



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

“Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)”

Proyecto Trabajo de Investigación Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente. (TEMI) previo la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborador por: Daysi Anabel Paredes Medina

Tutor: Ing. Gladys Navas

AMBATO-ECUADOR

2010

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Ing. Gladys Navas

En mi calidad de Tutora, del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: **“OBTENCIÓN DE ENZIMAS CELULASAS A PARTIR DE HONGOS (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) UTILIZANDO COMO SUSTRATOS LOS RESIDUOS DEL CULTIVO DEL BANANO (*Musa cavendish*)”**, de la Egresada: Daysi Anabel Paredes Medina, estudiante de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato; considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, 25 de octubre del 2010

.....
Ing. Gladys Navas

AUTORÍA DE LA TESIS

Los criterios emitidos en el siguiente trabajo de investigación **“OBTENCIÓN DE ENZIMAS CELULASAS A PARTIR DE HONGOS (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) UTILIZANDO COMO SUSTRATOS LOS RESIDUOS DEL CULTIVO DEL BANANO (*Musa cavendish*)”**, así también como los contenidos, ideas, análisis, y propuestas, son de responsabilidad de Daysi Anabel Paredes Medina y son parte del Proyecto de Investigación “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano” realizado en la Universidad Técnica de Ambato a través del Centro de Investigación Científica (CENI).

Ambato, 25 de octubre del 2010

.....
Daysi Anabel Paredes Medina
AUTORA

.....
Ing. Gladys Navas
TUTORA

APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 25 de octubre del 2010

Para constancia firman:

.....
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María por guiarme en todo el trayecto de mi vida.

A mis padres Simón y Priscila por su confianza y amor infundido en mi en todo momento.

A mis hermanos Pedro, Sandra, Marco y Henry por su apoyo incondicional.

A mis pequeños sobrinos, Cristofer y Anita con su ternura, me motivaron día a día.

A toda mi familia, en especial a la memoria de mi abuelita Dioselina.

Daysi

AGRADECIMIENTO

A mis padres, por creer en mí. A mi familia, compañeros y amigos que siempre me alentaron.

A la Universidad Técnica de Ambato, y por medio de ella a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me permitió formarme profesionalmente a través de su personal docente.

A la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología en Alimentos a (UOITA), por el financiamiento de este trabajo de investigación mediante el proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano” y por su intermedio al Ing. Mario Álvarez, Analista Investigador de la “UOITA” y mentor de mi trabajo de investigación, por su apoyo incondicional.

A la Ing. Gladys Navas, tutora de mi tesis, por la confianza depositada en mi, su apoyo y paciente guía.

A mis amigos y amigas de la FCIAL, quienes han aportado de una u otra manera durante toda la ejecución de este estudio, en especial a Lucy, Inesu, Jenny, Jazmina, Luis, Vinicio, Ángel, Juan y Eduardo, por estar ahí, por su cariño y comprensión. A todos los compañeros de la carrera por los gratos e inolvidables momentos compartidos.

Gracias

ÍNDICE

	Pág.
Portada.....	i
Aprobación del tutor de tesis.....	ii
Autoría de la tesis.....	iii
Aprobación por el tribunal de grado.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice.....	vii
Resumen ejecutivo.....	xv

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA.....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2.1. Contextualización.....	1
1.2.1.1. Contextualización macro.....	1
1.2.1.2. Contextualización meso.....	2
1.2.1.3. Contextualización micro.....	3
1.2.2. Análisis crítico.....	3
1.2.2.1. Árbol del problema.....	4
1.2.3. Prognosis.....	5
1.2.4. Formulación del problema.....	5
1.2.5. Interrogantes.....	5
1.2.6. Delimitación del objeto de investigación.....	6
1.2.6.1. Delimitación científica.....	6
1.2.6.2. Delimitación tiempo-espacial.....	6
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	7
1.4. OBJETIVOS.....	8
1.4.1. Objetivo general.....	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	8

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.	ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	9
2.2.	FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.....	12
2.3.	FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	12
2.4.	CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	13
2.4.1.	Marco conceptual de variable independiente.....	13
2.4.1.1.	Sustrato.....	13
2.4.1.1.1.	Banano.....	15
	- Aspectos botánicos y de cultivo del banano.....	15
	- Manejo de los residuos de banano	16
	- Clima y suelo para el cultivo del banano.....	17
	- Recolección del banano.....	17
	- Composición química de los residuos del cultivo de banano	18
	- Constituyentes de los residuos lignocelulósicos del banano	18
	* Celulosa	18
	* Hemicelulosa	19
	* Lignina.....	20
	* Otras sustancias.....	22
2.4.1.2.	Pretratamientos de los residuos lignocelulósicos.....	22
2.4.1.3.	Hongos.....	23
2.4.1.3.3.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	25
2.4.1.3.4.	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	27
2.4.1.3.5.	<i>Lentinula edodes</i>	27
2.4.1.3.	Fermentación sólida.....	29
2.4.2.	Marco conceptual de variable dependiente.....	30
2.4.2.1.	Enzimas celulasas	300
2.4.2.1.1.	Extracción de enzimas.....	312
2.4.2.2.	Actividad enzimática	33
2.4.2.2.1.	Factores que afectan la actividad enzimática	33
	- Efecto del pH.....	33
	- Efecto de la temperatura.....	35

2.4.2.3.	Producción de enzimas celulasas a partir de hongos	35
2.4.2.4.	Aplicaciones industriales	37
2.4.2.4.1.	Hidrólisis de residuos celulósicos.....	38
2.4.2.4.1.	Producción de bioetanol.....	39
2.5.	HIPÓTESIS	41
2.5.1.	Hipótesis nula	41
2.5.2.	Hipótesis alternativa	41
2.6.	SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES DE LA HIPÓTESIS ..	42
2.6.1.	Variable independiente	42
2.6.2.	Variable dependiente	42
2.6.3.	Unidad de observación	42

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1.	MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN	43
3.2.	NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	43
3.3.	MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN.....	44
3.3.1.	Método para la obtención de las enzimas celulasas	44
3.3.2.	Metodologías aplicadas para el análisis de los residuos de banano	46
3.3.2.1.	Determinación de humedad.....	46
3.3.2.2.	Análisis químico	46
3.3.2.2.1.	Extracción de solubles en alcohol–benceno	46
3.3.2.2.2.	Eliminación de los compuestos solubles en agua caliente.....	46
3.3.2.2.3.	Determinación del contenido de lignina insoluble en ácido.....	46
3.3.2.2.4.	Determinación del contenido de Celulosa.....	47
3.3.3.	Metodología aplicada para la determinación de actividad enzimática de las celulasas	47
3.3.3.1.	Determinación de azúcares reductores.....	48
3.3.3.1.1.	Método de cálculo de concentración de azúcares reductores y actividad enzimática.....	48
3.3.3.2.	Método para evaluar las condiciones optimas de acción de la celulasas.....	50

3.3.3.2.1.	pH.....	50
3.3.3.2.2.	Temperatura	51
3.3.4.	Metodología empleada para la producción de bioetanol.....	51
3.3.4.1.	Pretratamiento alcalino a los residuos de banano	51
3.3.4.2.	Fermentación alcohólica	51
3.4.	Población y muestra.....	50
3.4.3.	Diseño experimental	52
3.5.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	54
3.5.1.	OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE ...	54
3.5.2.	OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE:	55
3.6.	PLAN DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN	56
3.6.1.	Materiales	56
3.6.1.1.	Materias primas.....	56
3.6.1.2.	Equipos.....	57
3.6.1.3.	Materiales de laboratorio.....	57
3.6.1.4.	Reactivos	58
3.7.	PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	59

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	60
4.1.1.	Análisis químico de los residuos del cultivo de banano	60
4.1.2.	Verificación de crecimiento micelial en los distintos tratamientos ...	61
4.1.3.	Determinación de la concentración de azúcares reductores... 62	
4.1.4.	Determinación de actividad enzimática.....	63
4.1.4.1.	Análisis estadístico de la actividad de las enzimas celulasas .	64
4.1.5.	Efecto de la temperatura, tiempo y pH de reacción en la actividad de las enzimas celulasas	65
4.1.5.1.	Efecto de la temperatura y tiempo	66
4.1.5.2.	Efecto del pH	66
4.1.6.	Pretratamiento alcalino de los residuos del cultivo de banano	67
4.1.7.	Hidrólisis de los compuestos celulósicos	68

