

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“OBTENCIÓN DE CELULASAS DE *Trichoderma* sp. A PARTIR DE ORUJO DE  
UVA PARA PRODUCIR BIOETANOL USANDO HOJAS DE MAZORCA DE  
MAÍZ.”**

**Tesis presentada por las  
bachilleres:**

Baraybar Suárez, Ana Lucía  
Monje Salas, Christabel Rossana

**Para optar el título de  
INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

**Asesora:**

Ing. Cinthia Córdova Barrios

AREQUIPA - PERU

2017

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se utilizó *Trichoderma* sp. el cual fue inducido en un medio sintético y luego adaptado en agar CMC para utilizarlo como inóculo en la fermentación en estado sólido.

Para obtener la enzima celulasa, se realizó una fermentación en estado sólido con el inóculo de *Trichoderma* sp. obtenido y orujo de uva como sustrato, probando tres concentraciones de CMC (0.1%, 0.3% y 0.5%) durante 7 días de incubación. Se realizó la extracción de las enzimas utilizando dos tipos de disolventes (Tween 80 al 0.1% y NaCl al 0.9%); obteniéndose como resultados, que la máxima producción de enzima fue usando CMC al 0.5% en el orujo de uva con *Trichoderma* sp. durante la fermentación en estado sólido y Tween 80 al 0.1% como disolvente en la extracción de la enzima.

Se evaluó la actividad de la enzima a distintos pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.3, 5.5 y 6.0) y a distintas temperaturas (37°C, 50°C, y 60 °C), obteniéndose que los mejores resultados se alcanzaron a un pH 5 y una temperatura de 50°C.

Con la finalidad de aplicar la enzima celulasa obtenida para la producción de bioetanol, se realizó un pretratamiento de los residuos de la hoja de mazorca de maíz con NaOH al 1% para modificar la estructura química de la lignina, para posteriormente realizar la hidrólisis enzimática durante 48 horas. El producto de la hidrólisis compuesto por sólidos solubles fue concentrado a 6 °Brix, para su posterior fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* durante 5 días, obteniendo como rendimiento de etanol 12.81 mL por 100 g. de residuo seco.

Por medio de esta investigación se puede apreciar que existe un potencial uso de los residuos lignocelulósicos como sustratos para la producción de enzima celulasa y como fuente de biomasa para la producción de bioetanol.

**PALABRAS CLAVE:** Celulasa, bioetanol, residuos lignocelulósicos.



## ABSTRACT

In this present investigation, *Trichoderma* sp. was used and it was induced in a synthetic medium and conditioned to CMC Agar for its use as inoculum in the solid state fermentation.

In order to obtain cellulase enzyme, a solid state fermentation was performed with the *Trichoderma* sp. inoculum obtained and grape pomace as substrate, testing three concentrations of CMC (0.1%, 0.3% and 0.5%) during 7 days of incubation. Enzymatic extraction was performed using two types of solvents (0.1% Tween 80 and 0.9% NaCl) and the results indicate that the maximum enzyme production was using 0.5% CMC in the grape pomace with *Trichoderma* sp. during the solid state fermentation and 0.1% Tween 80 as the solvent in the enzyme extraction.

The enzymatic activity was evaluated at different pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.3, 5.5 and 6.0) and at different temperatures (37°C, 50°C, and 60°C), obtaining that the best results were reached at pH 5 and a temperature of 50 °C.

In order to apply the cellulase enzyme obtained for the production of bioethanol, a pretreatment of corn husks residues with 1% NaOH was carried out to modify the chemical structure of the lignin and to carry out the enzymatic hydrolysis which last for 48 hours. The hydrolysis product composed of soluble solids was concentrated at 6 ° Brix, for subsequent alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for 5 days, obtaining a yield of ethanol 12.81 mL per 100 g. of dry residue.

This research shows there is a potential use of lignocellulosic residues as substrates for the production of cellulase enzyme and as a source of biomass for the production of bioethanol.

**KEY WORDS:** Cellulase, bioethanol, lignocellulosics residues.



## DEDICATORIA

*A mis amados padres y a mi querido hermano por su constante apoyo.*

*Chris*

*A mis papás y a mi hermano por todo el amor y apoyo incondicional; y en especial a mi papá Walter que me cuida desde el cielo.*

*Ana Lucía*



## AGRADECIMIENTOS

*Habiendo llegado al cierre de esta etapa, quiero agradecer a todas las personas que han sido partícipes de ella, quienes me han ayudado a culminar este trabajo satisfactoriamente.*

*A mis papás Blanca Luz y Adolfo, por su apoyo 100 % incondicional, por su gran paciencia, por estar siempre a mi lado y en todo momento, por todo el amor que me han brindado, por creer en mí y nunca dudar de lo que soy capaz de realizar. ¡Los amo mucho! ¡Gracias por todo!..*

*A mi hermano Grover y a mis primos Robertito y Alvarito, por su aliento en este tiempo, ya sea con bromas y risas, también para que les sirva de ejemplo y les impulse a lograr todas sus metas.*

*A mi mamá Julita y a mi tía Toti, que siempre me recordaban que este era un camino que tenía que culminar.*

*A Eduardo, por su gran apoyo, porque se alegraba francamente con cada paso que daba, cuando me sentía cansada tenía las palabras adecuadas que me hacían persistir y, como siempre, me sacaban una sonrisa. Gracias por la confianza que depositaste en mí y por todo tu amor <3*

*A Ana Lucía, por su amistad y porque fué una gran compañera de tesis, por las risas, enojos y buenísimos momentos que pasamos realizando nuestro trabajo, los cuales hicieron placentero este camino que nos trazamos juntas.*

*A todos mis amigos, los que preguntaban para cuándo el título. ¡Chicos!, ¡Ahí les va!!.. :)*

**Chris**

*Mi agradecimiento es ante todo a Dios por regalarme la vida, permitirme llegar hasta este punto y darme salud para lograr mis objetivos.*

*Del mismo modo, me gustaría expresar en estas líneas mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante la realización de la presente tesis, en especial:*

*A mis papás, Jaime y Rosmeri, porque sin su amor, confianza, paciencia, comprensión, motivación y el apoyo económico durante todo este tiempo no hubiera podido conseguir este logro, porque les debo todo lo que soy; son un gran ejemplo de perseverancia para mi hermano y para mí, LOS AMO.*

*A mi hermano Jaime, por sus palabras de aliento y confidencialidad brindada, también por sus chistes que me ayudaban a aliviar el estrés.*

*A mi papá Walter, que desde el cielo me protege y me guía en todo lo que hago, siempre te llevaré en mi corazón papito.*

*A mi enamorado Lalo, por la ayuda que me ha brindado, la cual ha sido muy importante, por estar a mi lado inclusive en los momentos y situaciones difíciles; no fue sencillo culminar, sin embargo siempre estuviste alentándome y diciéndome que lo lograría, por todo esto y más, te amo.*

*A mis abuelitos Celia, Lidia, Jaime y Ada, por quererme y darme su apoyo motivacional.*

*Al resto de mi familia por los ánimos y consejos que me dieron en algún momento.*

*Y por último pero no menos importante a todos mis amigos, en especial a Chris con quien trabajé durante todo este tiempo para que esta tesis termine de manera satisfactoria.*

*Ana Lucía*

*A nuestros buenos amigos: Marcia, Paola, Kathy, Nía, Lucho, Lalo. Rodrigo, Alonso y Aldo por su amistad y ánimos brindados en todo este tiempo.*

*A Doménica y José Daniel por su apoyo en brindarnos información necesaria y consejos para realizar nuestro proyecto.*

*A nuestra asesora, Ing. Cinthia, por su ayuda en nuestro trabajo, gracias por sus palabras y por sus consejos.*

*A nuestros jurados Dr. Jaime Cárdenas, Blgo. Iván Paz y Mgter. Jaime Barreda, por sus aportes en la etapa final de nuestra tesis.*

*Gracias por todo*

*Chris y Ana Lucia*

## INDICE

INDICE .....	1
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS .....	7
INTRODUCCION.....	10
HIPOTESIS .....	12
OBJETIVOS.....	13
CAPITULO I.....	14
1. Residuos lignocelulósicos.....	14
1.1. Componentes lignocelulósicos .....	14
1.1.1. Celulosa.....	14
1.1.2. Hemicelulosa.....	15
1.1.3. Lignina .....	16
1.1.4. Otros.....	18
2. Orujo de uva como sustrato para la fermentación en estado sólido.....	18
3. Hoja de mazorca de maíz como sustrato para la fermentación alcohólica .....	19
4. Pretratamiento de residuos lignocelulósicos.....	20
4.1. Pre tratamiento físico.....	21
4.1.1. Trituración mecánica.....	21
4.1.2. Extrusión .....	21
4.2. Pre tratamiento químico .....	21
4.2.1. Hidrólisis con ácido diluido .....	21
4.2.2. Hidrólisis alcalina.....	22
4.2.3. Deslignificación por ozonización.....	23
4.3. Pre tratamiento biológico .....	24
5. <i>Trichoderma</i> sp. ....	24
6. Enzimas.....	26
6.1. Producción de enzimas microbianas .....	27
6.1.1. Fermentación en estado sólido .....	27
6.1.2. Fermentación en cultivo sumergido .....	28
6.2. Celulasas.....	29

6.3. Actividad enzimática .....	31
6.3.1. Factores que afectan la actividad enzimática .....	32
6.4. Hidrólisis enzimática .....	33
7. Bioetanol .....	34
7.1. Materias primas .....	34
7.2. Microorganismos productores de bioetanol .....	35
7.2.1. Levaduras. ....	35
7.3. Fermentación de azúcares para producir bioetanol .....	36
7.4. Importancia y aplicaciones .....	37
CAPITULO II .....	39
MATERIALES Y METODOS .....	39
1. Materiales .....	39
2. Métodos .....	42
1.1. Obtención de <i>Trichoderma</i> sp. inducido para la fermentación en estado sólido .....	42
1.2. Obtención de Enzimas Celulasas .....	44
1.3. Efecto del pH y temperatura en la actividad celulasa .....	47
1.4. Obtención de bioetanol a partir de hoja de mazorca de maíz .....	49
1.5. Análisis estadístico .....	52
CAPITULO III .....	53
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	53
1. Inducción y adaptación de <i>Trichoderma</i> sp. para producir celulasa .....	53
2. Obtención de Enzimas Celulasas .....	54
2.1. Selección del tamiz adecuado para el orujo de uva .....	54
2.2. Fermentación en estado sólido y extracción de enzimas celulasas .....	56
3. Efecto del pH y temperatura en la actividad de las enzimas celulasas .....	67
4. Obtención de bioetanol a partir de hojas de mazorca de maíz .....	76
4.1. Pretratamiento alcalino de las hojas de mazorca de maíz .....	76
CAPITULO IV .....	83
CONCLUSIONES .....	83
RECOMENDACIONES .....	84
BIBLIOGRAFIA .....	85
ANEXOS .....	92
ANEXO N° 1 - FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES .....	93

ANEXO N° 2 - IDENTIFICACIÓN DEL <i>Trichoderma</i> sp. ....	95
ANEXO N° 3 – ANALISIS FISICO QUIMICO .....	97
ANEXO N° 4 - KIT DE GLICEMIA ENZIMÁTICA.....	98
ANEXO N° 5 - METODO DEL DICROMATO DE POTASIO.....	100
ANEXO N° 6 - ANALISIS ESTADISTICO .....	102



## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos. ....	18
Tabla N° 2. Composición química del Orujo de Uva rojo. ....	19
Tabla N° 3. Composición química de Hoja de mazorca de maíz. ....	20
Tabla N° 4. Algunas de las enzimas producidas mediante fermentación en estado sólido. ....	28
Tabla N° 5. Composición del medio de cultivo específico para celulasas (Formula/litro) ....	42
Tabla N° 6. Composición del medio Agar CMC (Formula/litro).....	43
Tabla N° 7. Selección de los tamaños de partícula del orujo de uva a partir del crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. para un sistema FES.....	55
Tabla N° 8. Factores evaluados para el análisis factorial de medidas repetidas. ....	56
Tabla N° 9. Tabla de medias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp.....	58
Tabla N° 10. Análisis de Varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. ....	65
Tabla N° 11. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según concentración de CMC.....	65
Tabla N° 12. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según disolvente .....	66
Tabla N° 13. Análisis estadístico descriptivo de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes pH .....	68
Tabla N° 14. Análisis de varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes pH .....	69

Tabla N° 15. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes pH según método de LSD Fisher .....	70
Tabla N° 16. Factores evaluados para el análisis factorial de medidas repetidas. ....	71
Tabla N° 17. Tabla de medias de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas.....	72
Tabla N° 18. Análisis de Varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas.....	75
Tabla N° 19. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas .....	75
Tabla N° 20. Variación de los sólidos solubles (°Brix) reportados durante las 48 horas de hidrólisis enzimática.....	78
Tabla N° 21. Variación de los sólidos solubles (°Brix) reportados durante los 5 días de fermentación alcohólica .....	79
Tabla N° 22. Concentración de bioetanol evaluado por el método de dicromato de potasio .....	80
Tabla N° 23. Cantidad de etanol obtenido a partir de 100 g de residuos de hoja de mazorca de maíz.....	81
Tabla N° 24. Cantidad de etanol obtenible a partir de hojas de mazorca de maíz.....	82
Tabla N° 25. Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa del orujo de uva y hoja de mazorca de maíz en base seca .....	97
Tabla N° 26. Absorbancias a para concentraciones conocidas de etanol .....	1000
Tabla N° 27. Concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp.....	102
Tabla N° 28. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. por concentración de CMC y tiempo .....	104

Tabla N° 29. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. por disolvente y tiempo .....	105
Tabla N° 30. Análisis estadístico descriptivo de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes pH .....	105
Tabla N° 31. Concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas.....	106
Tabla N° 32. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes tiempos ....	107
Tabla N° 33. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas.....	108



## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Estructura de la cadena de celulosa .....	15
Figura N° 2. Monómeros precursores de hemicelulosa. ....	16
Figura N° 3. Estructura de la lignina .....	17
Figura N° 4. <i>Trichoderma</i> sp. ....	26
Figura N° 5. Cámara de Neubauer. ....	43
Figura N° 6. Medio con orujo de uva preparado para la FES .....	45
Figura N° 7. Muestra después del centrifugado, el sobrenadante es el extracto enzimático. ....	46
Figura N° 8. Muestras del sustrato a diferentes pH. ....	48
Figura N° 9. Medición de la temperatura.....	48
Figura N° 10. Residuo de hoja de maíz .....	49
Figura N° 11. Equipo de destilación .....	51
Figura N° 12. Hongo <i>Trichoderma</i> sp. . A la izquierda: <i>Thichoderma</i> sp. en medio PDA. A la derecha: <i>Trichoderma</i> sp. en agar CMC .....	54
Figura N° 13. Aumento de la concentración de glucosa a lo largo del tiempo - Prueba de Kit de Glicemia Enzimática .....	59
Figura N° 14. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según concentración de CMC.....	60
Figura N° 15. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según concentración de CMC y tiempo .....	61
Figura N° 16. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según disolvente .....	62
Figura N° 17. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según disolvente y tiempo .....	63

Figura N° 18. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según concentración de CMC y disolvente .....	64
Figura N° 19. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes pH.....	68
Figura N° 20. Promedios para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas .....	73
Figura N° 21. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de <i>Trichoderma</i> sp. a diferentes temperaturas y tiempos .....	74
Figura N° 22. Hojas de mazorca de maíz. A la izquierda: Hojas de mazorca molidas antes del pretratamiento. A la derecha: Hojas de mazorca molidas después del pretratamiento .....	77
Figura N° 23. Gráfica de Sólidos solubles (°Brix) durante las 48 horas de la hidrólisis enzimática .....	78
Figura N° 24. Gráfica de Sólidos solubles (°Brix) durante los cinco días de fermentación alcohólica .....	79
Figura N° 25. Identificación Macroscópica del hongo <i>Trichoderma</i> sp. en medio PDA	95
Figura N° 26.- Observación Microscópica del <i>Trichoderma</i> sp. a 100X con KOH al 10% .....	96
Figura N° 27. Curva de calibración para el etanol.....	101
Figura N° 28. Grafica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según concentración de CMC.....	103
Figura N° 29. Gráfica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según disolvente. ....	103
Figura N° 30. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de <i>Trichoderma</i> sp. según tiempo.....	104

Figura N° 31. Grafica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas..... 106

Figura N° 32. Promedios para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes tiempos ..... 107



## INTRODUCCION

La agricultura ocupa 1,5 mil millones de hectáreas en el mundo, lo que desencadena residuos lignocelulósicos que traen consigo problemas de contaminación ambiental ya que no son aprovechados. Se puede usar los residuos lignocelulósicos para generar nuevos productos, por tal fin es que actualmente se realizan investigaciones enfocadas a la producción de distintos subproductos y nuevas aplicaciones, siendo una de ellas el uso de residuos de lignocelulósicos como sustratos para la obtención de enzimas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioetanol.

Los materiales lignocelulósicos pueden presentar en su composición hasta 50% p/p de celulosa, la que se encuentra asociada con otras dos fracciones poliméricas, la hemicelulosa y la lignina (1), los cuales son una fuente de sustrato potencial para la producción de bioetanol si se saben utilizar las tecnologías enzimáticas.

La industria biotecnológica le ha dado una gran importancia al uso de hongos filamentosos para la obtención de enzimas, cabe resaltar, que estos hongos son capaces de ingresar a la matriz porosa de los sustratos y se destacan por su capacidad enzimática celulolítica, capaces de producir celulasas. Entre estos encontramos los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, entre otros.

La producción de enzimas también se ha convertido en un aliado de la biotecnología, entre ellas las celulasas, que son utilizadas industrialmente debido al potencial que muestran en el área textil, detergentes, papel, alimentos, generación de biocombustibles, entre otras.

El petróleo y sus subproductos son considerados actualmente uno de los mayores contaminantes a nivel mundial. La producción y utilización de combustibles fósiles generan gran cantidades de dióxido de carbono; estos a su vez son emitidos a la atmósfera y son los causantes del cambio climático y el calentamiento global, los biocombustibles son considerados alternativas capaces de substituir, con ventajas, a los

derivados del petróleo, dentro de estas fuentes renovables aparece, en los primeros lugares, el bioetanol, tanto por su uso, como por los resultados.

Como alternativa para aprovechar los materiales lignocelulósicos y mitigar la contaminación de estos al medio ambiente, se plantea el uso de residuos lignocelulósicos como sustrato para la fermentación en estado sólido de hongos filamentosos del cual se obtendrá celulasas, las que a su vez al emplearse en la hidrólisis de lignocelulosas permitirán obtener bioetanol.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue obtener enzimas celulasas por fermentación en estado sólido de *Trichoderma* sp. utilizando orujo de uva, las cuales fueron utilizadas en la hidrólisis de las hojas de mazorca de maíz para la obtención de azúcares fermentables para la obtención de bioetanol.





## HIPOTESIS

Dado que *Trichoderma* sp. es capaz de producir celulasas a partir de sustratos que contienen material lignocelulósico, es posible obtener estas enzimas mediante fermentación en estado sólido de orujo de uva, para la obtención de bioetanol a partir de la hidrólisis de hojas de mazorca de maíz.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Obtener celulasas de *Trichoderma* sp. a partir de orujo de uva para producir bioetanol usando hojas de mazorca de maíz

### Objetivos específicos

1. Inducir y adaptar al *Trichoderma* sp. para la obtención de celulasas.
2. Obtener celulasas a partir de *Trichoderma* sp. por fermentación en estado sólido (FES) con diferentes concentraciones de CMC, utilizando orujo de uva como sustrato y evaluar el efecto de Tween 80 y NaCl en la extracción de las celulasas obtenidas.
3. Evaluar el efecto del pH y la temperatura en la actividad celulasa.
4. Obtener bioetanol por fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hojas de mazorca de maíz utilizando las celulasas obtenidas.

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1. Residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos son la biomasa residual procedente de la agricultura, silvicultura, municipios y de diversas industrias, los cuales permiten obtener productos sustentables y no contaminantes del medio ambiente. Estos residuos están formados por 3 componentes: celulosa (40-60%) que está protegida por hemicelulosa (20-40%) y por lignina (10-25%) (2), su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (3).

Estos residuos pueden ser empleados en fermentación sólida de hongos productores de enzimas celulasas y como materia prima para producir bioetanol (4).

#### 1.1. Componentes lignocelulósicos

##### 1.1.1. Celulosa

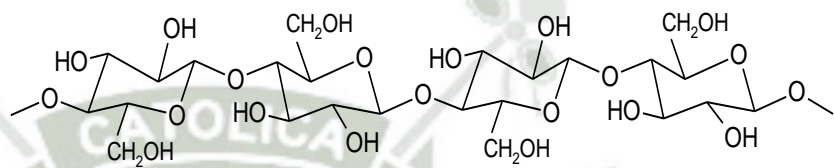
La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre, se encuentra en las paredes de las células vegetales formando parte de los tejidos de sostén. Es un polisacárido lineal compuesto exclusivamente por un gran número de moléculas de glucosa, contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de  $\beta$ -glucosa; es pues un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido); tiene una estructura muy cristalina, rígida y difícil de romper, además es insoluble en agua. (5)

La pared de una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa; la madera un 50 %, mientras que el ejemplo más puro de celulosa es el algodón con un porcentaje mayor al 90%.

##### 1.1.1.1. Estructura de la celulosa

La celulosa está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos (6) monosacáridos de

gran importancia en la fermentación. Posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las capas de celulosa son “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y unidas a través de puentes de hidrógeno. (7) Es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n= 200$ . (8) Es fuerte y resistente a la hidrólisis.

