


Figura 8. Estructura de la Hemicelulosa.

Fuente: ISIS, 2016 ³⁰

- c) Lignina. La lignina es un polímero complejo, tridimensional, globular, irregular, insoluble y de alto pesomolecular (>10,000), formado por unidades de fenilpropano cuyos enlaces son relativamente fáciles de hidrolizar por vía química o enzimática. Ésta molécula tiene diferentes tipos de uniones entre unidades aromáticas de fenilpropano.

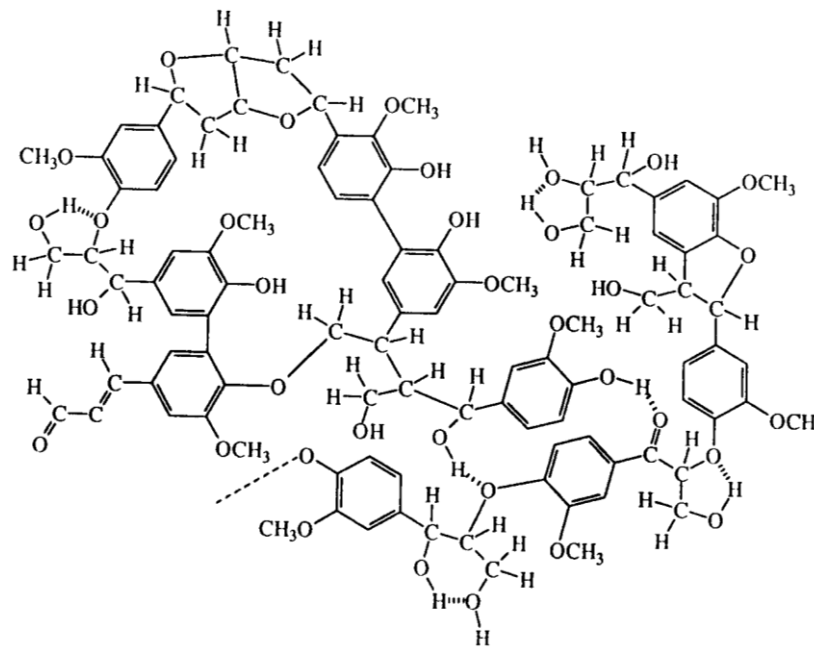


Figura 9. Estructura de la Lignina.

Fuente: ISIS, 2016 ³¹

En las plantas, la lignina se encuentra químicamente unida a la hemicelulosa y rodeado a las fibras compuestas por celulosa. Es responsable de la rigidez de las plantas y des sus mecanismos de resistencia al estrés y a ataques microbianos.

Es especialmente abundante (20- 30% de la pared) en células conductoras (vasos xilemáticos) y estructuras (fibras) con engrosamiento secundario. En cuanto a su biosíntesis, se sabe que los precursores de la lignina se forman por conducto de la ruta correspondiente al ácido shiquimico. Éste ácido, formado por unión del ácido fosfoenol pirúvico y eritrosa-4-fosfato, se convierte en el principal escalón de la biosíntesis de los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina, que están formados por aminación reductiva.

Las enzimas desaminantes convierten a continuación los dos aminoácidos en sus respectivas contrapartes del ácido shinámico. La hidroxilación en etapas por hidroxilasa, y en su momento la metilación por o-metiltransferasas, transforma los ácidos shinámicos en los tres ácidos para hidroxí-shinámicos conocidos como precursores de la lignina. Por el productor de pulpa y de papel, la lignina es un componente de la madera que ocasiona de los problemas que surgen durante la producción de la pulpa. De no ser por la lignina no resultaría necesario aplicar reactivos fuertes alcalinos o ácidos para la deslignificación química de la madera a fin de obtener pulpa y productos de papel. La deslignificación es la meta más importante en la producción de papel.

- d) Extractivos: Los extractivos son aquellas sustancias que se encuentran presentes en las diferentes fibras vegetales, pero que no son carbohidratos, tales como ácidos grasos, terpenos, fenoles y resinas. Muchos de estos compuestos son solubles en agua o disolventes orgánicos polares como el metanol, etanol o acetona, por lo que se eliminan rápidamente en los procesos extracción de celulosa³².

2.5.5. Propiedades físicas y químicas del bagazo.

El bagazo de caña de azúcar completo está integrado por tres componentes principales:

- El recubrimiento, en el que se incluye la epidermis, la corteza y el periciclo.
- Los mazos de fibra vascular, entre los que figuran las células conductoras de pared delgada asociadas con fibras de pared relativamente con estrecho lumen.
- El tejido básico (parénquima) o medula, con mazos de fibra distribuidos irregularmente.

33

Tabla 8. Propiedades químicas de las fracciones del bagazo.

	Entero	Fibra	Medula
Solubilidad en éter (%)	0.25	0.12	2.5
Solubilidad en alcohol-benceno (%)	4.1	1.8	2.8
Solubilidad en agua caliente (%)	2.5	0.9	1.9
Lignina (%)	20.2	20.8	20.2
Pentosas (%)	26.7	27.9	28.4
Hemicelulosa (%)	76.6	77.8	77.7
Alfa celulosa (%)	38.1	42.4	34.8
Ceniza (%)	1.67	0.7	2.29

Fuente: Allan, G.G, 1978 ³⁴.

2.5.6. Caracterización física del bagazo de caña de azúcar.

Considerando el azúcar como el principal producto de una fábrica de azúcar de caña se puede decir que esta industria genera otros subproductos, los cuales no son menos importantes. Algunos de ellos se originan durante la cosecha, como el cogollo y la paja y otros se obtienen en el proceso industrial, entre los cuales se encuentran principalmente el bagazo, las mieles finales y la cachaza. Entre ellos, el de mayor volumen y que tiene un uso inmediato en la propia fábrica es el bagazo, el cual puede alcanzar entre un 26 % a un 29 % del peso de la caña molida. Este bagazo está constituido por agua, sólidos en partículas y cantidades más pequeñas de sólidos solubles. Los valores más representativos son los siguientes: Humedad: 46-52 %; sólidos en partículas: 40-46 %; y sólidos solubles: 6-8 %.

Por otro lado, los sólidos en partículas están formados por dos tipos de estructuras bien diferenciadas: las fibras y la medula o meollo. Las fibras están formadas por células

cilíndricas y tejidos vasculares de paredes duras, las cuales se encuentran en la corteza y en la parte interior. Por su parte el meollo está formado por células parenquimatosas de forma irregular y de paredes finas con poca fuerza estructural, que se encuentran en la zona central de la caña y son de carácter esponjoso pudiendo absorber hasta 20 veces su propio peso en agua. La parte fibrosa es muy apropiada para la obtención de pulpa para la fabricación de papel y la producción de elementos aglomerados en forma de tableros, sin embargo suele venir acompañada de una parte de la médula que es preciso separar en equipos conocidos como desmeduladores. Los sólidos particulados también están acompañados de algunas cantidades de elementos finos y otros elementos extraños o suciedades que acompañan a la caña durante la cosecha y el transporte a la industria. Las proporciones de estos componentes son: fibra: 60 - 65%; medula: 18 - 20 %; finos e suciedades: 10 - 12%.

La distribución granulométrica del bagazo integral es muy variada, desde un fino polvo hasta partículas irregulares de gran tamaño, siendo reportado que hasta un 8 % de partículas grandes retenidas e la malla No. 1, y de 10 a 25 % de partículas pequeñas pasando por la malla No. 1.

Se aprecia que el bagazo no constituye un material homogéneo y su peso volumétrico o densidad aparente es muy baja, reportándose valores entre 50 kg/m^3 hasta 96 kg/m^3 en base seca y condiciones naturales, es decir, sin ningún grado de compactación.

En resumen, se puede afirmar que desde el punto de vista físico se distinguen dos características muy importantes en el bagazo: el alto contenido de humedad y la gran variedad de tamaños de partículas de diferente naturaleza física. Por lo tanto se requiere de una adecuada preparación y manipulación del mismo si se quiere hacer un uso adecuado y eficiente en las múltiples aplicaciones que tiene, tanto para su uso industrial como materia prima, así como también para su empleo como recurso energético en general ³⁵.

2.5.7. Utilización del bagazo como materia prima:

En la actualidad, dada la potencialidad de la industria azucarera, las plantas de azúcar y derivados se están convirtiendo en productores de energía, es decir, la energía pasa a ser un producto principal y deja de contemplarse como un subproducto. La filosofía energética de la industria azucarera y de los derivados ha cambiado, debido al alza de los precios del petróleo, la necesidad de buscar fuentes alternativas de energía, limpias además, para evitar o disminuir la emisión de gases de efecto invernadero. Por esta razón, la mayoría de los ingenios azucareros actuales presentan esquemas más eficientes de cogeneración, con mayores presiones, mayores eficiencias y con aporte de electricidad a la red. La producción de energía ha pasado a ser uno de los principales productos del ingenio azucarero, y los esquemas se caracterizan por [Costa, 2008]:

- La eficiencia es un objetivo fundamental en todo el ingenio azucarero. En algunos países se utiliza la paja y la punta de la caña como combustibles adicionales al bagazo. Se utilizan equipos de alto comportamiento rendimiento y eficiencia ³⁶.

En los nuevos ingenios azucareros, o en aquellos que se remodelan sobre todo desde el punto de vista energético, se tienen en consideración para el diseño de la planta de cogeneración los siguientes factores:

- Utilización del bagazo sólo, o bagazo más paja de la caña como combustible.
- Reducción de consumos internos de vapor de proceso en todo el ingenio azucarero.
- Usos de nuevas tecnologías. La tendencia actual es la de aumentar la eficiencia de todos los equipos que intervienen en la producción y utilización de la energía, fundamentalmente la caldera y los turbogeneradores ³⁶.

2.6. La cebada.

La cebada es una planta gramínea, de espigas formadas por espiguillas uniformes y grano aguzado en los extremos (*Hordeum vulgare*); nombre común de las especies de cereal de un género de gramináceas originarios de Asia y Etiopía; es una de las plantas agrícolas más

antiguas. En la actualidad ocupa el cuarto lugar en volumen de producción de cereales, después del trigo, el arroz y el maíz.

2.6.1. Composición de la cebada:

Al igual que otros cereales, la cebada, contiene una elevada proporción de carbohidratos, especialmente almidones y celulosa (del tejido de sostén principalmente), dándole aproximadamente un 67% y proteínas 12,8%, pertenecientes a las precursoras de las enzimas que se formarán durante la germinación; los porcentajes restantes corresponden a vitaminas y minerales que pueden encontrarse en diferentes proporciones dependiendo de las condiciones de cultivo. La composición del grano de cebada puede variar incluso para la misma cosecha dependiendo de la iluminación del terreno y otras variables del cultivo. Es muy rica en proteínas y carbohidratos, aunque pobre en lisina, contiene gran cantidad de fósforo y hierro y además es una importante fuente de vitaminas del complejo B ³⁷.

Tabla 9. Composición aproximada de un gramo de cebada.

Proteínas	10 gramos
Materia grasa	1.8 gramos
Hidratos de carbono	66.5 gramos
Celulosa	5.2 gramos
Materias minerales	2.6 gramos
Agua	14 gramos

Fuente: *Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos* ³⁸.

2.6.2. Tipos de cebada:

Las variedades cultivadas de cebada pertenecen a tres tipos distintos: de dos carreras o dísticas, de seis carreras o hexásticas, e irregulares. En Estados Unidos suelen cultivarse las hexásticas, mientras que en Europa predominan las dísticas; la variedad irregular se cultiva en Etiopía. Hay variedades excelentes para malteado, tanto de dos como de seis carreras, la

cebada pertenece al género *Hordeum*, de la familia de las *Gramineae*. La cebada de dos carreras corresponde a la especie *Hordeum distichon*, la de seis carreras a la especie *Hordeum vulgare*, y la cebada irregular a la especie *Hordeum irregulare*.

2.6.3. Utilidades de la cebada:

Las diferentes partes de la cebada pueden aplicarse en distintas utilidades, así el grano, la paja, el heno y varios subproductos de la cebada tienen un gran valor nutritivo, por lo que en algunos países se utiliza para la producción de alimento balanceado y en combinación con otros cereales como el centeno se lo utiliza en la elaboración de harinas y alimentos integrales.

La aplicación más grande y famosa del grano de cebada es en la elaboración de bebidas a base de malta como la Cerveza.

2.6.4. Características de la cebada para maltear:

Generalmente la cebada que entra en el proceso de malteado acostumbra a ser la de dos carreras, por su relación harina/cascarillas. Además los granos de esta deben tener características de la cerveza de un lote a otro. La cervecera acostumbra a ser la de dos, por su relación harina/cascarillas.³⁹

La parte fundamental del grano de cebada es el embrión que, bajo condiciones favorables de temperatura y de humedad, germina formando raíces y tallo. El endospermo ocupa la mayor parte del grano y constituye la reserva alimenticia de la planta (almidón), la cual será posteriormente la fuente de azúcares del mosto de cerveza. Sin embargo, la levadura no puede metabolizar este almidón, ya que posee una estructura formada por cadenas complejas de azúcares. Por este motivo debe ocurrir una transformación previa del almidón a azúcares sencillos (glucosa, maltosa y maltotriosa), tal proceso se realiza en el macerado del grano, que consiste en poner la malta en remojo a cierta temperatura para favorecer la acción de diferentes enzimas.⁴⁰

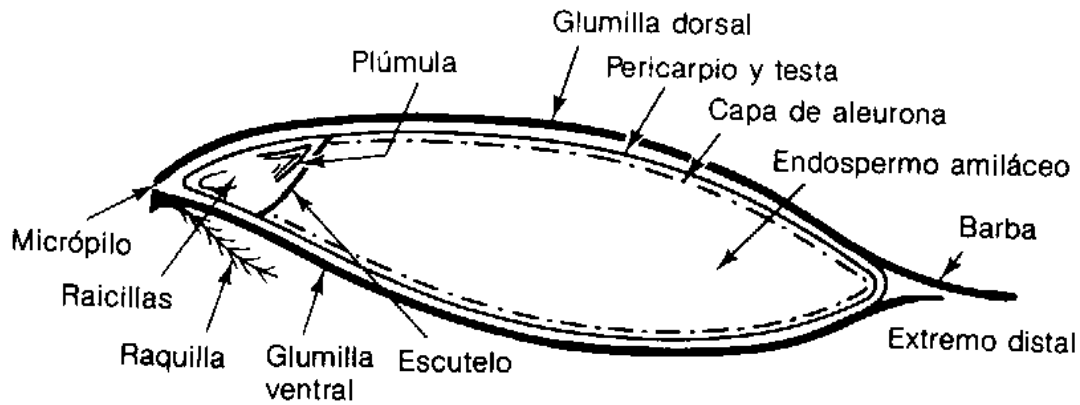


Figura 10. Sección longitudinal de un grano de cebada.

Fuente: Instituto Nacional de Investigación agropecuaria. Uru, 2012 ⁴¹.

2.6. La malta.

La malta es la cebada que ha germinado y ha sido posteriormente secada y tostada en un proceso que suele denominarse “malteado”.⁴²



Figura 11. Malta de cebada.

Fuente: Malteurop. 2012 ⁴³.

El proceso de elaboración de la malta se puede dividir en 5 etapas diferentes:

1. Remojo: El grano se remoja en agua y empieza a crecer.
2. Germinación: el grano empieza a germinar, desarrollando enzimas.
3. Secado: La germinación se detiene al secarse los granos aunque preserva las enzimas.
4. Limpieza: Las raíces y brotes se retiran de la malta.
5. Tostado: La malta se tuesta para que desarrolle aroma, sabor y color. ⁴⁴

2.7. Bagazo de malta.

Subproducto de la industria cervecera resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cereal (cebada, básicamente) malteado. Es un producto húmedo cuyo contenido en materia seca es de un 20-25%. No se observan diferencias significativas en la composición química correlacionadas con el contenido de materia seca, aunque éste es variable, en el mercado recibe otros nombres como el de cebadilla de cerveza.

El bagazo de cerveza es un subproducto rico en proteína, siendo su contenido proteico medio de un 24-26% sobre materia seca. El extracto etéreo representa un 6%. Es un subproducto rico también en fibra, con un contenido en FND del 44% y en FAD del 20%, aunque se trata de un fibra muy poco efectiva (18%). El contenido en lignina es de un 5% y el de cenizas de un 7%. En el residuo mineral destaca el contenido en P (6 g/kg), siendo más bajo (3 g/kg) el contenido en Ca.

El contenido en energía metabolizable de este subproducto es de 2,86 Mcal/kg. La degradabilidad efectiva de la proteína es baja (50%), siendo la velocidad de degradación de un 7 %/h. Se trata pues de un alimento de elevado contenido proteico, siendo ésta una proteína que escapa, en buena parte, de la degradación ruminal ⁴⁵.

El hez de malta se caracteriza también por un alto contenido de humedad (80%) por lo cual es necesario realizar un acondicionamiento, sin el cual resulta imposible conservarla, transportarla o manipularla adecuadamente en procesos posteriores. Dicho acondicionamiento está orientado a aumentar la durabilidad del producto (por más de un año) para permitir su comercialización y volver viable el transporte a largas distancias, tanto por

la estabilidad del producto como por la relación peso y valor del flete. Por cada 10 litros de cerveza elaborada se obtienen aproximadamente 2 Kg de hez de malta y a nivel nacional unas 700 tn diarias. Sin embargo, a pesar de que existe una elevada disponibilidad de este producto, en la actualidad no se está aprovechando de manera apropiada. Este producto es usado en varias partes del mundo para la alimentación de ovejas, caballos, cerdos, y pollos, pero el principal uso de la hez de malta es su utilización en tambos y en la alimentación de animales criados en “feed lot”. Para alimentación animal, el producto puede comercializarse tal cual se obtiene o pelletearlo para obtener un producto de mayor densidad y así lograr un almacenamiento y transporte más eficiente. La hez de malta seca permite, por sus características, la posibilidad de desarrollar una amplia variedad de productos como, por ejemplo, concentrados de proteínas, concentrados de fibras, utilización como insumo en panificados, etc. En consecuencia, la planta piloto no sólo es importante para definir los parámetros finales del proceso y realizar su evaluación económica, sino que es fundamental para continuar con la investigación y el desarrollo de otros productos.

El tratamiento de este subproducto es importante tanto desde el punto de vista económico como desde el medioambiental, ya que se obtendría un producto útil a partir de un residuo que hoy en día se manipula inapropiadamente y que es generado en grandes cantidades.⁴⁶



Figura 12. Bagazo de malta húmeda.

Fuente: FEDNA 2010 ⁴⁷.

2.7.1. Análisis químico-biológico del bagazo de malta.

Tabla 10. Composición química- biológica del bagazo de malta cervecero.

Materia seca	25,0 %
Materia organica	95,7 %
Pared celular	66,6 %
Celulosa	18,3 %
Proteinas	30,0 %
Lipidos	7,0 %
Minerales totales	4,3 %
Calcio	0,16 %
Fosforo	0,65 %
Digestibilidad de la MS	65,0 %
Digestibilidad de la proteina	85,0 %
Energia metabolizable	2,75 Mcal/kg MS
Degradabilidad a 20 horas	
MS	51,8 %
Proteinas	69,9 %
Degradabilidad a 40 horas	
MS	60,4 %
Proteinas	76,2 %

Fuente: Página web *San Ramón Malta Húmeda*. Argentina.⁴⁸

2.7.2. Alternativas de utilización del bagazo de malta.

Las fábricas de cerveza generan una serie de residuos o subproductos que, tratados convenientemente, pueden ser utilizados para la obtención de precursores de biocombustibles y de productos de alto valor añadido. Estos últimos se pueden reutilizar en la propia industria agroalimentaria o en la elaboración de alimentos funcionales y cosméticos.

Los residuos de este tipo de industria, añaden, contienen lípidos, carbohidratos, proteínas y otros compuestos interesantes. La única limitación a su uso como precedente de los biocombustibles radica en la rentabilidad económica de su proceso de obtención y en la calidad de estos ⁴⁹.

Los lodos procedentes de las industrias cerveceras son depositados en vertedero en su mayor parte, aunque en algunos casos se utilizan como abono orgánico y en la alimentación animal. Los residuos de lúpulo y malta pueden ser también compostados con otros materiales orgánicos para ser utilizados en la formulación de sustratos ⁵⁰.

2.8. Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.

La composición de los materiales lignocelulósicos, constituidos por celulosa, como los materiales en estudio el bagazo de caña de azúcar y el bagazo de malta; hemicelulosas y lignina, en una estructura compleja y difícil de penetrar y atacar por agentes químicos, requieren de un pretratamiento para “romper” esa estructura y facilitar los procesos posteriores.

Para que los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica den lugar a azúcares potencialmente fermentables, se debe someter a la biomasa a una etapa de hidrólisis. La hidrólisis de los polisacáridos puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática) siendo a través de enzimas producidas por microorganismos especializados en la producción de enzimas mediante el consumo de biomasa lignocelulósica. La hidrólisis ácida puede realizarse mediante un ácido concentrado o un ácido diluido.

La fermentación tradicional convierte la glucosa en etanol, pero en el caso de los materiales lignocelulósicos, la celulosa debe ser primero convertida a azúcares simples por hidrólisis y entonces fermentada para producir etanol. Debido a esto, la materia prima lignocelulósica debe ser procesada por las etapas que se muestran a continuación:

- Preparación del material lignocelulósico.
- Pre-tratamiento (fraccionamiento de las hemicelulosas y parte de la lignina).
- Purificación del hidrolizado (si es necesario).
- Hidrólisis principal (fraccionamiento de la celulosa).

- Purificación del hidrolizado (si es necesario).
- Fermentación.
- Recuperación del etanol.⁵¹



Figura 13. Obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósicos.

Fuente: Elaboración propia, Noviembre 2015.

2.9. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se da mediante un conjunto de enzimas llamadas hidrolasas, ejerciendo un efecto catalítico hidrolizante (rompen celulosa, lignina, hemicelulosa y otros azúcares presentes en las frutas). La celulosa es degradada por las celulasas a azúcares, que pueden ser fermentadas por levaduras o bacterias para la producción de etanol ⁵².

El proceso consiste en descomponer la celulosa y la hemicelulosa del residuo en azúcares sencillos y transformarlos en etanol mediante fermentación. En primer lugar se debe realizar un pre tratamiento del residuo, cuyo objetivo es alcanzar los mejores resultados en las etapas de hidrólisis y fermentación. Este sistema multienzimático, constituido básicamente por tres enzimas: Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4 glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa. De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, se encuentran los hongos capaces de conseguir rendimientos superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos, principalmente de las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Penicillium*.

La hidrólisis enzimática es el único proceso de hidrólisis en el que se obtiene un elevadísimo grado de aminoácidos libres y biológicamente activos. Además en relación a la hidrólisis química presenta mayor rendimiento, no necesita utilizar agentes químicos y genera menores costos de equipamiento ⁵².

2.9.1. Celulasas

Es el nombre genérico que reciben un conjunto de enzimas que son capaces de degradar la celulosa, un polisacárido conformado por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces β -1,4 ⁵³.

