

2 G. No. 19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

OBTENCION DE ALCOHOL ETILICO A PARTIR DE RESIDUOS CELULOSICOS

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N

ANA GUADALUPE CEVALLOS ROJAS
MARTHA MARIA LUISA ZAMORA PEREZ

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCION	1
2.	GENERALIDADES	4
3.	MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO	37
4.	METODOS EXPERIMENTALES	40
5.	RESULTADOS	58
6.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS	99
7.	CONCLUSIONES	104
8.	BIBLIOGRAFIA	107

1. INTRODUCCION

A partir de la década de los 70s, ha existido una preocupación creciente en torno a los recursos energéticos provenientes del petróleo, por ser un producto no renovable, escaso, costoso y selectivo en ciertas regiones del mundo.¹⁶

Estos factores han ocasionado el desarrollo de nuevas investigaciones de diversas fuentes alternativas de obtención y utilización de energía; las cuales proponen como posibles opciones el empleo de la energía geotérmica, nuclear, solar, etc. Sin embargo, a estas formas de generación de energía son inherentes a procesos que actualmente son costosos o que a veces conllevan a un alto riesgo de contaminación.

Otras investigaciones buscan emplear materiales de origen animal o vegetal con fines energéticos; ²¹ esta nueva fuente no convencional, utiliza la biomasa como posible energético capaz de ofrecer toda una gama de sustitutos de combustible,³ lo cual presenta la ventaja de usar materia orgánica renovable (desechos agrícolas, animales, forestales, municipales, etc), también accesible y sobre todo útil a los países en vías de desarrollo.

Desde principios de siglo se ha obtenido alcohol etílico (etanol) por fermentación a partir de azúcares y almidón, con el fin de utilizarse como energético. En las últimas décadas condicionado por el aumento en el costo de estos materiales, se ha producido por síntesis química a partir del petróleo; pero el incremento constante del precio de los hidrocarburos a partir de la década de los 70s, hace recurrir al método original de obtención, utilizando sustratos abundantes y baratos que no sean destinados al consumo humano.¹²

Así por ejemplo en Brasil, se ha desarrollado un plan a nivel nacional para investigar y producir etanol a partir de desechos celulósicos,⁴⁷ aprovechando los residuos y las plantas de caña de azúcar, yuca y otros vegetales provenientes de las grandes cosechas¹⁶ que se obtienen en su territorio, fortaleciendo así su Industria Azucarera y por lo tanto su desarrollo económico, mediante el uso de etanol como combustible líquido o como gasohol (mezcla de gasolina-etanol).^{45,48}

México se ha caracterizado por ser un país petrolero como consecuencia del descubrimiento de yacimientos en el Sureste de su región geográfica, lo cual ha restringido la posible expansión de investigaciones tendientes a obtener energía a partir de recursos renovables. La necesidad de fomentar dichas investigaciones, se justifica al entender la relación indisoluble que existe entre el consumo de energía y el nivel de vida, desarrollo social y avance industrial de un país; por lo que México no debe depender de un solo energético,³ y sí fortalecer su desarrollo económico mediante la racionalización u optimización del empleo de los recursos provenientes del petróleo al diversificar las fuentes de energía, reforzando la investigación para la utilización de los recursos energéticos no convencionales.³ En este sentido, los residuos agrícolas existentes en el país que actualmente son desperdiciados en su mayoría, produciendo muy a menudo problemas de contaminación, constituyen una importante fuente energética alternativa; ya que a partir de ellos, se pueden extraer materiales celulósicos que al ser sometidos a procesos de transformación con la ayuda de la Biotecnología, generan productos con alto valor energético como el etanol.⁴⁸

Por las razones anteriores, en el presente estudio se han fijado los siguientes objetivos:

- 1) Obtener alcohol etílico con fines energéticos, como complemento o sustituto de combustibles líquidos para transportes automotrices y motores estacionarios.
- 2) Emplear como materia prima, materiales celulósicos provenientes de desechos agrícolas como rastrojo de maíz, paja de trigo y aserrín, que actualmente producen contaminación.
- 3) Seleccionar un proceso biológico de transformación de generación de etanol a partir de residuos celulósicos, indicando sus condiciones de operación y requerimientos necesarios.

Para alcanzar estos objetivos, se decidió efectuar una investigación bibliográfica del producto, de la materia prima básica (celulosa) así como de sus procesos de obtención; posteriormente se realizó la etapa experimental con el fin de evaluar los diferentes residuos celulósicos ya mencionados, para escoger los más idóneos y poder seleccionar un proceso de transformación adecuado.

El presente estudio es de carácter experimental, enfocado a la obtención de alcohol como combustible líquido a partir de un proceso biológico que complemente las características de los materiales celulósicos existentes en el país, esperando sirva de contribución en la búsqueda de formas alternativas de energía, a partir de recursos renovables.

2. GENERALIDADES

2.1 HISTORIA.

El uso del etanol como líquido combustible no es nuevo, ya que desde 1895 Otto dió a conocer el ciclo por el cual enfatizaba el uso del etanol como combustible y fué a principios de este siglo, cuando una cervecera en Berlín hizo funcionar un vagón usando alcohol como combustible.⁶ Posteriormente se realizó una carrera de autos de 85 millas entre París y Chantilly usando también el alcohol como fuente energética por lo que todos los primeros ensambladores de autos experimentaron con etanol como combustible básico.⁵¹

Los grandes descubrimientos de yacimientos de petróleo en 1901, abastecieron completamente las necesidades de combustible para motores ocasionando con ésto el desuso del etanol. Las primeras experiencias en las que se utilizó la mezcla de gasolina-etanol (gasohol), como líquido combustible en automóviles, fué en Brasil por el INT (Instituto Nacional de Tecnología) en 1920. Posteriormente en 1930, para estabilizar la Industria Azucarera en Brasil fué cuando realmente se implantó el uso del gasohol, legislándose en 1931 la adición de un 5% de alcohol en la gasolina.

Durante la 2a Guerra Mundial en Brasil, se interrumpió la importación del petróleo por lo que en ese tiempo se alcanzó el máximo uso del etanol con fines energéticos.

En los años treinta, en Europa no se usaba todavía el petróleo, por lo que se seguía utilizando el alcohol producido a partir de la papa como combustible. Fué en la posguerra cuando se expandió la producción de petróleo en el Golfo Pérsico, inundando así el mercado interna-

cional y dejando en el olvido la producción de combustible a partir de biomasa.⁵¹

En 1975 fué lanzado por el gobierno brasileño, el Programa Nacional de Alcohol y su objetivo principal fué incrementar la producción de alcohol para utilizarse como combustible, debido al encarecimiento del petróleo.⁵²

Entre 1974 y 1976 el CTA (The Air Force Technical Center) investigó el funcionamiento de los motores brasileños que utilizaban el gasohol como combustible el cual, contenía diversas cantidades de alcohol. Su reporte fué satisfactorio comprobando que el gasohol contenía un 20% de alcohol y que los motores no disminuían su funcionamiento comparándolos con motores de gasolina; además, no requería ninguna modificación en el motor, por lo que abogaron para sustituir la gasolina con alcohol.⁶

Para 1977 en la Ciudad de Sao Paulo, existían 1.3 millones de vehículos con motores Otto usando gasohol y se probaban 400 vehículos movidos solamente por alcohol (etanol 96° G L) con motores ligeramente modificados.

Desde 1970 hasta la fecha, se han realizado varios estudios, con el fin de utilizar desechos celulósicos como fuente de obtención de diversos productos como azúcares, proteína unicelular y etanol.

Actualmente, gracias a estos estudios se ha desarrollado una nueva Industria en Brasil, que con el apoyo de su gobierno, ha prevalecido y desarrollado nueva tecnología para la producción de etanol con fines energéticos. Así mismo, el uso del gasohol en varios países como Estados Unidos y Brasil hace que se siga desarrollando esta nueva tecnología.

2.2 ETANOL.

2.2.1 Propiedades.

El etanol es uno de los productos químicos orgánicos más importantes en la mayoría de las industrias; se caracteriza por ser un líquido incoloro de olor agradable que hierve a 78.3°C y cuya densidad es 0.7894 a 20°C. Su fórmula condensada es $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ siendo su peso molecular de 50 g/mol. Es un compuesto orgánico soluble en agua. Es muy parecido al agua por lo que posee muchas propiedades de ésta, como el de ser de carácter neutro y el de poder cristalizar conjuntamente con muchas sustancias formando compuestos que llevan "alcohol de cristalización".

Se obtiene por destilación y el alcohol absoluto se obtiene destilando el alcohol al 96% en presencia de cal viva, sulfato de cobre anhidro o con benceno. El alcohol de 96% no es miscible con la gasolina, por lo que es necesario utilizar alcohol absoluto obtenido por destilación en presencia de benceno.¹¹

2.2.2 Usos.

El alcohol etílico se emplea ampliamente en la preparación de productos químicos y farmacéuticos. Se utiliza además como disolvente, como extractor y como anti-congelante. Sirve como sustrato y como materia prima para la síntesis de otros compuestos orgánicos con función disolvente, extractora, colorante, farmacéutica, lubricante, adhesiva, detergente, pesticida, plastificante y en perfumería; también se ha usado como deshidratante, como combustible y en bebidas alcohólicas y de destilería.¹²

Uno de los productos de importancia, derivados del etanol es el gasohol que es un combustible formado por

la mezcla de gasolina y etanol en una proporción de 90 a 10 o de 80 a 20, respectivamente. Si se le diera el uso como combustible para autos observaríamos que éstos no requieren ninguna modificación, cosa que no pasaría si se usara etanol puro ya que si se necesitaría algunas transformaciones en los motores. ⁴⁵

2.2.3 Obtención de Etanol.

El etanol es un producto que puede ser obtenido a partir de diversas materias primas clasificadas en cuatro tipos:

- a) Materias sacaroideas, constituidas por las melazas, azúcares de caña, remolacha y jugos de frutas.
- b) Materias que contienen almidón y que comprenden los cereales (maíz, malta, cebada, trigo, etc), al igual que las papas y la yuca.
- c) Materias celulósicas como la madera, rastrojos, pajas, residuos de fabricación de la madera y otros residuos celulósicos agrícolas.
- d) Materias petroquímicas como el etileno proveniente del gas natural.

De acuerdo al tipo de materia prima a utilizar es como se elige el proceso de obtención; en general existen dos procesos de obtención:

- a) Proceso químico.- En el que se utiliza el acetileno como materia prima y por medio de un proceso químico se convierte, a temperatura elevada, en etanol mediante la adición de agua en presencia de ciertos catalizadores. ³⁷

- b) Por fermentación.- Proceso de descomposición de carbohidratos provocada por enzimas segregadas por diferentes microorganismos como las levaduras, obteniendo así etanol como producto principal de la fermentación.

Basándonos en el objetivo de este trabajo, se eligió la síntesis biológica de etanol por ser el proceso que permite aplicar las condiciones idóneas ya mencionadas anteriormente.

2.2.4 Fermentación Alcohólica.

La fermentación alcohólica es el proceso por el cual se degradan los azúcares, en condiciones anaerobias, para dar como productos etanol y bióxido de carbono. Antes que la fermentación alcohólica se efectúe se debe considerar el uso del alcohol a producir y así elegir la materia prima y el microorganismo a emplear.

En la Tabla 2.1 se muestra la eficiencia de algunos microorganismos productores de etanol, así como los sustratos en los que actúan y algunos productos que también se obtienen durante el proceso de fermentación.

Como se observa en esta tabla los microorganismos con capacidad de producir altos rendimientos de etanol pertenecen al grupo de las levaduras y se ha comprobado que éstas son capaces de tolerar y producir de 13 al 20% de alcohol etílico.²²

Mecanismo de la Fermentación Alcohólica.

El mecanismo de la fermentación alcohólica ha sido muy estudiado debido a la gran importancia que tiene el

Tabla 2.1 Microorganismos productores de Etanol a partir de varios sustratos.

Sustrato	Microorganismo que actúa	Compuestos Formados	% Producción de Etanol práctico	Referencia
Melazas (sacarosa, rafinosa), granos (almidón), Jugo de caña, Papas.	Saccharomyces cerevisiae S. anamensis Schizosaccharomyces pombe	EtOH, CO ₂	90 - 98	37,52
Maltosa y Aminoácidos	Saccharomyces cerevisiae S. anamensis Schizosaccharomyces pombe	EtOH, alcohol amílico, isoamílico y propílico	78 - 92	37,52
Maltosa, Fructosa, Glucosa	Saccharomyces ellipsoideus Zymomonas mobilis	EtOH, CO ₂	90 - 98	37,52
Suero de Leche	Candida pseudotropicalis (Torula cremoris)	EtOH, CO ₂	84 - 94	37
Lejía Sulfitica y Azúcares de madera	S. cerevisiae	EtOH, CO ₂	39 - 47	37
Glucosa, Almidón	Sarcina ventriculi	EtOH, CO ₂ , ác. acético y fórmico	43 - 44	36
Glucosa (agave)	Pseudomona lidneri (Thermobacterium mobile)	EtOH, CO ₂ , ác. láctico	41 - 44	36
Pentosas, Pectina, Almidón, Glucógeno	B. macerans B. polymyxa B. acetoethylicum	EtOH, CO ₂ , acetona, ác. acético	22.5 - 31.2	14,36,39
Celulosa	Cl. thermocellum	EtOH, ác. acético	35	7
Glucosa	Cl. kluyveri Cl. thermosaccharolyticum Cl. ethylicum	EtOH, ác. acético EtOH, ác. acético y láctico EtOH, CO ₂ , H ₂	26	14,36,39
Xilosa, Glucosa	Fusarium lini	EtOH, CO ₂ , acetato		39
Glucosa	Lactobacillus plantarum Leuconostoc mesenteroides	EtOH, CO ₂ , lactato		39
Glucosa, Xilosa	Aeromonas hydrophilia	EtOH, 2,3-butanodiol		14
Glucosa, Almidón, Sacarosa, Rafinosa.	Rhizopus japonicum Mucor rouxanus	EtOH, CO ₂ , lactato EtOH, CO ₂	5 3 - 8	37,39 37,39

etanol en la industria química y de alimentos. Los azúcares que se pueden fermentar más fácilmente son los monosacáridos ya que se fermentan directamente, mientras que los di, tri y polisacáridos tienen que ser hidrolizados a hexosas antes de ser fermentados.

Muchas veces la misma levadura contiene este mecanismo de hidrólisis ya que poseen el sistema de enzimas hidrolasas necesarias para esta transformación. Las hexosas fermentescibles son: glucosa, fructosa, manosa y galactosa.

La degradación de estos azúcares empieza con la glucólisis de Embden-Meyerhoff en la cual el aceptor final de electrones no es el piruvato, sino el producto de su descarboxilación, el acetaldehído (ver Fig. 2.1). La descarboxilación del piruvato está catalizada por la enzima piruvato carboxilasa en presencia de la coenzima tiamina pirofosfato (TPP), la cual está unida al piruvato. Es así como el piruvato se descarboxila y se reduce posteriormente a etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa, con lo que se restituye el NAD en su forma oxidada. (Fig. 2.2).^{36,39}

Figura 2.1

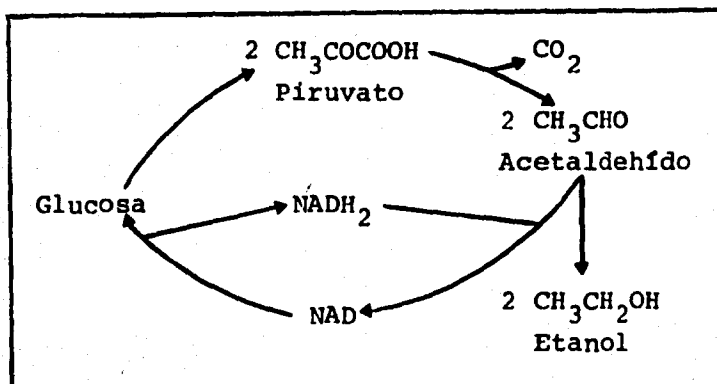
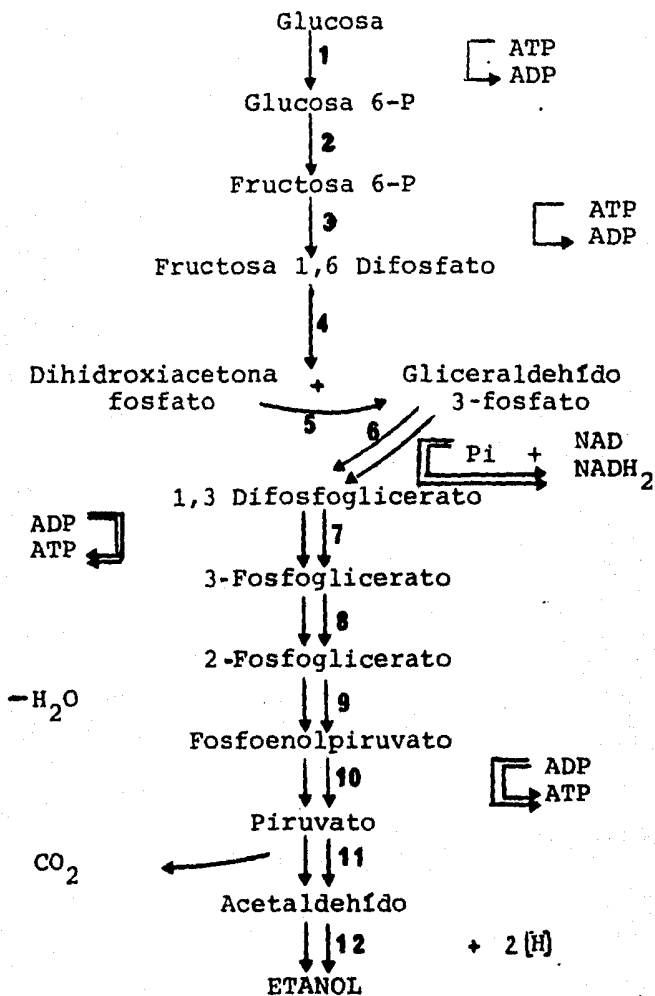
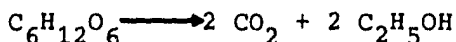


Figura 2.2 Mecanismo del Proceso de Fermentación Alcohólica. (Embden-Meyerhoff). (34)



ENZIMAS: 1. Hexocinasa. 2. Isomerasa. 3. Fosfofructocinasa. 4. Aldolasa. 5. Isomerasa. 6. Deshidrogenasa. 7. Fosfatasa. 8. Fosfogliceromutasa. 9. Enolasa. 10. Fosfatasa. 11. Carboxilasa. 12. Deshidrogenasa.

La estequiometría de la fermentación alcohólica, según la ecuación de Gay Lussac es:



Sin embargo, en la práctica se ha observado que la eficiencia de esta ecuación se ve disminuida ya que se pueden formar además de bióxido de carbono y etanol, otros productos secundarios, según las condiciones en que se trabaje (Tabla 2.2). Así mismo, la utilización del azúcar por parte del microorganismo para su crecimiento y generación de nuevas células, ocasiona la disminución de esta eficiencia.

Tabla 2.2 Productos Finales de la Fermentación por Levadura. (m moles/100 m moles de glucosa fermentada).

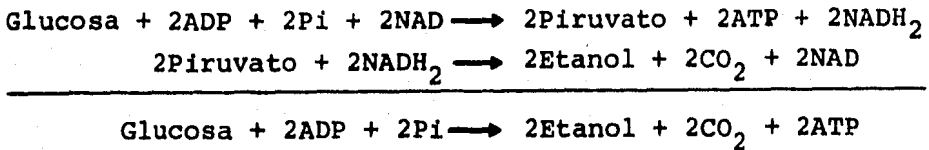
Productos	pH: 3.0	pH: 6.0	pH: 7.6
Etanol	171.50	165.90	148.00
Bióxido de carbono	150.80	178.00	167.80
Acido acético	0.52	4.27	9.16
Acido butírico	0.13	0.39	0.35
Acido fórmico	0.36	0.46	0.43
Acido láctico	0.82	1.73	0.87
Acido succínico	0.53	1.14	0.43
Acetofina	-	-	0.01
2,3-butanodiol	0.75	0.39	0.33
Glicerol	6.16	10.40	25.10
Carbono asimilado	12.40	12.40	-

Fuente: Ver referencia 40.

Uno de los productos secundarios de la fermentación alcohólica, de interés industrial es el aceite fusel, el cual es una mezcla de diversos alcoholes superiores, predominando el amílico y propílico. Estos alcoholes no se

forman a través del azúcar que se encuentra en la fermentación sino partiendo de sustancias nitrogenadas como los aminoácidos, existentes en el medio de fermentación.

Desde el punto de vista energético la fermentación alcohólica por levadura da una ganancia de 2 moles de ATP por mol de glucosa fermentada:



Procesos.

Los procesos empleados en la fabricación de alcohol etílico dependen de la naturaleza de la materia prima. Así por ejemplo, las materias sacaroides requieren poco o ningún tratamiento preliminar; en cambio las amiláceas o celulósicas necesitan de un tratamiento previo a su utilización en la fermentación. Estos requerimientos generalmente son llevados a cabo mediante hidrólisis que pueden desdoblar el polisacárido a unidades fermentescibles como la glucosa. La hidrólisis puede ser química, mediante el uso de ácidos o álcalis, o por vía enzimática utilizando microorganismos (ver sección 2.4.1).

2.3 CELULOSA.

2.3.1 Propiedades.

La celulosa es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosa, unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos. La celulosa varía ampliamente en la longitud de sus cadenas y en el grado de interacción entre ellas, de acuerdo a sus orígenes; así el peso de las moléculas de celulosa se encuentra entre 100 000 - 600 000 g/mol dependiendo del grado de polimerización que posea, es decir, del número de moléculas de glucosa que contenga.^{9,26}

La celulosa puede ser considerada como una fuente inagotable y fácilmente disponible,⁹ que no se encuentra en forma pura en ninguna fuente natural, sino que se halla asociada a compuestos como almidón, pectina, hemicelulosa y lignina. Con éstos dos últimos, la celulosa forma una mezcla física estrechamente ligada a la pared celular de las plantas superiores, que hace que sus tejidos sean fuertes, durables y resistentes a ataques enzimáticos.⁴⁸

Dentro de las características físicas de la celulosa destaca el que es insoluble en agua y que presenta 4 estructuras cristalinas (designadas como Celulosa I, II, III y IV) y que a continuación se mencionan:⁹

La Celulosa I es la forma cristalina localizada en los materiales celulósicos naturales.

La Celulosa II se encuentra en celulosas regeneradas como filamentos viscosos, celofán y algodón mercerizado.

La Celulosa III se forma por un proceso con etilamina.

La Celulosa IV se obtiene por tratamiento a altas temperaturas.

La estructura física de la celulosa, no es más que el resultado directo de la conformación de sus moléculas de glucosa, tales moléculas forman fibras lineales que tienden a alinearse unas sobre otras fuertemente unidas, debido a la existencia de enlaces laterales denominados puentes de hidrógeno, generados por los grupos hidroxilo presentes en las moléculas de glucosa. En las regiones cristalinas de la celulosa, las moléculas de glucosa se encuentran altamente ordenadas, no así en las regiones amorfas.⁹

Las características físicas y químicas de los materiales celulósicos que determinan su susceptibilidad a la degradación enzimática son:

- 1) Contenido de humedad de la fibra.
- 2) Grado de solubilidad de la celulosa en el agua (hinchamiento).
- 3) Grado de cristalinidad de la celulosa.
- 4) Conformación e impedimento estérico de las unidades de celulosa.
- 5) Grado de polimerización de la celulosa.
- 6) Naturaleza, concentración y distribución de los grupos sustituyentes de las sustancias con las que la celulosa está asociada.^{9,13}

Uno de los componentes que impiden la degradación de los materiales celulósicos es la lignina, ya que rodea a la fibra de celulosa en una unidad tridimensional compacta. Lo anterior se debe a que existen muy pocos en-

laces covalentes entre la celulosa y la lignina, sin embargo, esta última forma enlaces de tipo éster entre los radicales urónicos de la hemicelulosa y sus grupos fenólicos, generando el efecto ya descrito.⁹

2.3.2 Fuentes de Celulosa.

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante, es una fuente renovable producida por la mayoría de las plantas verdes. En orden decreciente de abundancia las fuentes naturales de celulosa son:⁹

- 1) El tronco de angiospermas (maderas duras) contienen 40 a 55 % de celulosa.
- 2) El tronco de gimnospermas (maderas blandas) contienen 45 a 50 % de celulosa.
- 3) El tallo de monocotiledóneas (trigo, arroz, caña de azúcar) contienen 25 a 40 % de celulosa.
- 4) Las células del parénquima no lignificado de muchas hojas (contienen 15 a 20 % de celulosa).
- 5) Ciertas fibras no lignificadas (tales como los filamentos de la semilla de algodón y las fibras del lino) contienen 80 a 90 % de celulosa.

El mayor volumen de celulosa disponible en la naturaleza se deriva de las tres primeras fuentes.