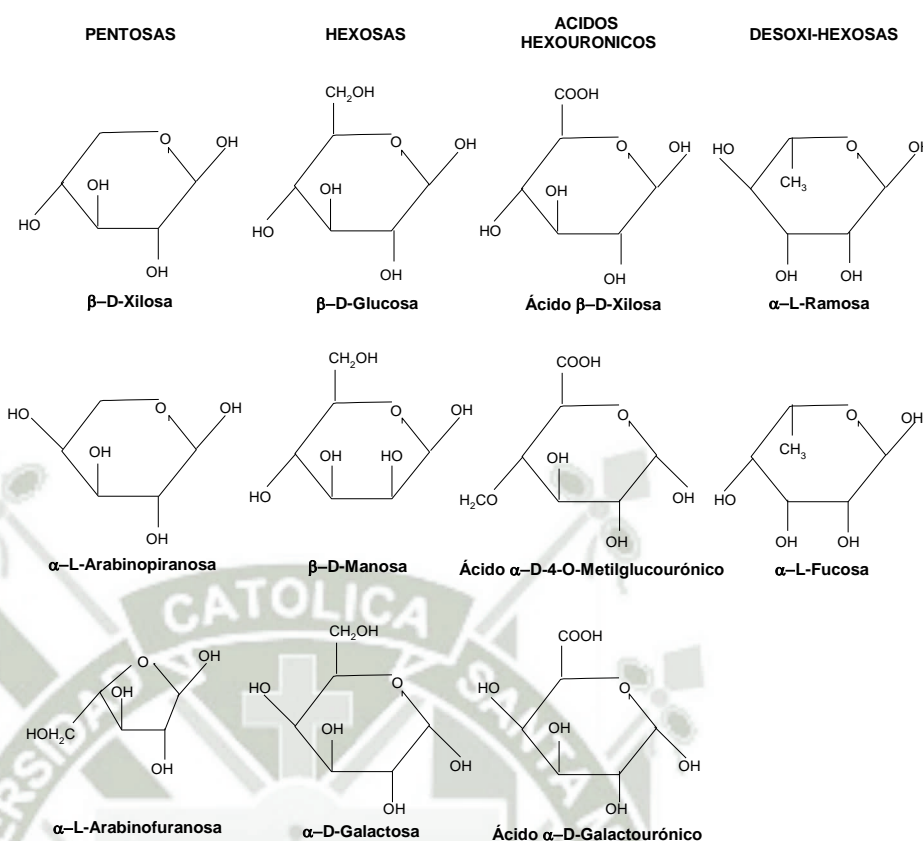


**Figura N° 1. Estructura de la cadena de celulosa (6)**

### 1.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, y galactosa), azúcar y ácidos (metilglucurónico, galacturónico y glucurónico), entrelazadas entre si glucosidicamente. Es una estructura aleatoria, amorfa, con pequeña solidez y fácilmente hidrolizable en ácidos o bases diluidas

La hemicelulosa se caracteriza por ser una molécula con ramificaciones, capaz de unirse a las otras moléculas mediante enlaces que constituyen la pared rígida que protege a la célula de la presión ejercida sobre esta por el resto de las células que la rodean. Sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (9)



**Figura N° 2. Monómeros precursores de hemicelulosa. (10)**

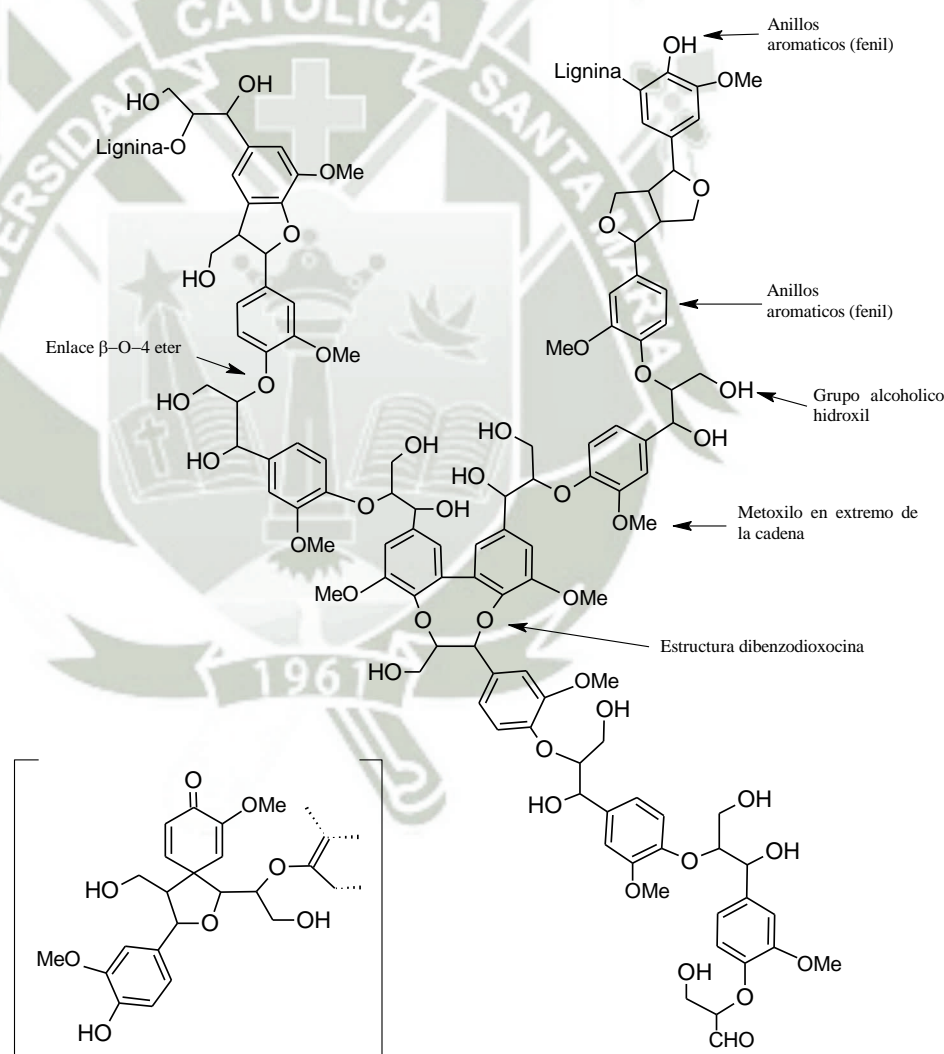
### 1.1.3. Lignina

La lignina es una macromolécula no polisacárida de naturaleza polímera especial, formada por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes parahidroxicinámicos. Es un heteropolimero amorfo ramificado de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenilpropánicos formado por alcoholes aromáticos como cumarílico, coniferílico y sinapílico. No es soluble en agua y es ópticamente inactiva; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada. (6)

Las ligninas son fracciones no carbohidratadas, extremadamente complejas y difíciles de caracterizar. Constituyen un polímero aromático, heterogéneo, amorfo, de alto peso molecular, ramificado, donde no existe ninguna unidad repetida definidamente.

Durante el desarrollo de la célula, la lignina es incorporada como último componente de la pared celular interpenetrando las fibrillas y fortaleciendo la pared celular (11), es el soporte estructural de la planta, el contenido varía con el tipo de planta. La lignina no contiene azúcares, pero encierra a la celulosa y hemicelulosa que si los contienen.

Debido a su estructura, la lignina es resistente a la degradación y ya que se encuentra íntimamente ligada a la celulosa, es necesario modificarla o removerla (des lignificación) para que la celulosa pueda ser degradada más fácilmente por las enzimas microbianas.



**Figura N° 3. Estructura de la lignina (12)**

#### 1.1.4. Otros

Entre las diversas sustancias que constituyen los materiales lignocelulósicos se encuentran: compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, entre otros (13) . Estas sustancias desempeñan la función de intermediarios metabólicos, reservan la energía, contribuyen al color, olor y a la resistencia al marchitamiento.

**Tabla N° 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos. (14)**

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera Dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cascara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Hierba Bermuda	25	35,7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31,4	12

## 2. Orujo de uva como sustrato para la fermentación en estado sólido

El orujo de uva es el residuo sólido obtenido tras la extracción del zumo de la uva y constituye el principal subproducto del proceso de elaboración del vino. (15) y (16). Uno de los principales problemas de las bodegas y las destilerías

es la generación de grandes cantidades de este residuo en cortos periodos de tiempo al año. Además, el orujo de uva presenta algunas características contaminantes como son un bajo pH y un alto contenido en sustancias fenólicas fitotóxicas y antibacterianas, que dificultan la sub-degradación biológica. (17)

El orujo de uva está formado por la piel, las semillas y el raspón, constituyendo un 13% del peso de la uva procesada. (18). Su composición química es bastante compleja: alcoholes, ácidos, aldehídos, ésteres, polifenoles, sustancias minerales, azúcares, etc. En su composición incluye carbohidratos, fibra, grasas, proteínas y sales minerales. (19)<sup>y</sup>(20)

**Tabla N° 2. Composición química del Orujo de Uva rojo. (21)**

<b>Compuesto</b>	<b>Orujo de uva rojo (%) base seca</b>
Celulosa	14.5
Hemicelulosa	10.3
Lignina	17.2
Cenizas	8.0

El aprovechamiento del orujo es muy diverso: En Francia lo usan para extraer el ácido tartárico, también es usado como forraje ya que el orujo tiene un valor alimenticio aproximadamente igual a la mitad del de la alfalfa, el orujo fermentado una vez ha sido destilado, constituye un abono excelente, finalmente es utilizado en la producción de alcohol. (22)

### **3. Hoja de mazorca de maíz como sustrato para la fermentación alcohólica**

La producción de biomasa residual que genera un cultivo de maíz de grano (cañas, hojas, chalas y mazorcas), fluctúa entre 20 a 35 toneladas por hectárea y en el maíz de choclo (cañas y hojas) varía entre 16 a 25 toneladas por hectárea. La proporción entre los componentes del residuo depende principalmente de la variedad, nivel de fertilización y tipo de cultivar. (23)

Se ha identificado que el porcentaje del peso seco según estructura corresponde de la siguiente manera: Panoja 12%, Tallos 17.6%, Chalas 8.9%, Total caña 38.5%, Mazorca 11.8%, Grano 49.7%, Total espiga 61.5%.

Cada una de estas estructuras posee características físico-químicas propias, lo que le confiere un valor nutritivo muy diferente, dependiendo de si el residuo corresponde a maíz de grano o maíz para consumo fresco. Los tallos presentan las estructuras más lignificadas y de menor contenido de proteína bruta (3.1%) y las hojas entre 4 y 7 %.

El bajo porcentaje de lignina en los restos de la planta del maíz lo hace más digestible que las pajas de cereales, siendo a su vez, más rico en azúcares solubles.

**Tabla N° 3. Composición química de Hoja de mazorca de maíz. (24)**

Compuesto	Hoja de mazorca de maíz porcentaje (%) base seca
Celulosa	34-41
Hemicelulosa	31-39
Lignina	2-14
Cenizas	3-7

#### **4. Pretratamiento de residuos lignocelulósicos**

El pretratamiento aumenta el acceso enzimático, por lo cual, es necesario someter a los residuos lignocelulósicos a un tratamiento preliminar con el objetivo de disociar el complejo lignina-celulosa, aumentar el área superficial del material, reducir la cristalinidad de la celulosa y/o disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis.

La hidrólisis enzimática de las lignocelulosas sin pretratamiento no suele ser tan eficaz debido a la alta estabilidad de los materiales a los ataques enzimáticos o bacterianos. Un pretratamiento eficaz también abarca bajos costos de inversión, bajo consumo de energía, uso de reactivos baratos, de fácil recuperación y que sean aplicables en diversos sustratos.

Los residuos lignocelulósicos, después de colectados, deben ser procesados adecuadamente, mediante la reducción del tamaño por procesos de cortado y/o molido y posteriormente lavado, si fuera necesario. De esta forma, los materiales están listos para su pretratamiento. (25)

Existen diversos tipos de pre tratamientos (físicos, químicos, biológicos, térmicos) que permiten la degradación de hemicelulosa y lignina de la biomasa.

#### **4.1. Pre tratamiento físico**

##### **4.1.1. Trituración mecánica**

El pre tratamiento de trituración mecánica se utiliza para reducir el tamaño de partícula y cristalinidad de la lignocelulosa, con el fin de aumentar el área de superficie específica y reducir el grado de polimerización (26).

##### **4.1.2. Extrusión**

La extrusión es un nuevo y prometedor pre tratamiento físico para la conversión de biomasa para la producción de etanol.

En la extrusión, los materiales se someten a calentamiento, mezcla y cizallamiento, lo que resulta en modificaciones físicas y químicas durante el paso a través del extrusor. Las ventajas de este pre tratamiento son: la capacidad de proporcionar transferencia de calor rápida y rápida mezcla (26).

#### **4.2. Pre tratamiento químico**

El objetivo de los pre-tratamientos químicos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando la acción de las enzimas.

##### **4.2.1. Hidrólisis con ácido diluido**

El pre tratamiento químico con ácido sulfúrico diluido ha sido reportado por sus altas tasas de reacción y por su efectiva hidrólisis de la celulosa. (14) A una temperatura moderada la sacarificación tiene bajos rendimientos. A altas temperaturas el tratamiento con ácido diluido favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del

80% de la hemicelulosa. La lignina no se solubiliza pero si aumenta los rendimientos de la hidrólisis enzimática. Está documentado que la producción de altas conversiones de xilano a xilosa hace el proceso económicamente favorable. (27)

Existen dos condiciones típicas del pre tratamiento con ácido diluido: (1) altas temperaturas (entre 160-200°C), en un proceso continuo con bajas cargas de sólido (5-10% peso sustrato/peso mezcla) o (2) bajas temperaturas (120-160°C), en un proceso con alta carga de sólidos (10-40%). La hidrólisis con ácido diluido ha sido exitosamente probada en el pre tratamiento de materiales lignocelulósicos como desechos de maíz, bagazo de caña, madera y astillas de álamo, paja de trigo y pasto. Ésta utiliza  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $HNO_3$  entre 1-5%. Las variables comúnmente estudiadas son la temperatura, la concentración del ácido y la razón sólido/líquido. (27)

El pre tratamiento con ácido diluido aumenta significativamente la hidrólisis de la celulosa, pero el costo es usualmente más alto que el de algunos pretratamientos fisicoquímicos, como la explosión a vapor o AFEX (explosión de fibra con amonio). Se debe neutralizar el pH para la hidrólisis enzimática y la fermentación aguas abajo. (28). Es por esta razón que la hidrólisis con ácido diluido se ha vuelto impopular.

#### **4.2.2. Hidrólisis alcalina**

El pretratamiento alcalino es el más utilizado para potenciar la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa; elimina selectivamente la mayor parte de lignina y parte de la hemicelulosa. Los principales reactivos utilizados son hidróxido de sodio ( $NaOH$ ), hidróxido de calcio y amoníaco.

El pre tratamiento con NaOH diluido provoca la ruptura de enlaces entre lignina y carbohidratos, produce un hinchamiento de la celulosa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, eliminación de lignina y hemicelulosas y disminución en el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. Se considera que el mecanismo de acción es la saponificación de los enlaces éster intermoleculares que atraviesan la hemicelulosa y la lignina (14). La porosidad del material lignocelulósico se incrementa con la eliminación de estos entrecruzamientos. Los niveles óptimos oscilan entre 5 y 8 g de NaOH / 100 g de sustrato. La efectividad de este pre tratamiento depende del contenido de lignina en el material. Se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja con un contenido de lignina del 18% (29) y de maderas duras, pero no de maderas blandas con un contenido de lignina superior al 26%.

Este pre tratamiento puede ser el más adecuado para el desarrollo de un proceso de aprovechamiento de residuos agrícolas por hidrólisis enzimática, puesto que es un reactivo relativamente barato, no produce sustancias extrañas que puedan interferir en la hidrólisis enzimática y las condiciones de operación son moderadas.

#### **4.2.3. Deslignificación por ozonización**

El ozono es un agente oxidante que muestra una eficiencia de deslignificación alta. Además, en presencia de ácido acético se solubiliza y presenta una gran selectividad hacia la degradación de la lignina y las materias orgánicas presentes.

Se conoce que a mayor contenido de lignina, el ozono ataca más directamente a la lignina. La hemicelulosa es ligeramente afectada, mientras que la celulosa no es afectada. Así, la cantidad de compuestos de degradación derivados de la hemicelulosa y de la celulosa es muy baja

La Ozonolisis es una reacción que se produce a temperatura ambiente y presión atmosférica y utiliza como agente el ozono. La velocidad de reacción del ozono con el material es sensible al contenido de humedad del mismo. Un requerimiento de humedad entre 40-50% puede ser óptimo para una oxidación efectiva. Este pre tratamiento presenta las siguientes ventajas: remueve efectivamente la lignina, no produce residuos tóxicos, las reacciones son llevadas a cabo a temperatura y presión ambiental. Sin embargo el proceso resulta muy costoso debido a la cantidad de ozono requerido.

#### 4.3. Pre tratamiento biológico

Se utiliza microorganismos que atacan los residuos lignocelulósicos y que son capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático.

Las ventajas del pre-tratamiento biológico son el bajo requerimiento energético y las suaves condiciones ambientales en la que se produce el proceso. Como inconveniente la tasa de hidrolisis es demasiado lenta. (30)

#### 5. *Trichoderma* sp.

Hay microorganismos (bacterias y hongos) que viven libres y también son capaces de hidrolizar la celulosa. Tienen una gran importancia ecológica, pues reciclan materiales celulósicos como papel, cartón y madera. De entre ellos, es de destacar el hongo *Trichoderma* sp. Este hongo fue descrito por primera vez hace 200 años por los micólogos como un gasteromiceto y solo un siglo después se realizó el análisis de su estructura y características para ser clasificado como género entre los hongos filamentosos, con propiedades y actividades biológicas cada vez más usadas en la agricultura actual. Su habilidad como antagonista solo fue descubierta hace 50 años y gran cantidad de artículos técnicos se han escrito describiendo sus bondades en el manejo biológico de los cultivos agrícolas.

El género *Trichoderma* está en el ambiente y especialmente en el suelo. Se ha utilizado en aplicaciones comerciales para la producción de enzimas y para la

regulación de los fitopatógenos que enferman las plantas. Se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica y por su relación con ella está clasificado en el grupo de hongos hipogeos, lignolícolas y depredadores. Es aeróbico y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido.

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (fungi), división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae (31). Aunque de acuerdo con (32), (33), (34), (35), la clasificación taxonómica del género *Trichoderma* sería Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*.

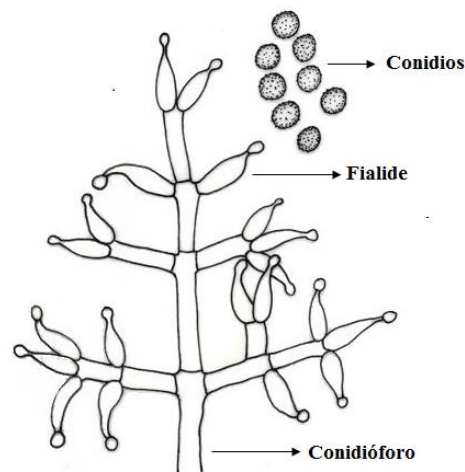
Morfológicamente, es un hongo que posee estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado, nace en centros pequeños. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estructuras de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. Es saprofito del suelo y de la madera y el crecimiento en el suelo es muy rápido.

La alta presencia de humedad y el riego mejora las condiciones de vida de *Trichoderma*, pasando de un estado latente a uno activo y desarrollándose óptimamente hasta en un 60 % de plena capacidad del suelo de retención de humedad. A porcentajes mayores de saturación se disminuye la colonización y sobrevivencia por la baja disponibilidad de oxígeno. Es favorecido por condiciones de pH ácido donde su población se incrementa por una mayor formación de conidióforos, por la germinación de conidias y por menor competencia con microorganismos como actinomicetos y bacterias que se encuentran limitados por la acidez. En suelos con temperatura que oscilan entre los 10 °C y 15°C y baja disponibilidad de nutrientes esenciales no crece y se afecta la actividad benéfica.

El modo de acción de *Trichoderma* está asociado a la descomposición de la materia orgánica que hay en el suelo y por el antagonismo con microorganismos

patógenos a las plantas usando procesos de depredación, parasitismo y competición, y por su hiperparasitismo.

*Trichoderma* es uno de los mejores productores de celulasa, participa en la biotransformación de celulosa, en la transformación de hemicelulosa, en la mineralización del Nitrógeno (reacciones hidrolíticas) y de algunas proteínas presentes, en la degradación y en la descomposición de la lignina y el humus que al tener estructuras basadas en núcleos aromáticos son degradados por oxidación de cadenas laterales. (36)



**Figura N° 4. *Trichoderma* sp.**

## 6. Enzimas

Las enzimas son proteínas que intervienen eficientemente como biocatalizadores altamente específicos en un gran número de reacciones. En los sistemas vivos las enzimas participan en la obtención de energía y nuevos materiales a partir de macromoléculas, siendo indispensables para el crecimiento, la reparación y el mantenimiento de las células. (37). Aunque todos los organismos podrían ser utilizados como fuente de producción de enzimas, para la aplicación comercial de las enzimas industriales los microorganismos son la fuente más importante, ya que producen una mayor cantidad y se puede mejorar su producción optimizando los parámetros físico-químicos o mediante manipulación genética. Además, las enzimas obtenidas a partir de microorganismos, especialmente las extracelulares, se extraen fácilmente mediante procesos de post-tratamiento con bajos costes. Es

importante señalar que la elección del organismo productor de las enzimas determinará la estabilidad y viabilidad del sistema de producción.

Los avances de la biotecnología en las últimas décadas, especialmente en genética e ingeniería de proteínas, han otorgado a las enzimas un papel fundamental dentro de los procesos industriales. (36)

## 6.1. Producción de enzimas microbianas

### 6.1.1. Fermentación en estado sólido

Es definida como el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia total o casi total de agua. Básicamente se utiliza para hongos; el hongo se desarrolla en la superficie húmeda de un material sólido, lo cual le permite crecer en condiciones similares a las encontradas en la naturaleza. Es una alternativa interesante para la producción de enzimas y su aplicación debido a su elevado potencial para la producción de las mismas y por sus numerosas ventajas sobre la fermentación en cultivo sumergido:

-La enzima en el crudo de FES está más concentrada, lo que presenta especial interés en procesos donde los productos del crudo fermentado pueden utilizarse directamente como fuente de enzimas sin etapas previas de purificación. Como ejemplos se pueden citar la elaboración de aditivos en la alimentación, la hidrólisis de materias lignocelulósicas y el procesado natural de fibras.

-Otra ventaja a señalar de la FES frente a la FCS respecto a la obtención de enzimas se refiere a los costes de producción, que en la primera son, en muchos casos, inferiores. Por ejemplo, en la producción de celulasa, mientras que el crudo de fermentación de cultivo sumergido cuesta sobre 20 \$/kg, el de FES tiene un valor de 0,2 \$/kg. (38) De forma análoga, un análisis económico sobre la producción de la enzima lipasa con el hongo *Penicillium restrictum* demostró que el capital a invertir en cultivo sumergido era un 78% superior al del proceso en FES, para una producción anual de 100 m<sup>3</sup>. (39)

Una ventaja adicional de la producción de enzimas mediante FES es la estabilidad de las mismas cuando se producen a altas temperaturas o pH extremos. (40)

En la tabla N° 4 se muestran algunos ejemplos de enzimas obtenidas por fermentación en estado sólido a partir de residuos agroindustriales.

**Tabla N° 4. Algunas de las enzimas producidas mediante fermentación en estado sólido. (41)**

Enzima	Microorganismos	Sustrato
Celulasa, $\beta$ -glucosidasa, carboximetilcelulasa, lacasa, poligalacturonasa, ligninasa	Cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Lentinula</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Pleorotus</i> sp., <i>Neurospora</i> sp., <i>Sporotrichum</i> sp., <i>Cerrena</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Phanerochaete</i> sp., etc.	Bagazo, fibra de coco, piel de arroz, paja de arroz, salvado de trigo, paja de trigo, residuo de té, sorgo dulce, ensilaje, pulpa de remolacha azucarera, serrín, orujo de uva, residuo de aceite de palma, residuo de casava, cascara de soja, etc.
Xilanasa, $\beta$ -xilosidasa, $\alpha$ -arabinofuranosidasa, acetoesferasa, catecoloxidasa.	Cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Phlebia radiata</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Melanocarpus albomyces</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>Thermomyces lanuginosa</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Thermascus aurantiacus</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> , <i>Thermomonosporas</i> sp.	Paja de arroz, cascara de maíz, mazorca de maíz, salvado de trigo, paja de trigo, bagazo, tallo de arroz, cascara de soja, pulpa de remolacha azucarera, cascara de arroz, orujo de manzana, residuo del procesado de café, paja de cebada, paja de avena.
Lacasa, Li-pperoxidasa, Mn-pperoxidasa, aril-alcoholesidasa, catalasa, fenol oxidasa.	Cepas de <i>Penicillium</i> sp., <i>Pleorotus</i> sp., <i>Phlebia radiata</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Flammulina velupites</i> , <i>Polyporus</i> sp., <i>Panus tigrinus</i> , <i>Trichoderma versicolor</i> .	Bagazo, salvado de trigo, paja de trigo, serrín, tallo de algodón, polvo de celulosa, virutas de madera.

### 6.1.2. Fermentación en cultivo sumergido (FCS)

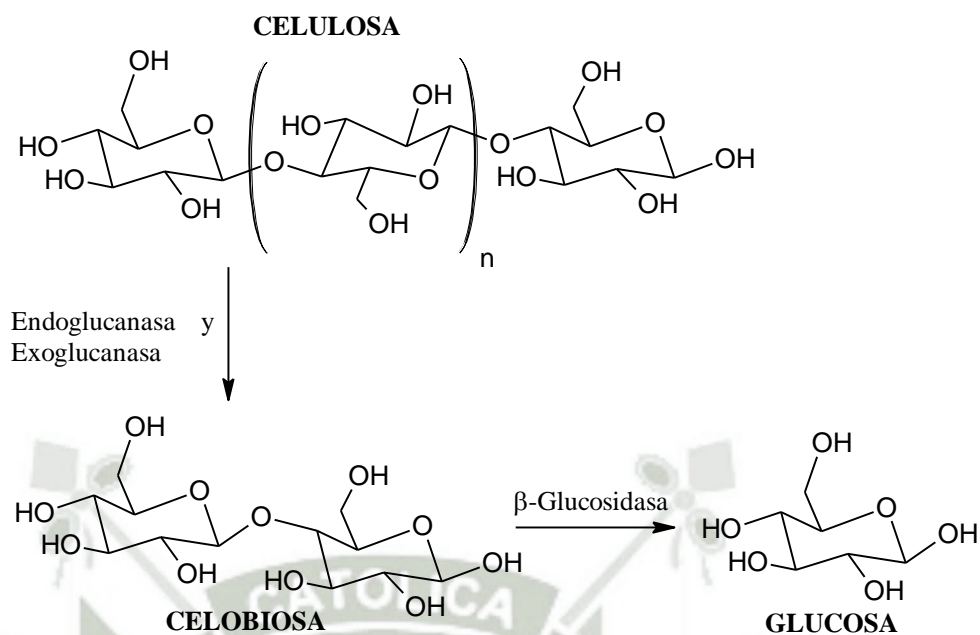
Se define como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede no ser aireado por medios mecánicos (42). Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación en cultivo sumergido, frecuentemente utilizando microorganismos manipulados

genéticamente. Sin embargo, este proceso mejorado presenta altos costes de producción. (43)<sup>y</sup> (44)

## 6.2. Celulasas

Las celulasas son un grupo de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la celulosa en monómeros de baja complejidad como la glucosa, participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 de la celulosa, están constituidas por un sistema enzimático complejo compuesto por tres grupos de celulasas que están involucradas en el proceso de hidrólisis:

- (1) Endoglucanasas o endocelulasas: Rompen los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos en forma aleatoria en el interior de la molécula de celulosa, ataca regiones de baja cristalinidad, generando nuevos finales de cadena no reductores. Como resultado hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. Puede actuar sobre celo dextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa.
- (2) Exoglucanasas :
  - Celobiohidrolasas: Actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Esta enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa y sobre celo dextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa.
  - Glucohidrolasas: Se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y CMC
- (3)  $\beta$ -glucosidasas o celobiasa: Hidrolizan celobiosa para producir glucosa.