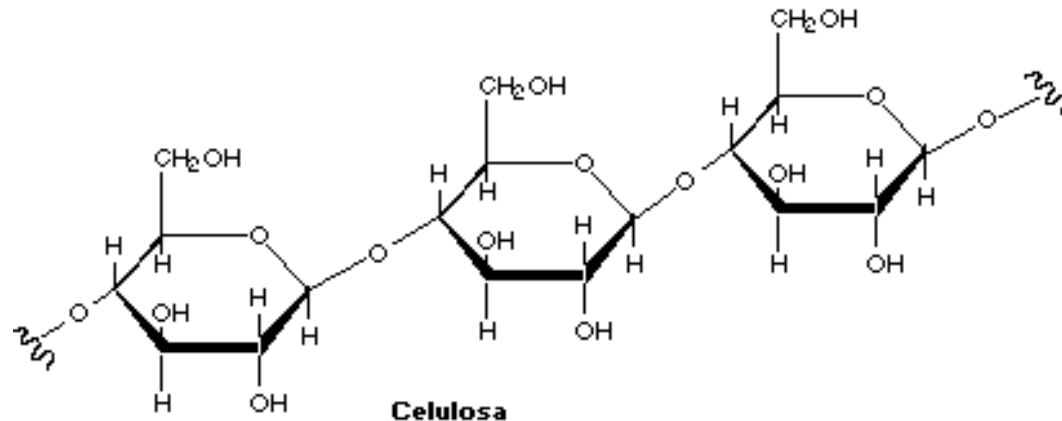


Figura 14. Estructura química de la celulosa

Fuente: Azúcares. Biología.edu.ar ²⁹

Las celulasas son glicosil hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas. De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos ⁵⁴.

2.9.1.1. **Endocelulasas:** También denominadas endoglucanasas. Éstas son 1,4--D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas ⁵⁵.

Las endocelulasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales ⁵⁶.

2.9.1.2. **Exocelulasas:** Son también conocidas como exoglucanasas, y actúan procesivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de

glucosa, las glucohidrolasas (1,4--D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian & Valaskova, 2008) ⁵⁷.

2.9.1.3. **Glucosidasas:** Son enzimas -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa.

Esta enzima es empleada en la producción de glucosa y de etanol, también para extraer componentes del té verde, para producir jarabe de fructosa y para el tratamiento de materiales que contienen lignocelulosa ⁵⁸.



2.10. *Aspergillus Niger*.

Tabla 11. Taxonomía de *A. niger*.

Taxonomía	
Dominio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Pezizomycotina
Clase:	Eurotiomycetes
Orden:	Eurotiales
Familia:	Trichocomaceae
Género:	<i>Aspergillus</i>
Especie:	<i>Aspergillus niger</i>

Fuente: Angulo, A. Sangolqui, 2010⁵⁹.

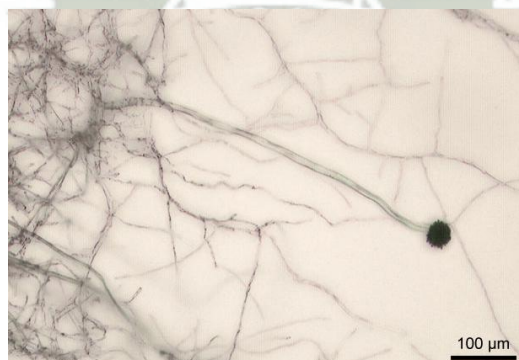


Figura 15. Micrografía de *A. niger* crecido en una placa de agar Sabouraud en aumento 100x.

Fuente: Aschkar, G. resúmenes detrabajos, 2008 ⁶⁰.

2.10.1. Características generales.

- ✓ El *Aspergillus niger* es un hongo común, versátil, de apariencia filamentosa y textura suave.
- ✓ El color es inicialmente blanco pero pronto se vuelve negro en la parte superior, mientras que la parte inferior permanece color amarillo pálido.
- ✓ *A. niger* crece rápidamente, como la mayoría de las especies de *Aspergillus*.

2.10.2. Características microscópicas.

Las características microscópicas del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación son:

- ✓ Cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas.
- ✓ Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas.
- ✓ Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas.
- ✓ Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café⁶¹.

2.10.3. Características macroscópicas.

- ✓ Colonias en medio PDA de color negro o marrón muy oscuro.
- ✓ Reverso incoloro a amarillo; colonia densa, granular a flocosa.
- ✓ En medio Sabouraud las colonias son más compactas.
- ✓ Colonias en bagazo de caña de azúcar, las colonias son de color negro; micelio blanco apenas visible; reverso incoloro; textura granular a flocosa⁶².

2.10.4. Condiciones de cultivo.

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies. Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas⁶³.

Sin embargo, algunos sistemas de producción como la fermentación sumergida no considera estos importantes aspectos de su fisiología.

Algunos procesos utilizan hongos inmovilizados en distintos soportes sintéticos, y en el caso de *Aspergillus* se ha probado la inmovilización para la producción de ácidos orgánicos⁶⁴.

Sin embargo, esta técnica de cultivo está principalmente enfocada hacia la obtención de ventajas operativas del proceso, como son la reutilización de biomasa, la facilidad para la recuperación del producto y también una mayor productividad. Esta última característica resulta importante para considerar que la forma de crecimiento de estos microorganismos es determinante en su comportamiento fisiológico. Los hongos que crecen sobre superficies constituyen biopelículas y como tales, muestran características fisiológicas particulares derivadas probablemente de una expresión diferencial de genes⁶⁵.

2.10.5. Interés del *A. niger* para la investigación en biología y biotecnología.

- ✓ Los hongos filamentosos son un grupo de interés industrial en la producción de enzimas.
- ✓ *Aspergillus* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación de la celulosa. Las glucanasas son utilizadas en muchos procesos industriales, como bioblanqueo, panificación, extracción y clarificación de jugos, elaboración de alimento animal, industria textil, entre otras. *Aspergillus* muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la

producción a gran escala, sus productos son generalmente considerados como GRAS (generally regarded as safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales ⁶⁶.

2.11. *Bacillus subtilis*.

Tabla 12. Taxonomía de *Bacillus subtilis*.

Taxonomía	
Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>B. subtilis</i>

Fuente: Fox. Chile, 2000 ⁶⁷.

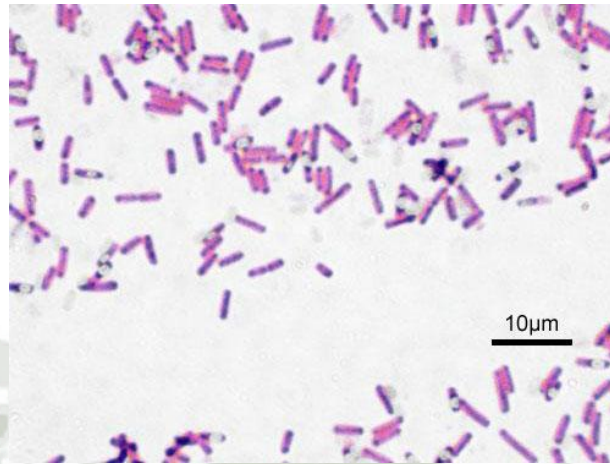


Figura 16. Tinción gram de *Bacillus subtilis*.

Fuente: Torsten Stein, 2013⁶⁸.

2.11.1. Características generales.

- ✓ *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, Catalasa-positiva, aerobio comúnmente encontrada en el suelo.
- ✓ Miembro del Género *Bacillus*.
- ✓ *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas.
- ✓ *B. subtilis* es un microorganismo autóctono del suelo donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats y los cuales ha colonizado eficientemente debido a sus cualidades, entre las cuales podemos mencionar; el tener un programa genético que le permite formar esporas, crecer en un amplio rango de temperaturas, la capacidad de moverse, mostrar velocidades de crecimiento altas, producir enzimas hidrolíticas extracelulares y una variedad de antibióticos ⁶⁸.
- ✓ Es una de las 40 especies reconocidas del género *Bacillus*, su identificación es sencilla: forma esporas termoresistentes, es catalasa y Voges-Proskauer positivo, su crecimiento en agar anaeróbico (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva ⁶⁹.

2.11.2. Características microscópicas.

- ✓ Bacilos Gram positivos de 0,8 mm de diámetro por 2 a 3 mm de largo con bordes redondeados. Presentan esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo ⁷⁰.
- ✓ Con endospora central y crecimiento aeróbico, catalasa positiva, presenta hidrólisis del almidón y reduce los nitratos, no produce indol, forma escasa cantidad de ácido sulfúrico, presenta crecimiento en NaCl al 7%, tiene reacción positiva Voges Proskauer, es manitol negativo y utiliza el citrato ⁷¹.

2.11.3. Características macroscópicas.

- ✓ Colonias, de 2 a 4 mm de diámetro, beta hemolíticas con hemólisis completa, que pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos ⁷².

2.11.4. Condiciones de cultivo.

Las principales fuentes de carbono para los organismos vivos son los carbohidratos. Estos constituyen la clase más abundante de moléculas biológicas, las cuales por oxidación, proveen a la célula de esqueletos de carbono y la energía necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos. La fuente natural de carbohidratos más abundante para los microorganismos lo constituye la biomasa vegetal. Las plantas producen una gran cantidad de polisacáridos, los cuales sirven como sustratos a los hongos y bacterias del suelo.

Bacillus subtilis es un organismo aislado del suelo, que participa conjuntamente con otras bacterias en las primeras etapas de descomposición de la biomasa vegetal ⁷³ y que mediante el uso de carbohidrolasas extracelulares degrada varios polisacáridos presentes en estos materiales, produciendo oligo, di o mono sacáridos que son transportados, fosforilados y subsecuentemente catabolizados vía glicólisis o pentosas fosfatos ⁷⁴.

B. subtilis puede utilizar un intervalo amplio de carbohidratos (alrededor de 18 diferentes mono o disacáridos) como fuente de carbono y energía ⁷⁵. Sin embargo, dos azúcares que frecuentemente se encuentran en la naturaleza, la D-xilosa y la Dgalactosa, no pueden ser utilizados por *B. subtilis* como únicas fuentes de carbono, lo cual es sorprendente ya que este

microorganismo sintetiza todas las proteínas necesarias para metabolizar ambos azúcares. En 1998, Krispín y Allmansberger, investigando el efecto tóxico de la galactosa en cepas de *B. subtilis* (galE negativo), obtuvieron mutantes espontáneas de *B. subtilis* 168, las cuales eran hábiles para crecer en D-galactosa como única fuente de carbono. La caracterización de esas mutantes revelaron que el transportador para arabinosa (AraE) funcionaba como transportador para 3 diferentes azúcares: arabinosa, xilosa y galactosa, y en consecuencia podían ser metabolizados ⁷⁶.

2.11.5. Interés del *B. subtilis* para la investigación en biología y biotecnología.

B. subtilis posee características que pueden ser ventajosas para el desarrollo de un biocatalizador etanológico, características que a continuación se describen. Después de *E. coli* y *S. cerevisiae*, *B. subtilis* es uno de los microorganismos mejor caracterizados en cuanto a su microbiología básica y aplicada se refiere. Es una bacteria grampositiva con un contenido bajo de GC. Fue aislado del suelo y tolera ambientes adversos. Se conoce su genoma completo y es ampliamente usado en la industria alimenticia por ser considerado un microorganismo GRAS (generally regarded as safe) por la Food & Drug Administration (FDA) de los EUA. De manera natural, *B. subtilis* presenta una notoria capacidad para exportar al medio diversas enzimas degradativas (glucanasas, proteasas y nucleasas) que le permiten asimilar eficientemente los distintos sustratos disponibles en su entorno ⁷⁷.

Esta capacidad excretora se ha utilizado para exportar proteínas heterólogas con alta eficiencia por lo que es posible concebir que, aunado a las enzimas degradativas que comúnmente produce, podría excretar eficientemente otras enzimas heterólogas tales como celulasas, xilanasas y celobiasas. Un organismo con tales características, podría utilizar los desechos agroindustriales como sustratos de la fermentación con un mínimo de tratamientos previos, eliminando el cuello de botella y abaratando este proceso; fundamentalmente por el elevado costo de los complejos de celulasas que se emplean para realizar la sacarificación ⁷⁸.

B. subtilis puede utilizar alrededor de 18 diferentes mono y disacáridos como fuente de carbono. Éstos son introducidos por la célula, fosforilados y después catabolizados por

glicólisis o la vía de las pentosas. Puede metabolizar glucosa, manosa, fructosa, ribosa y arabinosa, pero parece que no es capaz de crecer utilizando a xilosa y galactosa como únicas fuentes de carbono, atribuyéndose este hecho únicamente a la carencia de los transportadores. La ausencia de estos transportadores es sorprendente ya que puede sintetizar todas las proteínas necesarias para metabolizar ambos azúcares; aunque la expresión de estas proteínas que incorporan a la xilosa al metabolismo celular se inducen por la presencia de ésta ⁷⁹.

2.12. Fermentación.

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica de origen vegetal libre de nitrógeno, entre ellas están los hidratos de carbono o sus derivados, por medio de ciertos microorganismos (bacterias, bacilos, levaduras o mohos), y que generalmente van acompañadas de un desprendimiento gaseoso y producción de energía ⁸⁰.

Los procesos empleados en la fabricación de alcohol etílico por fermentación, dependen de la naturaleza de la materia prima. Las materias sacaroideas requieren por lo general de algún tratamiento o a veces de ninguno, mientras que las materias celulósicas deben ser hidrolizadas a azúcares fermentables antes de que las bacterias actúen sobre ellas. Ésta etapa del proceso se realiza por medio de bacterias fermentativas, levaduras, bacterias ácido lácticas y algunos hongos que se encargan de procesar los hidratos de carbono, en éste caso la fermentación de la glucosa liberada a partir de la celulosa, así como la de los azúcares procedentes de la hemicelulosa que se han liberado durante los pre tratamientos anteriores.

La fermentación más ampliamente conocida es la escisión de glucosa para formar etanol y CO₂, en especial predominante en levaduras ⁸¹.

Las levaduras utilizan las mismas reacciones del mecanismo Emben – Meyerhof hallado en animales para producir piruvato. El piruvato es dextricarboxilado en levaduras por una enzima que utiliza pirofosfato de tiamina como coenzima. El derivado hidroximetiltiamina intermedio se descompone para liberar acetaldehído al medio, el cual es entonces reducido por NADH a etanol ⁸².

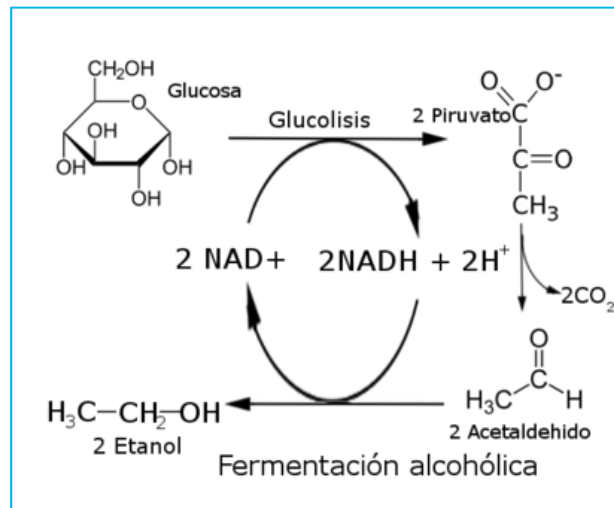


Figura 17. Mecanismo de Fermentación Alcohólica

Fuente: Chambers P. 2010 ⁸².

Los microorganismos (*Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc dextranicum* y *Clostridium thermocellum*) contienen una enzima llamada invertasa, que actúa como catalizador ayudando a transformar los azúcares en glucosa y fructuosa.

La transformación de la glucosa en etanol por acción de microorganismos se produce a través de una completa secuencia de reacciones que pueden resumirse en:

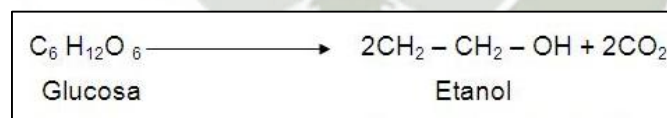


Figura 18. Transformación de glucosa a etanol.

Fuente: Mas A, 2006 ⁸³.

Esta es la fórmula típica de la fermentación alcohólica, la cual fue desarrollada por Gay - Lussac; quien describe la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono con producción de 28 calorías, Gay- Lussac obtuvo 23 partes de alcohol, lo cual indica un rendimiento aproximado de 50% de alcohol y 50% de dióxido de carbono ⁸⁴.

2.13. *Saccharomyces Cerevisiae*.

Tabla 13. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Taxonomía	
Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género:	<i>Saccharomyces</i>
Especie:	<i>S. cerevisiae</i>

Fuente: Hyma K. FEMS Yeast Research, 2011 ⁸⁵.

2.13.1. Características generales.

- ✓ La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol⁵². Filogenéticamente de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que la especie en su conjunto consta de dos poblaciones, domésticos y salvaje ⁸⁶.

Algunas características de esta levadura que forman parte de su adaptación son el hecho de que pueda metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por vía respiratoria como por vía fermentativa, y de crecer en condiciones aerobias o anaerobias.

- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura más importante en microbiología del vino. Es mejor modelo industrial conocido por su miembro, la

levadura *S. cerevisiae*, pero comprende además ocho especies estrechamente relacionadas. La opinión común coincide en que esta especie es un producto de la domesticación⁸⁷.

- ✓ Tiene gran capacidad de crecer en el zumo de uva, que se caracteriza por un alto contenido de azúcares y bajo contenido de sustancias de nitrógeno. La especie produce altas cantidades de etanol a la vez que consume el contenido de azúcares y baja el pH⁵⁹ que inhiben el crecimiento de cepas no- *Saccharomyces*.
- ✓ Además de poseer el fenómeno *killer*, que implica la secreción, por parte de ciertas cepas, de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina *killer*, a la cual ellas son inmunes, que mata a células sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros. Este tipo de interacciones pueden determinar la evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación. En algunas ocasiones una cepa *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* predomina al final del proceso fermentativo, sugiriendo que la expresión de la toxina le permitió conducir parte de la vinificación. Este fenómeno *killer* pueden ser un método alternativo para el control de levaduras no deseadas⁸⁸.
- ✓ Estas levaduras también están presentes en el envejecimiento de vinos formando una película llamada velo de flor, por lo que se llaman levaduras flor, Su crecimiento en la superficie produce cambios importantes en las características del vino debido a su metabolismo oxidativo. Las fermentaciones también son impulsadas en gran medida por inoculaciones de una sola cepa pura de *S. cerevisiae* seleccionada por el enólogo, que se añade al mosto de uva, después de la molienda. Para asegurar un mayor control de la vinificación, se obtienen resultados más predecibles y disminuye el riesgo de deterioro por otros microorganismo⁸⁹.

Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y no fermenta lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. La aireación óptima es de 0.6- 0.9 vvm.

Al seleccionar levaduras comerciales se deben tener en cuenta las propiedades de estas y las características del vino que se quiere producir, tales como la concentración de metabolitos que toleran o se precisan para iniciar con éxito la fermentación, o la

temperatura óptima de desarrollo: la mayoría lo hace entre 12 y 36° C; si la temperatura óptima es menor de 30° se denominan criófilas, si se encuentra entre 25 y 35° son mesófilas, y si la temperatura a la que se desarrolla preferentemente es mayor de 35° C se denominan termófilas ⁹⁰.

A pesar de esto, es más efectivo el uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas, ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son: Específicas del área, totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, totalmente adaptadas a la materia prima, es decir al mosto a fermentar, responsables, al menos parcialmente, de las características únicas de los vinos obtenidos ⁹¹.

2.13.2. Características microscópicas.

- ✓ Talo unicelular, ovalado, redondo, con gemaciones (yemas).
- ✓ Se observan redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas.

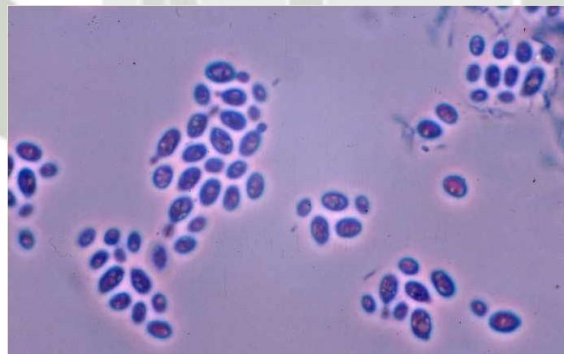


Figura 19. Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Tiago V. 2012 ⁹².

2.13.3. Características macroscópicas.

- ✓ *Sacharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes regulares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C.
- ✓ Sus dimensiones son: 2.5- 10 micras de ancho y 4.5- 21 micras de largo.
- ✓ Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados.



Figura 20. Vista macroscópica de *Sacharomyces cerevisiae* en medio YPG.

Fuente: Cocolin L. 2004 ⁹³.

2.13.4. Condiciones de cultivo.

- ✓ **Requerimientos nutricionales:** *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP,

NADP). Para que las fuentes de nitrógeno, fosforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechables por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable⁹⁴.

✓ **Condiciones que deben medirse y controlarse durante una fermentación discontinua.**

- a. **Temperatura:** La temperatura óptima de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35°C. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano.
- b. **pH:** El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También el pH es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último, puede afectar la floculación de la biomasa o su adhesión al vidrio. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaeróbico.
- c. **Nutrientes:** Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, pero es conveniente señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Según investigaciones realizadas, se ha encontrado que en un cultivo para levaduras en melazas la relación carbono/nitrógeno debe ser 1:1 para que la productividad celular sea máxima. También la relación fósforo/oxígeno es relevante en lo que refiere a la eficiencia de conversión energética y a la respiración⁹⁵.
- d. **Aireación:** La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismos como de productos del metabolismo. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina aeróbica y cuando éste carece de oxígeno anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y sólo el 2% se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo

que en un proceso fermentativo 46 en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaerobia generalmente por la producción de etanol.

- e. **Productividad:** La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo del cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función del tiempo (h). Esta depende del diseño del fermentador, ya que afecta la transferencia de oxígeno que se ve reflejada en el rendimiento obtenido al final de la fermentación (Quintero, 1981)⁵². Un microorganismo adecuado para su utilización industrial debe producir la sustancia de interés, pero hay muchos otros aspectos a considerar. Es preciso disponer del organismo en cultivo axénico (puro), debe ser genéticamente estable, y debe crecer en cultivo a gran escala ⁹⁶.
- f. **Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa:** La levadura obtiene la energía a través de dos tipos de metabolismo:
- **Asimilación:** En el cual la levadura toma las sustancias nutritivas que necesita del medio en que se desarrolla.
 - **Desasimilación:** En el cual, se degradan los hidratos de carbono incorporados a la célula. Se distinguen dos formas de desasimilación, la respiración y la fermentación. La primera se define como un proceso metabólico que conduce a una oxidación total de los hidratos de carbono incorporados bajo formación de dióxido de carbono, agua y energía, generando biomasa. Esta vía se presenta como ruta catabólica de glucosa; la mayoría de las células que convierten glucosa en piruvato pasan al ciclo del ácido tricarbóxico, 47 donde se convierte en dióxido de carbono y agua ⁹⁷.

2.13.5. Interés de *S. cerevisiae* para la investigación en biología y biotecnología.

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos⁹⁸.

Tal es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que bajo condiciones anaerobias reduce el piruvato a etanol con emisiones de CO_2 , obteniéndose un rendimiento estequiométrico teórico de 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO , por 1 g de glucosa metabolizada. Sin embargo, se ha observado que a nivel experimental e industrial sólo se alcanza entre el 87% y el 95% del rendimiento teórico para el etanol, ya que esta levadura también utiliza la glucosa en la producción de otros subproductos. No obstante, se prefiere su uso por requerir de menores costos de manejo, ya que la presencia de sacarosa en algunos sustratos no afecta el rendimiento de etanol; asimismo, los subproductos de la fermentación y la concentración a la cual estos se producen no crean efectos colaterales⁹⁹.

En 2012, Kasavi y colaboradores evaluaron cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriales por su sostenibilidad para uso en los procesos de producción de etanol. El crecimiento y el rendimiento de producción de etanol se valoró en diversos residuos agroindustriales incluyendo pasta de azúcar de remolacha, almidón y melaza de remolacha azucarera y residuos biológicos como la zanahoria, tomate y patatas. Unos análisis de componentes principales de los parámetros de fermentación relacionados con el crecimiento y la producción de las cinco cepas cultivadas en glucosa demostraron la superioridad de una de las cepas (Y9) respecto a su rápido crecimiento y los rendimientos más altos de etanol¹⁰⁰.

