

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL MANGO (*Mangifera Indica L*) Usando  
*Saccharomyces cerevisiae*

SANDRA MILENA OSPINA HENAO  
ELIANA NATALI HERNANDEZ RODRIGUEZ  
CARLOS ALBERTO LOZANO MORENO

UNIVERSIDAD CATOLICA DE MANIZALES  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA  
GRUPO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS-GIBI  
MANIZALES  
2012

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL MANGO (*Mangifera Indica L*) Usando  
*Saccharomyces cerevisiae*

SANDRA MILENA OSPINA HENAO  
ELIANA NATALI HERNANDEZ RODRIGUEZ  
CARLOS ALBERTO LOZANO MORENO

Informe final del trabajo de investigación para optar por el título de Bacteriólogo

Docente investigadora  
ANNIE ALEXANDRA CERÓN SÁNCHEZ  
MSc. Ing. Química

UNIVERSIDAD CATOLICA DE MANIZALES  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA  
GRUPO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS-GIBI  
MANIZALES  
2012

**Nota de aceptación**

-----  
-----  
-----

Docente investigadora

-----

Jurado

-----

Representante del Grupo de  
Investigaciones Biológicas - GIBI

Manizales, febrero de 2012

### **DEDICATORIA CARLOS AL BERTO LOZANO MORENO**

Este trabajo se lo dedico a Dios por darme la sabiduría  
Y fortaleza en cada paso de este proceso, a mi madre Julia y mi abuela  
Idalides por su esfuerzo y apoyo. A mis compañeros y amigos que  
Me brindaron su apoyo en los momentos más difíciles.

### **DEDICATORIA SANDRA MILENA OSPINA HENAO**

A Dios por darme la oportunidad de llegar a este gran momento.  
A mi familia, por acompañarme, apoyarme y darme fuerza durante  
Todo este proceso.

A los docentes de la Universidad Católica de Manizales  
Por abrirme el camino y darme animo durante todo este tiempo.  
A mi hija Laura por llegar a mi vida y brindarme tanta felicidad.

### **DEDICATORIA ELIANA NATALI HERNANDEZ RODRIGUEZ**

A Dios por ser luz y guía en todos los momentos de mi vida, ilustrándome con el  
Don de su ciencia. A mis padres quienes creyeron en mis capacidades, me  
sostuvieron con su ánimo, esfuerzo y trabajo me enseñaron a inclinar mi corazón  
a Dios. A mis hermanos por su afecto y fidelidad de sus nobles corazones que  
siempre me han dado palabras de ánimo y gran estímulo para seguir adelante sin  
importar los tropiezos de la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Ingeniera Annie Alexandra Cerón, por sus conocimientos, dedicación, paciencia y confianza durante este proceso de aprendizaje.

A la Doctora Martha Ramírez, por su asesoría y apoyo continuo.

Al personal de Caler, por su colaboración permanente.

A la Universidad Católica de Manizales, por permitirnos hacer uso de sus instalaciones.

A la Esp. Sandra María Marulanda, por su orientación y asesoría.

Al grupo de Investigación del GIBI, por permitirnos hacer uso de sus cepas microbianas.

A todas las personas que de una u otra manera formaron parte de esta investigación.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCION	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MARCO DE REFERENCIA	22
3.1 ANTECEDENTES	22
3.2 MARCO TEÓRICO	22
3.2.1 Alternativas de aprovechamiento de residuos agroindustriales	23
3.2.1.1 Aprovechamiento biológico y químico	23
3.2.1.2 Aprovechamiento térmico	26
3.2.2 Mango	26
3.2.2.1 Demanda de mango	27
3.2.2.2 Composición del mango	28
3.2.2.3 Contenido nutricional	28
3.2.2.4 Cosecha y maduración del mango	29
3.2.2.5 Conservación del mango	29
3.2.2.6 Composición química zumo de mango	30
3.2.2.7 Caracterización físico-química de los residuos del mango	30

3.2.3	Material lignocelulosico	31
3.2.3.1	Degradación de la celulosa	32
3.2.3.2	Degradación de lignina	33
3.2.3.3	Degradación de xilanos y otras hemicelulosas	34
3.2.4	Tratamiento del material lignocelulosico para obtener azucares fermentables	35
3.2.4.1	Pretratamiento mecánico	35
3.2.4.2	Pretratamiento térmico	36
3.2.4.3	Pretratamiento físico-químicos	36
3.2.4.4	Pretratamiento químico	37
3.2.4.5	Pretratamientos biológicos	38
3.2.5	Hidrólisis	38
3.2.5.1	Hidrólisis acida	39
3.2.5.2	Hidrólisis enzimática	39
3.2.5.2.1	Enzimas hidrolíticas <i>Aspergillus oryzae</i>	39
3.2.5.2.2	Enzimas hidrolíticas <i>Aspergillus niger</i>	39
3.2.5.2.3	Enzimas hidrolíticas <i>Trichoderma reesei</i>	39
3.2.6	Fermentación	40
3.2.6.1	Fermentación alcohólica	41
3.2.6.2	Fermentación de azucares simples por levaduras y bacterias	41
3.2.6.2.1	Levaduras	41
3.2.6.2.2	Bacteria	43
4.	METODOLOGIA	45

4.1	TIPO DE ESTUDIO	45
4.2	UBICACIÓN	45
4.2.1	Sitio de recolección de las muestras	45
4.2.2	Sitio de trabajo de laboratorio	45
4.3	POBLACIÓN Y MUESTRA	45
4.4	TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS	45
4.4.1	Recolección de las muestras	45
4.4.2	Preparación de los medios de cultivo	45
4.4.3	Recuperación del hongo <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma spp</i>	45
4.4.4	Identificación de los hongos recuperados	46
4.4.5	Caracterización de la materia prima	46
4.4.5.1	Parámetros microbiológicos	46
4.4.5.1.1	Método de recuento en placa	46
4.4.5.1.2	Procedimiento de las diluciones	46
4.4.5.1.3	Procedimiento de siembra en profundidad	47
4.4.5.1.4	Procedimiento de la siembra en superficie	47
4.4.5.1.5	Recuento de Mesófilos aerobios y facultativos viables	47
4.4.5.1.6	Técnica numero más probable coliformes fecales y totales	48
4.4.5.1.7	Recuento de mohos y levaduras	48
4.4.5.2	Parámetros físico-químicos	48
4.4.5.2.1	Procedimiento % de humedad	49
4.4.5.2.2	Procedimiento % de cenizas	49
4.4.5.2.3	Procedimiento materia orgánica	49



4.4.5.2.4	Medición de azúcares reductores	49
4.4.5.2.5	Determinación del pH	50
4.4.5.2.6	Procedimiento lignina Klason	50
4.4.5.2.7	Procedimiento holocelulosa	50
4.4.5.2.8	Procedimiento celulosa	51
4.4.5.2.9	Procedimiento hemicelulosa	51
4.4.5.2.10	Procedimiento sólidos solubles	51
4.4.5.3	Procedimiento pretratamiento	51
4.4.5.4	Procedimiento hidrólisis microbiana	52
4.4.5.5	Procedimiento fermentación sólidos hidrolizados	52
4.4.5.5.1	Preparación del inóculo	52
4.4.5.5.2	Fermentación	52
4.4.5.6	Cuantificación de etanol	53
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	54
5.1	ACONDICIONAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL MANGO ( <i>Mangifera indica</i> L)	54
5.2	ANALISIS MICROBIOLÓGICOS	54
5.2.1	Recuento de Mesófilos aerobios	54
5.2.2	Recuento de mohos y levaduras	54
5.2.3	Numero más probable Coliformes fecales y totales	55
5.2.4	Resultados análisis microbiológicos	55
5.3	RECUPERACION DEL HONGO <i>Aspergillus brasiliensis</i>	56
5.4	RECUPERACION DEL HONGO <i>Trichoderma spp</i>	57

5.5	ANALISIS FISICO-QUIMICOS	58
5.6	PRETRATAMIENTO	59
5.7	HIDRÓLISIS MICROBIANA	60
5.7.1	HIDRÓLISIS MICROBIANA <i>Aspergillus brasiliensis</i> y <i>Trichoderma spp</i>	60
5.8	FERMENTACION	64
5.8.1	Seguimiento de la fermentación hidrolizado <i>Aspergillus brasiliensis</i>	65
5.8.2	Seguimiento de la fermentación hidrolizado <i>Trichoderma spp</i>	65
5.8.3	Brix, % azucares totales y azucares r eductores	65
5.8.4	Población total y viabilidad levadura	67
5.8.5	Detención de la fermentación	68
5.8.5.1	Determinaciones de etanol	68
	CONCLUSIONES	70
	RECOMENDACIONES	71
	BIBLIOGRAFIA	72

## FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura de la celulosa	33
<b>Figura 2.</b> Estructura de la lignina	34
<b>Figura 3.</b> Estructura xilanos	35
<b>Figura 4.</b> Degradación enzimática de material lignocelulosico	40
<b>Figura 5.</b> Ruta metabólica de la producción de etanol en <i>S. cerevisiae</i>	42
<b>Figura 6.</b> Ruta metabólica de la producción de etanol en la <i>Z. mobilis</i>	44
<b>Figura 7.</b> Acondicionamiento de los residuos del mango ( <i>Mangifera indica</i> L)	54
<b>Figura 8.</b> Recuento Mesófilos aerobios viables	55
<b>Figura 9.</b> Recuento mohos y levaduras	55
<b>Figura 10.</b> Coliformes totales y fecales	56
<b>Figura 11.</b> Recuperación en medio PDA (agar papa dextrosa)	57
<b>Figura 12.</b> Características macroscópicas y microscópicas <i>Aspergillus brasiliensis</i>	57
<b>Figura 13.</b> Recuperación en medio PDA (agar papa dextrosa)	58
<b>Figura 14.</b> Características microscópicas <i>Trichoderma spp</i>	58
<b>Figura 15.</b> Pretratamiento materia prima	60
<b>Figura 16.</b> Microorganismos utilizados en la hidrólisis	60
<b>Figura 17.</b> Inoculación de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	61
<b>Figura 18.</b> Inoculación de <i>Trichoderma spp</i>	61
<b>Figura 19.</b> Azucares reductores método DNS	62

<b>Figura 20.</b> Montaje fermentación	65
<b>Figura 21.</b> Refractómetro	66
<b>Figura 22.</b> Recuento en cámara neubauer	67
<b>Figura 23.</b> Final de la fermentación	68
<b>Figura 24.</b> Cuantificación de etanol	69

## TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición nutricional del mango	29
<b>Tabla 2.</b> Composición química zumo de mango	30
<b>Tabla 3.</b> Composición química "Haden Muñoz"	30
<b>Tabla 4.</b> Caracterización físico-química de los residuos del mango	30
<b>Tabla 5.</b> Caracterización química de un sustrato de fermentación basado en Residuos de mango	31
<b>Tabla 6.</b> Algunos microorganismos que digieren la celulosa	33
<b>Tabla 7.</b> Preparación de las diluciones etanol	53
<b>Tabla 8.</b> Resultado análisis microbiológico materia prima sin tratar y con tratamiento térmico	56
<b>Tabla 9.</b> Resultado análisis físico-químico	59
<b>Tabla 10.</b> Datos curva patrón glucosa	63
<b>Tabla 11.</b> Resultados Brix	63
<b>Tabla 12.</b> Azúcares reductores	64
<b>Tabla 13.</b> Preparación inóculo	64
<b>Tabla 14.</b> Fermentación hidrolizado <i>Aspergillus brasiliensis</i>	65
<b>Tabla 15.</b> Fermentación hidrolizado <i>Trichoderma spp</i>	65
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación de etanol	69

## GRAFICOS

	pág.
<b>Grafico 1.</b> Curva patrón glucosa	63
<b>Grafico 2.</b> Porcentaje de azucares reductores hidrolizado	64
<b>Grafico 3.</b> Relación Brix	66
<b>Grafico 4.</b> Relación Azucares totales	66
<b>Grafico 5.</b> Azucares reductores durante la fermentacion	67
<b>Grafico 6.</b> Relacion poblacion total	67
<b>Grafico 7.</b> Relacion viabilidad	68

## RESUMEN

El etanol se considera una fuente alterna de energía y se puede obtener a partir de diferentes fuentes, como los azúcares, almidón y los materiales lignocelulósicos, sin embargo su aprovechamiento depende de la tecnología utilizada para su producción.

En el presente estudio se desarrolló un proceso para la producción de etanol a partir de residuos de mango obtenidos de diferentes puntos de venta de la Galería y una fábrica de producción de jugos de la ciudad de Manizales.

Estos residuos fueron acondicionados iniciando con un proceso de reducción de tamaño y análisis de su composición fisicoquímica y microbiológica, posteriormente se realizó un pretratamiento térmico a 121°C y 2 psi durante 30 minutos para posteriormente seguido a esto se llevo a cabo el proceso de hidrólisis a través de dos microorganismos (*Trichoderma spp* y *Aspergillus brasiliensis*), el seguimiento del proceso se realizó mediante la determinación del porcentaje de azúcares.

Finalmente, para el proceso de fermentación se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* por un tiempo de 44 horas, durante este tiempo se hizo evaluaron variables como el pH, densidad, viabilidad y población total de la levadura, porcentaje de etanol, azúcares totales, azúcares reductores, acidez total.

Los análisis microbiológicos realizados dan como resultado la presencia de Mesófilos aerobios con un recuento de  $80 \times 10^3$  UFC/g y Mohos y Levaduras con un recuento de  $30 \times 10^3$  UFC/g, y la ausencia de Coliformes totales y fecales, esto se soluciona con el pretratamiento térmico.

En el proceso de hidrólisis se obtuvieron los siguientes resultados, el material hidrolizado con *Aspergillus brasiliensis* presenta un rendimiento del 100% y el hidrolizado con *Trichoderma spp* un rendimiento del 98%.

Al realizar la fermentación obtuvimos un rendimiento de etanol en el hidrolizado con *Aspergillus brasiliensis* de 3,050 g alcohol/litro de solución y el hidrolizado con *Trichoderma spp* de 2,462 g alcohol/litro de solución.

**Palabras claves.** Holocelulosa, hemicelulosa, lignina, celulosa, hidrólisis microbiana, *Trichoderma spp*, *Aspergillus brasiliensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, mango (*Mangifera Indica L*).

## ABSTRACT

Ethanol is considered an alternate source of energy and can be obtained from various sources such as sugars, starch and lignocellulosic materials, but their use depends on the technology used for production.

In the present study we developed a process for producing ethanol from waste handled obtained from different points of sale from the gallery and a production plant juices from the city of Manizales.

These residues were fitted starting with a size reduction process and analysis of their physicochemical and microbiological composition then be made a thermal pretreatment at 121 °C and 20 psi for 30 minutes followed later this took place the process of hydrolysis through two microorganisms (*Trichoderma spp* and *Aspergillus brasiliensis*), monitoring the process was performed by determining the percentage of sugars.

Finally, for the fermentation process of *Saccharomyces cerevisiae* was used for a period of 44 hours, during which time he assessed variables such as pH, density, and population viability of yeast, the percentage of ethanol, total sugars, reducing sugars, acidity total.

The microbiological analysis carried out resulting in the presence of aerobic plate counts with a count of  $80 \times 10^3$  CFU / g Molds and yeast with a count of  $30 \times 10^3$  CFU / g, and the absence of total and fecal coliforms, this is solved with pretreatment heat.

In the hydrolysis process the following results were obtained, the hydrolyzate with *Aspergillus brasiliensis* presents a yield of 100% and *Trichoderma spp* hydrolyzate with a yield of 98%.

In conducting the fermentation yield of ethanol obtained in the hydrolyzate with *Aspergillus brasiliensis* 3.050 g alcohol / liter of solution and hydrolyzed with *Trichoderma spp* 2.462 g of alcohol / liter of solution.

**Keywords.** Holocellulose, hemicellulose, lignin, cellulose, microbial hydrolysis, *Trichoderma spp*, *Aspergillus brasiliensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, mango (*Mangifera indica* L).



## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y búsqueda de nuevos mecanismos biotecnológicos que permitan hacer uso de materias primas alternativas, es de mucha importancia, especialmente en casos donde materias primas producidas a gran escala por su uso en la alimentación son usadas para la obtención de productos destinados a otros fines, como por ejemplo la producción de etanol con objetivos carburantes a partir de maíz o caña de azúcar.

Si se tiene en cuenta que los residuos originados por la agroindustria pueden convertirse en materias primas y además conociendo que se encuentran desaprovechados y su degradación da origen a la producción de gases tóxicos, efecto invernadero, atracción de vectores y producción de lixiviados, que tienen consecuencias a corto, mediano y largo plazo. Es posible entonces considerar como una de las alternativas a esta problemática, la utilización de microorganismos capaces de transformar desechos a productos de interés.

Dentro de las materias primas provenientes del desarrollo agroindustrial, en el caso de nuestro país, se encuentran los residuos del procesamiento del mango de los cuales, una parte es utilizada en la alimentación animal y en otros casos es degradada al ambiente ocasionando problemas de contaminación ambiental, como los mencionados anteriormente.

Como una alternativa para dar solución a este problema y como valor agregado, los residuos agroindustriales del mango (*Mangifera indica L*), pueden ser utilizados como sustrato para la degradación biológica que debido a su contenido en material lignocelulósico lo convierte en un sustrato altamente productivo de azúcares fermentables entre otros productos que a su vez tienen numerosas aplicaciones en procesos industriales, como la obtención de alcohol carburante.

Lo anterior cobra más valor, considerando que la utilización de materiales lignocelulósicos viene siendo investigada intensamente, debido a que estos materiales representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo que constituyen una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía.

También es importante recordar que en la actualidad las fuentes mundiales de energía tradicionales se están agotando a un ritmo acelerado y su utilización como combustible no es apropiada ni resulta en beneficio para el medio ambiente. Las principales fuentes de energía son los combustibles fósiles, que al no ser aprovechados de forma racional tienden cada vez a agotarse, por lo que resulta imperiosa la necesidad de buscar fuentes alternativas de energía.

Unas de estas alternativas es la obtención de etanol, teniendo como materia prima los residuos de frutas provenientes de procesos agroindustriales, en este caso los residuos del procesamiento del mango (*Mangifera indica L*), ya que se constituyen en una alternativa viable, que amplía las posibilidades de solución a la contaminación ambiental, al ser esta una fuente de energía de costo ambiental bajo y que puede ser utilizada durante un período de tiempo más amplio si se lo compara con los combustibles fósiles.

Es conveniente que los residuos agroindustriales del mango (*Mangifera indica L*), sean sometidos a un pretratamiento y un proceso de hidrólisis donde se puedan liberar los azúcares fermentables, para lo cual hay varios métodos como los métodos químicos que ocasionan mayor contaminación, razón por la cual crece el interés en la hidrólisis enzimática que hace uso de los productos metabólicos de microorganismos que por sus características fisiológicas son capaces de producir enzimas degradadoras de polímeros, como la celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo estos los principales componentes de la biomasa vegetal.

La constante búsqueda de alcanzar mejores condiciones de vida del hombre ha dado lugar a un mayor nivel de desarrollo, caracterizado por un notable y constante avance tecnológico, lo que ha traído consigo un grave impacto en el entorno desde el momento mismo que el hombre apareció en escena. Dicho impacto debe ser contrarrestado por el medio en tal medida que permita que el equilibrio se restablezca.

Teniendo en cuenta lo anterior, debe ser por tanto, la misma tecnología la ruta que se deberá seguir para conseguir un modelo de desarrollo compatible con el entorno, sin que ello implique una paralización en la actividad productiva humana, complementando el alcance de mayores niveles de bienestar con impactos cada vez menores en el ambiente.

La producción de residuos sólidos orgánicos en América Latina y El Caribe varía entre el 30% y 60%, pudiendo ser utilizados mediante un proceso técnico de transformación para la obtención de diferentes productos, como: Humus, concentrado para alimentación de animales, y en el caso de esta investigación para obtener etanol.

Las grandes ciudades generan cantidades cada vez mayores de residuos, frecuentemente su disposición final se realiza en botaderos a cielo abierto o cuerpos de agua constituyendo un grave problema para la salud pública y ambiental, además los elevados volúmenes de residuos generados suponen importantes costos de recolección y disposición final.

Por otro lado, las fuentes mundiales de energía tradicionales se están agotando a un ritmo acelerado, en América Latina y en Colombia al igual que en el resto del mundo, las principales fuentes de energía son los combustibles fósiles, que al no

ser aprovechados de forma racional tienden cada vez a agotarse, por lo que cada vez cobran más importancia otras fuentes alternativas de energía.

Entre otros factores de importancia que impulsan la investigación sobre la producción de biocombustibles es la preocupación acerca del cambio climático, ya que se cree que éste es inducido por la acción humana, específicamente por el uso (combustión) de combustibles fósiles como: gasolina, diesel, gas licuado de petróleo, etc.