4.1.8.	Fermentación alcohólica	69
4.1.8.1.	Destilación alcohólica.....	70
4.1.8.2.	Cantidad de etanol obtenible a partir de residuos del cultivo de banano	71
4.1.9.	Análisis económico de la obtención de enzimas celulasas	71
4.2.	VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	75

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	CONCLUSIONES	76
5.2.	RECOMENDACIONES	77

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1.	DATOS INFORMATIVOS	79
6.2.	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	80
6.3.	JUSTIFICACIÓN	81
6.4.	OBJETIVOS.....	82
6.4.1.	Objetivo General.....	82
6.4.2.	Objetivos Específicos.....	83
6.5.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	83
6.6.	FUNDAMENTACIÓN	84
6.7.	METODOLOGÍA. MODELO OPERATIVO.....	84
6.7.1.	Modelo Operativo (Plan de acción).....	85
6.7.2.	Materiales Directos	86
6.7.3.	Materiales Indirectos	86
6.7.4.	Equipos	86
6.7.5.	Proceso de obtención de enzimas celulasas	87
6.8.	ADMINISTRACIÓN	88
6.8.1.	Administración de la propuesta	89
6.9.	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	90

CAPÍTULO VII

MATERIALES DE REFERENCIA

7.1. BIBLIOGRAFÍA	91
-------------------------	----

ANEXOS

ANEXO A

RESPUESTAS EXPERIMENTALES

- Tabla 1.** Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos del cultivo de banano en base seca
- Tabla 2.** Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos del cultivo de banano en base seca luego del tratamiento alcalino
- Tabla 3.** Verificación de la presencia de crecimiento micelial mediante inspección visual, en los distintos tratamientos, luego de 24 días de fermentación sólida
- Tabla 4.** Valores experimentales de la concentración de azúcares reductores (g de glucosa/50 ml de *mezcla reactiva) formados durante la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) por la acción de las enzimas celulasas obtenidas de los distintos tratamientos
- Tabla 5.** Promedios de los valores de actividad de las enzimas celulasas (UI/g de materia seca), calculadas
- Tabla 6.** Actividad de celulasas (UI/g de materia seca) obtenidas a distintas temperaturas en función del tiempo
- Tabla 7.** Actividad de celulasas (UI/g de materia seca) obtenidas a distintos pHs de reacción
- Tabla 8.** Variación de los sólidos solubles (°Brix) durante las 48 horas de hidrólisis enzimática del material celulósico pretratado
- Tabla 9.** Variación de los sólidos solubles (°Brix) registrados durante los nueve días de fermentación alcohólica

Tabla 10. Cantidad de etanol obtenido a partir de 100 g de residuos de banano

Tabla 12. Cantidad de etanol obtenible a partir de residuos del cultivo de banano.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 13. Análisis de varianza para la actividad de las enzimas celulasas

Tabla 14. Análisis de Tukey para el factor A (Residuos): Valores experimentales de actividad de las enzimas de celulasas (UI/g de materia seca)

Tabla 15. Prueba de Tukey: Efecto de la interacción AxB: Valores experimentales de actividad de las enzimas celulasas (UI/g de materia seca)

Gráfico 4. Representación gráfica del análisis estadístico de la interacción de los residuos y cepas de los hongos en función de las actividades enzimáticas

ANEXO C

GRÁFICAS DE LAS RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Gráfico 5. Efecto de la temperatura y tiempo en la actividad de las celulasas (UI/g de materia seca)

Gráfico 6. Efecto del pH en la acción de las enzimas celulasas obtenidas

Gráfico 7. Sólidos solubles (°Brix) durante la hidrólisis enzimática de los compuestos celulósicos

Gráfico 8. Sólidos solubles (°Brix) durante los nueve días de fermentación alcohólica

ANEXO D

DIAGRAMAS

Gráfico 9. Balance de materia de la obtención de enzimas celulasas

Gráfico 10. Diagrama de flujo para la obtención bioetanol utilizando los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)

ANEXO E

FOTOGRAFÍAS

ANEXO E1. Preparación del inóculo o semilla

ANEXO E2. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*), utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)

ANEXO E3. Hidrólisis de la celulosa presente en los residuos de banano pretratados

ANEXO E4. Pretratamiento alcalino

ANEXO E5. Determinación de azúcares reductores

ANEXO E6. Análisis químico de los residuos del cultivo de banano

ANEXO E7.Proceso de obtención de bioalcohol

RESUMEN EJECUTIVO

En Ecuador se genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos como resultado del cultivo de banano (ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina), los cuales pueden ser utilizados en fermentación sólida de hongos productores de enzimas celulasas y como materia prima para producir bioalcohol.

En el presente trabajo se analizó la actividad de enzimas celulasas (UI/g de residuo seco) obtenidas de la fermentación sólida sobre los residuos de banano pseudotallo, hojas y raquis con setas *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* en 24 días de incubación. La máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por *Lentinula edodes* en pseudotallo con valores de 8,14 UI/g de residuo seco, por consiguiente se lo consideró como el mejor tratamiento.

Se determinó que a una temperatura de 50°C y a pH 5,3 son las condiciones óptimas para que las enzimas celulasas actúen en la hidrólisis de sustratos celulósicos, condiciones a las que las celulasas alcanzan su máximo valor de actividad.

Con el propósito de aplicar las enzimas celulasas obtenidas en la tecnología de producción de bioalcohol en primera instancia se modificó la estructura química de la lignina de los residuos de banano, mediante un pretratamiento con 0,74 g de hidróxido de calcio/g de residuo, para la subsiguiente hidrólisis de la celulosa a azúcares con 12 UI de extracto enzimático/g de residuo seco pretratado.

El producto de la hidrólisis compuesto por azúcares solubles fue concentrado a 6°Brix, para su posterior fermentación alcohólica con

Saccharomyces cerevisiae durante 9 días. El mayor rendimiento de etanol fue en raquis, con 24,66 ml por 100 g de residuo seco.

Del análisis económico de la “tecnología de obtención de enzimas celulasas”, se llegó a establecer que el precio de producción de \$ 34,49 por kilogramo, que es relativamente alto al compararlo con el precio del mercado que es \$ 15,68 el kilogramo.

Mediante este estudio se avizora que existe un potencial uso de los residuos de cultivo de banano como sustratos para producción de enzimas celulasas y como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA

“Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)”

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1. Contextualización

1.2.1.1. Contextualización macro

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, lo que ha desarrollado la biotecnología como herramienta para que a través de los microorganismos se obtengan metabolitos de interés tanto industrial como ambiental (Mosquera, C. y Rubio, M. 2000).

A partir de 1940, las aplicaciones industriales de las enzimas fueron extendiéndose progresivamente. Un ejemplo del desarrollo comercial de las preparaciones enzimáticas es la división de enzimas de la empresa Novo Industry (actualmente Novozymes). Hasta 1965 sus ventas no excedían el millón de dólares americanos. Sin embargo, la aparición en 1960 de un detergente conteniendo una alcalasa de *Bacillus licheniformis*, y el desarrollo de un proceso enzimático para producir dextrosa a partir de glucoamilasas llevó a que la empresa facturase 50 millones de dólares anuales sólo cuatro años más tarde.

En 1987 en el mercado de enzimas en Estados Unidos y Europa alcanzó los 700 millones de dólares. Las de origen microbiano representaron un 60% de esta cifra. El crecimiento del mercado de enzimas para uso industrial ha continuado hasta alcanzar en 1998, los 1,6 billones de dólares repartidos en las siguientes áreas: Alimentación (45%), detergentes (34%), textil (11%), cuero (3%), papel (1,2%). Aproximadamente un 60% de las enzimas utilizadas en alimentación, formulación de detergentes e industrias de procesamiento de almidón son productos recombinantes. En el año 2000, el mercado alcanzó los 2000 millones de dólares sin incluir enzimas terapéuticas y de diagnóstico (Fernández, L. 2005).

En la actualidad hay en el mundo solo dos proveedores de complejos enzimáticos para degradar residuos lignocelulósicos: Novozymes (Dinamarca) y Genencor (EE.UU.) (Velázquez, B. 2010), dos empresas líderes de investigación y desarrollo de este tipo de enzimas encaminadas a la producción de etanol celulósico, las mismas que no reportan sus cifras de producción o comercialización.