2.3.3 Uso de los Residuos Celulósicos.

Los residuos celulósicos se pueden utilizar como

sustratos para diversas biosíntesis de productos de interés industrial. En cuanto a otros usos de estos desechos figuran la utilización del bagazo de caña y la pajilla de cebada para papel y maderas prensadas, el residuo fibroso de coco y agave tequilero en rellenos de sillones y bajo alfombras. Con respecto a otros materiales están orientados hacia los forrajes, como relleno en la dieta del animal.³⁵

2.3.4 Disponibilidad de los Residuos Celulósicos.

No todos los sustratos que se producen en México como desechos celulósicos son viables para la producción de etanol, debido a que algunos presentan limitaciones en mayor o menor grado en cuanto a su disponibilidad, distribución geográfica, ciclos de producción, fracción de celulosa aprovechable, costos, biodegradabilidad, toxicidad y compromiso para otras posibles aplicaciones.

Es por ésto por lo que se prefiere usar desechos agrícolas ya que su disponibilidad en cuanto a producción es muy alta y renovable (Tablas 2.4 y 2.5), su situación geográfica (Fig. 2.3) y ciclos de producción aceptables, con un contenido de celulosa alto (Tabla 2.3) y biodegradabilidad aumentada por el pretratamiento a que es sometido el desecho, así como la posible toxicidad debido a herbicidas y pesticidas queda eliminada debido al pretratamiento.

La producción anual de los residuos agrícolas promedio de 1972 a 1976 fué de 128 152 086 toneladas y la cantidad de material susceptible de ser utilizado en 1978 fué de 24 980 265 toneladas (Tablas 2.4 y 2.5).

Tabla 2.3 Composición Química de algunos desperdicios celulósicos (% en peso seco).

Componente	Rastrojo de maíz	Paja de trigo	Madera
Celulosa	29	34	44-50
Hemicelulosa	36	25	20-26
Lignina	14	13	7-12
Sílice, grasas, ceras, cenizas	5	28	Balance

Fuente: Ver referencia 10, 29.

Tabla 2.4 Producción Anual de los Principales Residuos Agrícolas (Promedio de 1972-1976).

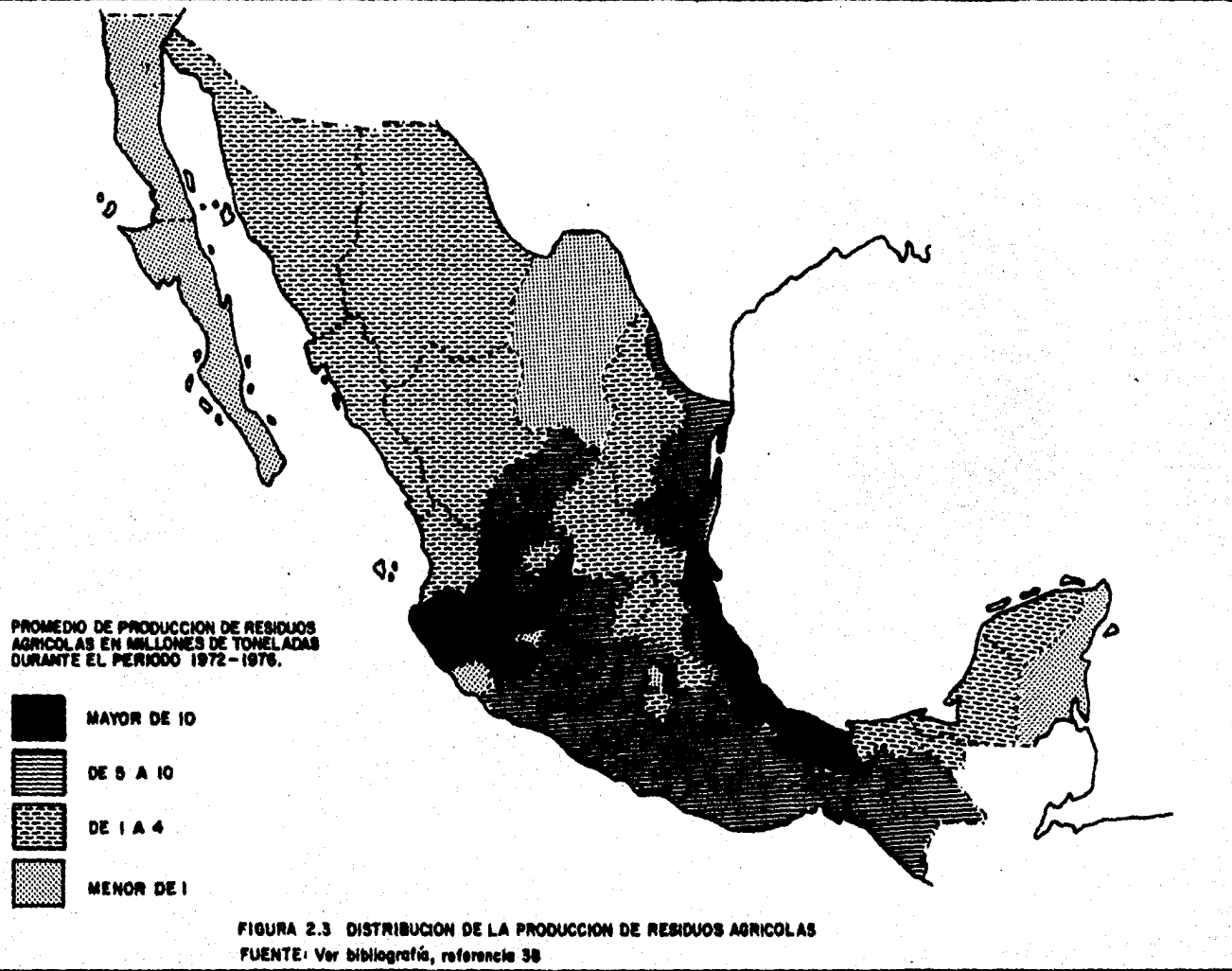
Residuo	Ton.	%
Maíz (raastrojo y olote)	103 623 675	80.28
Sorgo (raastrojo)	12 488 040	9.67
Caña de Azúcar (bagazo)	8 396 646	6.50
Trigo (paja)	2 519 361	1.95
Frijol (paja)	617 819	0.48
Arroz palay (cascarilla y paja).	506 527	0.39

Fuente: Ver referencia 38.

Tabla 2.5 Producción Nacional de Esquilmos Agrícolas en 1978.

Esquilmo Agrícola	Producción en Ton.
Rastrojo de maíz	16 618 532
Paja de sorgo	2 482 874
Paja de trigo	1 723 670
Paja de frijol	1 320 716
Punta de caña de azúcar	1 205 557
Cascarilla de salvado de trigo	750 172
Paja de cebada	534 746
Paja de avena	131 321
Frutas y hortalizas no comerciales	79 855
Cascarilla y arroz	59 309
Paja de cacahuete	43 379
Paja de garbanzo	25 134
	<hr/>
	24 980 265

Fuente: Ver referencia 38.



2.3.5 Degradación de la Celulosa.

Como se puede observar en la Fig. 2.4 la utilización indirecta de la celulosa depende de su conversión a glucosa, que es un sustrato básico en la obtención de varios productos de interés industrial.¹⁹

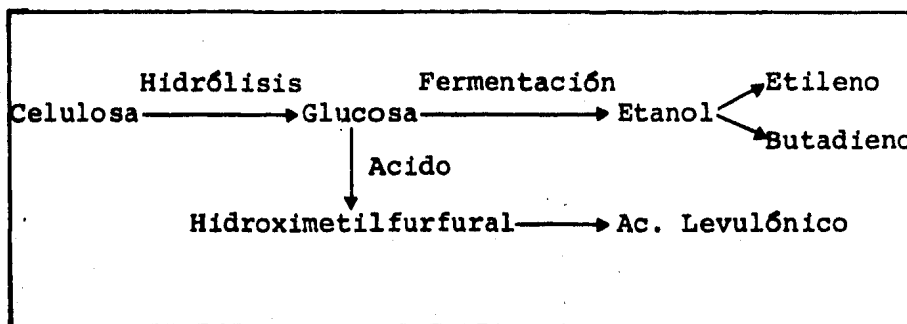


Figura 2.4 Posibles transformaciones de la celulosa.

La hidrólisis de la celulosa se puede efectuar por dos métodos:

- a) Hidrólisis química.- Consiste en tratar al material celulósico con ácido sulfúrico al 0.5 % v/v a una temperatura de 150°C y a una presión de 67 psi, manteniéndose unos minutos. El hidrolizado se neutraliza con carbonato de calcio y se obtiene un filtrado que contiene un 6 % p/v de azúcares.

Este método ha sido una tentativa para la utilización de este polisacárido, pero los altos costos y los problemas ambientales que ocasiona, hacen de éste un proceso nada económico.^{19,20}

- b) Hidrólisis enzimática.- Consiste en trans-

formar la celulosa en azúcares simples como la glucosa, mediante la acción de enzimas microbianas provenientes de algunos hongos, actinomicetos o bacterias.^{13,19}

Las ventajas que presenta el método enzimático con respecto al químico son las siguientes:

- 1) Las condiciones de reacción son moderadas, a 45°C y presión atmosférica.
- 2) Selectividad de la reacción a los productos deseados.
- 3) Generación de la celulosa en las cantidades requeridas. Autosuministro seguro.
- 4) Relativo corto tiempo de hidrólisis.
- 5) Posibilidad de recuperar tanto celulosa como fibra no hidrolizada.
- 6) Los azúcares obtenidos son puros y de calidad constante.

Pretratamiento de la Celulosa.

Como ya se había mencionado, la celulosa nativa se encuentra en combinación con hemicelulosa y lignina, y normalmente es invulnerable al ataque microbiano. Así los residuos lignocelulósicos requieren un pretratamiento previo a la fermentación.

Algunos de los efectos deseables del pretratamiento son: incrementar el volumen, el área superficial y la celulosa amorfa, así como disminuir la cristalinidad, el grado de polimerización y el tamaño de partícula de la celulosa.

Se han efectuado diversos estudios sobre pretra-

tamiento de los residuos celulósicos, pudiendo clasificarse de la siguiente manera:^{9,18,30}

1) Métodos físicos:

- a) Molienda.- Se realiza con el fin de disminuir el tamaño de partícula y aumentar el área superficial.^{33,48}
- b) Tratamientos térmicos.- Utilizando vapor, calentamiento, calentamiento a presión alta o calentamiento y descompresión.⁴⁸

2) Métodos químicos:

- a) Con ácidos (sulfúrico, peracético, etc). El ácido remueve la hemicelulosa, reduce el grado de polimerización y permite un cambio en la estructura cristalina de la celulosa.²³
- b) Con álcalis.- El tratamiento alcalino con solución de hidróxido de sodio al 1 o 2 % p/v, remueve casi toda la hemicelulosa además algo de lignina.^{30,33}

3) Métodos microbiológicos:

Por medio de microorganismos que degradan la lignina, como es el caso del hongo Pleurotus ostreatus y otros más, o también utilizando microorganismos que posean enzimas como la xilanasa, ya que ésta actúa sobre la hemicelulosa y crea una superficie de sustrato más accesible.¹⁸

Otros pretratamientos se pueden realizar por combinación de los métodos anteriores.^{23,48}

2.3.6 Degradación Biológica de la Celulosa.

La célula microbiana es impermeable a la molécula

la de celulosa de manera que el organismo debe excretar enzimas para hacer aprovechable el suministro de carbono.¹ El contacto físico directo entre las enzimas y sus sustratos es un requisito para la hidrólisis, por consiguiente, las enzimas extracelulares o se pegan sobre la superficie del microorganismo y actúan sobre la superficie de la fibra con la cual el microorganismo está en contacto, o se secretan al medio y actúan sobre la superficie accesible de las fibras.

La utilización biológica de la celulosa puede llevarse a cabo desde temperaturas cercanas al punto de congelación hasta alrededor de los 65°C. Cada una de las variedades de organismos celulolíticos se vé afectada en forma diferente por la temperatura. En medios con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido, bajo condiciones ácidas los hongos filamentosos son los que actúan.¹

Varios grupos de hongos utilizan la celulosa con más fuerza y están representados por especies de los géneros Aspergillus, Chaetomium, Curvularia, Fusarium y Trichoderma (Tabla 2.6). Se ha propuesto que los hongos son los principales causantes de la degradación de la celulosa en suelos húmedos mientras que las bacterias tienen mayor importancia en lugares semiáridos.

El complejo enzimático "Celulasa", es el sistema catalítico que requiere un microorganismo para convertir la celulosa a azúcares; está formado por tres tipos de enzimas designadas como:¹⁴

- a) β -1,4-glucan-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4)

(CMCasa, Cx, endocelulasa)

- b) β -1,4-glucan-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)
(Avicelasa, C₁, celobiohidrolasa)
- c) β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.21)
(Celobiasa)

Tabla 2.6 Algunos géneros microbianos capaces de utilizar celulosa.

HONGOS	BACTERIAS	ACTINOMICETOS
Alternaria	Bacillus	Micromonospora
Aspergillus	Cellulomonas	Nocardia
Chaetomium	Clostridium	Streptomyces
Fomes	Corynebacterium	Streptosporan- gium
Fusarium		
Myrothecium		
Penicillium		
Polyporus		
Rhizopus		
Trametes		
Trichoderma		
Verticillium		
Zygorhynchus		

Fuente: Ver referencia 1.

Para la hidrólisis completa de la celulosa insoluble, se requiere de la acción sinérgica de los componentes del complejo. Las diferentes celulasas varían ampliamente en las proporciones de sus componentes, dependen de la fuente y de las condiciones de crecimiento del microorganismo.

La adsorción de los componentes del complejo de

la celulasa, sobre el material celulósico es un requisito para su hidrólisis.¹⁸

Las enzimas se inactivan (se adsorben irreversiblemente sobre impurezas no celulósicas) después de cortos periodos de uso. Esta inactivación parece ser el principal obstáculo para no usar las enzimas aisladas para la producción de azúcares a partir de residuos celulósicos.²

El complejo celulolítico es inducible en la mayoría de los microorganismos y se sintetiza en presencia de celulosa o carbohidratos que son estructuralmente similares al polisacárido. Los organismos activos poseen una sola manera de regular la cantidad del sistema enzimático que producen, este mecanismo regulador es conocido como "represión catabólica".

Mecanismo de Acción de la Celulasa.

La enzima C_1 actúa sobre celulosa no degradada (natural), tiene poca o ninguna actividad sobre el polisacárido parcialmente degradado o en los oligómeros. La enzima C_x no hidroliza a la celulosa nativa, pero en cambio rompe los polímeros parcialmente degradados, actúa en moléculas que contienen muchas unidades de glucosa, además de los oligómeros tales como la celotetrosa y ocasionalmente celotriosa. La última fase de la transformación de celulosa a glucosa es catalizada por la β -glucosidasa, enzima que hidroliza la celobiosa, celotriosa y otros oligómeros de bajo peso molecular a glucosa.¹

la celulasa, sobre el material celulósico es un prerequisite para su hidrólisis.¹⁸

Las enzimas se inactivan (se adsorben irreversiblemente sobre impurezas no celulósicas) después de cortos períodos de uso. Esta inactivación parece ser el principal obstáculo para no usar las enzimas aisladas para la producción de azúcares a partir de residuos celulósicos.²

El complejo celulolítico es inducible en la mayoría de los microorganismos y se sintetiza en presencia de celulosa o carbohidratos que son estructuralmente similares al polisacárido. Los organismos activos poseen una sola manera de regular la cantidad del sistema enzimático que producen, este mecanismo regulador es conocido como "represión catabólica"

Mecanismo de Acción de la Celulasa.

La enzima C_1 actúa sobre celulosa no degradada (natural), tiene poca o ninguna actividad sobre el polisacárido parcialmente degradado o en los oligómeros. La enzima C_x no hidroliza a la celulosa nativa, pero en cambio rompe los polímeros parcialmente degradados, actúa en moléculas que contienen muchas unidades de glucosa, además de los oligómeros tales como la celotetrosa y ocasionalmente celotriosa. La última fase de la transformación de celulosa a glucosa es catalizada por la β -glucosidasa, enzima que hidroliza la celobiosa, celotriosa y otros oligómeros de bajo peso molecular a glucosa.¹

2.4 PROCESO BIOLÓGICO DE FABRICACION DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSA.

Para producir etanol de los desperdicios celulósicos (bagazo, papel, paja, etc), se presentan diversas alternativas generales basadas de acuerdo a las características del microorganismo y material de desecho a emplear. En la figura 2.5 se aprecian las diferentes rutas para obtener el alcohol, mostrando la analogía existente entre algunos de estos procesos con el correspondiente método de producción de bebidas alcohólicas (izquierda de la figura).

Muchos investigadores han dedicado su atención a la utilización de la celulosa como fuente de obtención de etanol y han considerado varias rutas para su producción:

- 1) Hidrólisis de la celulosa a azúcares y fermentación subsecuente de éstos.
- 2) Fermentación directa de los desperdicios celulósicos.
- 3) Programación Genética de microorganismos.

Independientemente de la ruta que se siga para aprovechar los desperdicios, es necesario eliminar la lignina ya sea por métodos físicos, químicos o microbiológicos, mencionados en la página 22. La vía microbiana de eliminación, ofrece la posibilidad de aprovechar en forma integral el residuo celulósico, ya que se han logrado obtener microorganismos mutantes que pueden ser empleados en el tratamiento preliminar de los materiales celulósicos (principalmente maderas) obteniendo proteína unicelular a partir de la lignina.²⁹

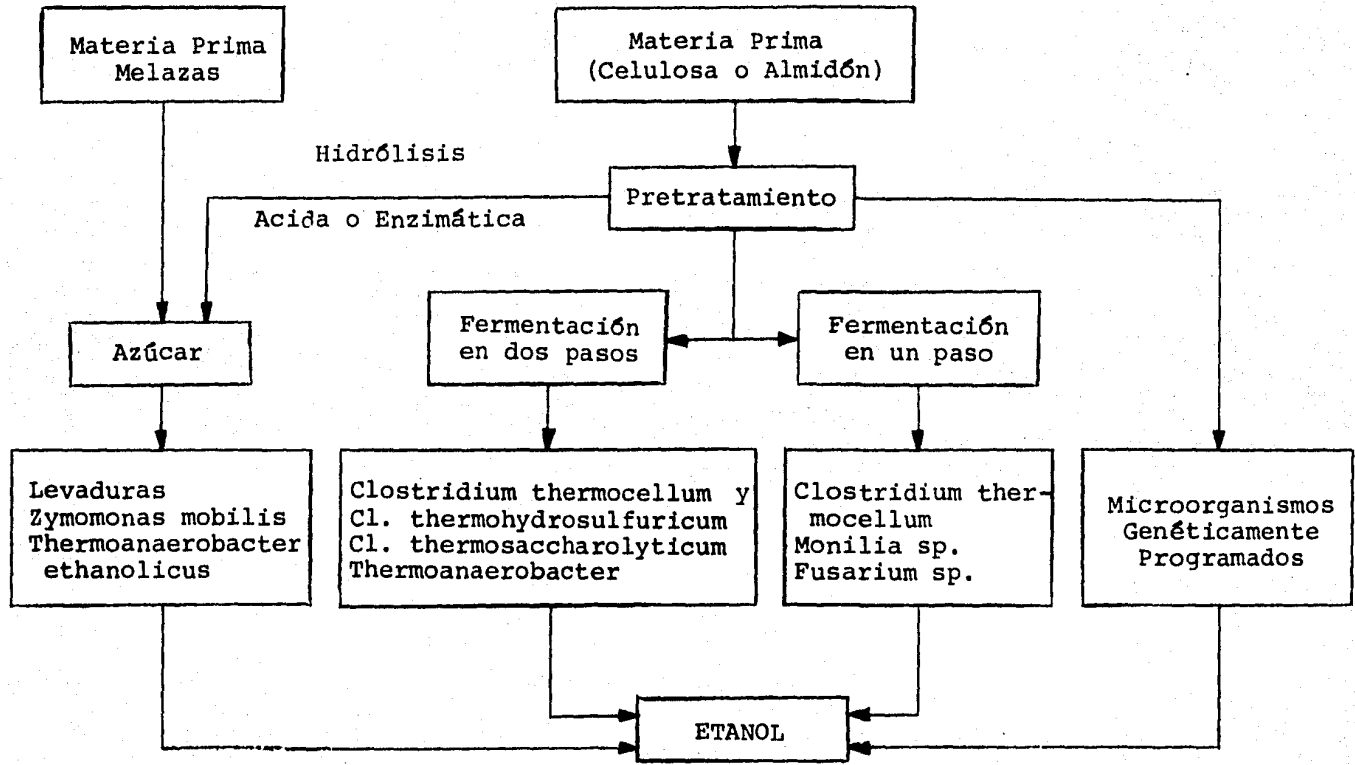


Figura 2.5 Proceso Biológico de Producción de Etanol.

Fuente: Ver referencia 12.

A continuación se describen las diferentes alternativas de producción de etanol en forma muy concisa. Estas vías de degradación son muy difíciles de comparar ya que existen muchas diferencias en las condiciones de saccharificación, en el tipo y concentración de sustrato y microorganismos empleados en cada una.

2.4.1 Hidrólisis de la Celulosa y Fermentación Alcohólica.

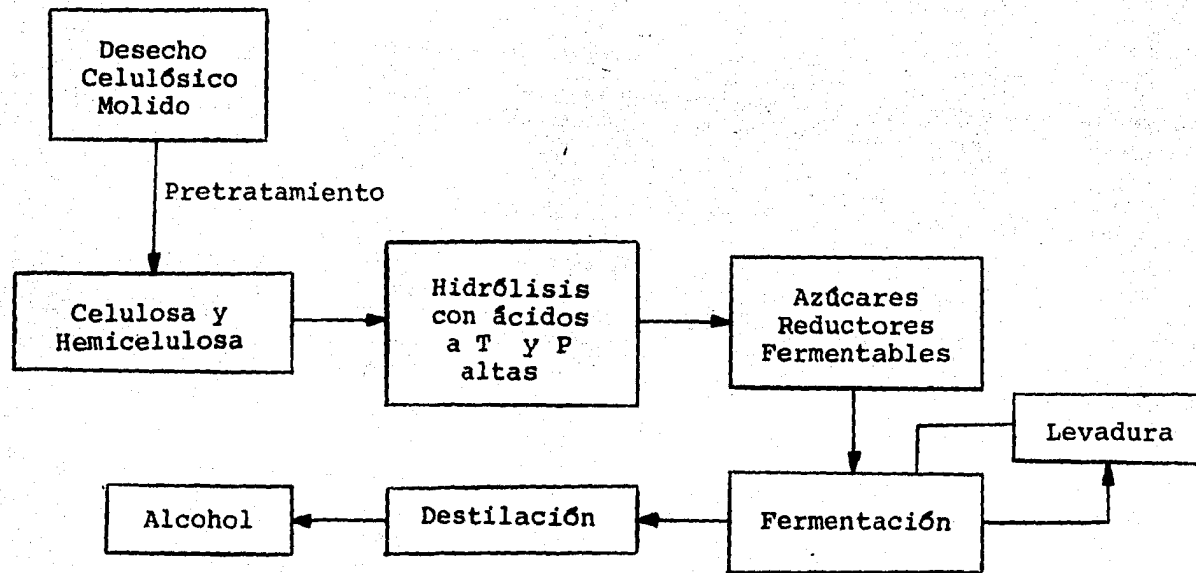
Las rutas de hidrólisis de los residuos celulósicos son varias, pero considerando el catalizador que utilizan existen dos vías: hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

Hidrólisis Ácida.

La hidrólisis ácida consiste en sacarificar un material celulósico a altas presiones y temperaturas en un medio acuoso, utilizando diferentes concentraciones de ácido. El producto final de esta hidrólisis (azúcares fermentables) se emplea para producir proteína unicelular, butanol, etanol y otros productos de fermentación de interés industrial.

Desde principios de siglo ha sido estudiado este procedimiento por varios países como Estados Unidos y Rusia, en los cuales se emplea actualmente con el objeto de obtener alcohol etílico.²⁹ En la Fig. 2.6 se muestran los pasos generales del método de conversión química de la celulosa a azúcares y la transformación de éstos a etanol por medio de la fermentación.

La madera, es la materia prima que ha sido más empleada para obtener alcohol mediante esta vía, existiendo diferentes procesos desarrollados por muchos investiga-



T = Temperatura P = Presión

Figura 2.6 Conversión Química de la Celulosa en la Producción de Etanol.

Fuente: Ver referencia 29.

dores que aseguran buenos rendimientos tanto de azúcares como de etanol.²⁹

En general la hidrólisis ácida de la celulosa ha sido una buena tentativa de producción de alcohol, pero los altos costos así como los problemas ambientales que ocasiona, hacen de ésta un proceso no económico.^{29,37}

Hidrólisis Enzimática.

Esta alternativa consiste en la producción y purificación de las enzimas celulasas y su aplicación al residuo celulósico, para posteriormente obtener etanol a partir de los azúcares reductores que se generen de la hidrólisis.

El estudio de este sistema requiere separar en 2 fases la hidrólisis, primero en producir y purificar la enzima y después su utilización como agente sacarificador. La producción de celulasa se ha desenvuelto alrededor del hongo Trichoderma viride, en menor escala en M. verrucaria y otras especies como Aspergillus y en mezclas de ellos.²⁸

La sacarificación de la celulosa mediante este método presenta algunos problemas técnicos y económicos, en la fase de purificación de la enzima, y es por ello que en muchas ocasiones, se utiliza el caldo de fermentación directamente en el desperdicio celulósico.