Desde el punto de vista económico, es posible pensar en el crecimiento de la economía nacional debido al desarrollo del sector agropecuario, ya que los biocombustibles líquidos, en específico los de primera generación, se producen a partir de agrocultivos.

En el caso de Colombia la demanda de energía aún no excede la capacidad de producción, sin embargo se espera que en un futuro en el aumento en la demanda, los biocombustibles puedan ser una alternativa viable de energía que podría satisfacer un porcentaje considerable de la demanda nacional de energéticos. En general, el uso de residuos agroindustriales como los del mango (*Mangifera indica L*), y otras frutas, para la producción de bioetanol podría ser una solución sustentable.

No hay que olvidar la importancia de la rentabilidad de los procesos de producción, en el caso concreto de biocombustibles y que esta depende en gran parte del costo de la materia prima, su pre-tratamiento y su conversión a producto final. Por este motivo, la mayoría de los estudios relacionados con la producción de biocombustibles se centran en la optimización del pre-tratamiento de la materia prima y el uso de fuentes alternativas de carbono.

Si consideramos la acumulación de residuos sólidos principalmente generados por el desarrollo de la agroindustria, éstos además de convertirse en una amenaza al ambiente, se constituyen en una oportunidad para el desarrollo de la industria biotecnológica al aprovechar los tres componentes que conforman los residuos vegetales: celulosa, hemicelulosa y lignina, como fuente de carbono para los microorganismos que poseen el complejo enzimático para metabolizar estos polímeros y liberar azúcares simples que pueden quedar a disposición de otros microorganismos fermentativos. Es importante tener en cuenta que en la actualidad en su gran mayoría, la actividad del bacteriólogo está enfocada al área de la salud, dejando a un lado otros campos que han sido poco explorados. Uno de estos campos es la industria, donde la importancia de este profesional radica en el conocimiento y el uso de los microorganismos, para la obtención de productos de gran beneficio para el ser humano. Con este trabajo es posible demostrar que debido a la formación profesional adquirida, le permite desempeñarse en diferentes campos de acción.

Resumiendo, éste es solo un ejemplo de la importancia de los estudios para el aprovechamiento de los residuos generados orientados a mejorar los procesos de producción, haciendo uso de la diversidad microbiana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar experimentalmente el proceso de fermentación de residuos agroindustriales del Mango (*Mangifera indica* L) usando *Saccharomyces cerevisiae*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Realizar el proceso de hidrólisis en los residuos agroindustriales de mango (*Mangifera Indica* L).
- Evaluar el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación empleando como sustrato la materia prima seleccionada.

## **3. MARCO DE REFERENCIA**

### 3.1 ANTECEDENTES

- En la universidad EAFIT en el año 2007, aplicaron tratamientos de hidrólisis al residuo del mango común con el fin de hacer la conversión de sus polisacáridos a unidades fermentables y obtuvieron como conclusiones que el tratamiento que mejor combina la producción de azúcares fermentables y condiciones de tratamientos suaves, es la hidrólisis térmica más la hidrólisis enzimática (Mejía *et al.*, 2007).
- Montoya Naranjo y F. Orozco Sánchez, proponen diferentes alternativas de aprovechamiento de los residuos industriales y obtuvieron como conclusión que los residuos generados por las empresas procesadoras de frutas no son adecuados para el tratamiento térmico (Yepes *et al.*, 2008).
- En el 2009 investigadores de la universidad de San Buenaventura con sede en Cali evaluaron la producción de etanol a partir de hidrólisis y fermentación simultánea (HFS) de residuos generados en el procesamiento de mango común (*Mangifera indica*) utilizando dos cepas de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* recombinante RH 218, obteniendo como conclusión que es favorable realizar tratamientos que favorezcan de los materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol al reducir el tamaño de la partícula de la materia prima a 245  $\mu\text{m}$  (Ockham *et al.*, 2009).
- Científicos de la universidad tecnológica de Pereira en el 2009 realizaron pretratamientos de la celulosa y la biomasa para su conversión a productos fermentables por la ruta etanólica, obteniendo como conclusión que las investigaciones analizadas se dirigen hacia el aprovechamiento de los residuos agroindustriales como materia prima para la fabricación de etanol mediante procesos enzimáticos o químicos de bajo costo (Guarnizo *et al.*, 2009).

### 3.2 MARCO TEÓRICO

En las ciudades se generan residuos de materia orgánica que proceden básicamente de restos de alimentos (domiciliarios, de hostelería, mercados, industrias alimenticias y agroindustrias), mataderos y carnicerías, barrido y poda de parques y jardines, y lodos de depuradoras de aguas residuales.

En aquellas ciudades en las que existen plantas de compostaje, éstas se hacen cargo generalmente sólo de la materia orgánica constituida por restos de alimentos, transformándola en compost que normalmente no ofrece la calidad

necesaria para ser un producto apreciado y valorado monetariamente dado su nivel de impurezas e incluso de contaminantes peligrosos.

Aunque actualmente los procesos mecánicos de separación de la materia orgánica y de compostaje han mejorado notablemente, sólo se consigue calidad y rentabilidad monetaria aceptable en contados casos en los que se procede a la recogida selectiva en origen de los residuos orgánicos, separados previamente (49).

Desafortunadamente, la gestión de residuos no es apropiada debido al abandono general de los asuntos ambientales concernientes a la erosión del suelo, a la agricultura y al aprovechamiento de los residuos, y se dificulta debido a la falta de experiencia y conocimiento de los procesos de compostaje y a la ausencia de legislación que obligue al cumplimiento de ciertos objetivos (50).

Por otra parte, se pueden obtener productos de mayor valor agregado si los residuos son tratados mediante técnicas biotecnológicas. Como ejemplo se puede citar la obtención de quitina o quitosano a partir de residuos de crustáceos.

Siguiendo este mismo ejemplo se pueden obtener productos a partir de residuos de frutas los cuales por su contenido de azúcares pueden tener algunos usos como fuente de obtención de etanol, alimentación animal, abono de buena calidad; etc.

Actualmente en Colombia, los residuos producidos por las industrias de jugos y pulpas son en su mayoría materias primas ricas en carbohidratos de bajo costo, y fuente abundante de azúcares fermentables pero están siendo subutilizados, lo cual causa serios problemas de contaminación ambiental, a pesar de que son potencialmente buenos para ser utilizados como materia prima en la producción de azúcares, alimento para animales, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos, obtención de biogás, en la extracción de aceites esenciales, pectinas, flavonoides, entre otros.

**3.2.1 Alternativas de aprovechamiento de residuos agroindustriales.** Existen básicamente tres grupos de tecnologías para la recuperación de recursos: el aprovechamiento biológico y químico, la obtención de combustibles (derivados de desechos) y el aprovechamiento térmico (51; 93; 92).

**3.2.1.1 Aprovechamiento biológico y químico.** Este tipo de tecnología permite efectuar la disposición final de los residuos orgánicos para obtener gases, líquidos o sólidos que pueden ser comercializables. Entre los procesos biológicos más comunes y más usados por las industrias se encuentran el compostaje y la lombricultura. A continuación se realiza una breve descripción de éstos y de otras alternativas pertenecientes a este grupo.

- **Compostaje.** El compost es el producto final obtenido mediante un proceso de descomposición biológica de la materia orgánica, en condiciones controladas de humedad y temperatura, que oscila entre 50 y 70°C, provocando así la destrucción de elementos patógenos y por tanto la total inocuidad del producto. Este material puede ser usado como mejorador de suelos o como abono.
- **Lombricultura.** La lombricultura es una técnica en la que además del abono, se puede obtener proteína animal usando para ello la lombriz roja californiana que se alimenta de la materia orgánica y la convierte en humus o abono natural (57). El humus, producido por la lombriz, está compuesto principalmente de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, encontrándose también una gran cantidad de microorganismos como hongos y bacterias. Las cantidades de estos elementos dependerán de las características químicas del sustrato que dieron origen a la alimentación de lombrices (72). Estas lombrices pueden criarse en cualquier lugar del planeta que posea temperaturas entre 20 y 25°C, un intervalo de temperatura en el cual esta técnica presenta su mayor rendimiento (91).
- **Pectinas.** Las pectinas son polisacáridos que se componen principalmente de unidades de ácido galacturónico unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$  1-4. Son sustancias blancas amorfas (homogalacturonanos, ramnogalacturonano) que forman en agua una solución viscosa; combinadas en proporciones adecuadas con azúcar y ácidos, forman una sustancia gelatinosa utilizada como espesante (67).
- **Enzimas.** Son biocatalizadores de naturaleza proteica. Todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a la acción de catalizadores o enzimas.
- **Aceites esenciales.** Comúnmente llamados esencias. Están constituidos principalmente por terpenos, son sustancias de consistencia grasosa, más o menos fluidas, a veces resinosas, muy perfumadas, volátiles, casi siempre coloreadas y más livianas que el agua. Los aceites esenciales pueden extraerse de las flores, hojas, semillas, frutos, cortezas, raíces o de la madera (86).
- **Flavonoides y carotenoides.** Los flavonoides o bioflavonoides son pigmentos naturales presentes en las frutas y en los vegetales, así como en el café, la cocoa y la cerveza, que protegen del daño de los oxidantes, como los rayos ultravioleta (67). Los flavonoides se utilizan como suplemento alimenticio para animales y humanos, ingredientes de bebidas refrescantes y confites, desodorización, desinfección, inhibidores de trombosis, antiinflamatorios, inhibidores de cáncer, antialérgicos, edulcorantes, bioflavonoides (vitamina P) y antioxidantes (78). Al igual que



los flavonoides, los carotenoides también poseen esta propiedad antioxidante.

- **Hongos comestibles.** Los hongos comestibles son organismos heterótrofos, es decir, que requieren del material orgánico para subsistir. Poseen el doble del contenido de proteínas que los vegetales y disponen de nueve aminoácidos esenciales, contando además con leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales). Poseen alta cantidad de minerales y vitaminas (superando a la carne de muchos pescados). Completan la caracterización sus bajas calorías y carbohidratos (88).
- **Fibra dietaria (alimento para animales y humanos).** Constituyente que da firmeza y textura fuerte a las estructuras externas de las frutas. Posee efectos preventivos contra determinadas enfermedades cardiovasculares y ayuda a mejorar la función gastrointestinal. La fibra dietaria obtenida principalmente de las cortezas de las frutas, consta de polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa, pectinas, rafinosa y estafinosa), polisacáridos no estructurales (gomas y mucílagos), sustancias estructurales no polisacáridas (lignina) y de otras sustancias como cutina, taninos y suberina (69).
- **Obtención de combustibles.** El biogás es el producto gaseoso que se obtiene de la descomposición de la materia orgánica mediante acción bacteriana o de su combustión en condiciones anaeróbicas y por esto es considerado como un subproducto del compostaje y de la pirólisis. El biogás está compuesto principalmente por metano (50-60 %), dióxido de carbono (35-45 %) y trazas de hidrógeno y nitrógeno (87). Es incoloro, inodoro e insípido, por lo que es difícil detectarlo. Se usa para la producción de la energía eléctrica, térmica y como biocarburante (51). Para la generación de biogás hay dos variables de principal interés, la temperatura y el tiempo. La temperatura de proceso debe estar entre 30 y 40 ° C y el tiempo para alcanzar la producción adecuada de metano depende de la temperatura y de la materia orgánica empleada para tal fin (72). Otro uso importante del biogás es la obtención de hidrógeno.

Este proceso consiste en una descomposición térmica catalítica del metano contenido en el biogás. Finalmente, el flujo gaseoso obtenido debe ser limpiado para conseguir un producto con bajo contenido de CO lo que lo hace adecuado para usarse como combustible, así como en la síntesis de amoníaco, metanol, en refinerías, entre otros (62). Para la obtención de otro combustible como el metanol, se requiere que el material biomásico usado tenga una humedad inferior al 60 %, ya que los residuos con una humedad alta tienen un bajo poder calorífico (72).

**3.2.1.2 Aprovechamiento térmico.** Desde el punto de vista físico y químico, los procesos de conversión energéticos se basan en la degradación de las moléculas orgánicas por la acción del calor (61). Las tecnologías que procesan térmicamente los residuos buscan la reducción de su volumen y la recuperación de energía a partir de los gases, líquidos y sólidos que se generan.

Estos procesos térmicos pueden clasificarse según los requerimientos de oxígeno. Los que requieren de oxígeno se conocen como calderas o incineradores. Los que no, se conocen como pirólisis y termólisis (58).

- **Incineración.** Esta alternativa es llamada usualmente como la “solución final” al problema de los residuos sólidos. La combustión crea gases calientes que por una transferencia de calor por convección transforman el agua contenida en los tubos en vapor de agua. Este vapor puede ser usado para generar energía (51). Durante este proceso se generan ciertas sustancias tóxicas conocidas como dioxinas y furanos. Las dioxinas y furanos (policloro-dibenzo-p-dioxinas, PCDDs y policloro-dibenzofuranos, PCDFs), son compuestos organoclorados con características químicas similares que se caracterizan por su persistencia en el ambiente y su baja biodegradabilidad. (52). No se recomienda la incineración sin aprovechamiento energético, ya que se produce CO<sub>2</sub> que contribuye al efecto invernadero y calentamiento global.
- **Pirólisis.** Consiste en la descomposición de la materia orgánica por calentamiento hasta llegar a la degradación de las sustancias carbonosas, entre 400 y 800°C, en total ausencia de oxígeno y presión controlada. Este método puede reducir el volumen de los residuos hasta en un 95%. La pirólisis teórica de una molécula de celulosa genera CO, H<sub>2</sub> y C; además de metano, dióxido de carbono y vapor de agua, entre otros, que originan serios problemas de índole ambiental (61). Cuando un residuo es pirolizado se obtiene una mezcla de gas, líquido y sólido según el tipo de residuo y la tecnología usada que permita un mayor grado de utilización.

**3.2.2 Mango (*Mangifera indica*).** El residuo del mango común (*Mangifera indica* L.) es un material vegetal que contiene gran cantidad de tejido lignocelulósico, el cual puede ser aprovechado para la obtención de metabolitos fermentables y productos de la fermentación.

El mango (*Mangifera indica* L.), pertenece a la familia Anarcadiaceae, que incluye alrededor de 600 miembros. Es una fruta popular y conocida como el rey de las frutas. Se cree que es una de las frutas más antiguas cultivadas; su origen es encontrado en la región Indo-Burma(34).

Su temperatura óptima de crecimiento es aproximadamente 24°-27°C, en suelos cuyo pH esté alrededor de 5.5-7.5 (35). Actualmente representa 2 millones de

hectáreas solamente en la India. Crece en zonas tropicales a alturas de 4,000 Ft. sobre el nivel del mar, y a 2,000 Ft. En zonas donde las estaciones estén muy marcadas.

El tamaño de la fruta varía de 2.5-30 cm de largo. Su forma es ovalada o redonda, con un hueso interior de tamaño significativo. Crece en árboles de hoja perenne. Presenta grandes variedades de tamaño y caracteres. El color depende de la región donde este cultivado, pero abarca mezclas de verde, amarillo y rojo. (11).

Es una fruta climatérica (adaptación) que es estado de maduración, ideal para el consumo, dura pocos días (33). En Colombia, se produce Mango en abundancia y es utilizado en gran proporción por la industria procesadora de alimentos. La cantidad de residuos industriales generados en el procedimiento y que se consideran desperdicios, pueden ser racionalmente empleados para la extracción de materias primas.

**3.2.2.1 Demanda de mango.** El consumo del mango, agrupando fresco como procesado, se concentra en los países asiáticos y latinoamericanos, entre los que destacan los del continente asiático como India, China, Tailandia, Filipinas, Pakistán e Indonesia. Estos países reportaron para el año 2007 una tasa de consumo per cápita de 5,3 kilogramos por año (FAO 2007). Sin embargo, los países que no lo producen cuentan con altos niveles de consumo, en este sentido se destaca principalmente el mercado de los Estados Unidos (EE.UU.), seguido por países de la Comunidad Económica Europea (CEE) (32).

Tal como se puede apreciar los diez mayores consumidores de mango, en su orden, son: la India, China, Tailandia, Indonesia, México, Pakistán, Filipinas, Brasil, Nigeria y Egipto. Colombia, que ocupa la vigésima cuarta posición y tuvo un consumo aparente de 3,9 kilos per cápita en el 2007.

De acuerdo con MADR 2006 con datos de FAO, el consumo de mango fresco y procesado per cápita anual, el mayor consumo lo tiene la isla de Santa Lucía con 194 kilos/ habitante. Es de resaltar que de los diez primeros países, cuatro corresponden a islas de las Antillas (Dominicana, Granada, Cuba, Antigua y Barbuda), que tienen una altísima vocación turística representada en el flujo permanente de cruceros. Colombia por su parte, con un consumo de 3,58 kilos per cápita ocupó la posición número 47 (23).

La mayor producción del mango en Colombia proviene principalmente de variedades criollas o prototipos regionales que se caracterizan por una alta estacionalidad de la cosecha. Igualmente, la mayor parte de la producción de mango criollo se destina y comercializa en el mercado nacional con la agroindustria, mientras que por su parte las áreas de mango fino se destinan para consumo fresco y solo una parte relativamente pequeña se exporta. (22). De las 17.225 hectáreas con mango en producción en Colombia al 2005, se estima que

4.160 hectáreas, es decir, el 26,6% pertenecen a variedades mejoradas, comúnmente conocidas como variedades finas.

Las empresas procesadoras de frutas con mayor participación dentro del sector, son: fabricación de jugos (40%); encurtidos y salsas (24%); conservas (16%); otros preparados como concentrados de frutas, pulpas de frutas y vegetales congelados (12%); mermeladas y jaleas (7%); la elaboración de frutas pasas no reportó datos para el año 2000, pero en promedio su participación en la industria no sobrepasa el 1% del total, los bienes finales de este sector se caracterizan por ser heterogéneos entre sí, y evidencian gran innovación y aporte de valor agregado. (6). De acuerdo con el DANE y el Plan Frutícola Nacional PFN del 2006, la oferta bruta de mango en Colombia 2006 alcanzó 165000 toneladas, de las cuales, el consumo urbano represento el 44% del total de ellas, es decir, 72.000 toneladas.

**3.2.2.2 Composición del mango.** La semilla del mango abarca del 9 al 27% aproximadamente del peso total de la fruta. El color de la piel varía con la madurez y el cultivo. Su contenido de carotenoides aumenta durante su madurez; es buena fuente de provitamina A (4).

La parte comestible del fruto total corresponde entre el 60 y el 75%. El componente mayoritario es el agua en un 84%. El contenido de azúcar varía de 10-20% y de las proteínas en un 0.5%.

El ácido predominante es el ácido cítrico aunque también se encuentran el ácido málico, succínico, galacturónico, tartárico y oxálico en cantidades menores (11).

**3.2.2.3 Contenido nutricional.** El mango es una fruta popular en su mayoría es consumido en estado fresco; ya que es considerado como una de las frutas tropicales más deliciosas (11). Representa una importante fuente nutritiva por su contenido en vitaminas y minerales. La tabla 1 muestra el contenido de nutrientes en promedio por 100g.(31)

Agua	81.7%
Calorías	66 cal
Proteína	0.7 g
Grasa	0.4 g
Carbohidratos totales	16.8 g
Fibra	0.9 g
Ceniza	0.4 g
Calcio	10 mg
Fósforo	13 mg
Hierro	0.4 mg

Sodio	7 mg
Potasio	189 mg
Vitamina A	4,800 UI
Tiamina	0.05 mg
Riboflavina	0.05 mg
Niacina	1.1 mg
Ácido Ascórbico	35 mg

**Tabla 1.** Composición nutricional del mango.(16)

El mango se caracteriza por ser una fuente importante de vitamina A, B y contiene cantidades variantes de vitamina C (15). Su composición depende de la variedad, así como en el estado de madurez que se tenga. (9). El contenido ascórbico y la acidez total disminuye durante el desarrollo del fruto, mientras que los carotenoides y azúcares totales aumentan (3).

**3.2.2.4 Cosecha y maduración del mango.** Una maduración adecuada al mango de recolección es indispensable ya sea para la venta del fruto fresco o en este caso para su procesamiento (32). El mango si se recolecta demasiado verde se produce una maduración no normal y desarrolla arrugamiento de la piel, sabor, color y aroma pobres aun si se usan maduradores artificiales como el acetileno o etileno. Si se cosecha sobre madurado tampoco es bueno ya que no se puede almacenar satisfactoriamente y se puede desarrollar una pulpa muy suave alrededor del hueso. La mayoría de los cultivadores de mango se fijan en el cambio de tono de la cáscara para recolectarlos (33), el cual va de verde embotado a olivo (33).

Debido a que el mango es una fruta climatérica, inmediatamente después de cosecharse, el mango se empaca rápidamente; puesto que dura aproximadamente 16 semanas y muestra un pico climatérico máximo alrededor de la cuarta semana. (11).