**Ecuación 1**

Bacterias y hongos son capaces de producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos y otros. Estos microorganismos pueden actuar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Algunos microorganismos capaces de producir celulasas son las bacterias del género *Clostridium*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces*. Las celulasas comerciales están centradas en hongos como *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium*. (27)

Aplicación industrial de las celulasas: Se aplican en el procesado de la celulosa, tratamiento de basura, conversión de desechos vegetales en fertilizantes o alimento para animales, en la fermentación alcohólica de granos, en la extracción de zumos de frutas y verduras, en la industria de la pulpa y el papel, en las industrias textil, alimentaria, química, de combustibles, etc. (44). También se utilizan para conseguir una conversión eficaz de la biomasa lignocelulósica en combustible. (45) y (46)

Además, los hidrolizados enzimáticos producidos tras la actuación de celulasas y hemicelulasas se han utilizado como sustrato para la producción

de sustancias de gran interés como productos químicos (polifenoles, ácidos orgánicos, etc.) y disolventes (acetona, butanol, etc.). (47)

### 6.3. Actividad enzimática

La acción de las enzimas se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición. El sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones débiles como ser: puentes de hidrógeno, electrostáticos, hidrófobos, etc., en un lugar específico llamado el centro activo. Este centro es una pequeña porción de la enzima, constituida por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato. Para ejercer su actividad las enzimas requieren, a menudo, de moléculas auxiliares, que se ubican en el centro activo de la enzima; en el caso de ser moléculas orgánicas reciben el nombre de coenzimas, mientras que si son iones metálicos (generalmente oligoelementos) se llaman cofactores entre los que se encuentran el hierro, cobre, yodo, manganeso, selenio, zinc, cromo, cobalto, flúor, litio y silicio. El conjunto enzima + cofactor o coenzima se denomina holoenzima, mientras que la parte proteica propiamente dicha se conoce como apoenzima. Usualmente las llamadas coenzimas no son simples moléculas auxiliares de las enzimas sino verdaderos sustratos de las reacciones pero que a diferencia del sustrato principal se regeneran fácilmente mediante reacciones simples.

Las enzimas tienen una estructura tridimensional sin la que no pueden desarrollar su actividad. En esa estructura poseen el centro activo al que se unen los sustratos y en el que se produce la reacción catalítica. Cuando el sustrato accede al centro activo, se produce un cambio en la estructura del conjunto enzima-sustrato pero una vez finalizada la canalización (catálisis: transformación química motivada por sustancias que no se alteran en el curso de la reacción) la enzima es recuperada sin ningún cambio en su estructura. (48)

La determinación de la efectividad de una enzima se evalúa generalmente siguiendo la desaparición del sustrato o la aparición de un producto formado en la reacción.

Para expresar la actividad de la celulasa se evalúa la aparición del producto formado con una cantidad conocida de sustrato, una determinada cantidad de enzima y en un lapso definido de tiempo.

### 6.3.1. Factores que afectan la actividad enzimática

**-Efecto del pH:** La mayoría de las enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente. Este efecto se debe a que, al ser las enzimas de naturaleza proteica, al igual que otras proteínas, se desnaturalizan y pierden su actividad si el pH varía más allá de unos límites estrechos. De ahí la conocida importancia biológica de los sistemas tampón.

En la mayor parte de los casos el pH óptimo está próximo a la neutralidad, en consonancia con el pH intracelular, pero existen enzimas con pH óptimo muy diverso según sea el pH del medio en el que habitualmente actúan (las enzimas proteolíticas del jugo gástrico tienen pHs óptimos próximos a 2 ya que este es el pH de dicho jugo). Por último existen algunos enzimas a los que el pH no afecta en absoluto. (49)

**-Efecto de la Temperatura:** Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa con la temperatura. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas se produce un brusco descenso de la actividad cuando se alcanza una temperatura crítica. Este efecto no es más que un reflejo de la desnaturalización térmica del enzima cuando se alcanza dicha temperatura. Si representamos gráficamente la variación de la actividad de los enzimas en función de la temperatura da la impresión

de que existe una temperatura "óptima" análoga al pH óptimo estudiado anteriormente; hay que resaltar que esa aparente temperatura óptima no es más que el resultado de dos procesos contrapuestos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y 2) la desnaturalización térmica del enzima. (50)

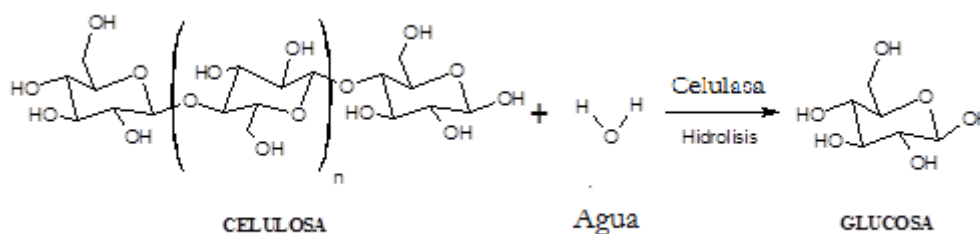
#### 6.4. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por enzimas celulasas que poseen una alta especificidad sin formación de productos indeseables. Consiste en tres pasos:

- 1.-Absorción de las enzimas celulasas en la superficie de la celulosa.
- 2.-Degradación de celulosa a azúcares fermentables (pentosas y hexosas, incluida la glucosa).
- 3.-Desorción de las celulasas.

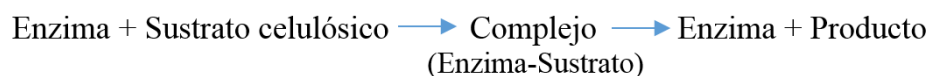
Los productos de la hidrólisis en su mayoría pueden ser fermentados por levaduras o bacterias a etanol. Las condiciones de uso de la hidrólisis enzimática son suaves (pH 4,8 y temperatura entre 45-50°C) y no posee el problema de la corrosión.

Según Terán, M. (51) la reacción es:



Ecuación 2

La labor enzimática de la hidrólisis puede ser resumida de la siguiente manera:



## 7. Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible obtenido por la fermentación de la materia orgánica y la biomasa rica en hidratos de carbono a través de la acción microbiana. El bioetanol tiene las mismas características y composición química que el etanol ya que se trata del mismo compuesto. La diferencia radica en su proceso de producción (52).

### 7.1. Materias primas

Para la producción de etanol se utilizan diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice.

Varios autores, coinciden en definir 3 tipos de materias primas para la producción de etanol:

- a) Materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos como fuente de azúcares. (Tales como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.)
- b) Materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares. (Tales como la yuca, maíz, papa, etc.)
- c) Materiales celulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, tales como el bagazo, la madera, residuos agrícolas, etc.

El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. Las de la primera clase fermentan directamente. El segundo tipo consta de hidratos de carbono complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables

mediante la acción de enzimas. Las sustancias celulósicas de la tercera clase se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con enzimas o ácidos inorgánicos, principalmente. (53)

## 7.2. Microorganismos productores de bioetanol

Los microorganismos más empleados en la obtención de bioetanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables.

### 7.2.1. Levaduras.

Las levaduras son empleadas para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas.

En las levaduras, la producción de etanol se realiza principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales o melaza de azúcar. Las principales características que debe tener una cepa para la producción de alcohol industrial son:

- Capacidad de fermentar rápidamente el medio y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico.
- Pocos exigentes en factores de crecimiento, para evitar la adición de vitaminas a los medios industriales.
- Tener una buena tolerancia al etanol.
- Buena producción de esteres y glicerol.

Las levaduras más utilizadas y estudiadas para la producción de alcohol, son *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*. (54)

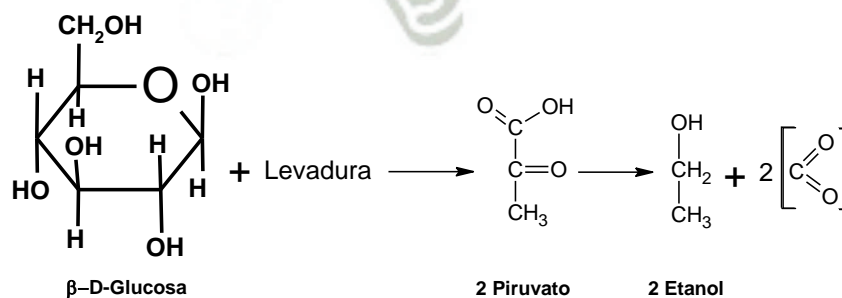
*-Saccharomyces cerevisiae*: Es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior. (55). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C y un pH aproximado de 4.0 a 5.0, no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo.

### 7.3. Fermentación de azúcares para producir bioetanol

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono y moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos incluye 3 etapas fundamentales:

- La conversión de carbohidratos en azúcares simples
- La fermentación de estos azúcares a etanol
- Finalmente la separación del etanol por destilación



Ecuación 3

#### 7.4. Importancia y aplicaciones

El bioetanol es ampliamente utilizado como combustible en Brasil, Estados Unidos y algunos países europeos. Los mayores productores son Brasil (37 % de la producción mundial), EE.UU. (33 % de la producción mundial) y la Unión Europea con un 14% de la producción mundial.

Hoy en día, la producción de etanol requiere un 50 % menos de energía que la que se necesitaba en la década de 1980. La tecnología de la producción de bioetanol está mejorando continuamente. Por ejemplo, el rendimiento de etanol a partir del maíz se ha incrementado en más de un 22 % en los EE.UU. en comparación a 1980.

El desarrollo de métodos para la producción de biocombustibles (bioetanol) se considera renovable y sostenible. Un combustible de bioetanol tiene el potencial para reducir la emisión neta de dióxido de carbono, el principal gas de efecto invernadero. También mantiene y permite el desarrollo de las actividades agrícolas y , desde un punto de vista económico, una reducción de la importación de productos de combustible extranjero.

La alternativa de emplear residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, constituye hoy día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo. La existencia en los diversos países iberoamericanos de abundantes recursos lignocelulósicos, justifica la dedicación por estas naciones de un esfuerzo importante al desarrollo y adaptación de tecnologías tendientes a la utilización integral y racional de los mismos.

El bioetanol tiene el potencial para reemplazar los combustibles líquidos derivados del petróleo en algunas aplicaciones.

Los biocombustibles pueden definirse en general como aquellos combustibles sólidos, líquidos o gases obtenidos a partir de productos agrícolas o del procesamiento de productos agroindustriales o de residuos orgánicos, es decir, de la biomasa y son por lo tanto distinguibles de los

combustibles fósiles, que se derivan de fosilizados de materiales biológicos. En la actualidad, los biocombustibles más ampliamente producidos son el etanol, diesel y metanol (50)



## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue realizada en el laboratorio 302 del pabellón H en la Universidad Católica de Santa María.

#### 1. Materiales

##### Material Biológico

- Orujo de Uva
- Hoja de mazorca de maíz
- *Trichoderma* sp.
- Levadura Fleischman
- Harina de maíz

##### Material de Vidrio

- Cámara de Neubauer
- Luna de reloj
- Baguetas
- Pipetas
- Vaso precipitado
- Tubos de ensayo
- Erlen Mayers de 50 mL y de 250 mL.
- Balones de 500 mL y 1000 mL
- Matraces
- Botellas de vidrio ámbar 50 mL
- Equipo de destilación

- Termómetro

**Equipos:**

- Autoclave Vertical Type Steam Sterilizer
- Microscopio Leica
- Estufa J. P. Selecta
- Picatodo Marca Molinex
- Shaker
- Refrigeradora
- Cocina eléctrica
- Agitador magnético
- Mechero bunsen
- Balanza Analítica Kern
- Baño Termostático Precistern
- Espectrofotómetro Agilent Technologies
- Centrífuga Hettich EBA 20

**Reactivos:**

- Medio de cultivo PDA.
- Agar CMC
- Peptona
- Extracto de levadura
- Agar
- Carboximetil celulosa (CMC)
- Kit de glicemia enzimática
- Cloruro sodio
- Tween 80
- Hidróxido de sodio
- Soluciones buffer

- Urea
- Sulfato de amonio
- Buffer citrato
- Carbonato de potasio
- Ácido sulfúrico
- Carbonato de potasio
- Dicromato de potasio
- Etanol

**Otros:**

- Asa en punta
- Micropipetas de 10 $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 1000 $\mu$ l
- Termómetro digital
- pH metro Hanna
- Brixómetro Atago
- Placas Petri descartables
- Propipetas
- Tamizadores (<1.45mm, >1.45<1.75mm y >1.75 <2mm)
- Tubos Falcon
- Tips de micropipeta
- Plastifilm
- Espátula

**Programas:**

- Statgraphics Centurión XVII
- Microsoft Excel
- Chemscketh 11.0

## 2. Métodos

### 1.1. Obtención de *Trichoderma* sp. inducido para la fermentación en estado sólido

#### 1.1.1. Obtención de la cepa de *Trichoderma* sp.

La cepa de *Trichoderma* sp. fué cedida por los responsables del proyecto “Obtención de celulasas y pectinasas a partir de los hongos *Trichoderma* sp. y *Aspergillus niger* desarrollados en dos sustratos pectinocelulósicos para extraer el colorante natural de la semilla del achiote (*Bixa orellana*)” quienes realizaron la identificación del *Trichoderma* sp. la cual se muestra en el ANEXO N° 2. La cepa fue activada en medio PDA durante 7 días e incubada a una temperatura de 25 °C.

#### 1.1.2. Inducción de *Trichoderma* sp. para producir celulasa

Para la inducción de *Trichoderma* sp. se realizó un repique del hongo que se encontraba en medio PDA a una placa Petri que contenía el medio de cultivo específico para celulasas descrito en la Tabla N°5 para así inducir al hongo a producir celulasas. Se dejó incubar por 7 días a temperatura ambiente.

**Tabla N° 5. Composición del medio de cultivo específico para celulasas (Formula/litro)**

Componentes	Gramos
Peptona	1
Extracto de levadura	0,5
Agar Agar	15
CMC (Carboximetilcelulosa)	3,5

### 1.1.3. Adaptación de *Trichoderma* sp.

Pasados los 7 días se añadieron 2 mL de una solución de NaCl (0.9%) a la placa petri del hongo inducido y se resuspendieron las esporas, luego se añadieron 200  $\mu$ L de la suspensión a ocho placas petri que contenían 10 mL del medio de adaptación Agar CMC, cuya formulación se describe en la Tabla N°6 y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente.

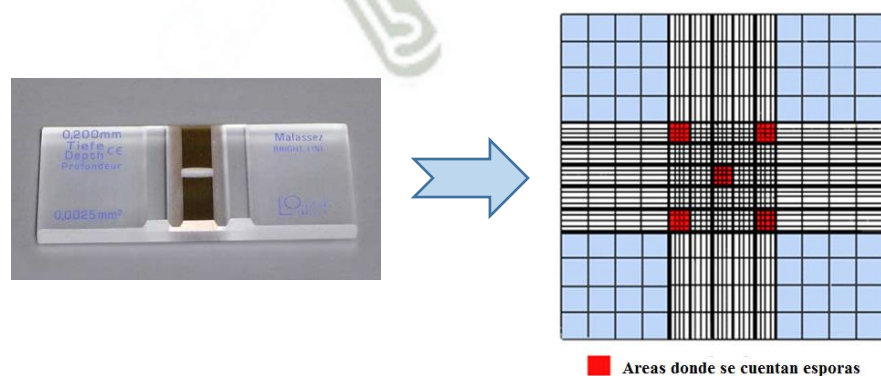
**Tabla N° 6. Composición del medio Agar CMC (Formula/litro)**

Componentes	Gramos
NaNO <sub>3</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.5
KCl	0.5
CMC	2.0
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Peptona	0.2
Agar Agar	17

### 1.1.4. Preparación del inóculo:

Transcurrido el tiempo de incubación en Agar CMC se realizó un lavado a cada placa con 2 mL solución de NaCl (0.9%), las esporas se recogieron en un frasco de vidrio.

La determinación de la concentración de esporas en el inóculo se llevó a cabo mediante un recuento en cámara Neubauer con ayuda de un microscopio óptico a 40x.



**Figura N° 5. Cámara de Neubauer.**

## 1.2. Obtención de Enzimas Celulasas

### 1.2.1. Recolección del sustrato

Se recolectaron 500 g de orujo de uva de la vinificadora “La Hacienda del Abuelo” ubicada en el distrito de Vítor, provincia de Arequipa. Se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta el momento de su utilización.

### 1.2.2. Preparación del medio de fermentación en estado sólido

Para la fermentación en estado sólido (FES), se utilizó como sustrato orujo de uva estéril, para lo cual se mezclaron 500 g de orujo de uva con 5 litros de agua durante media hora, transcurrido este tiempo, el sólido se filtró, este paso se repitió 2 veces. Finalmente, se secó en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, el residuo seco fue molido y llevado a diferentes tamaños de partícula:  $<1.45\text{mm}$ ,  $>1.45<1.75\text{mm}$  y  $>1.75 <2\text{mm}$ . Posteriormente fue esterilizado dos veces en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos antes de ser utilizado.

### 1.2.3. Selección del tamiz adecuado para orujo de uva

Se determinó el crecimiento de *Trichoderma* sp. con diferentes tamaños de partículas:  $<1.45\text{mm}$ ,  $>1.45<1.75\text{mm}$  y  $>1.75 <2\text{mm}$ .

Se tomó 5 g de sustrato dentro de una placa Petri, se adicionó agua destilada y se ajustó la humedad al 70%; se agregó el inoculo de *Trichoderma* sp. de  $4.5 \times 10^7$  esporas, se incubó a temperatura ambiente durante 7 días. El procedimiento se realizó para cada uno de los diferentes tamaños de sustrato. Finalizado el tiempo de incubación se determinó visualmente en que sustrato hubo mayor crecimiento del hongo.

#### 1.2.4. Fermentación en estado solido

Después de seleccionar el tamaño de partícula adecuado, se evaluaron diferentes concentraciones de CMC (0.1%, 0.3% y 0.5%) como inductores para la producción de enzimas celulasas durante la FES.

La fermentación en estado sólido se llevó a cabo en placas petri de 9 cm de diámetro, a cada una se adicionó 5 gramos de sustrato de orujo de uva estéril con el tamaño de partícula determinado anteriormente, CMC a diferentes concentraciones (0.1%, 0.3% y 0.5%) y un inóculo de  $4.5 \times 10^7$  esporas; el entorno se ajustó a una humedad 70% . Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Cada experimento se realizó 6 veces. A los 7 días se realizó la extracción de celulasas.



**Figura N° 6. Medio con orujo de uva preparado para la FES**

#### 1.2.5. Extracción de celulasas

Finalizada la FES se realizó la extracción de celulasas. La mitad de las placas se lavaron usando 50 mL de Tween 80 al 0.1% y la otra mitad se lavó usando 50 ml de NaCl 0.9% como disolvente, el contenido de las placas se traspasó a beakers de 100 mL y se dejaron en el shaker a temperatura ambiente por 30 minutos a 120 rpm, finalizado el tiempo, las muestras se filtraron y se centrifugaron por 10 minutos a 6000 rpm. Se separó el sobrenadante, que fue utilizado para las determinaciones enzimáticas.

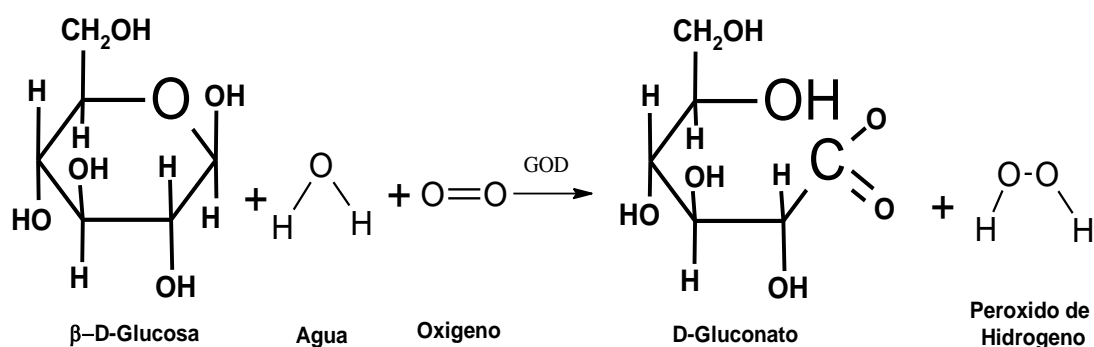


**Figura N° 7. Muestra después del centrifugado, el sobrenadante es el extracto enzimático.**

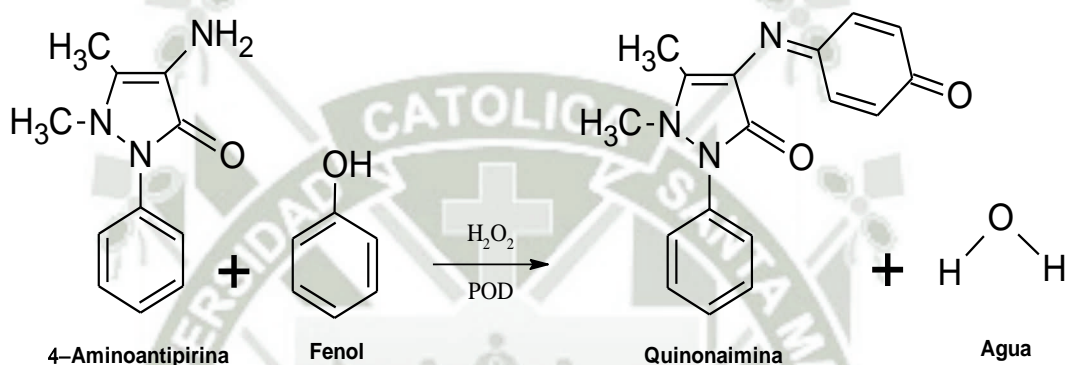
#### **1.2.6. Medición de la actividad de la celulasas**

Para la medición de la actividad de enzimas celulasas fue necesario evaluar indirectamente dicha concentración enzimática mediante el kit de glicemia enzimática, el cual cuantifica los azúcares reductores liberados por la enzima, a mayor actividad de la enzima, mayor será la cantidad de glucosa obtenida. Para ello, el extracto enzimático obtenido fue usado en la hidrólisis de una suspensión de harina de sorgo de maíz, a una temperatura de 37°C por un lapso de 90 min en un agitador magnético, tomando una muestra cada 10 minutos e inmediatamente se utilizaba el kit de glicemia enzimática. El procedimiento que se siguió se describe en el ANEXO N° 4.

El método de glicemia enzimática se fundamenta en la reacción de Trinder, donde la glucosa es oxidada a D-gluconato por la glucosa oxidasa (GOD), con formación de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el fenol y la 4- aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinonaimina roja proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



Ecuación 4



Ecuación 5

### 1.3. Efecto del pH y temperatura en la actividad celulasa

#### 1.3.1. Efecto del pH:

Para evaluar el efecto del pH, se preparó una suspensión de harina de sorgo de maíz como sustrato a diferentes pH: 4.0, 4.5, 5.0, 5.3, 5.5 y 6.0 para posteriormente someterlas a la acción de las enzimas celulasas obtenidas por el lapso de una hora a un baño termostático a 50°C. Terminado el tiempo se midió la actividad de la enzima usando el kit de glicemia enzimática. Toda la experimentación se realizó por triplicado



**Figura N° 8. Muestras del sustrato a diferentes pH.**

### **1.3.2. Efecto de la Temperatura:**

Para evaluar el efecto de la temperatura se incubó la celulasa obtenida a diferentes temperaturas: 37°C, 50°C, 50°C-pH 5 y 60°C y se añadió como sustrato una suspensión de harina de sorgo de maíz, se dejó en agitación a 100 rpm utilizando un agitador magnético por un lapso de 5 horas, tomando una muestra cada hora. Finalizado el tiempo se midió la actividad de la enzima usando el kit de glicemia enzimática. La experimentación se realizó por duplicado.