En la Fig. 2.7 se resumen las condiciones de operación para la hidrólisis enzimática, estableciendo un sistema de recirculación de la enzima y celulosa no hidrolizada, para obtener los azúcares que por fermentación mediante Saccharomyces cerevisiae, son transformados en etanol.²⁹ Se han realizado varios estudios económicos para evaluar la potencialidad económica de este proceso, presentándose venta-

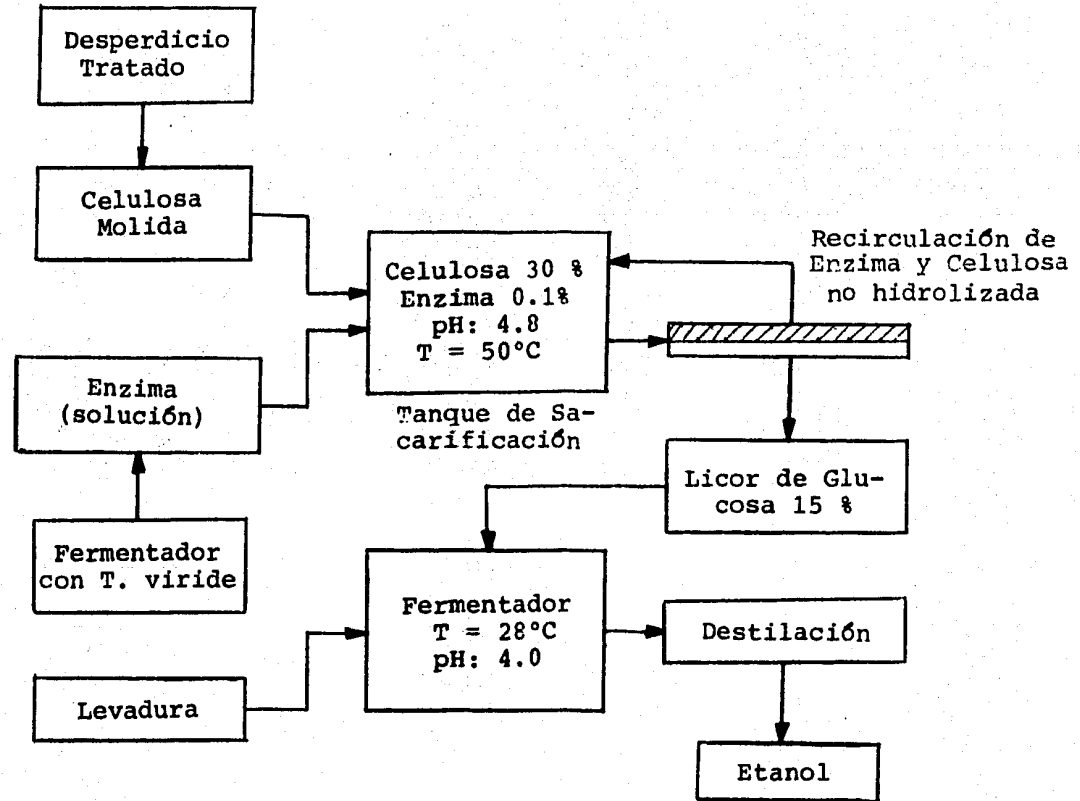


Figura 2.7 Producción de Etanol en un Proceso en Dos Fases.

Fuente: Ver referencia 29.

jas tecnológicas y de operación, utilizando generalmente el complejo enzimático de Trichoderma viride y la acción de la levadura Saccharomyces cerevisiae en procesos continuos o procesos en lote en los que usan el bagazo de caña de azúcar como materia prima.^{16,47}

2.4.2 Fermentación Directa.

Otra alternativa de uso de los desperdicios celulósicos, es la de fermentarlos con un microorganismo que tenga actividad celulolítica y fermentativa para obtener etanol; o con dos que por separado, establezcan una relación de transformación secuencial.

Proceso en Dos Fases.

Este procedimiento es muy similar al anterior ya que se obtienen azúcares y etanol subsecuentemente, mediante microorganismos celulolíticos y productores de etanol. En este proceso han empleado a Trichoderma viride y Aspergillus, o cultivos mixtos de ellos como cepas productoras de azúcares y a Zymomonas y levaduras como S. cerevisiae, como microorganismos capaces de utilizar los azúcares para generar etanol.¹⁴

Proceso en Una Fase.

En este proceso, un único microorganismo degrada el desperdicio celulósico tratado y transforma el azúcar resultante en etanol. En la Fig. 2.8 se mencionan algunos microorganismos que poseen esta propiedad, pero es el género Clostridium el que tiene mayor capacidad de transformar celulosa en etanol.

El método de obtención es muy simple (ver Fig. 2.8) y las condiciones de operación y tecnológicas hacen de esta alternativa la opción más competitiva, económica-

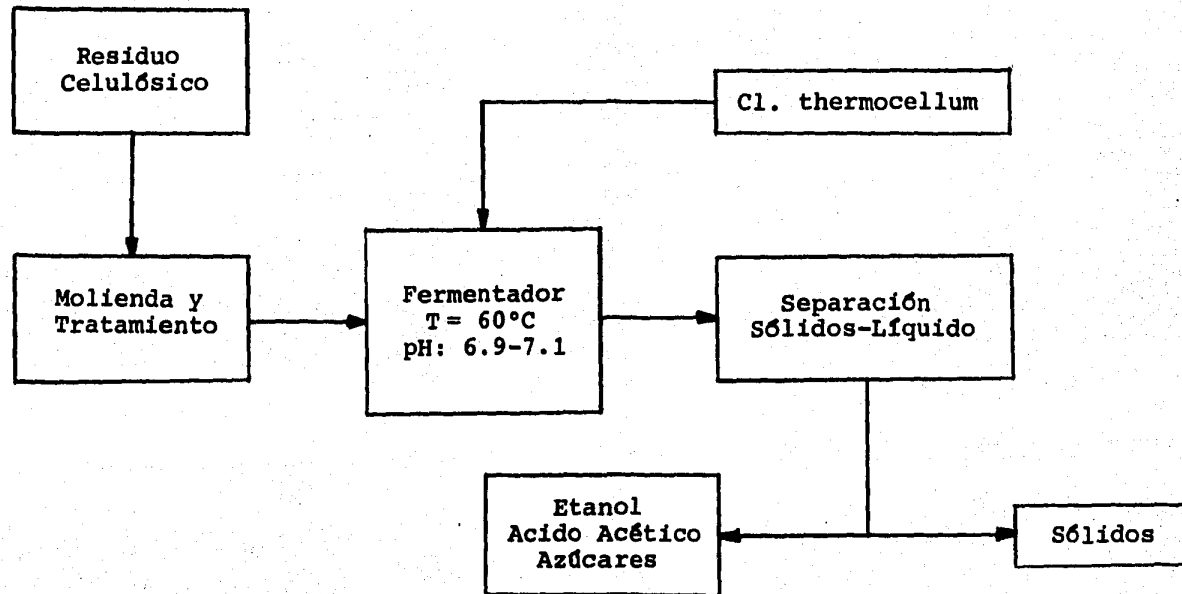


Figura 2.8 Producción de Etanol en el Proceso de Una sola Fase.

Fuente: Ver referencia 7.

mente hablando en comparación a las anteriores.²⁹

Clostridium thermocellum degrada la celulosa y hemicelulosa en etanol; pero su incapacidad de metabolizar pentosas ocasiona su complementación con otro microorganismo como Cl. thermosaccharolyticum, en donde éste ayuda durante la fermentación degradando las pentosas favoreciendo así mayores rendimientos de etanol, disminuyendo los correspondientes a otros productos secundarios que se generan (ácido acético).^{7,12} Otros estudios reportan combinaciones similares de acción, al utilizar al actinomiceto Thermoactinomyces con Cl. thermocellum, Cl. thermosaccharolyticum con Bacillus macerans, Fusarium oxysporum con S. cerevisiae y otros, obteniendo altos rendimientos de etanol.

2.4.3 Programación Genética.

Una de las principales limitaciones con que se topa la producción de etanol por fermentación es la capacidad de los microorganismos de tolerar el disolvente. La última opción sería la de programar genéticamente por diversas técnicas de mutación, levaduras o bacterias (como Zymomonas) que posean una alta actividad fermentativa para producir etanol y que por medio de la recombinación genética sean capaces de convertir la celulosa en etanol, en una sola operación, que la tolerancia y efectos inhibitorios propios del etanol y los azúcares estén minimizados y que los rendimientos del alcohol sean tales, que reduzcan el costo de operación y hagan que este proceso sea económicamente viable.^{12,14}

En cuanto al costo que tendría el etanol producido por fermentación de residuos celulósicos, sería competi-

tivo de acuerdo a los rendimientos de etanol obtenido, y a la posibilidad de aprovechar en forma integral el residuo, y todos los subproductos obtenidos; ya sea empleándolos como fertilizantes, como alimento en forma de forraje o como fuente para la producción de proteína unicelular.

Actualmente en Brasil están ya establecidas varias plantas para la producción de etanol mediante esta vía al igual que por vía de sustancias sacaroideas y amiláceas.²⁴

En este país se le ha dado auge a esto, ya que existe todo un programa basado en aumentar la producción de etanol como fuente energética y uno de sus fines es el de sustituir la gasolina y el diesel, completamente por etanol. Actualmente en Rusia, Estados Unidos y otros países ya se usa la mezcla de gasolina-etanol y es por eso que se ha despertado el interés en esos países de aprovechar los recursos celulósicos para este fin.²⁴

3. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

3.1 MATERIAL UTILIZADO.

Se utilizó material y cristalería de laboratorio. Parte del equipo utilizado fué el siguiente:

- 1) Agitadora con temperatura y agitación controlables.
Marca: New Brunswick Scientific.
Modelo G24
- 2) Cromatógrafo de Gases.
Marca: Wilkens.
Modelo Aerograph 600. Columna Chromosorb 103 (6 pies de largo por 1/8 pulg. de diámetro de acero inoxidable).
- 3) Molino tipo intermedio con motor de 1/4 H.P.
Marca: Arthur C. Thomas.
Modelo Willey.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

Las cepas utilizadas en este trabajo: Trichoderma viride y Trichoderma sp., fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., y se trabajaron por separado durante todo el proceso.

La levadura con la que se trabajó fué Saccharomyces cerevisiae variedad ellipsoideus, esta cepa fué suministrada por el Departamento de Cepas de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

3.3

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

1) Medio de Extracto de Malta Agar. ⁵⁰	
Extracto de malta	25.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

2) Medio de Inducción. ³⁵	
Fosfato monobásico de potasio	2.0 g
Sulfato de amonio	1.4 g
Urea	0.3 g
Sulfato de magnesio	0.3 g
Cloruro de calcio	0.3 g
Carboximetilcelulosa	10.0 g
Solución de metales traza	1.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml

Solución de metales traza: Contiene 500 mg de sulfato de hierro, 156 mg de sulfato de magnesio, 167 mg de cloruro de zinc, 1 ml de ácido clorhídrico al 19 %, se afora a 100 ml con agua destilada.

3) Medio de V-8 Agar. ⁵⁰	
Jugo V-8	180.0 ml
Carbonato de calcio	2.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

4) Medio de Martin (Rosa de Bengala Estrepto-
micina).

Rosa de bengala	0.05 g
Peptona	5.00 g
Glucosa	10.00 g
Fosfato de potasio	1.00 g
Sulfato de magnesio	0.50 g
Agar	20.00 g
Estreptomycin	30.00 μ g/ml
Agua destilada	1000.00 ml

5) Medio para Levaduras.

Glucosa	10.00 g
Extracto de levadura	1.00 g
Sulfato de amonio	0.50 g
Fosfato monobásico de potasio	0.25 g
Cloruro de sodio	0.10 g
Solución de metales traza	1.00 ml
Agar	2.00 g
Agua destilada	100.00 ml

6) Medio de Sabouraud.

Peptona	10.00 g
Glucosa	20.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

4. METODOS EXPERIMENTALES

4.1 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.

La elección del esquema general de trabajo en esta investigación, se hizo en base a las condiciones de operación, tipo de microorganismos y eficiencia de los procesos de obtención descritos en la sección 2.4. El método de obtención de etanol en dos pasos seleccionado, consiste en dos fermentaciones secuenciales, una celulolítica y otra alcohólica, en las cuales se obtienen altos rendimientos de sus principales productos, azúcar y etanol respectivamente.

En la Fig. 4.1 se ilustran las fases que constituyeron la parte experimental de este estudio (Degradación Celulolítica y Fermentación Alcohólica), señalando las principales etapas que las integran. Dichas fases serán analizadas a continuación, describiendo en forma muy concisa las acciones y actividades que se desarrollaron en cada una de las etapas integrantes.

4.1.1 Fase 1. Degradación Celulolítica.

Esta fase consistió en preparar al material celulósico convenientemente para posteriormente ser utilizado en la obtención de azúcares mediante un proceso biológico de degradación.

En la Fig. 4.2 se muestra la secuencia de las etapas que constituyen esta fase y que a continuación se describen.

1) Sustratos. - Como ya se mencionó en la sección 2.3.4, en México existe una gran cantidad de desechos agrícolas que pueden emplearse como fuente de celulosa. En base a la disponibilidad y al uso que se les dá a los residuos celulósicos se eligieron tres y son:

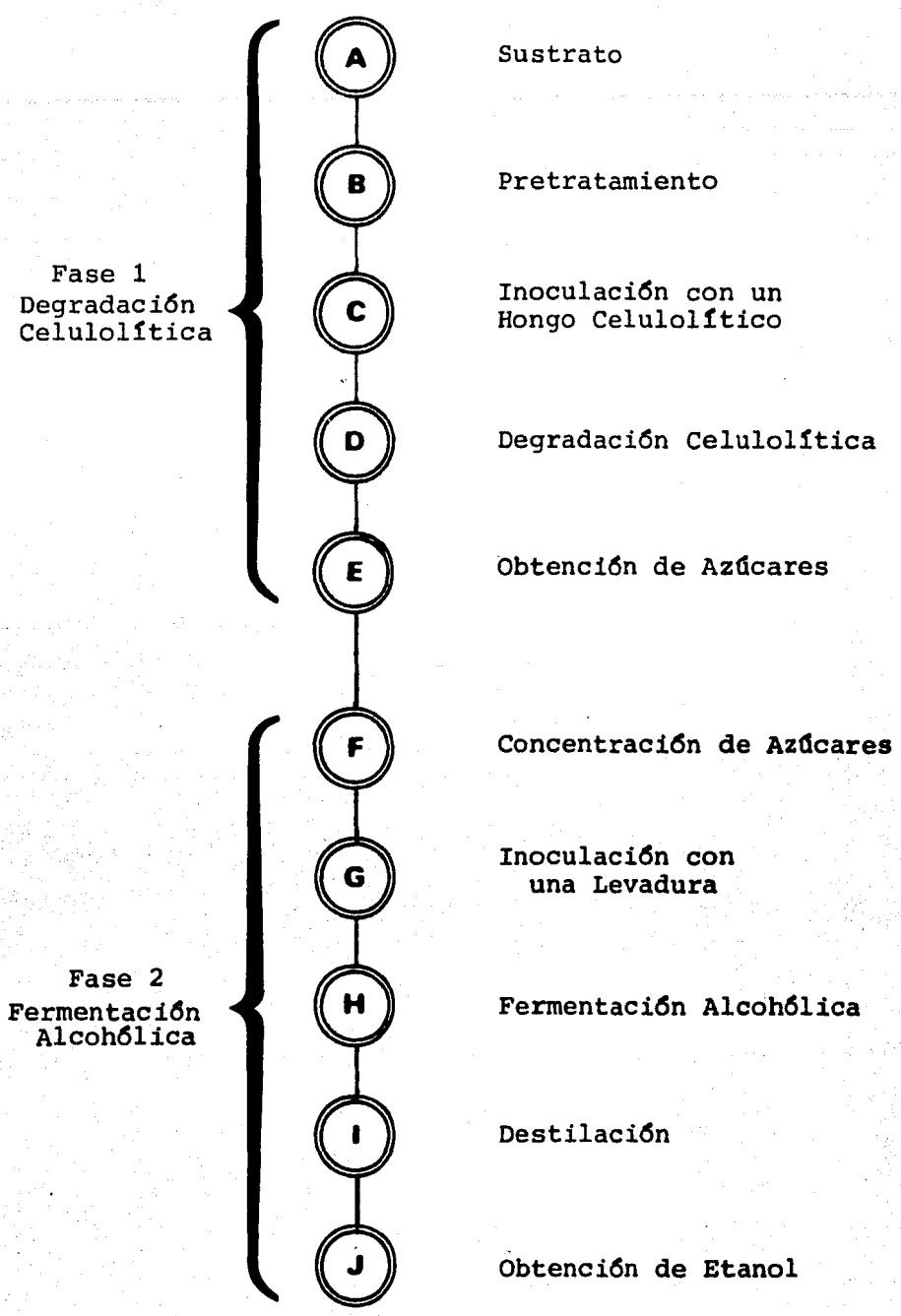


Figura 4.1 Esquema General de Trabajo.

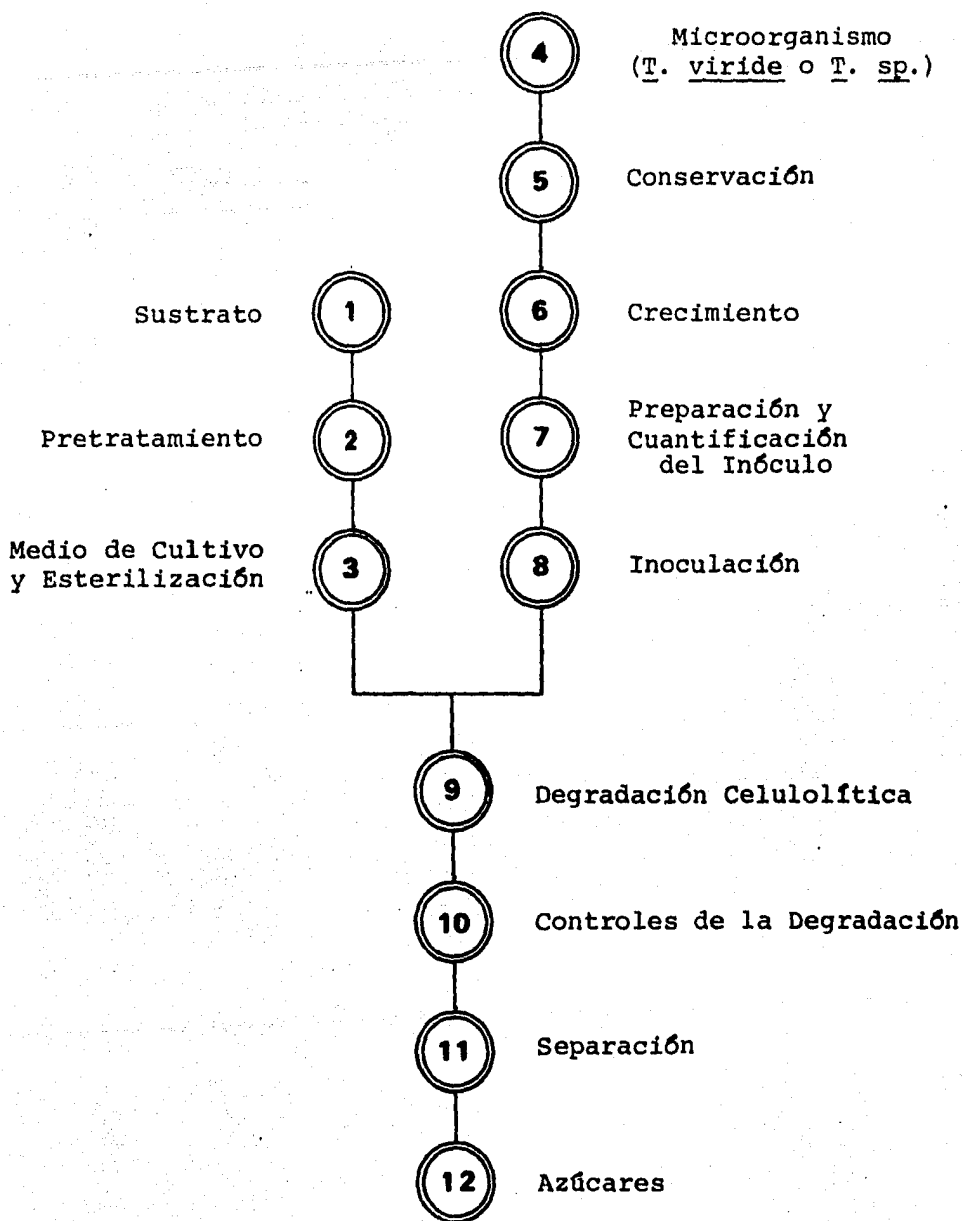


Figura 4.2 Fase 1. Degradación Celulolítica

- a) Aserrín.- Proporcionado por la carpintería de la Facultad de Química U.N.A.M.
- b) Paja de trigo.- Adquirida en el mercado de Jamaica de la Cd. de México.
- c) Rastrojo de maíz.- Recolectado en San Lorenzo Tezonco y Xochimilco en el Distrito Federal.

Para poder utilizar estos residuos se molieron en un molino Willey con una malla del No. 10.

2) Pretratamiento.- Como se mencionó en la parte de generalidades, la deslignificación de los residuos celulósicos mediante tratamientos alcalinos aumentan la susceptibilidad de la celulosa al ataque microbiano sin que éste ocasione efectos inhibitorios. En función de este conocimiento los pretratamientos probados en este estudio fueron:

- a) Pretratamiento químico.- El residuo se trató con hidróxido de sodio al 4 % p/v, durante 24 horas a temperatura ambiente, entre 20 y 25°C de temperatura, con una relación de 1 g de residuo por 10 ml de álcali.
- b) Pretratamiento físico y químico.- Este método análogo al anterior, consistió en procesar al residuo celulósico con hidróxido de sodio al 1 % p/v, en autoclave durante 1 hora a temperatura de 121°C y presión de 1.5 Kg/cm². La relación fué de 1 g de residuo por 10 ml de álcali.

Dadas las características del aserrín y los datos reportados por Neri,³² se efectuaron dos diferentes tratamientos a este residuo celulósico, denominando:

Aserrín 1 al tratado químicamente con hidróxido de sodio al 4 % o al tratado física y químicamente con hidróxido de sodio al 1 % p/v.

Aserrín 2 al tratado químicamente con hidróxido de sodio al 0.5 % p/v o al tratado física y químicamente con hidróxido de sodio al 0.5 % p/v.

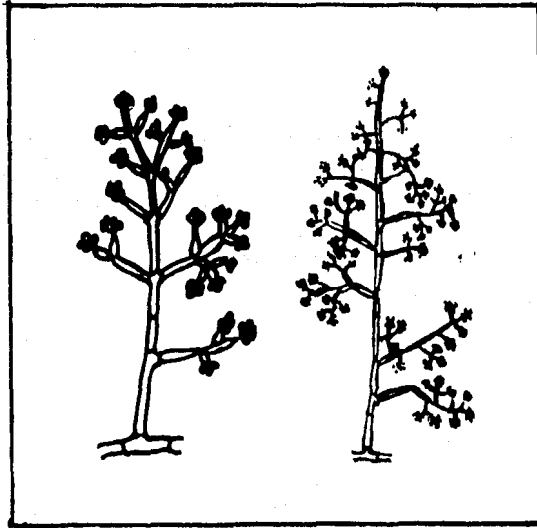
Después del tratamiento con álcali se lava el sustrato con abundante agua hasta neutralizarlo, posteriormente se secó a 60°C y se guardó en un recipiente cerrado.

3) Medio de Cultivo.- Se empleó el medio de inducción -Medio No. 2- en donde se substituyó la carboximetilcelulosa por los sustratos, utilizándose éstos por separado. Para encontrar la concentración óptima de los sustratos se compararon tres diferentes concentraciones: 0.2, 0.5 y 1 % p/v para cada uno de los sustratos. Cabe señalar que para cada sustrato se usó un testigo que contenía 0.5% de él mismo en el medio.

El medio ya preparado fué ajustado a pH: 4.5 y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

4) Microorganismo.- La selección del microorganismo se efectuó basándose en las características del complejo enzimático que posee. Se ha demostrado que el género Trichoderma segrega un complejo de celulasa abundante en sus tres componentes, además de ser estable y resistente a compuestos inhibidores y tóxicos, por lo que es apropiado para la sacarificación de los materiales celulósicos.^{28,40}

Para la identificación y control de cada una de las cepas, Trichoderma viride y Trichoderma sp., se reali-



zaron varios microcultivos.

Trichoderma viride se caracteriza por ser un hongo imperfecto que se encuentra comúnmente en el suelo y la madera. Sus colonias se desarrollan con rapidez formando una capa micelial delgada con manchas irregulares de color verde grisáceo, debido a la masa de sus esporas maduras. Las esporas, por lo general, se producen mejor en los extremos de la superficie de los cultivos inclinados. En algunos cultivos el reverso del medio es amarillo brillante o parduzco.^{3,44,50}

El exámen microscópico revela que es un hongo con micelio y conidióforo septados. Los conidióforos se ramifican irregularmente siendo las ramas finales verdaderas filídes, de las cuales las conidias se van separando sucesivamente. Las cabezas esporóforas frágiles y esféricas contienen de 10 a 20 conidias ovaes que miden de 2.5 a 3 micras de diámetro.