**3.2.2.5 Conservación del mango.** El propósito de la conservación de alimentos es alargar la vida de anaquel. Se debe considerar que el proceso de preservación puede no retener todas las características deseables en la fruta. Las principales formas de conservar a las frutas son: mínimamente procesadas, enlatadas, congeladas, irradiadas, cristalizadas, sometidas a altas presiones y tratamiento térmico (9). El principal proceso de preservación que se emplea es la deshidratación.

**3.2.2.6 Composición química zumo de mango.**

<b>Hidratos de carbono</b>	<b>15.8 gr</b>
Kilocalorías por 100 gramos de alimento	63 kilocalorías
Proteínas	0.6 gr
Grasas totales	0.1 gr
Colesterol	0 mg
Fibra	1.5 gr
Sodio	7 mg
Calcio	10 mg

**Tabla 2.** Composición química zumo de mango

% Humedad	82.0
% Sólidos totales	18.0
% Sólidos solubles	16.8
% Carbohidratos	11.8
% Fibra	4.6
% Cenizas	0.19
Vit A UI	3894
Vit C mg/100g	14.65

**Tabla 3.** Composición química "Haden Muñoz"

**Fuente.** Peña, Hector, *et. al.* Fruticultura Tropical, 1° Parte. ICFES, PAG 14

### 3.2.2.7 Caracterización físico-química de los residuos del mango

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Humedad	69,00
Almidón	0
Extracto etéreo	0,48
Fibra cruda	9,49
Proteína	0,86
Azúcares totales	5,77
Otros compuestos	14,39

**Tabla 4.** Caracterización físico-química de los residuos del mango

**Fuente.** Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, vol. 61, núm. 1, junio, 2008, pp. 4422-4431 Universidad Nacional de Colombia

COMPUESTO QUÍMICO	MANGO MUESTRA 50% CÁSCARA - 50% BAGAZO
% Celulosa	5.20
% Hemicelulosa	3.70
% Lignina	4.73
% Cenizas	3.38
°Brix	4.4
pH	4.08

**Tabla 5.** Caracterización química de un sustrato de fermentación basado en residuos de mango (50% cáscara - 50% bagazo de mango)

**Fuente.** Revista Científica Guillermo de Ockham. Vol. 7, No. 2. Julio -Diciembre de 2009 - ISSN: 1794-192X

**3.2.3 Material lignocelulosico.** Los residuos de mango están compuestos en su mayoría por material lignocelulosico. Este material está compuesto por la lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) que es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (102). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (103).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (104).

La celulosa es sintetizada, en menores proporciones, por bacterias del género *Acetobacter* y los tunicados (105). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y Dglucurónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (106).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (107). Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas)

(106). En los residuos lignocelulósicos existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.

**3.2.3.1 Degradación de la celulosa.** La celulosa es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de  $\beta$ -D glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos. La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals (99). Los aportes de celulosa al suelo varían mucho con la región, el clima y los cultivos (98).

La celulosa es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas: endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que ataca los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos).

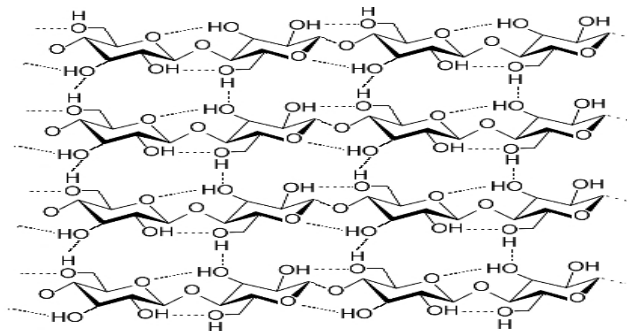
exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula,  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (101).

La hidrólisis de la celulosa intacta se cumple mejor cuando estas tres enzimas operan al unísono, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* que se encuentra entre la célula y el substrato al cual hidroliza. El celulosoma está constituido por nueve sitios polipeptídicos de adhesión a la molécula de celulosa, unidos a segmentos duplicados que a su vez se unen a otro polipéptido sobresaliente de la capa superficial en la pared celular (100).

En los suelos bien aireados la celulosa es degradada y utilizada por varios microorganismos aerobios (hongos, mixobacterias y otras eubacterias). En el rumen, bajo condiciones anaeróbicas, la celulosa es atacada por bacterias y unos pocos hongos anaeróbicos del grupo *Chytridiomycetes* (99).

Los hongos tienen más éxito que las bacterias durante la celulólisis en los suelos ácidos o en la madera (lignocelulosa). Excretan celulasas que pueden ser aisladas del medio de cultivo así como del micelio. Las bacterias deslizantes y las mixobacterias no excretan celulasas al medio, pero se adhieren a las fibras de celulosa para digerirlas. En los ambientes anaeróbicos la celulosa es degradada por eubacterias meso y termofílicas, por ejemplo *Clostridium thermocellum*. Esta bacteria crece en un medio mineral con celulosa pero no con glucosa. La digestión de la celulosa por diversas bacterias está acompañada de la secreción de una sustancia carotenoide amarilla que sirve como indicador de la hidrólisis. En el rumen, el 90% de la celulosa es metabolizada, siendo el sistema natural más eficiente (99).





**Figura 1.** Estructura de la celulosa

Fuente. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/243955>

Organismos eucarioticos				
Quitridiomycetos	Hongos mitosporicos	Ascomycetos	Basidiomycetos	
<i>Neocallimastix</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Coprinus</i>	
<i>Orpinomyces</i>	<i>Botrytis</i>		<i>Fomes</i>	
<i>Piromonas</i>	<i>Fusarium</i>		<i>Pleurotus</i>	
<i>Sphaeromonas</i>	<i>Humicola</i>		<i>Polyporus</i>	
	<i>Myrothecium</i>		<i>Trametes</i>	
	<i>Trichoderma</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
Organismo procaroticos				
Mixobacterias	Bacterias deslizantes	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomicetos
<i>Archangium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Polyangium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Sorangium</i>			<i>Clostridium</i>	<i>Streptosporangium</i>
			<i>Eubacterium</i>	
			<i>Ruminococcus</i>	

**Tabla 6.** Algunos microorganismos que digieren la celulosa

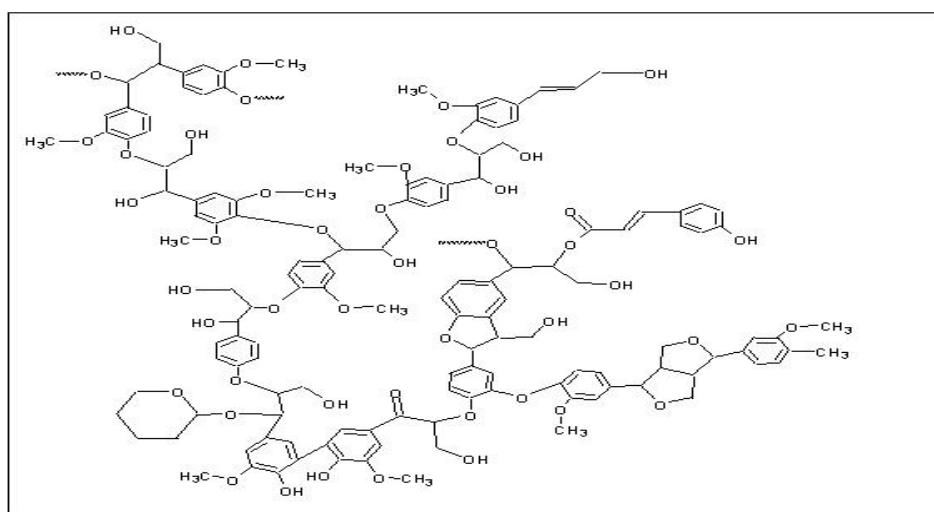
**3.2.3.2 Degradación de lignina.** El contenido en lignina del tejido leñoso varía entre 18 y 30% del peso seco. Está ubicada en la lámina secundaria de las paredes celulares y es el componente de las plantas degradado más lentamente. No es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja (98). Los monómeros son todos derivados del fenilpropano, principalmente alcohol coniferilo.

La complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de la lignina se manifiestan en el contenido de grupos metoxi: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto, 14% en gramíneas (99). Las unidades fenilpropano están entrecruzadas por múltiples enlaces éter y C-C, que son extremadamente resistentes al ataque enzimático. La lignina es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por microorganismos (96).

Dos grupos de hongos se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo y los que provocan la podredumbre blanca que degradan

lignina. Entre estos últimos se encuentran *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Xylaria* (98).

La degradación de lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces  $\beta$ -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren  $H_2O_2$  proveniente de la oxidación por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera. Sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular liberados actúan luego las fenoloxidasas (99).



**Figura 2.** Estructura de la lignina

**Fuente.** <http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/inorganic/inorganicmodulespan.html>

**3.2.3.3 Degradación de xilanos y otras hemicelulosas.** Las hemicelulosas consisten en polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico). Son sustancias de soporte o de almacenamiento en las plantas (99).

El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30% de xilano, la madera de coníferas 7 - 12% y la de árboles de hojas caducas 20 - 25%. La cadena consta de 30 - 100 unidades de b-D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos.

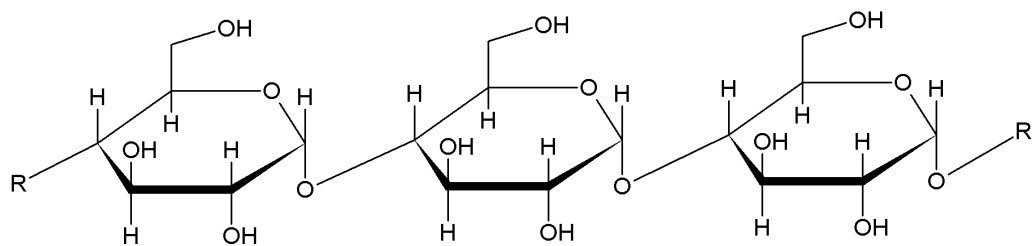
Algunos xilanos también presentan arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C3 de la xilosa. El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. La xilanasa que es constitutiva en algunos clostridios e inducible en otros organismos, produce xilosa, xilobiosa y oligómeros de 2 a 6 unidades. Muchos organismos excretan xilanasas, en los suelos neutros o alcalinos predominan *Bacillus*, *Sporocytophaga*, *Clostridium* y otras bacterias pero en los

ácidos, los hongos (99). La temperatura óptima para la descomposición es 37°C, y para los actinomicetos termófilos entre 45 y 50°C.

Los mananos constituyen el 11% del peso seco de la madera de algunas coníferas. Son hidrolizados por muchos organismos que también actúan sobre galactomananos y glucomananos. Los galactanos son degradados más lentamente que otras hemicelulosas y tienen enlaces  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3 glicosídicos.

Las galactanasas microbianas producen galactosa, galactobiosa y galactotriosa. Algunos organismos producen varias enzimas simultáneamente, como *Fusarium oxysporum* que creciendo en tomate sintetiza arabanasa, xilanasa, galactanasa y glucanasa. Las enzimas extracelulares pueden ser adsorbidas por las arcillas, disminuyendo su actividad (98).

La degradación de las hemicelulosas está determinada la disponibilidad de nitrógeno como ocurre con la descomposición de la celulosa. Las hemicelulosas de plantas maduras son degradadas más lentamente que las del tejido más joven. Por otra parte, al mismo tiempo que se degradan los polímeros vegetales, los microorganismos sintetizan otros polisacáridos como los glucanos y pentosanos de los mohos, los mananos de las levaduras, los glucanos y levanos de las cápsulas bacterianas (96).



**Figura 3.** Estructura xilanos

**Fuente.** <http://cmackay.wordpress.com/2009/07/22/composicion-y-propiedades-del-roble/>

**3.2.4 Tratamiento del material lignocelulósico para obtener azúcares fermentables.** Etapas para liberar los azúcares presentes en los materiales lignocelulosicos: El objetivo de los pretratamientos es aumentar la susceptibilidad del material (para obtener un sustrato lignocelulósico reactivo que sea altamente accesible) al ataque de microorganismo y enzimas en su utilización o procesamiento bioquímico de los mismos.

#### **3.2.4.1 Pretratamiento mecánico.**

- **Trituración mecánica.** Molienda para reducción de partícula del tamaño de malla inferior a 40, tiene un efecto mínimo en los rendimientos de la hidrólisis, así como la tasa de hidrólisis de la biomasa (108).

- **Ultrasonido.** Es una técnica empleada para extraer lignina y hemicelulosa (109), este método se emplea a 25°C y diferentes períodos de tiempo entre 10 a 60 min generando un mejor tiempo de residencia a los 30 min.; sin embargo, su efecto sobre la biomasa es muy superficial comparado con métodos como el pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**3.2.4.2 Pretratamiento térmico.** En este tipo de pretratamiento la materia prima es calentada en un rango de 150 a 180°C, donde la hemicelulosa y seguida a ella la lignina son solubilizadas (110). Temperaturas superiores a 180 °C solubiliza la hemicelulosa (111). Durante los procesos térmicos una parte de la hemicelulosa es hidrolizada y forma ácidos, estos son asumidos como catalizadores para hidrolizar la hemicelulosa (112).

- **Explosión por vapor.** La materia prima se somete a temperaturas entre 160-260°C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras), y químicas (despolimerización y rotura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables a controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (113).
- **Agua líquida a alta temperatura (LHW).** En este proceso se somete la biomasa al efecto de agua caliente a una temperatura entre 170 – 230°C por un tiempo de 46 min. El objetivo de este pretratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de estos, el pH debe mantenerse entre el 4 y 7 durante el pretratamiento. Mantener el pH en este rango minimiza la formación de monosacáridos y, por lo tanto, también la formación de productos de degradación que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico durante el pretratamiento (114).

### 3.2.4.3 Pre-tratamientos físico-químicos.

- **Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX).** Este pretratamiento se realiza con cargas de amoníaco en torno a 1:1 (amoníaco kg/kg peso biomasa seca) a temperaturas que van desde 25°C a 120°C, con una duración de 10 a 60 días, (115). También se da un aumento de seis veces la hidrólisis enzimática y un rendimiento de 2,5 veces el rendimiento a etanol después de este pretratamiento.
- **Explosión con CO<sub>2</sub>.** Se lleva a cabo con alta presión y altas temperaturas de hasta 200 °C, con una duración de varios minutos. Este pretratamiento

produce líquidos que pueden ser ácidos, estos ácidos hidrolizan especialmente la hemicelulosa. El CO<sub>2</sub> también se aplica como CO<sub>2</sub> supercrítico (35 °C, 73 bares), este incrementa el rendimiento de glucosa en 50-70% de bagazo (116), esto es probablemente causado por el aumento del tamaño de poros.

#### 3.2.4.4 Pretratamiento químico.

- **Hidrólisis ácida.** Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (118). Siendo solamente usados a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los métodos industriales de hidrólisis ácida se agrupan en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados (10-30%), trabajan a bajas temperaturas (170-190°C) y mayor tiempo de residencia; y los que utilizan ácidos diluidos (1-5%), a temperaturas más altas (160-240°C), y tiempo de reacción de 6-12 segundos.
- La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosa, especialmente xilano como glucomanano. La hemicelulosa puede ser sometida a reacciones hidrolíticas produciendo monómeros, como 5-(hidroximetil) furfural y otros productos (119). Durante el pretratamiento ácido la lignina es rápidamente condensada y precipitada en ambientes ácidos (120).
- **Oxidación húmeda.** Un pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético a la biomasa, que está sumergida en el agua. Durante el pretratamiento oxidativo puede tener lugar reacciones como sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimientos de vínculos de alquil, aril, éter o de núcleos aromáticos (121).
- **Tratamientos con ozono.** El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa. Se lleva a cabo a condiciones de presión y temperatura ambientales. La degradación es esencialmente limitada a atacar la lignina y hemicelulosa aunque la celulosa es afectada (122).
- **Hidrólisis con álcalis.** Se lleva a cabo con NaOH diluido donde se sumerge el material lignocelulósico, a 60°C por 24 horas, produciendo un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como solvatación y saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa, lo que la hace más accesible para enzimas y bacterias. Disoluciones de álcalis fuertes dan lugar a hidrólisis alcalina, degradación y descomposición de polisacáridos y rompimiento de radicales finales. La pérdida de

polisacáridos es causada principalmente por el rompimiento de radicales finales y reacciones hidrolíticas (119).

- **Tratamiento con solventes orgánicos.** En el proceso, un compuesto orgánico o acuoso se mezcla con un ácido inorgánico (HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), este se utiliza para romper el interior de la lignina y puentes de hemicelulosa. Se emplean disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurílico. Ácidos orgánicos como oxálico, acetilsalicílico y salicílico también puede ser utilizados como catalizadores en el proceso. A temperaturas altas (por encima de 185 °C), el uso de catalizadores es innecesario para la deslignificación (123).

**3.2.4.5 Pretratamientos biológicos.** En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas o microorganismos, como hongos con capacidad de degradar residuos. Lo que se busca es sintetizar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático, por lo que generalmente se hace necesario hacer primero un tratamiento con hongos y posteriormente con las enzimas.

- **Tratamiento con hongos.** Utiliza microorganismos como hongos capaces de degradar la madera para llegar a la lignina y hemicelulosa en los materiales de desecho. Existe un grupo de hongos capaces de atacar la celulosa, y otro grupo que ataca la celulosa y lignina, por lo tanto son más eficaces el último grupo de hongos para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulosicos (124).
- **Tratamiento con bio-solventes orgánicos.** Emplea solventes orgánicos y hongos, el primero para permitir la acción de hidrólisis en la hemicelulosa y el segundo para la descomposición de la red de lignina. Se han realizado estudios con etanol como solvente y hongos para la degradación de lignina en madera, los hongos usados fueron *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Pleurotus ostreatus*, y *Coriolus versicolor*. El pretratamiento biológico puede ahorrar el 15% de la electricidad necesaria en la etanólisis, el etanol puede ser reutilizado y es amigable con el medio ambiente (125).

**3.2.5 Hidrólisis.** Cuya función es liberar la glucosa presente en los materiales lignocelulosicos. El proceso de obtención de etanol a partir de un residuo lignocelulósico involucra como etapa fundamental la producción de azúcares fermentables a partir de celulosa y hemicelulosa. Después que el material lignocelulósico ha recibido determinado pretratamiento se realiza el proceso de la hidrólisis de la celulosa y las hemicelulosa.

**3.2.5.1 Hidrólisis acida.** Se basa en el empleo de un catalizador no específico, que puede separar la lignina del material, como por ejemplo hidrolizar la celulosa.

**3.2.5.2 Hidrólisis enzimática.** Se basa en el empleo de enzimas provenientes de microorganismo que actúan como un catalizador macromolecular específico.

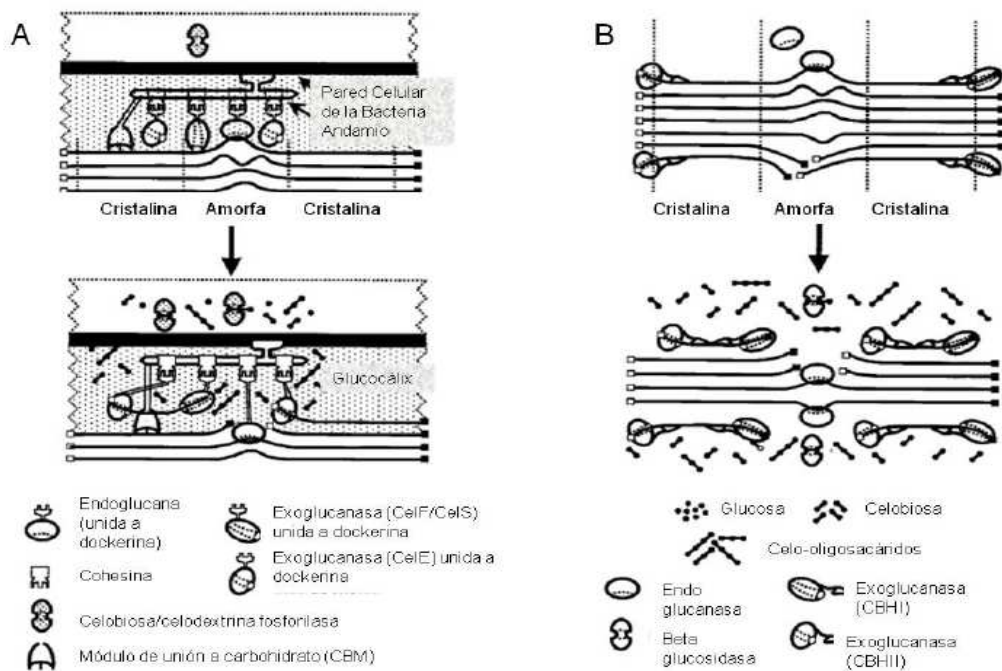
**3.2.5.2.1 Enzima hidrolíticas *Aspergillus oryzae*.** La alfa-amilasa ( $\alpha$  1,4-D-GlucanGlucano-hidrolasa) hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa en unión alfa-1,4. El ataque se hace en forma no selectiva (tipo endoenzima) sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5-7 unidades de glucosa, o un número múltiplo (46).