2.14. *Zymomonas mobilis*.

Tabla 14. Taxonomía de *Z. mobilis*.

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alpha Proteobacteria
Orden	Sphingomonadales
Familyia	Sphingomonadaceae
Genero	<i>Zymomonas</i> Kluyver and van Niel 1936
Especie	<i>Z. mobilis</i>

Fuente: Rogers P. 1982 ¹⁰¹.

2.14.1. Características generales.

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa que puede fermentar determinados azúcares a través de una ruta metabólica productora de bioetanol, en ocasiones, con mayor eficacia que las levaduras. Posee un ciclo de Krebs incompleto, carente de genes para 2 enzimas, pero posee unas características muy fuertes para realizar las vías de síntesis de pirúvico a partir de glucosa o gliceraldehído-3-fosfato. Este organismo también muestra una alta tasa de captación de azúcares, fermentando a etanol estos tipos específicos. Además, el rendimiento de síntesis de etanol como combustible es del 97%, muy superior al 90-93% de *Saccharomyces cerevisiae* ¹⁰².

En 1928, Lindner descubrió que la fermentación del Hidromiel que conducía a la bebida alcohólica “pulque” era provocada por una bacteria a la que él denominó *Thermobacterium mobile*, la que más tarde sería conocida como *Z. mobilis*

Este investigador sugirió que esta bacteria intervenía únicamente en las regiones tropicales.

En 1941, Roelofsen fu el primero en aislar *Z. mobilis* a partir del vino de palma. Aquí se puede apreciar que está bien adaptada a un medio en el cual existen cantidades importantes de sacarosa, glucosa, fructosa, aminoácidos y factores de crecimiento.

Zymomonas también ha sido aislado a partir de jugos de caña de azúcar ¹⁰³.

2.14.2. Características microscópicas.

- ✓ *Zymomonas* presenta forma de bacilar de 2 a 6 μm de longitud y 1 a 1,4 μm de ancho. Se disponen generalmente en pares.
- ✓ Son móviles, ya que presentan de 1 a 4 flagelos, aunque esta movilidad puede ser perdida espontáneamente.
- ✓ No forman cápsulas ni esporas.



Figura 21. Vista por microscopía electrónica de *Z. mobilis*.

Fuente: Joachimsthal, E. 2000 ¹⁰⁴.

2.14.3. Características macroscópicas.

- ✓ Son catalasa positiva y oxidasa e indol negativos.
- ✓ No reducen los nitratos, el rojo neutro ni el tween 60 u80.
- ✓ Las colonias en medio estándar son brillantes, blancas o cremas y miden alrededor de 2 mm de diámetro tras 2 días de incubación a 30 °C. Presentan borde regular y es perceptible un olor frutado cuya intensidad depende de la cepa ¹⁰⁵.

2.14.4. Condiciones de cultivo.

- ✓ Presenta un pH óptimo de 7,3.
- ✓ Crece en medios con glucosa y fructosa y fermenta estos dos azúcares. Produce al menos un mol y medio de etanol por mol de glúcido fermentado y también forma pequeñas cantidades de ácido láctico y trazas de acetil metil carbinol.
- ✓ También pueden crecer en medios que contengan 2%(p/v) de extracto de levadura y 20% (p/v) de glucosa o en un medio estándar a un pH entre 4,1 - 5,2 si éste contiene 5% (v/v) de etanol o rojo neutro (0,1% p/v) ¹⁰⁶.

2.14.5. Interés de *S. cerevisiae* para la investigación en biología y biotecnología.

- ✓ Actualmente *Zymomonas sp.* es considerado un contaminante serio en la industria cervecera, pues son favorecidos por la anaerobiosis y la presencia de azúcares simples.
- ✓ En la cerveza provoca turbidez importante y un olor a manzana que podría ser debido a la presencia de acetaldehído e hidrógeno sulfurado.
- ✓ *Z. mobilis* interviene en la fermentación del vino de palma, de la cerveza chica, así como en la fabricación del vino. Se asegura, además, que participaba en la fabricación de las cervezas auténticas de la antigüedad.
- ✓ También se ha utilizado para la conservación de jugos extraídos de remolacha y en el tratamiento de desechos de la industria cervecera para uso como alimento en animales de granja (un uso parecido se ha producido con la papa) ¹⁰⁷.

- ✓ Otro uso dado ha sido para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol (0,7%), a esta se la llama “cerveza dietética”. También ha sido empleada para desarrollar una nueva tecnología en la producción del “pulque”.
- ✓ También en la producción a gran escala de etanol. Esto debido a que su rendimiento de conversión es mayor que el de la levadura y a que puede producirlo a una velocidad significativamente más elevada, además, esta bacteriano necesita oxígeno y presenta en general una mejor tolerancia al etanol que la levadura. Como desventajas podríamos apuntar que la cepa necesita de un pH de cultivo más elevado que el de las levaduras, y esto generaría un mayor peligro de contaminación, además, sólo metaboliza un espectro muy reducido de sustratos: glucosa, fructosa y sacarosa. En el futuro todos estos problemas podrán ser salvados gracias al aporte de la Ingeniería Genética y la Biotecnología¹⁰⁸.

2.15. Identificación de las cepas fermentadoras *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*.

Para la identificación de los microorganismos fermentadores se realizaron las siguientes pruebas:

a. Coloración de Gram:

- **Morfología celular.** Las láminas anteriormente coloreadas se observan al microscopio con objetivos de inmersión 100X y se constata la forma celular.
- **Catalasa.** Mediante las siguientes reacciones:

Reacción positiva: Se observa desprendimiento inmediato de oxígeno por las colonias evaluadas.

Reacción negativa: Sin desprendimiento de oxígeno.

- b. **Citocromo-oxidasa.** Se emplean tiras de ensayo con zona de acción para la demostración de la citocromo oxidasa en microorganismos¹⁰⁹.

c. Agar hierro- tres azúcares

Se hacen siembras tanto por estría en la superficie inclinada como en columna vertical mediante estría central; se incubaron por 48 horas a 37°C.

Interpretación del proceso, análisis de los Picos de Flauta:

- alcalino/profundidad alcalina (K/K): No fermentación de hidratos de carbono.
- alcalino/profundidad acida (K/A): Glucosa fermentada; sacarosa y lactosa no fermentadas.
- alcalino/profundidad acida (Negra) (K/A/H₂S): Glucosa fermentada, lactosa no fermentada, producción de H₂S.
- ácido/profundidad acida: Glucosa, lactosa y sacarosa fermentadas.

d. Reducción de Nitrato. El cultivo axénico que se somete al ensayo se incuba durante 12-24 horas a la temperatura óptima en caldo nutritivo estándar II, al que se le añade 1.5 g/l de nitrato de potasio (Merck, 94). Después de la incubación se adiciona unas gotas del reactivo de nitritos. La reacción se considera positiva si, transcurrido un minuto aproximadamente, se aprecia una coloración roja, cuya intensidad dependía de la cantidad de nitrito formada (Merck, 1994) A las reacciones negativas se les agregó polvo de Zinc; los iones de Zinc indican la presencia de nitratos residuales y confirman una reacción negativa verdadera. ⁵⁵

e. SIM. El cultivo sometido a examen se siembra por picadura en la capa superior del medio de cultivo y se incuba por 24 horas a 37°C ¹¹⁰.

Tabla 15. Características bioquímicas de *Z. mobilis*.

Prueba bioquímica	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Zymomonas sp</i>	Prueba bioquímica	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Zymomonas sp</i>
Catalasa	NR	+	L-sorbosa	-	NR
Oxidasa	NR	-	D-ribosa	-	NR
Citrato	NR	-	Ramnosa	-	NR
D-glucosa	+	+	Trealosa	+	NR
Fructuosa	+	-	Celobiosa	-	NR
Galactosa	+	+	Melotiosa	+	NR
D-Xilosa	-	+	Melositoza	-	NR
Manosa	NR	+	Glucosamina	-	NR
Lactosa	-	+	Glicerol	-	NR
Sacarosa	+	-	Eritrol	-	NR
Manitol	-	-	Glucitol	-	NR
Maltosa	+	-	Inositol	-	NR
Arabinosa	-	-	D-lactato	-	NR
Rafinosa	-	-	D-gluconato	-	NR
Sorbitol	NR	-	Ciclohexamida	NR	-
Indol	NR	-	Nitratos	NR	-
Movilidad	-	-	Sulfuros	NR	-
TSI	NR	A/A	Crecimiento a 10°C	+	NR
MR/VP	NR		Crecimiento a 45°C	NR	NR

Convenciones: + positivo, - negativo, D débilmente

Fuente: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1-1994¹¹¹.

Tabla 16. Pruebas bioquímicas para identificación de *Zymomonas sp.* y *Saccharomyces sp.*

Pruebas	<i>Zymomonas mobilis</i>
Coloración de Gram	-
Morfología celular	Bacilo
Catalasa	+
Oxidasa	-
Movilidad	-
Indol	-
Crecimiento en agar nutritivo	-
Crecimiento en agar EMB	-
Reducción de nitratos	-
Crecimiento a 37°C	+
Crecimiento a 20°C	+
Crecimiento en forma anoxigénica y oxigénica	+
Crecimiento solo en condiciones aerobias	-
Producción de H ₂ S	-
Resistente a la penicilina	+
Inhibido por novobiosiona	+
Fermentación de:	
Glucosa	+
Fructosa	+
Lactosa	-
Sacarosa	+
Arabinosa	-

Fuente. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1-1994¹¹¹.

2.16. Biocombustibles y Bioetanol

El biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa. Es una fuente renovable de energía, a diferencia de otros recursos naturales como el petróleo, carbón y los combustibles nucleares. Aunque se puede hablar de muchos tipos de biocombustible, por su importancia, aplicación y volumen de producción, básicamente hay dos: el bioetanol y el biodiésel. Se cree que pueden sustituir a los combustibles fósiles más tradicionales, en virtud de su bajo o nulo deterioro ambiental y sus características de renovación.

El bioetanol, o etanol de biomasa, puede ser obtenido de maíz, de caña de azúcar, remolacha, etc., por medio de procesos de fermentación enzimáticos de sus azúcares. Dado que la composición de la celulosa es muy rica en azúcar, resultaría muy útil producir alcoholes a partir de la fermentación de celulosa, principal componente estructural de los materiales vegetales¹¹².

Según el Consejo Nacional de Defensa de los Recursos Renovables de Estados Unidos, más de mil millones de toneladas de materiales con celulosa (aserrín, césped, hojas de árboles, viruta de madera, etc.) se generan anualmente y de su destilación fermentativa podrían ser obtenidos cerca del 30% de los combustibles necesarios para los automóviles en el 2050. El problema radica en los elevados costos que representa romper la rígida celulosa para posteriormente fermentarla y destilarla. Se espera que en un futuro muy cercano, microorganismos genéticamente diseñados para degradar y producir el etanol, a partir de celulosa, permitan bajar los costos de producción del etanol desde esta fuente natural.

Ventajas del uso de biocombustibles:

- No incrementan los niveles de CO₂ en la atmósfera, con lo que se reduce el peligro del efecto invernadero.
- Proporcionan una fuente de energía reciclable y, por lo tanto, inagotable.
- Revitalizan las economías rurales, y generan empleo al favorecer la puesta en marcha de un nuevo sector en el ámbito agrícola.

- Se podrían reducir los excedentes agrícolas que se han registrado en las últimas décadas.
- Se mejora el aprovechamiento de tierras con poco valor agrícola y que, en ocasiones, se abandonan por la esasa rentabilidad de los cultivos tradicionales.
- Se mejora la competitividad al no tener que importar fuentes de energía tradicionales¹¹³.

El reto principal de la industria y la biotecnología en la producción de combustibles es la bioconversión de la celulosa, por lo que las celulasas han adquirido una importancia enorme en estos procesos. Para contender con los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos requeridos en la producción de etanol a niveles industriales, se hacen necesarias enzimas con altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH¹¹⁴.

La producción mundial de bioetanol en 2007 fue de 50 x 10⁹ millones de litros, lo que equivale a más de cuatro veces de lo que se produjo en 2003. Sin embargo, este aumento cubre solamente el 1% de las necesidades totales de combustible. Algunos estudios han demostrado la no sustentabilidad de la tecnología actual que emplea maíz y caña de azúcar como materias primas en los principales países productores (Estados Unidos de América y Brasil, respectivamente). Además de que las prácticas agrícolas actuales son dañinas al medio ambiente debido a la erosión de los suelos (privándolos de N y P), y la contaminación del agua que generan, lo que reduce los beneficios asociados a la limpieza del uso de etanol¹¹⁵.

2.17. Destilación.

Es un método de separación y purificación de sustancias líquidas muy empleado. El objetivo principal es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades (puntos de ebullición), o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles de una mezcla. El éxito obtenido en el uso de las técnicas de destilación depende de varios factores¹¹⁶.

Entre éstos se incluye la diferencia de presión de vapor (referido a la diferencia en el punto de ebullición) de los componentes presentes, de la cantidad de muestra, del equipo de

destilación, de la posible destilación simultánea de dos componentes, o la formación de azeótropos, y del cuidado que tenga el experimentador.

Dado que el proceso de destilación se basa en el hecho de que el vapor procedente de una mezcla líquida es más rico en el componente más volátil, estando la composición controlada por las leyes de Raoult y Dalton, una destilación simple no conducirá nunca a la separación completa de las dos sustancias volátiles, excepto cuando la diferencia de volatilidad es muy grande) ¹¹⁷.

La obtención de agua destilada o la purificación de solventes orgánicos mediante destilación simple son procesos comunes en el laboratorio y en la industria. Se puede separar dos o más líquidos mediante destilación simple cuando sus temperaturas de ebullición difieren considerablemente.



Figura 22. Tipos de destilación (Uyazán et al, 2008)

Fuente: Wilniewicz, E. Y COL. 1988. Biotechnol. Letters ¹¹⁸.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

✓ **Material biológico.**

Cepas *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas* y *Bacillus sp. Bacillus subtilis*.

✓ **Material de laboratorio.**

Placas Petri, Matraces 100, 250, 500, 1000 mL, Beakers 50, 100, 250, 500, 1000 mL, Pipetas 1, 5, 10 mL, Micropipetas 0,5-50, 20-200, 100-1000 uL, Tips Blancos, Amarillos y Azules, Tubos Falcon, Tubos Eppendorf, Bagueta y espátula, Asa De Kohle, Frascos De Vidrio 50, 300, 1000 mL, Celdas De Cuarzo, Cámara De Neubauer, Luna De Reloj y Crisoles

✓ **Insumos y reactivos.**

Tritón x-100, agua destilada, sulfato de amonio, fosfato diácido de potasio anhidro, ácido sulfúrico, sulfato de magnesio heptahidratado, heptamolibdato de amonio tetrahidratado, acetato de sodio anhidro, ácido tricloroacético, sulfato ferroso heptahidratado, CMC, glicina, hidróxido de sodio, D(+) glucosa, DNS, citrato de sodio dihidratado, medio Sabouraud, medio PDA, azul de lactofenol, medio YPD, extracto de levadura, dextrosa, ácido clorhídrico, almidón, agar manitol, agar TSI, agar citrato, agar tripticase de soja, peptona, tinción gram.

✓ **Equipos e instrumentación:**

Baño maría, centrífuga, cámara de flujo laminar, espectrofotómetro, estufa, shaker, balanza analítica, pHmetro, horno, equipo de destilación, termómetro, cronómetro.

3.2. Metodología.

A. Fase de campo.

a. Recolección y selección de los residuos: bagazo de caña y bagazo de malta.

La recolección del bagazo de caña de azúcar, se realizó en el mercado el Altiplano de la ciudad de Arequipa, de los puestos de venta de jugo de caña de azúcar. Se recolectó a medio día un promedio de 3 kg de un solo puesto de venta de jugos. Se guardaron las muestras en bolsas Ziploc estériles. Se seleccionó aquellos residuos que no hayan tenido contacto con el suelo, de un tamaño oscilante entre 20-30 cm y que hayan sido colectados inmediatamente después de haber sido extraído el jugo.

La recolección de bagazo de malta se realizó en una empresa cervecera artesanal, “Machay” ubicada en Cerro Colorado. Se recolectó un total de 3 kg, en bolsas Ziploc estériles. La recolección se realizó durante la producción de un lote de cerveza, obteniendo los residuos directamente en el proceso, sin emplear recipientes intermedios.

b. Recolección y selección de la tierra cultivo para el aislamiento de *Bacillus subtilis*.

La tierra de cultivo seleccionada para el aislamiento de *Bacillus subtilis*, fue recolectada en el mes de marzo del año 2015, en el distrito de Sachaca en la localidad de Arequipa, área caracterizada por un clima cálido soleado con una temperatura promedio de 24°C y además que se cultiva la cebolla principalmente. La colección de tierra se realizó en frascos medianos estériles de toma de muestra.

Se seleccionó un área de estudio, un terreno de 400 m² aproximadamente, se tomó al azar en 4 sitios de una parcela, en cada uno de ellos se extrajeron 15 g de suelo por muestra de rizosfera. Primero con la ayuda de una herramienta mecánica como es la lampa, se retiró la tierra de la superficie del terreno escogido para toma de muestra. A continuación con la lampa se excavó a unos 15 cm de profundidad (tabla 17).

Allí es cuando se recolectó en los frascos de plástico para toma de muestra estériles, con la ayuda de una cuchara estéril se colocó la cantidad necesaria de tierra dentro del frasco, y terminada la acción se selló adecuadamente el recipiente y se almacenó en una bolsa Ziploc para su traslado al laboratorio. Se realizaron 4 tomas de muestra de la misma forma, siguiendo un tipo de muestreo aleatorio simple (Figura 23.a) y se trasladaron al laboratorio.

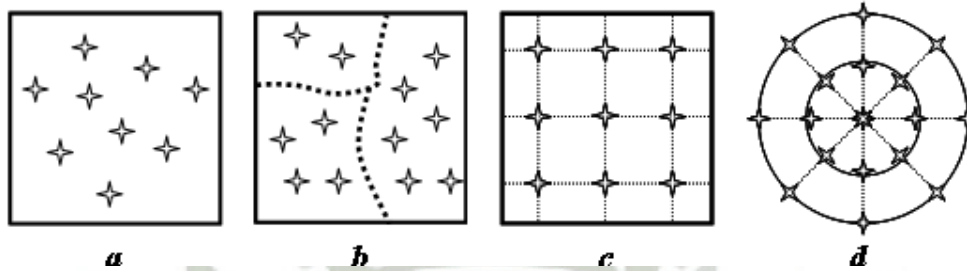


Figura 23. Tipos de muestreo

Fuente: Instituto Nacional de Ecología, México 2008

Tabla 17. Profundidad del muestreo según en uso del suelo.

USOS DEL SUELO	PROFUNDIDAD DEL MUESTREO (CAPAS)
Suelo Agrícola.	0 – 30 cm (1) 30 – 60 cm
Suelo Residencial/Parques	0 – 10 cm (2) 10 – 30 cm (3)
Suelo Comercial/Industrial/Extractivo	0 – 10 cm (2)

- 1) Profundidad de aradura
- 2) Capa de contacto oral o dermal de contaminantes
- 3) Profundidad máxima alcanzable por niños

Fuente: Guía de muestreo de suelos, Ministerio del Ambiente



Figura 24. Toma de muestra de tierra.

B. Fase de laboratorio.

a. Aislamiento, identificación y caracterización de *Bacillus subtilis*, *A. niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*:

- Aislamiento de *Bacillus subtilis*.

Se realizó la obtención de la cepa de *Bacillus subtilis*, por el método de diluciones seriadas a partir de tierra agrícola, El aislamiento de *B. subtilis* se llevó a cabo por medio de la resuspensión aséptica de 1g de tierra agrícola en 100 mL de agua peptonada tamponada, con agitación vigorosa por 30 s, después se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-3} , se sembró 0.1 ml de las diluciones por triplicado en agar nutritivo en placas Petri, para identificación de *Bacillus subtilis* por el método siembra en superficie con un asa de Digrasky. Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C, transcurrido este tiempo, se realizó el conteo por UFC/mL y se identificó el género requerido por características macroscópicas microscópicas y bioquímicas.

Se tomó una muestra representativa de cada colonia para realizarle una tinción simple con cristal violeta Gram y observar al microscopio, con un aumento de 100X. Aquellas colonias que mostraron presencia de endospora bacteriana pasaron a una subcultivación en agar tripticase de soya, durante 24 h a 28°C para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resulten positivos a la catalasa se conservan en frascos de agar nutriente a 4°C hasta su posterior uso. Luego se procedió a verificar la taxonomía bacteriana, esto se realizó mediante las claves extraídas de los manuales de Bergey's (1974, 1984 y 2000) y en tesis de pregrado de Bastias (1981) realizando las pruebas bioquímicas mencionadas, tales como: catalasa, prueba de reducción de nitratos, Voges Proskauer, citrato, reducción de azúcares tales como glucosa, manitol, arabinosa y almidón, forma de las colonias y observándose además el crecimiento en anaerobiosis. Una vez identificada la cepa de *Bacillus subtilis* se purificó en el medio tripticasa soya.



Figura 25. Pesado de 1g. de muestra de tierra para aislamiento de *B. subtilis*.

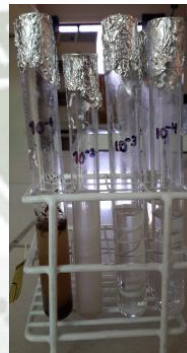


Figura 26. Diluciones seriadas de la tierra para sembrado en placa.

- **Aislamiento de *Aspergillus niger*.**

Para el aislamiento de *Aspergillus Niger*, se realizó en medio PDA, por medio de la resiembra en nuevo medio PDA y Sabouraud, a partir de una muestra de *Aspergillus* anteriormente almacenada. Después se permitió desarrollar el crecimiento del hongo y se repicó la cepa de *A. niger* para la purificación, en medio PDA y en agar maltosa sabouraud. Además se realizó la caracterización macroscópica y microscópica utilizando azul de lactofenol para la observación en el microscopio de conidios, hifas y esporas, posteriormente se almacenó la placa, con el hongo puro, en un lugar fresco y libre de luz.

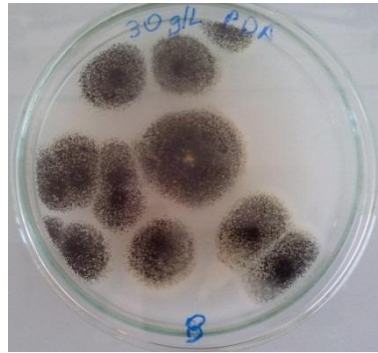


Figura 27. Aislamiento de *A. niger* nativo.

- **Aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Para el aislamiento de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo una muestra de malta en proceso de fermentación, para la producción de cerveza artesanal. Se suspendió 1 g de malta obtenida del fermentador, en 100 mL de agua destilada estéril, con agitación vigorosa por 30 s en el Vortex. Después se realizó diluciones seriadas de la muestra hasta 10^{-3} de concentración y posteriormente se tomó 0,1 mL de la dilución, la cual se sembró con un asa de Digrasky en placas con agar YPG y se incubaron durante 72 h a 37°C en la estufa. Terminado el crecimiento se realizó repique de las colonias que indicaron ser la levadura en estudio. Y también se determinó la presencia de *S. cerevisiae* mediante pruebas microscópicas con coloración Gram, pruebas bioquímicas de SIM, citocromo oxidasa y agar TSI (glucosa, lactosa y sacarosa).

Además se observó macroscópicamente las placas con las colonias de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo identificadas como estas.