5) Conservación del Microorganismo.- Las cepas de Trichoderma fueron sembradas en medio de Sabouraud -Medio No. 6- para su conservación. Se guardaron en refrigeración, resemebrándose cada 2 meses.

6) Crecimiento del Microorganismo.- Se sembró la cepa de Trichoderma en varios tubos con medio de V-8 Agar -Medio No. 3-, ya que este medio es muy apropiado para favorecer el crecimiento y la esporulación del hongo. Los tubos ya sembrados se incubaron a 30°C por 3 días para T. viride y por 6 días para T. sp.

7) Preparación y Cuantificación del Inóculo.- Ya esporulado el hongo, se elaboró una suspensión de esporas que posteriormente se cuantificó por el método de la Cuenta Viable. La suspensión de esporas contenía 1.52×10^8 esporas/ml.

8) Inoculación.- Los matraces con 150 ml de medio de cultivo (obtenido en el paso No. 3) se inocularon con 1 ml de la suspensión de esporas de concentración conocida, exceptuando el testigo de cada sustrato.

9) Degradación Celulolítica.- Todos los matraces fueron colocados en incubación a 30°C y con agitación a 125 rpm, simultáneamente. Esta etapa es importante porque se lleva a cabo la sacarificación del material celulósico, por lo cual durante el proceso se implementaron varios controles que nos indicaban cualquier anomalía que se presentara, tanto en el transcurso como en el final de la degradación. Los matraces se retiraron de incubación cuando la concentración de azúcares fué la máxima ya que ésto se utilizó como indicador del final de la degradación celulolítica.

10) Controles de la Degradación. - Durante el transcurso de la sacarificación se realizaron los siguientes controles:

- a) Temperatura: Se mantuvo constante a 30°C.
- b) Agitación: Fué de 125 rpm durante todo el proceso.
- c) pH: Se controló entre el valor de 4.0 - 4.5
- d) Azúcares Reductores Totales: Se cuantificaron por el método de Luff-Schoorl⁴ cada 24 horas, lo cual nos indicó el grado de aumento o disminución de los azúcares en el medio durante el proceso de sacarificación.
- e) Actividad Celulolítica: Permitió determinar la eficiencia del complejo de celulasa del microorganismo. Se compone de dos pruebas: Actividad Celulolítica en Papel Filtro y Actividad Celulolítica en Carboximetilcelulosa.²⁶
- f) Control Microbiológico: Consiste en buscar posibles microorganismos contaminantes en el medio de cultivo.

11) Separación. - Al obtener la máxima concentración de azúcares, se sacaron los matraces de incubación y se esterilizaron en autoclave. Posteriormente, se filtró el medio para separar el sustrato sólido residual y el microorganismo, de la solución azucarada.

12) Azúcares. - La solución azucarada fué recolectada en un matraz y en caso de no ser procesada ese mismo día, se esteriliza en autoclave y guarda en refrigeración.

Al evaluar la susceptibilidad de los sustratos

se observó que los aserrines no eran utilizados por los microorganismos, obteniéndose bajas concentraciones de azúcares, por lo que se decidió seguir trabajando solamente con los sustratos de maíz y trigo ya que en éstos se obtienen muy buenos rendimientos de azúcares.

4.1.2 Fase 2. Fermentación Alcohólica.

Consistió en la utilización de los azúcares obtenidos en la primera fase, para la producción de etanol. En la Fig. 4.3 se muestra la secuencia de las diferentes etapas que la integran y que a continuación se describen.

13) Concentración e Identificación de Azúcares.- La concentración de los azúcares se efectuó por evaporación lenta del agua de la solución azucarada, evitando así su caramelización.

Este concentrado, para su posterior utilización, debe contener por lo menos el 10 % p/v de azúcares en solución para utilizarse como sustrato en la fermentación alcohólica.

Los azúcares fueron identificados por Cromatografía en Papel usando como eluyente: Isopropanol - Acido Acético - Agua (3:1:1); y como revelador 1.66 g de Acido Oxálico y 0.91 ml de Anilina disueltos en 48 ml de Butanol.

14) Mosto.- El mosto fué elaborado utilizando una concentración de 10 % p/v de azúcares totales como -- fuente de carbono, complementándose con los demás constituyentes, excepto el agar del medio para levaduras -Medio No. 5- se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C.

La presencia de ciertas vitaminas como la biotina, vuelven más tolerantes a las levaduras a altas concen-

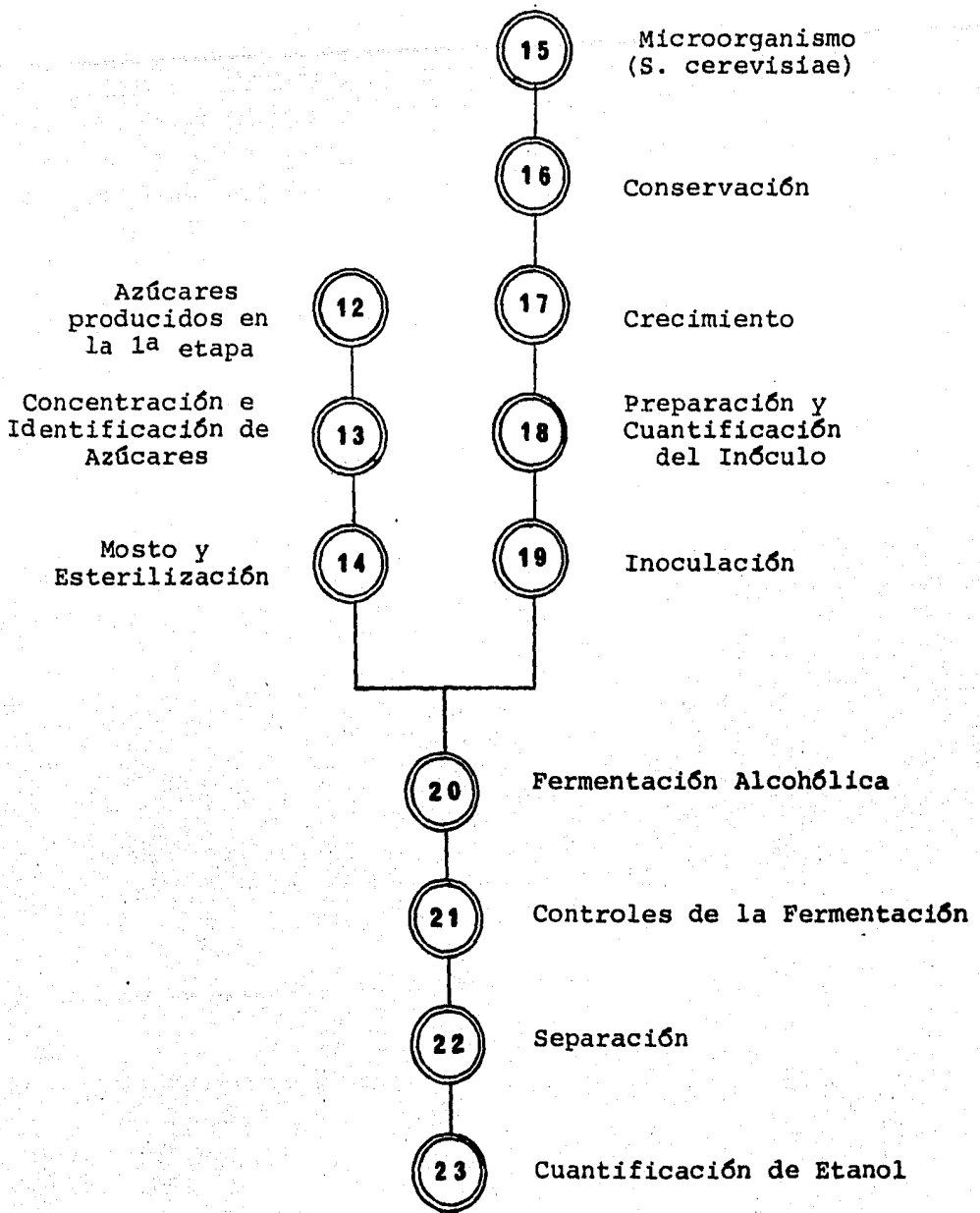


Figura 4.3 Fase 2. Fermentación Alcohólica

traciones de etanol, incrementándose así su productividad. Por esta razón, el mosto ya estéril fué complementado con una mezcla de vitaminas (12.5 μ g de biotina, 250 μ g de piridoxina, 1.87 mg de inositol, 2.5 mg de pantotenato de calcio, 5 mg de tiamina y 25 mg de peptona); adicionando - 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo.¹⁶

15) Microorganismo. - Los microorganismos más - empleados en procesos industriales para la obtención de etanol son levaduras del género Saccharomyces, destacándose Saccharomyces cerevisiae por fermentar varios azúcares como: glucosa, galactosa, fructosa, manosa y sacarosa.

La cepa elegida fué Saccharomyces cerevisiae variedad ellipsoideus,³⁶ por tener la capacidad de tolerar y producir altas concentraciones de etanol (20 %). Se identificó de acuerdo a sus características de crecimiento en diferentes medios y por sus propiedades bioquímicas como una levadura esporógena que no licua la gelatina; los azúcares que fermenta son: manosa, sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa y rafinosa 1/3.

Cuando crece en mosto de cerveza forma una película ténue y un anillo delgado; en cultivos de 45 días a - 15°C, la colonia gigante adquiere sobre gelatina-mosto una forma cónica baja encontrándose surcada por finas rayas - radiales y gruesos anillos concéntricos.

En cultivos jóvenes predominan las células alargadas elípticas, cuyo tamaño varía de 3-7 micras por 5-14 micras. Forma esporas con facilidad a 25°C, y la asociación de cuatro de ellas constituyen una asca que se ven - con claridad y son frecuentemente refringentes.¹⁵

16) Conservación del Microorganismo. - La cepa

de Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus fué sembrada para su conservación en medio de Sabouraud -Medio No. 6-; se guardó en refrigeración, resemebrándose cada tres meses.¹⁵

17) Crecimiento del Microorganismo.- La cepa de S. cerevisiae fué sembrada en varios tubos con medio para levaduras -Medio No. 5-, los que a continuación se incubaron a 28°C durante dos días.

18) Preparación y Cuantificación del Inóculo.- A los tubos con la levadura ya desarrollada, se les agregó solución salina isotónica estéril con lo cual quedó preparado el inóculo que posteriormente, se cuantificó por el método de la Cuenta Viable. La suspensión de células contenía 9.7×10^7 células/ml.

19) Inoculación.- Los matraces con el mosto ya esterilizado (paso No. 14) fueron inoculados, en condiciones de esterilidad, con 1 ml de la suspensión de levadura de concentración conocida, los correspondientes a los testigos no se inocularon.

20) Fermentación Alcohólica.- Los matraces fueron colocados en incubación a 28°C en condiciones estáticas para producir anaerobiosis e iniciar la fermentación alcohólica. Cuando la concentración de azúcares permaneció constante o cerca de cero, los matraces se retiraron de la incubación ya que ésto indicó que la fermentación había llegado a su punto final.

21) Controles de la Fermentación Alcohólica.- Con el fin de visualizar las condiciones que permiten buenos rendimientos de etanol, durante la fermentación se llevó el control de varios parámetros:

- a) Temperatura: Permaneció constante a 28°C.
 - b) pH: Se mantuvo entre 4.8 - 5.0
 - c) Agitación: Para favorecer las condiciones de anaerobiosis se mantuvo estático el proceso.
 - d) Azúcares Reductores Totales: Se determinaron cada 24 horas por el método de Luff-Schoorl.⁴
 - e) Cuantificación de Etanol: Se determinó por Cromatografía de Gases cada 24 horas.
 - f) Control Microbiológico: La determinación se llevó a cabo cada 24 horas, mediante la observación microscópica del mosto en busca de posibles microorganismos contaminantes.
- 22) Separación. - Esta etapa consistió en dos partes:

tes:

- a) Separación del microorganismo del medio mediante la filtración de éste a través de un filtro de poro grueso.
- b) Separación del etanol del filtrado por medio de una destilación simple a temperatura controlada (Ver Técnica No. 3).

Posteriormente el destilado obtenido (100 ml) fué guardado en refrigeración, en un frasco previamente etiquetado, para su posterior cuantificación.

23) Cuantificación de Etanol. - Se determinó la concentración de etanol mediante Cromatografía de Gases, de cada uno de los ensayos verificados.

Antes de efectuar la Fermentación Alcohólica de los azúcares obtenidos del hidrolizado de maíz y trigo, se

probó la efectividad de la levadura al variar la concentración de glucosa (10, 13 y 15 % p/v) del medio para levaduras para obtener la concentración máxima de etanol, llevando los mismos controles descritos en el punto 21 exceptuando la determinación de etanol, que se cuantificó solamente al final de la fermentación (al determinarse un mínimo de azúcares); ya que no se contó con el Cromatógrafo de Gases las veces necesarias.

4.2 TECNICAS.

Para la realización de la parte descrita en la sección anterior, se emplearon una serie de técnicas con el objeto de poder evaluar las etapas críticas del proceso biológico de investigación.

A continuación se describen detalladamente en que consistieron dichas técnicas cuantitativas mencionándolas en su orden cronológico al que se emplearon.

- 1) Determinación de Azúcares Reductores Totales.⁴
(Método Modificado de Luff-Schoorl).

Fundamento:

Este método indirecto de valoración, se basa en la propiedad de los azúcares de reducir el reactivo de cobre alcalino y valorar posteriormente el cobre reducido por yodometría. El yodo liberado es inversamente proporcional al cobre reducido y a la cantidad de azúcares reductores totales presentes en la muestra.

Reactivos:

- a) Acido clorhídrico al 25 % v/v.
- b) Yoduro de potasio.

- c) Indicador de almidón al 2 % p/v.
- d) Reactivo de cobre: 388 g de carbonato de sodio cristalizado ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) son disueltos en 300 o 400 ml de agua tibia. A continuación se preparan dos soluciones, una compuesta con 50 g de ácido cítrico en 50 ml de agua, y la otra con 25 g de sulfato de cobre cristalizado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) libre de fierro en cerca de 100 ml de agua. Estas soluciones se agregan a la correspondiente de carbonato de sodio en forma individual; la mezcla obtenida se enfría aforándose a 1 litro para posteriormente ser sometida a una decantación y separar la solución clara en botellas ámbar, la cual puede guardarse indefinidamente pues no presenta el fenómeno de autorreducción.

Procedimiento:

En un matraz erlenmeyer se colocan 10 ml provenientes de la solución de la muestra problema y 10 ml del reactivo de cobre; enseguida, mediante la aplicación de flama directa, la solución se hierve durante 2 minutos sobre una tela con asbesto, el matraz se conecta a un condensador de reflujo para someter la solución a dicho proceso durante 10 minutos; a continuación se enfría con agua corriente para posteriormente agregar 3 g de yoduro de potasio y 10 ml de ácido clorhídrico al 25 % v/v, agitando hasta que cese la producción de gas que se forma en este paso.

El último paso de esta técnica consiste en titular el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0.1 N usando 1.0 ml del indicador de almidón; en el punto estequiométrico o punto final el color azul desaparece, formándose un precipitado crema. El procedimiento anterior se utilizó para cada muestra investigada corrien-

dose un testigo del reactivo de color, al igual que un testigo de cada sustrato.

Cálculos:

La cantidad del azúcar reductor total presente en la muestra se obtiene por las diferencias entre los volúmenes de valoración de las titulaciones de los testigos y problemas, la cual equivale al cobre reducido. En la literatura existen tablas que reportan estos valores en función a los parámetros que se manejaron en este procedimiento o en su defecto se realiza una curva patrón para facilitar la interpolación de los datos obtenidos.

2) Determinación de la Actividad Celulolítica.²⁶

Fundamento:

Esta determinación de actividad se basa en la degradación de un sustrato con una solución de enzima con respecto al tiempo, en condiciones favorables de temperatura y pH para que actúe.²⁶

Reactivos:

- a) Papel Whatman No. 1
- b) Regulador de Citratos pH: 4.8
- c) Carboximetilcelulosa al 1 % p/v.

Procedimiento:

a) Actividad en Papel Filtro.- En tubos de ensaye se coloca una tira de papel filtro Whatman No. 1 que pese 50 mg, 1 ml del regulador de citratos y 0.5 ml del filtrado provenientes de las muestras. A continuación los tubos se incuban a 50°C con una agitación de 125 rpm durante 1 hora, al cabo del cual se cuantifican los azúcares reductores totales por el método de Luff-Schoorl.

b) Actividad en Carboximetilcelulosa.- Esta técnica es aná-

loga a la anterior, variando únicamente el tipo de sustrato y las condiciones de operación, ya que este procedimiento utiliza 0.5 ml de carboximetilcelulosa al 1 % p/v en agua, realizándose la incubación a 50°C sin agitación durante 30 minutos, a partir de los cuales se procede a cuantificar los azúcares reductores totales por el método ya descrito.

3) Separación de Etanol.³⁴

En un matraz aforado de 100 ml se toma una muestra de experimentación del mismo volumen la cual se pasa a un matraz de fondo plano conectado a un equipo de destilación, compuesto de una trampa Kjeldahl y refrigerante. A continuación se destila la muestra en la cual se han agregado previamente dos porciones (20 ml) de agua destilada provenientes del lavado del matraz de medición el cual a su vez se emplea como recipiente para recibir el destilado cuyo volumen será de 100 ml aforándose con unas gotas de agua destilada. La destilación debe hacerse en un tiempo de 30 a 60 minutos a una velocidad uniforme, en un valor de temperatura de 78.3 a 90°C.

4) Cuantificación de Etanol.²⁵

La cuantificación de esta sustancia se realizó por Cromatografía de Gases usando el Cromatógrafo de Gases del Departamento de Cromatografía y Rayos X del Instituto de Química de la U.N.A.M. Las condiciones empleadas en este equipo se muestran a continuación:

Columna: Chromosorb 103 de acero inoxidable. (6 pies de largo por 1/8 de pulgada de diámetro).

Detector: Ionización de flama.

Temperatura de la Columna: 105°C.

Flujo de Nitrógeno: 30 ml/min.

Volúmen Inyectado: 2 μ l de muestra.

Velocidad de la Carta: 0.1 pulg/min.

Se usó como estándar interno isopropanol (2-iso-
propanol).

5. RESULTADOS

5.1 DEGRADACION CELULOLITICA.

5.1.1 Microorganismo.

Los hongos celulolíticos probados en esta investigación, presentaron características morfológicas en microcultivo que corresponden al género Trichoderma. La diferencia entre las dos cepas utilizadas, radica en el tamaño y color de sus esporas; Trichoderma viride presenta - pequeñas esporas arriñonadas de color verde, en cambio, la cepa de Trichoderma sp. posee esporas ovales de color café y un poco más grandes que las anteriores. Esta coloración trasciende en la apreciación macroscópica de sus colonias, siendo verde y de aspecto polvoso la de Trichoderma viride, negra y grumosa la de Trichoderma sp.

5.1.2 Elección de Sustrato, Tratamiento y Concentración Optima.

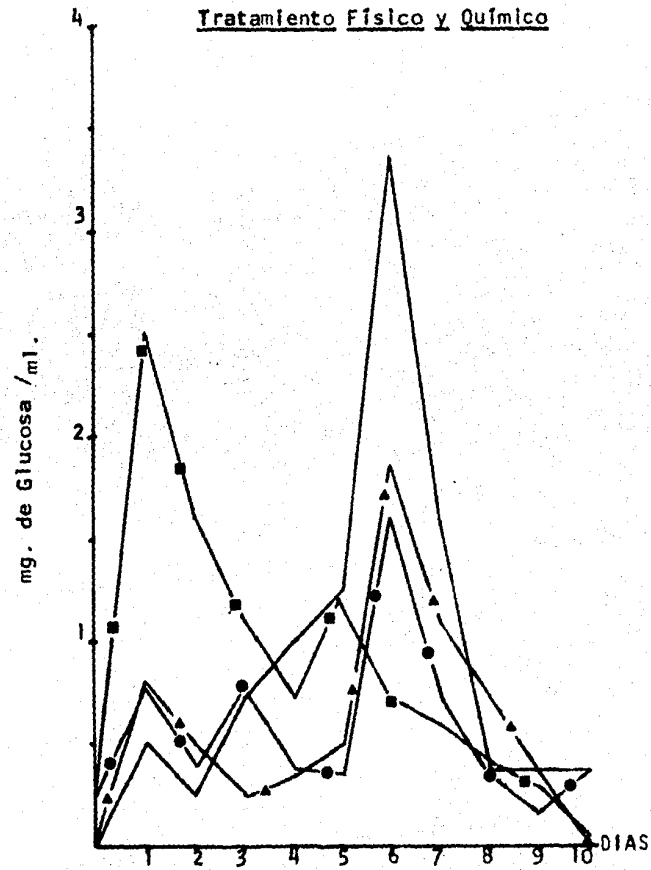
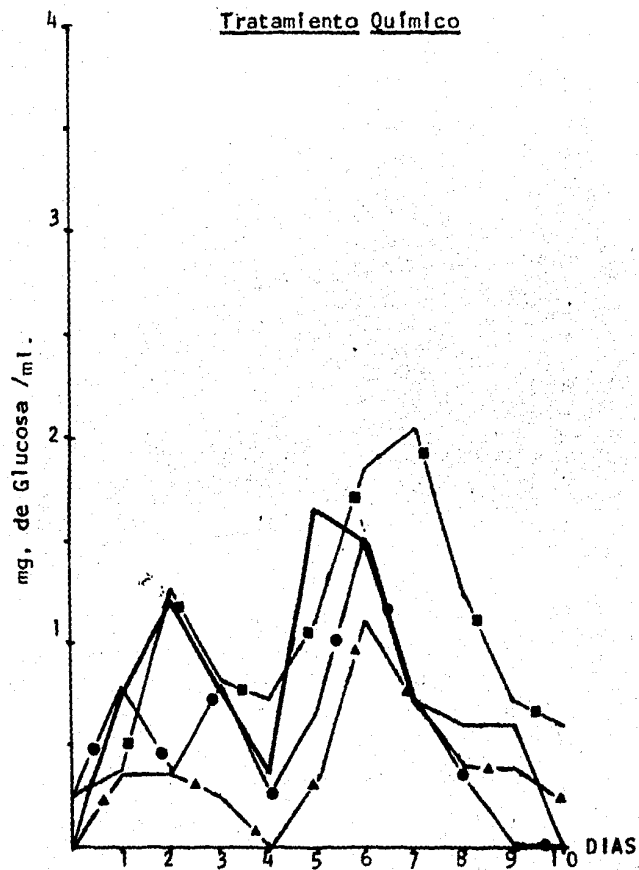
Por medio de la determinación de azúcares reductores totales se evaluaron los diferentes parámetros: sustrato, tratamiento y concentración óptima de sustrato; para las dos cepas de Trichoderma utilizadas. A continuación se presentan los resultados obtenidos agrupándolos de acuerdo a la concentración de sustrato, evaluando así los dos diferentes tratamientos para cada microorganismo; de esta manera las gráficas 5.1, 5.2, 5.3 muestran el comportamiento de T. sp. y las gráficas 5.4, 5.5, 5.6 el de Trichoderma viride.

(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.72	0.78	0.38	0.35
2	1.20	0.37	1.25	0.37
3	0.78	0.78	0.78	0.25
4	0.38	0.25	0.72	0.00
5	1.65	0.68	1.10	0.34
6	1.46	1.50	1.84	1.10
7	0.72	0.72	2.04	0.72
8	0.60	0.34	1.20	0.38
9	0.60	0.00	0.72	0.37
10	0.00	0.00	0.60	0.25

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.50	0.78	2.50	0.80
2	0.25	0.38	1.62	0.50
3	0.72	0.78	1.10	0.25
4	1.00	0.37	0.72	0.37
5	1.25	0.34	1.21	0.50
6	3.34	1.60	0.72	1.84
7	1.60	0.72	0.60	1.10
8	0.37	0.34	0.38	0.72
9	0.37	0.17	0.29	0.34
10	0.37	0.37	0.05	0.00

Glu = Glucosa

Cuadro 5.1 Comportamiento de Trichoderma sp. en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 0.2 % p/v.