**Figura N° 9. Medición de la temperatura**

## 1.4. Obtención de bioetanol a partir de hoja de mazorca de maíz

### 1.4.1. Recolección y preparación del sustrato

Se recolectaron 500 g de hojas de mazorca de maíz del mercado San Camilo y se lavaron con abundante agua varias veces, se secaron en una estufa a 60°C durante 48 horas, se sometieron a un proceso de molienda y fueron tamizados a un tamaño entre 1.45 mm y 1.75 mm. Finalmente se esterilizó dos veces en la autoclave a 121°C durante 20 minutos antes de ser utilizado.



**Figura N° 10. Residuo de hoja de maíz**

### 1.4.2. Pre-tratamiento alcalino de la hoja de mazorca de maíz

El pretratamiento se realizó con el objetivo de eliminar la lignina. Se pesó 100 g de residuo molido y se colocó en un balón de 1L, se adicionó NaOH 1% en una relación de 1/10 solido-liquido (56), luego se cerró el balón herméticamente y se llevó a la autoclave a una temperatura de 121°C, presión 15 psi por 60 min. Finalizado el tiempo, se enfrió hasta temperatura ambiente, para luego filtrar y separar el material solido del líquido. El sólido obtenido se lavó con agua hasta alcanzar un pH neutro para luego secarlo y almacenarlo para su posterior uso.

#### 1.4.3. Hidrólisis enzimática

Los experimentos se programaron para que, una vez obtenidas las celulasas, inmediatamente se proceda con la hidrólisis, es decir, siempre se utilizó enzima fresca.

La hidrolisis tuvo lugar en un baño termostático a la temperatura y pH óptimos en frascos de 1 litro acondicionados para este proceso. Los gramos de residuos pretratados fueron puestos en una suspensión del 5 % en agua destilada, se ajustó el pH con buffer citrato al pH óptimo hallado y se le adicionó el extracto de las enzimas celulasas obtenidas y se incubaron a 50°C durante 48 horas, se midieron los °Brix a las 0,12, 24 y 48 horas. Cada ensayo se hizo por triplicado. Al final de este tiempo se filtró y se obtuvo un líquido que contenía el azúcar fermentable. El líquido filtrado fue concentrado hasta 6°Brix por evaporación (57) y posteriormente esterilizado en autoclave por 15 minutos a 15 psi.

#### 1.4.4. Fermentación alcohólica

Se adaptó de acuerdo al método que aplicó Cardona (58) en el que a los productos de las reacciones de hidrólisis se sometieron a fermentaciones alcohólicas en reactores de plásticos adaptados a escala de laboratorio. Se garantizaron las condiciones de fermentación utilizadas industrialmente (32°C y pH entre 3,5 y 4,0). Se concentró a 6°Brix. Se utilizó levadura comercial (levadura Fleischman, 1 g/l) y se adiciono al medio urea (0.48 g/l) y sulfato de amonio (0.24 g/l). La fermentación se llevó a cabo durante 5 días. Se determinaron los °Brix durante los 5 días de fermentación. El contenido de etanol se estableció al término del proceso.

#### 1.4.5. Destilación simple

Con la finalidad de obtener el bioetanol se procedió a destilar el producto de la fermentación alcohólica y posteriormente evaluar la concentración de bioetanol en el destilado obtenido mediante el método de dicromato de potasio.

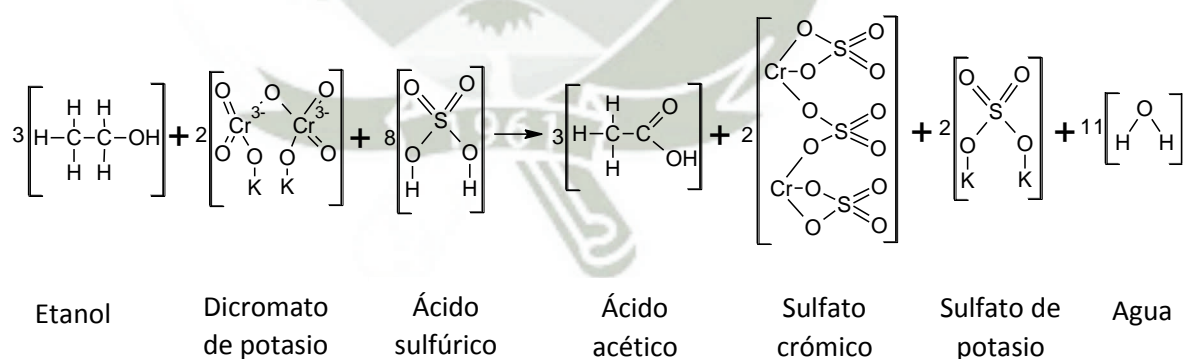
El fermentado obtenido se traspasó a un balón y se procedió a destilar en el equipo de destilación.



**Figura N° 11. Equipo de destilación**

#### 1.4.6. Prueba de dicromato de potasio para determinar la concentración de bioetanol.

El método del dicromato de potasio es una experimentación que se basa en el siguiente fundamento, cuando el alcohol presente en una muestra se difunde sobre una mezcla oxidante de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, el ión crómico de color amarillo-naranja se reduce a ión cromoso de color verde-azul y el etanol es oxidado cuantitativamente a acetaldehído, ácido acético y agua. La reacción final ocurre de la siguiente manera:

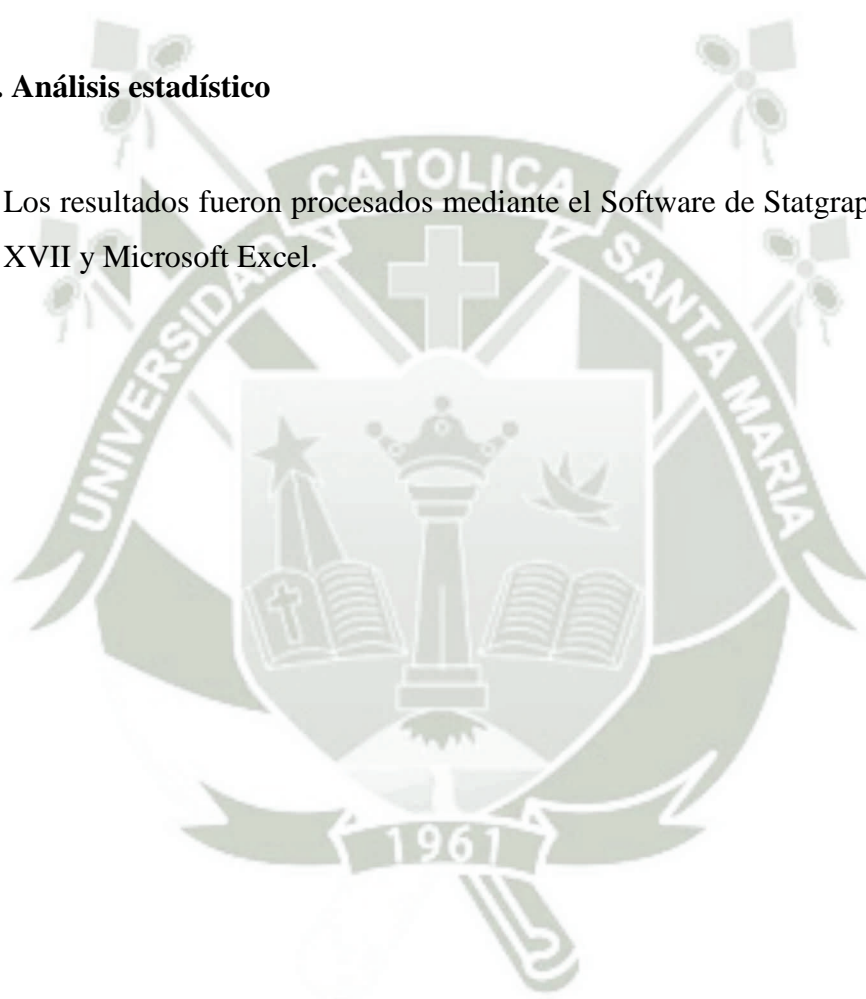


**Ecuación 6**

La técnica del dicromato de potasio es un método de colorimetría, se realizó tomando 1 mL de la muestra anteriormente destilada más 3 mL de la solución madre descrita en el ANEXO N° 5 y más 2 mL de la solución de carbonato saturada. La mezcla fue colocada en tubos de ensayo y cerrados herméticamente y fueron llevado a Baño María a 35°C por 20 minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de esta mezcla a 400 nm (59), esta absorbancia se interpola con la recta de la curva de calibración para el etanol. (ANEXO N° 5).

### 1.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados mediante el Software de Statgraphics centurión XVII y Microsoft Excel.



## CAPITULO III

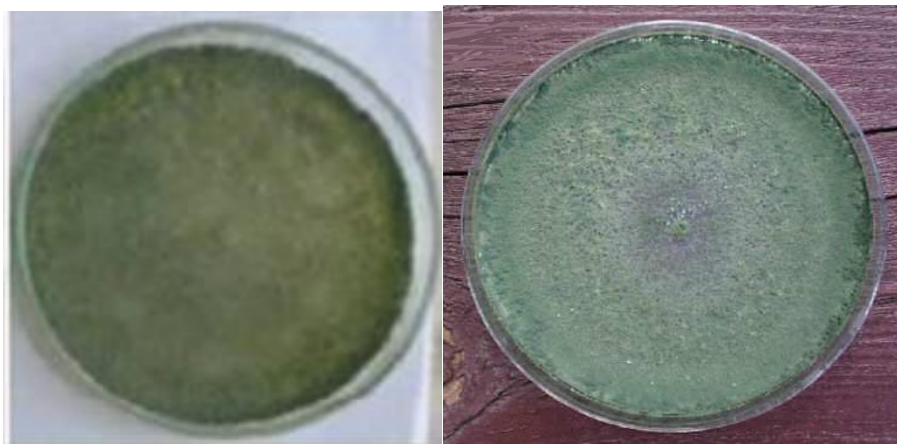
### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 1. Inducción y adaptación de *Trichoderma* sp. para producir celulasa

Para estimular la producción de celulasas a partir de *Trichoderma* sp. se utilizó un medio de cultivo específico para celulasa con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono. Cabe mencionar que Díaz (60) publicó en su trabajo un estudio preliminar para evaluar el orden de magnitud en el que se obtenían las enzimas, para lo cual usó inductores en un medio de cultivo sintético en donde la única fuente de carbono era la pectina y el xilano, dicho medio estaba compuesto por 1 g/L de peptona, 0,5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de agar, 3,5 g/L de xilano y 3,5 g/L pectina, este medio fue usado para el hongo *Aspergillus awamori*; la composición del medio de inducción específico para celulasas en la presente investigación esta descrito en la Tabla N°5, el cual es similar al medio que uso Díaz con la diferencia que la fuente de carbono fue el CMC.

En el estudio realizado por Mora (61), se usó agar CMC para determinar la actividad celulolítica y seleccionar el microorganismo que se usaría en las fermentaciones. En el presente estudio, se utilizó agar CMC como medio de adaptación de *Trichoderma* sp.

La morfología de la cepa de *Trichoderma* sp. no cambia al ser repicada del agar PDA al medio de cultivo específico y de este al agar CMC como se observa en la figura N° 12, ya que en los medios el hongo crece presentando rugosidades y escasa formación de micelio aéreo de textura velutinosa; sin embargo, tuvieron un crecimiento un poco lento comparado al del agar PDA.



**Figura N° 12. Hongo *Trichoderma* sp. . A la izquierda: *Thichoderma* sp. en medio PDA. A la derecha: *Trichoderma* sp. en agar CMC**

Se podría afirmar que el *Trichoderma* sp. produjo celulasas ya que se observó que hubo crecimiento del hongo tanto en el medio de cultivo específico como en el agar CMC, siendo CMC la única fuente de carbono.

## **2. Obtención de Enzimas Celulasas**

### **2.1. Selección del tamiz adecuado para el orujo de uva**

El tamaño de partícula es un factor muy importante para el desarrollo de la FES y producción de enzimas. Sustratos de partículas pequeñas proporcionan una gran área específica, lo que afecta de manera positiva el desarrollo del microorganismo. Sin embargo, un tamaño de partícula demasiado pequeño, que genere a su vez un espacio interpartícula reducido, disminuye la eficiencia de la respiración y/o aireación dificultando el crecimiento microbiano, tal y como lo menciona Díaz (60).

Para elegir el tamaño de partícula adecuado del sustrato para el crecimiento de *Trichoderma* sp. el cual está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido, se seleccionaron diversos tamaños de partícula menores de 2 mm, según Bernard et al.

(62), el espacio interpartícula es lo más importante y es afectado por el tamaño de la partícula, su forma y la humedad. Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato, resultado de la acción de los microorganismos según Moo-Young et al. (63).

**Tabla N° 7. Selección de los tamaños de partícula del orujo de uva a partir del crecimiento de *Trichoderma* sp. para un sistema FES**

Tamaño de partícula	Crecimiento con <i>Trichoderma</i> sp.
<1.45 mm	+++
>1,45 y < 1,75 mm	+++++
>1.75 <2mm	++++

(+) Crecimiento muy bajo  
 (++) Crecimiento bajo  
 (+++) Crecimiento regular  
 (++++) Crecimiento bueno  
 (+++++) Crecimiento muy bueno

Se usaron 3 tamaños diferentes de partículas de orujo de uva para determinar en cual había mayor crecimiento del hongo, el cual fue calificado visualmente como se detalla en la Tabla N°7, el *Trichoderma* sp. que fue sembrado en orujo de uva con tamaño de partícula entre 1,45 y 1,75 mm muestra un mayor crecimiento, esto podría deberse a que las partículas de tamaño medio utilizadas presentan mayor porosidad, lo que provoca una mejor transferencia de calor y materia y esto podría aumentar la producción de celulasas, por el contrario, las partículas de mayor tamaño presentan una menor superficie específica para el crecimiento del hongo, lo que conllevaría a concentraciones de producto más bajas; de la misma forma, las partículas de menor tamaño impiden la transferencia de calor y materia, con concentración de producto también bajas.

Los resultados obtenidos coinciden con el trabajo de Kumar et al. (64) donde se estudió la influencia del tamaño de partícula del sustrato en la producción de ácido cítrico a partir del bagazo de caña de azúcar

usando *Aspergillus niger*. Los tamaños de partículas que evaluaron se encontraban en un rango entre 0.64 y 2 mm. Los resultados del estudio determinaron que la máxima producción se obtenía cuando se utilizaban partículas de 1,2-1,6 mm, y por el contrario, los valores más bajos se daban con partículas de 1,6 – 2 mm.

En la FES también se deben tener en cuenta otros factores importantes tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación que afectan significativamente tanto el crecimiento de los microorganismos como la formación de productos.

## 2.2. Fermentación en estado sólido y extracción de enzimas celulasas

Una vez elegido el tamaño de partícula adecuado, se procedió a evaluar la adición de la solución de inducción CMC a diferentes concentraciones en la FES de orujo de uva y posteriormente se evaluó el efecto de las soluciones disolventes como el NaCl y Tween al momento de la extracción enzimática.

**Tabla N° 8. Factores evaluados para el análisis factorial de medidas repetidas.**

<b>Factor entre grupos</b>	Concentración CMC	0.1%
		0.3%
		0.5%
<b>Factor entre grupos</b>	Disolventes	NaCl
		Tween 80
<b>Factor intra grupos</b>	Tiempo	0 minutos
		10 minutos
		20 minutos
		30 minutos
		40 minutos
		50 minutos
		60 minutos
		70 minutos
		80 minutos
90 minutos		

Para poder evaluar el efecto de la concentración de CMC y el efecto de los disolventes NaCl y Tween 80 se procedió a realizar un análisis factorial de medidas repetidas, tal como se observa en la Tabla N° 8, los resultados obtenidos se agruparon por factores: entre grupos e intra grupos.

El factor entre grupos se subdividió en Concentración de CMC (0.1 %, 0.3% y 0.5%) y disolventes (NaCl y Tween 80), mientras que en el factor intra grupos se considera como única subdivisión el tiempo.

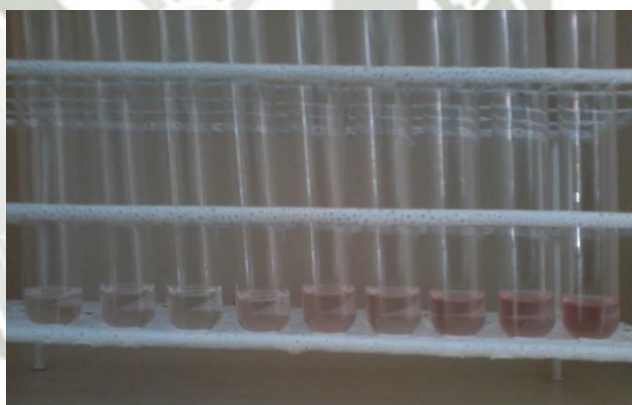


**Tabla N° 9. Tabla de medias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp.**

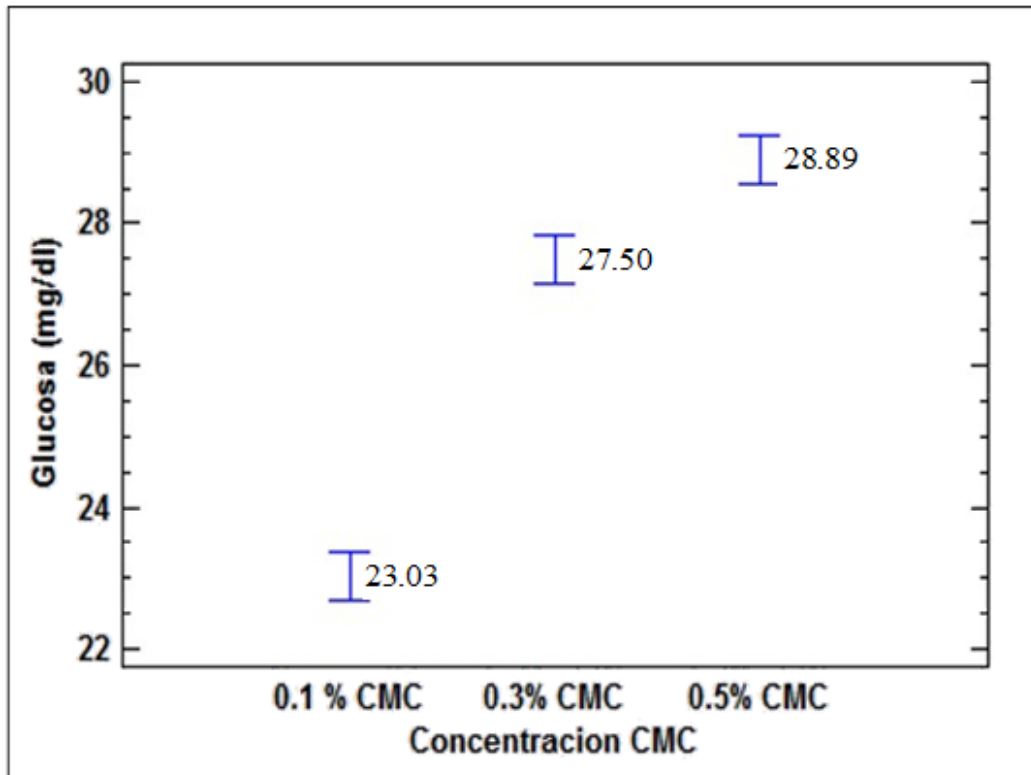
Tiempo (min)	Concentración de glucosa (mg/dl)					
	NaCl			Tween		
	0.1% CMC	0.3% CMC	0.5% CMC	0.1% CMC	0.3% CMC	0.5% CMC
<b>1</b>	7.95+/-2.44	10.16+/-1.01	9.40+/-2.07	8.34+/-2.97	9.15+/-2.45	10.71+/-2.84
<b>10</b>	9.21+/-1.06	16.55+/-2.96	12.75+/-5.17	12.20+/-4.99	10.8+/-3.48	15.11+/-7.01
<b>20</b>	11.04+/-2.96	21.99+/-3.07	16.33+/-4.4	21.39+/-5.35	17.24+/-2.32	18.05+/-2.43
<b>30</b>	13.81+/-2.11	24.38+/-3.32	19.69+/-3.99	25.06+/-2.11	23.24+/-4.27	25.37+/-4.53
<b>40</b>	16.10+/-3.77	26.78+/-1.80	23.98+/-7.83	28.27+/-4.39	31.17+/-5.12	34.13+/-4.50
<b>50</b>	19.01+/-1.94	27.14+/-3.51	31.34+/-6.31	29.69+/-4.98	38.64+/-4.9	37.36+/-3.08
<b>60</b>	24.49+/-3.63	31.49+/-2.15	36.45+/-2.71	31.5+/-2.97	39.26+/-0.82	42.23+/-3.26
<b>70</b>	26.29+/-3.33	32.54+/-3.83	35.86+/-6.13	35.36+/-3.31	40.94+/-1.48	42.36+/-1.71
<b>80</b>	31.16+/-5.69	34.30+/-0.88	35.71+/-2.66	38.78+/-1.48	40.57+/-2.71	43.10+/-2.21
<b>90</b>	33.74+/-2.44	33.67+/-3.73	<b>36.63+/-3.27</b>	37.38+/-3.95	39.98+/-1.34	<b>43.10+/-4.11</b>

En la tabla N° 9 se observa que la máxima concentración de glucosa obtenida con NaCl se da con 0.5% de CMC a un tiempo de 90 minutos y tiene un valor de 36.63 mg/dl y la máxima concentración de glucosa obtenida con Tween se da con 0.5% de CMC a un tiempo de 80 y 90 minutos y tiene un valor de 43.10 mg/dl. Los resultados por triplicado se muestran en la Tabla N° 26 del ANEXO N° 6.

Para evaluar la concentración de glucosa se utilizó el kit de glicemia enzimática, en la Figura N° 13 se puede observar la acción de la enzima celulasa a través del cambio de color de una misma muestra a medida que transcurre el tiempo, la formación de la coloración rojiza es proporcional a la concentración de glucosa, a mayor coloración roja, hay mayor concentración de glucosa.



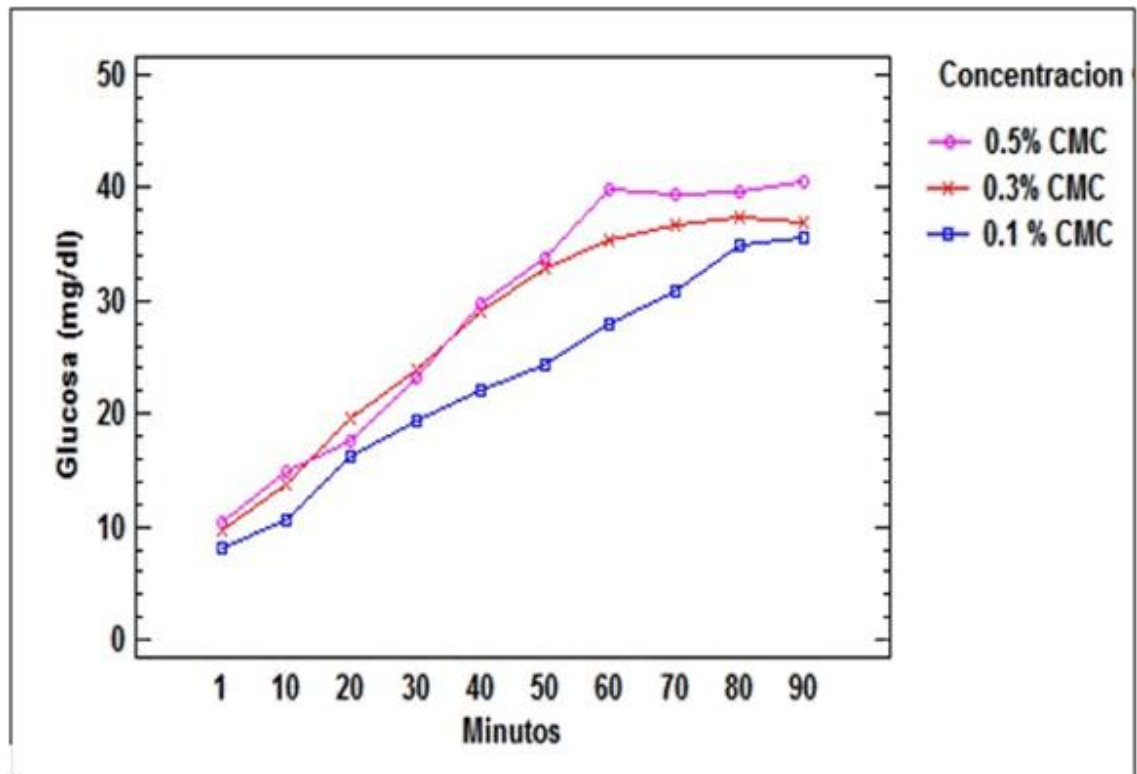
**Figura N° 13. Aumento de la concentración de glucosa a lo largo del tiempo - Prueba de Kit de Glicemia Enzimática**



**Figura N° 14. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según concentración de CMC**

En la figura N°14 se observa la comparación de los promedios a distintas concentraciones de CMC, así mismo se podría decir que a una concentración de 0.5% de CMC se produce más enzima, ya que la concentración de glucosa es mayor.