**3.2.5.2.2 Enzima hidrolíticas *Aspergillus brasiliensis*.** La amiloglucosidasa (Alfa-1,4- D-Glucan glucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y alfa-1,6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (47).

Puesto que la glucoamilasa es la única entre todas las amilasas que libera glucosa a partir del almidón en un tiempo relativamente corto, se puede valorar determinando la glucosa formada tras un corto tiempo de reacción, para ello se emplean glucosa oxidasa y peroxidasa o mejor hexoquinasa y glucosa-6-p-deshidrogenasa (46).

**3.2.5.2.3 Enzima hidrolíticas *Trichoderma reesei*.** La celulasa forma parte de las paredes celulares de las plantas e hidroliza los enlaces beta-1,4 glucano de las cadenas de celulosa y de sus productos de degradación formando, glucosa, celobiosa y polímeros de la glucosa más grandes, además de ocasionar disminución en la viscosidad (48).

El pH óptimo de los sistemas celulolíticos suele estar entre 4-6. Son termoestables y la temperatura óptima para algunos de ellos se encuentra alrededor de 60°C. Se trata por lo tanto de dos parámetros favorables para la aplicación técnica siempre que se consiga aumentar la actividad celulolítica y hacer a la celulosa atacable por los sistemas enzimáticos mediante un tratamiento previo sencillo (46).



**Figura 4.** Degradación enzimática de material lignocelulósico  
Fuente. (Modificado de Lynd et al., 2002).

Luego completada la hidrólisis enzimática de la celulosa y la hemicelulosa, procedemos al proceso de fermentación mediante microorganismos óptimos para realizar esta etapa.

**3.2.6 Fermentación.** En los procesos de fermentación se producen cambios químicos en las sustancias orgánicas producidos por la acción de las enzimas. Esta definición general incluye prácticamente todas las reacciones químicas de importancia fisiológica.

Actualmente, los científicos suelen reservar dicha denominación para la acción de ciertas enzimas específicas, llamadas fermentos, producidas por organismos diminutos tales como el moho, las bacterias y la levadura. Por ejemplo, la lactasa, un fermento producido por una bacteria que se encuentra generalmente en la leche, hace que ésta se agrie, transformando la lactosa (azúcar de la leche) en ácido láctico (126)

El tipo de fermentación más importante es la fermentación alcohólica, en donde la acción de la cimesa segregada por la levadura convierte los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, en alcohol etílico y dióxido de carbono. Hay otros muchos tipos de fermentación que se producen de forma natural, como la



formación de ácido butanoico cuando la mantequilla se vuelve rancia, y de ácido etanoico (acético) cuando el vino se convierte en vinagre (128)

Generalmente, la fermentación produce la descomposición de sustancias orgánicas complejas en otras simples, gracias a una acción catalizada. Por ejemplo, debido a la acción de la diastasa, la cimasa y la invertasa, el almidón se descompone (hidroliza) en azúcares complejos, luego en azúcares simples y finalmente en alcohol. (127)

Las fermentaciones pueden ser: naturales, cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles; o artificiales, cuando el hombre propicia condiciones y el contacto referido.

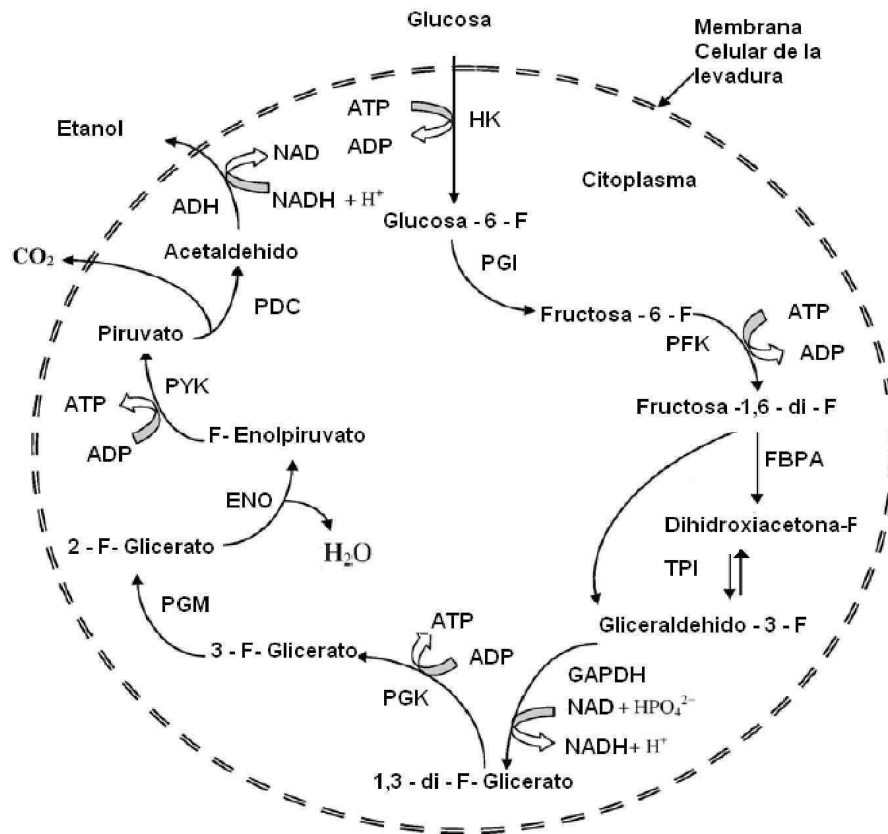
**3.2.6.1 Fermentación alcohólica.** La fermentación alcohólica (denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica) es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es:  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. (128)

**3.2.6.2 Fermentación de azúcares simples por levaduras y bacterias.** En muchos procesos de fermentación, la oxidación de azúcares simples bajo condiciones anaerobias involucra dos fases: la oxidación de la glucosa y el metabolismo de piruvato. El metabolismo de la glucosa ocurre de la misma manera tanto en la respiración aerobia como en la respiración anaerobia y se da frecuentemente a través de la vía glucolítica de Embden–Meyerhof–Parnas o EMP. Sin embargo, si el oxígeno no está disponible para su uso como aceptor externo de electrones (como ocurre en la respiración aerobia) o el microorganismo no tiene la capacidad de utilizar componentes inorgánicos alternativos tales como nitratos o sulfatos, la molécula portadora de electrones  $\text{NAD}^+$  debe ser regenerada donando electrones hacia componentes orgánicos intermediarios, (129)

Teniendo en cuenta las diferentes alternativas bioquímicas para la fermentación de los azúcares, se presenta a continuación una descripción de la ruta de biosíntesis de producción de etanol de dos microorganismos modelos implementados y reportados en la literatura científica: Levaduras y Bacterias.

**3.2.6.2.1 Levaduras.** La principal vía metabólica de este tipo de microorganismo en la producción de etanol es la glucólisis ó vía EMP, a través de la cual una molécula de glucosa es metabolizada y dos moléculas de piruvato son producidas.

Bajo condiciones anaerobias, el piruvato es posteriormente reducido a etanol con emisiones de  $\text{CO}_2$  obteniéndose un rendimiento estequiométrico teórico de 0.511g de etanol y 0.489g de  $\text{CO}_2$  por 1g de glucosa metabolizada, (130). En la glucólisis se producen dos moléculas de ATP los cuales son empleados para llevar a cabo la biosíntesis de las células de la levadura lo cual involucra una variedad de bio-reacciones que requieren energía. Además, la producción de etanol está estrechamente ligada al crecimiento celular del microorganismo, lo que significa que la biomasa se obtiene como un subproducto. Sin el consumo continuo de ATP por parte del microorganismo que está en crecimiento, el metabolismo glucolítico se vería interrumpido inmediatamente, debido a la acumulación intracelular de ATP, causando una inhibición a la fosfofructoquinasa (PFK), una de las enzimas de regulación más importantes en la glucólisis. El mecanismo de producción de etanol a partir de glucosa en las levaduras se presenta en la Figura 5.



**Figura 5.** Ruta metabólica de la producción de etanol en *S. cerevisiae*. HK: Hexoquinasa, PGI: Fosfoglucosimerasa, PFK: Fosfofructoquinasa, FBPA: Fructosa bifosfato aldolasa, TPI: Triosa fosfato isomerasa, GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato aldolasa, PGK: Fosfoglicerato quinasa, PGM: Fosfogliceromutasa, ENO: Enolasa, PYK: Piruvato quinasa, PDC: Piruvato descarboxilasa, ADH: Alcohol deshidrogenasa.

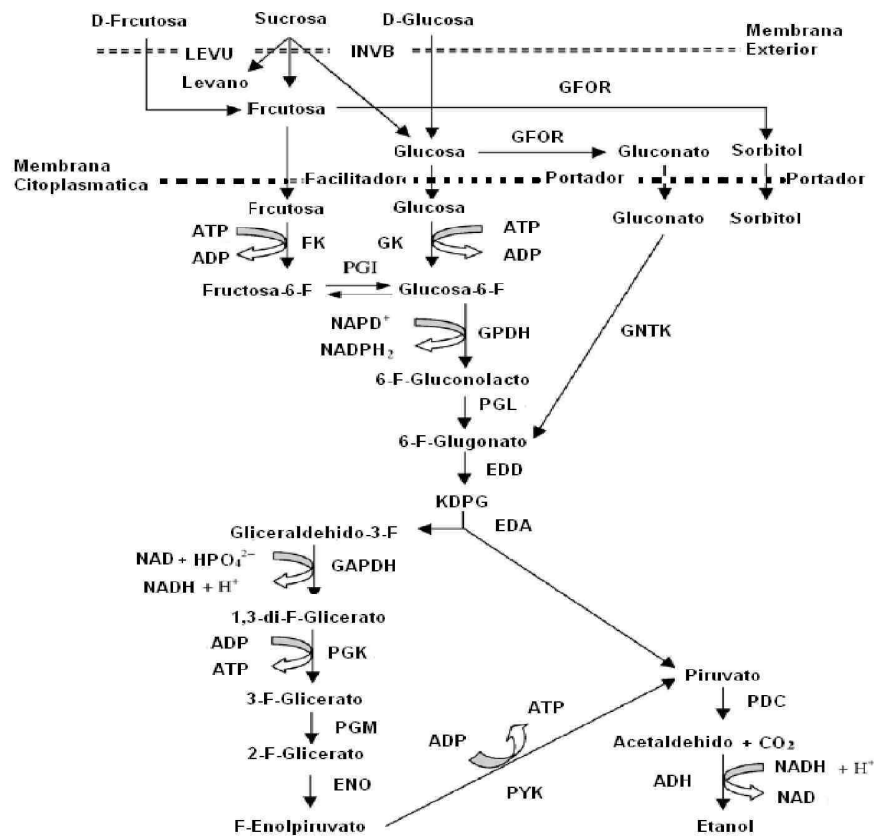
Las bacterias son consideradas en los procesos fermentativos como los microorganismos más efectivos en la producción de alcohol, ya que estos crecen a velocidades mayores que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y generan mayores rendimientos, por lo tanto es de importancia conocer la ruta metabólica de este microorganismo para la conversión de sustratos a etanol y otros subproductos, (129). La bacteria más estudiada en este tipo procesos es la bacteria *Zymomonas mobilis* que se presenta a continuación.

**3.2.6.2.2 Bacteria.** La *Zymomonas mobilis* es un microorganismo anaeróbico gram negativo que produce etanol a partir de glucosa por la vía Entner–Doudoroff (ED) en conjunto con las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Comparado con la vía EMP de las levaduras en la cual la enzima PFK es clave y herméticamente regulada, en el mecanismo de producción de etanol de la *Z. mobilis* esta enzima no interviene, produciendo solo una molécula de ATP por molécula de sustrato consumido, (129). Esto demuestra que la producción de etanol en esta bacteria está desligada de la generación de energía, lo cual se traduce en una menor producción de biomasa y una mayor producción de etanol. Se ha reportado que el rendimiento de la *Z mobilis* podría ser tan alto como 97 % del rendimiento teórico estequiométrico etanol/glucosa, mientras que únicamente el 87 - 95 % puede ser alcanzado por la *S. cerevisiae*. Así, como una consecuencia del bajo rendimiento de ATP, la *Z mobilis* mantienen un flux metabólico de glucosa más alto, y consecuentemente, garantiza una productividad de etanol más alta, (132).

A pesar de poseer características mucho más atractivas que la *S. cerevisiae*, estas bacterias poseen las siguientes desventajas, (130).

- Esta especie tiene un espectro de sustrato muy específico.
- La fermentación se hace inestable.
- Generación de muchos subproductos.
- Altos costos de manipulación.

En la Figura 6 se muestra el mecanismo de reacción enzimático en la producción de alcohol por la bacteria *Z mobilis*, (130).



**Figura 6.** Ruta metabólica de la producción de etanol en la *Z. mobilis*. LEVU: Levansacarasa, INV: Invertasa, GFOR: Glucosa-Fructosa oxidoreductasa, FK: Fructoquinasa, GK: Glucoquinasa, GPDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, PGL: Fosfogluconolactonasa, EDD: 6-Fosfogluconato deshidratasa, KDPG: 2-keto-3-deoxy-6-fosfogluconato, EDA: 2-keto-3-deoxy-gluconato aldolasa, GNTK: Gluconato quinasa.

Comparando el desempeño tanto de bacterias como de levaduras, se observa que la producción de alcohol se ve más beneficiada por el uso de bacterias. Pero hay que considerar que algunas especies de levaduras a ciertas condiciones de fermentación mejoran su desempeño de forma notable. De esta manera, la pregunta de cuál microorganismo se debe elegir por ser más apto a nivel industrial (bacteria o levadura) tiene que ser respondida a la luz de su facilidad de manejo.

La baja producción de biomasa por parte de bacterias como la *Z. mobilis* hace necesaria la esterilización del medio de fermentación, lo cual eleva los costos de producción. Por lo tanto, se recomienda dar prioridad a un menor costo de manejo que al rendimiento de alcohol. Lo anterior conduce a que industrialmente se prefiere el uso de la *S. cerevisiae* sobre la *Z. mobilis*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio fue descriptivo y se llevo a cabo los siguientes procesos: caracterización microbiológica y físico-química de la materia prima, recuperación de microorganismo para realizar la hidrólisis, hidrólisis microbiana y fermentación de los residuos hidrolizados.

### 4.2 UBICACIÓN

**4.2.1 Sitio de recolección de las muestras.** Los residuos del mango se obtuvieron de la especie común proveniente de los puestos de ventas localizados en la galería de la ciudad de Manizales y los residuos de la fabricación de jugos Savida.

**4.2.2 Sitio de trabajo de laboratorio.** El trabajo de laboratorio se llevo a cabo en el laboratorio de Fitopatología y control de calidad de la Universidad católica de Manizales.

### 4.3 POBLACION Y MUESTRA

Las muestras fueron recolectadas en diferentes puntos de ventas de la galería de la ciudad de Manizales y fábrica de jugos Savida teniendo en cuenta que la variedad de mango fuese la común.

### 4.4 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

**4.4.1 Recolección de las muestras.** Las muestras fueron recogidas en la zona de galería de la ciudad de Manizales y fábrica de jugos Savida luego se trasladaron al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Católica de Manizales para realizar el despulpado.

**4.4.2 Preparación de los medios de cultivo.** Los medios de cultivos que se utilizaron para la caracterización microbiológica en la materia prima fueron agar Plate count (mesofilos aerobios), medio Lauril Sulfato con campana de Durhan (coliformes totales y fecales), agar Saboraud (mohos y levaduras), agar PDA (recuperación de *Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*), estos medios fueron preparados de acuerdo a las especificaciones dadas por la casa comercial correspondiente.

**4.4.3 Recuperación del hongo *Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*.** La cepa de cada microorganismo fue proporcionada por el cepario del instituto de investigaciones microbiológica y biotecnología de la Universidad Católica de

Manizales GIBI, esta cepa se purificó y se aisló incubando en agar PDA durante 5 a 7 días a temperatura ambiente.

**4.4.4 Identificación de los hongos recuperados.** Los microorganismos recuperados fueron identificados de acuerdo a sus características macroscópicas del cultivo y microscópicas a través de placas de lactofenol observando las estructuras típicas de cada hongo.

#### **4.4.5 Caracterización de la materia prima.**

**4.4.5.1 Parámetros microbiológicos.** Estos parámetros se analizan para determinar el contenido de microorganismo en la materia prima y analizar de este modo como su nivel de contaminación puede interferir en la hidrólisis microbiana.

- Mesófilos aerobios
- Coliformes totales
- Coliformes fecales
- Mohos y levaduras

##### **4.4.5.1.1 Método de recuento en placa.**

**4.4.5.1.2 Procedimiento de las diluciones.** Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, debe guardarse en refrigeración a 4°C por un tiempo máximo de 24 horas.

- Se desinfectó con alcohol al 70% el frasco que contiene la materia prima.
- En un frasco se adicionó 9 mL de agua peptonada al 0.1% como dilución  $10^{-1}$ .
- Se rotularon dos tubos de vidrio como dilución  $10^{-2}$  y dilución  $10^{-3}$ , y se adicionó a cada uno de ellos 9 mL de agua peptonada al 0.1%.
- Se homogenizó la muestra y tomamos una parte representativa de la materia prima.
- Se tomaron 1g de la muestra mezclada y agregamos al frasco que contiene los 9 mL, luego se mezcla resuspendiendo con la pipeta más de 10 veces, hasta homogeneizar la mezcla; así se obtiene la dilución  $10^{-1}$ .
- Se tomaron 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  y lo adicionamos al tubo que contiene 9 mL de agua peptonada al 0.1% marcado con la dilución  $10^{-2}$ . Se mezcló unas 10 veces aspirando con la pipeta. Esta es la dilución  $10^{-2}$ .
- Se tomaron 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  y lo adicionamos al tubo marcado con la dilución  $10^{-3}$ . Se mezcló unas 10 veces aspirando con la pipeta. Así se obtiene la dilución  $10^{-3}$ .
- De esta forma se tienen las diferentes diluciones, el número de ellas va a depender del producto y de los parámetros que existan, pero deben sembrarse por lo menos tres (3) diluciones.

#### **4.4.5.1.3 Procedimiento de siembra en profundidad.**

- Se tomaron 5 cajas de petri estériles marcadas en la tapa como dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , control del diluyente y control del medio.
- Se mezclaron unas diez veces con la pipeta la dilución  $10^{-1}$  y tomamos 1ml de la dilución y lo adicionamos en la caja marcada con  $10^{-1}$ , las diluciones se sembraron por duplicado.
- Se mezclaron de igual forma con pipeta diferente la dilución  $10^{-2}$ , tomamos 1mL y lo adicionamos en la caja marcada como dilución  $10^{-2}$ .
- Se mezclaron de igual forma con pipeta nueva la dilución  $10^{-3}$ , se pipeteo 1mL y lo adicionamos en la caja marcada como dilución  $10^{-3}$ . El tiempo transcurrido entre la realización de las diluciones y la siembra en la última caja, no fue mayor de 20 minutos.
- Se adicionó 1mL de agua peptonada al 0.1% a la caja marcada como control del diluyente.
- Se adicionó 15mL del agar fundido a  $45^{\circ}\text{C}$ , a cada una de las cajas, incluyendo las cajas marcadas como control del diluyente y del medio.

#### **4.4.5.1.4 Procedimiento de la siembra en superficie.**

- Se preparó la muestra y se realizaron las diferentes diluciones.
- Se marcaron dos cajas de petri del mismo medio, una como control del diluyente y otra como control del medio.
- Luego se adiciono 0.1mL de cada una de las diluciones en las cajas marcadas respectivamente que contienen el medio de cultivo.
- Posteriormente extendimos con una varilla de vidrio la muestra sobre toda la superficie del medio, hasta que la superficie quede seca.
- Se incubaron por 24-48 horas a  $35-37^{\circ}\text{C}$ .
- Se seleccionaron las cajas que tengan entre 20 a 200 colonias.
- Se realizó el conteo final multiplicando por la dilución y por 10.

#### **4.4.5.1.5 Recuento de Mesófilos aerobios y facultativos viables.**

- Se prepararon las diluciones de igual forma que para el recuento en placa.
- Se pipeteó a las cajas de petri 1 mL de cada una de las diluciones.
- Se vertió 15mL de agar plate count fundido a  $45^{\circ}\text{C}$  en cada una de las cajas.
- Se mezclaron de igual forma que para el recuento en placa.
- Se dejó solidificar.
- Se invirtieron las cajas e incubaron por 24-48 horas a  $35-37^{\circ}\text{C}$ .
- Al cumplirse el tiempo de incubación, se sacaron las cajas y posteriormente se procedió al conteo de las cajas.