1.2.1.2. Contextualización meso

En América latina existen empresas productoras de enzimas que no son precisamente celulasas. En México, Brasil, Argentina y Uruguay, muchas de las cuales son subsidiarias de empresas transnacionales, como es el caso de Pfizer en México y Brasil y Novo en Brasil. En Colombia no hay producción de enzimas a escala industrial, siendo importadas de diversos países de Europa, Japón, Estados Unidos, Canadá y México. La importación de enzimas en Colombia se hace en su mayor parte a través de representantes o casas comerciales, pero algunas industrias de cervecería, molinería y lácteos hacen importación directa de las enzimas que requieren (Carrera, J. 2002).

1.2.1.3. Contextualización micro

En el Ecuador se produce por año más de 8 millones de toneladas de residuos de banano como: hojas, pseudotallo y raquis, y aproximadamente 240,000 toneladas de fruta, que se originan en las plantas empacadoras y que no se exporta. Todos estos desechos no son manejados adecuadamente y terminan en los bordes de las carreteras y en los lechos de ríos, en los que causan contaminación por la carga orgánica que representan. En el aire estos desechos provocan una substancial contaminación por la generación de gas metano (Álvarez, M. *et. al.*, 2003).

Como alternativa para aprovechar los residuos del cultivo de banano y aplacar la mencionada contaminación, se plantea su empleo como sustratos para la fermentación sólida del micelio de setas, del cual se obtendrá enzimas celulasas, las mismas que al aplicarse en residuos celulósicos permitirán obtener azúcares fermentables como la glucosa para la obtención de bioetanol.

1.2.2. Análisis crítico

En el árbol de problemas se identifica como problema la obtención de enzimas celulasas, por lo tanto el establecimiento de una tecnología de su obtención que implique el aprovechamiento de los residuos del cultivo de banano (hojas, pseudotallo y raquis) como sustratos, permitirá la producción de micelio de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* que generen estas enzimas. Logrando de esta manera contrarrestar el alto costo de las enzimas celulasas comerciales para sustratos celulósicos; estas enzimas se aplicarán para la transformación de este tipo de residuos a azúcares aplicables a fermentaciones alcohólicas.

La combinación de los tres tipos de residuo del banano: hojas, pseudotallo y raquis con las tres cepas de hongos planteados en el diseño experimental y evaluado a través de respuestas experimentales, permitirán escoger el mejor tratamiento para la tecnología de obtención de enzimas celulasas.

1.2.2.1 Árbol del problema

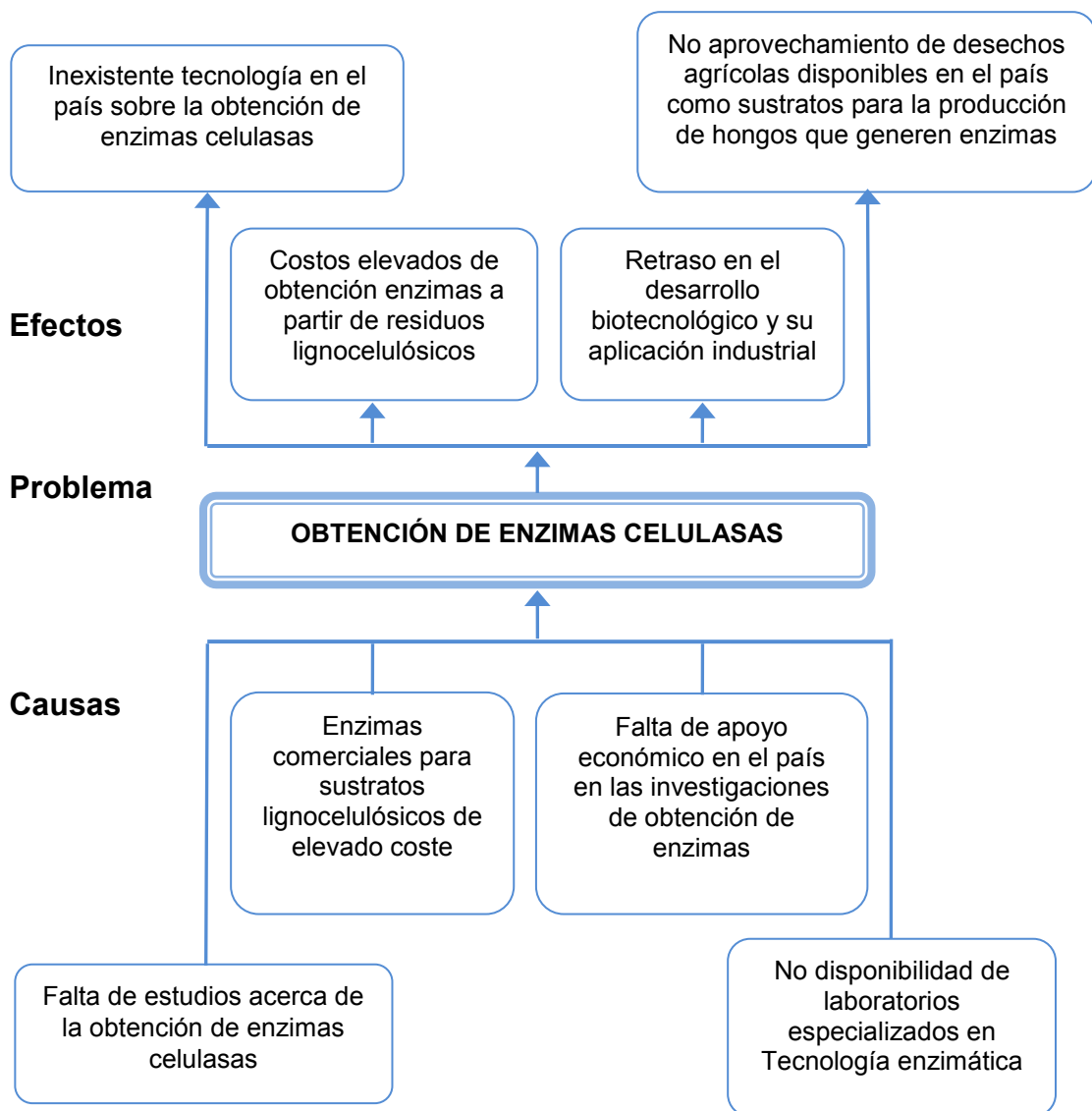


Gráfico 1. Árbol de problemas
Elaborado por: Daysi Paredes Medina

1.2.3. Prognosis

La falta de un estudio y desarrollo tecnológico para la obtención de enzimas celulasas no permitiría dar lugar a procesos de conversión (de celulosa a azúcares como la glucosa) de los residuos celulósicos tan abundantes en nuestro país que se generan de la planta de banano al momento de su cosecha, que al ser difíciles de manejar tienden a provocar un problema medioambiental.

Cabe recalcar que en el presente estudio se utilizó los residuos de banano: hojas, pseudotallo y raquis; pero al no realizar esta investigación se estaría desvalorizando su empleo como sustratos de los hongos para la obtención de enzimas celulasas; para evitar la importación de las mismas. En la actualidad la industria nacional está obligada a salvaguardar esta falta de tecnologías mediante la obtención de enzimas que son de alto costo.

1.2.4. Formulación del problema

¿Es factible obtener enzimas celulasas por fermentación sólida utilizando el micelio de las setas de *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, empleando como sustratos pseudotallos, hojas y raquis de banano en la provincia de Tungurahua durante el periodo octubre 2009 a marzo 2010?

1.2.5. Interrogantes

¿Los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* pueden crecer en residuos lignocelulósicos de la planta de banano y por ende producir enzimas celulasas?

¿Cuáles serán los valores de actividad enzimática de las enzimas celulasas obtenidas de la fermentación sólida con los diferentes sustratos (residuos de banano)?

¿Las enzimas celulasas obtenidas pueden emplearse para producir bioetanol a partir de la hidrólisis de la celulosa presente en los residuos de banano?

¿Cuáles serían los costos de producción de las enzimas celulasas?