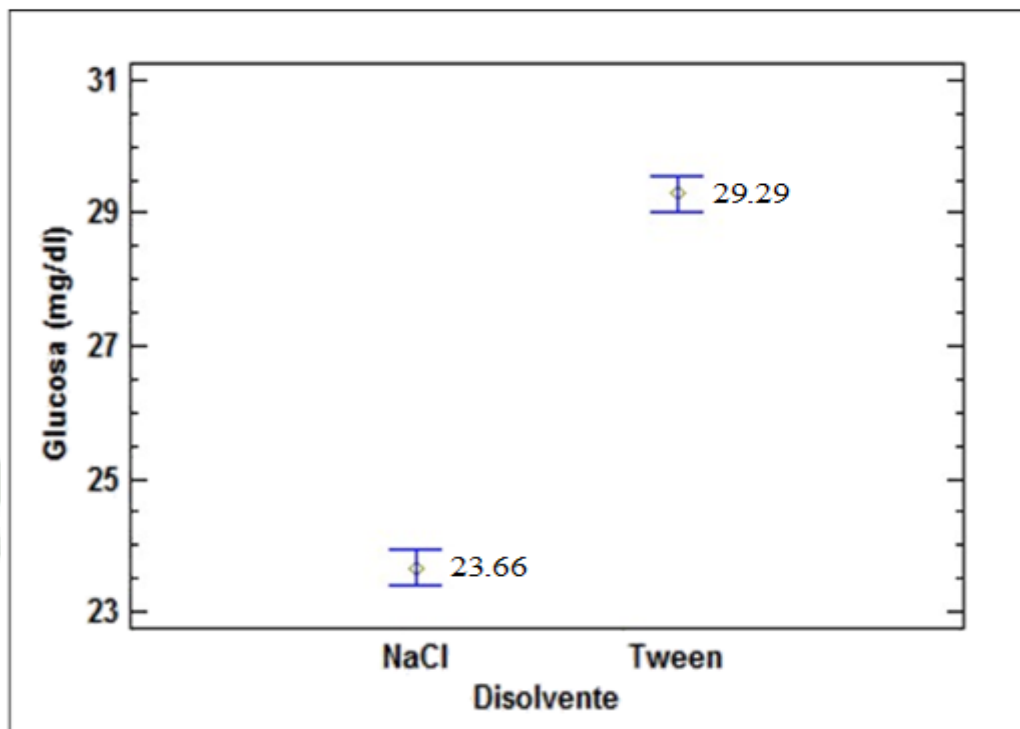
Según lo expuesto por Osama et al. (65) en donde trabajó a distintas concentraciones de CMC (0.25%-2%), indicó que la mayor formación de enzima se obtuvo a 0.5% y luego comenzó a disminuir gradualmente, esto se debería probablemente a la alta viscosidad del medio, disminuyendo el suministro de oxígeno a las células. Y Fritsche (66), menciona que la alta viscosidad retarda la división celular, dando como resultado un metabolismo de baja producción y extracción de celulasas.



**Figura N° 15. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según concentración de CMC y tiempo**

En la Figura N° 15, se puede observar el aumento de la concentración de glucosa usando 0.5% de CMC a medida que se incrementa el tiempo, mostrando su mayor valor a los 60 minutos, siendo este de 39 mg/dl, y a partir de ese minuto la curva comienza a estabilizarse; a diferencia de ello, cuando se emplearon 0.1% y 0.3% de CMC como inductores frente al tiempo, se observa que ambos tienen una tendencia creciente con respecto a la concentración de glucosa hasta el minuto 80, pasando de 9 y 10 mg/dl a 34 y 36mg/dl respectivamente, y a partir de ese tiempo comienzan a estabilizarse. Por tanto se podría señalar que la concentración de glucosa obtenida se ve afectada por la concentración de CMC y el tiempo empleado. De la misma manera se puede evidenciar que la mayor concentración de glucosa obtenida fue usando 0.5% de CMC y a los 60 minutos.

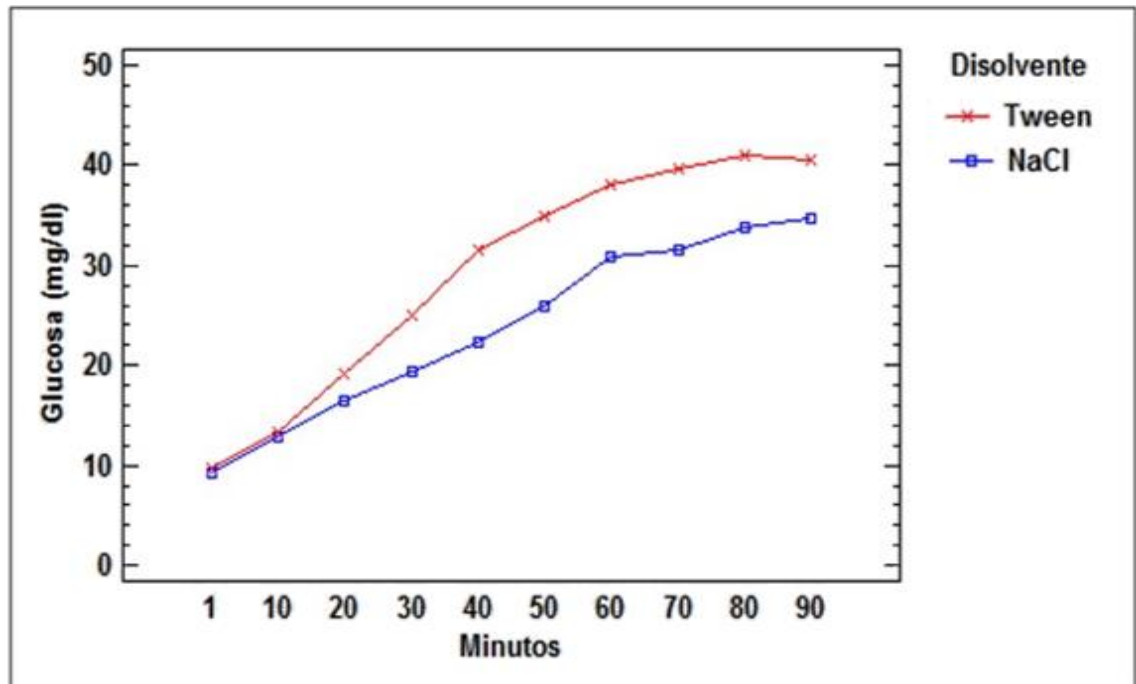
Lo observado en esta grafica coincide con lo mencionado por Lugani et al. (67), la celulasa es una enzima inducible, cuya producción depende de la presencia de un sustrato el cual también actúa como inductor.



**Figura N° 16. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma sp.* según disolvente**

En la Figura N°16, se observa la comparación de los promedios con Tween 80 (0.1%) y NaCl, así mismo se podría decir que con Tween 80 se produce más enzima, ya que se obtiene una mayor concentración de glucosa.

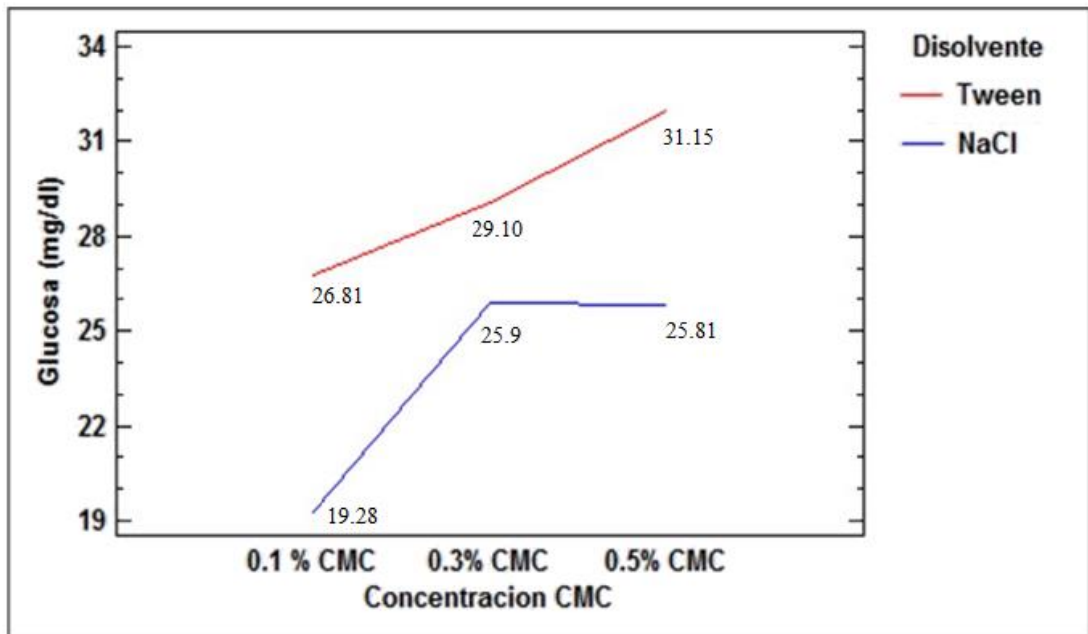
Qadeer et al. (68) y Ramakrishna et al. (69) mencionan que el disolvente eficaz para lixiviar enzima a partir de sustrato fermentado puede depender principalmente de tres factores, es decir, tipo de enzima, la fuente de enzima y el sustrato que se utilice en el medio.



**Figura N° 17. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según disolvente y tiempo**

En la Figura N° 17, se puede observar el aumento de la concentración de glucosa usando Tween 80 a medida que se incrementa el tiempo, mostrando su mayor valor al minuto 80, siendo este de 40 mg/dl, y a partir de ese minuto la curva comienza a estabilizarse, igualmente, cuando se empleó NaCl como disolvente frente al tiempo, se observa una tendencia creciente con respecto a la concentración de glucosa, siendo 34 mg/dl el máximo valor obtenido a los 90 minutos. También se observa que usando Tween 80 se obtienen mayores valores de concentración de glucosa que al emplear NaCl. Se podría indicar que la concentración de glucosa obtenida se ve afectada por el disolvente y el tiempo empleado.

Según Shu et al. (70), los surfactantes afectan a la permeabilidad de la membrana celular microbiana, lo que contribuye a hacer que se secrete enzima en el medio, y reduce la concentración de enzimas de intracelular, lo que incrementa la producción de enzima



**Figura N° 18. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según concentración de CMC y disolvente**

En la Figura N° 18 se puede observar el aumento de la concentración de glucosa usando Tween 80 a medida que se incrementa la concentración de CMC, a diferencia de ello, cuando se empleó NaCl como disolvente frente a cantidades crecientes de CMC, se observa una tendencia positiva de la concentración de glucosa cuando se empleó 0.1% de CMC y 0.3% de CMC, pasando de 19 mg/mL a 25mg/mL, sin embargo cuando se experimentó en presencia de NaCl con 0.5% de CMC no se observó un incremento en la concentración de glucosa, evidenciándose en la figura antes mencionada. Por tanto se podría señalar que la concentración de glucosa obtenida se ve afectada por el disolvente y la concentración de CMC empleado. De la misma forma se puede evidenciar que la mayor concentración de glucosa obtenida fue en presencia de Tween 80 y 0.5% de CMC.

Las presunciones mencionadas en las figuras 14, 15, 16, 17 y 18, mostradas líneas arriba se tuvieron que comprobar estadísticamente para la validación de los resultados, para lo cual se hizo un análisis de varianza.

**Tabla N° 10. Análisis de Varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Concentración CMC	1122.37	2	561.187	198.40	0.0000
Disolvente	1423.32	1	1423.32	503.19	0.0000
CMC*Disolvente	146.519	2	73.2593	25.90	0.0000

En el análisis de varianza realizado se observó que para los factores “entre grupos”, CMC y disolvente, los efectos principales y su interacción fueron estadísticamente significativos con un valor-P de 0.0000.

Este análisis permite concluir que es importante una adecuada combinación y selección de disolvente e inductor, para ello se realizó la prueba de comparaciones múltiples con la finalidad de evidenciar cuales condiciones permitieron obtener una mayor concentración de glucosa.

**Tabla N° 11. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según concentración de CMC**

Contraste	Promedio
0.1 % CMC	23.03 <sup>a</sup>
0.3% CMC	27.50 <sup>b</sup>
0.5% CMC	28.89 <sup>c</sup>

En la Tabla N° 11 se puede observar que al trabajar con CMC al 0.5% se obtiene una concentración de 28.89 mg/dl, el cual es una respuesta estadísticamente diferente y mayor a las demás, corroborando de esta manera lo presumido en la Figura N°15.

En la presente investigación se corroboró que a 0.5% de CMC se obtiene mayor concentración de glucosa lo cual es un indicador indirecto de la actividad de la celulasa.

**Tabla N° 12. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según disolvente**

<i>Contraste</i>	<i>Promedio</i>
NaCl	23.66 <sup>a</sup>
Tween	29.29 <sup>b</sup>

En la Tabla N°12 se puede observar que al trabajar con Tween 80 al 0.1% se obtiene una concentración de 29.29 mg/dl de glucosa, la cual es una respuesta estadísticamente diferente y mayor a la que se obtiene con NaCl, corroborando de esta manera lo presumido en la figura N°17

En la presente investigación se trabajó con dos disolventes el NaCl y Tween 80 para evaluar cuál de los dos mostraba mejor efecto en la extracción de celulasas.

Rao et al. (71) reportó que el rendimiento de la enzima extraída aumenta utilizando NaCl como disolvente sugiriendo que la enzima se une a la superficie del micelio por enlaces iónicos y que podría ser liberada por compuestos iónicos como NaCl en el medio.

En el presente trabajo uno de los disolventes que se utilizó para la extracción fue el NaCl al 0.9%, con el que se obtuvo una concentración de glucosa de 23.66 mg/dl, la cual fue superada por la concentración de glucosa obtenida por el Tween 80 al 0.1% que fue de 29.29 mg/dl.

Tangu et al. (72) encontró que con concentraciones de Tween alrededor de 0.02% disminuye notablemente la liberación de celulasas en el *T. reesei* mutante Rut C-3. Además, Romanelli et al. (73) reportó que el Tween 80 al 0.05% disminuye la capacidad celulolítica de varios hongos

termófilos; así mismo Shu et al. (70) describe en su investigación el efecto del Tween 80 para la producción de celulasas a diferentes concentraciones (0.05% a 0.25%), donde concluyo que la actividad de la enzima aumenta gradualmente en el rango de concentraciones de Tween de 0.05% a 0.1% y disminuye a concentraciones mayores de 0.1%, por lo tanto la concentración optima fue 0.1%.

En la presente investigación se corroboró lo descrito por Shu et al. (70) que con el Tween 80 al 0.1% se obtiene mayor concentración de glucosa lo cual es un indicador indirecto de la actividad de la celulasa.

### **3. Efecto del pH y temperatura en la actividad de las enzimas celulasas**

Los efectos de factores como el pH, la temperatura y el tiempo pueden actuar como inhibidores de la enzima si es que no se encuentran dentro de los parámetros adecuados, la inhibición debe minimizarse para que la actividad de una reacción catalizada por una enzima sea máxima.

#### **3.1. Efecto del pH en la producción de celulasas**

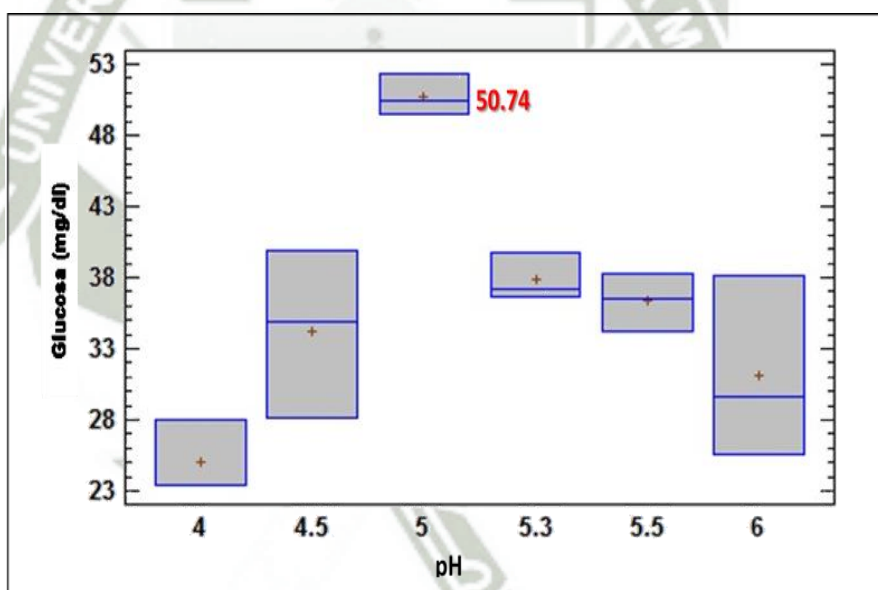
Cuando todos los demás factores permanecen constantes, la velocidad de las reacciones enzimáticas depende del pH del medio. Todas las enzimas poseen una zona de pH en la que alcanza su máxima velocidad, las enzimas como proteínas responden a los cambios de pH. A medida que el pH cambia, las cargas de los diferentes aminoácidos se modifican y lo mismo sucede con la forma de la enzima hasta que se altera tanto que deja de funcionar.

El pH ejerce una acción parecida a la de la temperatura y existe, por tanto, también un pH óptimo, tal que, al alejarse de él, disminuye la actividad enzimática.

**Tabla N° 13. Análisis estadístico descriptivo de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes pH**

	pH 4	pH 4.5	pH 5	pH 5.3	pH 5.5	pH 6
Promedio	24.98+/- -6.52	34.28+/- 14.74	<b>50.74+/- -3.56</b>	37.85+/- -4.14	36.34+/- 5.18	31.11+/- 16.01
Desviación Estándar	2.6240	5.9346	1.4337	1.6664	2.0858	6.4466

En la Tabla N° 13 se muestran los promedios para cada tratamientos a diferentes pH, se observa que el mayor valor se obtiene a pH 5 con una concentración de 50,74 mg/dl y tiene una desviación estándar menor que los demás tratamientos.



**Figura N° 19. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes pH**

En la Tabla N°13 y Figura N°19 se muestra que el mayor valor de concentración de glucosa (mg/dl) se obtuvo a pH 5 con un valor de 50,74 mg/dl de concentración de glucosa, que es donde se maximiza la acción de las

celulasas en una hora de reacción, al variar la concentración de glucosa con cada pH usado se afirmaría lo que dice Badui (74) , que la hidrólisis de la celulosa por acción de las celulasas se ve influenciada por la concentración de iones hidrogeno del medio, ya que afecta el grado de ionización de los aminoácidos del complejo enzima-sustrato. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. A un pH menor o mayor a 5 la actividad de la enzima disminuye, y por ende la formación de glucosa es baja.

**Tabla N° 14. Análisis de varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes pH**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1107.13	5	221.426	14.31	0.0001
Intra grupos	185.696	12	15.4747		
Total (Corr.)	1292.82	17			

Se realizó un análisis de varianza como se muestra en la Tabla N° 14 en donde se obtiene un valor de  $p < 0.05$  el cual nos indica que si existe una diferencia estadísticamente significativa al menos entre uno de los valores obtenidos con diferente pH.

**Tabla N° 15. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma sp.* a diferentes pH según método de LSD Fisher**

pH	Promedio
4	24.98+/-6.52 <sup>a</sup>
6	31.11+/-16.01 <sup>ab</sup>
4.5	34.28+/-14.74 <sup>b</sup>
5.5	36.34+/-5.18 <sup>b</sup>
5.3	37.85+/-4.14 <sup>b</sup>
5	50.74+/-3.56 <sup>c</sup>

En la Tabla N° 15 se muestran los promedios de las concentraciones de glucosa obtenidas a diferentes pH, con letras diferentes se señala cuales promedios son iguales o diferentes entre sí. El método de Fisher permite entonces concluir a un nivel de significancia de 0.05 que trabajar a pH 5 es significativamente diferente que trabajar con los demás pH y es también en donde los valores obtenidos de concentración de glucosa son los más altos.

Los resultados del pH óptimo obtenidos concuerdan con lo que afirma Yazdi et al. (75), donde la actividad máxima para celulasas estuvo entre pH 4,0 - 7,0, siendo el pH 5,0 el óptimo para la estabilidad de todos los componentes. El trabajo que realizó Pardo et al. (76), también concluye que la actividad máxima se da entre 4,2 y 5,8, siendo 4,8 el pH óptimo de las celulasas.

Para Wiseman (77) las enzimas son activas en un rango limitado de pH ya que cada enzima tiene un pH óptimo porque, al igual que otras proteínas, los enzimas poseen muchos grupos ionizables de forma que los

cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo.

### 3.2.Efecto de la temperatura en la producción de celulasas

Al igual que ocurre en la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activo.

Existe una temperatura óptima en que la actividad enzimática es máxima, por encima de ella la actividad disminuye e incluso desaparece por desnaturalización de la enzima

**Tabla N° 16. Factores evaluados para el análisis factorial de medidas repetidas.**

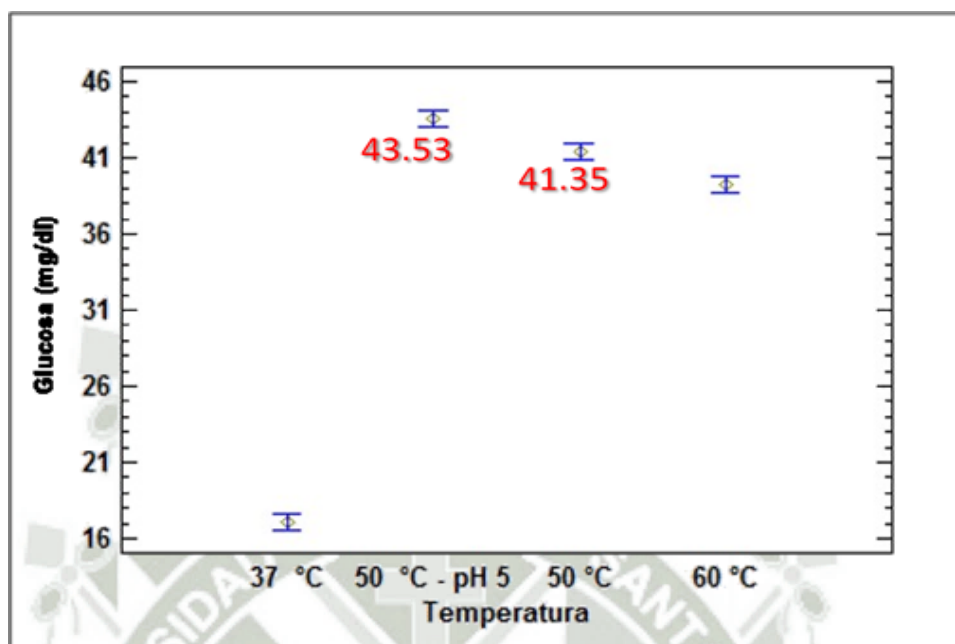
<b>Factor entre grupos</b>	Temperatura	37 °C
		60°C
		50°C
		50°C - ph5
<b>Factor intra grupos</b>	Tiempo	0 horas
		1 horas
		2 horas
		3 horas
		4 horas
		5 horas

Para poder evaluar el efecto de la temperatura, se procedió a realizar un análisis factorial de medidas repetidas, tal como se observa en la Tabla N° 16 los resultados obtenidos se agruparon por factores: entre grupos e intra grupos.