#### **4.4.5.1.6 Técnica número más probable coliformes fecales y totales.**

- Se desinfectó con alcohol al 70% toda el área de trabajo y el recipiente que contiene la muestra a analizar.

- Se peso 1 g de la muestra y se realizaron tres diluciones de igual forma que para el recuento en placa.
- Se sembraron por triplicado 1 mL de cada una de las diluciones en tubos que contenían 9 mL de Lauril sulfato con tubos durham preparados a concentración simple.
- Se mezclaron e incubaron por 24-48 horas a 35-37°C .
- Se leyeron a las 24 horas los tubos negativos, a los positivos se agregó reactivo de Kovack para evidenciar coliformes fecales.
- Se comparó con la tabla el resultado de NMP.
- Se expresó el resultado como NMP de Coliformes Totales = No. de bacterias / g ó mL.

#### **4.4.5.1.7 Recuento de mohos y levaduras.**

- Se prepararon las diluciones de igual forma que para el recuento en placa.
- Se pipeteó a las cajas de petri 1 mL de cada una de las diluciones.
- Se vertió 15ml de agar Saboraud fundido a 45°C en cada una de las cajas.
- Se mezclaron de igual forma que para el recuento en placa.
- Se dejaron solidificar.
- Se invirtieron las cajas e incubaron a 22°C por 5 a 7 días (las cajas se protegieron con papel crista flex).
- Se seleccionaron las cajas entre 20 y 100 colonias y multiplicamos por el inverso de la dilución.

**4.4.5.2 Parámetros físico-químicos.** Se refiere a las propiedades o atributos físicos, químicos y biológicos que posee la materia prima para conservar su calidad, las cuales pueden variar durante el proceso industrial al que fue sometido.

- % Azucares reductores método DNS
- % Cenizas
- % Humedad
- Determinación del pH
- Materia orgánica (MO)
- Lignina klason
- Holocelulosa
- Celulosa
- Hemicelulosa
- Sólidos solubles
- Kit etanol Merck

#### **4.4.5.2.1 Procedimiento % de humedad.**

- Se peso 50 g de la muestra homogeneizó en un crisol de peso conocido.
- Se calentó a 105°C durante 24 horas.
- Al culminar las 24 horas se dejo enfriar en un desecador y se peso.



**Nota:** La pérdida de peso experimentada se acepta como humedad, expresando el porcentaje respecto a peso de muestra húmeda.

**Cálculos:** Humedad operativa =  $[W \text{ final} - W \text{ crisol} + \text{muestra}] / W \text{ muestra}$

#### 4.4.5.2.2 Procedimiento % de cenizas.

- Una vez secada la muestra a 105°C para calcular la humedad.
- Se calcino durante 24 horas a 430°C.
- Al culminar las 24 horas, se dejó enfriar en un desecador y se pesó.

**Nota:** El contenido en cenizas se expresa en porcentaje respecto de muestra seca.

**Calculo:** peso de las cenizas = peso crisol con ceniza – peso crisol vacío  
% de las cenizas =  $\text{peso de las cenizas} \times 100 / \text{peso de la muestra}$ .

#### 4.4.5.2.3 Procedimiento materia orgánica.

- Se colocó 10 g de la muestra en un crisol.
- Se registró su peso.
- Se llevó posteriormente a la mufla hasta peso constante.

**Nota:** Por diferencia de peso se estima el contenido de materia orgánica.

**Calculo:** % M.O =  $100 - \% \text{ cenizas}$

**4.4.5.2.4 Medición de azúcares reductores.** El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácido dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540nm de los azúcares reductores

- **Reactivo DNS.** Se disolvió 1.6 g de NaOH GR en agua destilada (10 – 20 ml) y se vertió en un balón aforado de 100 ml, se adicionó 30 g de tartrato de sodio y potasio, luego se agregó 1 g de reactivo DNS, se aforó a 100 ml con agua destilada, se almacenó en frascos ámbar a 4 °C.
- **Solución patrón de glucosa.** Se preparó la solución estándar de glucosa a una concentración de ~10000 mg/l (ppm) en agua destilada, para ello se tomó 500 mg de glucosa, y se vertieron en un balón aforado de 50 ml y aforó con agua destilada.
- **Curva patrón.** A partir de la solución patrón de glucosa y agua destilada se prepararon 10 tubos con diferentes concentraciones. El trabajo se hizo por triplicado. A cada uno de los tubos, se le adicionó 0.5 ml de reactivo DNS a los 0.5 ml resultantes de cada dilución y se agitó. Se pusieron en un baño maría a ebullición por 5 minutos, se dejaron enfriar y se adicionó a cada tubo 5 ml de agua destilada y se agitó, se envolvieron los tubos en papel aluminio y se dejó en reposo durante 15 minutos. Utilizando como blanco una solución de agua con el reactivo DNS, se determinó la absorbancia de cada tubo a 540nm.

**4.4.5.2.5 Determinación del pH.** El pH se midió el líquido sobrenadante con un pH-metro con electrodo de vidrio.

**4.4.5.2.6 Procedimiento lignina Klason.** Según la norma ANSI/ASTM (American National Standard Institute, 1977).

- Se peso 1 g de muestra ( $P_1$ ).
- Se homogenizo con 15 ml de  $H_2SO_4$  72% y se dejo reposar 12-24 horas.
- Luego se transvaso el contenido del vaso a un matraz de 1.000 ml.
- Se añadieron 560 ml de agua desionizada para pasar de  $H_2SO_4$  72% a HSO 3%.
- El matraz se conecto a un refrigerante y se mantuvo a ebullición durante 4 horas en una manta calefactora.
- Al cabo de las cuales se dejo sedimentar el sólido y se filtro en una placa filtrante, secada en estufa a  $105^\circ C$  y pesada ( $P_2$ ).
- El sólido filtrado se lavo con agua desionizada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido.
- Se seco en estufa a  $105^\circ C$  durante 12 horas y se peso ( $P_3$ ).
- Se tomaron unos 100 mg del sólido seco y se calcinaron en mufla a  $430^\circ C$  durante 24 horas, obteniéndose así su porcentaje en materia orgánica (MOlig).

**4.4.5.2.7 Procedimiento holocelulosa.** Según la técnica descrita por Browning (1967).

- Se peso 2 g de muestra ( $P_1$ ), en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.
- Se añadieron 63 ml de agua desionizada.
- A la suspensión se le añadieron 0,2 ml de ácido acético glacial y 0,6 g de clorito sódico.
- Se cubrió con un vidrio de reloj y se introdujo al baño maría ( $70-80^\circ C$ ), agitando de vez en cuando. Este proceso se repitió dos veces más.
- Al finalizar la tercera hora, se coloco el Erlenmeyer en un baño de agua-hielo hasta que la temperatura baje a los  $10^\circ C$ .
- Se filtro en placa filtrante, previamente pesada ( $P_2$ ) y se lavo con agua desionizada hasta la eliminación de la coloración amarilla.
- Posteriormente se lavo con agua desionizada, se dejo secar a  $60^\circ C$  y se peso ( $P_3$ ).

**Nota:** Al sólido obtenido se le determinan los porcentajes de humedad (% Hholo) y de la materia orgánica (% MOholo), respectivamente.

**4.4.5.2.8 Procedimiento celulosa.** Según la norma ANSI/ASTM (American National Standards Institute, 1977b).

- Se pesaron 1 g de holocelulosa (P<sub>1</sub>), en un Erlenmeyer de 100 ml.
- Se añadieron 5 ml de NaOH 17,5% mezclando con una varilla de vidrio. Cada 5 minutos se añadieron 2,5 ml de NaOH 17,5% hasta consumir un total de 12,5 ml y se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 16,5 ml de agua desionizada a 20°C para pasar de NaOH 17,5% a 8,3%, se mezcló bien y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- A continuación se filtró en placa filtrante de peso conocido (P<sub>2</sub>) y se lavó con 50 ml de NaOH 8,3%.
- Posteriormente con agua desionizada. Se repitió el lavado con NaOH 8,3% y agua desionizada dos veces.
- Se cortó la succión y se añadieron 7,5 ml de ácido acético 10% y se dejó en contacto 3 minutos.
- Se volvió a conectar el vacío y se lavó con agua desionizada hasta neutralidad del filtrado.
- Se Secó a 105°C en estufa durante 12 horas y se pesó (P<sub>3</sub>).

**4.4.5.2.9 Procedimiento hemicelulosa.** El contenido en hemicelulosa se calculó por diferencia entre el contenido de holocelulosa y el de celulosa.

**4.4.5.2.10 Procedimiento sólidos solubles.** Los sólidos solubles se expresaron como Brix, se determinó con un refractómetro digital, a 25°C. Se coloca una gota de la solución del material en el refractómetro y se leyó en Brix.

**4.4.5.3 Procedimiento pretratamiento.** La materia prima antes de realizar la hidrólisis microbiana se pretrató para acondicionar el material lignocelulósico para que los microorganismos lo degraden con más eficacia.

Se realizó un pretratamiento térmico, sometiendo la materia prima a 121°C a 20 PSI durante 30 minutos.

Al culminar este periodo de tiempo se realizó choque térmico a la disolución, hasta obtener una temperatura de 28°C para continuar con la hidrólisis.

**4.4.5.4 Procedimiento hidrólisis microbiana.** Se utilizan dos cepas (*Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*), ambas cepas se purificaron aislando los microorganismos sobre el medio PDA (Agar papa dextrosa), se incubó a 28°C durante 7 días.

**Inoculo *Aspergillus brasiliensis*:** Se corta en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> el 3% que corresponden a 3.7 g del microorganismo y se adicionan a un matraz con 50 mL de agua destilada estéril pH ajustado a 4.5.

**Inoculo *Trichoderma spp*:** Se corta en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> el 3% que corresponden a 3.7 g del microorganismo y se adicionan a un matraz con 50 mL de agua destilada estéril pH ajustado a 4.5.

**Preparación Hidrólisis:** se realiza en bolsas de polipropileno, cada bolsa contiene 240 g de la materia prima pretratada y se le adiciono 50 mL de cada inoculo microbiano.

La disolución obtenida se incuba a 30°C durante 5 días.

**Nota:** El procedimiento anterior se realizó por separado para evitar la secuestación de los microorganismos utilizados.

Antes de realizar el paso de fermentación es necesario conocer qué cantidad de azúcares fueron liberados en la hidrólisis lo que hace necesario realizar las siguientes pruebas azúcares reductores, azúcares totales y Brix.

#### **4.4.5.5 Procedimiento fermentación sólidos hidrolizados.**

**4.4.5.5.1 Preparación del inoculo.** Sembramos 1 g de *Saccharomyces cerevisiae* en 1 litro de mosto producto de la hidrólisis preparado bajo las mismas condiciones del control de comparación, no estéril, sin complementos nutricionales o ajuste de pH, en Erlenmeyer, incubando a 30°C, por 30 minutos.

**4.4.5.5.2 Fermentación.** Las fermentaciones se llevaron a cabo en Erlenmeyers de vidrio de 1000 mL con un volumen de trabajo de 500mL (incluido el inoculo).

Se Inoculo a una concentración de  $1,06 \times 10^6$  UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae*, en el producto de la hidrólisis.

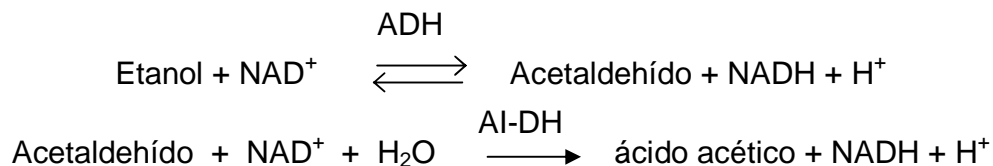
Se adiciono sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en una concentración de 1,5 g/L y se incubo en condiciones anaerobias a 27°C y se tapo el Erlenmeyer con filtro de salida de CO<sub>2</sub>, a pesar de que la fermentación dura más tiempo se evaluara la producción de etanol de los microorganismos durante 44 horas.

Se tomaron muestras en diferentes intervalos para determinar biomasa. La concentración de Brix y etanol se determinaron al final del proceso de fermentación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La concentración de biomasa se realizo en cámara de Neubauer, la concentración de azúcares reductores y de etanol se realizo al final de la fermentación, y de esta manera comparar que microorganismo tuvo más éxito en el proceso de hidrolisis.

**4.4.5.6 Kit etanol Merck.** Cuantificación de etanol mediante test enzimático: el método que empleamos es el test enzimático "Ethanol UV-method Boehringer

Mannheim / R-Biopharm / Merck", en cual se llevaron a cabo las siguientes reacciones:



La cantidad de NADH es determinada mediante la lectura de la absorbancia a 340 nm. La preparación de las soluciones se realizo de la siguiente forma:

Soluciones	Blanco	Muestra
Reactivo 2 (3000 µl reactivo 1 + 1 pastilla botella 2)	3.0 ml	3.0 ml
Solución de la muestra	---	0.1 ml*
Agua destilada	0.1 ml	---
Lectura de la absorbancia 1 (A <sub>1</sub> ) , después de 3 minutos e iniciar reacción por adición de :		
Suspensión 3	0.050 ml	0.050 ml
Reacción completa a los 5 – 10 minutos, realizar lectura de las soluciones (A <sub>2</sub> )		
* Observación: debido a la alta sensibilidad del método, cada una de las muestras debe ser diluida de acuerdo con la concentración esperada así:  0,76 – 7,6 g/l: factor de dilución 1/1000  >7,6 g/l: factor de dilución 1/10000		

**Tabla 7.** Preparación de las diluciones etanol.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL MANGO (*Mangifera indica L*).

Los residuos provenientes del mango se recolectaron en diferentes puntos de venta de la Galería de Manizales y fabrica de producción de jugos Savida fueron trasladado al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Católica de Manizales, en los cuales se lavó con agua destilada y se trituro para disminuir el tamaño de las partículas.



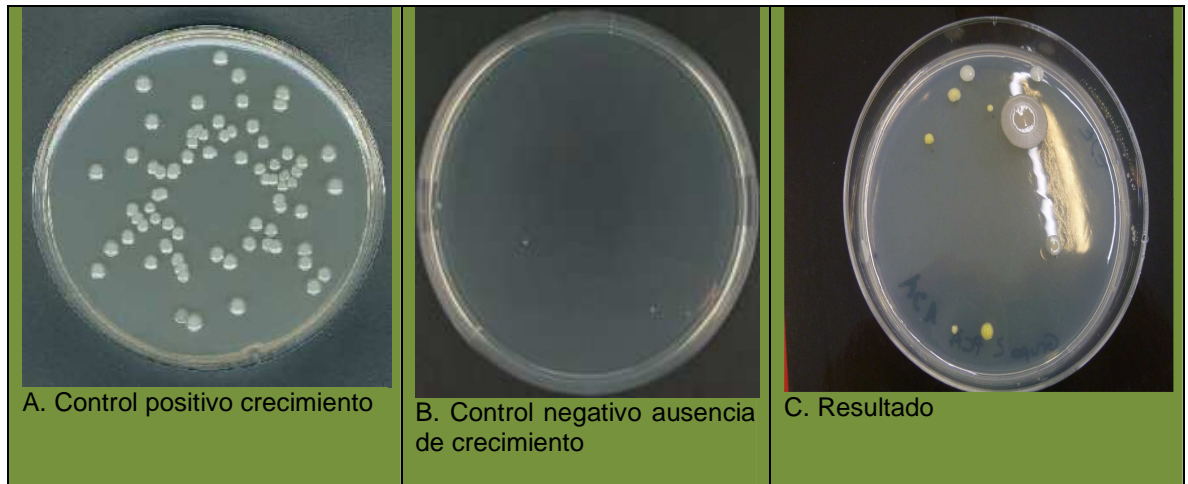
**Figura 7.** Acondicionamiento de los residuos del mango (*Mangifera indica L*)

## **5.2 ANALISIS MICROBIOLÓGICO**

La materia prima se sometió a los siguientes análisis microbiológicos para determinar la importancia de realizar un pretratamiento térmico que elimine los microorganismos contaminantes que puedan interferir en la hidrólisis microbiana. Se realizó la disolución correspondiente de la materia prima hasta  $10^3$  y  $10^4$  por duplicado

### **5.2.1 Recuento de Mesófilos aerobios**

Se sembró por profundidad en agar plate count y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



**Figura 8.** Recuento mesofilos aerobios viables

### 5.2.2 Recuento mohos y levaduras

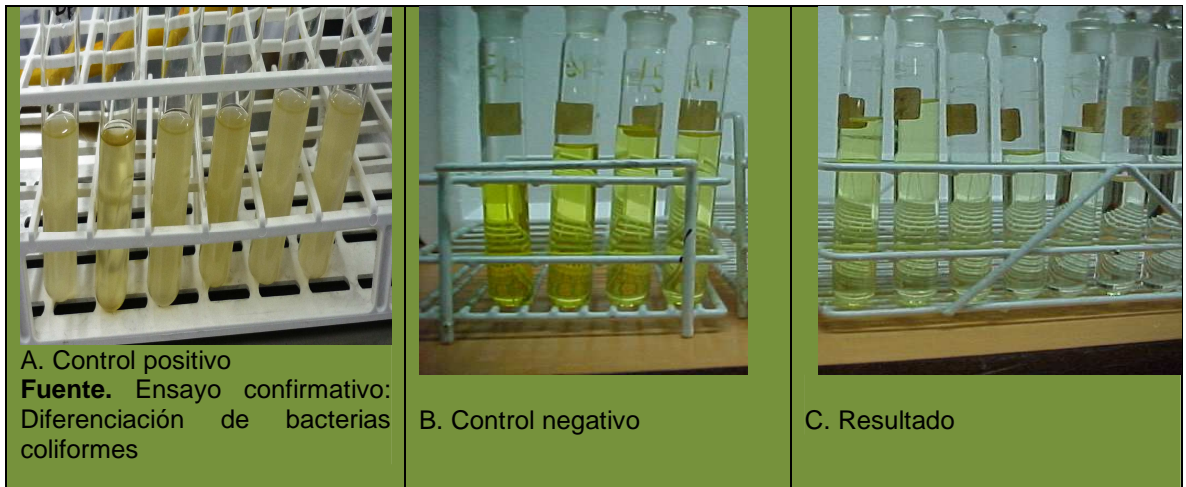
Se sembró por profundidad en agar Saboraud y se incubó a 25 °C durante 48 horas.



**Figura 9.** Recuento mohos y levaduras

### 5.2.3 Numero más probable coliformes fecales y totales

Se sembró en caldo lauril sulfato y se incubó a 25 °C durante 48 horas.



**Figura 10.** Coliformes totales y fecales

#### 5.2.4 Resultados análisis microbiológicos

Parámetro microbiológico	Sin autoclavar	Autoclavado pretratamiento térmico
Mesofilos aerobios viables	$80 \times 10^3$ UFC/g	< 10 UFC/g
Mohos y levaduras	$30 \times 10^3$ UFC/g	< 10 UFC/g
Coliformes totales y fecales	< 3 microorganismo/g	< 3 microorganismo/g

**Tabla 8.** Resultado análisis microbiológico materia prima sin tratar y con tratamiento térmico.

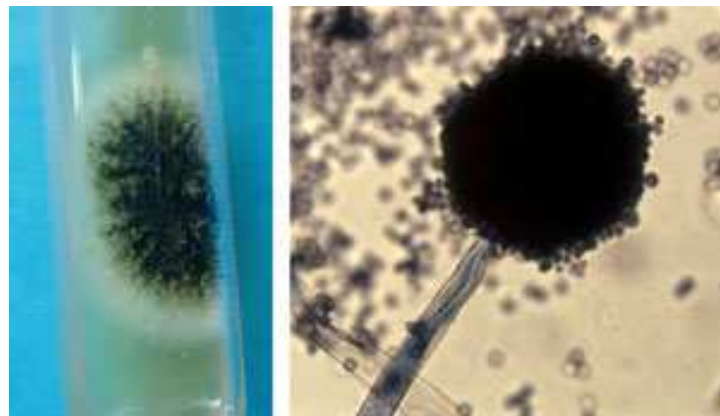
#### 5.3 RECUPERACION DEL HONGO *Aspergillus brasiliensis*.

El hongo se recupero a partir de cepas conservadas en el cepario del Instituto de Investigaciones Microbiológica y Biotecnología GIBI de la universidad Católica de Manizales referencia *GIBI\_000056\_IN-F*.