1.2.6. Delimitación del objeto de investigación

1.2.6.1. Delimitación científica

Área: Agroindustria
Sub-área: Investigación biotecnológica
Sector: Tecnología de enzimas
Sub-sector: Enzimas celulasas

1.2.6.2. Delimitación tiempo-espacial

El presente proyecto de investigación se realizó en la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y en la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos (UOITA), junto con el desarrollo del proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”, auspiciado por CENI-UTA, durante el período comprendido entre octubre del 2009 y marzo del 2010.

1.3. JUSTIFICACIÓN

El progreso de la biotecnología de las enzimas celulasas ha llamado la atención a nivel mundial, ya que los métodos tradicionales de producción de enzimas pueden ser demasiado prolongados hasta la obtención de la enzima purificada. Por esta razón nace la necesidad de buscar nuevas alternativas que permitan la obtención de enzimas celulasas en tiempos cortos y con propiedades bioquímicas adecuadas para el proceso en el cual va a usarse (Ponce, T. y Pérez, O. 2002).

Una de las alternativas es el uso de los residuos provenientes del cultivo de banano que produce como principales residuos: hojas, pseudotallo y raquis, ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina. Teniendo en cuenta esta composición, pueden usarse como sustratos para el cultivo de hongos *Pleurotus* y *Lentinula* capaces de producir enzimas celulasas, con importantes aplicaciones industriales especialmente en la manufactura de textiles, papeles y en la industria de alimentos en el procesamiento de vinos, además de su uso en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos provenientes del cultivo de banano para la producción de etanol

Una planta de banano al momento de su cosecha debe tener un peso promedio de 100 kg los cuales están repartidos en 15 kg de hojas, 50 kg de pseudotallo, 33 kg de banano y 2 kg de raquis. Esto lógicamente indica que el 67% del volumen total de producción lo constituyen los desechos que no aprovecha el hombre sistemáticamente, sino más bien es un foco de contaminación (Bao, M. *et al.*, 1987).

El propósito de este estudio es obtener enzimas celulasas mediante el aprovechamiento de los desechos o residuos del cultivo de banano (hojas, pseudotallo y raquis), como sustratos para la fermentación sólida del micelio de las setas *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lenitnula edodes*, las cuales serán empleadas en la hidrólisis de los

residuos celulósicos del cultivo banano, para la obtención de azúcares fermentables de los que se pueda obtener bioetanol.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

- Obtener enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)”

1.4.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis físico químico de los residuos del cultivo del banano (hojas, pseudotallo y raquis).
- Determinar el mejor tratamiento para la obtención de enzimas celulasas mediante el cálculo de actividad enzimática.
- Establecer la temperatura y pH óptimos de reacción de las enzimas celulasas obtenidas.
- Aplicar las enzimas celulasas obtenidas, en la tecnología de producción de bioalcohol.
- Realizar un análisis económico de la tecnología de obtención de enzimas celulasas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

A nivel macro y meso se han realizado varios trabajos acerca de la obtención de enzimas celulasas a nivel de laboratorio a partir de distintos sustratos y cepas, los mismos que citamos a continuación:

STUTZENBERGER, F. *et al.* (1970), citado en la tesis de Oliva, J. (2003), investigaron los microorganismos con actividad celulolítica durante la composición de residuos municipales sólidos, aislando 3 cepas celulolíticas: *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus sp.*, *Thermoactinomyces sp.* La actividad de la celulasa fue determinada en extractos clarificados de compost por medición de la velocidad de hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC). La máxima actividad se obtuvo a 65°C y pH 6,0 con una concentración de CMC al 2,5%.

YAZDI, M.T. *et al.*, (1990), mencionado por Oliva, J. 2003, indagaron sobre el complejo de celulasas de *Neurospora crassa*, determinando la temperatura y pH óptimos para su actividad y estabilidad. Los resultados mostraron que la actividad máxima ocurrió entre pH 4,0-7,0. Siendo el pH 5,0 o cercano a este, el óptimo para la estabilidad de todos los componentes. La temperatura óptima resultó entre 45-65°C, con un rango para su estabilidad.

KESKAR, S.S. (1992), describe las condiciones óptimas para la producción de celulasa por *Penicillium janthinellum* en cultivos agitados, empleando sustratos celulósicos tratados con álcali así como celulosa nativa. Las máximas actividades de CMcelulosa, exoglucanasas y beta glucosidasa logradas por dicha especie fueron 60,5 y 9 U/ml respectivamente. La hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada, algodón y papel filtro fue de 57% a 58% en 48 horas a 50°C con glucosa como el mayor producto (Oliva, J. 2003).

RUEGG, M. y TAUKE, S. (2004), en su estudio “Actividad de las celulasas de hongos aislados de suelos de la Estación Ecológica de Juréia-Itatins, Sao Paulo, Brasil”, analizaron ochenta hongos filamentosos aislados de la región selva tropical del Atlántico conocida como la Ciénega Grande, de los que fueron analizadas para evaluar el potencial de producción de celulasas en respuesta a la presencia de celulosa como la única fuente de carbono en el medio de cultivo. Se concluye, que la producción de celulasas depende del tipo de sustrato. La mejor actividad CMCasa (1,64 U) se obtuvo con el cultivo de *Trichoderma harzianum* en salvado de trigo después de 4 días de la siembra a 25°C. Se destaca también que los hongos producen celulasas en la naturaleza, no ocupan el mismo nicho ecológico en cultivo puro, donde hay competencia, sino que interactúan con otros organismos celulolíticos y aquellos que degradan varios polímeros

M.M.V. BAIG, *et al*, (2004), en su publicación “Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes”, se describe la utilización de los residuos agrícolas provenientes del cultivo de banano, hojas secas y pseudotallo en su sacarificación por parte de *Trichoderma lignorum*. Los residuos fueron tratados con vapor de agua, obteniéndose un rendimiento de 1,34 mg/ml de azúcares reductores a las 24 horas de reacción. El tamaño del sustrato afectó la sacarificación, cuando el sustrato fue más pequeño (<120µ) su produjeron más azúcares. La producción máxima de

azúcares se dio a un pH de 6,0 mientras que la temperatura óptima fue de 40°C. En estas condiciones los residuos agrícolas provenientes del cultivo del banano dejados por degradación natural pueden ser utilizados para producir efectivamente azúcares fermentables que se pueden convertir en otras sustancias como el alcohol.

RAMIREZ, L. y URREGO, F. (2005), en su trabajo “Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma sp* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo”, se señalan que para una mayor producción de celulasas, se requiere una concentración de fibra de aproximadamente 25%, con una temperatura de incubación cercana a los 23°C. Así también comprobaron el potencial que posee la fibra de palma como fuente de nutrientes para el crecimiento para el hongo *Trichoderma sp*, y como resultado de esto la producción de celulasas para dos fines: comercialización de la enzima concentrada, y reutilización de la fibra agotada para otros fines como extracción de carotenos o empleo como combustible en las calderas de las plantaciones.

MANJARRES, J. (2007), estudia la producción de enzimas celulolíticas mediante el cocultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.*, en fase sólida utilizando los residuos de palma pretratados biológicamente (cultivo con *Pleurotus ostreatus* durante 20 días), con el fin de deslignificar y favorecer la producción de celulasas. Se evaluaron las actividades celulasa total (Fpasa), endoglucanasa (CMCasa) y β -glucosidasa (Celobiasa) durante 16 días de cultivo y a una temperatura de 30°C. Se realizaron diversas evaluaciones de fermentación de los hongos, de forma individual y en cocultivo. Los mayores valores se obtuvieron con *Aspergillus sp.* como cepa individual (A16T0) con valores de 0,149 UI/ml de Fpasa, 0,329 UI/ml de CMCasa y 0,148 UI/ml de Celobiasa; sin embargo bajo el sistema de cocultivo, el cual se inicio con *Aspergillus sp.* durante 9 días y posteriormente *Trichoderma sp.* (A9T7) resultó ser beneficioso al evitar que la actividad enzimática no decayera.

2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

La presente investigación se basa en un paradigma Positivista según: Reichart y Cook (1986), este paradigma tiene como escenario de investigación el laboratorio a través de un diseño preestructurado y esquematizado; su lógica de análisis está orientada a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el respectivo análisis de resultados.

Además la realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto-objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo y puede y debe ser estudiada y por tanto conocida.

2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL

En la fundamentación legal se consideran los métodos utilizados para cada uno de los ensayos, establecidos por la Norma de la A.O.A.C y ciertos autores vigentes a la fecha de estudio.