**Tabla N° 17. Tabla de medias de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

Grupo	Concentración de glucosa (mg/dl)					
	0h	1h	2h	3h	4h	5h
37°C	12.36+/-10.76	13.21+/-4.64	14.09+/-6.29	15.07+/-4.96	17.33+/-8.13	30.22+/-21.98
50°C	11.43+/-9.5	32.68+/-6.48	41.74+/-4.26	44.22+/-23.13	57.62+/-9.72	60.45+/-7.37
60°C	14.05+/-6.35	28.7+/-11.56	33.32+/-15.82	44.02+/-22.87	56.62+/-18.42	58.76+/-5.84
50°C – pH5	10.43+/-7.94	40.96+/-16.39	43.85+/-19.12	49.84+/-30.3	52.54+/-8.58	63.57+/-17.09

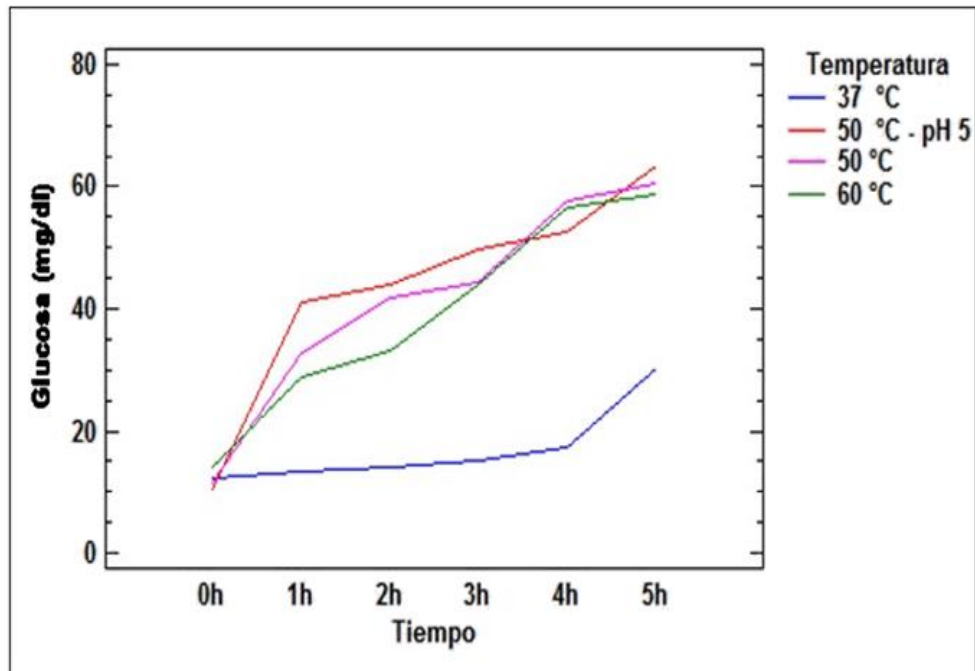
En la tabla N° 17 se observa que la máxima concentración de glucosa se da a 50 °C-pH5 y a un tiempo de 5 horas y tiene un valor de 63.57 mg/dl.



**Figura N° 20. Promedios para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulósicas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

En las figuras N°20 se muestran los promedios de concentración de glucosa con respecto a la temperatura, en donde se observa que hay mayor concentración de glucosa a una temperatura de 50 °C - pH 5.

Con ello se procedió al análisis de varianza respectivo mostrado en la Tabla N°18



**Figura N° 21. Gráfica de interacciones de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas y tiempos**

La Figura N°21 nos muestra la interacción entre la temperatura y el tiempo transcurrido, a medida que transcurre el tiempo, la concentración de glucosa va aumentando, la máxima concentración de glucosa fue a las 5 horas para todos los tratamientos; a temperaturas elevadas el aumento de concentración glucosa es mayor con respecto a 37°C, por lo que se podría decir que la enzima trabaja a altas temperaturas, también se puede observar que de los 4 tratamientos, los valores más altos de concentración glucosa fueron con 50°C- pH 5 a un tiempo de 5 horas.

**Tabla N° 18. Análisis de Varianza para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Temperatura	5437.75	3	1812.58	1931.01	0.0000
ERROR(Col_1)	3.75469	4	0.938673	0.32	0.8622
Tiempo	8250.6	5	1650.12	559.87	0.0000
Tiempo*Temperatura	1635.41	15	109.027	36.99	0.0000
ERROR(Tiempo)	58.9467	20	2.94733		
Total (corregido)	15386.5	47			

En el análisis de varianza mostrado en Tabla N° 18 se observa un valor de  $P < 0.05$ , lo cual nos indica que existe una diferencia estadísticamente significativa al menos entre uno de los valores obtenidos a diferentes temperaturas y tiempos.

**Tabla N° 19. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

Temperaturas	Promedio
37 °C	17.04 <sup>a</sup>
60 °C	39.24 <sup>b</sup>
50 °C	41.35 <sup>c</sup>
50 °C - pH 5	43.53 <sup>d</sup>

En la tabla N° 19 se muestran los promedios de las concentraciones de glucosa obtenidas a diferentes temperaturas, las letras diferentes señala que todos los tratamientos son significativamente diferentes entre sí, por lo que

las próximas hidrólisis trabajaron a 50°C y pH 5 ya que se evidencia que a esa temperatura y pH es donde se produce mayor actividad enzimática.

La temperatura optima hallada concuerda con Yazdi et al. (75) donde la temperatura óptima resultó entre 45 - 65°C, con un rango de 45 - 50°C para la estabilidad de enzimas celulasas y con el trabajo que realizo Pardo et al. (76), donde también concluye que la temperatura óptima para la actividad del sistema celulolítico está en un rango de 50 a 55 °C

Las celulasas actúan a condiciones bastante específicas y óptimas de pH y temperatura debido a la especificidad de la catálisis; para celulasas se estableció que 5 y 50°C son las condiciones óptimas de pH y temperatura respectivamente.

#### **4. Obtención de bioetanol a partir de hojas de mazorca de maíz**

##### **4.1. Pretratamiento alcalino de las hojas de mazorca de maíz**

El Pretratamiento alcalino se realizó con el fin de remover o modificar la lignina, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas y mejorando la digestibilidad de la celulosa, según menciona Wang et al. (78).

Se realizaron tres repeticiones, el peso inicial de cada una fue de 100 g, el peso final promedio después del tratamiento con NaOH fue de 65 g de hoja de mazorca de maíz deslignificada, esta pérdida de masa puede deberse a la solubilización de la lignina y de la hemicelulosa con lo cual se logra el objetivo del pretratamiento.



**Figura N° 22. Hojas de mazorca de maíz. A la izquierda: Hojas de mazorca molidas antes del pretratamiento. A la derecha: Hojas de mazorca molidas después del pretratamiento**

En el trabajo de Branka et al. (79), se utilizaron NaOH (0,02-1,25 M), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,02-0,51 M) como disolventes de pretratamiento (25-85 ° C, 2 h), NaOH fue el más eficaz en el aumento de la susceptibilidad de las hojas de maíz hacia las enzimas, produciendo un 83-96% de azúcares reductores. Este disolvente solubilizó hasta 60,6% la lignina y parecía desintegrar la estructura fibrilar de la hoja de maíz.

A la misma conclusión llegó Elkin et al. (80) en su trabajo donde compararon diversos pretratamientos físicos y químicos con ácidos y álcalis para maderas, donde la deslignificación alcalina mostro los mejores rendimientos de etanol.

El impacto que tienen los parámetros del pretratamiento alcalino sobre la hidrólisis enzimática de la hoja de mazorca de maíz es muy importante, ya que se busca que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático.

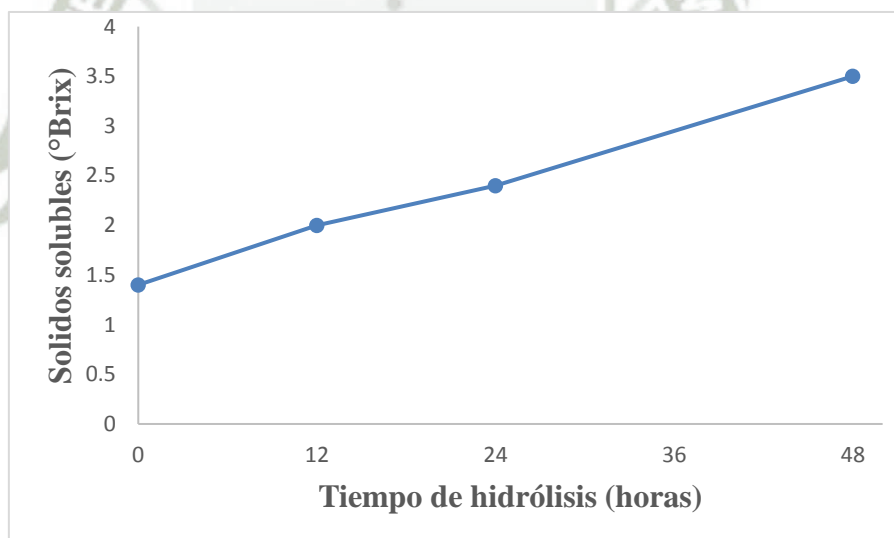
#### 4.2. Hidrólisis de los compuestos enzimáticos

Se llevó a cabo la hidrólisis de la hoja de mazorca de maíz con el extracto enzimático.

**Tabla N° 20. Variación de los sólidos solubles (°Brix) reportados durante las 48 horas de hidrólisis enzimática**

Tiempo de Hidrolisis (horas)	Sólidos solubles (°Brix)			
	R1	R2	R3	Promedio
0	1.3	1.7	1.3	1.4+/-0.57
12	1.9	2.0	2.2	2.0 +/- 0.38
24	2.6	2.2	2.4	2.4 +/- 0.50
48	3.5	3.4	3.6	3.54 +/-0.24

En la Tabla N° 20, se observan que a medida que pasa el tiempo los valores de sólidos solubles ascienden 2 °Brix aproximadamente; con lo que se interpreta que las enzimas celulasas están actuando y son efectivas.



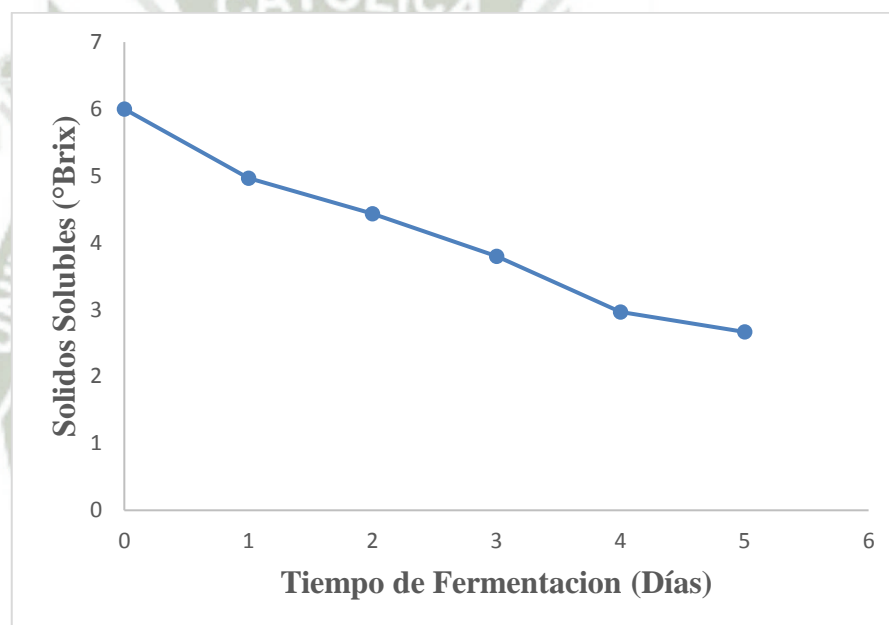
**Figura N° 23. Gráfica de Sólidos solubles (°Brix) durante las 48 horas de la hidrólisis enzimática**

En la Figura N° 23 se puede apreciar la tendencia ascendente de los sólidos solubles que se presenta durante las 48 horas de hidrolisis enzimática de los compuestos celulósicos, indicando de esta manera la producción de glucosa.

### 4.3.Fermentación Alcohólica

**Tabla N° 21. Variación de los sólidos solubles (°Brix) reportados durante los 5 días de fermentación alcohólica**

Tiempo de Fermentación (días)	Solidos solubles (°Brix)			
	R1	R2	R3	Promedio
1	6.0	6.0	6.0	6.0 +/- 0.00
2	4.3	4.5	4.5	4.4 +/- 0.27
3	3.8	4.0	3.6	3.8 +/- 0.50
4	3.0	3.0	2.9	3.0 +/- 0.14
5	2.7	2.7	2.6	2.7 +/- 0.14



**Figura N° 24. Gráfica de Sólidos solubles (°Brix) durante los cinco días de fermentación alcohólica**

En la Tabla N° 21, se muestran los datos de sólidos solubles (°Brix) durante los 5 días de fermentación, tiempo en el que se estabilizó la fermentación. Los °Brix consumidos en 5 días son en promedio de 3.3. En la Figura °N 24 se observa gráficamente un comportamiento decreciente en el valor de azúcares, esto se debe que a medida que pasa el tiempo la levadura va consumiendo toda la glucosa contenida en el medio transformándola en etanol y CO<sub>2</sub>

La graduación Brix es una medida de la cantidad de azúcar en un líquido. El azúcar se convierte en alcohol durante la fermentación. A medida que los °Brix disminuyen, la cantidad de alcohol en líquido aumenta.

Este valor de °Brix perdidos se parece a los valores obtenidos en el trabajo de Paredes et al, en donde los °Brix consumidos fue de 4 para un °Brix inicial de 6.

#### 4.4.Determinación de la concentración de etanol

Con la finalidad de obtener el bioetanol se procedió a destilar el producto de la fermentación alcohólica. En la Tabla N° 22 se observa que se obtienen 1.69 grados alcohólicos.

**Tabla N° 22. Concentración de bioetanol evaluado por el método de dicromato de potasio**

Repetición	Absorbancia	CC Etanol (%)
1	0.389	1.70
2	0.387	1.73
3	0.394	1.65
<b>Promedio</b>	<b>0.390+/- 0.009</b>	<b>1.69 +/-0.10</b>

**Tabla N° 23. Cantidad de etanol obtenido a partir de 100 g de residuos de hoja de mazorca de maíz**

Muestra	Residuos secos sin pretratamiento	Residuos secos después del pretratamiento	Vol. Del líquido obtenido después de la hidrólisis con enzimas celulasas y la concentración a 6 °Brix	Grado alcohólico del líquido fermentado	Relación volumen de etanol por 100g de residuos seco
	g	g	mL	°GL	mL etanol/100 g residuo
<b>R1</b>	100	68	764	1.70	12.99
<b>R2</b>	100	65	687	1.73	11.88
<b>R3</b>	100	71	822	1.65	13.56
<b>Promedio</b>	100+/- 0.0	65+/-7.45	758+/-160	1.69+/-0.10	12.81+/-2.12

En la Tabla N° 23 observa que con 100g de residuos secos, se obtiene 12,81 mL de bioetanol.

Sánchez et al. (81) menciona que el empleo de la biomasa lignocelulósica como materia prima en la obtención de bioetanol, representa una oportunidad relevante para la producción de este biocombustible a bajos costos, además de contribuir a la solución de la problemática ambiental generada por los desechos agroindustriales.

Los resultados revelaron que el bioetanol puede ser producido a partir de residuos agrícolas, tales como la hoja de mazorca de maíz, usando celulasas en la hidrólisis enzimática y posteriormente *Saccharomyces cerevisiae* como organismos de fermentación.

#### **4.5. Cantidad de etanol obtenible a partir de hojas de mazorca de maíz**

En la Tabla N° 24, se muestran valores de litros de bioetanol que se produciría por toneladas de residuos frescos y secos, con el propósito de tener una idea del volumen de bioetanol que se obtendría por tonelada de residuos generados.

Así se tiene que el bioetanol que se obtendría sería de 128.10 litros por tonelada de residuo seco. En el trabajo de Paredes et al. (4), reporto que de los residuos de banano se obtuvieron 267.10 litros de etanol/tonelada de residuo seco.

**Tabla N° 24. Cantidad de etanol obtenible a partir de hojas de mazorca de maíz**

<b>Residuo</b>	<b>Solidos secos (%)</b>	<b>mL etanol producido por 100 g residuo seco</b>	<b>L de etanol/ton residuo fresco</b>	<b>L de etanol/ton residuo seco</b>
Hoja de mazorca de maíz	93	12.81	119.13	128.10

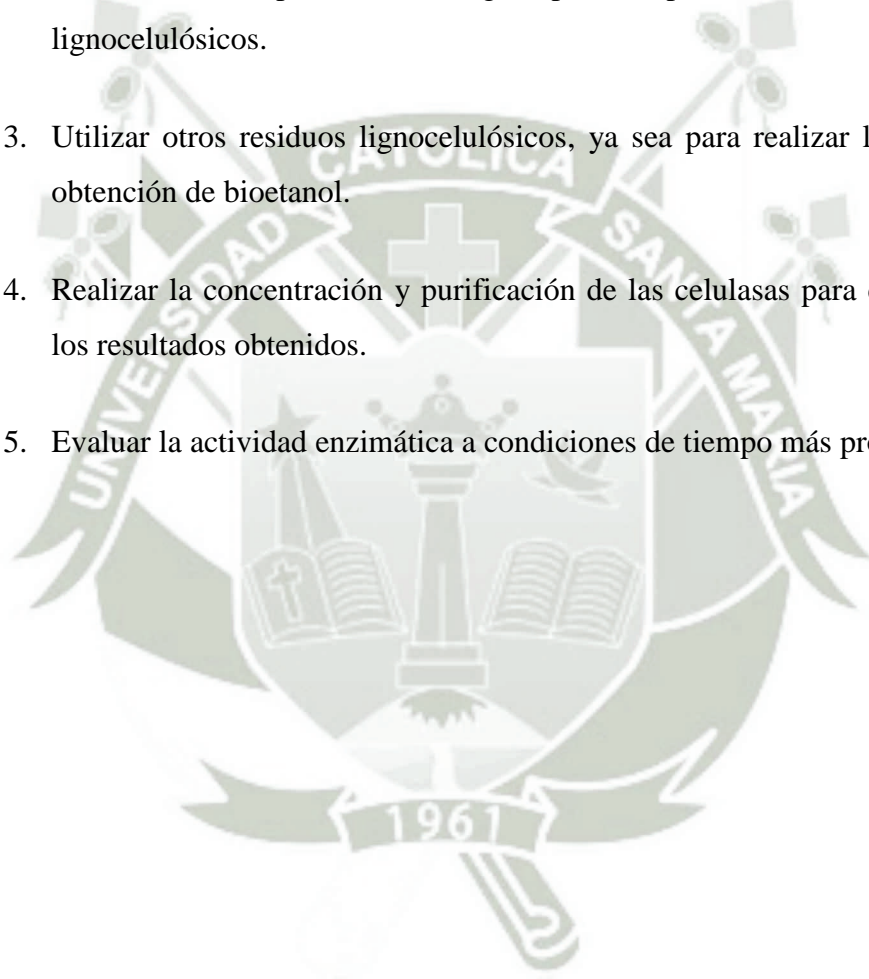
## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

1. Se indujo y adaptó *Trichoderma* sp. para la producción de celulasas utilizando medio de cultivo específico para celulasas y Agar CMC , lo cual se demostró mediante el crecimiento del hongo en el medio.
2. Se determinó que el mejor tratamiento para la obtención de enzimas celulasas a partir de *Trichoderma* sp. consistió en el uso de CMC al 0.5% en la fermentación en estado sólido y utilizando Tween 80 al 0.1% en la extracción de celulasa obteniéndose una máxima concentración de 43.10 mg/dl de glucosa, lo que es igual a mayor actividad enzimática.
3. Se evaluó el efecto del pH y la temperatura en la actividad celulasa, resultando que a pH igual a 5 se obtiene 50.74 mg/dl de glucosa y una temperatura de 50°C se obtiene 63.57 mg/dl de glucosa, estos son los valores en que la enzima actúa mejor durante la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos.
4. Se obtuvo bioetanol por fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hojas de mazorca de maíz utilizando las celulasas obtenidas en una relación de 12.81 mL de etanol por 100 g de residuo seco.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar una caracterización molecular de *Trichoderma* sp., para establecer los parámetros específicos para el crecimiento y desarrollo del microorganismo.
2. Estudiar otros tipos de tecnologías para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos.
3. Utilizar otros residuos lignocelulósicos, ya sea para realizar la FES o para obtención de bioetanol.
4. Realizar la concentración y purificación de las celulasas para contrastar con los resultados obtenidos.
5. Evaluar la actividad enzimática a condiciones de tiempo más prolongado.



## BIBLIOGRAFIA

1. Saha B. Hemicellulose Bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2003; 30: p. 279-291.
2. BNDES Banco Nacional de Desenvolvimento Economico S. Bioetanol de caña de azúcar: energía para el desarrollo sostenible. 2008;: p. 126.
3. Ponce T, Perez O. Celulasas y xilanasas en la industria. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav. 2002.
4. Paredes D, Alvarez M, Silva M. Obtencion de enzimas celulasas por fermentacion solida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtencion de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. Revista Tecnologica ESPOL. 2010 Diciembre; 23(81-88).
5. ECURED. [Online]. Available from: <http://www.ecured.cu/index.php/Celulosa>
6. Fengel D, Wegener G. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.; 1984.
7. Laureano P, Teymouri H, Dale B, Alizadeh H. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2005; 124: p. 1081-1099.
8. Balagopalan C. Improving the nutritional value of cassava by solid state fermentation. Journal of Scientific and Industrial Research. 1996;: p. 479-482.
9. Hemicelulosa. Wikipedia. [Online]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hemicelulosa>
10. Edward F. Los beneficios para la salud de la hemicelulosa. [Online]. Available from: <http://www.globalhealingcenter.net/salud-natural/hemicelulosa-beneficios-de-salud.html>
11. Composición química de celulosa lignina. [Online]. Available from: <http://www.manualdelombricultura.com/wwwboard/messages/9645.html>
12. Bommarius A, Riebel B. Biocatalysis: fundamentals and applications. 2004;: p. 611.
13. Santos J, Zabala D. Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos sas s.a.s. Fundación Universidad de América - Facultad de Ingenierías. 2016.
14. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a

- review. 2002;: p. 1-11.
15. Soto M, Moure A, Dominguez H, Parajo J. Charcoal adsorption of phenolic compounds present in detilled grape pomace. *Journal of Food Engineering*. 2008; 84(1): p. 156-163.
  16. Rice A. Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues. *American Journal of Enology Viticulture*. 1976; 27: p. 21-26.
  17. Bustamante M, Moral R, Paredes C, Perez-Espinoza A, Moreno-Caselles J, Perez-Murcia M. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*. ; 28(2): p. 372-380.
  18. Ruberto G, Renda A, Amico V, Tringali C. Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis Vinifera* L. 2nd ed.; 2008.
  19. Botella M, de Ory I, Cantero C, Blandino D. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*. ; 26: p. 100-106.
  20. Diaz A, Caro I, de Ory I, Blandino A. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*. ; 41(3): p. 302-306.
  21. Zheng Y, Et al. Ensilage and bioconversion of Grape Pomace into Fuel Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60(44): p. 11128-11134.
  22. Guiteras J. Valoración y aprovechamiento de algunos residuos y subproductos. [Online]. Available from: <http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/10975/1/299-313.pdf>
  23. Pasturas de America. Residuos del cultivo de maiz. [Online].; 2006. Available from: <http://www.pasturasdeamerica.com/utilizacion-forrajes/residuos-agricolas/maiz/>
  24. Carvalho C, Oliveira F, Amorim M, Guimaraes C, Furtado A. Chemical, physical, mechanical, thermal and morphological characterization of corn husk residue. *Cellulose Chemistry And Technology*. 2014;: p. 727-735.
  25. Viñals M, Bell A. Obtencion de etanol a partir de biomasa. [Online]. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223123848002.pdf>
  26. Escalante J, Fuentes H. Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura. Programa Academico de Ingenieria Industrial y de Sistemas. 2013.