**Figura 11.** Recuperación en medio PDA (agar papa dextrosa)



**Figura 12.** Características macroscópicas y microscópicas *Aspergillus niger*

**Fuente.** <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>

Color negro por el aspecto macroscópico de las colonias, las hifas son incoloras (hialinas). El color negro se debe a las conidias en la superficie del cultivo que son oscuras y cuyo diámetro que puede ser hasta de 4  $\mu\text{m}$ . La vesícula está rodeada de fiálides por lo que los contornos de la misma no se pueden observar, este color de conidias y la disposición de las fiálides en los 360° son característicos de esta especie.

#### **5.4 RECUPERACION DEL HONGO *Trichoderma spp.***

El hongo se recupero a partir de cepas conservadas en el cepario del Instituto de Investigaciones Microbiológica y Biotecnología GIBI de la universidad Católica de Manizales referencia *GIBI\_000078\_IN\_F*.

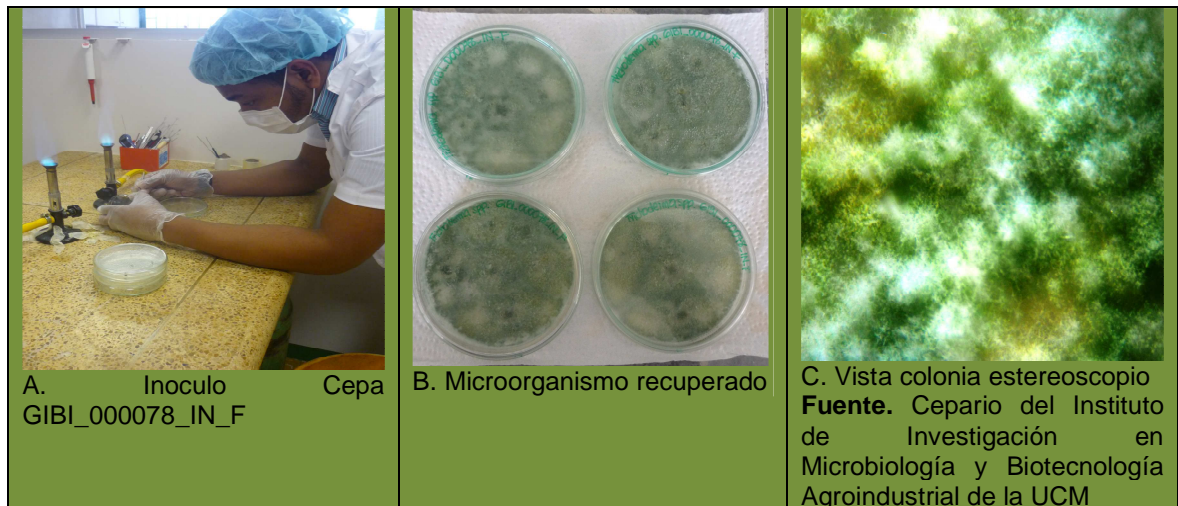


Figura 13. Recuperación en medio PDA (agar papa dextrosa)

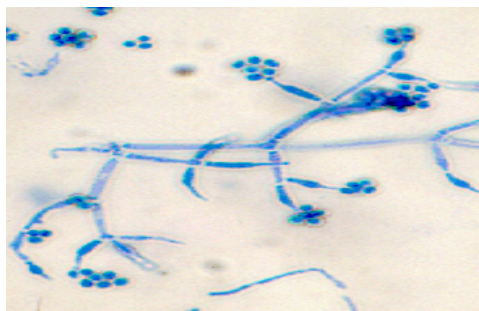


Figura 14. Características microscópicas *Trichoderma spp*  
Fuente.

[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_%28hyaline%29/Trichoderma/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Trichoderma/)

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

### 5.5 ANALISIS FISICO-QUIMICOS

PARAMETROS	RESULTADOS	Lund and Smoot (1982)	Peña,Hector, et. al	Mejía et al., 2007
% Humedad	78,4%		82	
% Cenizas	2.6%		0.19	3.38
% materia orgánica	0.8			

% lignina	0.38%	0.43	0.32	4.73
% hemicelulosa	5.67	0.37	1.3	3.70
Sólidos solubles	3.6		18	4.4
pH	4.2			4.08
% holocelulosa	1.07			
% celulosa	6.71	0.67	1.4	5.20

**Tabla 9.** Resultado análisis físico-químico

Los resultados no concuerdan con Lund and Smoot (1982) los cuales afirman que la fibra dietética del mango (*Mangifera indica L*) está compuesta por (celulosa 0.67 %, hemicelulosa 0.37 %, lignina 0.43 %) esto se puede deber a que la caracterización que hicieron estos autores se basa en la pulpa del mango (*Mangifera indica L*) no a los residuos.

Tampoco se coincide con Peña, Hector, *et. al* el cual caracterizo el fruto del mango (*Mangifera indica L*) obtenido los siguientes resultados ( humedad 82 %, sólidos totales 18 %, fibra 4.6 %, cenizas 0.19 %) esta variación se debe a que la caracterización no se le realizo solo a los residuos si no a la pulpa del mango.

Los resultados arrojados se acercan más a Mejía *et al.*, 2007 que caracterizo los residuos del mango (*Mangifera indica L*) obteniendo los siguientes valores (celulosa 5.20 %, hemicelulosa 3.70 %, lignina 4.73 %, cenizas 3.38 %, sólidos solubles 4.4, pH 4.08), las variaciones con los anteriores autores pueden deberse a la variedad de mango utilizada a las condiciones ambientales y físicas empleadas.

## 5.6 PRETRATAMIENTO

Se selecciono 240 g por separado para la hidrólisis de cada microorganismo, los residuos agroindustriales fueron sometidos a un pretratamiento térmico en autoclave a 121°C durante 20 minutos, con el fin de romper las estructuras fibroticas e inhibir los microorganismos antagonistas que puedan interferir en la hidrólisis microbiana y favorecer la preparación de los materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol al reducir el tamaño de la partícula de la materia prima.

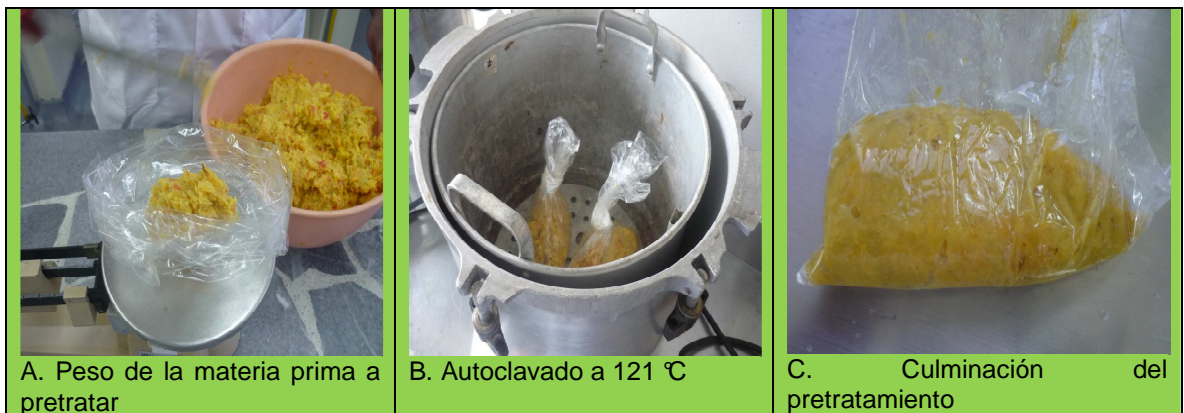


Figura 15. Pretatamiento materia prima

### 5.7 HIDRÓLISIS MICROBIANA

Para realizar la hidrólisis se emplearon dos microorganismos *Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*, la función de estos microorganismos es romper los enlaces del material lignocelulósico que contiene los azúcares fermentables.

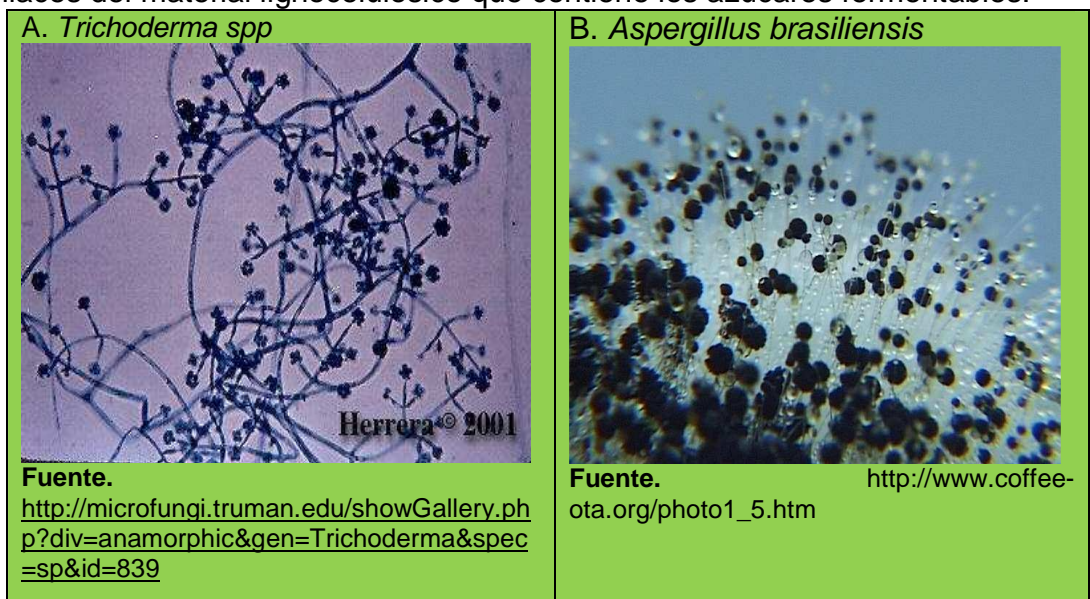


Figura 16. Microorganismos utilizados en la hidrólisis

#### 5.7.1 Hidrólisis microbiana *Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*

Al culminar el pretratamiento de la materia prima, para cada microorganismo (*Aspergillus brasiliensis* y *Trichoderma spp*), se inocularon aproximadamente 4,57 g de *Trichoderma spp* y 4,60 g de *Aspergillus brasiliensis* más 50 mL de agua destilada con ajuste de pH a 4.5

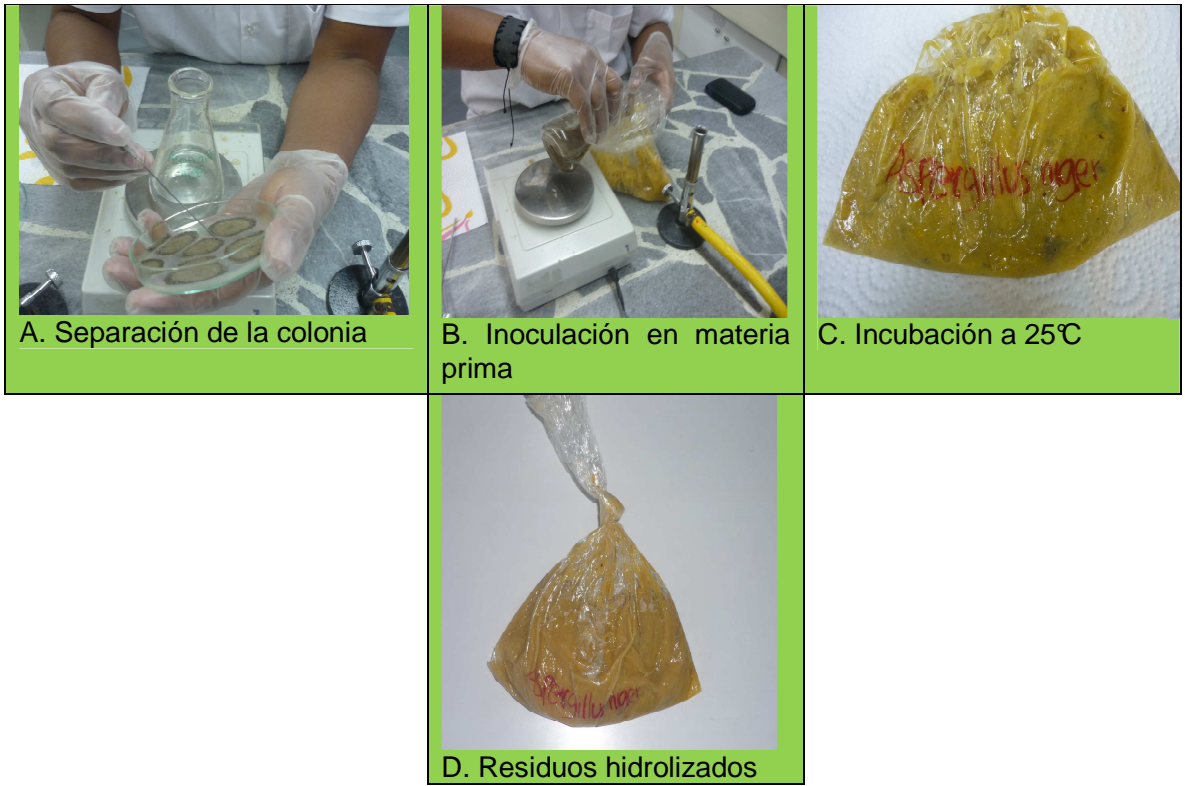
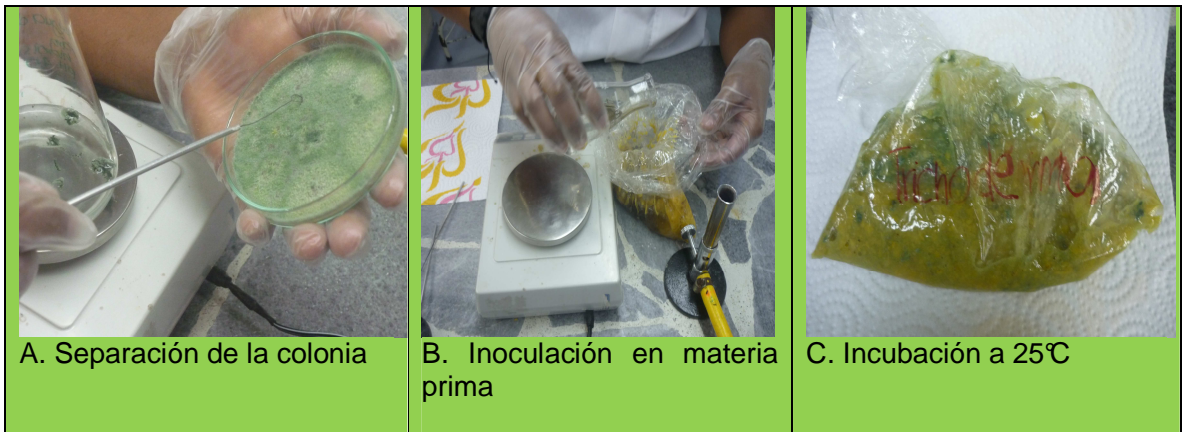
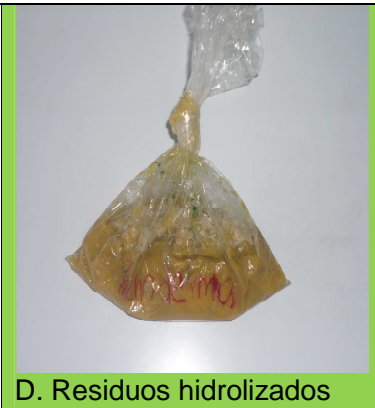


Figura 17. Inoculación de *Aspergillus brasiliensis*



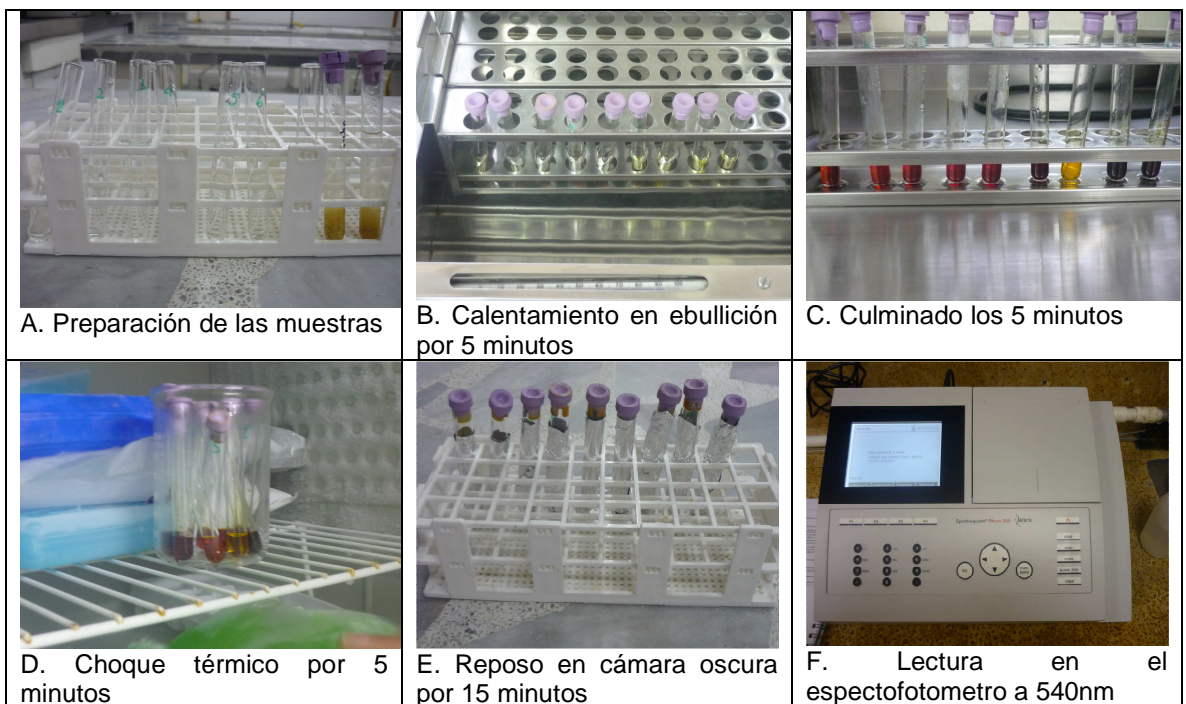


**Figura 18.** Inoculación de *Trichoderma spp*

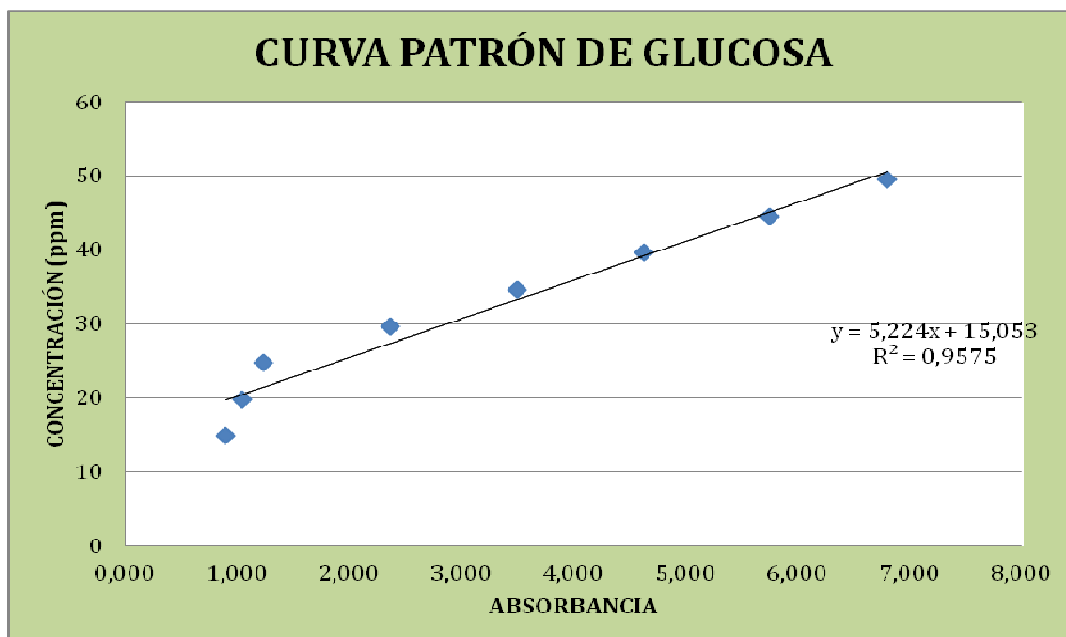
El tiempo de incubación para los dos microorganismos fue de 7 días, posteriormente el material fue autoclavado a 121°C durante 15 minutos, con el fin de neutralizar la actividad hidrolítica de *Trichoderma spp* y *Aspergillus brasiliensis*.

A cada muestra se le realizó lectura de Brix y azúcares reductores para determinar la efectividad de la hidrólisis.

Para realizar los azúcares reductores se empleó el método DNS los datos fueron comparados a través de una curva patrón y las muestras se analizaron en el espectrofotómetro Spectroquant pharo 300 Merck.