Figura 28. Muestra de mosto cervecero para aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Aislamiento de *Zymomonas mobilis*.**

Para el aislamiento de la cepa *Zymomonas mobilis*, se utilizó una muestra de mosto de uva en estado de fermentación, se retiró 100 ml de la muestra y se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-3} y se tomó 0,1 ml de la dilución y se sembró en placas de Medio líquido de CELPG (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L, glucosa 20 g/L, cicloheximida 100 ppm, etanol al 3%, ajustar a pH 5 con ácido láctico) en tubos de Durham invertido y se incubó por 48 h a 37°C. Se determinó la presencia de *Z. mobilis* mediante la producción de gas CO₂. Posteriormente pruebas bioquímicas de catalasa, citocromo oxidasa, agar TSI (glucosa, lactosa y sacarosa), reducción de nitrato y SIM.



Figura 29. Preparación de mostro de uva para aislamiento de *Zymomonas mobilis* nativa.



Figura 30. Prueba de Durham con tubo invertido en medio CELMG para *Z. mobilis*.

b. Caracterización de los residuos celulósicos:

Se obtuvo 3 kg de bagazo de caña (resultante de la extracción de jugo) del mercado del Altiplano - Arequipa, y se lavó con agua estéril, se determinó la humedad del bagazo. Se colocó 10 g de cada muestra, previamente cortada en pedazos de aproximadamente de 5cm, en una cápsula y se colocaron a 150°C durante 2 h en la estufa hasta obtener peso constante. Se determinó el porcentaje de cenizas de las muestras, colocando la cápsula con la muestra empleada en la medición de humedad, en una mufla a 600°C durante 2 horas, se colocó en el desecador hasta su enfriamiento y se pesó. Para el caso del bagazo de malta, se obtuvo la muestra de la elaboración de cerveza artesanal, este bagazo fue igualmente lavado, se determinó su humedad y porcentaje de cenizas de la misma forma que el bagazo de caña de azúcar.



Figura 31. Pesado de bagazo de malta y bagazo de caña de azúcar.



Figura 32. Muestras de bagazo de caña de azúcar y bagazo e malta para determinación de humedad.

c. Pretratamiento de los residuos celulósicos:

Para una adecuada digestión de los residuos celulósicos, estos fueron sometidos a un pretratamiento mecánico y por vapor de agua a presión (autoclave). Se colocaron 500 g de bagazo de caña en un molino mecánico, con el cual se obtendrá partículas de 0,5 cm aproximadamente. Posterior a esto, se colocó toda la caña en una bolsa de polipropileno, y se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Este mismo tratamiento se aplicó para el bagazo de malta.



Figura 33. Preparación de las muestras de residuos a pretratar.

d. Acondicionamiento de las cepas *A. niger* y *B. subtilis* en el bagazo de caña y bagazo de malta con concentraciones de sales inductoras para la producción enzimática.

Se evaluó el crecimiento de *A. Niger* y *B. subtilis*, en medio con bagazo de caña y bagazo de malta por separado, mediante un cultivo en placas Petri. Para cada se cepa se pesaron 5 g de bagazo de caña esterilizada, cortada y molida con un tamaño de 0.5 cm aprox., se colocaron en la placa Petri previamente esterilizada, se humedeció el bagazo con el medio mineral del Tratamiento I de la Tabla 18 y se inoculó con una asada de la cepa en la parte central y en los cuatro puntos cardinales de la placa de cultivo con la cepa *A. niger*, igualmente en otra placa de bagazo de caña se inoculó con la cepa *B. subtilis*, realizándose el mismo procedimiento para los Tratamientos siguientes II, III y IV. Además se realizó el mismo procedimiento nombrado anteriormente para el bagazo de malta.

Se almacenaron dichas placas a temperatura ambiente para el *A. niger* y se incubó a 37°C para el *B. subtilis* bien rotuladas. Seguidamente se controlaron las placas mediante la observación del crecimiento macroscópico del *A. niger* en ambos bagazos.

Tabla 18. Sales a diferentes concentraciones para la inducción a producción de enzimas.

Tratamiento Sales	I	II	III	IV
Sulfato de amonio (%)	0.1	0.5	1	0
Sulfato de maganesio. (%)	0.5	1	2	0
Fosfato diácido de potasio. (%)	0.1	0.5	1	0

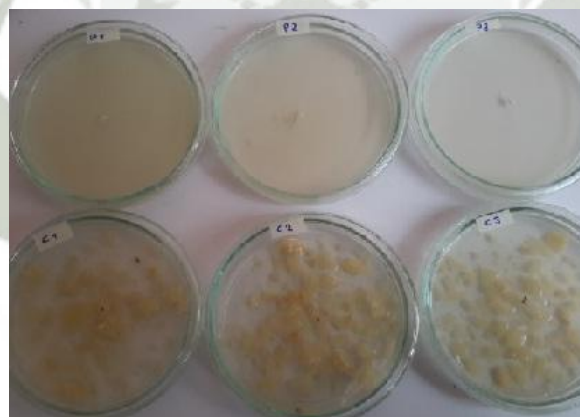


Figura 34. Preparación de las placas con bagazo de caña de azúcar para la siembra de *A. niger* y *B. subtilis*.

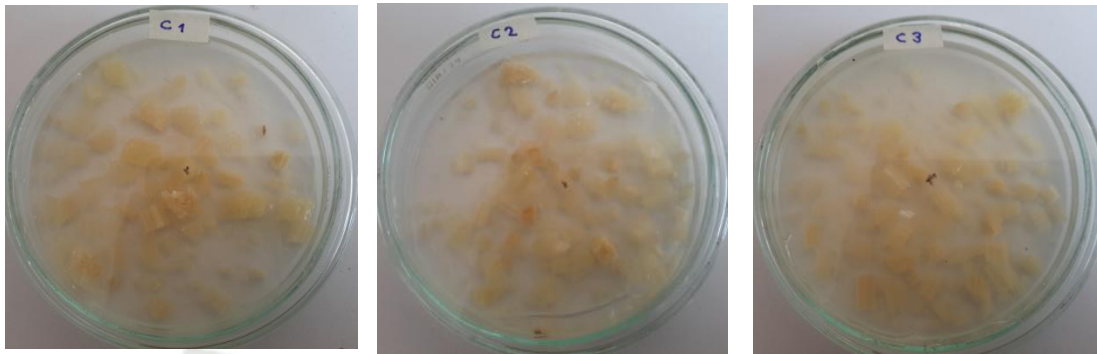


Figura 35. Siembra de *B. subtilis* en placas con bagazo de caña de azúcar.

e. Determinación de las cinéticas de crecimiento.

- **Cinética cepa *Bacillus subtilis*:** se tomó muestras cada 2 horas por 2 días, para ello se utilizó un frasco de vidrio estéril con tapa rosca la cual tenía 2 puertos, uno de ellos es el desfogue de CO₂ y el segundo puerto es de toma de muestra adherido a una manguera con una jeringa hipodérmica. Se preparó inóculos a partir de las cepas que presentaron mejores resultados en la etapa de acondicionamiento.

Para la temperatura de 37°C con bagazo de caña de azúcar: En el frasco de toma de muestra se colocaron 50 g bagazo de caña previamente molido de 0,5cm de diámetro, se diluyó en 600 ml de medio mineral que incluye los tres tratamientos de sales en cada frasco, y se esterilizó en la autoclave por 15 minutos a 121°C y 1,5 Bar. Después de la esterilización se inoculó cada frasco al mismo tiempo y a las mismas condiciones, a una concentración determinada previamente por la escala de Mc Farland, y se dejó en estado estacionario en un baño maría con termostato a 37° por dos días para las tomas de muestra, se retiraron 8ml de muestra con una jeringa hipodérmica y se almacenaron las muestras en tubos Falcon estériles de 15 ml.

Para la cinética a 27°C de *B. subtilis* se realizó de la misma manera que la primera temperatura, pero se controlaron con un termostato a la temperatura requerida. Para la temperatura siguiente se realizó del mismo modo, pero siempre controlando las

temperaturas con termostato, en el caso de la temperatura de 17°C se controló la temperatura con agua helada.

Para el caso de la cinética de *B. subtilis* pero con bagazo de malta, se realizó de la misma forma y en las mismas condiciones que el procedimiento anterior, aclarando que se realizó aparte en otro frasco de vidrio estéril.



Figura 36. Armado de los sistemas para las determinación de la cinética de *B. subtilis*.



Figura 37. Toma de muestras de los sistemas a 37°C.



Figura 38. Toma de muestra de los sistemas a 27°C.

- **Cinética cepa *Aspergillus niger*:** se tomó muestras cada 12 horas por 7 días, para ello se utilizó 1 frasco de vidrio estéril con tapa rosca en la cual tenía 2 puertos, uno de ellos es el desfogue de CO₂ y el segundo puerto es de toma de muestra adherido a una manguera con una jeringa hipodérmica.

Para la temperatura de 37°C: En el frasco de toma de muestra se colocó 50 g bagazo de caña previamente molido de 0,5 cm de diámetro, se diluye en 600 ml de medio mineral que incluye los tres tratamientos de sales en cada frasco, y se esteriliza en la autoclave por 15 minutos a 121°C y 1,5 Bar. Después de la esterilización se inoculó cada frasco al mismo tiempo y a las mismas condiciones, a una concentración determinada previamente por la escala de Mc Farland, y se dejó en estado estacionario en un baño maría con termostato a 37° por dos días para las tomas de muestra, se retiró 12 ml con una jeringa hipodérmica y se almacenó las muestras en tubos Falcon.

Para la cinética a 27°C de *A. niger* se realizó de la misma manera que la primera temperatura, pero se controló con un termostato a la temperatura requerida. Para las temperaturas siguientes se realizaron del mismo modo, pero siempre se controlaron las temperaturas con termostato, en el caso de la última temperatura de 17°C se controló la temperatura con agua helada.

Para el caso de la cinética de *A. niger* pero con bagazo de malta, se realizó de la misma forma y en las mismas condiciones que el procedimiento anterior, aclarando que se realizó aparte en otro frasco de vidrio estéril.

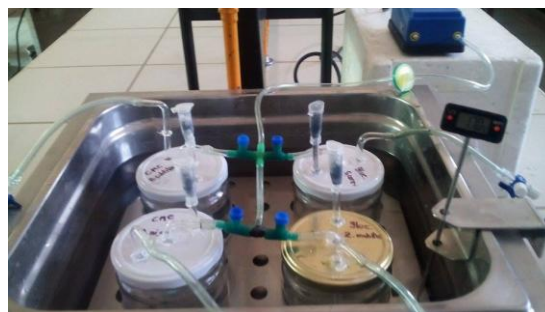


Figura 39. Sistemas de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 17°C



Figura 40. Sistema de medición de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 37°C.



Figura 41. Sistema de medición de cinéticas de las cuatro cepas en estudio a 27°C.

- **Cinética de *Saccharomyces cerevisiae* y *Z. subtilis*:** Se realizó para cada cepa por separado de la siguiente forma, se tomó muestras cada 4 horas por 3 días, para ello se utilizó 1 frasco de vidrio estéril con tapa rosca, para cada cepa por separado, en la cual tenía 2 puertos, uno de ellos es el desfogue de CO₂ y el segundo puerto es de toma de muestra adherido a una manguera con una jeringa hipodérmica.

En el frasco de toma de muestra se colocaron 300 ml de solución de glucosa al 1% y luego se inoculó en cada frasco para cada cepa *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* según la escala de Mc Farland. Para controlar el crecimiento de las cepas fermentadoras, se tomaron muestras cada 4 horas de cada frasco con las cepas en estudio. Y se almacenaron las muestras tomadas en tubos falcon estériles. Se determinó las cinéticas de crecimiento mediante el conteo en cámara de Neubauer a través del microscopio y también mediante medición de OD con espectroscopia.

f. **Producción de extracto enzimático en sustratos sólidos:**

Terminados los periodos de tiempo de la determinación de las cinéticas de las cuatro cepas en estudio, se realizaron nuevos sistemas para la determinación de la actividad enzimática. Estos nuevos sistemas solamente se realizaron para *Bacillus subtilis* y para *Aspergillus niger* los sistemas consistieron en un frasco de vidrio estériles para cada cepa de una capacidad de 1 L, además se pesaron 500 g de bagazo de caña de azúcar sus tapas son rosca hermética y poseían dos puertos, uno de inoculación y toma de muestra y otro de salida de gases, estos nuevos sistemas además se realizó estacionariamente, para el caso de *Bacillus subtilis* se realizó a temperatura de 37°C y para *Aspergillus niger* se realizó a 17°C. Lo mismo se realizó para el sistema con bagazo de malta y la mezcla de sustratos, así como también para ambas cepas. El tiempo de incubación y crecimiento fue según los resultados obtenidos en la etapa de determinación de las cinéticas. Se tomó 3 mL de muestra cada 6 horas para determinar su pH.



Figura 42. Sistema batch de *B. subtilis* a 37°C en bagazo de caña de azúcar.



Figura 43. Sistema batch de *A. niger* a 17°C en bagazo de caña de azúcar.

A continuación, de acuerdo al tiempo que obtuvimos en los resultados, para la determinación de la actividad enzimática se realizó un lavado el bagazo de caña y el bagazo de malta de ambos sistemas de las dos cepas, por separado en diferentes recipientes de vidrio estériles, con tritón 10X y se centrifugó el líquido obtenido del lavado de ambos bagazos a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se rotuló correctamente para cada caso, luego se determinó la presencia de actividad enzimática de los mismos, mediante la degradación de los polisacáridos empleando el método descrito por Miller (1959) modificado.



Figura 44. Lavado del bagazo de caña de azúcar después del sistema batch con *Bacillus subtilis*.



Figura 45. Lavado del bagazo de caña de azúcar después del sistema batch con *Aspergillus niger*.

g. Determinación de celulasas:

Se separó 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensayo. Adicionalmente, se colocó 2 mL de una solución de CMC al 1% en buffer glicina-hidróxido de sodio 0,05 M, pH 9,0. Se incubó a 50°C durante 10 min. Se adicionó 4 mL de ácido tricloro acético 0,3 M, para detener la reacción, y 7 mL del reactivo DNS. Se hirvió por 5 minutos y se enfrió durante 45 minutos.

Se determinó la presencia enzimática con la aparición de cambio de color, de amarillo a rojo. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro, a 510nm. Se calculó en todas las muestras mediante el uso de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración. La medición de actividad total de celulasa, se calculó con la siguiente fórmula:

$$U/g = \frac{\text{Concentración glucosa producida} \times \text{Volumen ensayo} \times \text{Factor dilución}}{\text{Volumen enzima} \times \text{Factor extracción} \times \text{Tiempo ensayo}}$$

Para el caso de *B. subtilis*, se controló del mismo modo el crecimiento sobre ambos bagazos por separado.

Después de 5 días de inoculación, se lavó el bagazo de caña y el bagazo de malta por separado en diferentes recipientes de vidrio estériles, con tritón 10X y se centrifugó el líquido obtenido del lavado de ambos bagazos a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Se rescató el sobrenadante y se rotuló correctamente para cada caso. Luego se determinó la presencia de actividad enzimática de los mismos, mediante la degradación de los polisacáridos empleando el método descrito por Miller (1959) modificado.

h. Diseño, construcción y funcionamiento del bioreactor para la obtención del extracto enzimático, digestión enzimática y fermentación.

Se diseñó y construyó el sistema de fermentación, empleando un frasco de vidrio de una altura de 40 cm y un diámetro de 15 cm, el cual contó con un head plate con 6 puertos, los cuales fueron empleados para inoculación, aireación, inoculación de cepa fermentadora, toma de muestra y control de humedad. Se implementó un baño maría, conteniendo agua destilada, con un calentador con termostato de 200 w.

- **Etapas de producción de extracto enzimático:** Se colocó 500 g de bagazo de caña triturado, suplementado con la concentración de sales adecuada (determinada en el Método d). Se ajustó el pH del sistema a 7,0 con NaOH 1 M (Ariffin H. *et. al.* 2006). Se controló la temperatura del sistema mediante la regulación del termostato, estableciendo

el sistema de *B. subtilis* en 37°C. Para la inoculación de *Bacillus subtilis*, se preparó 10 mL de caldo mineral con el bagazo de caña y malta por separado, los cuales fueron incubados a 37°C, durante 24 horas. Se ingresó por el puerto de inoculación. El sistema se evaluó durante 4 días. Para la inoculación de *Aspergillus*, se preparó 10 mL de caldo mineral, que se incubó a temperatura ambiente. Se evaluó el sistema por un periodo de 6 días. Se llevó a cabo el mismo procedimiento en el sistema que empleó bagazo de malta y la mezcla de estos, como sustrato sólido. Finalizado el tiempo de evaluación, se procedió a realizar un lavado del sustrato sólido de cada sistema con Triton 10X, reteniendo el lixiviado en frascos de vidrio estériles. Posteriormente se procedió a la separación del extracto enzimático del resto del lixiviado, para ello se centrifugó el lixiviado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recolectado en recipientes estériles y almacenado a 4°C.

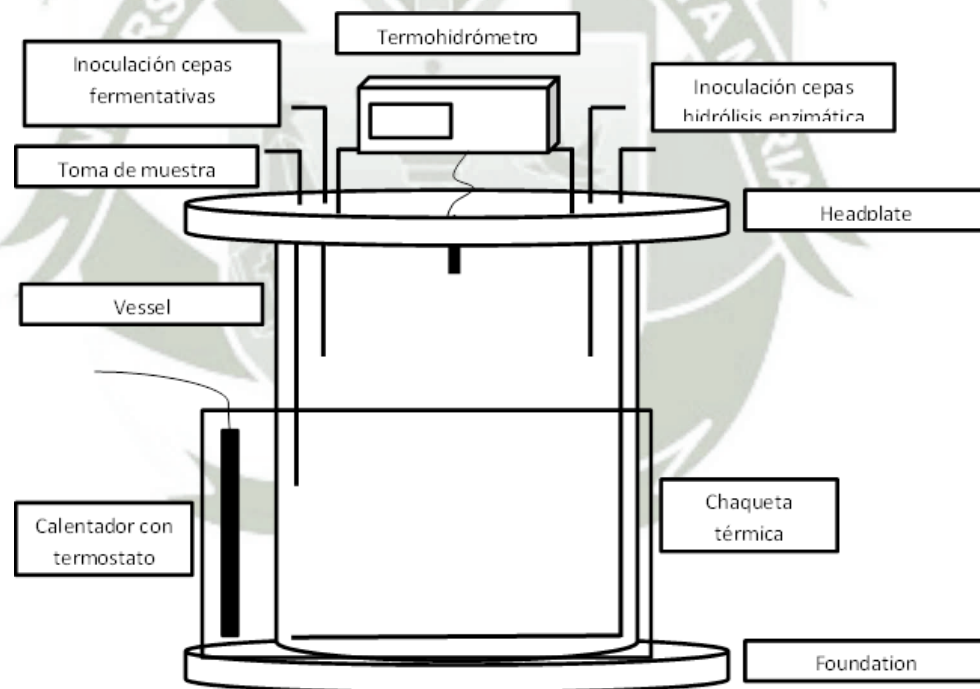


Figura 46. Diseño del bioreactor.

Fuente: Elaboración propia.2015.

i. **Inmovilización de extracto enzimático:**

Se procedió a inmovilizar el extracto enzimático obtenido de los 4 sistemas, en alginato de calcio. Se mezcló 200 mL de alginato de sodio al 3,0% p/v preparados en buffer acetato (0,05M pH 4) con 200 mL de extracto enzimático en el mismo buffer para formar una solución. La solución se agregó gota a gota sobre 500 mL de CaCl_2 al 1,0 M en agua, con agitación constante a temperatura ambiente para lograr la formación de esferas. Las esferas se dejaron en la solución por 15 minutos con agitación constante y a temperatura ambiente, se filtraron y se lavaron con agua destilada estéril dos veces. Se almacenaron en agua destilada a 4°C hasta su uso.



Figura 47. Extracto enzimático inmovilizado de *A. niger* en pellets de alginato de calcio



Figura 48. Extracto enzimático inmovilizado de *B. subtilis* en pellets de alginato de calcio

Etapa de digestión enzimática: Se procedió a la implementación del sistema para la digestión enzimática de acuerdo a la tabla 19.

Tabla 19: Contenido de cada sistema para la digestión enzimática

	Sistema I		Sistema II		Sistema III	
	Ext. Libre	Ext. Inmovilizado	Ext. Libre	Ext. Inmovilizado	Ext. Libre	Ext. Inmovilizado
Bagazo de caña (g)	500	500	-	-	250	250
Bagazo de malta (g)	-	-	-	-	250	250
Agua (mL)	500	500	500	500	500	500
Ext. Enz. Libre (mL)	100	-	100	-	100	-
Ext. Enz. Inmov (mL)	-	100	-	100	-	100

j. Fermentación y obtención de bioetanol con *S. cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*.

Se llevó a cabo la fermentación de los residuos celulósicos previamente tratados con los extractos enzimáticos libres e inmovilizados de las cepas *Bacillus subtilis* y *A. niger*, para la obtención de bioetanol mediante el empleo de cepas fermentadoras. Se empleó el sistema descrito en el método g. En cada sistema, se adicionó, 50 mL de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* y 50 mL de inóculo de *Zymomonas mobilis*, inóculos preparados en caldo mineral, incubados a 37°C durante 24 horas. Se evaluó el sistema durante 72 horas.

k. Obtención y concentración del bioetanol obtenido.

- Finalizado el tiempo de fermentación, de los tres sistemas, bagazo de caña de azúcar, bagazo de malta y bagazo de caña de azúcar y malta juntos, se procedió a la separación del etanol obtenido. Se colocó 250 mL del líquido obtenido del sistema, en un balón de destilación de 500 mL, conectado a un refrigerante. Se calentó a 78°C para conseguir la ebullición del etanol, y se recolectó en un matraz de 250 mL conectado en el extremo inferior del refrigerante.



Figura 49. Destilación y concentración del etanol a partir de la fermentación.

I. Determinación de la presencia de etanol:

Finalizada la destilación del contenido de los 3 sistemas de cada extracto enzimático y recolectado el destilado, se procedió a confirmar la presencia de etanol en este. Esto se realizó mediante la prueba cualitativa del dicromato de potasio. Se añadió 1 mL del destilado en un tubo de ensayo y se adicionó 3 mL de solución sulfocrómica previamente preparada (Anexo 5), y 2 mL de una solución de carbonato de potasio saturada (1g/mL). Finalmente se incubó a 100°C en baño maría durante 15 minutos. Se apreció la presencia de coloración producto de la reacción de la reacción entre el etanol y el dicromato de potasio en condiciones especiales.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Recolección y selección de residuos

De todo el material recolectado, se seleccionó los bagazos que poseían menor cantidad de nodos, los cuales dificultarían su posterior procesamiento y tratamiento, debido a la dureza de estos, así como también se seleccionó aquellos que presentaron color homogéneo y ausencia de suciedad.