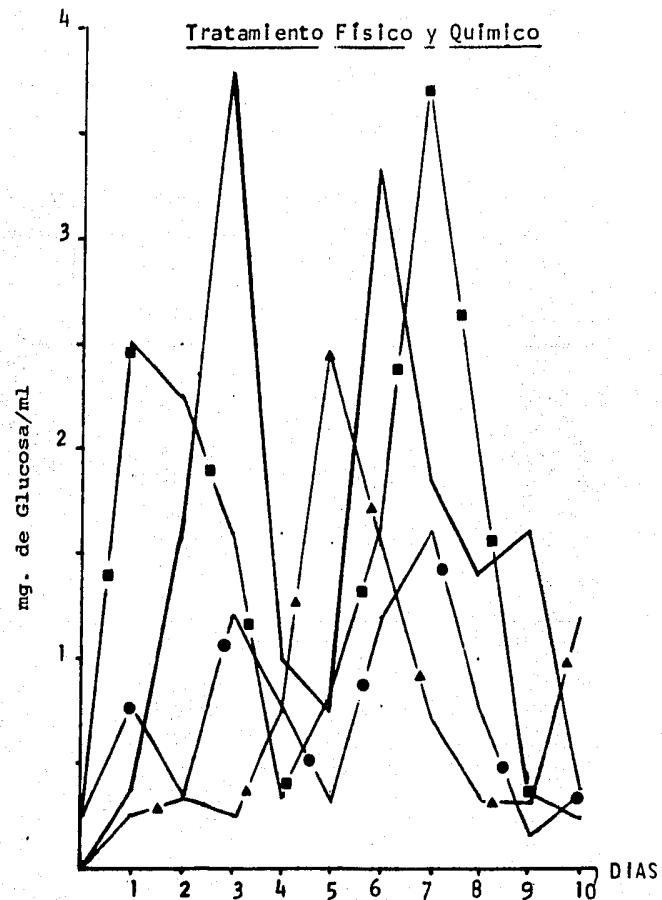
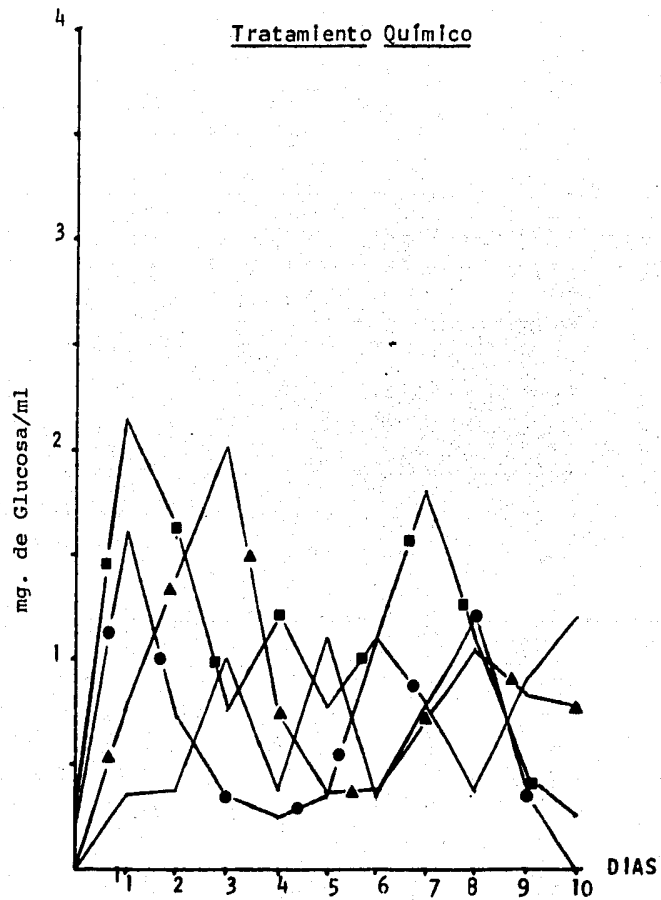
Grafica 5.1 Comportamiento de *Trichoderma* sp. en los sustratos al 0.2% con los dos tratamientos.
 Rastrojo de maíz —●—, Paja de trigo — —, Aserrín 1 —■—, Aserrín 2 —▲—

(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.34	1.60	2.12	0.78
2	0.37	0.72	1.63	1.60
3	1.00	0.34	0.78	2.00
4	0.37	0.25	1.20	0.72
5	1.10	0.72	0.78	0.34
6	0.34	1.10	1.10	0.34
7	0.78	0.78	1.80	0.72
8	0.37	1.20	1.10	1.10
9	0.90	0.34	0.37	0.85
10	1.20	0.00	0.25	0.78

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.38	0.78	2.50	0.25
2	1.60	0.37	2.25	0.37
3	3.75	1.20	1.60	0.25
4	1.00	0.78	0.34	0.78
5	0.72	0.34	0.78	2.46
6	3.30	1.20	1.60	1.60
7	1.84	1.60	3.71	0.72
8	1.40	0.78	1.00	0.34
9	1.60	0.17	0.37	0.38
10	0.37	0.37	0.25	1.20

Glu = Glucosa

Cuadro 5.2 Comportamiento de Trichoderma sp. en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 0.5 % p/v.



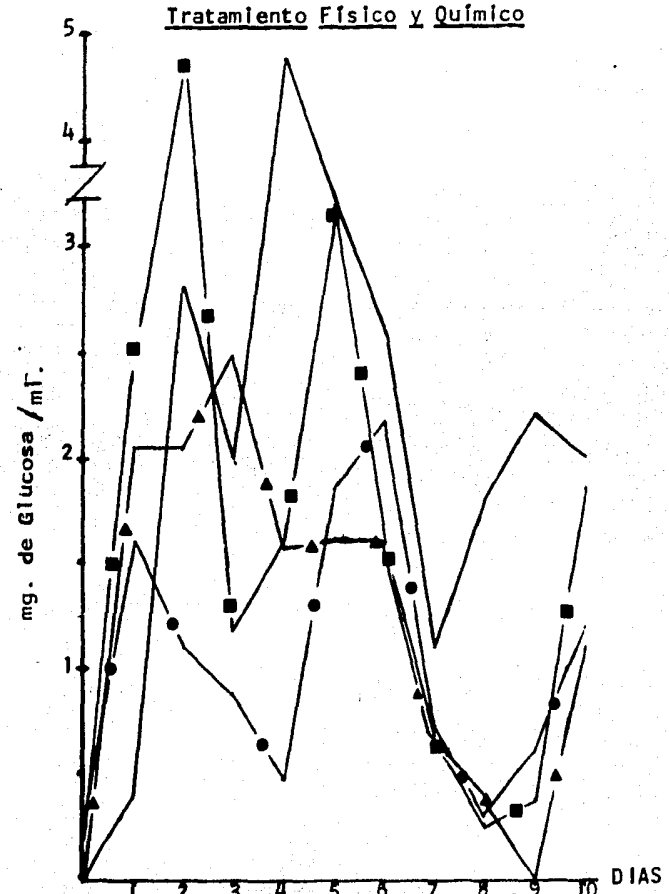
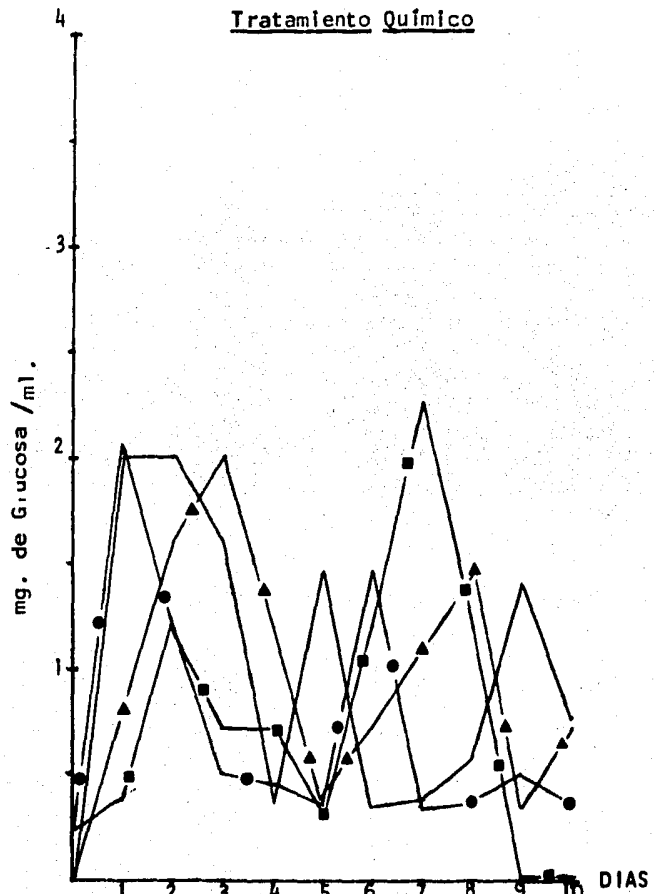
Gráfica 5.2 Comportamiento de *Trichoderma* sp. en los sustratos al 0.5% con los dos tratamientos. Rastrojo de maíz—●—, Paja de trigo—▲—, Aserrín 1—■—, Aserrín 2—▲—.

(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	2.00	2.00	0.38	0.80
2	2.00	1.20	1.21	1.60
3	1.60	0.50	0.72	2.00
4	0.37	0.42	0.72	1.20
5	1.46	0.34	0.34	0.34
6	0.34	1.46	1.22	0.72
7	0.38	0.34	2.25	1.10
8	0.57	0.37	1.20	1.45
9	1.40	0.50	0.00	0.34
10	0.78	0.37	0.00	0.78

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.40	1.60	2.50	2.05
2	2.80	1.10	4.74	2.05
3	2.00	0.88	1.20	2.46
4	4.74	0.47	1.60	1.60
5	3.20	1.84	3.24	1.63
6	2.60	2.16	1.60	1.60
7	1.10	0.72	0.72	0.72
8	1.80	0.30	0.28	0.34
9	2.20	0.60	0.37	0.00
10	2.00	1.20	1.84	1.10

Glu = Glucosa

Cuadro 5.3 Comportamiento de Trichoderma sp. en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 1 % p/v.



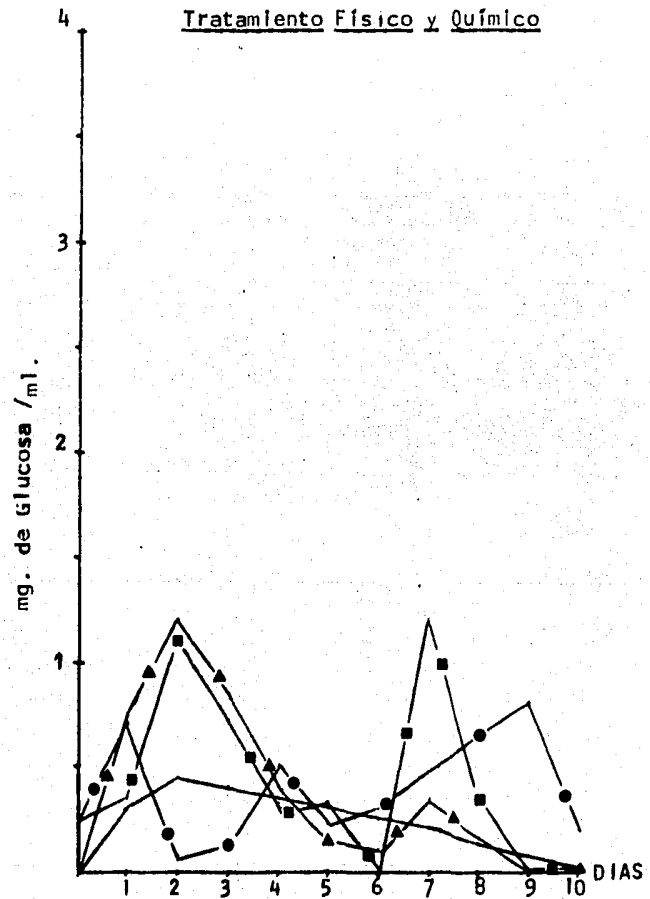
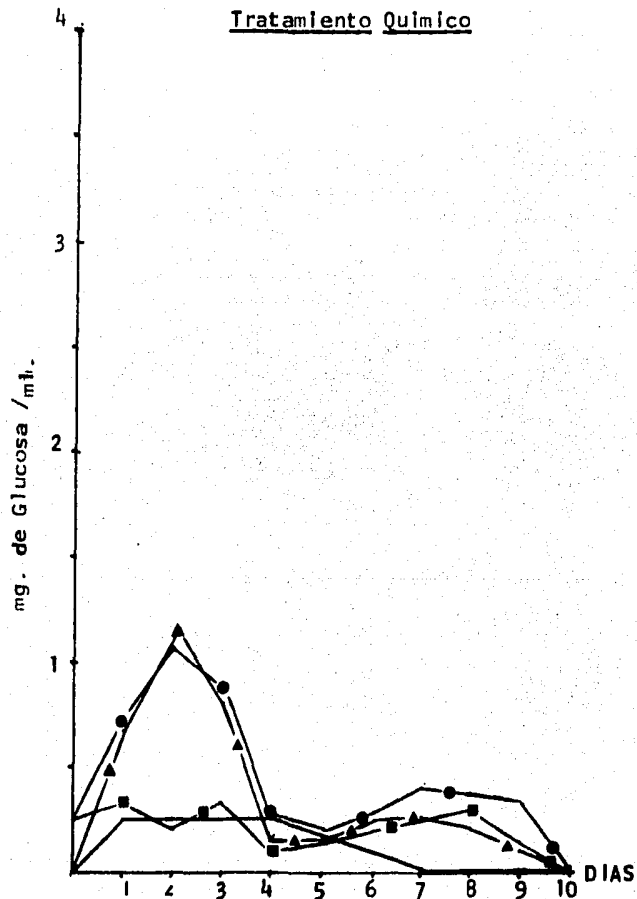
Gráfica 5.3 Comportamiento de *Trichoderma* sp. en los sustratos al 1% con los dos tratamientos.
 Rastrojo de maíz —●—, Paja de Erigo — —, Aserrín 1 —■—, Aserrín 2 —▲—

(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.25	0.72	0.32	0.72
2	0.25	0.57	0.22	1.10
3	0.25	0.40	0.32	0.80
4	0.25	0.25	0.10	0.15
5	0.17	0.20	0.15	0.16
6	0.10	0.30	0.20	0.25
7	0.00	0.40	0.25	0.25
8	0.00	0.37	0.30	0.20
9	0.00	0.35	0.15	0.10
10	0.00	0.00	0.00	0.00

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	0.30	0.70	0.35	0.72
2	0.45	0.07	1.10	1.20
3	0.40	0.12	0.72	0.82
4	0.35	0.50	0.34	0.40
5	0.30	0.22	0.34	0.15
6	0.25	0.30	0.00	0.10
7	0.20	0.48	1.20	0.34
8	0.12	0.65	0.34	0.15
9	0.07	0.80	0.00	0.00
10	0.00	0.20	0.00	0.00

Glu = Glucosa

Cuadro 5.4 Comportamiento de Trichoderma viride en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 0.2 % p/v.



Gráfica 5.4 Comportamiento de *Trichoderma viride* en los sustratos al 0.2% con los dos tratamientos. Rastrojo de maíz —●—, Paja de trigo —■—, A serrín 1 —◆—, A serrín 2 —▲—.

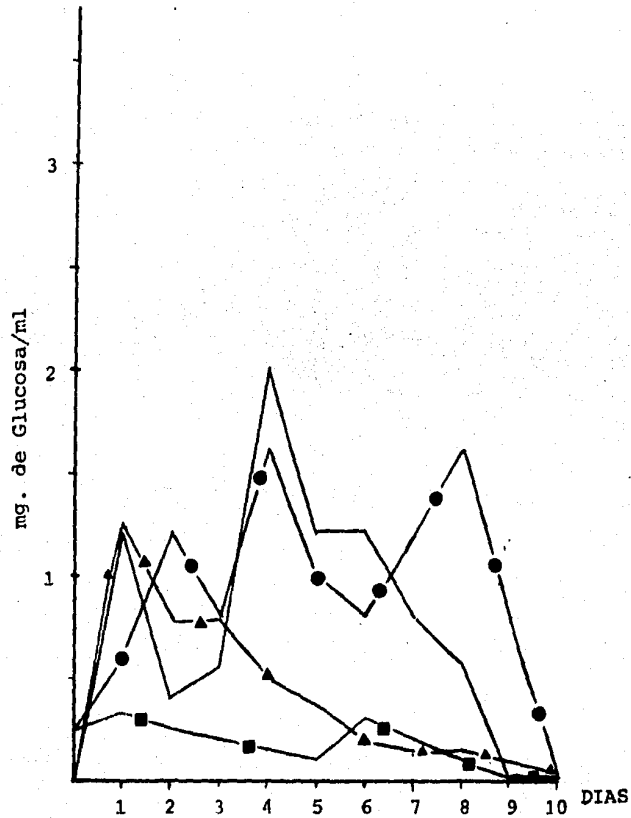
(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	1.20	0.60	0.32	1.20
2	0.40	1.20	0.25	0.80
3	0.55	0.80	0.20	0.80
4	2.00	1.60	0.15	0.50
5	1.20	1.00	0.10	0.37
6	1.20	0.80	0.30	0.20
7	0.80	1.20	0.20	0.15
8	0.57	1.60	0.10	0.15
9	0.00	0.80	0.00	0.10
10	0.00	0.00	0.00	0.00

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	2.30	2.90	0.40	0.43
2	3.20	2.60	0.30	1.60
3	1.40	3.20	1.10	1.10
4	1.57	1.57	0.35	0.72
5	2.00	0.60	0.35	0.00
6	0.80	1.20	0.25	0.00
7	0.55	2.90	0.15	1.46
8	0.25	0.80	0.00	2.20
9	0.25	0.50	0.00	0.34
10	0.00	0.50	0.00	0.00

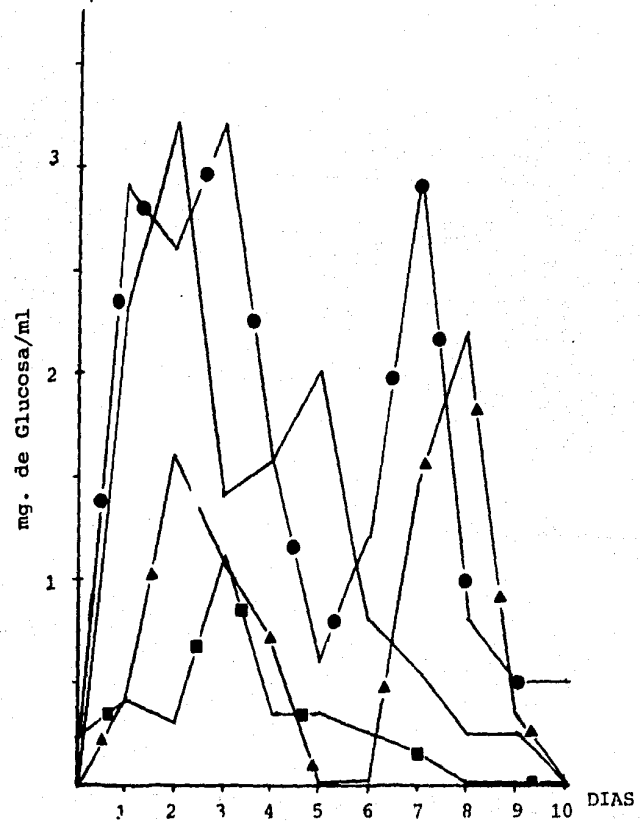
Glu = Glucosa

Cuadro 5.5 Comportamiento de Trichoderma viride en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 0.5 % p/v.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



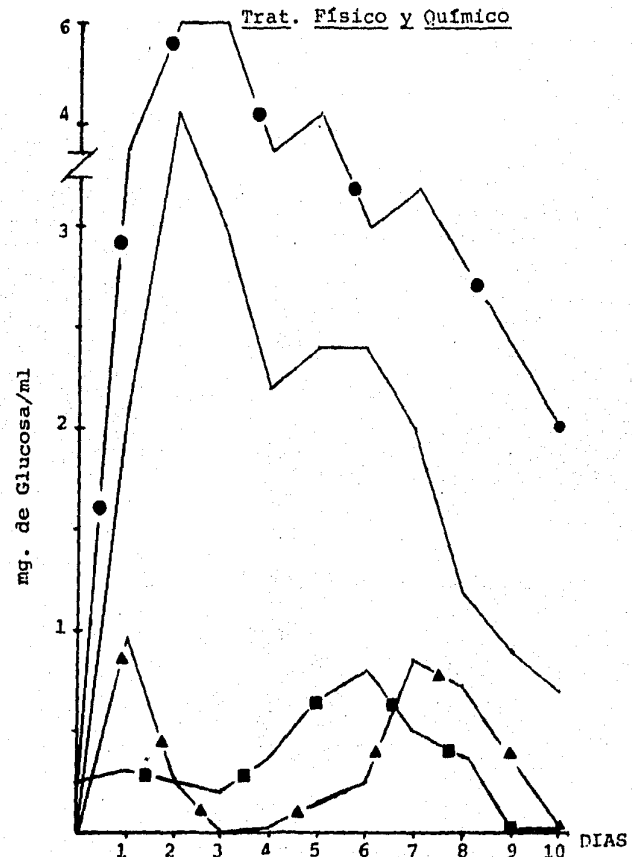
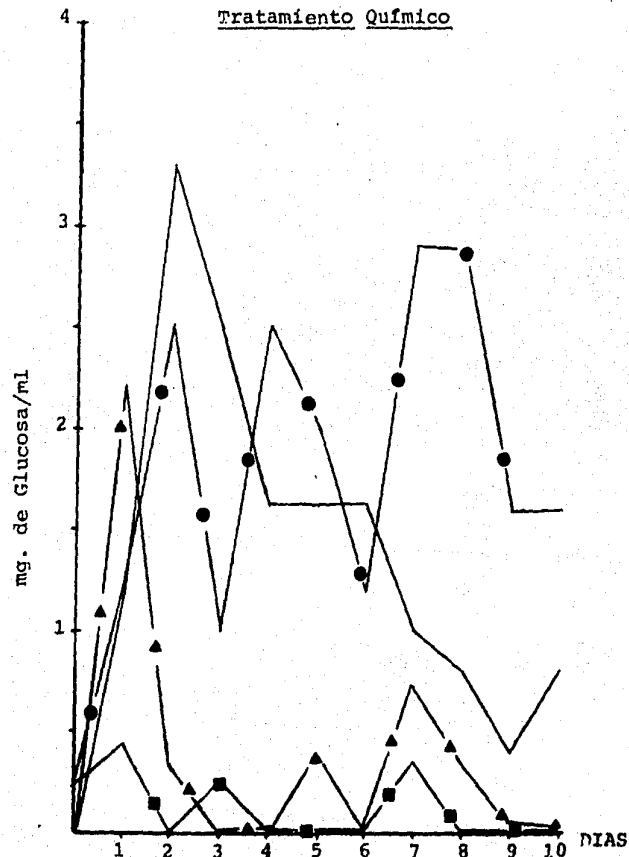
Gráfica 5.5 Comportamiento de *Trichoderma viride* en los sustratos al 0.5% con los dos tratamientos. Rastrojo de maíz —●—, Paja de trigo — —, Aserrín 1 —■—, Aserrín 2 —▲—.

(a) TRATAMIENTO QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	1.21	1.20	0.43	2.20
2	3.29	2.50	0.00	0.34
3	2.50	1.00	0.25	0.00
4	1.63	2.50	0.00	0.00
5	1.63	2.00	0.00	0.37
6	1.63	1.20	0.00	0.00
7	1.00	2.90	0.35	0.71
8	0.80	2.80	0.00	0.34
9	0.40	1.60	0.00	0.00
10	0.80	1.60	0.00	0.00

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO				
Sustrato Día	Trigo (mg Glu/ml)	Maíz (mg Glu/ml)	Aserrín 1 (mg Glu/ml)	Aserrín 2 (mg Glu/ml)
0	0.00	0.25	0.25	0.00
1	2.10	3.75	0.30	0.45
2	4.13	5.00	0.25	0.25
3	3.00	5.00	0.20	0.00
4	2.20	3.75	0.37	0.00
5	2.40	4.10	0.65	0.15
6	2.40	3.00	0.80	0.25
7	2.00	3.30	0.50	0.82
8	1.20	2.80	0.37	0.72
9	0.90	2.40	0.00	0.37
10	0.70	2.00	0.00	0.00

Glu = Glucosa

Cuadro 5.6 Comportamiento de Trichoderma viride en los tratamientos (a) y (b), utilizando los diferentes sustratos al 1 % p/v.



Gráfica 5.6 Comportamiento de *Trichoderma viride* en los sustratos al 1 % con los dos tratamientos. Rastrojo de maíz —●—, Paja de trigo — —, Aserrín 1 —■—, Aserrín 2 —▲—.

De acuerdo a los resultados mostrados en las gráficas anteriores, se resumen los siguientes datos en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1

Sustrato	<u>Trichoderma sp.</u>		<u>Trichoderma viride</u>	
	Conc. Optima de Sustrato (%)	Azúcares (mg/ml)	Conc. Optima de Sustrato (%)	Azúcares (mg/ml)
T. Químico				
Trigo	1.0	2.00	1.0	3.40
Maíz	1.0	2.00	1.0	2.90
Aserrín 1	1.0	2.25	1.0	0.43
Aserrín 2	1.0	2.00	1.0	2.20
T. Fís. y Quím.				
Trigo	1.0	4.74	1.0	4.13
Maíz	1.0	2.16	1.0	5.00
Aserrín 1	1.0	4.74	0.2	1.20
Aserrín 2	1.0	2.46	0.5	2.20

5.1.3 Actividad Celulolítica de Trichoderma.

Los resultados de la sección anterior sirvieron de base para evaluar la actividad celulolítica de los dos microorganismos en los diferentes sustratos. En las gráficas siguientes se muestran las actividades en papel filtro y en carboximetilcelulosa, para cada concentración óptima de sustrato, de esta manera las gráficas 5.7 a 5.10 muestran la eficiencia celulolítica de Trichoderma sp. y las gráficas 5.11 a 5.14 la de Trichoderma viride.