- Determinación de Humedad-Método 930.15 A.O.A.C. 1996.
- Extracción de los solubles en alcohol-benceno-Núñez, C. 2008
- Eliminación de los compuestos solubles en agua caliente-Núñez, C. 2008.
- Determinación del contenido de lignina insoluble en ácido-Núñez, C. 2008.
- Determinación del contenido de celulosa-Orea-Igarza, U. *et al*, 2006
- Estimación del contenido de hemicelulosas totales-Orea-Igarza, U. *et al*, 2006.
- Determinación de Azúcares Reductores-Lane y Eynon, 1923.
- Determinación de actividad enzimática de las enzimas celulasas-Loera y Córdova, 2003.

- Pretratamiento alcalino a los residuos de banano-González, J. (2009)
- Fermentación alcohólica-Cardona, C. (2004).
- Medición del grado alcohólico o Título alcohómetro-Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, España,1986

2.4. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

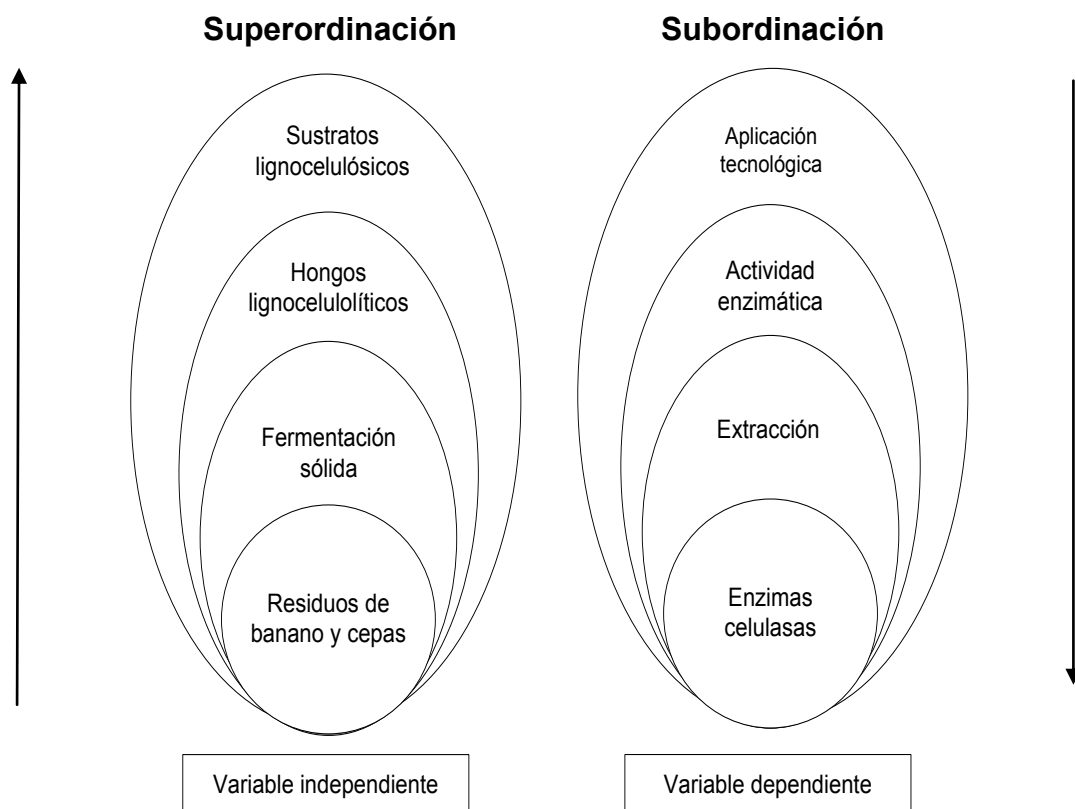


Gráfico 2. Red de inclusión interrelacionado

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

2.4.1. Marco conceptual de variable independiente

2.4.1.1. Sustrato

Se puede entender al sustrato como la tierra para las plantas que proporciona los nutrientes necesarios. El sustrato para el hongo debe proporcionar nutrientes específicos requeridos para el crecimiento.

En el Cuadro 1, se presenta los sustratos que pueden utilizarse en el cultivo de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, y *Lentinula edodes* (Shiitake).

Cuadro 1. Sustratos utilizados en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, y *Lentinula edodes*

Nutrientes		Sustratos
Orgánicos	Fuentes de C	Celulosa
		Hemicelulosa
	Fuentes de N	Proteína
		Amino nitrógeno
Inorgánicos		K, P, Si, Fe, Mg

Fuente: Cha, *et al.*, 1997

Los hongos *Pleurotus ostreatus*, y *Pleurotus pulmonarius* al igual que el hongo *Lentinula edodes*, son hongos de la pudrición blanca que usan lignina y celulosa juntas como la fuente de carbono. Por consiguiente, cualquier tipo de materias orgánicas que contengan lignina y celulosa, pueden usarse como sustratos para estos tipos de hongos y esto incluye casi todos los residuos agrícolas.

Los sustratos pueden ser cáscara de semilla de girasol, paja de arroz o de trigo, frejol, bagazo de caña de azúcar, aserrín de árbol de laurel, eucalipto, cáscara de maní, residuo de algodón, cáscara de semilla de algodón, aserrín de coco, pulpa de café, papel, residuo de cáscara de cacao, fibra de coco y otros. Los materiales inorgánicos se incluyen normalmente en los materiales del sustrato y no necesitan suplemento adicional en la mezcla (Cha, D. y col. 1997).

A continuación se describe el sustrato que se va a emplear en el presente estudio.

2.4.1.1.1. Banano

Banano es una planta monocotiledónea, esto es, al germinar la semilla se produce en ella un solo cotiledón, el banano pertenece al orden de los ZINZIBERALES, familia *Musaceae* y género *Musa* (García y Martínez, 2006).

2.4.1.1.1.1. Aspectos botánicos y de cultivo del banano

La planta de banano está conformada por raíz, pseudotallo, raquis, hojas, racimo, e inflorescencia como se describe en la Figura 1.

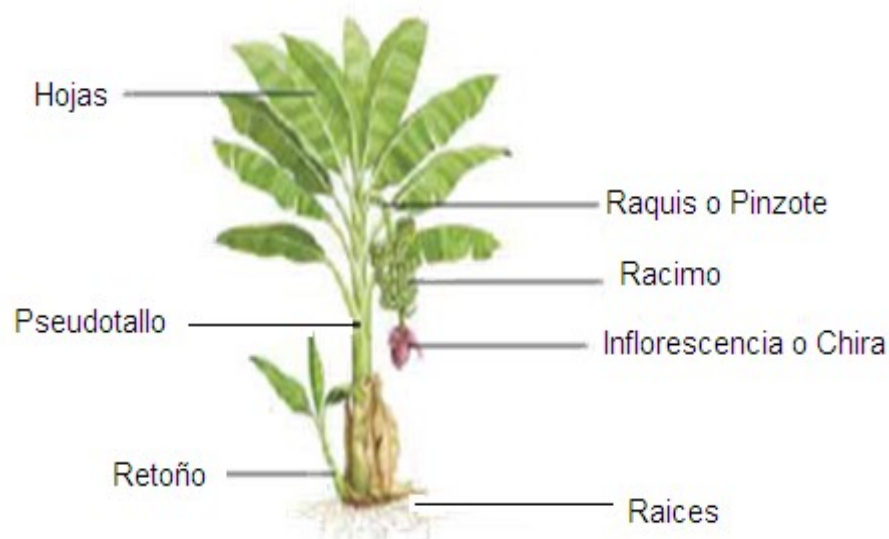


Figura 1. Esquema de una planta de banano (Tomada de Moya, M. 2005)

La planta es herbácea perenne gigante, con rizoma corto y tallo aparente, que resulta de la unión de las vainas foliares, cónico y de 3,5-7,5 m de altura, terminado en una corona de hojas (www.infoagro.com).

Existen por lo general de siete a nueve hojas grandes y bien desarrolladas antes de que la inflorescencia y el tallo comiencen a crecer. Las hojas son enormes, alargadas y ovales, con nervios abundantes y

paralelos, es decir casi en ángulo recto con el nervio central. Mucho antes de que aparezca la inflorescencia van muriendo sucesivamente las hojas más viejas. Los pecíolos se secan y se doblan y la hoja encogida cuelga hacia abajo ocultando a menudo el pseudotallo. Algunos campesinos estiman que las hojas secas prestan protección y sombra al falso tallo (pseudotallo).