27. Ballesteros I, Ballesteros M, Manzanares P, Negro M, Olova J, Saez F. Dilute-Sulfuric acid pretreatment of Cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 2008;; p. 84-91.
28. Iranmahbooba J, Nadima F, Monemib S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed Wood chips. *Biomass and Bioenergy*. ;; p. 401-404.
29. Bjerre A, Olesen A, Femqvist T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 49: p. 568-577.
30. Fan L, Gharpuray M, Lee Y. *Cellulose hydrolysis biotechnology monographs* 57. 1987.
31. Alexopoulos C, Mims C. *Introductory Mycology*. 1979;(3).
32. Kuhls K, Lieckfeldt E, Sammuels G, Meyer W, Kubicek C, Borner T. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*. 1997;; p. 44-460.
33. Lieckfeldt E, Samuels G, Nirenberg H, Petrini O. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: p. 2428-2428.
34. Samuels G, Chaverri P. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* 2003; 48: p. 1-116.
35. Jaklitsch W, Samuels G, Dodd S, Lu B, Druzhinina I. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies Mycol.* 2006; 55: p. 135-177.
36. Alkorta I, Garbisu C, Llama M, Serra J. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biotechnology*. 1998;; p. 21-28.
37. Ibrahim C. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*. 2008; 11: p. 4572-4582.
38. Tengerdy R. Cellulase production by solid substrate fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1996;; p. 313-316.
39. Castilho L, Polato C, Baruque E, SantAnna Jr G, Freire D. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.. *Biochemical Engineering Journal*. 2000; 3: p. 239-247.
40. Deschamps F, Huet M. Xylanase production in solid-state fermentation: a study

- of its properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1985;; p. 177-180.
41. Singh K, Singh A. Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1996;; p. 472-478.
  42. Diaz D. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentacion solida sumergida. Facultad de zootecnia y ecologia - Universidad autonoma de chihuahua. 2009.
  43. Holker U, Hofer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;; p. 175-186.
  44. Gao J, Weng H, Zhu D, Yuan M, Guan F, Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. 2008; 16: p. 7623-7629.
  45. Kang S, Park Y, Lee J, Hong S, Kim S. Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2004;; p. 153-156.
  46. Mielenz J. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*. 2001;; p. 324-329.
  47. Kuhad R, Singh A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1993;; p. 151-172.
  48. Coto C. Curso Introduccion al Comocimiento Cientifico Experimental. [Online]. [cited 2015 08 21. Available from: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo18.htm>
  49. Enzimas. [Online]. [cited 2015 08 20. Available from: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema14.pdf>
  50. Chandel A, Chan E, Rudravaram R, Narasu M, Rao L, Ravindra P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2007;; p. 14-32.
  51. Teran M. Obtencion de celulasas de *Thielavia terrestres* y su utilizacion para la hidrolisis de subproductos celulosicos. Tesis de Ingenieria Quimica. 1984.
  52. Bioetanol. [Online]. Available from: [https://es.wikipedia.org/wiki/Etanol\\_\(combustible\)#Bioetanol](https://es.wikipedia.org/wiki/Etanol_(combustible)#Bioetanol)
  53. Hernandez M. TENDENCIAS ACTUALES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL. Boletin N°08. Facultad de Ingenieria - Universidad Rafael

Landivar.

54. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. ;: p. 957-985.
55. Fajardo C, Ericka E, Sarmiento F, Sandra C. Bogota: Pontifica Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Basicas. Microbiologia Industrial; 2008.
56. Cardona E, Rios J, Peña J, Rios L. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum sp*) y king Grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la produccion de Bioetanol. Informacion Tecnologica. 2013; 24(5): p. 69-80.
57. Paredes A, Alvarez M, Silva M. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de Bioalcohol. Tecnologica ESPOL-RTE. 2010; 23(1): p. 78-89.
58. Cardona C, Sanchez O, Ramirez J, Alzate L. Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado. Revista Colombiana de Biotecnología. 2004; 6(2): p. 78-89.
59. Ramos S, Martinez J. Estandarización de una técnica cuantitativa para determinar etanol en una muestra problema por microdifusión y espectrofotometría. Guanajuato: Departamento de Ingeniería Industrial. Universidad Politécnica de Guanajuato. 2014.
60. Díaz A. Reciclado de orujo de uva como medio solido de fermentacion para la produccion de enzimas hidroliticas de interes industrial. Cadiz: Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz - Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente.. 2009.
61. Mora V. Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido. Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. 2015.
62. Bernard A, Janes C, Du P. Environmental Parameters. In Doelle H, Otros , editors. In Solid Substrate Cultivation. London: Elsevier Applied Science; 1992. p. 65-85.
63. Moo-Young M, Moreira A, Tengerdy R. In Filamentous Fungi. In Smith J, Berry D, Kristianse E, editors. Principles of the Solid Substrate Fermentation. London: Edward Arnold Publishers; 1983. p. 117-144.
64. Kumar D, Jain V, Shanker G, Srivastava A. Citric acid production by solid state fermetation using sugarcane bagasse. Process Biochemistry. 2003; 38(12): p. 1731-1738.

65. Osama A, Mohamed H, Ali E, Bakry H, Housam A, Abdelmageed O. Physiological studies on carboxymethyl cellulase formation by *Aspergillus terreus* dsm 826. Brazilian Journal of Microbiology. 2012; 43(1): p. 1517-1528.
66. Fritsche W. mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag. 1999; 2.
67. Lugani Y, Singla R, Singh B. Optimization of cellulose production from Newly isolated *bacillus sp* Y3. Journal of bioprocessing & biotechniques. 2015; 5(11).
68. Qadeer M, Anjum J, Akhtar R. Biosynthesis of enzymes by solid substrate fermentation. Part II: Production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. Pak. J. Sci. Ind. Res. 1980; 23: p. 25-29.
69. Ramakrishna S, Suseela T, Ghildval N, Jaleel S, Prema P, Lonsane B, et al. Recovery of amyloglucosidase from mouldy bran. Indian Journal Technology. 1982; 20: p. 476-480.
70. Shu G, Hu M, Wang S, Chen H. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. Procedia Environmental Sciences. 2011; 8: p. 357-361.
71. Rao V, Nayak D, Charyulu P, Adhya T. Yield response of rice to root inoculation with *Azospirillum*. The Journal of Agricultural Science. 1983; 100(3): p. 689-691.
72. Tangnu S, Blanch H, Wilke C. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and  $\beta$ -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). Biotechnology and Bioengineering. 1981; 23: p. 1837-1849.
73. Romanelli C, Houston C, Barnett S. Studies on Thermophilic Cellulolytic Fungi. American Society for Microbiology. 1975; 30(2): p. 276-281.
74. Badui D. Química de los Alimentos. Cuarta ed. Mexico D.F.: Pearson Education S.A.; 2006.
75. Yazdi M, Woodward J, Radford A. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. Journal of General Microbiology. 1990; 136: p. 1313-1319.
76. Pardo A, Forchiassin F. Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. Argent Microbiol. 1999; 31(1): p. 31-35.
77. Wiseman A, Calvo A. Manual de Biotecnología de las enzimas Zaragoza: Editorial Acribia; 1991.
78. Wang Z, Keshwani D, Redding A, Cheng J. Alkaline pretreatment of coastal bermudagrass for Bioethanol production. Rhode Island:Annual International

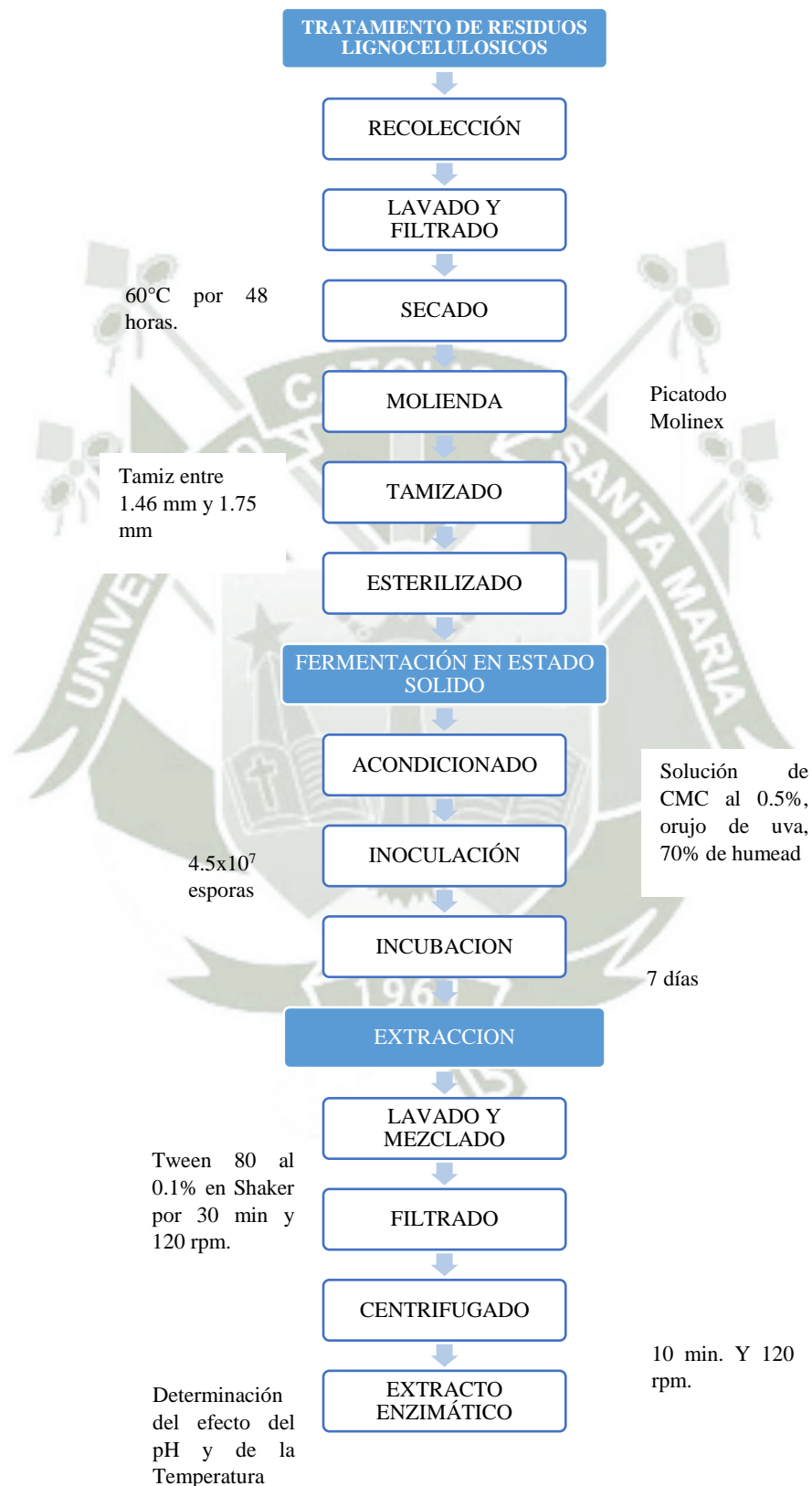
Meeting Sponsored by ASABE. 2008.

79. Branka B, Costas G, Donald M, McGregor A. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *Journal of the Science of food and Agriculture*. 1991; 56(2): p. 195-214.
80. Elkin A, Rios L, Peña J. Efecto del Pretratamiento de biomasa maderera en el rendimiento a etanol. *Revista Informacion Tecnologica*. 2013; 24(5): p. 113-122.
81. Sánchez A, Gutierrez A, Muñoz J, Rivera C. Produccion de Bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulosicos. *Revista Tumbaga*. 2010; 5: p. 61-91.
82. Dongo D, Vizcarra J. Obtención de celulasas y pectinasas a partir de los hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger* desarrollados en dos sustratos pectinocelulosicos para extraer el colorante natural de semilla del achiote (*Bixa Orellana*). 2013.
83. Pandey A, Soccol C, Mitchel M. New developments in solid state fermentation: Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 2000;: p. 1153-1169.
84. Zadrazil F, Kamra D, Isikuemhen O, Schuchardt F. Bioconversion of lignocellulose into ruminant feed with white rot fungi. *Journal of Applied Animal Research*. 1996;: p. 105-124.
85. Basaure P. Maiz: Composicion. [Online]. Available from: <http://www.manualdelombricultura.com/foro/me>
86. Musatto S, Fernandes M, Milagres A, Roberto I. Effect of hemicellulose and lignin on enzy-matic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;: p. 124-129.
87. Cardona C. Simulación de los Procesos de Obtención de Etanol a partir de Caña de Azúcar y Maíz. *Scientia et Technica*. 2005;: p. 187-192.
88. *Trichoderma* Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. [Online].; 2015. Available from: <http://www.oriusbiotecnologia.com/trichoderma-pers-caracteristicas-generales-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible>
89. Wyman C. Handbook on bioethanol: production and utilization.. Washington: Taylor and Francis. 1996.
90. Shakhashiri. Ethanol. Chemical of the week. [Online]. Available from: <http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/PDF/Ethanol.pdf>
91. I Seminario-Taller Biocombustibles Biodiesel-Bioetanol. Bogota-Colombia;; 2007.

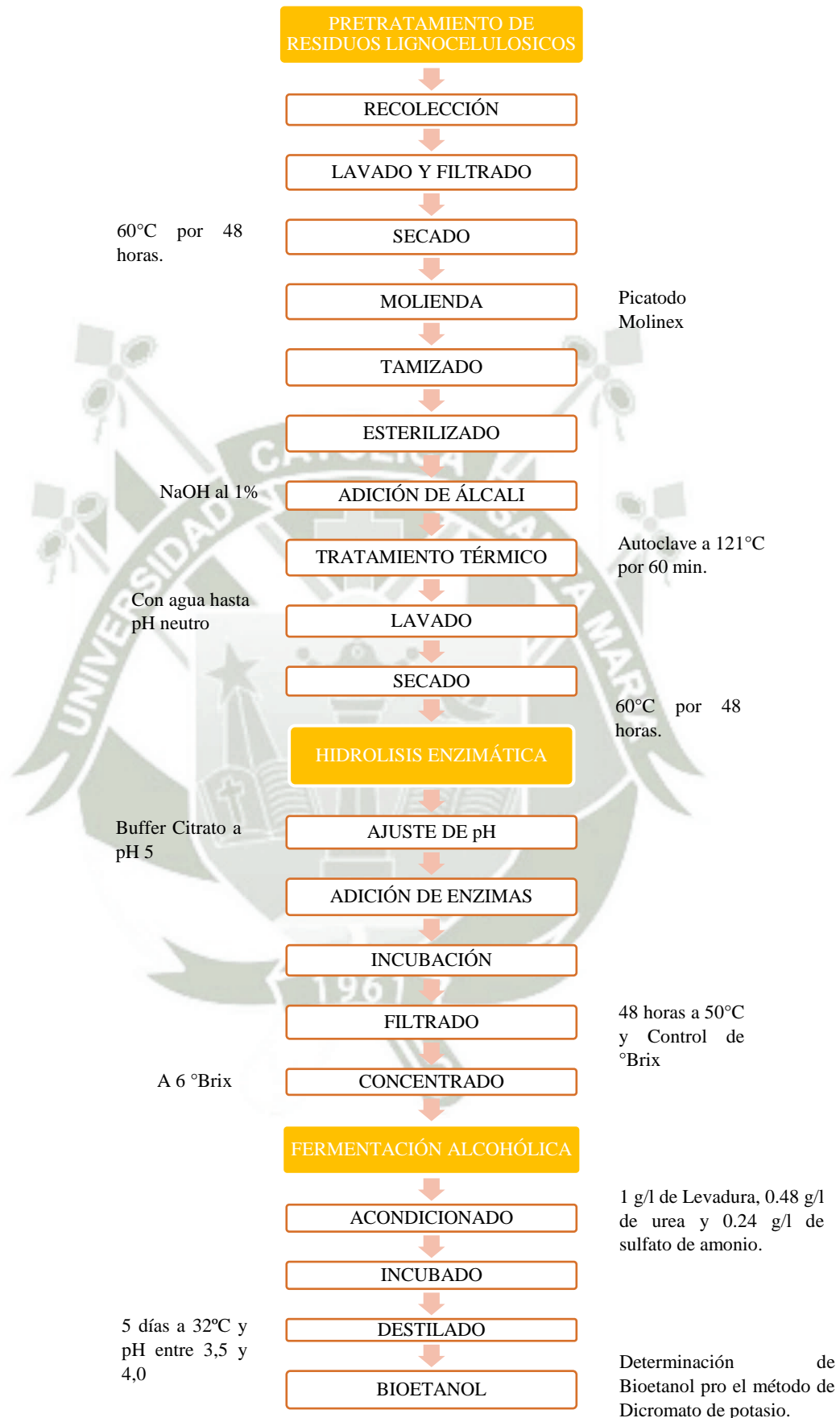


## ANEXO N° 1 - FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES

### Obtención de Celulasas



## Obtención de Bioetanol



## ANEXO N° 2 - IDENTIFICACIÓN DEL *Trichoderma* sp. (82)

### A. Estructura Macroscópica

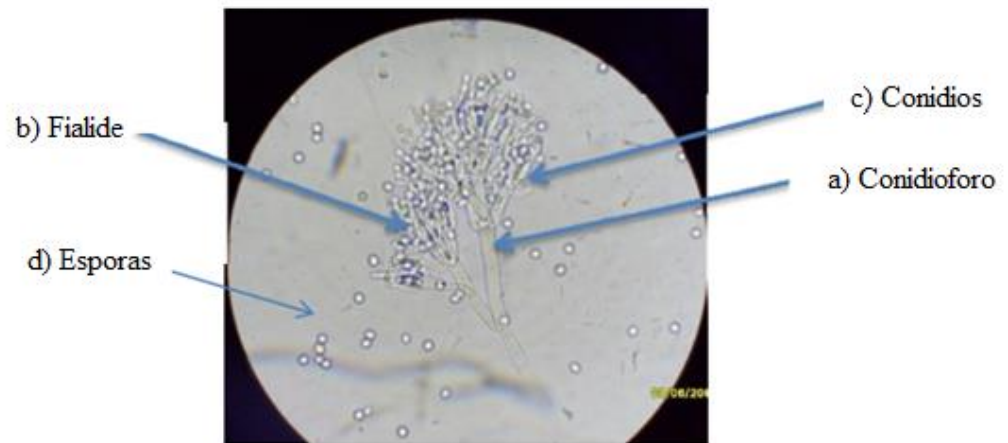
Las características que evaluaron fue el color, aspecto, bordes, y velocidad de crecimiento de las colonias; al inicio las colonias eran de color blanco y crecían en forma de copitos de algodón y mientras maduraban cambiaban de color a verde esmeralda formando esporas del mismo color, el tiempo de crecimiento aproximadamente es de 6 a 8 días, que es cuando alcanza su madurez, como se puede apreciar en la figura 25.



**Figura N° 25. Identificación Macroscópica del hongo *Trichoderma* sp. en medio PDA**

### B. Identificación Microscópica del *Trichoderma* sp.

Por medio de la microscopia óptica se observó la forma y disposición de las fialosporas y fiálides como también la forma y la formación de las esporas, al igual que las hifas. Las estructuras características indicaron que la cepa observada se trataba de *Trichoderma* sp.



**Figura N° 26.- Observación Microscópica del *Trichoderma* sp. a 100X con KOH al 10%:** Se observa la forma característica de a) Conidióforos, b) Fialídes, c) Conidios y d) Esporas.



## ANEXO N° 3 – ANALISIS FISICO QUIMICO

**Tabla N° 25. Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa del orujo de uva y hoja de mazorca de maíz en base seca**

<b>Compuesto</b>	<b>Orujo de uva rojo (%)</b>	<b>Hoja de mazorca de maíz (%)</b>
Celulosa	15.39	35.93
Hemicelulosa	6.69	33.72
Lignina	17.81	12.84

Fuente: El análisis físico químico fue realizado por el laboratorio Servilab de la UNSA



## ANEXO N° 4 - KIT DE GLICEMIA ENZIMÁTICA



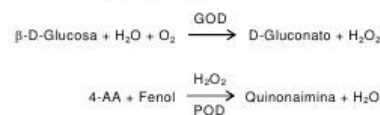
LINEAR Chemicals, S.L.

### GLUCOSE MR

<b>REF 1129005</b> 2 x 50 mL	<b>REF 1129010</b> 4 x 100 mL	<b>REF 1129015</b> 4 x 250 mL	<b>GLUCOSA MR</b> <i>Método enzimático colorimétrico</i> PUNTO FINAL
<b>CONTENIDO</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>CONTENIDO</b>	
R1.Reactivo 2 x 50 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL	R1.Reactivo 4 x 100 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL	R1.Reactivo 4 x 250 mL CAL. Patrón 1 x 3 mL	
Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>			

#### FUNDAMENTO

En la reacción de Trinder<sup>1,2</sup>, la glucosa es oxidada a D-gluconato por la glucosa oxidasa (GOD), con formación de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinonaimina roja proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



#### COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

**R1** **Monoreactivo.** Tampón fosfatos 100 mmol/L pH 7,5, glucosa oxidasa > 10 KU/L, peroxidasa > 2 KU/L, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, fenol 5 mmol/L.

**CAL** **Patrón de Glucosa.** Glucosa 100 mg/dL (5,55 mmol/L). Patrón primario de matriz orgánica. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 917b.

#### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C.  
Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Mantener los frascos cerrados, protegidos de la luz y evitar la contaminación durante su uso.  
**Descartar si se observan signos de deterioro:**  
- Presencia de partículas y turbidez.  
- Absorbancia del Blanco (A) a 500 nm > 0,100 en cubeta de 1 cm.

#### PREPARACION DE LOS REACTIVOS

El Monoreactivo y el Patrón están listos para su uso.

#### MUESTRAS

Suero o plasma heparinizado libre de hemólisis.  
La glucosa es estable unas 24 horas a 2-8°C, cuando el suero o el plasma se separa dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción.

#### INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid) puede afectar los resultados.
- Bilirrubina (> 10 mg/dL) puede afectar los resultados.
- Hemoglobina (> 1 g/L) puede afectar los resultados.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>4</sup>.

#### EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro o colorímetro para mediciones a 500 ± 20 nm.
- Unidad termostaticada ajustable a 37°C.
- Pipetas de volumen variable para reactivos y muestras.

#### TECNICA

1. Equilibrar reactivos y muestras a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos rotulados:

TUBOS	Blanco	Muestra	CAL. Patrón
R1. Monoreactivo	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Muestra	-	10 µL	-
CAL. Patrón	-	-	10 µL

3. Mezclar y reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente ó 5 minutos a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) de la muestra y el patrón a 500 nm frente al blanco de reactivo.

El color es estable 2 horas protegido de la luz.

#### CALCULOS

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = \text{mg/dL glucosa}$$

Muestras con concentraciones superiores a 500 mg/dL deben diluirse 1:4 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 4.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:  
mg/dL x 0,0555 = mmol/L

QUALITY SYSTEM CERTIFIED  
ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquín Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN  
Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website [www.linear.es](http://www.linear.es)



LINEAR Chemicals, S.L.

### VALORES DE REFERENCIA<sup>2</sup>

Suero, plasma (en ayunas)

Adultos	70 - 105 mg/dL (3,89 - 5,83 mmol/L)
Niños	60 - 110 mg/dL (3,33 - 6,11 mmol/L)
Neonatos	40 - 60 mg/dL (2,22 - 3,33 mmol/L)

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

### CONTROL DE CALIDAD

El empleo de un calibrador para calcular los resultados permite obtener una exactitud independiente del sistema o instrumento empleado.

Para un control de calidad adecuado, se incluirán en cada serie controles valorados (normales y elevados) que se tratarán como muestras problema.

**REF 1980005 HUMAN MULTISERA NORMAL**  
Valorado. Nivel normal de glucosa.

**REF 1985005 HUMAN MULTISERA ABNORMAL**  
Valorado. Nivel elevado de glucosa.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y la técnica usada. Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad y sus medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

### SIGNIFICADO CLINICO

La glucosa es una de las mayores fuentes de energía del cuerpo humano derivada de la degradación de los carbohidratos, incorporados a través de la dieta diaria y regulada a través de los procesos de *gluconeogénesis* (síntesis endógena a partir de aminoácidos y otras sustancias) y *glucogenólisis* (degradación del depósito de glucógeno hepático).

El nivel en sangre se mantiene a través de la ingesta y de hormonas reguladoras como la insulina, glucagon y epinefrina.

Un aumento anormal en la tasa de glucosa sanguínea, conocida como *hiperglucemia*, puede estar asociado con la diabetes mellitus y con la hiperactividad de las glándulas adrenales, tiroideas o pituitaria.

La *hipoglucemia* o disminución anormal por debajo de la tasa hallada en ayunas, se observa en casos de sobredosis de insulina, tumores secretores de insulina, hipopituitarismo, enfermedad de Addison, mixedema y condiciones que interfieren con su absorción. La determinación de glucosa en sangre, es una prueba clave para evaluar y diagnosticar desórdenes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos.