(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Trigo 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	2.00	1.10	0.72
2	2.00	0.00	0.00
3	1.60	1.45	0.72
4	0.37	0.34	0.00
5	1.46	1.84	1.89
6	0.34	0.00	0.34
7	0.38	0.00	0.34
8	0.57	0.71	1.08
9	1.40	0.34	0.34
10	0.78	0.34	0.34

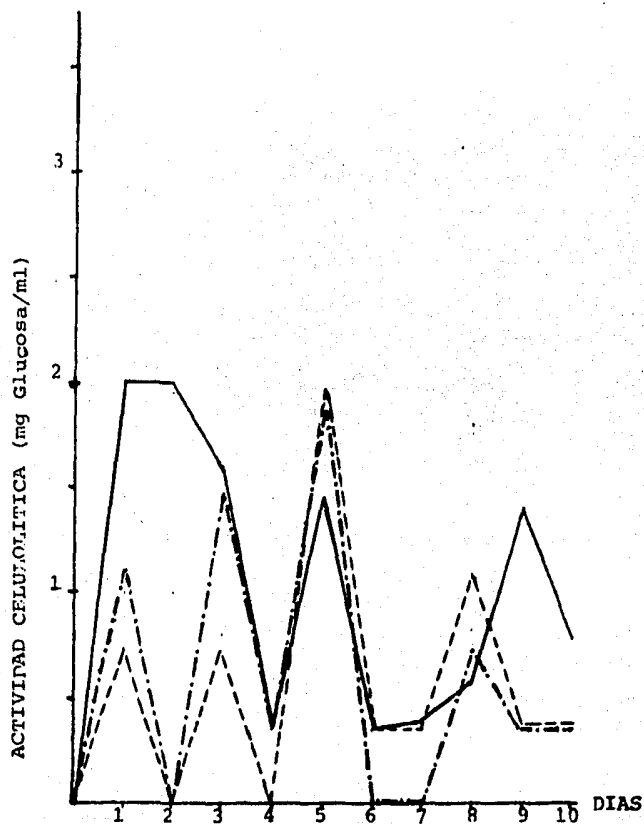
(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Trigo 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	0.40	0.72	0.00
2	2.80	1.10	0.71
3	2.00	1.00	0.34
4	4.74	1.60	0.72
5	3.20	1.40	0.72
6	2.60	0.72	0.72
7	1.10	0.42	0.34
8	1.80	0.34	1.08
9	2.20	0.71	0.15
10	2.00	0.72	0.71

Glu = Glucosa

CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.7 Actividad Celulolítica de Trichoderma sp.
en Trigo al 1 % p/v.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



Gráfica 5.7 Eficiencia Celulolítica de Trichoderma sp. en los dos tratamientos.
Paja de trigo — C.M.C. --- Papel Filtro - - - -

(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Maíz 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.00
1	2.00	0.72	0.71
2	1.20	0.34	0.71
3	0.50	0.34	0.34
4	0.42	0.34	0.00
5	0.34	0.00	0.00
6	1.46	0.72	0.71
7	0.34	0.11	0.00
8	0.37	0.34	1.08
9	0.50	0.00	0.62
10	0.37	0.00	0.34

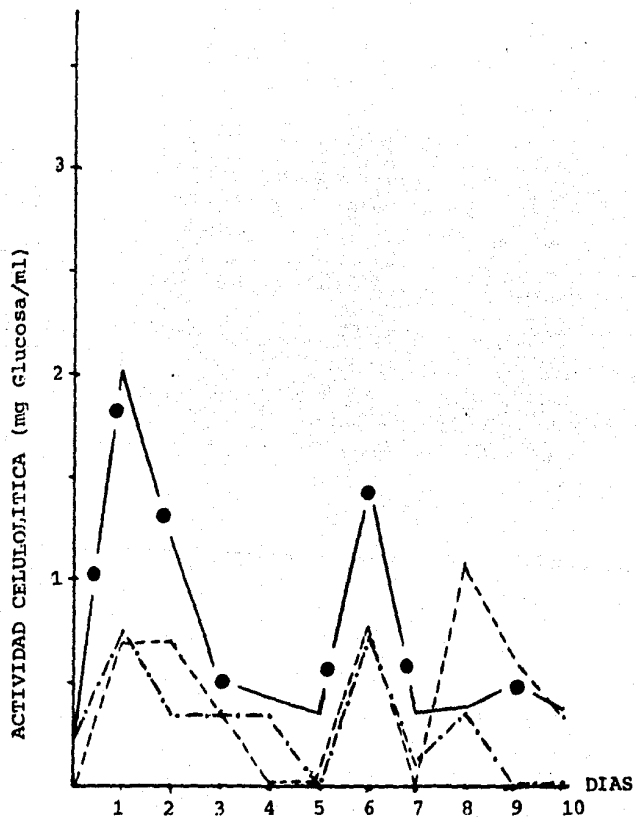
(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Maíz 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.00
1	1.60	0.72	0.72
2	1.10	0.34	0.34
3	0.88	1.08	0.34
4	0.47	0.72	0.00
5	1.84	1.10	0.74
6	2.16	1.20	0.34
7	0.72	0.72	0.34
8	0.30	0.00	0.71
9	0.60	0.00	0.72
10	1.20	0.34	0.73

Glu = Glucosa

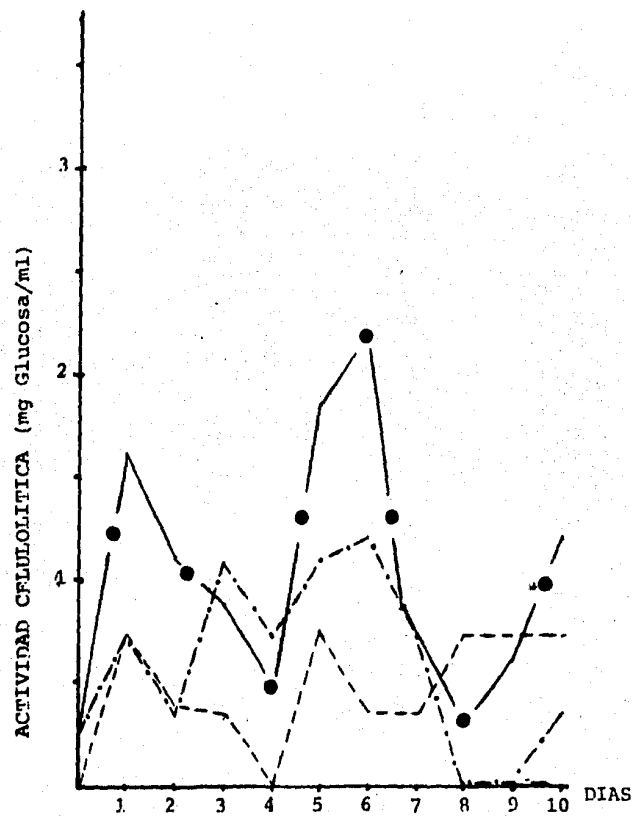
CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.8 Actividad Celulolítica de Trichoderma sp.
en Maíz al 1 % p/v.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



Gráfica 5.8 Eficiencia Celulolítica de Trichoderma sp. en los dos tratamientos.
Rastrojo de maíz —●— C.M.C. --- Papel Filtro -.-.-

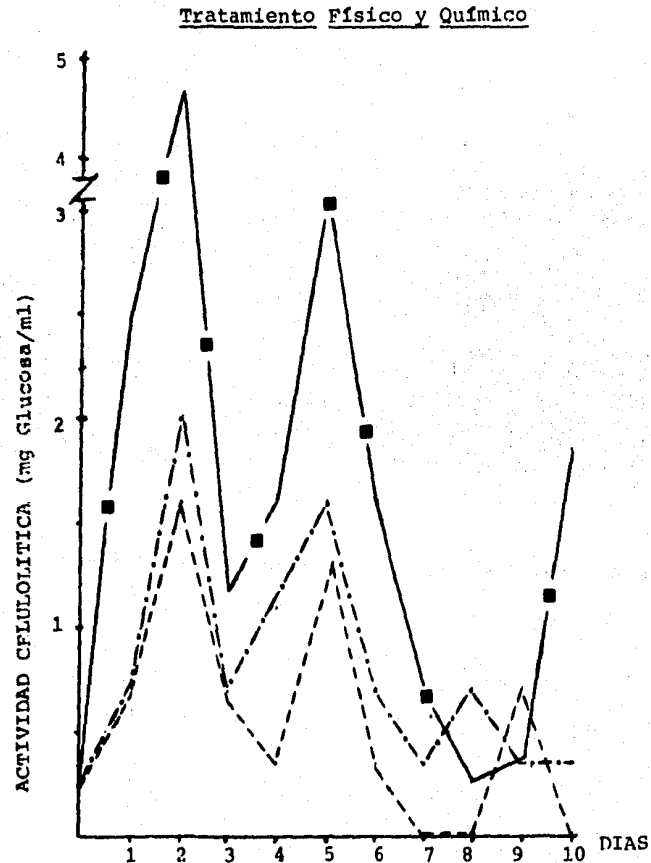
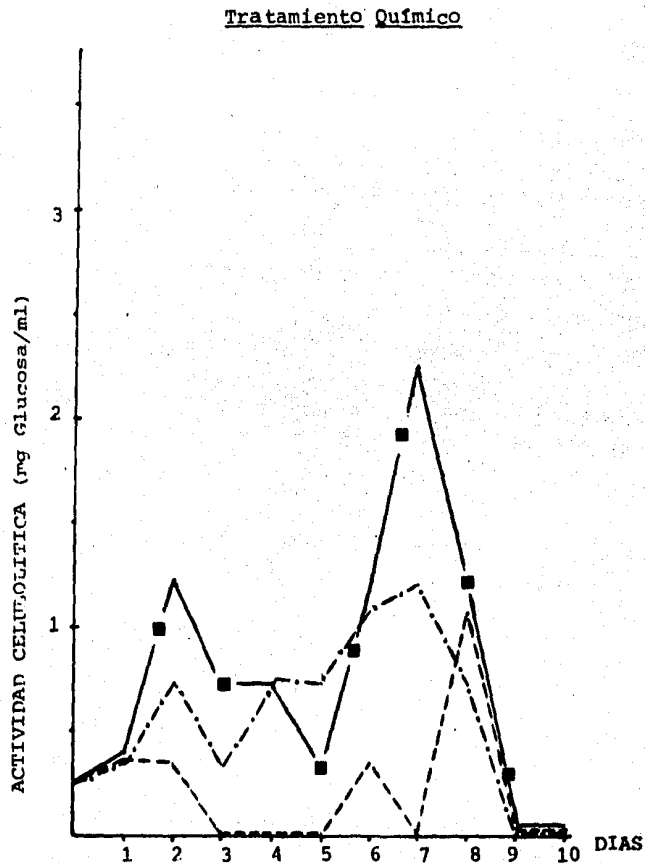
(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.25
1	0.38	0.34	0.34
2	1.21	0.71	0.34
3	0.72	0.34	0.00
4	0.72	0.71	0.00
5	0.34	0.71	0.00
6	1.22	1.08	0.34
7	2.25	1.20	0.00
8	1.20	0.71	1.80
9	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.25
1	2.50	0.72	0.72
2	4.74	2.00	1.60
3	1.20	0.71	0.72
4	1.60	1.10	0.34
5	3.24	1.60	1.20
6	1.60	0.71	0.34
7	0.72	0.34	0.00
8	0.28	0.71	0.00
9	0.37	0.34	0.71
10	1.84	0.34	0.00

Glu = Glucosa

CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.9 Actividad Celulolítica de Trichoderma sp. en Aserrín 1 al 1 % p/v.



Gráfica 5.9 Eficiencia Celulolítica de *Trichoderma* sp. en los dos tratamientos.
 Aserrín 1 —■—
 C.M.C. ----

----- Papel Filtro.

(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 2 1% (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	0.80	0.71	0.34
2	1.60	0.34	0.34
3	2.00	0.71	1.45
4	1.20	1.08	0.34
5	0.34	0.34	0.00
6	0.72	0.34	0.34
7	1.10	0.71	0.34
8	1.45	1.45	0.34
9	0.34	0.71	0.00
10	0.78	0.34	0.00

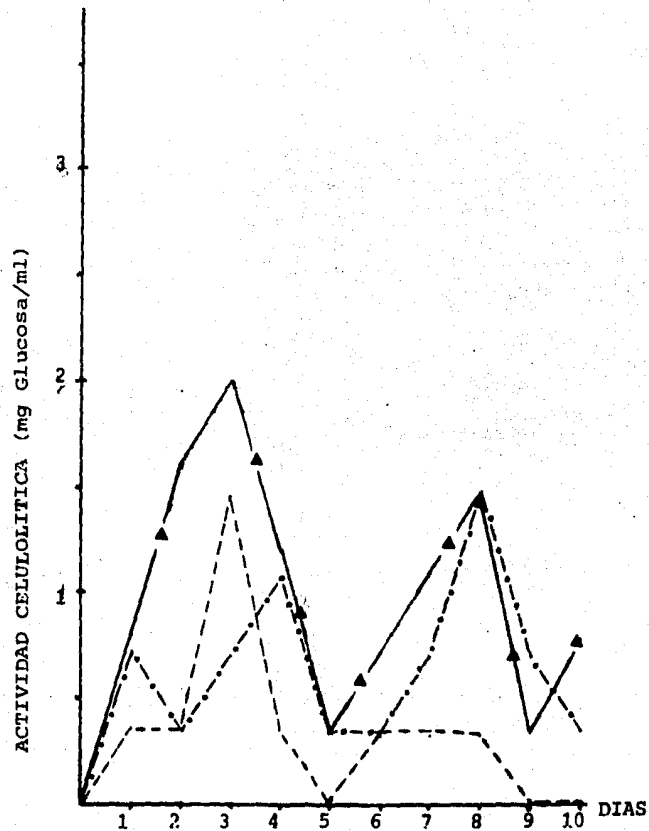
(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 2 1% (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	2.05	0.72	0.34
2	2.05	0.34	0.72
3	2.46	1.60	1.22
4	1.60	0.72	0.72
5	1.63	0.72	0.15
6	1.10	0.34	0.34
7	0.72	0.34	0.73
8	0.34	0.34	0.00
9	0.00	0.34	0.00
10	1.10	0.00	0.34

Glu = Glucosa

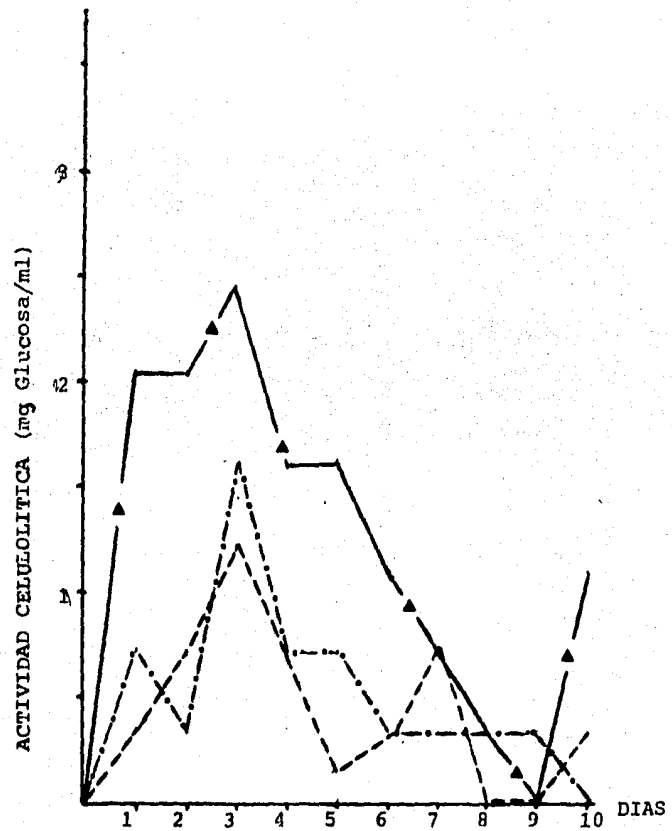
CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.10 Actividad Celulolítica de Trichoderma sp. en Aserrín 2 al 1 % p/v.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



Gráfica 5.10 Eficiencia Celulolítica de Trichoderma sp. en los dos tratamientos.
Aserrín 2 —▲— C.M.C. - - - - - Papel Filtro.

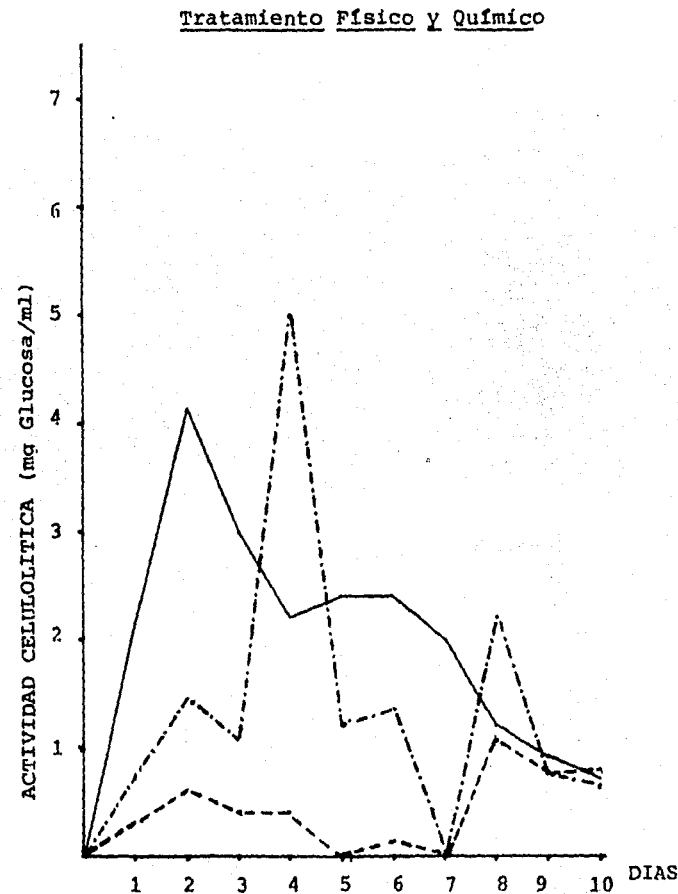
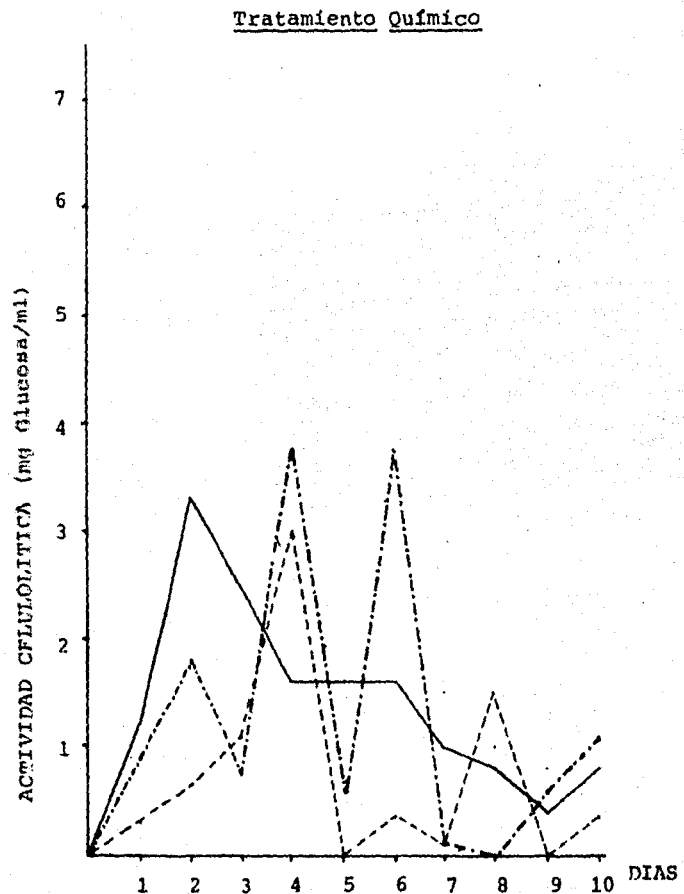
(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Trigo 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	1.21	0.90	0.30
2	3.29	1.80	0.65
3	2.50	0.75	1.10
4	1.63	3.75	3.00
5	1.63	0.60	0.00
6	1.63	3.75	0.34
7	1.00	0.10	0.10
8	0.80	0.00	1.50
9	0.40	0.60	0.00
10	0.80	1.10	0.34

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Trigo 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	2.10	0.75	0.30
2	4.13	1.46	0.60
3	3.00	1.08	0.40
4	2.20	5.00	0.40
5	2.40	1.20	0.00
6	2.40	1.35	0.15
7	2.00	0.00	0.00
8	1.20	2.20	1.10
9	0.90	0.75	0.75
10	0.70	0.65	0.80

Glu = Glucosa

CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.11 Actividad Celulolítica de Trichoderma vi-
ride en Trigo al 1 % p/v.



Gráfica 5.11 Eficiencia Celulolítica de Trichoderma viride en los dos tratamientos.
 Paja de Trigo ——— C.M.C. - - - - - Papel Filtro - · - · - ·

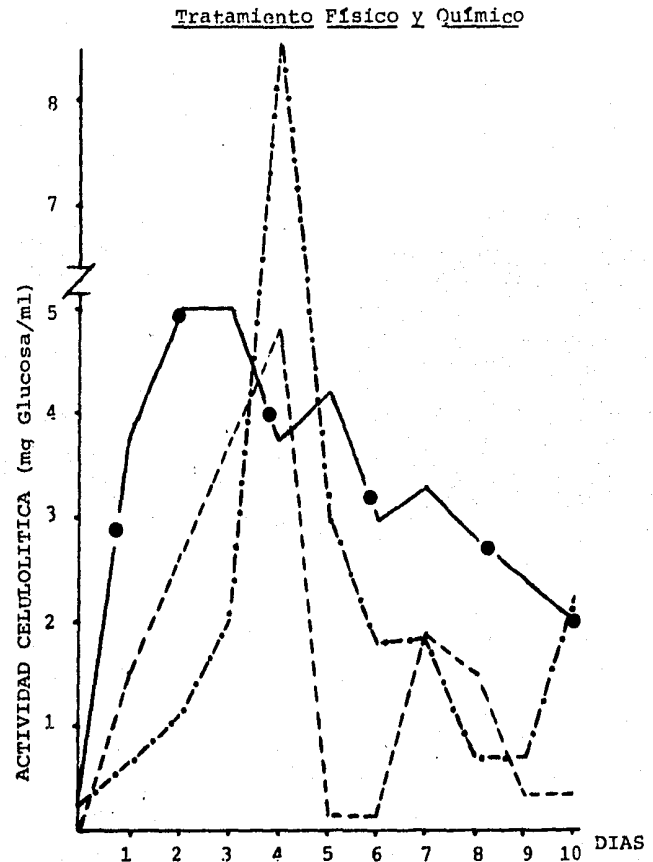
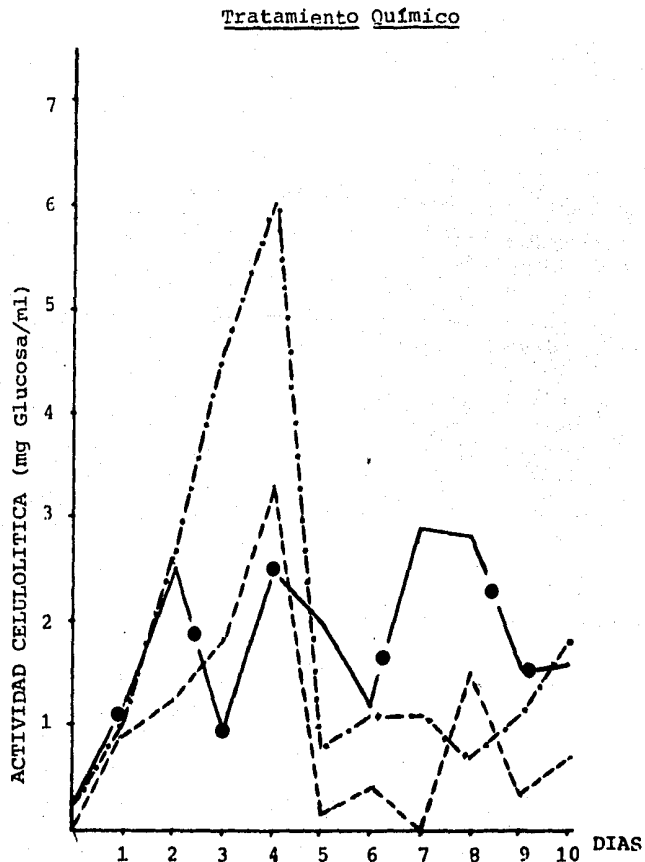
(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Maíz 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.00
1	1.20	1.00	0.90
2	2.50	2.60	1.25
3	1.00	4.60	1.84
4	2.50	6.00	3.30
5	2.00	0.80	0.15
6	1.20	1.10	0.40
7	2.90	1.10	0.00
8	2.80	0.70	1.50
9	1.60	1.10	0.34
10	1.60	1.80	0.70

(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Maíz 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.25	0.00
1	3.75	0.65	1.50
2	5.00	1.10	2.60
3	5.00	2.00	3.70
4	3.75	8.60	4.80
5	4.10	3.00	0.15
6	3.00	1.80	0.15
7	3.30	1.80	1.80
8	2.80	0.70	1.50
9	2.40	0.70	0.34
10	2.00	2.20	0.34

Glu = Glucosa

CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.12 Actividad Celulolítica de Trichoderma vi-
ride en Maíz al 1 % p/v.