**Figura 19.** Azúcares reductores método DNS



**Grafica 1.** Curva patron glucosa

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA
4,95	0,392
5	0,589
14,85	0,898
19,8	1,042
24,75	1,230
29,7	2,368
34,65	3,499
39,6	4,624
44,5	5,750
49,5	6,800

**Tabla 10.** Datos curva patrón glucosa

### Resultados

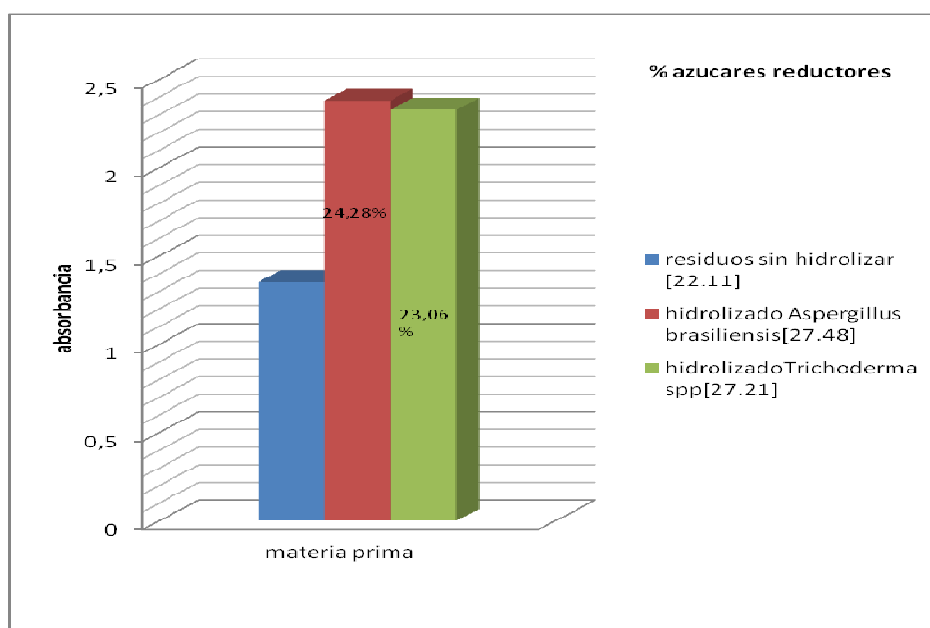
Brix antes de hidrolizar	Brix después de hidrolizar
Índice de refracción 1.35 = 11.40 Brix	<i>Aspergillus brasiliensis</i> : Índice de refracción 1.68 = 14.19 Brix
	<i>Trichoderma spp</i> : Índice de refracción 1.66 = 14.02 Brix

**Tabla 11.** Resultados Brix

La concentración de los azúcares reductores se sacó empleando la fórmula de la curva de calibración [concentración] = 5,224[absorbancia] + 15,053.

azúcares reductores antes de hidrolizar				azúcares reductores después de hidrolizar	
Concentración	22,11	ppm	-	<i>Aspergillus brasiliensis</i> concentración	Absorbancia
Absorbancia	1,352			27,48 ppm	2,380
				<i>Trichoderma spp</i> concentración	Absorbancia
				27,21ppm	2,328

**Tabla 12.** Azúcares reductores



**Gráfico 2.** Porcentaje de azúcares reductores hidrolizado

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente afirmamos que la hidrólisis microbiana es viable debido al alto contenido de azúcares fermentables presentes en el material hidrolizado esto nos permite proceder con el proceso fermentativo.

## 5.8 FERMENTACION

Las fermentaciones se realizaron por separado en Erlenmeyer de 1000 mL, con un volumen final de trabajo de 500mL.

	Mosto	Inoculo	Volumen final
Hidrolizado <i>Trichoderma spp</i>	90 g + 500 mL de agua destilada	3 % de levadura activa	590 mL
Hidrolizado <i>Aspergillus brasiliensis</i>	90 g + 500 mL de agua destilada	3 % de levadura activa	590 mL

**Tabla 13.** Preparación inoculo



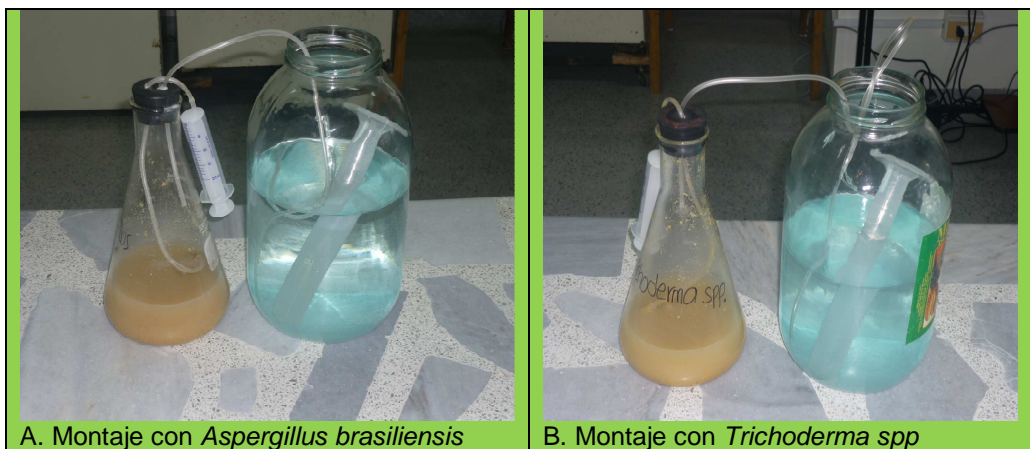


Figura 20. Montaje fermentación

### 5.8.1 Seguimiento de la fermentación hidrolizado *Aspergillus brasiliensis*.

Hora	Brix	pH	Densidad	% Azúcares totales	% Acidez libre	Población levadura-viabilidad	
						(10 <sup>6</sup> Cel/mL)	%
0	12,42	4,5	0,984	12,33	0,09	56	40
14	11,56	3,06	0,98	11,44	0,12	77	67
20	11,38	3,22	0,978	11,2	0,18	87	30
37	11,18	3,10	0,974	10,82	0,36	110	36
44	10,09	3,1	0,958	9,55	0,54	128	29

Tabla 14. Fermentación hidrolizado *Aspergillus niger*

### 5.8.2 seguimiento de la fermentación hidrolizado *Trichoderma spp.*

Hora	Brix	pH	Densidad	% Azúcares totales	% Acidez libre	Población levadura-viabilidad	
						(10 <sup>6</sup> Cel/mL)	%
0	12,35	4,5	0,842	12,26	0,09	76	54
14	12,16	3,22	1,022	11,87	0,29	98	59
20	11,45	3,23	1,044	11,15	0,3	107	31
37	11,27	3,08	1,024	10,97	0,3	126	36
44	11,09	3,1	1,004	10,61	0,48	152	30

Tabla 15. Fermentación hidrolizado *Trichoderma spp*

### 5.8.3 Brix, % de azúcares totales y azúcares reductores.

Los Brix se midieron en un refractómetro, agregando una gota de la muestra a analizar y el porcentaje de azúcares se midió teniendo en cuenta la diferencia entre los Brix y la acidez libre.



Figura 21. Refractómetro

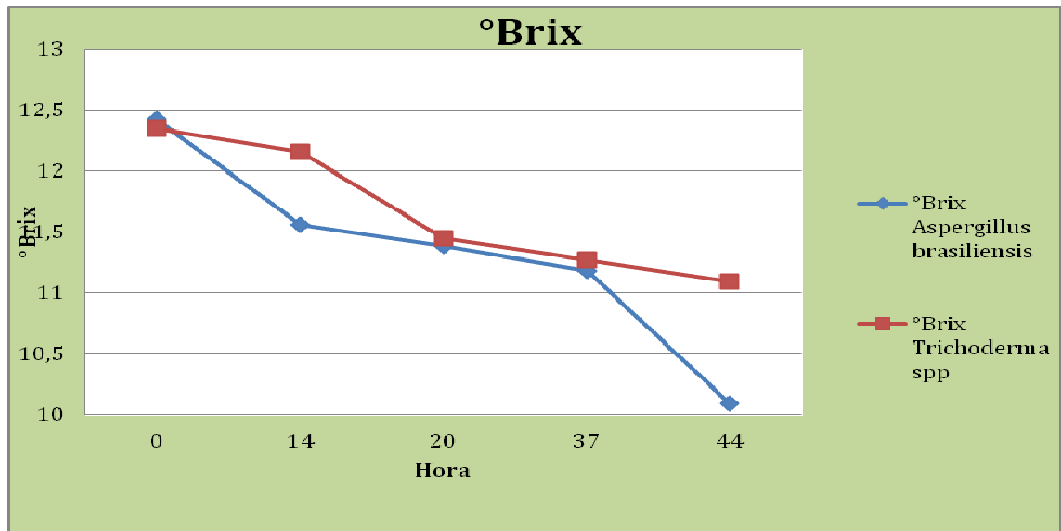


Grafico 3. Relacion °Brix

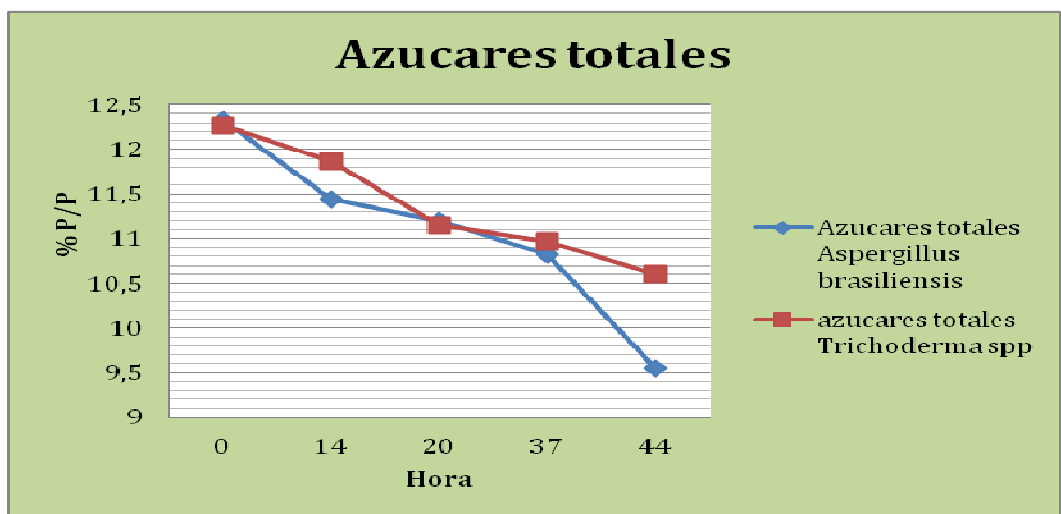
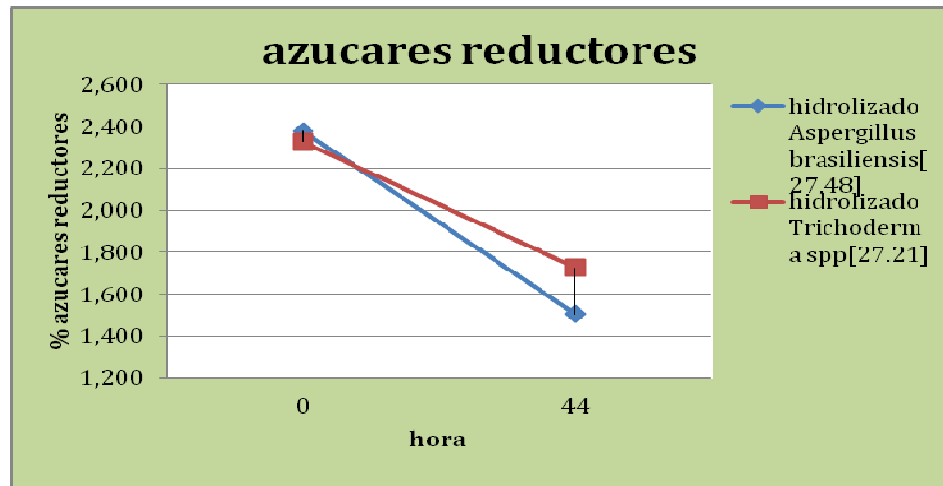


Grafico 4. Relación Azucres totales



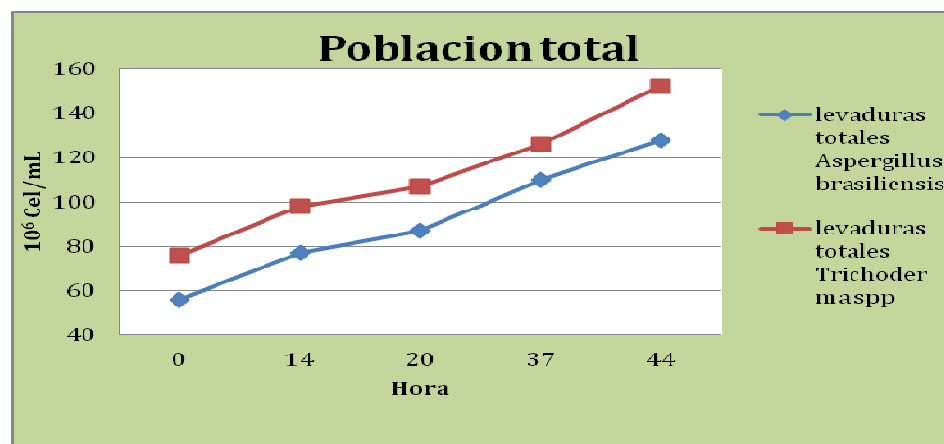
**Grafico 5.** Azucares reductores durante la fermentación

Durante los procesos fermentativos se observa que los microorganismos están asimilando los azúcares para su reproducción, la fermentación se ve más acelerada en el hidrolizado con *Aspergillus brasiliensis*.

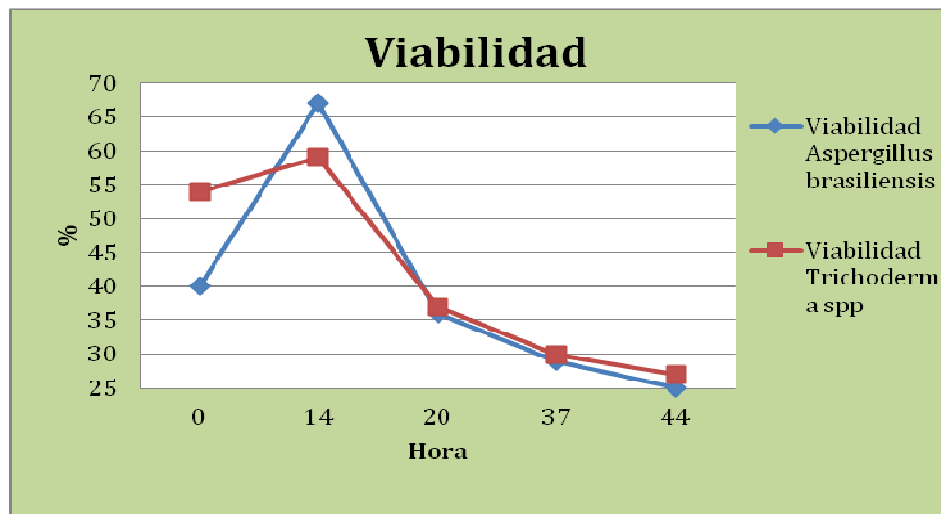
#### 5.8.4 Población total y viabilidad de la levadura



**Figura 22.** Recuento en cámara neubauer



**Grafico 6.** Relacion poblacion total

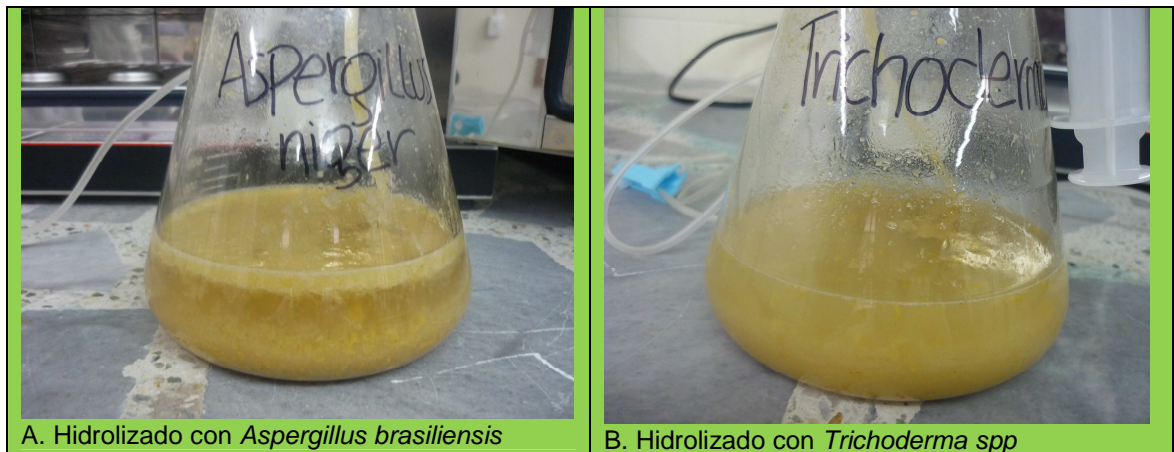


**Grafico 7.** Relacion viabilidad

En el grafico de población total se observa que la tendencia de *Trichoderma spp* va en aumento, pero esto se debe a que en ambas fermentaciones se está produciendo biomasa ya que el porcentaje de viabilidad disminuye al pasar de las horas puede deberse al agotamiento de los nutrientes.

#### 5.8.5 detención de la fermentación.

A las 44 horas se detuvo la fermentación a las cuales se le realizaron determinación de etanol, azúcares reductores.



**Figura 23.** Final de la fermentación

#### 5.8.5.1 Determinaciones de etanol

Este parámetro se analizó al culminar la fermentación empleando el kit de etanol de la casa comercial Merck, y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Spectroquant pharo 300 Merck.

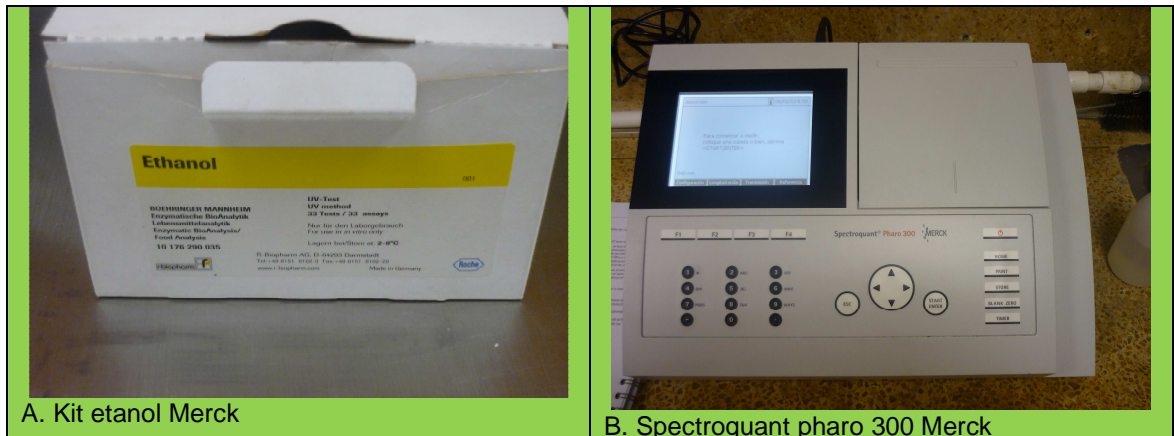


Figura 24. Determinación de etanol

<p>Quantificación de etanol <i>Aspergillus brasiliensis</i></p> <p>3,050 g alcohol/litro de solución</p>	<p>Quantificación de etanol <i>Trichoderma spp</i></p> <p>2,462 g alcohol/litro de solución</p>
--	---

Tabla 16. Cuantificación de etanol

De los resultados arrojados podemos observar que el mayor contenido de etanol se dio en el hidrolizado con *Aspergillus brasiliensis*, esto nos evidencia que el mayor rendimiento lo obtuvo este microorganismo lo cual lo hace eficiente para romper el material lignoceluloso y liberar con más rapidez los azúcares fermentables.