El verdadero tallo es un rizoma grande, almidonoso, subterráneo, que está coronado con yemas; éstas se desarrollan una vez que la planta ha florecido y fructificado. A medida que cada chupón del rizoma alcanza la madurez, su yema terminal se convierte en una inflorescencia al ser empujada hacia arriba desde el interior del suelo por el alargamiento del tallo, hasta que emerge arriba del pseudotallo (www.infoagro.com). Cuando un pseudotallo ha producido el racimo de fruto, ya no vale para nada más, por lo que generalmente se corta y trocea para agregarlo como abono al terreno. (Escobar, J. 1965).

2.4.1.1.1.2. Manejo de los residuos de banano

Según El Agro (2000), citado en Palacios, A. (2007), en el Ecuador se han realizado varios trabajos de investigación y adaptación de tecnologías para la utilización de residuos del cultivo del banano, como es la producción de prehumus utilizando microorganismos y abono orgánico conocido como Bokashi, fermentado los residuos con microorganismos eficaces, tecnología desarrollado por el doctor Teruo Higa, profesor de agricultura de la Universidad de Ryukyus en Japón (Palacios, A. 2007).

Hojas y pseudotallos de banano son fuentes de forraje muy útiles en muchos países tropicales, sobretodo en la época seca. Se pueden triturar y distribuir frescos o se pueden ensilar. El contenido en proteína y minerales es bajo, por lo cual el uso requiere suministrarlos con ingredientes ricos en proteína (Bao, M. y col., 1987).

En Ecuador existe la manufactura de productos elaborados artesanalmente de residuos de banano tales como papel de raquis de banano, cajas ecológicas. Ecuador es un país bananero que posee alrededor de 180 mil hectáreas de plantaciones de banano (Dávalos, M. y Zurita, S. 2004).

2.4.1.1.1.3. Clima y suelo para el cultivo del banano

Exige un clima cálido y una constante humedad en el aire. Necesita una temperatura media de 26-27°C, con lluvias prolongadas y regularmente distribuidas. Son preferibles las llanuras húmedas próximas al mar, resguardadas de los vientos y regables.

Es poco exigente en cuanto a suelo, ya que prospera igualmente en terrenos arcillosos, calizos o silíceos con tal que sean fértiles, permeables, profundos, ricos y bien drenados, especialmente en materias nitrogenadas. (www.infoagro.com).

2.4.1.1.1.4. Recolección del banano

La duración de la plantación es de 6 a 15 años, dependiendo de las condiciones ambientales y de los cuidados del cultivo. La planta que se colocó sobre el terreno de asiento da únicamente frutos imperfectos y los mejores frutos se obtienen de los vástagos nacidos de su pie, que fructifican a los nueve meses de la plantación.

Los frutos se pueden recolectar todo el año y son más o menos abundantes según la estación. Se cortan cuando han alcanzado su completo desarrollo y cuando empiezan a amarillear (www.infoagro.com).

2.4.1.1.1.5. Composición química de los residuos del cultivo de banano

A continuación se presenta el análisis proximal de los residuos del cultivo de banano en base seca.

Cuadro 2. Análisis proximal de los residuos del cultivo de banano en base seca (g/100g)

Análisis	Hojas (%)	Pseudotallo (%)	Raquis (%)
*Humedad	8,40	10,00	8,70
Cenizas	16,10	28,30	23,10
Extracto Etéreo	2,30	9,60	1,50
Proteína cruda	12,30	5,30	3,30
Fibra cruda	34,20	35,30	53,90

Fuente: Palacios, A., 2007

*Humedad del sustrato en base seca

2.4.1.1.2. Constituyentes de los residuos lignocelulósicos del banano

2.4.1.1.2.1. Celulosa

La celulosa que es el biopolímero de D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre (Montoya, S. 2008). La celulosa es además la forma más común de encontrar el carbono de la biomasa (Romero, M. *et al.*, 2009). Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso. Las moléculas largas de celulosa llamadas microfibrillas, forman haces por los puentes de hidrógeno que se crean entre los numerosos grupos-OH de los anillos de glucosa.

En la celulosa las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, disposición bastante rígida y muy estable. En la Figura 2, se muestra una estructura parcial de la celulosa. La longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida, así como de la edad y estado metabólico al momento de la extracción.

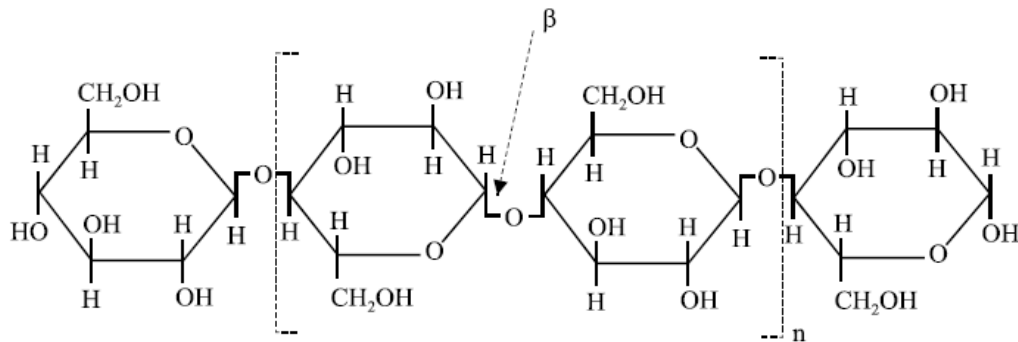


Figura 2. Estructura de la celulosa y enlace formado (Tomada de Romero, M. *et al.*, 2009).

Se consideran dos tipos de celulosa: la nativa o cristalina, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, resultando así insoluble (ej.: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.); y la celulosa modificada, la cual resulta soluble como la celulosa amorfa, carboximetilcelulosa, celooligosacáridos, en las cuales el grado de cristalinidad y el grado de polimerización es menor.

2.4.1.1.2.2. Hemicelulosa

En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos. Las hemicelulosas son plímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-galacturónico, que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa.

La mayoría de las hemicelulosas ocurre como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β -1,4 (de menor longitud que la de celulosa), ver Figura 3. De la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se clasifican usualmente de acuerdo a los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosas presentes en las paredes de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes.

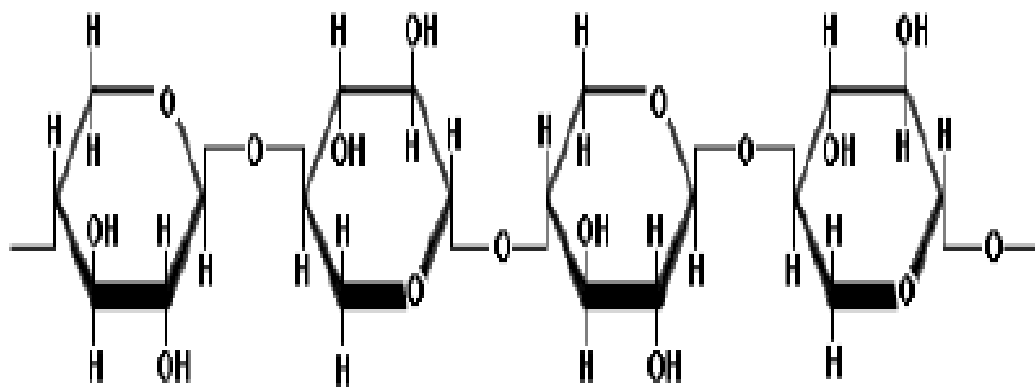


Figura 3. Segmento de estructura plana de hemicelulosa (Tomado de Montoya, S. 2008)

Las hemicelulosas cubren y unen a la microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría porque este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición.

2.4.1.1.2.3. Lignina

La lignina es el polímero aromático no polisacárido más abundante de la naturaleza. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo, de alto peso molecular, tridimensional. En la Figura 4, se puede observar su estructura.