Gráfica 5.12 Eficiencia Celulolítica de *Trichoderma viride* en los dos tratamientos.
 Rastrajo de maíz — — — C.M.C. - - - - Papel Filtro - - - -

(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 1 l. % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	0.43	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00
3	0.25	0.75	0.00
4	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00
7	0.35	0.24	1.85
8	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00

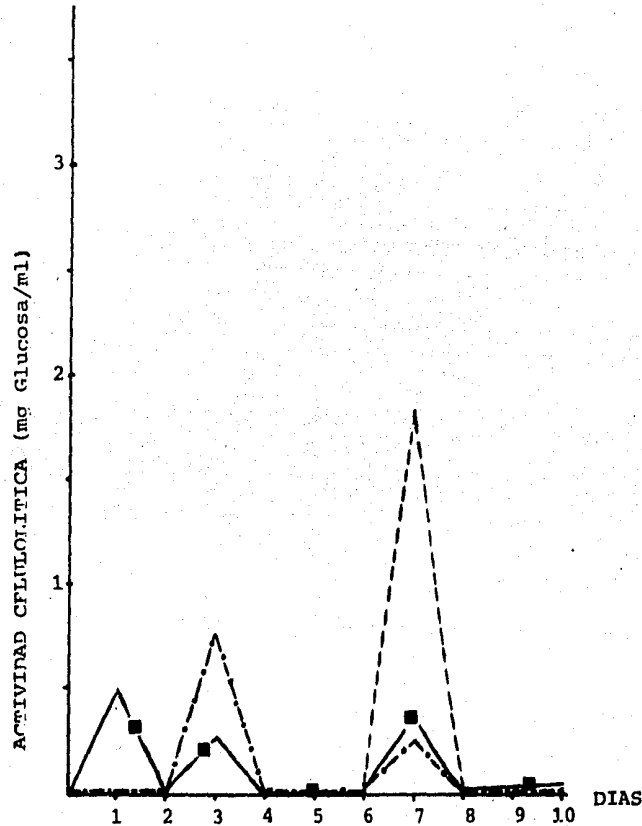
(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 1 .2% (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.25	0.00	0.00
1	0.35	0.34	0.00
2	1.10	1.46	0.00
3	0.72	0.70	0.72
4	0.34	0.70	0.00
5	0.34	0.20	0.40
6	0.00	0.00	0.00
7	1.20	1.00	1.10
8	0.34	0.34	0.00
9	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00

Glu = Glucosa

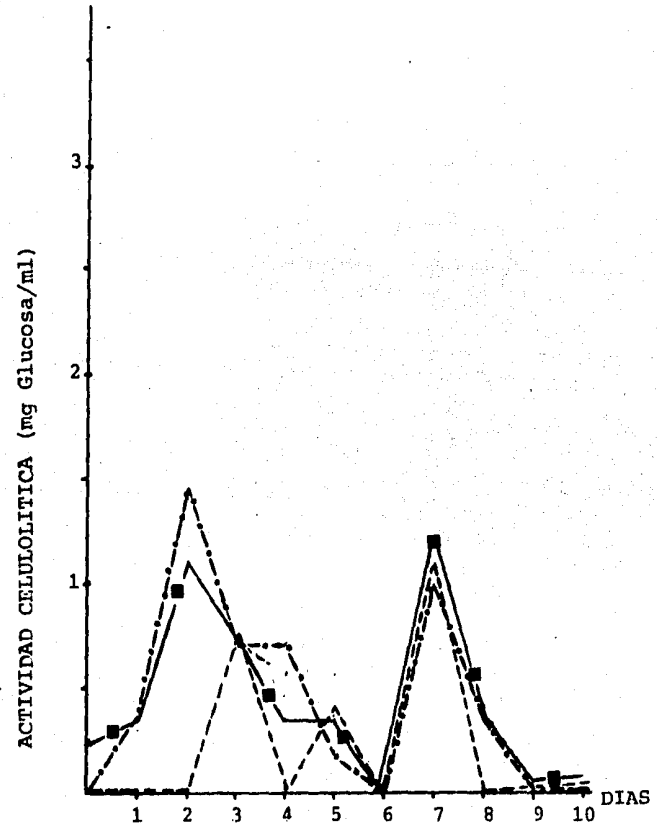
CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.13 Actividad Celulolítica de Trichoderma vi-
ride en Aserrín 1 al 1 y 0.2 % p/v, res--
pectivamente.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



Gráfica 5.13 Eficiencia Celulolítica de Trichoderma viride en los dos tratamientos.

Aserrín 1 —■—

C.M.C. ---

Papel Filtro -.-.-

(a) TRATAMIENTO QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 2 1 % (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	2.20	1.10	0.34
2	0.34	0.70	0.00
3	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00
5	0.37	0.34	0.00
6	0.00	0.00	0.00
7	0.71	0.00	0.34
8	0.34	0.34	1.10
9	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00

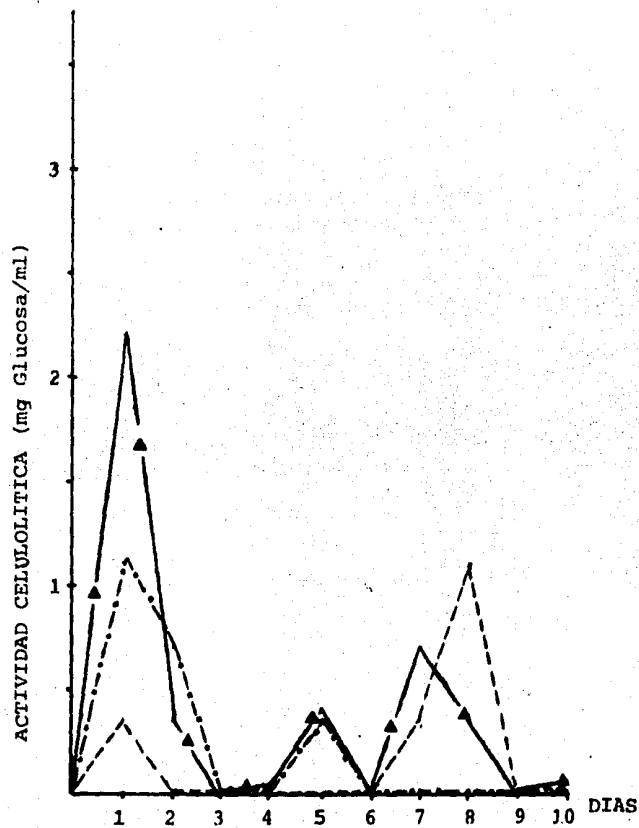
(b) TRATAMIENTO FISICO Y QUIMICO			
Sustrato Día	Aserrín 2 .5% (mg Glu/ml)	Act. en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Act. en CMC (mg Glu/ml)
0	0.00	0.00	0.00
1	0.43	0.34	0.34
2	1.60	1.10	0.00
3	1.10	1.05	0.00
4	0.72	0.00	0.72
5	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00
7	1.46	1.84	0.34
8	2.00	1.46	2.60
9	0.34	0.34	0.00
10	0.00	0.00	0.00

Glu = Glucosa

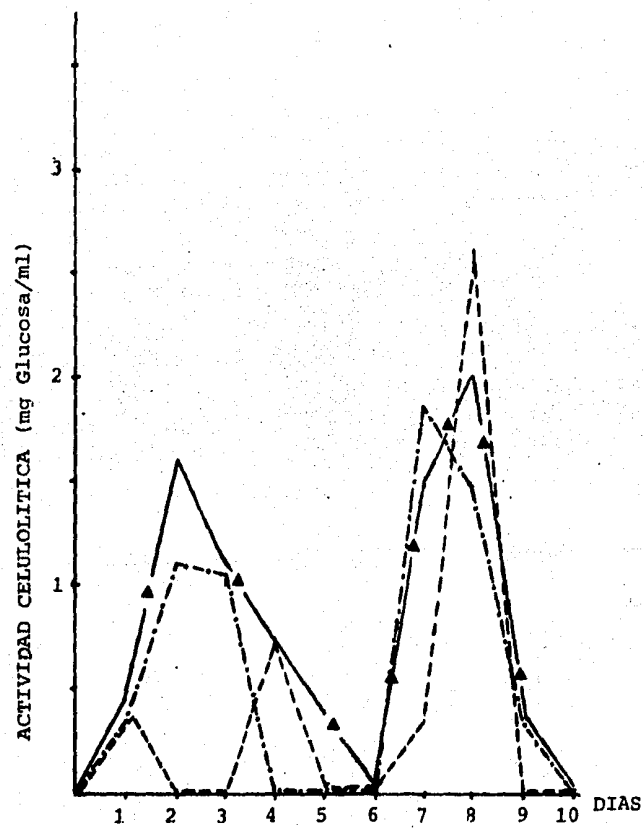
CMC = Carboximetilcelulosa

Cuadro 5.14 Actividad Celulolítica de Trichoderma vi-
ride en Aserrín 2 al 1 y 0.5 % p/v, res-
pectivamente.

Tratamiento Químico



Tratamiento Físico y Químico



Gráfica 5.14 Eficiencia Celulolítica de *Trichoderma viride* en los dos tratamientos.

Aserrín 2 —▲—

C.M.C. ----

Papel Filtro -.-.-

Sustrato	<u>Trichoderma sp.</u>			<u>Trichoderma viride</u>		
	Conc. Optima de Sustrato (%)	Actividad en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Actividad en C.M.C. (mg Glu/ml)	Conc. Optima de Sustrato (%)	Actividad en Papel Filtro (mg Glu/ml)	Actividad en C.M.C. (mg Glu/ml)
T. Químico						
Trigo	1.0	1.45	1.89	1.0	3.75	3.00
Maíz	1.0	0.72	1.08	1.0	6.00	3.30
Aserrín 1	1.0	1.20	1.08	1.0	0.75	1.85
Aserrín 2	1.0	1.45	1.45	1.0	1.10	1.10
T. Fis. y Quím.						
Trigo	1.0	1.60	1.08	1.0	5.00	1.10
Maíz	1.0	1.20	0.74	1.0	8.60	4.80
Aserrín 1	1.0	1.60	1.60	0.2	1.46	1.10
Aserrín 2	1.0	1.60	1.22	0.5	1.84	2.60

Tabla 5.2 Actividad Celulolítica máxima en la Concentración Óptima de los Sustratos.

Al analizar los resultados de las Tablas 5.1 y 5.2, observamos que a partir de los aserrines 1 y 2, se generaron bajas concentraciones de azúcares que se consumían rápidamente; a pesar de la actividad celulolítica que presentaron las dos cepas de Trichoderma. En cambio la actividad celulolítica elevada presentada en los sustratos pretratados física y químicamente de maíz y trigo, ocasionó la obtención de altos rendimientos de azúcares reductores facilitando su concentración posterior, por lo que se eligieron éstos últimos sustratos como fuente de celulosa óptima.

5.1.4 Identificación de Azúcares.

Los azúcares obtenidos de la degradación celulo-lítica de trigo y maíz, fueron identificados a partir del concentrado de los mismos, por medio de Cromatografía en - Papel obteniendo: glucosa y trazas de celobiosa y xilosa; como se muestra en la Fig. 5.1 y en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Datos de la Cromatografía de los Azúcares.

Azúcares Testigo	Rf. determinado Experimentalmente
Arabinosa	0.45
Celobiosa	0.19
Galactosa	0.33
Glucosa	0.38
Manosa	0.44
Xilosa	0.50
Problema: Maíz	0.38
Trigo	0.50
	0.38
	0.18

$$Rf = \frac{\text{Velocidad de migración de la muestra}}{\text{Velocidad de migración del solvente}}$$

Los resultados de la Tabla 5.3 nos muestran una similitud entre los cromatogramas obtenidos de los hidrolizados de maíz y trigo, identificándose la glucosa como el azúcar predominante en los dos. Por esta razón, se decidió mezclar ambos concentrados de azúcares y utilizarlos como única fuente de carbono en la fermentación alcohólica.

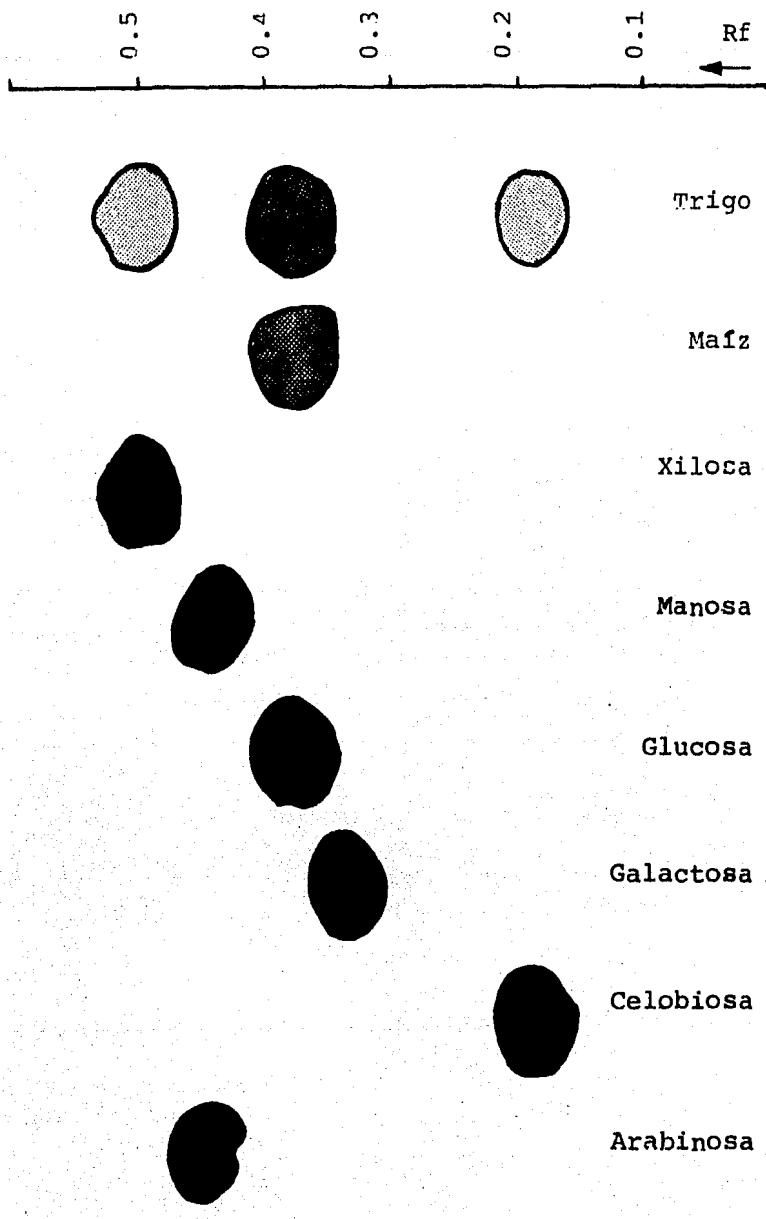


Figura 5.1 Cromatografía en Papel, de Azúcares.

5.2 FERMENTACION ALCOHOLICA.

5.2.1 Efectividad de la Cepa Productora de Etanol.

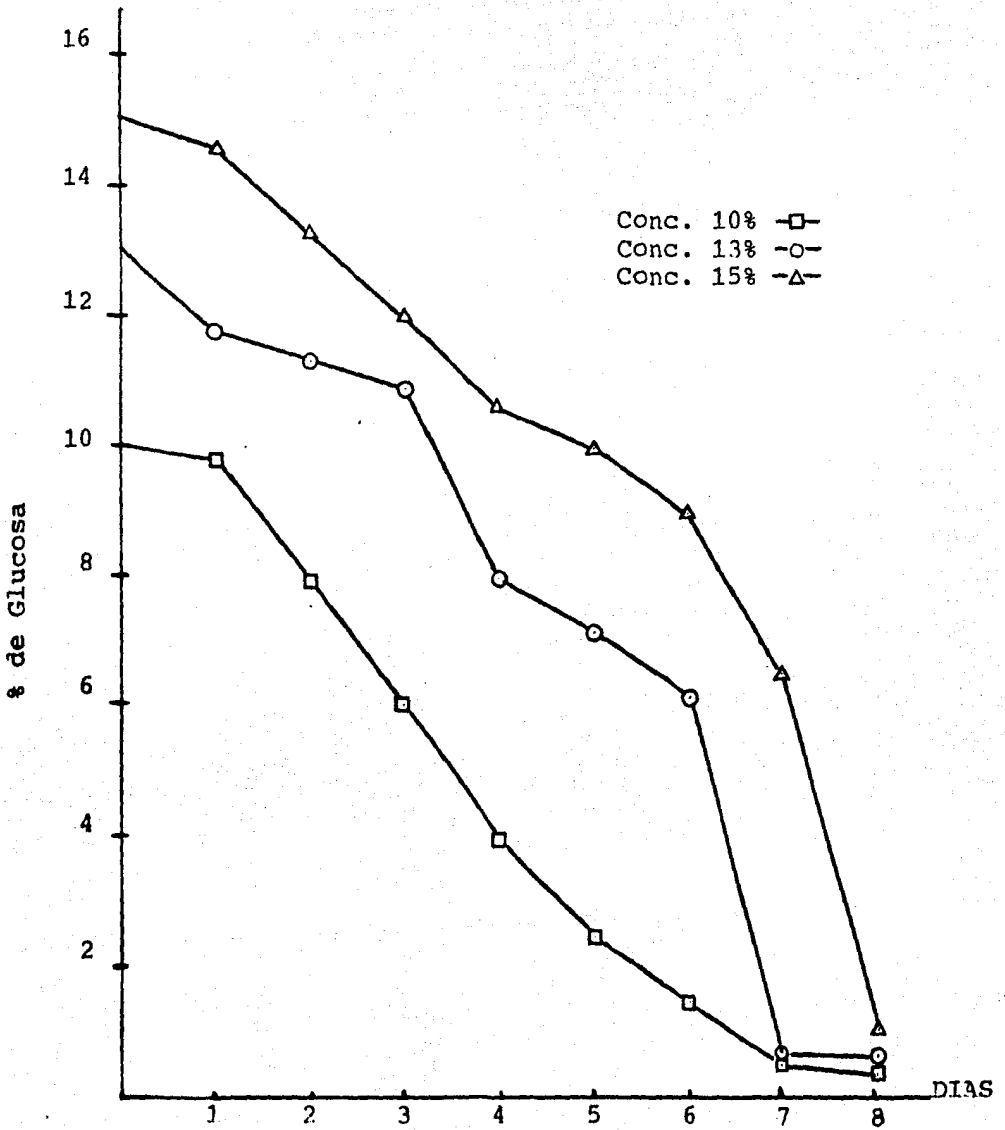
Para probar la efectividad de S. cerevisiae var. ellipsoideus y la concentración óptima de azúcares, se inoculó el medio líquido para levaduras -Medio No. 5- variando la concentración de glucosa (10, 13 y 15 % p/v) -mostrándose los resultados en la Tabla 5.4 representados en la gráfica 5.15. La efectividad máxima de la cepa se encontró usando una concentración de azúcar del 13 % p/v, ya que como se muestra en la Tabla 5.5 se obtuvo la máxima concentración de etanol en menor tiempo.

Tabla 5.4 Utilización de la glucosa por S. cerevisiae.

Día	Concentración de Glucosa		
	10 %	13 %	15 %
0	10.00	13.00	15.00
1	9.80	11.83	14.70
2	7.90	11.30	13.30
3	6.00	10.90	12.00
4	4.00	8.00	10.80
5	2.50	7.20	10.00
6	1.55	6.10	9.00
7	0.50	0.60	6.50
8	0.40	0.55	1.00

Tabla 5.5 Efectividad de la cepa productora de Etanol a diferentes concentraciones de azúcar.

Conc. Inicial de Azúcares (% p/v)	Conc. Final de Azúcares (% p/v)	Tiempo de Fermentación (días)	Producción de Etanol (% v/v)
10	0.5	7	5.0
13	0.6	7	6.6
15	1.0	8	6.8

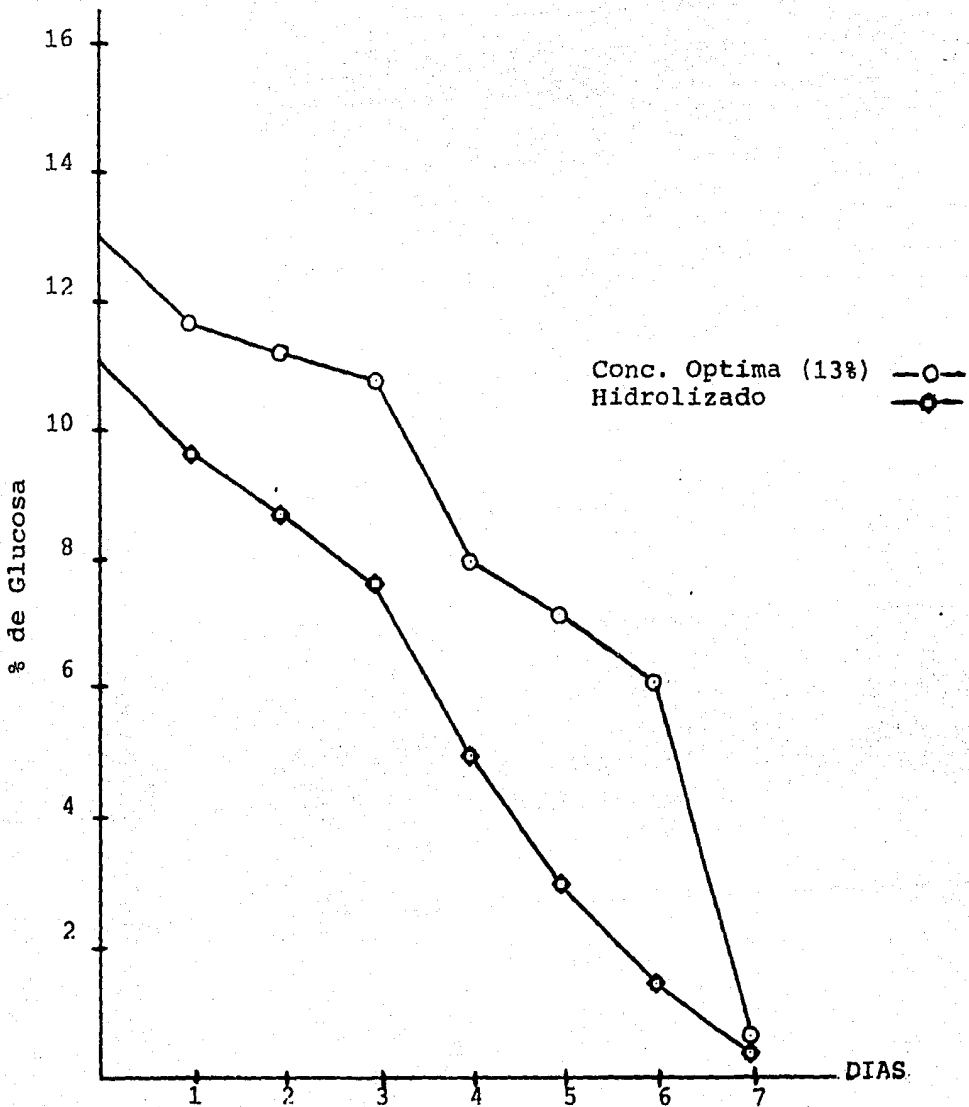


Gráfica 5.15 Utilización de la Glucosa a diferentes concentraciones por *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*.

La comparación de la utilización de los azúcares por Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus, entre el - concentrado de los azúcares provenientes del hidrolizado - de maíz y trigo (concentración inicial de 11.12 % p/v) y - la correspondiente concentración óptima encontrada (con - centración inicial de 13 % p/v), se muestra en la gráfica 5.16 y en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Utilización de los Azúcares por S. cerevisiae.