## CONCLUSIONES

- Actualmente la obtención de fuentes de energías derivados del petróleo atraviesa una fuerte crisis debido a una disminución en sus reservas, por lo cual la aplicación de nuevas tecnologías dirigidas a generar combustibles a partir de materiales renovables como la lignocelulosa, y no de alimentos, representa una alternativa viable a la demanda energética mundial.
- En el material lignocelulósico se dispone de una gran cantidad de azúcares fermentables, sin embargo, su utilización se puede ver impedida debido a que los azucares se encuentran expresados en cadenas complejas que no pueden ser aprovechables por los microorganismos fermentadores, una solución a este problema han sido los diversos métodos fisicoquímicos, térmicos y biológicos que se han desarrollado para liberar los azúcares fermentables y obtener bioetanol.
- Algunas estrategias utilizando microorganismos como los hongos para realizar la hidrólisis y las levaduras se han enfocado en la obtención de etanol a partir de lignocelulosa. En este proceso de sacarificación y fermentación por separado se han obtenido cantidades y rendimientos significativos de etanol lo cual representa un punto de partida que conducirá al desarrollo de tecnologías encaminadas a satisfacer las necesidades energéticas en el futuro.
- La realización de un pretratamiento térmico es indispensable ya que elimina los microorganismos presentes en la materia prima que puedan interferir en la hidrólisis microbiana y favorece la preparación de los materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol al reducir el tamaño de la partícula de la materia prima.
- Los microorganismo utilizados en la hidrólisis (*Trichoderma spp* y *Aspergillus brasiliensis*), realizaron con eficacia la degradación de los residuos vegetales liberando azucares fermentables obteniendo un rendimiento para *Aspergillus brasiliensis* de 24,28% y de *Trichoderma spp* 23,06%.
- El proceso de fermentación de los residuos hidrolizados fueron asimilados eficientemente por el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* esto se evidencia en el porcentaje de viabilidad que alcanza un pico máximo de 67%.
- En el proceso de fermentación del material lignocelulosico de los microorganismo hidroliticos se logro un rendimiento de etanol de 3,050 g

alcohol/litro de solución para el hidrolizado con *Aspergillus brasiliensis* y  
2,462 g alcohol/litro de solución para el hidrolizado con *Trichoderma spp.*

## RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar ensayos con el material hidrolizado en una planta piloto, con el fin de escalar los resultados obtenidos en el laboratorio y posteriormente ser usados en un proceso industrial alternativo rentable y que cumpla con las condiciones ambientales, .
- Realizar el proceso de hidrólisis microbiana bajo tiempos más prolongados, con el fin de poder obtener rendimientos interesantes empleando concentraciones microbianas superiores o inferiores a las sugeridas en este estudio.
- Es necesario realizar una cromatografía para conocer el tipo y cantidad de componentes hidrolizados, para identificar la naturaleza de las fuentes nutricionales que puede utilizar *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación del hidrolizado de los residuos del mango (*Mangifera indica* L).
- Por dificultad en recuperar la cepa *Zymomonas mobilis* no se realizó la fermentación con este microorganismo es necesario establecer si el rendimiento obtenido por *Saccharomyces cerevisiae* es mejor que *Zymomonas mobilis* en el hidrolizado y cuál de los dos da un mejor rendimiento de etanol.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Sánchez Marroquín, A., "Estudios sobre la microbiología del pulque; XX Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida", Rev. Latinoamer. Microbiol. Parasitol., 9, pp. 87-90, 1967.
- [2] Rogers, P.L., K.J. Lee y D.E. Tribe, "kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration", Biotechnol. Lett., 5, pp. 345-350, 1979.
- [3] Swings, J. y J. de Ley, "The biology of *Zymomonas*", Bacteriol., Rev., 41, pp. 1-46, 1977.
- [4] Belaich, J.P. y J.C. Senez, "Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*", J. Biotechnol., 89, pp. 1195-1200, 1965.
- [5] Tuite, M., Oliver, S. 1991. *Saccharomyces cerevisiae*. Editorial Plenum Press. New York. 100-120p.
- [6] Lee, K. J., D.E. Tribe y P.L. Rogers, "Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations", Biotechnol, Lett., 1, pp. 421-426, 1979.
- [7] Viikari L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Crit Rev Biotechnol 1988; 3(7):237-61.
- [8] Montenecourt BS. *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In: Demain AL, Solomon, editors. Biology of Industrial Microorganisms. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, Inc; 1985. p. 261-89.
- [9] DiMarco AA, Romano A. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl Environ Microbiol 1985;49:151-7.
- [10] Ingram LO, Eddy CK, Mackenzie KF, Conway T, Alterthum F. Genetics of *Zymomonas mobilis* and ethanol production. Dev Ind Microbiol 1989;30:53-69.
- [11] Algar EM, Scopes R. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J Biotechnol 1985; 2:275-87.
- [12] Osman YA, Ingram LO. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. J Bacteriol 1985;164(1):173-80.
- [13] Swings, J. y J. de Ley. "The biology of *Zymomonas*", Bacteriol., Rev., 41, pp. 1-46, 1977.

- [14] Belaich, J.P. y J. C. Senez, #Influence of aereation and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*", J, Biotechnol., 89, pp. 1195-1200,1965.
- [15] Ludrin-Seiller, I., "Fermentation alcoolique par *Zymomonas mobilis*: etude du comportement dynamique de la souche et potentialities technologiques", These doc. Ing. Insa. Toulouse, Francia, 1984.
- [16] Bringer, S., R. k. Finn y h. Sahn, "Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*", Arch Microbiol., 139, pp. 376-381, 1984-
- [17] Lee, K.J. et al., "The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*", Biotechnol. Lett., 3, pp. 207-212, 1981.
- [18] Lyness, E.W. y H.W. Doelle, "Levansucrase frim *Zymomonas mobilis*". Biotechnol. Lett., 5, pp. 345-350, 1989.
- [19] Toran-Diaz, I. et al., "The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose medium", Biotechnol, Len., 5, pp. 409-412, 1983.
- [20] Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. 2000. Metabolic Engineer of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (1): 34-50p.
- [21] Chandrakant, P., Bisaria, V. 2000. Simultaneous bioconversion of glucosa and xylose to etanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 301- 309.
- [22] White, J. 1995. Yeast Technology. Wiley & Sons. USA. 431 p.
- [23] Mesas, J. M., y Alegre, M. T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. Cienc. Tecnol. Aliment 2 (4): 174-183p.
- [24] Kretzchmar, H. 1990. Levaduras y Alcoholes y otros productos de la fermentación. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España. 582 p.
- [25] Hornsey, I.S. 2003. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- [26] Jaccques, K., Lyons, T.P., Kelsall, D.R. 1999. The Alcohol Textbook. Tercera edición. Nottingham Universty Press. Alltech Inc. Nottingham. 346 p.
- [27] Ward, O.P. 1991. Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 274 p.
- [28] Santander, M. C. 2006. Optimización de las concentraciones de urea y fosfato de amonio en la producción de alcohol a partir de miel Final y miel virgen de caña

de azúcar empleando *Saccharomyces cerevisiae*. . Requisito parcial para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

[29] Stryer, L. 1995. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Reverte S.A. 451 p.

[30] L.f. Mejía Giraldo; H.A. Martínez Correa; J.E. Betancourt Gutiérrez y C.E. Castrillon Castaño. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del Mango común (*Mangifera Indica* L) en la obtención de azúcares fermentables. Universidad EAFIT. Medellín, Antioquia

[31] Dube M., *J. Agric. Food Chem.* 2004.

[32] Abedinifar, S. et al. (2008) Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 33. pp. 828 – 833.

[33] Chiung-Fang, H et al. (2009) Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate. *Bioresource Technology*. Vol. 100. pp. 3914–3920.

[34] Agudelo, R. A (2009) Evaluación experimental del proceso SFES de alcohol carburante a partir de material lignocelulósico. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. BibliotecaCentral).

[35] Valencia, N. R. et al. (2009) Producción de etanol a partir de subproductos del café. Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé).

[36] Xu, J. et al. (2010) Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*. Vol. 101. pp. 2900–2903.

[37] Rasmussen, M. L. et al. (2010) Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresource Technology*. Vol. 101. pp. 3526–3533.

[38] Nouredini, H. et al. (2010) Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. *Bioresource Technology*. Vol. 101. pp. 1060–1067.

[39] Carrasco, C. et al. (2010) SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 46. pp. 64–73.

[40] Saha, B. C. et al. (2010) Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol. *New Biotechnology*. Vol. 27. Number 1. pp. 10-16.

- [41] Huang, C. F. et al. (2009). Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid, Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. Vol. 100. pp. 3914–3920.
- [42] Huang, C. et al. (2009). Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. Vol.100. pp. 3914–3920.
- [43] Zabihi, S. et al. (2010). Pretreatment of wheat straw using steam, steam/acetic acid and steam/ethanol and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Biosystems Engineering*. Vol. 105.Pp. 288 – 297.
- [44] Behera, S. et al. (2009). Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. In press.
- [45] Kumar, A. et al. (2009). Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. Vol.100. Issue. 13. pp. 3293-3297.
- [46] Benavides M.; et al. Estudio sobre la obtención de glucosa a partir de harina de arroz mediante hidrólisis enzimática. *Tecnología*, nº153, Colombia (1985).
- [47] Braverman J.B.S. *Bioquímica de los alimentos*. Editorial Manual Moderno, S.A. de C.V, México (1980).
- [48] Novo Nordisk. *Ficha Técnica de Enzimas* (1999).
- [49] Hacia un Manejo Integral de los Desechos Sólidos. [http://www.isdem.gob.sv/desechos\\_s1.html](http://www.isdem.gob.sv/desechos_s1.html) 2008.
- [50] MAPFRE. 1994. *Manual de Contaminación Ambiental*. Madrid: MAPFRE. pp. 42-63.
- [51] Abraham, E. R., S. Ramachandran and V. Ramalingam. 2007. Biogas: Can it be an important source of energy?. *Env. Sci. Pollut. Res.* 14 (1): 67-71.
- [52] Aristizábal, B., J. González y C. Montes. 2003. Retos en la aplicabilidad de la norma colombiana sobre el control de dioxinas y furanos en incineradores. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. Medellín. 28:17-27.
- [53] Asofungicol. 2005. Orellanas. En: <http://www.ccneiva.org/promocion/orellanas.htm>. Consulta: Abril 2006.

- [54] Agencia Universitaria de Periodismo Científico y Cultural - AUPEC. 2008. Hongos: riqueza de la naturaleza poco explotada. En: <http://aupec.univalle.edu.co/informes/abril97/boletin34/hongos.html>. Consulta: Febrero 2008.
- [55] Cámara de Comercio de Medellín. Servicios corporativos: establecimientos por actividad. 2004. En: <http://www.camaramed.org.co/servicioscorporativos/inteligencia/establecimientospoactividadeconómica2004.xls>. Consulta: Abril 2005.
- [56] Cámara de Comercio de Medellín. Informe Empresarial. 2006. En: <http://www.camaramed.org.co/Documentos/docs/informaempresarial2007/4.1medellin.pdf>. Consulta: Febrero 2008.
- [57] Cardona, J. 2002. 2500 toneladas diarias de basura buscan acomodarse. Rev. Amb. El Reto. 42:20-27.
- [58] Castaño, A y D. Londoño. 2002. Sinergia de subproductos industriales en el municipio de Itagüi. Trabajo de grado. Ingenieros de Producción. Escuela de Ingeniería.
- [59] Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. 70 p. Cháfer, M.T., P. Fito, M.D. Ortolá y A. Chiralt. 2000.
- [60] Aprovechamiento de la corteza de cítricos mediante deshidratación osmótica con pulso de vacío. Aliment. Equipos Tecnol. 19 (9): 55-60.
- [61] Devia, J. 2003. Proceso para producir pectinas cítricas. Rev. Univ. EAFIT. Medellín. 39(29):21-29.
- [62] Echevarría, M. 2002. Producción de hidrógeno a partir de la descomposición térmica catalítica del biogás de digestión anaerobia. Rev. Téc. Residuos. 12(68):94-98 Elias, X. 2003. Uso de combustibles alternativos.
- [63] Tecnologías aplicables. Rev. Téc. Residuos. 13(71):68-82 Elisashvili, V., M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E.
- [64] Metreveli, T. Kharziani and G. Kvesitadze. 2008.
- [65] Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. Bioresour. Technol. 99(3): 457–462 Estrada, A. 1998.
- [66] Pectinas cítricas. Efecto del arrastre de vapor en la extracción y diferentes métodos de secado. Rev. NOOS 7:23-34.

- [67] Fennema, O. 1993. Química de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España. 1092 p.
- [68] Giraldo, G. y O. López 1997. Extracción y aplicación de las pectinas de guayaba dulce, tomate de árbol y cáscara de maracuyá. Rev. NOOS 3:17-23.
- [69] Gutiérrez, E., G. Medina, M. Orfilia, O. Florez y O.L.
- [70] Martínez. 2002. Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. Rev. Vitae 9(1):5-14.
- [71] Hernández, M., M.A. Chávez, R. Báez, C. Carvajal, M. Márquez, H. Morris, R. Santos, J.L. González, V. Quesada y C. Rodríguez. 2003. Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Biotecnol. Apl. 20(3):180 –182.
- [72] Intermediate Technology Development Group. ITDG. 2008 a. Biogas and liquid biofuels. The Shumacher Centre for Technology and Development. England. En: [http://www.itdg.org/docs/technicalinformation\\_service/fruit\\_wasteutilis ation.pdf](http://www.itdg.org/docs/technicalinformation_service/fruit_wasteutilis ation.pdf). Consulta: Febrero 2008.
- [73] Intermediate Technology Development Group. ITDG. 2008 b. Fruit waste utilisation. The Shumacher Centre for Technology and Development, England. En: <http://www.itdg.org/docs/technicalinformationservice/fruitwasteutilisation.pdf>. Consulta: Febrero 2008.
- [74] Isaza, J., M. Perilla y Y. Correa. 1996. Determinación de pectina metoxilada en 10 frutas colombianas de uso común. Rev. Sci. Tecn. Pereira (3):1-5.
- [75] Jacobsen, S.E., A. Mujica y R. Ortiz. 2003. La Importancia de los cultivos andinos. Fermentum 13(36):14–24.
- [76] Kesterson, J.W and R.J. Braddock. 1976. By-products and speciality products of Florida citrus. Chemist and Associate Food Scientist. Agricultural Research and Education Center, Florida. University of Florida. 119 p.
- [77] Lako, J., V.C. Trenerry, M. Wahlqvist, N. Wattanapenpaiboon, S. Sotheeswaran and R. Premier. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of fijian fruit, vegetables and other readily available foods. Food Chem. 101(4):1727–1741.
- [78] Legall, J.R., L.E. Dicovski y Z.I. Valenzuela. 2008. Manual básico de lombricultura para condiciones tropicales.

- [79] Escuela de Agricultura y Ganadería de Estela "Francisco Luis Espinoza". Nicaragua. En: <http://usuarios.rnet.com.ar /mmorra/libro2.htm>. Consulta: Enero 2008.
- [80] Medina, M. 1997. Manejo de desechos sólidos y desarrollo sustentable. Rev. Antioq. Econ. Desarro. 54:70-80.
- [81] Medina, O. y L. Moreno. 2003. Pulpa de remolacha y cáscara de naranja como fuentes de carbono en la producción de pectinasas. Cienc. Desarro. Tunja 1(1):50-59.
- [82] Méndez, R. 1995. Aprovechamiento de subproductos agropecuarios. Unisur, Santafé de Bogotá. 336 p.
- [83] Mukerjee, D. 1998. Health impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. A critical review. J. Air. Waste Manag. Assoc. 48(2):157-165.
- [84] Nitsawang, S., R. Hatti-Kaul and P. Kanasawud. 2006. Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. Enzyme Microb. Technol. 39(5):1103–1107
- [85] Ochoa, A. 1998. Aceites esenciales. El aroma de la naturaleza. Agencia AUPEC, Universidad del Valle. Cali. En: <http://aupec.univalle.edu.co/informes/julio98/aceites.html>. Consulta: Febrero 2008.
- [86] Peters, T. 2003. Optimización del aprovechamiento energético de biogás de vertederos. Rev. Téc. Residuos 13 (70): 34-37.
- [87] Portal Bioceánico. 2008. Producción y comercialización de setas y hongos comestibles V. Guía No. 5: Hongos y setas. En: <http://www.portalbioceanico.com/nuevasactividades hongosysetas.htm>. Consulta: Febrero 2008.
- [88] Restrepo, E. y A. Uribe. 1994. Diseño de un sistema de transformación de materia orgánica para acelerar el proceso de compost. Trabajo de grado. Ingenieros Mecánicos. Escuela de Ingeniería Mecánica. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia. 80 p.
- [89] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca - SAGARPA. 2008. Lombricultura y alimentación. Texcoco, Estado de México. México. En: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/publicaciones/fichas/listafichas/T-6-01.pdf>. Consulta: Febrero 2008.
- [90] Tsai, W.T. 2008. Management considerations and environmental benefit analysis for turning food garbage into agricultural resources. Bioresour Technol. Jan 4 [Epub ahead of print] Vijayaraghavan, K, D. Ahmad and Ch.

- [91] Soning. 2007. Biohydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter. *Intl. J. Hydrogen En.* 32:4754–4760.
- [92] Xu, G., D. Liu, J. Chen, X. Ye, Y. Ma and J. Shi. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chem.* 106(2):545–551.
- [93] Yi, Z., Y. Yu, Y. Liang and B. Zeng. 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT Food Sci. Tech.* 41(3):597–603.
- [94] Dommergues Y, Mangenot F. *Écologie microbienne du sol.* Paris. Masson et Cie. 1970, pp 92-154
- [95] Fenchel T, King GM, Blackburn TH. *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling.* 2<sup>ed</sup>. Academic Press, San Diego, 2000; pp. 43-59, 117-161.
- [96] Alexander M. *Introducción a la microbiología del suelo.* México, AGT Editor 1980, pp. 163-218, 270-291.
- [97] Schlegel H.G. *General microbiology.* 7 ed. Cambridge University Press 1993, pp. 234-244, 446-464.
- [98] Shoham Y, Lamed R, Bayer EA. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology* 7: 275-281, 1999.
- [99] Muller HG. *An introduction to tropical food science.* Cambridge University Press, 1988.
- [102] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R & Tschaplinski T (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science.* 311: 484-489.
- [100] Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Biochemistry of microbial degradation.* Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 233–277.
- [101] Ovando-Chacón SL & Waliszewski KN (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120.



[102] Béguin P & Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 25-58.

[106] Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T & Martínez, E (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.

[103] Aro N, Pakula T & Penttila M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 719–739.

[104] Chang, V.S., y Holtzapple, M.T. (2000). Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 84 – 86, 5–37.

[105] Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z. y Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology.* 100, 903–908

[106] Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19, 797-841.

[107] Beall, F.C. y Eickner, H.W. (1970). Thermal degradation of wood components: a review of the Literature. Madison – USA. U.S.D.A. Forest service, research paper FPL 130.

[108] Gregg D. y Saddler J.N. (1996). A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotech.* 57-58, 711–727.

[109] Duff, S.J.B., y Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 55 (1): 1-33.

[110] Kohlmann, K.L., Westgate, P.J., Sarikaya, A. et al. (1995). Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. BTEC paper 127. En: 207th American Chemical Society National Meeting, ACS Symposium series No. 618. *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, 237–255.

[111] Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., y Dale, B.E., (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 121-124, 1133-41.

[112] Zheng, Y-Z., Lin, H-M y Tsao, G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology Progress.* 14 (6): 890-896.

[117] Kim, K.H., y Hong, J. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology.* 77, 139–144.

- [113] Galbe, M., y Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 618- 628.
- [114] Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter. Berlin.
- [115] Liu, C., y Wyman, C.E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- [116] Hon, D.N.S. y Shiraishi, N. (2001). *Wood and Cellulosic Chemistry*, second ed. Dekker, New York.
- [117] Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology.* 83 (1), 1-11
- [118] Sánchez, Ó.J., y Cardona, C.A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia.* 30 (11): 671-678.
- [119] Fan L. T., Gharpuray, M. M., y Lee, Y. H. (1987). *Cellulose Hydrolysis.* Berlin, Alemania. Springer-Verlag. 3, 1-68.
- [120] Itoh, H., (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology.* 103, 273-280.
- [121] Fermentación. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n> 2008.
- [122] CONN, Eric. 1996. *Bioquímica Fundamental.* 5ta. ed. México: Limusa. pp. 87-92.
- [123] HANSEN, Albert. 1959. *Microbiología de las Fermentaciones Industriales.* Zaragoza: Acribia. pp. 98-359.
- [124] MURRAY, K. y Colaboradores. *Bioquímica de Harper.* 21va. ed. México: El Manual Moderno. pp. 127-151.
- [125] Bai, F. W. et al. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances.* Vol. 26. pp. 89-105.
- [126] N. Kosaric, N. et al. (2001). *Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation. The Biotechnology of ethanol: Clasical and future applications,* Eds. WILEY-VCH. pp. 103–105.

[127] Chandraraj, K. et al. (2004). Bacterial Alcoholic fermentation. Concise Encyclopedia of bioresource. pp. 327-333.

[128] Huang, C. F. et al. (2009). Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid, Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. Bioresource Technology. Vol. 100. pp. 3914–3920.