En el caso del bagazo de malta, no fue necesaria la selección de los residuos recolectados, debido a su homogeneidad y al cuidado aséptico empleado en el proceso de elaboración de cerveza artesanal.

b. Aislamiento de *Bacillus subtilis*

Los resultados mostrados en la tabla 20, detalla la morfología macroscópica observada (Figura 50), la cual coincide con la descrita en la investigación realizada por Realpe y colaboradores en el 2001, para la identificación de géneros de *Bacillus*.⁶⁷

Tabla 20. Características macroscópicas de las colonias aisladas de *B. subtilis*

CEPA	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	
<i>Bacillus subtilis</i>	Características	Colonias blancas, redondas, convexas
	Tamaño	Pequeñas
	Borde	Regular
	Apariencia	Ligeramente Elevadas



Figura 50. Agar TSA con cultivo de *B. subtilis*

En la Figura 51 se muestra la observación microscópica (realizada con tinción Gram con lente de aumento 100x) la cual asimismo, se asemeja con la morfología descrita por Logan en 1999, quien describe a *Bacillus subtilis* como una cepa gram positiva, formadora de esporas.⁶⁸

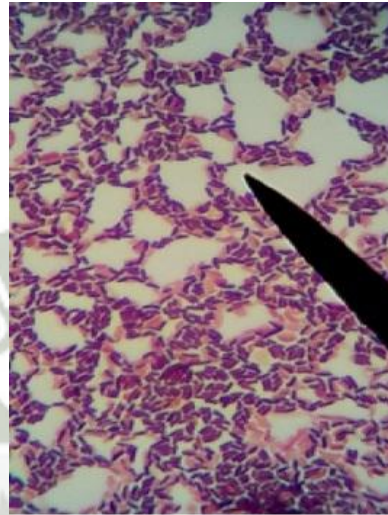


Figura 51. Micrografía con microscopio con lente 100x de *B. subtilis*

c. Pruebas bioquímicas del aislamiento de *B. subtilis*

En la tabla 21, se observa los resultados obtenidos en el proceso de identificación bioquímica de las colonias aisladas. Se aprecia la selección de las cepas obtenidas mediante la confirmación de sus características bioquímicas, las cuales otorgan igualdad a las expuestas en el manual de Bacteriología Sistémica de Bergey's (Anexo 1) y con la investigación realizada por Koneman y colaboradores en 1997, donde indican que *Bacillus subtilis* es una cepa fermentadora de azúcares, evidenciado en el medio TSI (Figura 52.A), así como también, al poseer flagelos peritricos, posee movilidad (Figura 52.B), asimismo, Kyong y colaboradores en 2005, indica que es una cepa productora de la enzima ureasa, necesaria para el reciclaje de nitrógeno ambiental, lo cual se aprecia en el resultado (Figura 52.C. También se indica que esta cepa es productora de 2,3 butanodiol, lo cual se evidencia en la prueba de MR-VP (Figura 52.D), este resultado es corroborado por Parés y Juárez en 1997. Se indica

que esta cepa no es productora de la exoenzima gelatinasa, como se evidencia en la prueba (Figura 52.E), coincidiendo este resultado con el expuesto por Olivas y Alarcón en 2004.

Tabla 21. Resultados de las pruebas bioquímicas de *B. subtilis*

Pruebas bioquímicas	Resultados
Amilasa	Positivo
Voges-Proskauer	Positivo
Citrato Simmons	Positivo
Crecimiento en NaCl 6.5%	Positivo
Ureasa	Positivo
TSI	A/A CO ₂ (+) H ₂ S (-)
SIM	Indol (+) Motilidad (+) H ₂ S (-)
Test de Nitratos	Positivo
Licuefacción de gelatina	Negativo
Manitol Salado	Positivo

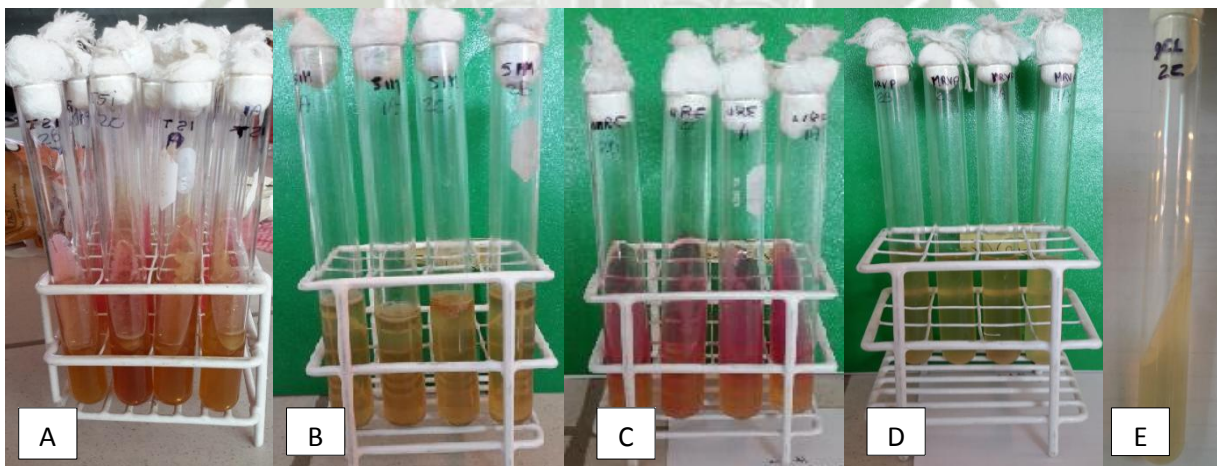


Figura 52. A) Prueba de TSI, B) Prueba SIM, C) Prueba de Ureasa, D) Prueba Voges-Proskauer, E) Prueba de Licuefacción de gelatina

Según Bergey's, es productor de amilasa, corroborado con una prueba de lugol en agar almidón post cultivo (Figura 53). Del mismo modo, esta cepa se desarrolla presencia de manitol, lo cual se confirmó mediante el viraje del medio Manitol Salado, a color amarillo (Figura 54).



Figura 53. Prueba de amilasa en agar Almidón



Figura 54. Agar Manitol Salado

d. Aislamiento de *Aspergillus niger*.

- **Caracterización morfológica de *A. niger*:** Como resultado del aislamiento en placas Petri con agar Papa Dextrosa (PDA), se apreció el crecimiento de colonias de color negro con apariencia algodonosa, y tonalidades amarillas en el anverso de la placa. Al sexto día de incubación en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad, se apreció un

crecimiento radial de 10-15 mm, formación de micelio aéreo superficial. Estas características, junto a las microscópicas afirman lo mencionado por Gilman (1957) y CABI (2003) para la especie de hongo *Aspergillus niger*.



Figura 55. Identificación macroscópica de cepa en placas con medio PDA

Al realizar observaciones microscópicas para la identificación de *A. niger*, se observó estructuras vegetativas, conidióforo liso y recto, una vesícula recubierta por abundantes conidios, características que son similares al estudio realizado por Zambrano et al (1996) Finalmente con esta observación y la identificación macroscópica se confirmó el aislamiento de *A. niger*.



Figura 56. Estructura microscópica de *A. niger* observadas con un lente de aumento 40x

e. Aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*

En los resultados que se muestran en la tabla 22, se describe la morfología de las colonias observada de las cepas aisladas.

Tabla 22. Características macroscópicas de las colonias aisladas de *S. cerevisiae* y *Z mobilis*

Cepa	Morfología de las colonias	
Zymomona mobilis	Características	Colonias blancas, redondas, convexas
	Tamaño	Pequeñas
	Borde	Regular
	Apariencia	Ligeramente Elevadas
Saccharomyces cerevisiae	Características	Colonias amarillentas/canela, redondas, convexas
	Tamaño	Medianas
	Borde	Irregular
	Apariencia	Elevadas

En la Figura 57, se muestran los resultados gráficos de las características microscópicas realizadas con tinción Gram con lente de aumento 100x, y las características macroscópicas. Estos resultados macroscópicos y microscópicos coinciden con las investigaciones de Garzón y Hernández en 2009, que nos indican que *Saccharomyces cerevisiae* presenta colonias amarillentas, con bordes irregulares (Figura 57.A) y presenta una tinción violeta oscura con coloración gram (Figura 57.B).

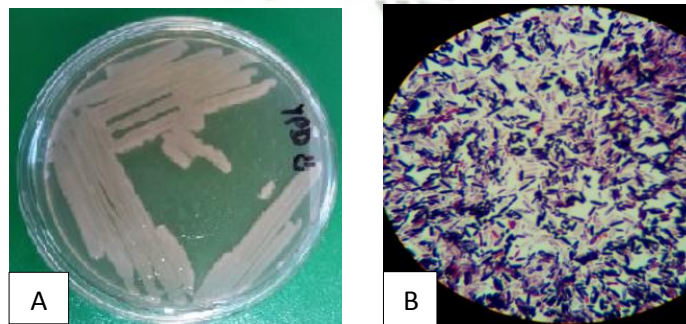


Figura 57. Crecimiento en medio YPD (A) y micrografía con microscopio con lente 100x de *S. cerevisiae*. (B)

En la Figura 58.A se observa el crecimiento de *Z. mobilis* en medio CELMG, donde se observan colonias redondas, blanquecinas, convexas y con borde regular. En la figura 58.B, se aprecia la vista microscópica con amplificación 1000X de *Z. mobilis*, donde se aprecia células con forma abastionada, gram negativas. Estos resultados coinciden con los presentados por Rogers y Skotnicki en su investigación sobre *Z. mobilis* en 1982, y Chen y Agrawal en 2012.

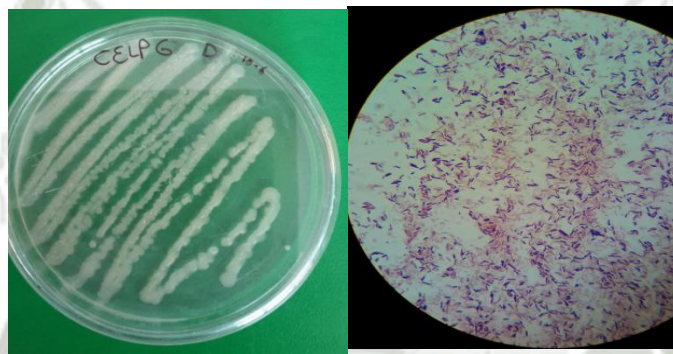


Figura 58. Crecimiento en CELMG (A) y micrografía con lente 100x de *Z. mobilis* (B)

f. **Pruebas bioquímicas del aislamiento de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis***

En la tabla 23, se presenta los resultados obtenidos en el proceso de identificación bioquímica de las colonias aisladas, en donde dichos resultados estar acorde con los trabajos de Matiz (2000), clasificando el género *Zymomonas*, especie *mobilis*.

Tabla 23. Resultados de la identificación bioquímica de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*

Microorganismo	Pruebas bioquímicas	Resultados
<i>Z. mobilis</i>	Catalasa	Positivo
	Citocromo Oxidasa	Negativo
	Test de Nitratos	Positivo
	SIM	Indol (-) Motilidad (-) H2S (-)
	TSI	A/A Co2 (+) H2S (-)
<i>S. cerevisiae</i>	SIM	Indol (-) Motilidad (-) H2S (-)

	Citocromo Oxidasa	Negativo
	TSI	K/A Co2 (+) H2S (-)

g. Caracterización de residuos celulósicos

Se determinó que la humedad del bagazo de caña fue de 47,18%, resultado comparable con el obtenido por Espinosa y colaboradores en 1990, donde nos indican que la humedad de este sustrato oscila entre 45-50%. Asimismo se obtuvo como resultado de la determinación de cenizas, un valor de 3.64%, valor similar al obtenido en investigaciones realizadas por Díaz en 2008 (4,11%) y Valdez y San Carlos (3,98%).

Se determinó que el contenido de humedad del bagazo de malta fue de 81,52%, resultado ligeramente mayor al obtenido en investigaciones por Calsamiglia y colaboradores en 2004, donde indica que el valor de este residuo varía entre 70-85%, esto debido al alto grado de retención de agua de la malta, por su estructura. Como resultado de la determinación de cenizas, se obtuvo que el bagazo de malta posee un 4.1%, resultado similar al obtenido por Ferret en el 2004, donde indica valores de ceniza de 3,53% y 3,85%.

h. Pretratamiento de residuos celulósicos

Como resultado del pretratamiento del bagazo de caña, se obtuvo partículas de 0,5 a 0,6 cm de longitud, adecuadas para incrementar la superficie de contacto entre las cepas encargadas de la hidrólisis enzimática y el sustrato, esto sin alcanzar un grado de acumulación que no permita el desarrollo de la cepa entre cada partícula. Posterior al autoclavado, la consistencia se tornó más blanda. El bagazo de malta únicamente sufrió una ligera disminución de su dureza, producto del autoclavado.

i. Acondicionamiento de cepas *A. niger* y *B. subtilis*

Se apreció el crecimiento radial de *A. niger*, para determinar el efecto del crecimiento sobre sales inductoras de producción enzimática, donde se apreció que, tanto sobre bagazo de caña y bagazo de malta, el efecto del tratamiento II tuvo un mayor crecimiento miceliar (Tabla 24). Asimismo, con *B. subtilis*, el crecimiento invasivo de la cepa, fue superior en el tratamiento II, sobre ambos sustratos. Todos estos resultados corroboran lo expuesto por Torres en 2009 y Alcarraz y colaboradores en 2007, quienes indica que una concentración de

sulfato de amonio y fosfato diácido de potasio alrededor de 0,1 y 1%, y una concentración de sulfato de magnesio alrededor de 0,2 y 2%, mejoran el crecimiento y la producción de enzimas hidrolíticas de estas cepas.

Tabla 24: Crecimiento Radial de *A. niger* y *B. subtilis*

Cepa	Tratamientos	Tiempo										
		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
A. niger (cm)	I	0,5	0,5	1,5	2,4	3,3	4,6	5,4	7,1	8,4	10	10
	II	0,5	0,6	1,7	2,8	4,2	7,5	9,4	10	10	10	10
	III	0,5	0,5	1,6	2,5	3,1	4,2	4,9	6,8	7,9	10	10
	IV	0,5	0,5	1,4	2,3	2,9	3,7	5,1	6,3	7	8,6	10
B. subtilis (cm)	I	0,5	0,8	2	4,5	5,5	7,9	8,5	10	10	10	10
	II	0,5	0,9	2,2	5,1	6,9	8,1	10	10	10	10	10
	III	0,5	0,8	1,9	4,3	5,3	6,5	8	9,3	10	10	10
	IV	0,5	0,8	1,8	3,8	4,6	5	6,6	8,1	9,6	10	10

j. Determinación de las cinéticas de crecimiento de *A. niger*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*

En las figuras se aprecia la velocidad de crecimiento de las cepas en estudio. Las curvas correspondientes a las cinéticas de crecimiento, presentaron una corta etapa de latencia, debido al suministro de sustrato rico en carbohidratos y proteínas que reactivan el metabolismo y división celular. Con el consumo y agotamiento constante del sustrato empieza la fase estacionaria de los microorganismos, lo cual sucede a partir del tercer día en el caso de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, del segundo día en el caso de *Bacillus subtilis* y *Zymomonas mobilis*, esto debido al metabolismo más lento del hongo y levadura. Cervantes (2007), menciona que la respuesta positiva en la proliferación de microorganismos se asocia al aporte de aminoácidos, vitaminas y cofactores liberados a medida que las células llegan a la fase de muerte y se lisan, llegando a la fase críptica.

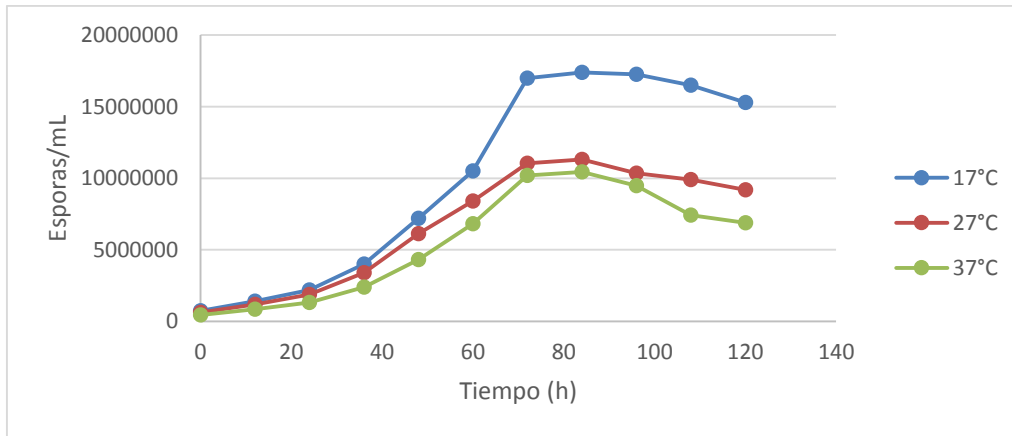


Figura 59. Curva de crecimiento de *A. niger* en mezcla de sustratos

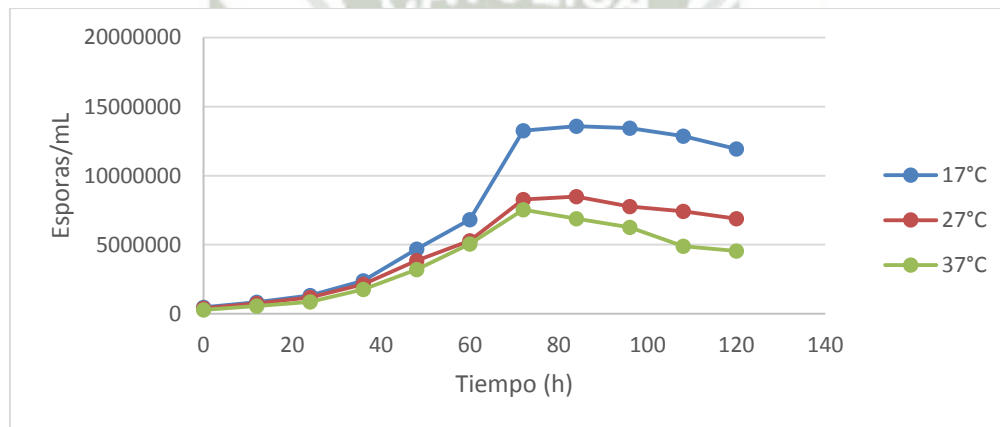


Figura 60. Curva de crecimiento de *A. niger* en bagazo de caña

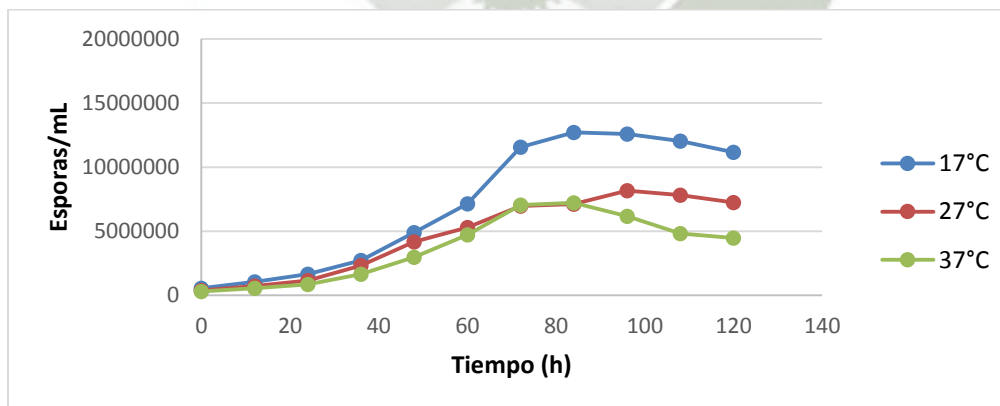


Figura 61. Curva de crecimiento de *A. niger* en bagazo de malta

Se aprecia que la cepa alcanza su fase estacionaria a las 72 horas, al tratarse de una cepa fúngica, el crecimiento miceliar es lento, debido al requerimiento de esporulación que estas cepas poseen para su crecimiento. Asimismo se observa que el crecimiento es mayor a 17°C, temperatura dentro del rango óptimo, descrito por Bergey en el Manual de Bacteriología Sistémica.

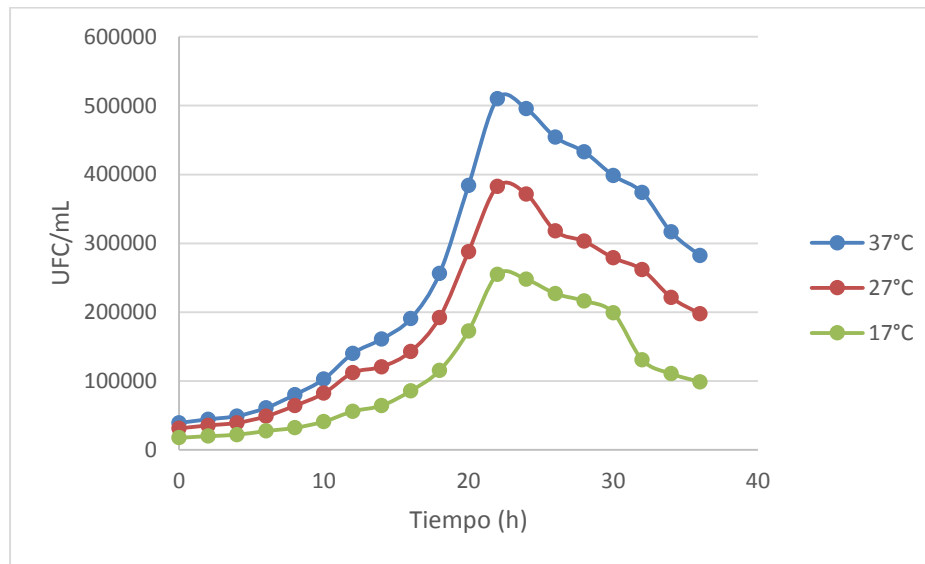


Figura 62. Curva de crecimiento de *B. subtilis* en bagazo de malta

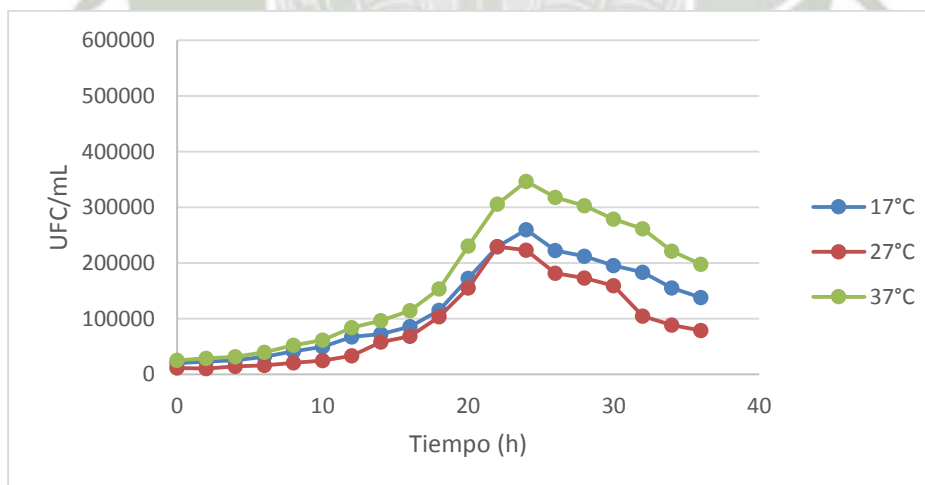


Figura 63. Curva de crecimiento de *B. subtilis* en bagazo de caña

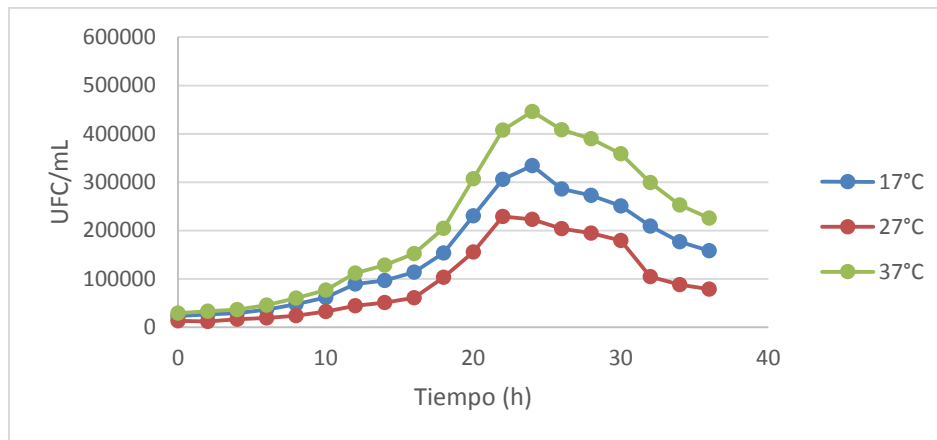


Figura 64. Curva de crecimiento de *B. subtilis* en mezcla de sustratos

Se aprecia una etapa estacionaria a las 22 horas, al ser una cepa bacteriana, posee un tiempo de crecimiento más corto.