Día	Patrón % Azúcares	Problema % Azúcares
0	13.00	11.12
1	11.83	9.80
2	11.30	8.80
3	10.90	7.70
4	8.00	5.00
5	7.20	3.00
6	6.10	1.50
7	0.60	0.45



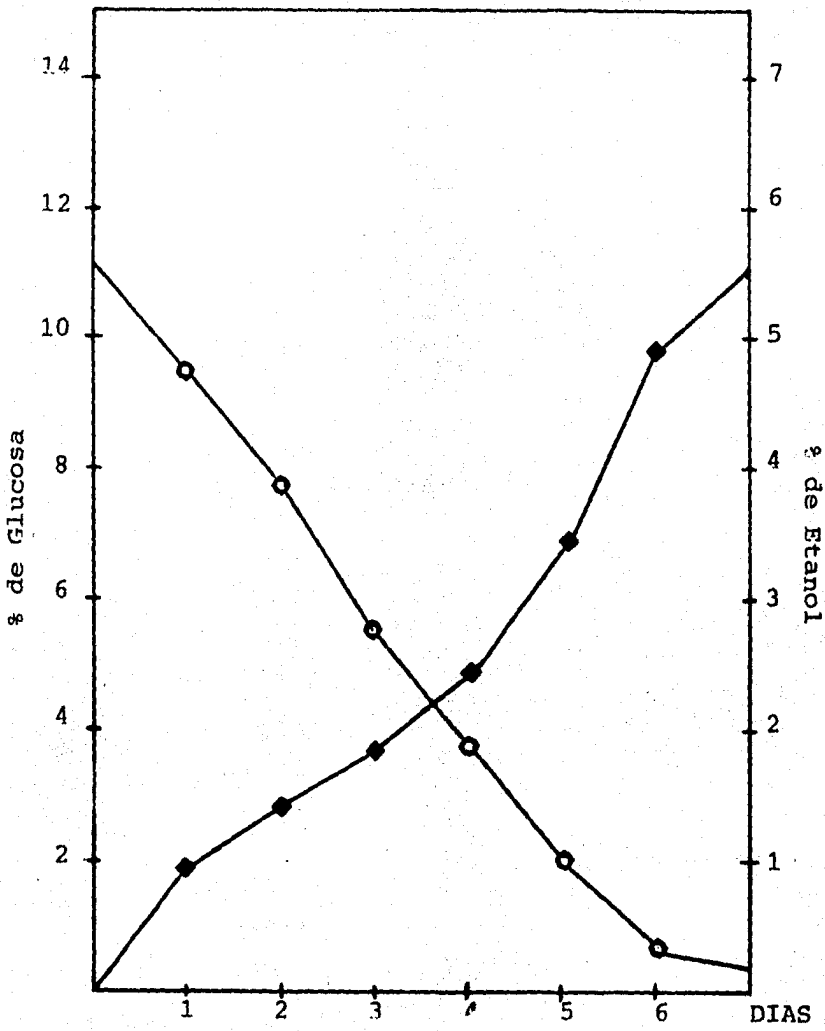
Gráfica 5.16 Comparación de la Utilización de los azúcares entre el hidrolizado y la - concentración óptima de glucosa, por S. cerevisiae.

5.2.2 Producción de Etanol a partir del Hidrolizado.

En base a los resultados anteriores se procedió a cuantificar el etanol producido en el hidrolizado de maíz y trigo cada 24 horas, durante la fermentación. La concentración inicial de azúcares en el hidrolizado fué de 11.12 % p/v, obteniéndose 5.5 % v/v de etanol, el transcurso de la fermentación se puede observar en la gráfica 5.17 y en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7 Fermentación Alcohólica del Hidrolizado.

Día	% Azúcares	% Etanol
0	11.12	0.00
1	9.51	0.90
2	7.76	1.44
3	5.53	1.86
4	3.81	2.44
5	2.00	3.46
6	0.71	4.80
7	0.45	5.50



Gráfica 5.17 Fermentación Alcohólica del Hidrolizado de Maíz y Trigo.

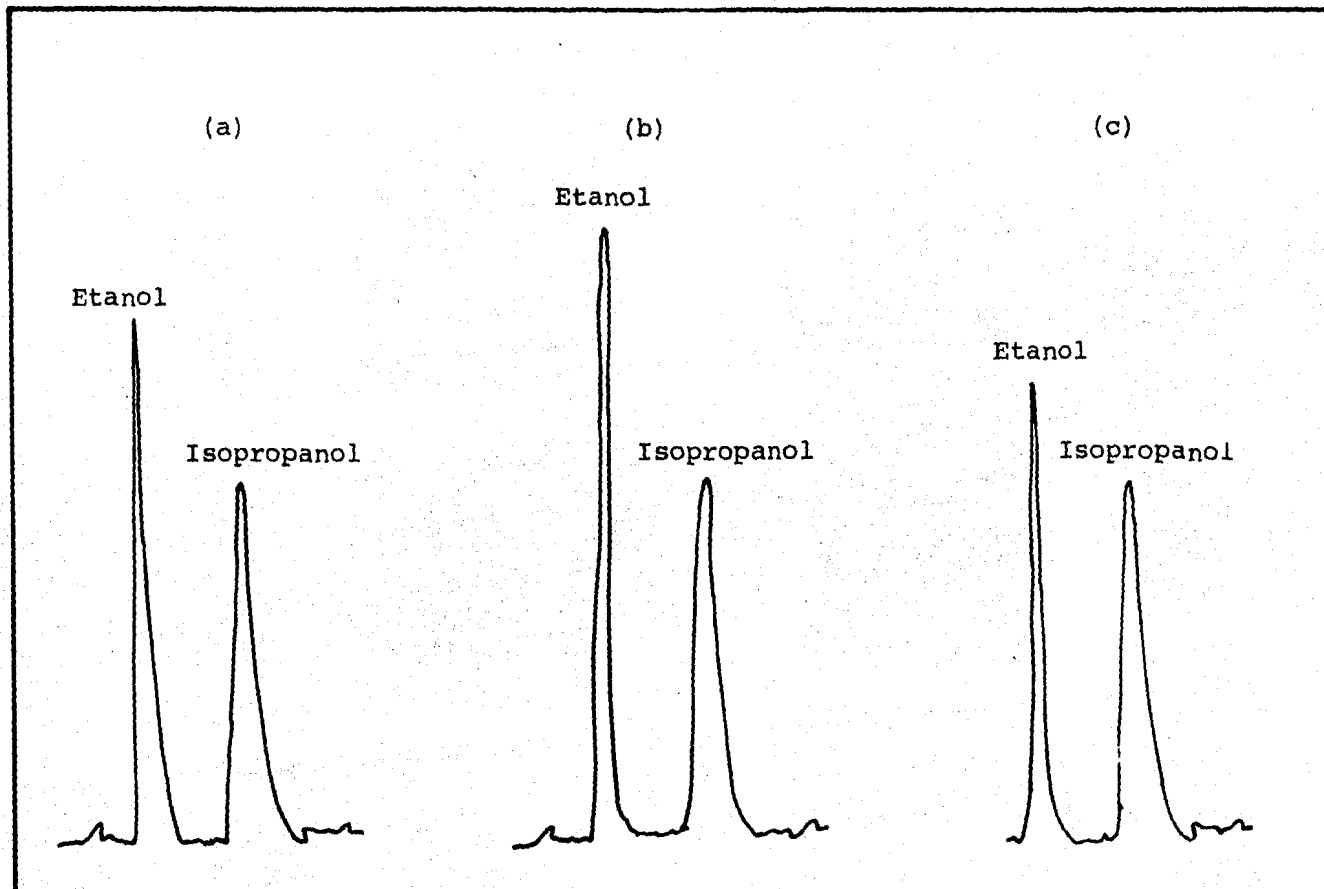


Figura 5.2 Cromatogramas de la Cuantificación de Etanol; (a) a partir del 13 % de glucosa; (b) a partir del 15 % de glucosa; (c) a partir del 11.12 % de azúcares del hidrolizado de maíz y trigo.

6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

6.1 DEGRADACION CELULOLITICA.

En base a los resultados mostrados en el capítulo anterior y resumidos en la Tabla 5.1, se puede observar en general para las dos cepas de *Trichoderma* que:

- a) El tratamiento alcalino a temperatura elevada aumentó la disponibilidad del sustrato al ataque enzimático, independientemente de su concentración, a diferentes tiempos. Estas observaciones confirman los resultados de Cabello y Conde.⁵
- b) La concentración óptima de cada sustrato, en los dos tratamientos efectuados, fué de 1 % p/v exceptuando los aserrines tratados físicamente y químicamente utilizados para *Trichoderma viride*. Esta concentración fué la que presentó mayor producción de azúcares reductores totales, por esta razón se escogió para evaluar la actividad celulolítica de los microorganismos como se muestra en las gráficas 5.7 a 5.14.

El análisis de los resultados de actividad celulolítica nos indica que el tratamiento físico y químico de los sustratos incrementó notablemente la actividad en papel filtro de las dos cepas, en cambio la actividad en carboximetilcelulosa disminuyó ligeramente aunque esto no afectó en la producción de azúcares, ya que en general se observó en todas las gráficas un aumento de éstos con el pretratamiento efectuado. Esto se puede explicar en base al incremento de la disponibilidad del sustrato tratado ocasionando que la enzima generada sea totalmente utilizada para la degradación de éste. En la Tabla 5.2 se puede ob-

servar que la cepa de T. viride presenta una actividad celulolítica mayor que la de Trichoderma sp.

Así mismo, los valores máximos de azúcares obtenidos para T. viride son 4.13 y 5.00 mg/ml en trigo y maíz respectivamente, en cambio para T. sp. es 4.74 mg/ml tanto en trigo como en aserrín 1. En las gráficas 5.7 y 5.9 se observa la utilización de los sustratos óptimos para Trichoderma sp., en donde se aprecia que en cada máximo valor de azúcares obtenido hay una rápida disminución de éstos, por lo que el tiempo de recolección es muy corto. En las gráficas 5.11 y 5.12 de sustratos óptimos para Trichoderma viride los máximos valores que se presentan permanecen estables por más tiempo, por lo que la recolección se facilita.

En general en todas las gráficas presentadas durante el estudio de la degradación enzimática del residuo celulósico se observó que después de cada período de rápida formación de glucosa, la hidrólisis es muy lenta. Este fenómeno diversos autores lo explican diciendo que después de agotada la parte amorfa de la celulosa, la parte cristalina restante es más difícil de hidrolizar, así como la inhibición de la β -glucosidasa por el constante aumento de celobiosa y glucosa en el medio y por el consumo de la glucosa producida, por parte del microorganismo.²⁰

De acuerdo al análisis anterior se eligió como microorganismo a Trichoderma viride y como sustratos óptimos a maíz y trigo en la obtención del concentrado de azúcares. El empleo del aserrín como sustrato en esta investigación no pudo llevarse a cabo, debido a las razones expuestas en el Cap. de Resultados. La actividad celulolítica registrada en los aserrines nos indica que sí se fa-

vorece la inducción del complejo "celulasa" de los microorganismos, pero sus bajos rendimientos de azúcares obtenidos, nos muestran una inhibición de las enzimas o que los pretratamientos efectuados no fueron efectivos; por lo que su utilización como sustratos, dependerá de la susceptibilidad de la fibra de celulosa a ser atacada y ésto se podría lograr encontrando un pretratamiento más efectivo, que permita romper la estructura molecular tan compacta que existe entre la lignina y la celulosa.

En el Cromatograma presentado en el capítulo anterior (Fig. 5.1) se puede observar que la cepa de Trichoderma viride, produjo en su metabolismo de fermentación de la celulosa exclusivamente glucosa al utilizar maíz, y en el caso de trigo se obtuvieron varios azúcares, diferenciándose su concentración de acuerdo a su Rf e intensidad de sus manchas: glucosa y trazas de celobiosa y xilosa.

6.2 FERMENTACION ALCOHOLICA.

La concentración óptima de azúcares se eligió en base a la efectividad de la cepa (Tabla 5.5) en donde se observa que al usar una concentración de azúcar del 15 % p/v se obtenía la máxima concentración de etanol pero en un tiempo de fermentación más prolongado; en cambio al emplear una concentración de azúcar del 13 % p/v se disminuía el tiempo de fermentación, obteniéndose una concentración de etanol muy similar a la máxima encontrada.

Por lo dicho anteriormente, se escogió la concentración del 13 % como la óptima, dadas las condiciones de trabajo al concentrar el hidrolizado no se pudo obtener la concentración de azúcares óptima (13 %) por lo que se trabajó con una concentración inicial del 11.12 % p/v de azú-

cares.

En los cromatogramas obtenidos durante la fermentación alcohólica en el hidrolizado de maíz y trigo (Fig. 5.2), se apreció que la levadura produce en su metabolismo de degradación en anaerobiosis, exclusivamente a diferentes concentraciones etanol, de acuerdo al consumo de los azúcares presentes en el medio; por lo que en el último día de la fermentación, la concentración de éstos es mínima obteniéndose un máximo en la generación del alcohol (gráfica 5.17).

Al comparar los rendimientos obtenidos de etanol, a partir del medio patrón (glucosa) y del hidrolizado de maíz y trigo, se puede analizar la eficiencia de la utilización de estos azúcares por la levadura, obteniendo 6.6 y 5.5 % v/v de etanol respectivamente, esto nos representa un 97 % del valor práctico de la efectividad de la utilización de los azúcares del hidrolizado, por la cepa.

De acuerdo a la cantidad de sustrato empleado y los rendimientos de azúcares y etanol obtenidos, podemos decir que a partir de 100 g de sustrato (maíz y trigo pretratados física y químicamente) obtuvimos 50 g de azúcares reductores y por consiguiente 18.86 g de etanol. Debe tomarse en cuenta que no toda la cantidad de sustrato fué utilizada por el microorganismo, ya que al obtener la máxima concentración de azúcares y separar el hidrolizado del microorganismo se observó que quedaba cierta cantidad de sustrato residual que no pudo ser cuantificado.

Los valores mostrados en las diferentes tablas (capítulo 5) son los resultados obtenidos de la media de 3

réplicas. La reproducibilidad de estos datos está limitada por varios factores, como variaciones imprevisibles de aereación, la utilización de varios matraces, la confiabilidad de las técnicas empleadas, y las diferencias químicas de los sustratos usados (contenido de humedad, época de cosecha, etc.).

7. CONCLUSIONES

7.1 RESUMEN.

La necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de energía, a partir de materia orgánica de desecho (biomasa) y generar productos de alto valor energético como el etanol, hizo de este trabajo su principal objetivo.

Se estudiaron diferentes residuos celulósicos (aserrín, paja de trigo y rastrojo de maíz) como posibles sustratos en la obtención de etanol, eligiendo un proceso biológico de transformación, que consistió en tres etapas:

- a) Deslignificación del residuo celulósico mediante un tratamiento alcalino.
- b) Degradación o Sacarificación de los residuos mediante la hidrólisis enzimática, utilizando Trichoderma viride.
- c) Fermentación Alcohólica de los azúcares provenientes de la hidrólisis, usando Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus.

El maíz y el trigo fueron los sustratos más susceptibles a la degradación celulolítica y por consiguiente se utilizaron en la obtención de etanol, obteniéndose un rendimiento del 5.5 % v/v. Para poder utilizar el aserrín con este fin es necesario efectuar una deslignificación más efectiva utilizando tratamientos más drásticos que rompan la cristalinidad de la celulosa.

7.2 CONCLUSIONES.

A pesar de las restricciones en cuanto a la disponibilidad de material y equipo, que existieron en la realización del presente estudio, se pueden inferir las si-

guientes conclusiones:

- 1) El método estudiado en esta investigación - permite el aprovechamiento de residuos vegetales poco utilizados, incrementando su valor mediante la elaboración de productos de interés industrial.
- 2) De los diversos materiales celulósicos empleados, el rastrojo de maíz y la paja de trigo presentaron los resultados más satisfactorios como fuentes de biomasa, a partir de cuyo procesamiento se puede obtener etanol con fines energéticos.
- 3) La disponibilidad de rastrojo de maíz y paja de trigo es abundante en México, teniendo una distribución homogénea, ciclos de producción aceptables y un elevado contenido de celulosa.
- 4) La celulosa posee un gran potencial de utilización como fuente alternativa de energía en la producción de etanol como carburante para automóviles, pudiendo llegar a ser éste una forma de energía complementaria y/o competitiva a la obtenida por el petróleo (gasolina).
- 5) La sacarificación con Trichoderma viride, - indica que se obtiene glucosa en mayor proporción que otros azúcares, como consecuencia de utilizar como fuente de carbono a los residuos celulósicos, al segregar un complejo de celulasas rico en sus tres componentes:

Endocelulasa (C_x), Celobiohidrolasa (C_1) y β -Glucosidasa.

- 6) Dada la calidad de los azúcares producidos en el hidrolizado de los residuos de maíz y trigo se puede obtener el alcohol etílico a partir de la utilización de éstos por la levadura Saccharomyces cerevisiae.
- 7) De lo realizado en este estudio, se puede apreciar que los métodos microbiológicos presentan un enorme potencial para la fabricación de productos energéticos, y en el caso investigado (generación de etanol) las condiciones de obtención no son drásticas; por lo que pensamos que la Biotecnología constituye una alternativa energética bastante viable, por emplear recursos renovables poco utilizados.

A partir de este breve estudio, consideramos que se deben realizar nuevas investigaciones para optimizar las condiciones empleadas o cambiar el enfoque de ataque, mediante cultivos mixtos, tratamientos microbiológicos, utilización de mutantes o procesos alternativos, que establezcan el aprovechamiento integral del material celulósico, no sólo en cuanto a la formación de un producto energético, sino considerando la utilización de los desechos de estos procesos, los cuales pueden ser empleados como fertilizantes, complementos alimenticios para animales, etc., permitiendo que dichos procesos sean económicamente viables.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexander, M.; "Introducción a la Microbiología del Suelo" AGT Editor, pp. 163-177, México, 1980.
- 2) Bellamy, W. D.; "Single Cell Proteins from Cellulosic Wastes" Biotechnology & Bioengineering, Vol XVI, pp. 869-880, 1974.
- 3) Barnett, H. L., Hunter, B. B.; "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" Third Edition, Burgess Publishing Co pp. 88-89, Minneapolis, 1972.
- 4) Brown, C. A., Zerban, F. W.; "Physical and Chemical - Methods of Sugar Analysis" John Willey & Sons, pp. - 830-832, London, 1941.
- 5) Cabello, A., Conde, J.; "Prediction of the Degradability of Sugar Cane Cellulosic Residues by Indirect - Methods" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXIII, pp. 2737-2745, 1981.
- 6) Carty, W.; "Gasohol: Brazil's Liquid Energy" Américas, Vol 33 No. 4, 1981.
- 7) Cooney, Ch., Wang, D.; "Simultaneous Cellulose Hydrolysis and Ethanol production by a Cellulolytic Anaerobic Bacterium" Biotechnology & Bioengineering Symp. No 8, pp. 103-114, 1978.
- 8) Cramer, F.; "Paper Chromatography" First Edition, Mc. Millan & Co., London, 1955.
- 9) Crowling, E. B., Kirk, T. K.; "Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Process" Biotechnology & Bioengineering Symp. No. 6, pp. 95-123, 1976.
- 10) De la Torre, M. M.; "Producción de Proteínas a partir de Residuos Lignocelulósicos" Ciencia y Desarrollo No.

37, Año CII, pp. 111-116.

- 11) Enciclopedia Salvat Diccionario, Tomo I, Savat Editores, España. 1971.
- 12) Eveleigh, D. E.; "Elaboración Microbiológica de Productos Químicos Industriales" Investigación y Ciencia No. 62, pp. 94-96, 1981.
- 13) Fan, L. T., Lee, Y., Beardmore, D.; "Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Effects of Major - Structural Features of Cellulose on Enzymatic Hydrolysis" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII, pp. 177-199, 1980.
- 14) Flickinger, M.; "Current Biological Research in Conversion of Cellulosic Carbohydrates into Liquid Fuels: How Far Have We Come?" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII Suppl. 1, pp. 27-48, 1980.
- 15) "Fuentes de Energía" Información Ciencia y Tecnología, Vol 5 No. 43, pp. 17, 1983.
- 16) Ghose, T. K., Tyagi, R. D.; "Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate I: Batch Versus Continuous Systems" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXI, pp. 1383-1400, 1979.
- 17) Ghose, T. K., Tyagi, R. D.; "Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate II: Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXI, pp. 1401-1420 1979.
- 18) Ghose, T. K., Bisaria, V. S.; "Studies on the Mechanism of Enzymatic Hydrolysis" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXI, pp. 131-146, 1976.

- 19) Goldstein, I.; "Chemicals from Lignocellulose" Biotechnology & Bioengineering Symp. No. 6, pp. 293-301, 1976.
- 20) Herr, D.; "Conversion of Cellulose to Glucose with - Celulase of Trichoderma viride ITCC-1433" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII, pp. 1601-1612, 1980.
- 21) Horton, G. L., Rivert, D. B.; "Preparation of Cellulosic for Enzymatic Conversion" Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 19, pp. 422-429, 1980.
- 22) Jonguensen, A.; "Microbiología de las Fermentaciones Industriales" 7a Edición, Ed. Acribia, España, 1959.
- 23) Knappert, D., Grethelin, H., Converse, A.; "Partial Acid Hydrolysis of Cellulosic Materials as a Pre- - treatment for Enzymatic Hydrolysis" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII, pp. 1449-1483.
- 24) Lindeman, L. R., Rocchioccioli, C.; "Ethanol in Brazil: Brief Summary of the State of Industry in 1977" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXI, pp. -- 1107-1119, 1979.
- 25) Littlewood, A. B.; "Gas Chromatography: Principles, Techniques and Applications" Second Edition, Academic Press, New York, 1970.
- 26) Mandels, M., Andreotti, R., Roche, Ch.; "Measurement of Saccharifying Cellulase" Biotechnology & Bio- - engineering Symp. No. 6, pp. 21-33, 1976.
- 27) Mandels, M., Hantz, L., Nystrom, J.; "Enzymatic Hydrolysis of Waste Cellulose" Biotechnology & Bioengineering, Vol XVI, pp. 1471-1493, 1974.
- 28) Menezes, T., Arakaki, T., DeLamo, P., Sales, A.;

- "Fungal Cellulases as an Aid for the Saccharification of Cassava." *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XX, pp. 555-565, 1978.
- 29) Monroy, O., Viniegra, G.; "Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos" AGT Editor, México, 1981.
- 30) Moo-Young, Ch., Viach, D.; "Single Cell Protein from Various Chemically Pretreated Wood Substrates using - Chaetomium cellulolyticum" *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XX, pp. 107-118, 1978.
- 31) Murao, S., Danamoto, J., Arai, M.; "Isolation and Identification of a Cellulolytic Enzyme Producing Microorganisms" *J. Ferment. Technol.* Vol 57 No. 3, pp. 151-156, 1979.
- 32) Neri, F. H., Unzueta, M. J.; "Predigestión Microbiana de Fibras Lignocelulolíticas" Tesis, Fac. de Química, U.N.A.M., 1980.
- 33) Nesse, N., Wallick, J., Harper, J.; "Pretreatment of Cellulosic Wastes to Increase Enzyme Reactivity" *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XIX, pp. 323-336, 1977.
- 34) Pérez, A. R., Verde, C. J.; "Curso Comparativo de Laboratorio de Fermentaciones Industriales" Tesis, Fac. de Química, U.N.A.M., 1978.
- 35) Pietersen, N.; "Continuous Cultivation of Trichoderma viride on Cellulose" *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XIX, pp. 337-348, 1977.
- 36) Porter, J. R.; "Bacterial Chemistry and Physeology" 5th Edition, John Willey & Sons, pp. 970-972, New York, 1946.

- 37) Prescott, S. C., Dumm, C. G.; "Industrial Microbiology" Mc. Graw Hill Publishing Co, New York, 1959.
- 38) "Programa Nacional de Residuos Forrajeros" I.N.I.A., 1979.
- 39) Rainbow, C., Dumm, C. G.; "Biochemistry of Industrial Microorganisms" Third Edition, Academic Press, London, 1969.
- 40) Reese, E., Mandels, M.; "Stability of the Cellulase - of Trichoderma reesei under Use Conditions" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII, pp. 323-335, 1980.
- 41) Rose, A. H.; "Microbiología Química" 2a Edición. Ed. Alambra, España, 1977.
- 42) Savarese, J. J., Young, S. D.; "Combined Enzyme Hydrolysis of Cellulose and Yeast Fermentation" Biotechnology & Bioengineering, Vol XX, pp. 1291-1293, 1978.
- 43) Senez, J.; "Microbiología General" Editorial Alambra, España. 1976.
- 44) Skinner, Ch., Emmons, Ch., Tsuchiya, H.; "Molds, Yeast and Actinomycetes" Second Edition, John Willey & Sons, New York, 1979.
- 45) Solar Energy Information Data Bank. "Facts about Gasohol!"
- 46) Stahl, E.; "Thin-Layer Chromatography" Second Edition, Springer-Verlag-Berlin, pp. 807, 1969.
- 47) Straunard, P. L.; "The Brazilian Ethanol Program" Biotechnology & Bioengineering, Vol XXII, pp. 1489-2012, 1980.
- 48) Tassinari, T., Macy, Ch., Spano, L.; "Energy Require-

ments and Process Design Considerations in Compression-Milling Pretreatment of Cellulosic Wastes for Enzymatic Hydrolysis." *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XXII, pp. 1689-1705, 1980.

- 49) Tyagi, R. D., Ghose, T. K.; "Batch and Multistage Continuous Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate and Optimum Design of Fermentor by Graphical Analysis." *Biotechnology & Bioengineering*, Vol XXII, pp.1907-1928 1980.
- 50) Ulloa, M.; "Atlas de Micología Básica" 1^a Edición. Ed. Concepto, México, 1978.
- 51) Yang, V., Trindade, S.; "Gasohol Program in Brazil" - *Chemical Economy & Engineering Review*, Vol II (3), pp. 12-19, 1979.
- 52) Winnacher, K., Weingather, E.; "Tecnología Química" - Tomo VII, G. Gili, Barcelona España, pp. 899, 1954.