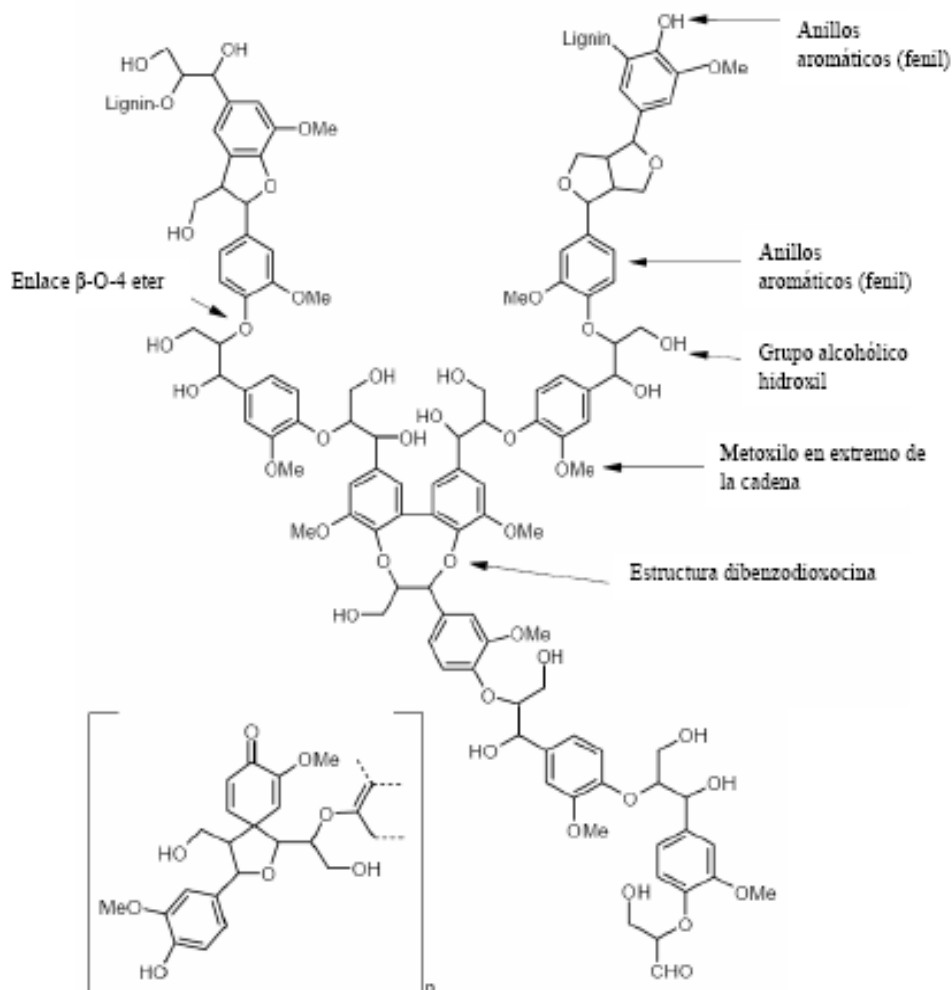


Figura 4. Estructura de la lignina, (Tomado de Montoya, S. 2008)

La lignina imparte resistencia a la degradación microbiana de la madera. La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares de la madera provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa. Una vez que la lignina rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, la celulosa resulta más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada. Así, la lignificación en muchas plantas puede ser un mecanismo de resistencia a las enfermedades y se produce como un mecanismo de defensa hacia los hongos patógenos o en respuesta a heridas.

Debido a su estructura la lignina es altamente resistente a la degradación. Hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO₂ y H₂O como productos finales son los hongos causantes de pudrición blanca. Estos hongos en su mayoría pertenecen a los ordenes *Aphylophorales* y *Agaricales*; poseen un complejo (Montoya, S. 2008).

2.4.1.1.2.4. Otras sustancias

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros.

Los componentes solubles en solventes neutros, representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílago, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

Las cenizas, son residuos inorgánicos que permanecen después de quemar la biomasa a altas temperaturas, suelen ser menos del 2% de peso seco de la madera (Oliva, J. 2003).

2.4.1.2. Pretratamientos de los residuos lignocelulósicos

La hidrólisis enzimática presenta la necesidad de un pretratamiento para la mejor utilización del desperdicio celulósico, debido a la cristalinidad de las fibras celulósicas como también la presencia de lignina (Terán, M. 1984).

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material, disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis. Además, un pretratamiento eficaz es el que reúne otras características como: bajo consumo energético, bajos costos de inversión, utilización de reactivos baratos, fácilmente recuperables y debe ser aplicable a diversos substratos.

Los pretratamientos pueden limitarse, simplemente, a generar un aumento de las regiones amorfas de la celulosa lo que conlleva a la mejora de la hidrólisis (Guarnizo, A. 2009). Entre los métodos de pretratamiento de material lignocelulósico, encontramos pretratamientos físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. En el presente estudio se aplicó un tratamiento químico, hidrólisis con álcali.

Algunas bases pueden ser usadas también en el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos y el efecto del pretratamiento alcalino depende del contenido de lignina de los materiales. El mecanismo de la hidrólisis alcalina es por la saponificación de los enlaces ésteres entrecruzados intermolecular xilano hemicelulosa y otros componentes, por ejemplo lignina y otra hemicelulosa. La porosidad del material lignocelulósico se incrementa con la eliminación de estos entrecruzamientos.

2.4.1.3. Hongos

Como “hongos” se designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y bacterias. Esta diferenciación se debe, entre otras cosas, a que poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa.

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. (Bial-Arístegui, 2002).

En el hongo hay que diferenciar dos partes fundamentales: el cuerpo vegetativo y el cuerpo reproductor. El cuerpo vegetativo, que se encuentra bajo el suelo, está formado por unos filamentos llamados hifas que pueden ser unicelulares (con sucesión de núcleos). Al conjunto de todas las hifas es a lo que se le llama micelio. El micelio es el que se encarga de absorber las sustancias minerales del suelo para alimento del hongo.

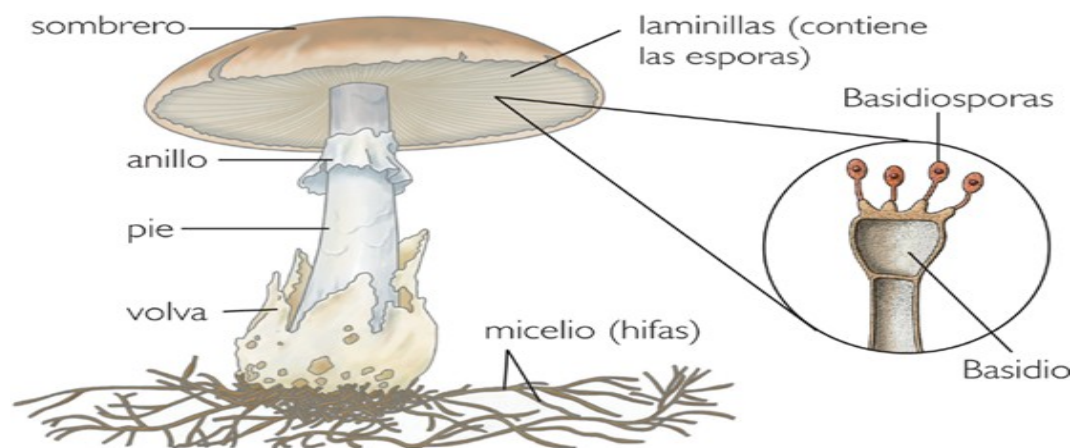


Figura 5. Partes de hongo y de una seta (Tomado de <http://www.kalipedia.com>)

El micelio en realidad es el hongo, ya que la seta (a la que comúnmente se la llama hongo), es su aparato reproductor. En la Figura 5 se describe gráficamente las partes de un hongo. Los micelios reproductores crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los organelos reproductores (endosporios) para la formación de nuevos micelios. Los micelios vegetativos se encargan de la absorción de nutrientes, crecen hacia abajo, para cumplir su función (Wikipedia).

A continuación se presenta una descripción botánica de las setas *Pleurotus* y *Lentinula* que se emplearon en el presente estudio.