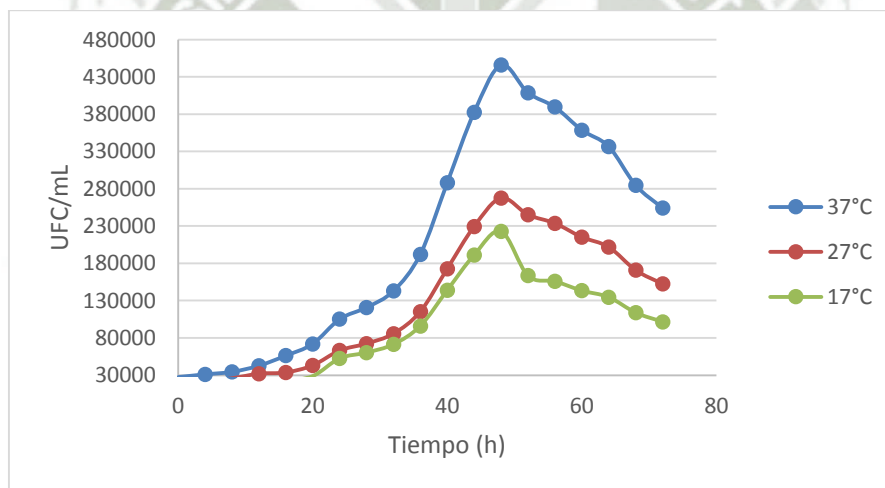


Figura 65. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*

Presenta una etapa estacionaria a las 48 horas, lo cual coincide con las investigaciones de Garzón y Hernández en 2009, quienes indican que la etapa de máximo crecimiento de esta cepa se da entre las 40 y 48 horas, donde finaliza su etapa exponencial.

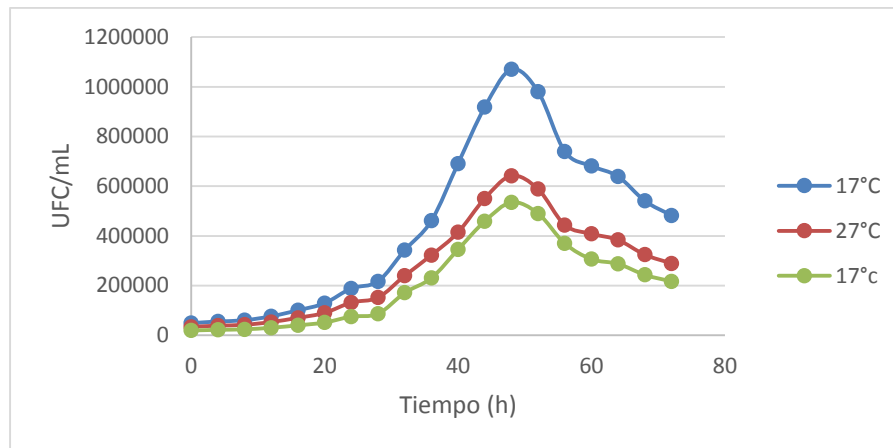


Figura 66. Curva de crecimiento de *Z. mobilis*

Esta cepa presenta una etapa exponencial que finaliza a las 48 horas, de manera similar a *S. cerevisiae*, a diferencia que al tratarse de una bacteria, posee mayor velocidad de reproducción, lo cual se ve reflejado en la cantidad de UFC/mL en las cinéticas a comparación de *S. cerevisiae*.

k. Evaluación del extracto enzimático de *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*, en bagazo de caña, bagazo de malta y mezcla de estos, obtenido a diferentes concentraciones de sales inductoras.

Para la determinación de la cantidad de azúcares reductores generados durante la digestión o hidrólisis enzimática del bagazo de caña, bagazo de malta y mezcla de estos, se utilizó el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) o también llamado Método de Miller (1959). Al ser comparados los datos con los obtenidos por Matiz et al (2002), se indica un resultado correspondiente al 50-60% de azúcares totales, lo que prueba que puede ser empleado como un sustrato alternativo enriquecido y favorece el crecimiento y producción de catalizadores de origen biológico.

A diferencia de la hidrólisis producida por agentes ácidos, las cepas del género *Aspergillus* y *Bacillus*, permiten obtener una mayor cantidad azúcares reductores para la posterior fermentación, ya que estos microorganismos poseen la capacidad de producir enzimas

celulásicas de tipo endoglucanasas, que rompen los enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa, tal como es manifestado por Bou (2004).

Como resultado de la evaluación del extracto enzimático, se determinó mediante el método de Miller (1959), que el tratamiento II de sales inductoras es el que mayor actividad total de celulasas presentó, en ambas cepas, únicamente difiriendo en el sustrato sobre el cual se obtuvo, siendo estos bagazo de malta y bagazo de malta + bagazo de caña, para *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*, respectivamente.

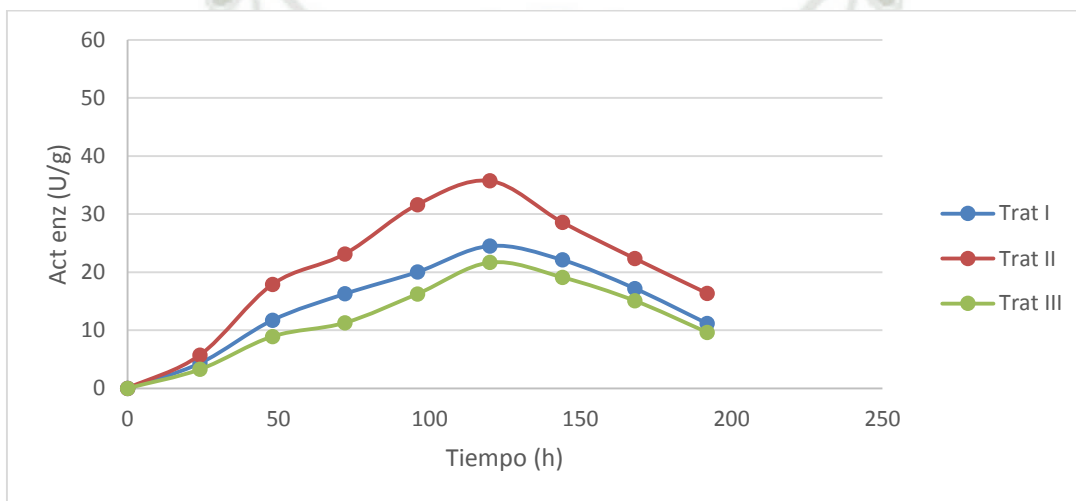


Figura 67. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Bacillus subtilis* con Trat. I, II y III en bagazo de caña

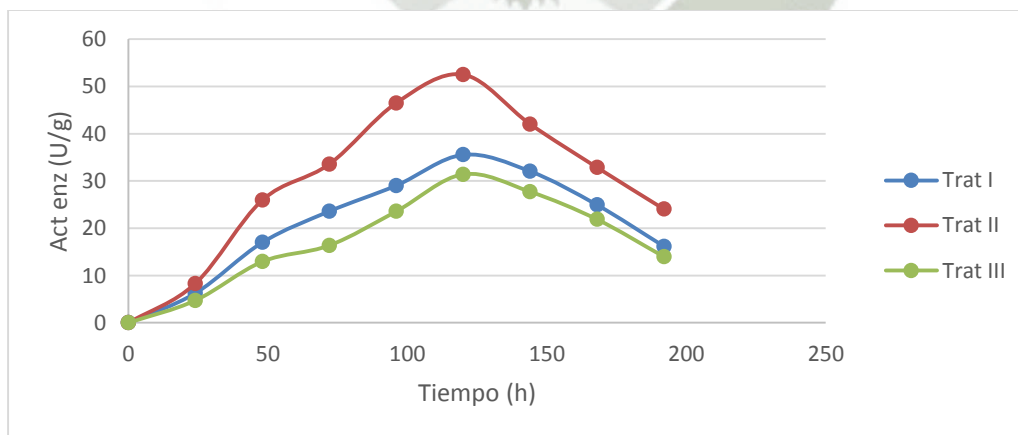


Figura 68. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Bacillus subtilis* con Trat. I, II y III en bagazo de malta

Se aprecia que el tratamiento II, otorga un aumento considerable en la actividad enzimática, tanto en bagazo de malta y bagazo de caña, tal como se aprecia en las figuras 63-64, correspondiente *B. subtilis*, esto corrobora los resultados obtenidos por Torres en 2009. Además se aprecia que se obtuvo un valor mayor en el sistema que empleo bagazo de malta como sustrato.

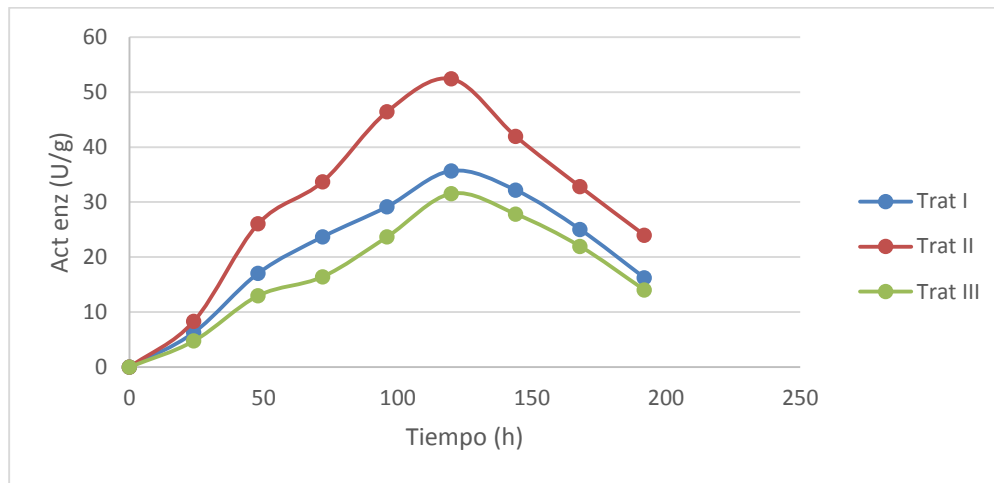


Figura 69. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Aspergillus niger* con Trat. I, II y III en bagazo de malta

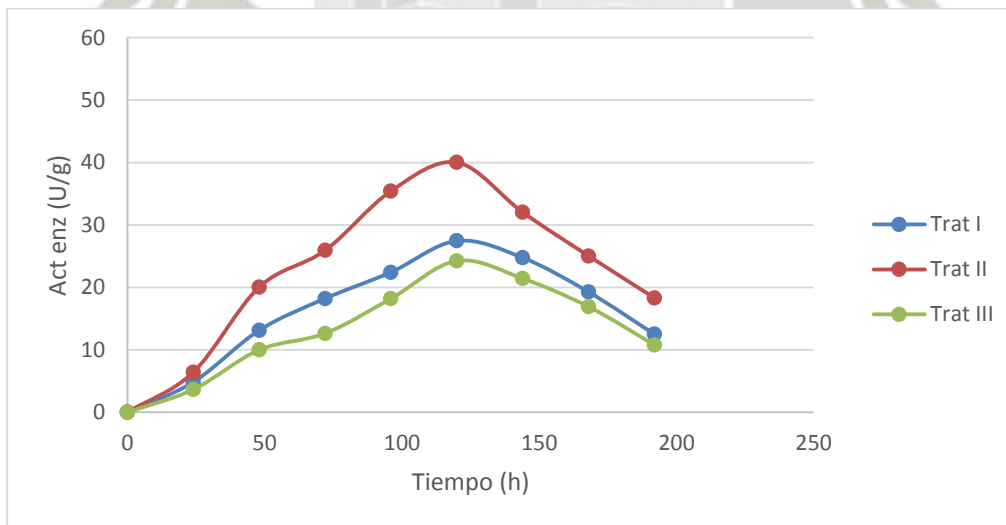


Figura 70. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Aspergillus niger* con Trat. I, II y III en bagazo de caña

Del mismo modo que en *B. subtilis*, se aprecia que el tratamiento II posee mayor incremento en el extracto obtenido a partir de *A. niger*, el cual se evidencia en las figuras 65 y 66. Además se aprecia que se obtuvo un mayor valor en el extracto obtenido en bagazo de malta.

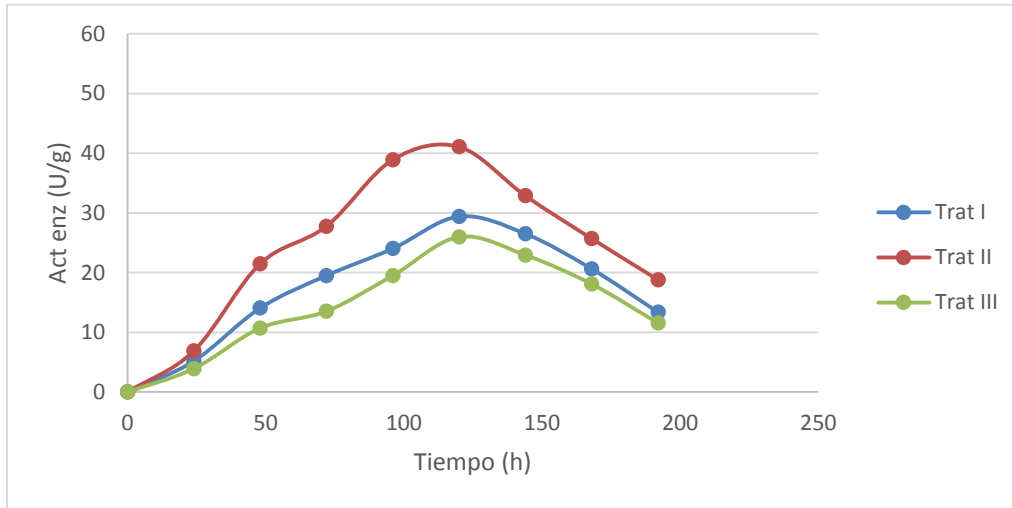


Figura 71. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Bacillus subtilis* con Trat. I, II y III en bagazo de caña + bagazo de malta

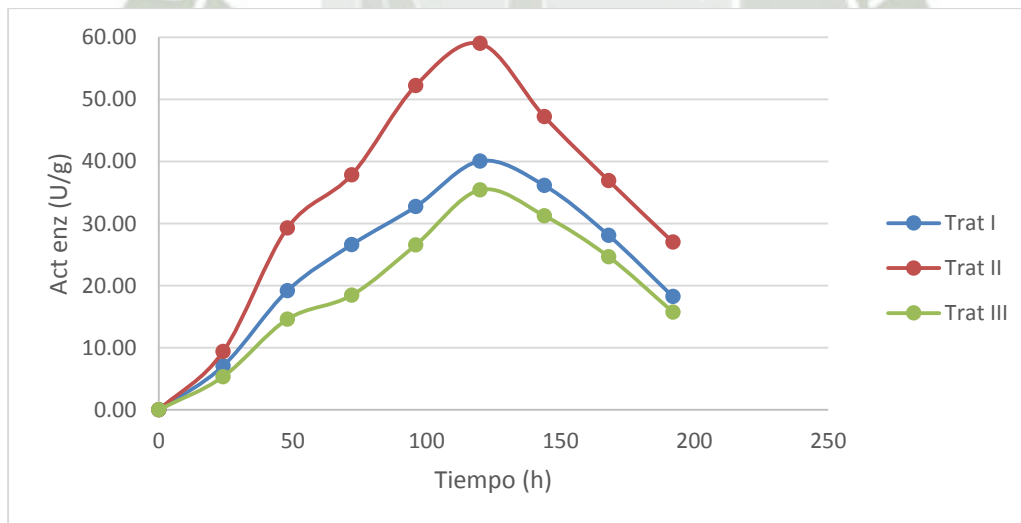


Figura 72. Valores promedio de actividad enzimática de extracto obtenido de *Aspergillus niger* con Trat. I, II y III en bagazo de caña + bagazo de malta

Al combinar ambos sustratos en proporciones 1:1, se aprecia que se obtuvo un resultado mayor que en los sustratos por separado, en el caso de *A. niger*, mientras que en el caso de *B. subtilis*, el mayor valor se apreció en el sistema en bagazo de malta.

l. Inmovilización de extracto enzimático:

Finalizada la inmovilización con alginato de calcio, se un volumen de pellets de diámetro 0,4-0,6 cm. Los cuales fueron refrigerados a 4°C hasta ser empleados para la digestión enzimática.

m. Funcionamiento del bioreactor para la digestión enzimática y fermentación.

La previa digestión enzimática llevada a cabo en el bagazo de malta, bagazo de caña y mezcla de estos por el extracto obtenido a partir de *A. niger* y *B. subtilis*, permitió un incremento considerable de azúcares fermentables por el consorcio formado por *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*. Según lo expuesto por Cervantes (2007), en un proceso fermentativo se dan tres tipos de fermentación, ácida, alcohólica y viscosa. La interacción de las tres determina el incremento en la biomasa del sistema, consumo de azúcares, proteínas y formación de etanol que dan un aspecto viscoso cuando se conforman todos estos productos. En el proceso de obtención de bioetanol, *Z. mobilis* emplea la ruta metabólica Entner-Doudoroff (Anexo 3), y *S. cerevisiae* utiliza la ruta metabólica de la glicólisis (Anexo 4), para completar el metabolismo energético. El piruvato, como producto final de las rutas metabólicas, se convierte a etanol mediante la acción de las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. A diferencia de la hidrólisis producida por agentes ácidos, las cepas del género *Aspergillus* y *Bacillus*, permiten obtener una mayor cantidad azúcares reductores para la posterior fermentación, ya que estos microorganismos poseen la capacidad de producir enzimas celulásicas de tipo endoglucanasas, que rompen los enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa, tal como es manifestado por Bou (2004). Luego de la evaluación del sistema durante la digestión enzimática, se determinó que hubo un incremento en la cantidad de azúcares presentes en el sistema, esto se determinó mediante el método de Miller (1959). En la figura 74, se puede apreciar el incremento en la cantidad de azúcares reductores.



Figura 73. Biorreactor de digestión enzimática

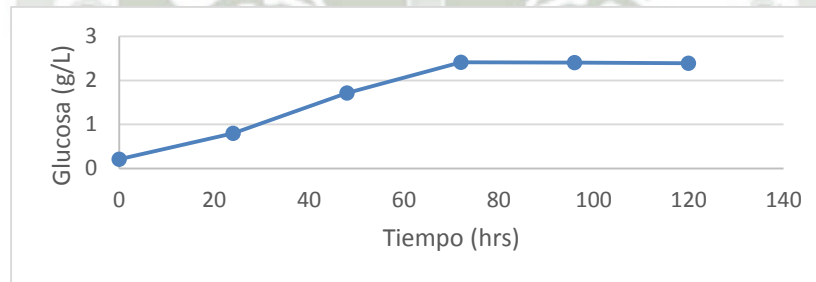


Figura 74. Concentración de azúcares reductores en el sistema de hidrólisis enzimática

Al presenciar el aumento de azúcares en el sistema de digestión, se evidenció el efecto del extracto enzimático sobre el sustrato celulósico, permitiendo la presencia de una mayor cantidad de azúcares fermentables por el consorcio empleado.

n. Obtención y concentración del bioetanol obtenido

Finalizado el tiempo de digestión enzimática y fermentación, se llevó a destilación el contenido del bioreactor, donde se obtuvo un total de 150 mL de destilado en el sistema de . Se alcanzó concentraciones de bioetanol similares a las reportadas en investigaciones por Monsalve (2006), donde se obtuvo 225 mL en 8 días, trabajando en un menor tiempo de fermentación (5 días).



Figura 75. Obtención de bioetanol por destilación simple

o. Determinación cualitativa de la presencia de etanol:

Finalizado el tiempo de incubación, se observó la presencia de color verde en los tubos de ensayo, diferenciándose entre cada sistema (Tabla 25), producto de la reacción óxido-reducción del etanol y el dicromato de potasio. Esta coloración coincide con los resultados obtenidos por Ramos y Martínez en el 2011, donde indican que el viraje de color de la solución sulfocrómica de amarillo a verde, indica la presencia de un agente reductor, como lo es el etanol.

Tabla 25: Determinación de bioetanol en destilaciones

Sistemas	Extracto <i>Aspergillus niger</i>	Extracto <i>Bacillus subtilis</i>
Bagazo de caña	Verde amarillento	Amarillo verdoso
Bagazo de malta	Amarillo verdoso	Verde oscuro
Bagazo caña + bagazo malta	Verde oscuro	Verde amarillento

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Primero: En muestras de rizosfera de cultivo de cebolla, se aisló e identificó en base a sus características macroscópicas (color y forma de colonias y crecimiento en medio TSA), microscópicas (tinción Gram) y bioquímicas (Amilasa, Voges-Proskauer, citrato-Simmons, crecimiento en NaCl 6,5%, ureasa TSI, SIM, reducción de nitratos, crecimiento en manitol salado), a *Bacillus subtilis*, como microorganismo nativo, el cual posee capacidad hidrolítica.

Segundo: Se aisló e identificó al hongo *Aspergillus niger*, en base a sus características macroscópicas (crecimiento en medio PDA) y microscópicas (tinción de azul de lactofenol).

Tercero: Se aisló e identificó en base a sus características macroscópicas (crecimiento en medio CELMG), microscópicas (tinción Gram) y bioquímicas (Catalasa, reducción de nitratos, SIM, TSI) a la cepa *Zymomonas mobilis* a partir de una muestra de mosto de uva en fermentación.

Cuarto: Se aisló e identificó en base a sus características macroscópicas (crecimiento en YPD), microscópicas (tinción Gram) y bioquímicas (SIM, citocromo oxidasa, TSI) a la cepa *Saccharomyces cerevisiae* a partir de una muestra de mosto cervecero en fermentación.

Quinto: Se determinó las etapas de crecimiento mediante la construcción de las cinéticas de cada cepa en estudio.

Sexto: En la producción del extracto enzimático, se determinó que una concentración de 0,5% de sulfato de amonio, 1% de sulfato de magnesio y 0,5% de fostafo diácido de potasio, mejoran significativamente la producción de enzimas al ser sales inductoras del proceso de síntesis intracelular de éstas.

Séptimo: Se determinó que la temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* fue de 37°C, mientras que la de *Aspergillus*

niger, fue de 17-20°C, pudiendo crecer estas 4 cepas de manera regular en rangos de 17-27°C.

Octavo: Se inmovilizó 500 mL de extracto enzimático de cada sistema en alginato de calcio, para su aplicación en los tres diferentes sustratos en estudio, donde se obtuvo pellets de un diámetro promedio de 0.5 cm.

Noveno: La concentración de azúcares fermentables posterior a la hidrólisis enzimática, fue de 2,4 g/L en el sistema de bagazo de caña de azúcar; 3,1 g/L en el sistema de bagazo de malta y 2,65 g/L en la mezcla de los sustratos. Esta variación de azúcares fermentables se debió la mayor capacidad de retención de azúcares en la malta durante en proceso de hidrólisis en la producción de cerveza artesanal.

Décimo: Se diseñó y construyó un biorreactor a escala de laboratorio empleado para la hidrólisis enzimática y la producción de etanol mediante fermentación alcohólica, a partir de bagazo de caña, bagazo de malta y para la mezcla de estos sustratos.