### NOTAS

- En muestras hemolizadas los enzimas liberados de los hematíes originan una disminución de la tasa de glucosa presente, obteniéndose valores bajos falsos.
- Adicionalmente, la catalasa presente compete con la peroxidasa por el peróxido de hidrógeno dando asimismo valores erróneos bajos.
- Este ensayo permite ser adaptado a distintos instrumentos automáticos. Cualquier adaptación a un instrumento deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Consultar con su distribuidor para cualquier dificultad en la adaptación del método.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

B1129-2/0901  
RI.cas

QUALITY SYSTEM CERTIFIED  
ISO 9001 ISO 13485



LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN  
Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website [www.linear.es](http://www.linear.es)

### CARACTERISTICAS ANALITICAS

- **Límite detección:** 0,63 mg/dL

- **Linealidad:** Hasta 500 mg/dL

- **Precisión**

mg/dL	Intraserial		Interserial	
Media	113,3	279,5	113,3	279,5
DE	1,71	2,71	2,76	3,61
CV%	1,5	0,97	2,44	1,29
N	10	10	10	10

- **Sensibilidad:** 3,5 mA/ mg/dL glucosa.

- **Correlación.** Este ensayo (y) fue comparado con un método comercial similar (x). Los resultados fueron los siguientes:

$$N = 65 \quad r = 0,99 \quad y = 1,03x - 0,75$$

Las características analíticas han sido generadas usando un instrumento automático. Los resultados pueden variar según el instrumento utilizado.

### REFERENCIAS

1. Trinder, P. Ann. Clin. Biochem. 6 : 24 (1969).
2. Barham, D. y Trinder, P. Analyst. 97 : 142 (1972).
3. Szasz, B., Hurt, K. y Busch, E.W. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 12 : 256 (1974).
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
5. Tietz, N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3<sup>rd</sup> Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA. (1995).

**ANEXO N° 5 - METODO DEL DICROMATO DE POTASIO****Preparación de la solución de dicromato y curva de calibración**-Preparación de soluciones

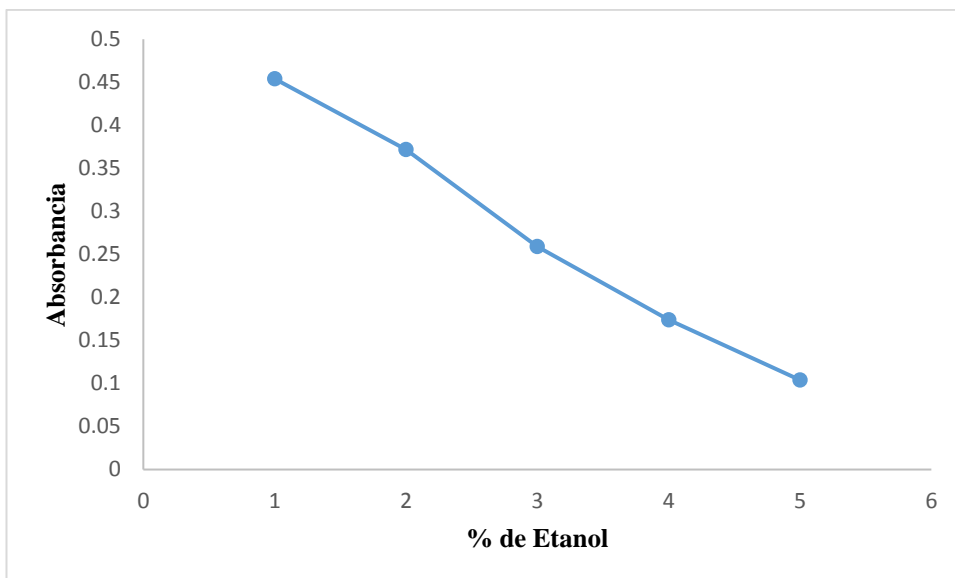
- ✓ Mezcla sulfocrómica: 500 mL de ácido sulfúrico al 12.88% mas 0.75 g de dicromato de potasio.
- ✓ Solución de ácido sulfúrico al 13.72%
- ✓ Solución madre: 20 mL de mezcla sulfocrómica y 32 mL de solución de ácido sulfúrico al 13.72%
- ✓ Solución de carbonato de potasio saturada

-Curva de calibración

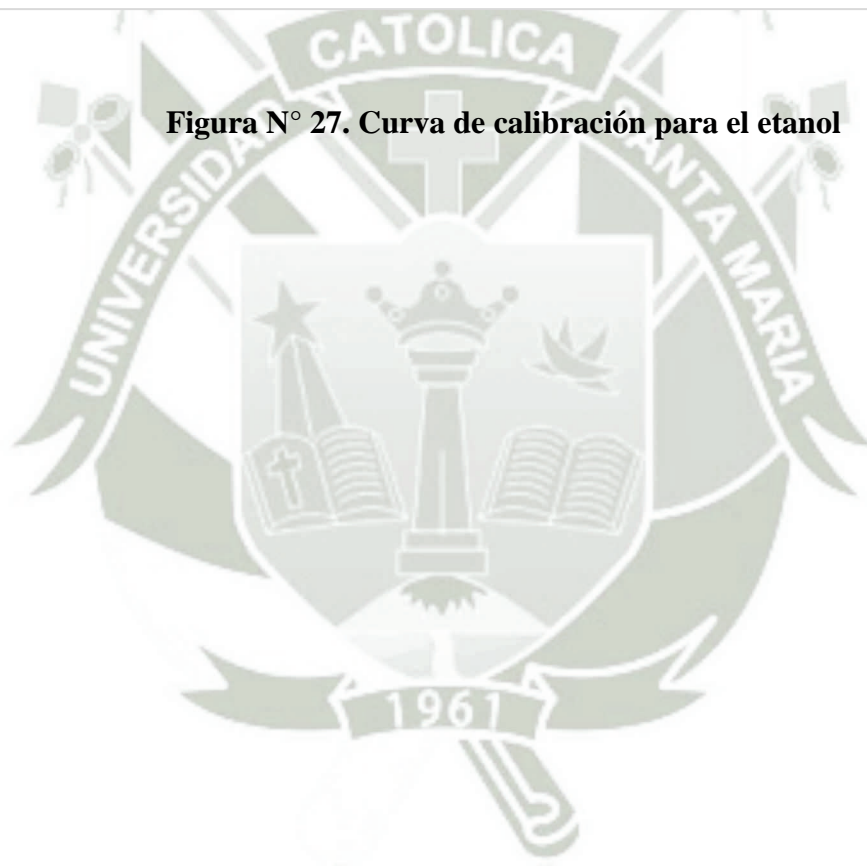
Se prepararon 5 soluciones de etanol con las siguientes concentraciones 1%, 2%, 3%, 4% y 5% en tubos de ensayo con 1 mL de cada concentración, a cada tubo de ensayo se le añadió 3 mL de solución madre y 2 mL de solución de carbonato saturada, dichos tubos de ensayo fueron cerrados herméticamente y colocados a baño María a 35°C por 20 min, transcurrido el tiempo cada uno de los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 400 nm para realizar la curva de calibración.

**Tabla N° 26. Absorbancias a para concentraciones conocidas de etanol**

<b>Etanol (%)</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>1</b>	0.454
<b>2</b>	0.372
<b>3</b>	0.259
<b>4</b>	0.174
<b>5</b>	0.104



**Figura N° 27. Curva de calibración para el etanol**



## ANEXO N° 6 - ANALISIS ESTADISTICO

**Tabla N° 27. Concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp.**

Ensayo	Disolventes	Concentración de CMC	Tiempo (minutos)									
			1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	NaCl	0.1 % CMC	8.24	9.15	10.04	12.95	15.79	18.17	22.89	27.46	33.78	33.67
2	NaCl	0.1 % CMC	6.86	9.67	12.36	14.65	17.75	19.16	25.76	26.59	29.56	34.76
3	NaCl	0.1 % CMC	8.76	8.82	10.72	13.82	14.76	19.71	24.82	24.83	30.13	32.80
4	NaCl	0.3% CMC	10.50	16.34	21.08	23.12	27.12	25.81	30.51	33.47	34.09	35.40
5	NaCl	0.3% CMC	10.28	17.83	23.40	25.78	27.28	28.62	32.14	33.39	34.10	32.95
6	NaCl	0.3% CMC	9.71	15.47	21.50	24.25	25.95	26.99	31.83	30.76	34.71	32.67
7	NaCl	0.5% CMC	8.89	14.46	14.51	20.64	25.09	34.23	35.49	33.24	34.67	36.24
8	NaCl	0.5% CMC	8.95	10.43	18.05	17.84	20.42	30.35	37.64	36.19	35.65	35.56
9	NaCl	0.5% CMC	10.36	13.36	16.42	20.60	26.42	29.45	36.23	38.14	36.81	38.10
10	Tween	0.1 % CMC	9.66	11.38	21.61	24.14	26.29	31.03	32.76	34.82	39.28	38.88
11	Tween	0.1 % CMC	7.32	14.49	23.43	25.21	29.69	30.66	31.36	34.39	38.12	37.54
12	Tween	0.1 % CMC	8.05	10.73	19.14	25.82	28.83	27.39	30.38	36.88	38.94	35.71
13	Tween	0.3% CMC	10.25	11.98	17.36	24.99	33.53	36.43	39.59	40.25	41.27	40.36
14	Tween	0.3% CMC	8.84	11.16	18.11	23.18	29.73	39.29	38.93	41.32	39.31	40.21
15	Tween	0.3% CMC	8.35	9.25	16.25	21.55	30.24	40.21	39.25	41.24	41.12	39.36
16	Tween	0.5% CMC	10.34	19.85	19.41	28.40	34.38	36.65	43.76	42.13	43.60	44.07
17	Tween	0.5% CMC	11.80	15.03	19.22	26.08	36.98	35.93	43.34	43.82	44.36	43.71
18	Tween	0.5% CMC	12.35	16.32	17.32	25.44	34.92	36.63	42.55	42.25	43.32	45.27

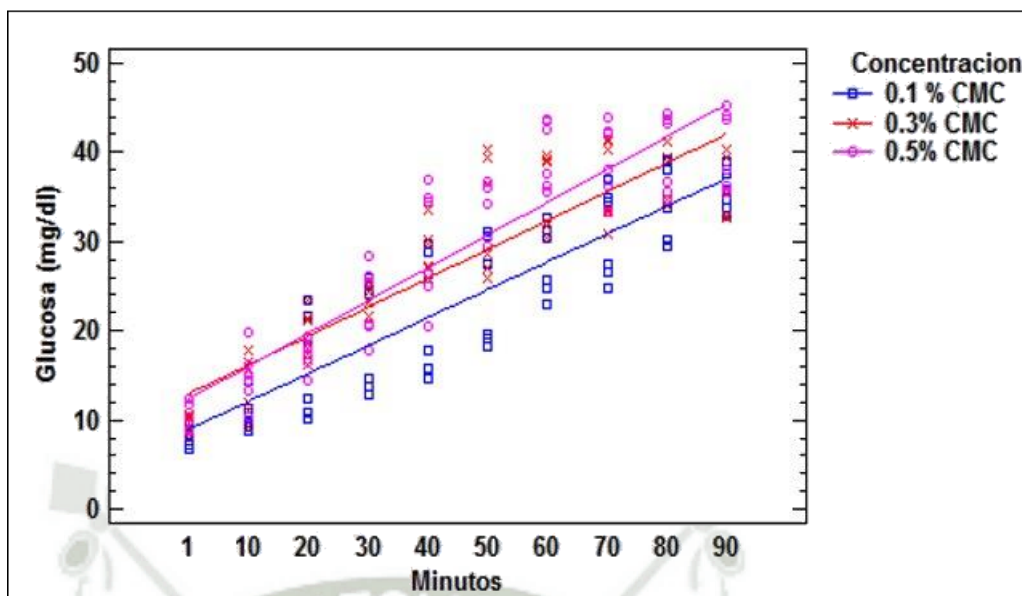


Figura N° 28. Gráfica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según concentración de CMC

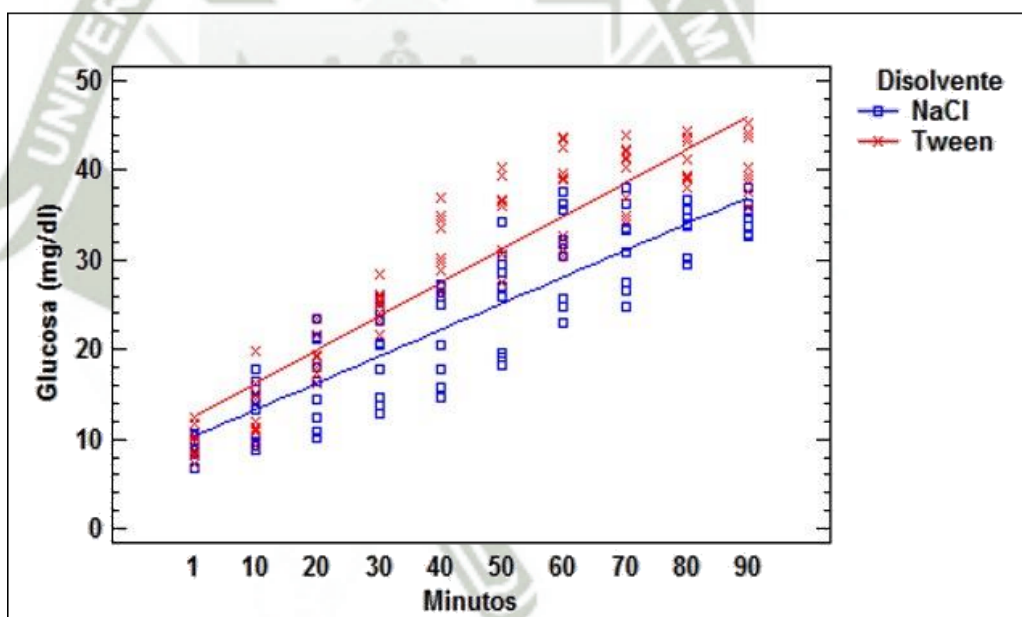
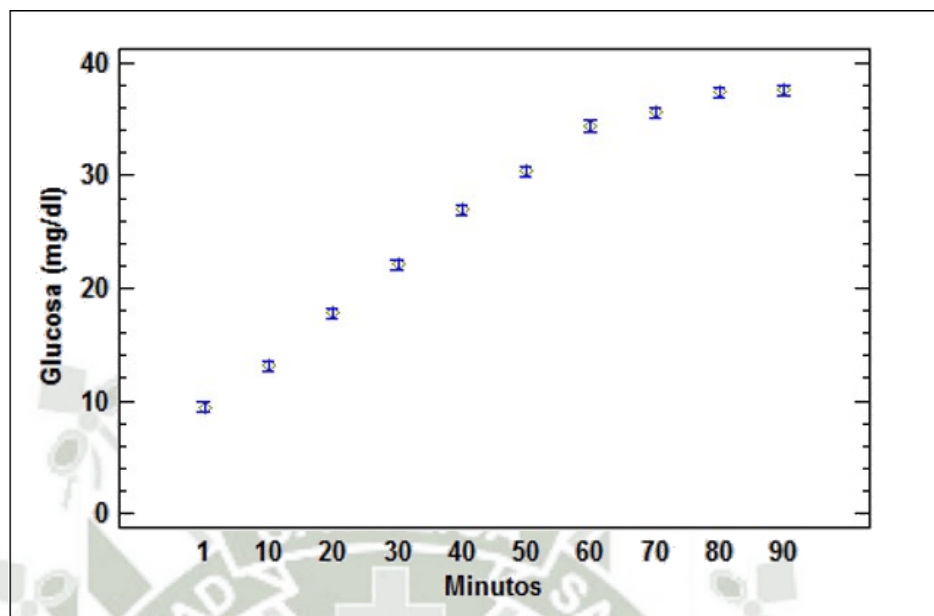


Figura N° 29. Gráfica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según disolvente.



**Figura N° 30. Promedios de la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. según tiempo**

**Tabla N° 28. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. por concentración de CMC y tiempo**

Contraste	1 minuto	10 minutos	20 minutos	30 minutos	40 minutos
0.1 % CMC	8.14 (a)	10.71 (a)	16.22 (a)	19.43 (a)	22.18 (a)
0.3% CMC	9.66 (a,b)	13.67 (b)	19.62 (b)	23.81 (b)	28.97 (b)
0.5% CMC	10.45 (b)	14.91 (b)	17.49 (a)	23.16 (b)	29.70 (b)

Contraste	50 minutos	60 minutos	70 minutos	80 minutos	90 minutos
0.1 % CMC	24.35 (a)	27.99 (a)	30.82 (a)	34.96 (a)	35.56 (a)
0.3% CMC	32.89 (b)	35.37 (b)	36.73 (b)	37.43 (b)	36.82 (a)
0.5% CMC	33.87 (b)	39.83 (c)	39.29 (c)	39.73 (c)	40.49 (b)

**Tabla N° 29. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) para la evaluación de la actividad de enzimas celulasas obtenidas de *Trichoderma* sp. por disolvente y tiempo**

<i>Contraste</i>	<b>1 minuto</b>	<b>10 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>30 minutos</b>	<b>40 minutos</b>
NaCl	9.17 (a)	12.83 (a)	16.45 (a)	19.29 (a)	22.28 (a)
Tween	9.66 (a)	13.35 (a)	19.09 (b)	24.97 (b)	31.62 (b)

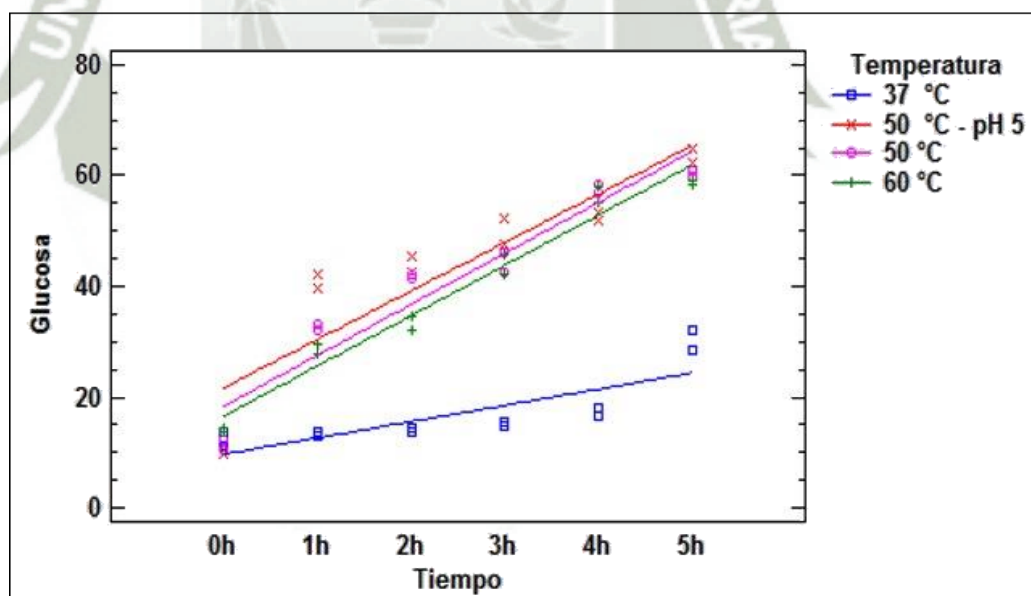
<i>Contraste</i>	<b>50 minutos</b>	<b>60 minutos</b>	<b>70 minutos</b>	<b>80 minutos</b>	<b>90 minutos</b>
NaCl	25.83 (a)	30.81 (a)	31.56(a)	33.72 (a)	34.68 (a)
Tween	34.91 (b)	37.99 (b)	39.67 (b)	41.03 (b)	40.56 (b)

**Tabla N° 30. Análisis estadístico descriptivo de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes pH**

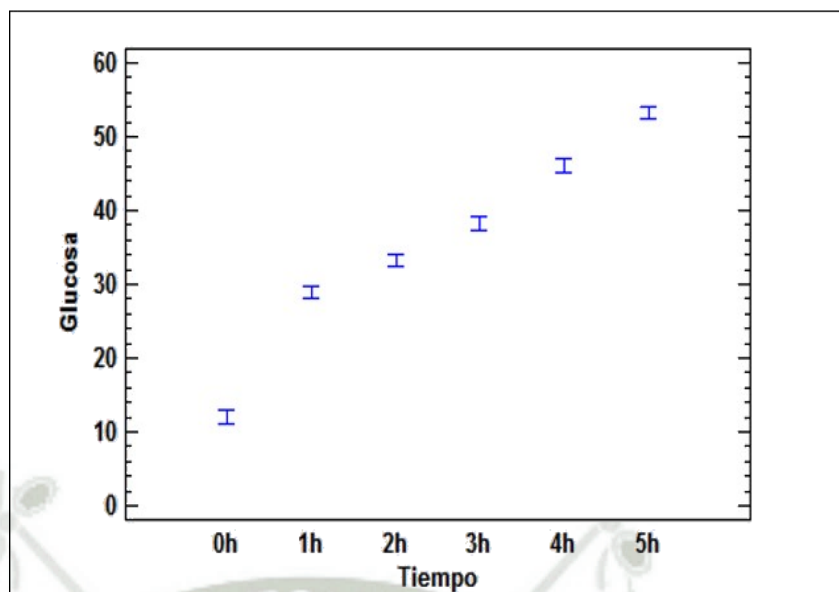
	<b>pH 4</b>	<b>pH 4.5</b>	<b>pH 5</b>	<b>pH 5.3</b>	<b>pH 5.5</b>	<b>pH 6</b>
Recuento	3	3	3	3	3	3
Promedio	24.98+/- -6.52	34.28+/- 14.74	50.74+ /-3.56	37.85+ /-4.14	36.34+/- 5.18	31.11+/- 16.01
Mediana	23.47	34.84	50.44	37.14	36.52	29.61
Varianza	6.8857	35.2196	2.0556	2.7770	4.3507	41.5592
Desviación Estándar	2.6240	5.9346	1.4337	1.6664	2.0858	6.4466
Coefficiente de Variación	10.50%	17.31%	2.83%	4.40%	5.74%	20.72%
Mínimo	23.46	28.09	49.48	36.65	34.17	25.54
Máximo	28.01	39.92	52.3	39.75	38.33	38.17
Rango	4.55	11.83	2.82	3.10	4.16	12.63
Sesgo Estandarizado	1.2247	-0.2958	0.6366	1.1067	-0.2725	0.6989

**Tabla N° 31. Concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

Ensayo	Temperatura	Tiempo (horas)					
		0	1	2	3	4	5
1	37 °C	13.60	12.84	13.59	14.68	17.97	17.49
2	37 °C	11.12	13.57	14.58	15.46	16.69	31.95
3	50 °C	12.33	22.17	42.07	41.40	56.85	51.03
4	50 °C	10.52	33.19	41.40	62.04	68.38	89.87
5	60 °C	13.55	25.79	52.07	82.82	65.17	72.30
6	60 °C	14.55	29.61	34.56	32.22	38.07	45.22
7	50 °C - pH 5	9.30	42.25	32.35	37.45	43.21	57.22
8	50 °C - pH 5	11.95	19.67	19.34	52.22	51.86	64.91



**Figura N° 31. Grafica de tendencias de la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**



**Figura N° 32. Promedios para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes tiempos**

**Tabla N° 32. Comparaciones múltiples para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes tiempos**

Tiempo	Promedio
0h	12.07 <sup>a</sup>
1h	28.89 <sup>b</sup>
2h	33.24 <sup>c</sup>
3h	38.29 <sup>d</sup>
4h	46.02 <sup>e</sup>
5h	53.25 <sup>f</sup>

**Tabla N° 33. Análisis interactivo para la concentración de glucosa (mg/dl) obtenida por acción de enzimas celulasas de *Trichoderma* sp. a diferentes temperaturas**

	<b>0h</b>	<b>1h</b>	<b>2h</b>	<b>3h</b>	<b>4h</b>	<b>5h</b>
<b>37 °C</b>	12.36 (a,b)	13.21 (a)	14.09 (a)	15.07 (a)	17.33 (a)	30.22 (a)
<b>50 °C - pH 5</b>	10.43 (a)	40.96 (b)	43.85 (b)	49.835 (b)	52.53 (b)	63.56 (b)
<b>50 °C</b>	11.43 (a,b)	32.68 (c)	41.73 (b)	44.22 (c)	57.61 (c)	60.45 (b,c)
<b>60 °C</b>	14.05 (b)	28.70 (d)	33.32 (c)	44.02 (c)	56.62 (c)	58.76 (c)