Décimo primero: Luego de la concentración mediante destilación, se obtuvo 150 mL de destilado en el sistema que empleó bagazo de caña, 171 mL de destilado en el sistema que empleó bagazo de malta y 164 mL de destilado en el sistema que empleó ambos sustratos, esto nos indica una proporción directa entre los azúcares fermentables obtenidas después de la hidrólisis enzimática y el etanol obtenido en la fermentación

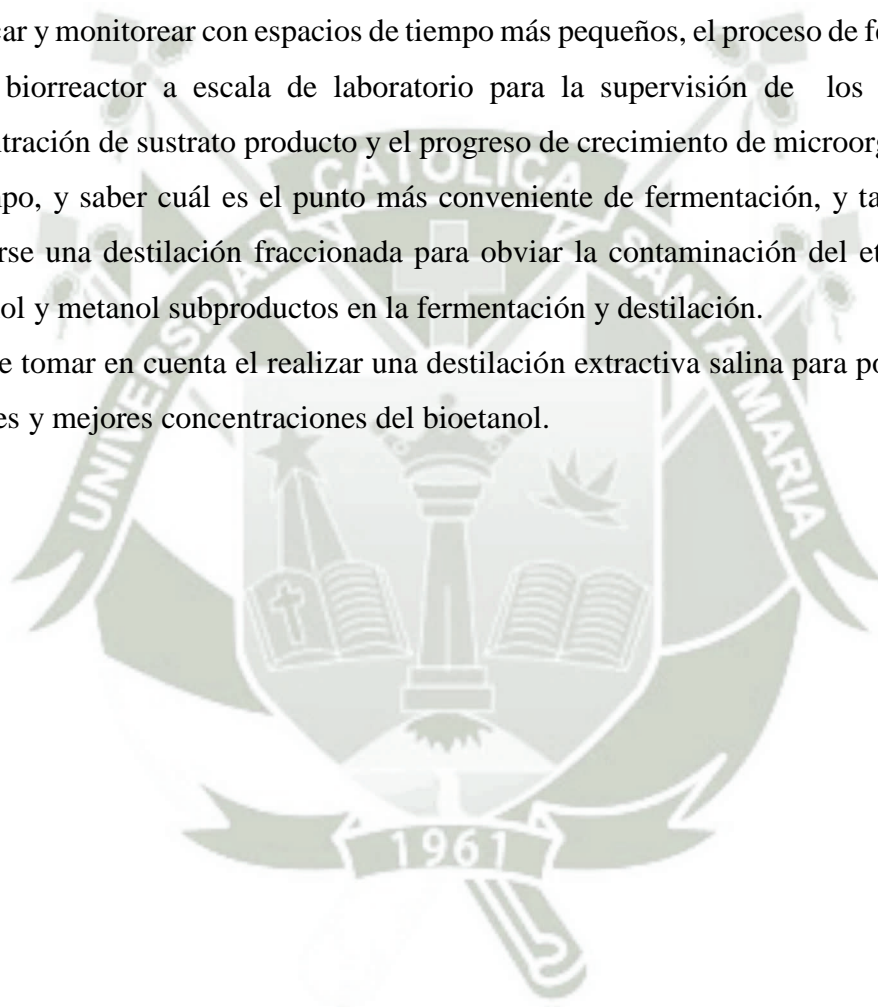
Décimo segundo: Se determinó la presencia cualitativa del bioetanol obtenido mediante la reacción óxido-reducción del etanol y el dicromato de potasio, donde indicó que, el viraje de color de la solución sulfocrómica de amarillo a verde, representa la presencia de un agente reductor, como lo es el etanol.

CAPÍTULO VI

SUGERENCIAS

- ❖ Profundizar el estudio de las diversas alternativas existentes de residuos agrícolas y residuos agroindustriales regionales y nacionales para la producción y desarrollo de energías renovables, las cuales son materias primas que aseguren mantener la autonomía alimentaria y variedad del abastecimiento energético y la posibilidad de alcanzar servicios de energía sin dejar una huella negativa ambiental.
- ❖ Respecto a la caracterización de las cepas, podría llevarse a cabo una tipificación mediante marcadores moleculares, los cuales sean específicos para cada microorganismo, hongos, levadura y bacterias, como las secuencias del gen 18S del rRNA región del gen 28S del rDNA , RPDs, RFLPs, etc.
- ❖ Para el acondicionamiento de las cepas, se podría emplear el sustrato o bagazo pero en condiciones pretratadas químicamente o biológicamente para la hidrólisis completa de la lignina, es decir mediante el empleo de microorganismos capaces de realizarlo, por ello se requiere un estudio mayor de estos microorganismos.
- ❖ En el proceso de hidrólisis enzimática, podría emplearse proporciones crecientes de la mezcla de sustratos, para determinar el efecto de cada una sobre el crecimiento de las cepas y su posterior producción de enzimas.
- ❖ Asimismo podría hacerse una comparación de producción de enzimas en los sustratos utilizados bagazo de caña y bagazo de malta entre las cepas nativas que fueron aisladas en esta investigación, con las cepas caracterizadas y tipificadas que son las cepas ATCC, y así determinar también el rendimiento con respecto a la fermentación con las cepas nativas aisladas fermentadoras, con las ATCC.
- ❖ Se sugeriría llevar el extracto a un proceso de purificación, y aislar las enzimas por separado, para así determinar la actividad que posee cada enzima, y comparar si esta actividad con las enzimas puras, aumenta, con respecto al sustrato en bruto.
- ❖ Se podría determinar el efecto de otros soportes durante la inmovilización enzimática, y además a diferentes concentraciones de los mismos.

- ❖ Para conseguir mayor concentración del bioetanol se debe ejecutar monitoreos continuos de los microorganismos mientras el proceso de la fermentación ya que contribuye el nivel preliminar de microorganismos, inclinación por los sustratos, la disponibilidad de sustrato, la concniente tasa de crecimiento de las especies en estudio que compiten a distintas temperaturas, la realización de metabolitos antimicrobianos, la disputa microbiana por un sustrato limitante como la glucosa o el oxígeno y la interacción entre las especies en estudio.
- ❖ Verificar y monitorear con espacios de tiempo más pequeños, el proceso de fermentación en un biorreactor a escala de laboratorio para la supervisión de los cambios de concentración de sustrato producto y el progreso de crecimiento de microorganismos en el tiempo, y saber cuál es el punto más conveniente de fermentación, y también debe realizarse una destilación fraccionada para obviar la contaminación del etanol con n-propanol y metanol subproductos en la fermentación y destilación.
- ❖ Se debe tomar en cuenta el realizar una destilación extractiva salina para poder obtener mayores y mejores concentraciones del bioetanol.



CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA:

1. G.W. Huber, S. Iborra, A. Corma, Chemical Review 106 (2006) 4044-4098. Disponible en: <http://www.ambientum.com/revista/2013/junio/biomasa-como-materia-prima-para-obtencion-combustibles-liquidos.asp>
2. M. Hashem, S.M.I. Darwish, Biomass Bioenergy 34 (2010) 953-959.
3. mK. Georgonianni, A. K. Katsoulidis, P.J. Pomonis, G. Manos, M.G. Kontominas, Fuel Processing and Technology 90 (2009) 1016-1022.
4. COCERAL: European association (Internet). Belgica: COCERAL; c2009 (citado 2015). Disponible en: www.coceral.com
5. Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo, 8 de mayo de 2003.
6. “Informe marco sobre la demanda de energía eléctrica y gas natural, y su cobertura”, Comisión Nacional de la Energía (CNE), 2012.
7. Decisión nº 1600/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, Comisión de las Comunidades Europeas 2002.
8. “Biomasa. Cultivos energéticos” Instituto para la diversificación y ahorro de la Energía. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010.
9. W. Vermeiren, Topics in Catalysis, Springer, Junio 2009.
10. Diseño de plantas agroindustriales. Universidad de Trujillo. Perú. c2015. Disponible en: <http://es.slideshare.net/marioespinoza/informe-diseo-de-planta-azucarera-final>
11. Semanario económico y financiero de cuba. Caña de azúcar, alternativa viable para alimentación ganadera. Perú. Enero 2015; c2016. Disponible en: <http://www.opciones.cu/cuba/2013-08-16/cana-de-azucar-alternativa-viable-para-alimentacion-ganadera/>
12. Salvador Aita Gervasi; Libros para agrónomos: Caña de azúcar. c2015. Disponible en: <http://librosagronicos.blogspot.pe/2015/06/cana-de-azucar.html>

13. Portal informativo de la ACTAF: Infoagro.org. Caña de Azúcar. c2015. Cuba.
Disponible en: [Página web: www.actaf.co.cu/biblioteca/cana-de-azucar.html](http://www.actaf.co.cu/biblioteca/cana-de-azucar.html)
14. Fermín Subirós Ruiz. El cultivo de la caña de azúcar. Primera edición. Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Año 2000.
15. EcuRed: Conocimiento con todos y para todos. Caña de azúcar. c2015. Ecuador.
Disponible en: http://www.ecured.cu/index.php/Ca%C3%B1a_de_az%C3%BAcar
16. **NETAFIM. Caña de azúcar: La hoja. c2015. EEUU. Disponible en:**
http://www.sugarcane.crops.com/s/growth_morphology/the_leaf/
17. EcuRed. Conocimiento con todos y para todos. Caña de azúcar. la flor y su inflorescencia. c2015.
Disponible en: www.ecured.cu/Ca%C3%B1a_de_az%C3%BAcar#Flor_y_su_inflorescencia
18. Dirección General de Competitividad Agraria. Ministerio de Agricultura: Caña de azúcar. Primera Edición, Mayo 2013. Disponible en:
http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomia_cana_azucar.pdf
19. Producción, Exportación e Importación de la caña de azúcar. Superintendencia Nacional de Aduanas Compendio estadístico agrario OIA- MINAG. Lima – Perú Abril del 2007. Disponible en: www.regionsanmartin.gob.pe.
20. Central Azucarera Chucarapi Pampa Blanca S.A. Perú 2005. Disponible en:
<http://www.bvl.com.pe/hhii/019094/20060403174853/MEMORIA32200532PARTE321.PDF>
21. INEI. Producción de caña de azúcar aumentó en 35,0%. Perú 2015. Disponible en:
<http://m.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-cana-de-azucar-aumento-en-35-0/>
22. EcuRed. Bagazo de caña. c2015. Disponible en:
http://www.ecured.cu/index.php/Bagazo_de_ca%C3%B1a

- 23.3M. Ciencia aplicada a la vida. _Bagazo de caña, posible componente de concreto hidráulico. Febrero 2014. Disponible en: <http://noticiasdelaciencia.com/not/9573/bagazo-de-cana-posible-componente-de-concreto-hidraulico/>
24. Mechanical behavior of the concrete reinforced with sugar cane bagasse fibers. DYNA, Vol. 74, Núm. 153. 2007. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/rt/printerFriendly/943/11634>
25. Zoycris Pernaleté ¹. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. Bioagro v.20 n.1 Barquisimeto abr. 2008. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-33612008000100001&script=sci_arttext
26. Agroindustria para o Mercosul. Edição 2009 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia. Brasília, novembro de 2009. Disponible en: http://www.premiomercosul.cnpq.br/pdf/Premio_mercosul_2009.pdf
27. EcuRed. Bagazo de caña de azúcar: Composición; c2015. Disponible en: http://www.ecured.cu/Bagazo_de_ca%C3%B1a
28. Industria papelera, Capitulo 5. Perú 2011. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/olvera_a_p/capitulo5.pdf
29. Industria papelera, Capitulo 5. Perú 2011. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/olvera_a_p/capitulo5.pdf
30. Arboleda Marcelo. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Química De Alimentos. Microbiología industrial. Preservación de Cepas Levaduriformes y Fúngicas degradadoras del Bagazo De Caña De Azúcar. Ecuador 2009. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/26085572/PROYECTO-BAGAZO-DE-CANA>

31. Arboleda Marcelo. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Química De Alimentos. Microbiología Industrial. Preservación de Cepas Levaduriformes y Fúngicas degradadoras del Bagazo De Caña De Azúcar. Ecuador 2009. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/26085572/PROYECTO-BAGAZO-DE-CANA>
32. Arboleda Marcelo. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Química De Alimentos. Microbiología Industrial. Preservación de Cepas Levaduriformes y Fúngicas degradadoras del Bagazo De Caña De Azúcar. Ecuador 2009. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/26085572/PROYECTO-BAGAZO-DE-CANA>
33. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Numero Especial No. 1. Volumen XVII. 1983.
34. Ing. Francisco Diez Torres e Ing. Norge Garrido Carralero, Bagazo de caña de azúcar: ¿energía o etanol carburante? Dos casos de estudio. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba, 2008.
35. Revista Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos. Volúmen 2 número 1, 2002. Cali- Colombia.
36. Jehiel Sandoval Salazar. Potencial de aporte en generación eléctrica en Costa Rica por parte de los ingenios azucareros mediante biomasa. Universidad de Costa Rica. Diciembre 2014. Disponible en: <http://eie.ucr.ac.cr/uploads/file/proybach/pb0917t.pdf>
37. Carlos Catillo L. Universidad Central del Ecuador. Germinación y malteado de Cebada. Marzo 2002. Disponible en: Google books. Germinación y malteado.

38. *FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. 2004. S. Calsamiglia, A. Ferret, A. Bach. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, 70 pp.*
39. Carlos Catillo L. Universidad Central del Ecuador. Germinación y malteado de Cebada. Marzo 2002. Disponible en: Google books. Germinación y malteado.
40. Escuela Superior de Hostelería y Turismo de Madrid. Elaboración y esquema. c2014Disponible en: http://www.escuelasuperior-hosteleriaturismo-madrid.com/comenius/2005_2006/elaboracion.html
41. Malta cervecera. Argentina. Disponible en: <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm>
42. García Olmedo, Francisco (1965). *Ensayos analíticos para la cebada y la malta II. "Cereales"* (n. 177); pp. 17-20. Malta de cebada. https://es.wikipedia.org/wiki/Malta_de_cebada
43. Dr. Eliseo Pablo Sánchez. Hez de malta: en busca de su valor agregado. *INTI-Cereales y Oleaginosas.*, 2009.
44. Elaboración de la cerveza. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Elaboración_de_cerveza
45. FEDNA: Bagazo de cerveza húmedo. España, 2009. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/bagazo-de-cerveza-h%C3%BAmedo
46. INTI. Un subproducto industrial transformado en alimento. Noticiero tecnológico semanal nº104 · 12 de mayo de 2008. Disponible en: <http://www.inti.gob.ar/noticiero/noticiero104.htm>

47. FEDNA: Bagazo de cerveza húmedo. España, 2009. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/bagazo-de-cerveza-h%C3%BAmedo
48. San Ramon. San Isidro argentina. Página web: <http://sanramon.8k.com/index.html>
49. Boletín UCA. Investigadores de la UCA producen biocombustibles a partir del residuo de la cerveza. Disponible en: <http://boletin-it.uca.es/eng/ceia3/1/2011/investigadores-de-la-uca-producen-biocombustibles-a-partir-del-residuo-de-la-cerveza-2>
50. **F. Xavier Martínez Farré.** Escuela Superior de Agricultura de Barcelona. Universidad Politécnica de Catalunya. Gestión y tratamiento de residuos agrícolas. Segunda parte.
Disponible en: http://www.infoagro.com/hortalizas/residuos_agricolas2.htm
51. Frank Carlos Vargas Tangua. Universidad Industrial de Santander. Transformación microbiana del bagazo de caña panelera en azúcares fermentables útiles para la obtención de bioetanol. Bucaramanga. 2010. Disponible en: <http://www.panelamonitor.org/media/docrepo/document/files/tranformacion-microbiana-de-bagazo-de-cana-panelera-en-azucres-fermentables-para-la-obtencion-de-bioetanol.pdf>
52. ERIKA ESPERANZA FAJARDO CASTILLO, SANDRA CONSTANZA SARMIENTO FORERO. EVALUACIÓN DE MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS. DRTO MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL BOGOTÁ, D.C AGOSTO DE 2007.
53. Takeshi Hayashi, Yoshifumi Furuta, Kensuke Furukawa. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2011) Volume 111: 414–419

54. Rómulo Aycachi. “PRODUCCIÓN DEBIOETANOL” FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA. Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque, 21 de marzo de 2009
55. Merck. 1994. Manual de medios de cultivo.
56. Madigan M; Martinko J (editors). (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall.
57. Raper, Keneth and Fennellhe Williams & Wilkins company, pp. 293-344
58. de Vries, R. P. and J. Visser. 2001. Aspergillus Enzyme Involved In Degradation Of Plant Cell Wall Polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65:497-522.
59. Jones, J. B. G. (1994). Fungal adhesion. Mycological Research 98: 961-981.
60. Anderson, J. G. 1983. Immobilized cell and film reactor systems for Filamentous fungi. The Filamentous Fungi, Volume 4 Chapter 6 (J. E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen, eds.). E. Arnold, London.
61. Gutiérrez-Correa, M. 2003. Opinion on Surface Adhesion Fermentation. Agriculture Food Research.
62. Martínez-Anaya et al.; *Celulasas fúngicas, aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética*; Rev Latinoam Microbiol 2008; 50 (3-4): 119-131
63. Oliveros et al.; *Celullase activity of filamentous fungi induced by rice husk*, African Journal of Biotechnology 2014; Vol.13(45), pp. 4236-4245.
64. Marín R.; *Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico*, Universidad de Chile, 2007.
65. Angulo A.; “*EFFECTIVIDAD DE MICROORNISMOS NATIVOS EN RELACIÓN A Aspergillus niger, Clostridium thermocellum ATCC 27405 Y Zymomonas mobilis PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE SANDÍA “Citrullus lanatus” A ESCALA PILOTO*”, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, 2010.
66. Núñez M., García P.; *Biocombustibles: bioetanol y biodiesel*, Universidad de Santiago de Compostela.
67. Realpe et al; *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, 2001.

68. Logan NA, Turnbull CBP. *Bacillus and recently derived genera*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. Seventh edition. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p. 357-69.
69. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr, editores. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Fifth edition. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams and Wilkins; 1997 p.651-708.
70. G.W. Huber, S. Iborra, A. Corma, Chemical Review 106 (2006) 4044-4098.
71. M. Hashem, S.M.I. Darwish, Biomass Bioenergy 34 (2010) 953-959.
72. mK. Georgonianni, A. K. Katsoulidis, P.J. Pomonis, G. Manos, M.G. Kontominas, Fuel Processing and Technology 90 (2009) 1016-1022.
73. Cereales peruanos, 2013. Página web: www.coceral.com
74. Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo, 8 de mayo de 2003.
75. “Informe marco sobre la demanda de energía eléctrica y gas natural, y su cobertura”, Comisión Nacional de la Energía (CNE), 2012.
76. Decisión nº 1600/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, Comisión de las Comunidades Europeas 2002.
77. “Biomasa. Cultivos energéticos” Instituto para la diversificación y ahorro de la Energía. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010.
78. W. Vermeiren, Topics in Catalysis, Springer, Junio 2009.
79. Caña de azúcar, 2013. Página web: www.snvworld.org/files/publications/modulo_v-cana_de_azucar.pdf
80. Caña de azúcar, alternativa viable para alimentación ganadera, 2016. Página web: <http://www.opciones.cu/cuba/2013-08-16/cana-de-azucar-alternativa-viable-para-alimentacion-ganadera/>
81. Módulo de caña de azúcar. Perú, 2010. Página web: www.snvworld.org/files/publications/modulo_v-cana_de_azucar.pdf
82. Caña de azúcar, Perú, 2009. Página web: www.actaf.co.cu/biblioteca/cana-de-azucar.html
83. Producción de caña de azúcar. Página web: www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/012-a-cana-de-azucar.pdf

84. Fermín Subirós Ruiz. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Primera edición, 2000.
85. Características de la hoja de caña de azúcar. Página web: <http://www.sugarcane crops.com/s/Foreword/>
86. Felipe Perafán G. Azúcar de caña. Cali - Colombia.2009
87. EcuRed, producción de caña de azúcar. Página web: www.ecured.cu/index.php/Ca%C3%B1a_de_az%C3%BAcar
88. Principales Aspectos de la Cadena Agroproductiva. Caña de azúcar. Ministerio de agricultura, 2009. Página web: agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomia_canaazucar.pdf
89. Producción, Exportación e Importación de la caña de azúcar (Perú) Superintendencia Nacional de Aduanas. Compendio estadístico agrario OIA- MINAG. Lima – Perú Abril del 2007. Página web: www.regionsanmartin.gob.pe
90. Pampa blanca. Página web: www.securities.com/php/company-profile/PE/Central_Azucarera_Chucarapi_Pampa_Blanca_SA_es_1240102.html
91. Cultivo y producción de caña de azúcar. Página web: webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:YncWajpoDIAJ:www.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-cana-de-azucar-aumento-en-35-0-/imprimir/+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe
92. EcuRed. Index Bagazo de caña 2015. Página web: http://www.ecured.cu/index.php/Bagazo_de_ca%C3%B1a
93. García Hortal, José Antonio. *Fibras papeleras* (2007). Barcelona. Edicions UPC
94. Tesis Biotecnología. Página web: www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-33612008000100001&script=sci_arttext
95. Agroindustria para o Mercosul. Edição 2009 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia. Brasília, novembro de 2009.

96. EcuRed. Bagazo de caña de azúcar. 2015. Página web:
http://www.ecured.cu/Bagazo_de_ca%C3%B1a
97. Shaila Guadalupe Hernández García. Trabajo de tesis: El bagazo de la caña de azúcar, 2012.
98. Hipertextos del área de la biología. Azúcares o glúcidos, 2010. Página web:
<http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>
99. Programa ISIS, 2016. Hemicelulosa .
100. Programa ISIS, 2016. Lignina.
101. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Numero Especial No. 1. Volumen XVII. 1983.
102. Tesis bioprocesos. Página web:
www.proceedings.scielo.br/scielo.php?pid=MSC0000000022006000100036&script=sci_arttext
103. ALLAN, G.G. 1978. Polymeric cellulose derivatives. Special paper, 8th World Forestry Congress.
104. Ing. Francisco Diez Torres e Ing. Norge Garrido Carralero, Bagazo de caña de azúcar: ¿energía o etanol carburante? Dos casos de estudio. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba, 2008.
105. Revista Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos. Volúmen 2 número 1, 2002. Cali- Colombia.
106. García Olmedo, Francisco (1965). Ensayos analíticos para la cebada y la malta II. "Cereales" (n. 177); pp. 17-20
107. SEELEY, D.B. 1976. Cellulose saccharification for fermentation industry applications. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, N° 6. p. 285-292.
108. Industria cervecera. Página web: www.fabricarcerveza.es/cerveza-sin-gluten/item/104-elaborar-cerveza-sin-gluten
109. *FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. 2004. S. Calsamiglia, A. Ferret, A. Bach. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, 70 pp.*

110. Instituto Nacional de Investigación agropecuaria. Grano de cebada. Uruguay, 2012 Página web: http://www.caf.org.uy/IMG/pdf/Grano_de_cebada.pdf
111. García Olmedo, Francisco (1965). Ensayos analíticos para la cebada y la malta II. "Cereales"
112. Malteurop. 2012. Página web: <https://es.malteurop.com/nuestra-actividad/cebadas/de-la-cebada-a-la-malta>
113. García Olmedo, Francisco (1965). El malteo de la Cebada. "Cereales" (n. 174); pp. 17-20
114. Dr. Eliseo Pablo Sánchez. Hez de malta: en busca de su valor agregado. *INTI-Cereales y Oleaginosas.*, 2009.
115. LÓPEZ FERNÁNDEZ, Carlos. Et al. PROCESO PARA EL APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA PARA LA OBTENCIÓN DE PRECURSORES DE BIOCOMBUSTIBLES, ALIMENTOS FUNCIONALES Y COSMÉTICOS. UNIVERSIDAD DE CÁDIZ, 2009.
116. FEDNA. 2010. PÁGINA WEB. http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/bagazo-de-cerveza-h%C3%Bamedo
117. San Ramon. San Isidro argentina. Página web: <http://sanramon.8k.com/index.html>
118. Labores Culturales y recolección de los cultivo ecológicos. Ángel J. Gordillo- Rivero. Jorge García- Moreno. Certificado de Prfesionalidad. Agricultura Ecológica. Ediciones Nobel S.A.
119. EMMANUEL LÓPEZ GARCÍA. PROCESAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL. MONOGRAFÍA Para Acreditar la Experiencia Educativa: EXPERIENCIA RECEPCIONAL, 2008.
120. Gonzales Mario. Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, Universidad de Trujillo. Centro de investigación. 2010.
121. Martínez-Anaya et al.; *Celulasas fúngicas, aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética*; Rev Latinoam Microbiol 2008; 50 (3-4): 119-131

122. Marín R.; *Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico*, Universidad de Chile, 2007.
123. Baldrian, P. & Valaskova, V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev*. Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.
124. Oliveros et al.; *Celullase activity of filamentous fungi induced by rice husk*, *African Journal of Biotechnology* 2014; Vol.13(45), pp. 4236-4245.
125. Goedegebuur, F., Fowler, T., Phillips, J., van der Kley, P., van Solingen, P., Dankmeyer, L. & Power, S. 2002. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current Genetics*. 41, 89-98.
126. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66, 506-577.
127. Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y. & Lamed, R. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*. 58, 521-54.
128. Angulo A.; “*EFFECTIVIDAD DE MICROORNISMOS NATIVOS EN RELACIÓN A Aspergillus niger, Clostridium thermocellum ATCC 27405 Y Zymomonas mobilis PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE SANDÍA “Citrullus lanatus” A ESCALA PILOTO*”, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, 2010.
129. Aschkar, G. M; Pozzo Ardizzi, M. C. ; Pellejero, G.; Gil, M. I.; Agramento, M.; Roa, R.; Van Konijnenburg, A.; 2008. Resúmenes de trabajos - En: Observación de presencia y cuantificación de *Aspergillus niger* en distintos cultivares de cebolla (*Allium cepa* L.) durante el período vegetativo en el Valle inferior del Río. - Página/s: 64.
130. Raper, Keneth and Fennellhe Williams & Wilkins company, pp. 293-344
131. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988
132. Jones, J. B. G. (1994). Fungal adhesion. *Mycological Research* 98: 961-981.
133. Anderson, J. G. 1983. Immobilized cell and film reactor systems for Filamentous fungi. *The Filamentous Fungi*, Volume 4 Chapter 6 (J. E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen, eds.). E. Arnold, London.
134. Gutiérrez-Correa, M. 2003. Opinion on rface Adhesion Fermentation. *Agriculture Food Research*

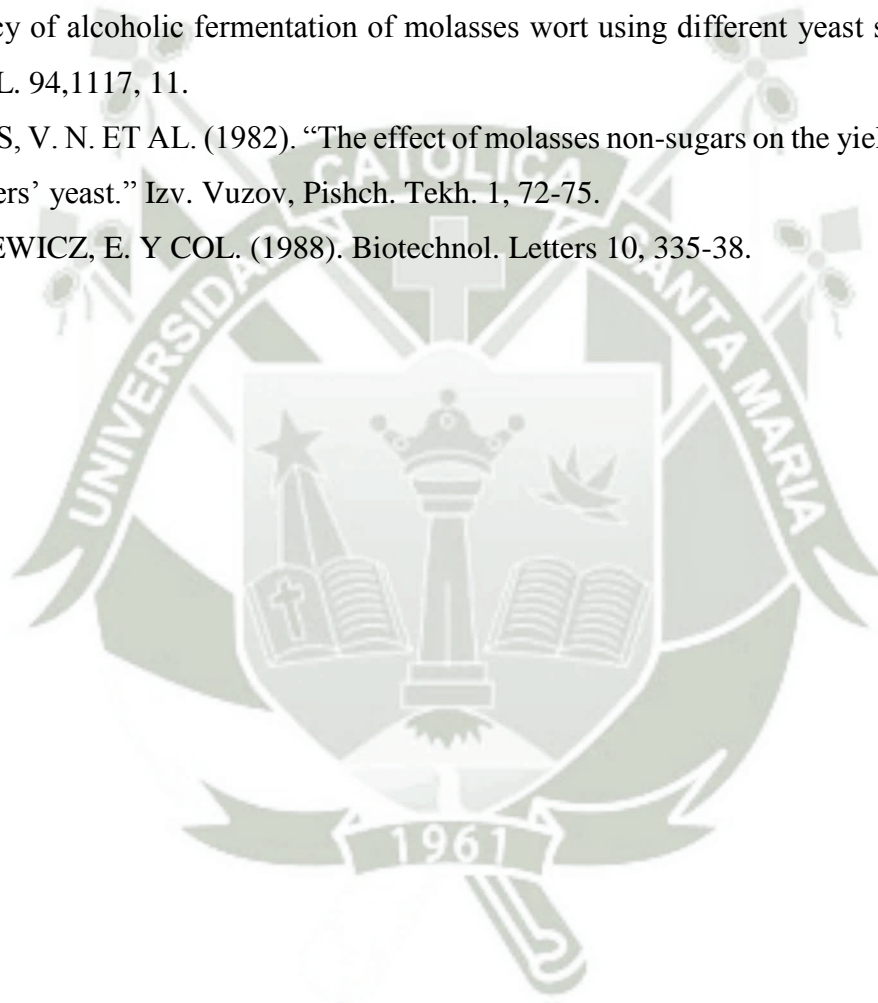
135. de Vries, R. P. and J. Visser. 2001. Aspergillus Enzyme Involved In Degradation Of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:497-522.
136. Fox, Greg A. Bala. *Bioresource Technology*. Volume 75, issue 3, December 2000, page 235-240. Controladores Biológicos: *Bacillus subtilis* y *B. thuringiensis*. Proyecto: fundación para innovación agraria, Ministerio de agricultura, Chile.
137. Torsten Stein. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. Volume 56, Issue 4, pages 845-857, May 2013
138. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. Thomas E. Angelini and cols., 106 no. 43, August 18, 2009.
139. Logan NA, Turnbull CBP. *Bacillus* and recently derived genera. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Seventh edition. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p. 357-69.
140. Bergeys D, 1989 - 2000. *Manual of the Determinative Bacteriology*. Night Edition. Philadelphia 2 :540-589.
141. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr, editores. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Fifth edition. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams and Wilkins; 1997 p.651-708.
142. Mota L. J., Tavares P., Sá-Nogueira I. 1999. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 33:476-489.
143. Stölke J., Hillen W. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:849-880.
144. Krispin O., Allmansberger R. 1998. The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. *J. Bacteriol.* 180:3250-3252.
145. Devine K. M. 2000. *Bacillus subtilis*, Genetics: En *Enciclopedia of Microbiology*. Ed. Lederberg J. Segunda Edición. Academic Press. I:373-382.
146. Hoffmann T., Troup B., Szabo A., Hungerer C., Jahn D. 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: Cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:219-225 Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías F, Covarrubias A: La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2004; 46 (1-2).

147. Jolliffe L. K., Doyle R. J., Streips U. N. 1980. Extracellular proteases modify cell wall turnover in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141:1199-1208.
148. Konopásek I., Strzalka K., Svobodová J. 2000. Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 1464. 18-26.
149. FERMENTACION ALCOHOLICA- BIOETANOL. 2012. Pagina web: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/FERMENTACION-ALCOHOLICA.pdf>
150. Esteve -Zarzoso, Peris-Torán, Garcia-Maiquez, Uruburu F, Querol A: Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 0099-2240/01, 67
151. Chambers P, Pretorius I: Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *European Molecular Biology Organization (EMBO) reports* 2010; 11
152. Mas A, Torija MJ, Beltrán G, Novo M, Hierro N, Oblet M, Rozés N, Guillamón JM: *Selección de Levaduras*. México DF, Alfa Editores Técnicos, 2006.
153. Bartra E: *Genética de levaduras*. Estación de Viticultura y Enología de Vilafranca del Penedès, INCAVI 2000. N° 3.
154. Hyma K, Saerens S, Verstrepen K, Fay J: Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 2011; 11: 540-551.
155. Schuller D, Cardoso F, Sousa S, Gomes P, Gomes A, Santos M, Casal M: Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions. *PLoS ONE* 2012; 7 (2): e32507.
156. de Vries, R. P. and J. Visser. 2001. Aspergillus Enzyme Involved In Degradation Of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:497-522.
157. Gonzalez R, Barcenilla JM, Tabera L: Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. *ACE Revista de Enología* 2007.
158. Jesús García Gallego: *Maridaje, enología y cata de vinos*. Antequera: Innovación y Cualificación SL, 2008: 71.

159. Gonçalves P, Valério E, Correia C, de Almeida J, Sampaio J: Evidence for Divergent Evolution of Growth Temperature Preference in Sympatric *Saccharomyces* Species. *PLoS ONE* 2011; 6 (6): e20739. doi:10.1371, journal.pone.0020739.
160. Rojas R, Reyes E: Aseguramiento de la Calidad y Biotecnología en la Industria del Vino. *Ciencia & Trabajo* 2005; 7 (17): 97-103.
161. Tiago V, Loureiro-Dias M, Loureiro V, Prista C: Peculiar Homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the Late Stages of Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78 (17): 6302-6308.
162. Cocolin L, Pepe V, Comitini F, Comi G, Ciani M: Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* 2004; 5: 37-245.
163. Nally MC, Maturano YP, Vázquez F, Toro ME. Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología* 2005; 37: 73-77.
164. Maqueda M, Zamora E, Álvarez M, Ramírez M: Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78 (3): 735-743.
165. Erika Esperanza Fajardo Castillo, Sandra Constanza Sarmiento Forero. Evaluación De Melaza De Caña Como Sustrato Para La Producción De *Saccharomyces Cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Básicas. Drto Microbiología Industrial Bogotá, D.C Agosto De 2007.
166. Skory C., D. 2003. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate deshydrogenase gene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 22-27.
167. C. Cardona y C. Orrego, Avances investigativos en la producción de biocombustibles, Manizales: Universidad Nacional de Colombia, 2009.
168. K. Yu, S. Kim y S. Han, "Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*". *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 4157-4161, 2010.

169. C. Kasavi, I. Finore, L. Lama, B. Nicolaus, G. Oliver, E. Toksoy y B. Kirdar, “Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass”. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 45, pp. 230-238, 2012.
170. Rogers P; Lee K; Skotnicki M; Tribe D (1982). *Microbial reactions: Ethanol Production by Zymomonas mobilis*. New York: Springer-Verlag. pp. 37–84.
171. Takeshi Hayashi, Yoshifumi Furuta, Kensuke Furukawa. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2011) Volume 111: 414–419
172. Swings, J; De Ley, J (March 1977). "The biology of Zymomonas". *Bacteriological reviews* 41 (1): 1–46.
173. Joachimsthal, E L; Rogers, PL (2000). "Characterization of a high-productivity recombinant strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose mixtures.". *Applied biochemistry and biotechnology*. 84-86: 343–56
174. Chen, Rachel; Agrawal M (2012). "Industrial Applications of A Novel Aldo/Keto Reductase Of Zymomonas Mobilis"
175. Agrawal, Manoj; Chen, Rachel Ruizhen (2011). "Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4". *Biotechnology Letters* 33 (11): 2127–2133.
176. Rómulo Aycachi. “PRODUCCIÓN DE BIOETANOL” FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA. Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque, 21 de marzo de 2009
177. Zhang, M; Eddy, C; Deanda, K; Finkelstein, M; Picataggio, S (Jan 13, 1995). "Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*". *Science* 267(5195): 240–3.
178. Merck. 1994. Manual de medios de cultivo.
179. Madigan M; Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall.
180. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1-1994
181. Núñez M., García P.; *Biocombustibles: bioetanol y biodiesel*, Universidad de Santiago de Compostela.

182. LLERENA, G. Y COL. (1999). “Alternativas de sustratos para la producción de alcohol” Rev. Cuba Azúcar. 28, 3, 49-52.
183. MURPHY N. F. (1988). “Ethanol production from blackstrap molasses by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp.” J.Agric. Univ. Puerto Rico 72, 3, 483-84.
184. PANCHAL, C. Y COL. (1984). “Fermentation ethanol production. Application of the new genetics and ancient art.” Energy Technol. and Econ. Production. p. 1270-1273.
185. SOBKOWIEZ, G. ET AL. (1992). “The influence of volatile acids on the dynamics and efficiency of alcoholic fermentation of molasses wort using different yeast strains.” Int. Sug. JNL. 94, 1117, 11.
186. SHVETS, V. N. ET AL. (1982). “The effect of molasses non-sugars on the yield of alcohol and bakers’ yeast.” Izv. Vuzov, Pishch. Tekh. 1, 72-75.
187. WILNIEWICZ, E. Y COL. (1988). Biotechnol. Letters 10, 335-38.



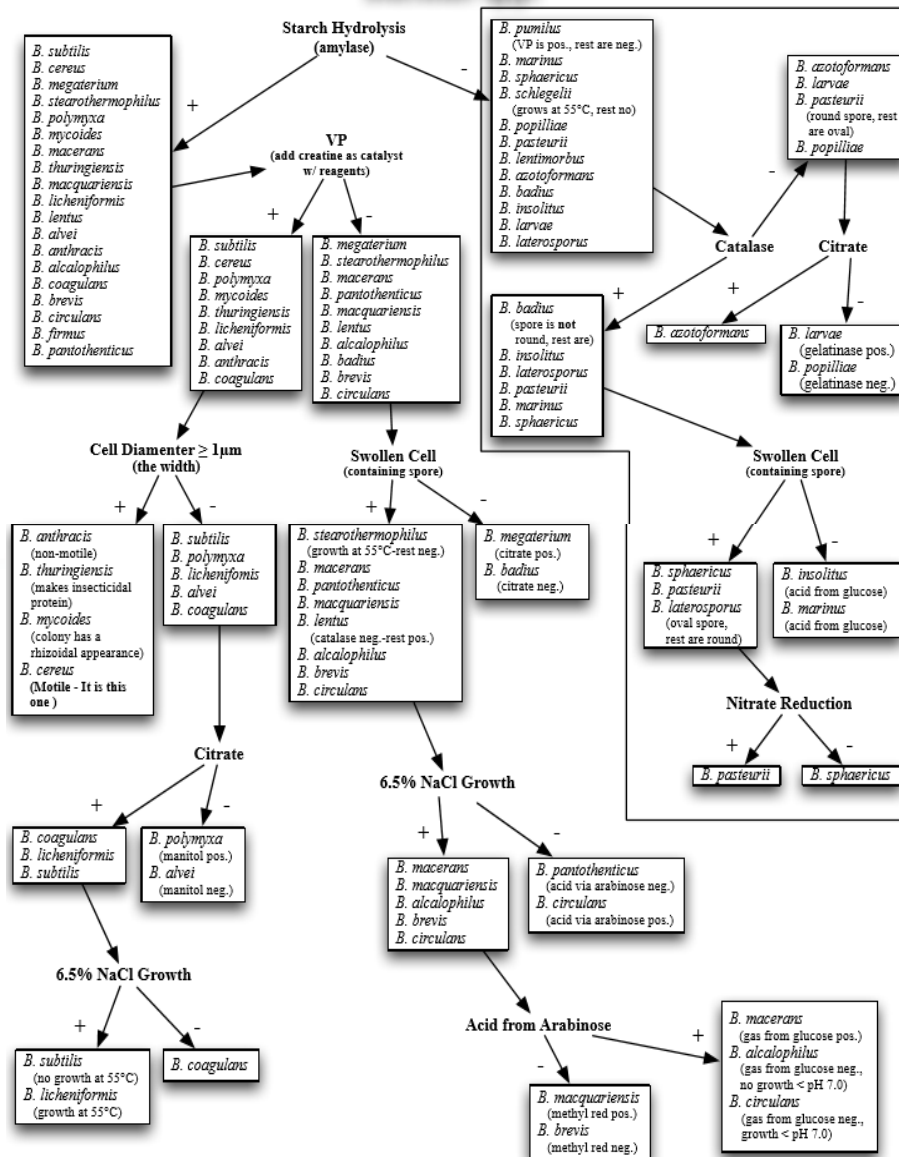
CAPITULO VIII

ANEXOS

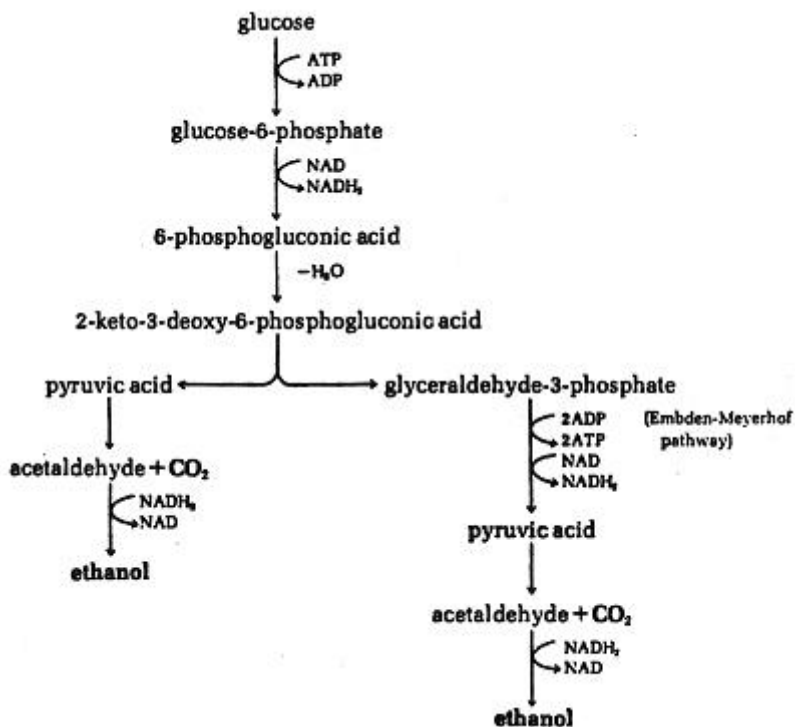
ANEXO 1: Manual de Bacteriología Sistémica de Bergey's, Diagrama de identificación de especies del género *Bacillus*

Bacillus spp. ID Flowchart

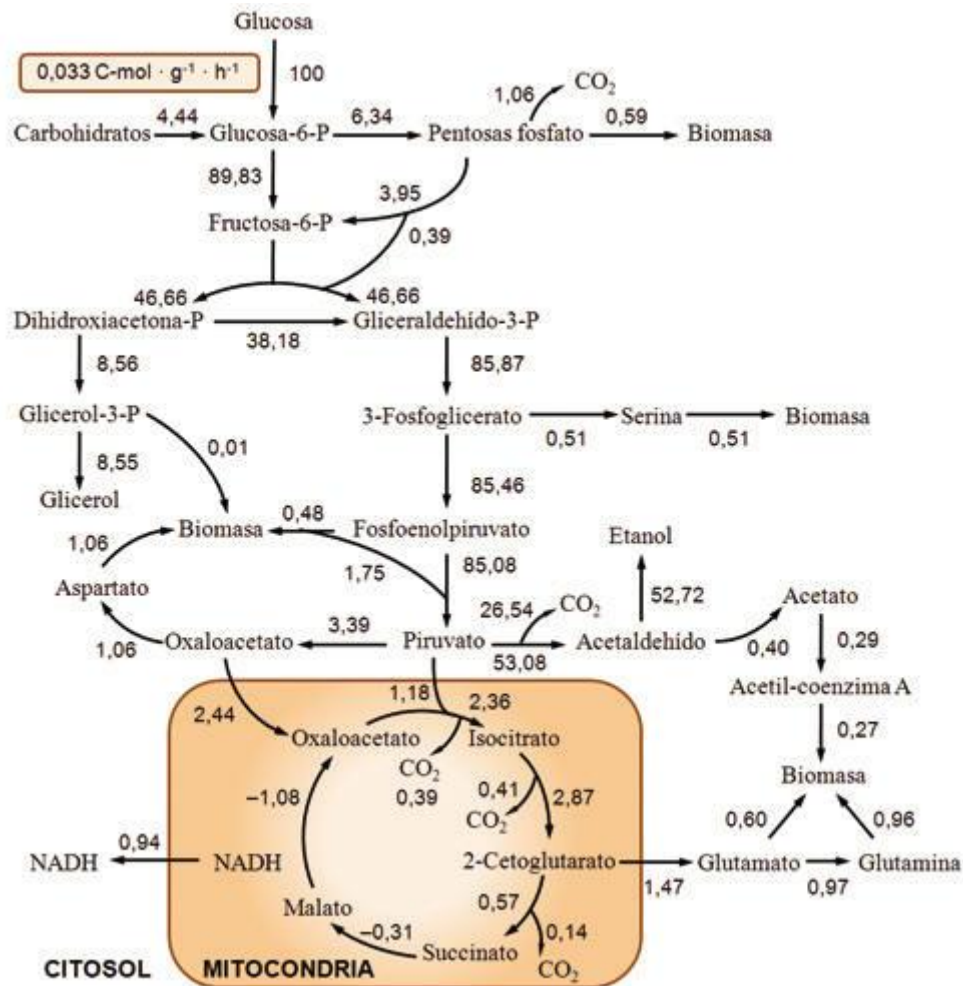
Bacillus spp.



ANEXO 2: Ruta metabólica de Entner Doudoroff empleada por *Zymomonas mobilis*



ANEXO 3: Ruta metabólica de la glicólisis empleada por *Saccharomyces cerevisiae*



ANEXO 4: TABLAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

- Cinética microbiana en Esporas/mL y O.D. con respecto al tiempo de *A. niger*

Esporas/mL	OD	Tiempo (hrs)
740000	0,041	0
1400000	0,052	12
2200000	0,073	24
4000000	0,091	36
7200000	0,121	48
10500000	0,193	60
17000000	0,26	72
17400000	0,271	84
17250000	0,259	96
16500000	0,245	108
15300000	0,224	120

- Cinética microbiana en UFC/mL y O.D. con respecto al tiempo de *B. subtilis*

UFC/mL	OD	Tiempo (hrs)
39200	0,002	0
44500	0,006	2
49200	0,014	4
61000	0,019	6
80300	0,026	8
102800	0,031	10
140200	0,039	12
161000	0,043	14
190500	0,052	16
256200	0,065	18
384000	0,091	20
510000	0,12	22
495400	0,114	24
454100	0,101	26
432900	0,096	28
398500	0,09	30
374000	0,083	32
316400	0,064	34
282300	0,06	36

- Cinética microbiana en UFC/mL y O.D. con respecto al tiempo de *S. cerevisiae*

UFC/mL	OD	Tiempo (hrs)
27440	0,001	0
31150	0,004	4
34440	0,010	8
42700	0,013	12
56210	0,018	16
71960	0,022	20
105150	0,029	24
120750	0,032	28
142875	0,039	32
192150	0,049	36
288000	0,068	40
382500	0,090	44
445860	0,103	48
408690	0,091	52
389610	0,086	56
358650	0,081	60
336600	0,075	64
284760	0,058	68
254070	0,054	72

- Cinética microbiana en UFC/mL y O.D. con respecto al tiempo de *Z. mobilis*

UFC/mL	OD	Tiempo (hrs)
49300	0,002	0
56000	0,005	4
61000	0,012	8
76800	0,016	12
101100	0,022	16
129500	0,026	20
189200	0,035	24
217300	0,042	28
342900	0,051	32
461100	0,063	36
691200	0,089	40
918000	0,117	44
1070000	0,133	48
980800	0,118	52
740200	0,130	56
681400	0,122	60
639500	0,112	64
541000	0,086	68
482700	0,081	72

ANEXO 5: PREPARACIÓN DE MEZCLA SULFOCRÓMICA

Se pesó 0,15 gramos de dicromato de potasio, el cual se disolvió en 100 mL de ácido sulfúrico al 12,88%. Posteriormente se mezcló 10 mL de la solución con 16 mL de ácido sulfúrico al 13,72%