Cuadro 3. Taxonomía de las setas *Pleurotus* y *Lentinula*

Nombre científico	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	* <i>Lentinula edodes</i>
Reino	Fungí	Fungí	Fungí
Clase	<i>Basidiomycetos</i>	<i>Basidiomycetos</i>	<i>Basidiomycetos</i>
Subclase	<i>Eubasidiomucetos</i>	<i>Eubasidiomucetos</i>	<i>Homobasidiomycetes</i>
Orden	<i>Autobasidiomycetos</i>	<i>Autobasidiomycetos</i>	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Pleurotuaceae</i>	<i>Pleurotuaceae</i>	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>	<i>Pleurotus</i>	<i>Lentinula</i>
Especie	<i>ostreatus</i>	<i>pulmonarius</i>	<i>edodes</i>

Fuentes: Dormal, M., (2006), Guzmán, G. y col., (1993). * Mushroom Growers' Handbook 2, (2005)

Pleurotus ostreatus, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* son los nombres de una gama de hongos comestibles que poseen agua, carbohidratos y lípidos. Sus proteínas de alta calidad biológica contienen nueve de los aminoácidos esenciales para el hombre, incluidas lisina y metionina. Son fuente de vitaminas, fibras, minerales, y aportan de 150 a 350 calorías por kilogramo, además de sus propiedades medicinales (Alvarez, M.; Sória, M. y Larrea, P., 2003).

2.4.1.3.3. *Pleurotus ostreatus*

Las especies del género *Pleurotus*, hongos de podredumbre blanca capaces de crecer y degradar una cantidad de desechos agrícolas y forestales (lignocelulósicos) atacando los diferentes polímeros de la madera (celulosa, hemicelulosa, lignina) (Pérez, R. 2005).

Especie: *Pleurotus ostreatus*: var. florida.

Cepas: La mayoría de las cepas de este hongo se originan a partir de especímenes silvestres cultivadas en 1958 por SS Bloque de Gainesville, Florida. Eger.

Nombre Común: *Pleurotus Florida*, *Florida Pleurotus*.

Raíces latinas y griegas: *Pleurotus* viene del griego “*pleuro*”, que significa formado lateralmente o en una posición de lado. El epíteto de la Florida, evidentemente se refiere a la localidad donde se recogió este hongo por primera vez.

Parámetros de crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*:

Tipos miceliales: rápido crecimiento del micelio rhizomorphic lineal, que es un conjunto de hifas fuertemente apretadas y resistentes que forman un cordón, recordando a las raíces de las plantas superiores. Su color suele ser blanquecino.

Medio estándar de crecimiento: granos de centeno.

Sustrato de fructificación y método de preparación: paja de cereales (generalmente trigo) equilibrado para un contenido de humedad del 75%. La paja, picado o entero, se pasteuriza por inmersión 71,1°C, en un baño de agua durante 20-30 minutos. Un método alternativo utiliza la pasteurización de vapor vivo a 60°C, durante 6 horas. En Japón, *Pleurotus* se cultiva en una mezcla de aserrín de madera dura y el salvado (4:1 partes, el 65% de humedad y un pH de 6.8 hasta 7,0). Esta mezcla se esteriliza durante 1 hora a 15 psi. *Pleurotus* crece en una amplia gama de residuos de alto contenido de celulosa.

Temperatura del sustrato: El crecimiento más rápido se da a 28-30°C. La muerte térmica se produce si se mantiene por encima de micelio de 40°C, durante 72 horas.

Humedad relativa: 90 a 100%.

Duración: 10-14 días para la colonización completa.

Cambios de aire fresco: 0 por hora.

Luz: La incubación debe ser en la oscuridad total (Staments, P. y. Chilton, J.S. 1983).

2.4.1.3.4. *Pleurotus pulmonarius*

Hábitat: Fructifica sobre troncos de planifolios (maderas duras), sobre todo *Populus* (chopos o álamos) en Otoño es poco frecuente.

Microscopía: Esporas cilíndricas, de 7-12 x 3-4 µm, hialinas, lisas. Esporada blanca. Cutícula formada por hifas fibuladas.

Observaciones: Parecido a *Pleurotus ostreatus* (<http://www.bioscripts.net>) en la mayoría de parámetros de crecimiento micelial.

2.4.1.3.5. *Lentinula edodes*

Cepas: Existen numerosas cepas de *Lentinus edodes* disponibles en casas comerciales y en centros de investigación. La American Type Culture Collection, que vende las cultivos a las organizaciones educativas y centros de investigación, cuentan con varias cepas silvestres e industriales. Las cepas son a menudo distinguidas por sus preferencias

de fructificación a diferentes temperaturas para zonas más frías o cálidas.

Nombres comunes: El hongo shiitake, El hongo negro japonesa, y el hongo negro chino. (El shiitake nombre proviene de la asociación de este hongo en el árbol chí, un miembro del género *Pasania*).

Raíces latinas y griegas: *Lentinus* viene de “*lentis*” o en forma de lente por la forma de la tapa y *edodes* significa la comestibilidad de esta especie.

Parámetros de crecimiento micelial de *Lentinula edodes*:

Tipos Miceliales: Rhizomorphic lineal.

Medio estándar de Crecimiento: En madera pre-empapado o una mezcla de aserrín, salvado en una proporción 4:1.

Sustrato de fructificación y método de la preparación: Roble o aliso de 4-6 pulgadas de diámetro, son aserrados en 3 pies de largo. Estos se deben cortar en la primavera o el otoño para maximizar el contenido y la savia se puede inocular inmediatamente. (Algunos productores prefieren preparar estos sustratos en las pilas a la sombra, al aire libre durante un mes antes de la inoculación). Antes de inocular, sustratos deben ser limpiadas de cualquier liquen u hongos.

Humedad relativa: 60-75%, el 90% para aserrín.

Temperatura del Sustrato: El crecimiento rápido a 25 °C, (Temperaturas superiores a 35 °C y por debajo de 41 °C el crecimiento del micelio se detiene).

Duración: 6-12 meses para cortar troncos, 30-60 días para bloques de aserrín.

Cambios de aire fresco: Al aire libre suficiente.

pH óptimo: 5-6.

Luz: No se requiere (Staments, P. y Chilton, J.S. 1983).

2.4.1.3. Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (FES), es generalmente definida, como el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia total o casi total de agua. El sustrato, sin embargo, necesita contener cierta humedad, que debe estar en forma absorbida dentro de la matriz sólida.

La fermentación en estado sólido puede ser entendida como un método de cultivo de microorganismos sobre y dentro de las partículas de la matriz sólida (sustrato sólido), donde el líquido ligado con éste se halla a un nivel adecuado, de forma que la actividad del agua asegura el correcto crecimiento y metabolismo de las células, pero no excediendo la capacidad máxima de tenencia de agua de la matriz sólida.

Este sistema comprende tres fases:

- 1. Fase sólida:** es un sustrato vegetal que contiene microorganismos y nutrientes.
- 2. Fase líquida:** para las diferentes transferencias de masa.
- 3. Fase gaseosa:** muy importante porque influye en tres aspectos del proceso fermentativo:
 - regula la temperatura del sustrato,
 - regula el nivel de humedad del medio y
 - mantiene las condiciones aeróbicas (Álvarez, M.; Sória, M. y Larrea, P., 2003).

Las aplicaciones más importantes de la fermentación en estado sólido se pueden resumir en las siguientes:

- Degradación de desecho sólido para obtención de compost,
- Preparación de alimentos más apetecibles,
- Producción de micotoxinas y otros metabolitos,
- Enriquecimiento proteico de alimentos de bajo valor nutritivo y.
- Producción de enzimas (Álvarez, M., *et al.*, 2003).

2.4.2. Marco conceptual de variable dependiente

2.4.2.1. Enzimas celulasas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. Como catalizadores, las enzimas actúan en pequeña cantidad. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, no modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución.

Las enzimas celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad una enzima de celulasas es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa. Este complejo enzimático está formado por tres tipos de enzimas:

- Endoglucanasas (EGs) o endocelulasas (β -1,4-D-glucan 4-glucanohidrolasa), la cual ataca las regiones de baja cristalinidad en la fibra celulósica, creando cadenas terminales libres.
- Celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasas (β -1,4-D-glucan 4-celobiohidrolasa) y la cual degrada la molécula adicional por

eliminación de las unidades de celobiosa de las cadenas terminales libres;

- β -glucosidasa (BGs) o celobiasa (β -D-glucósido glucohidrolasa), la cual hidroliza la celobiosa para producir glucosa (Carrillo, F. 2002; Romano, D., *et al.*, 2005). La Figura 6, se observa este mecanismo.

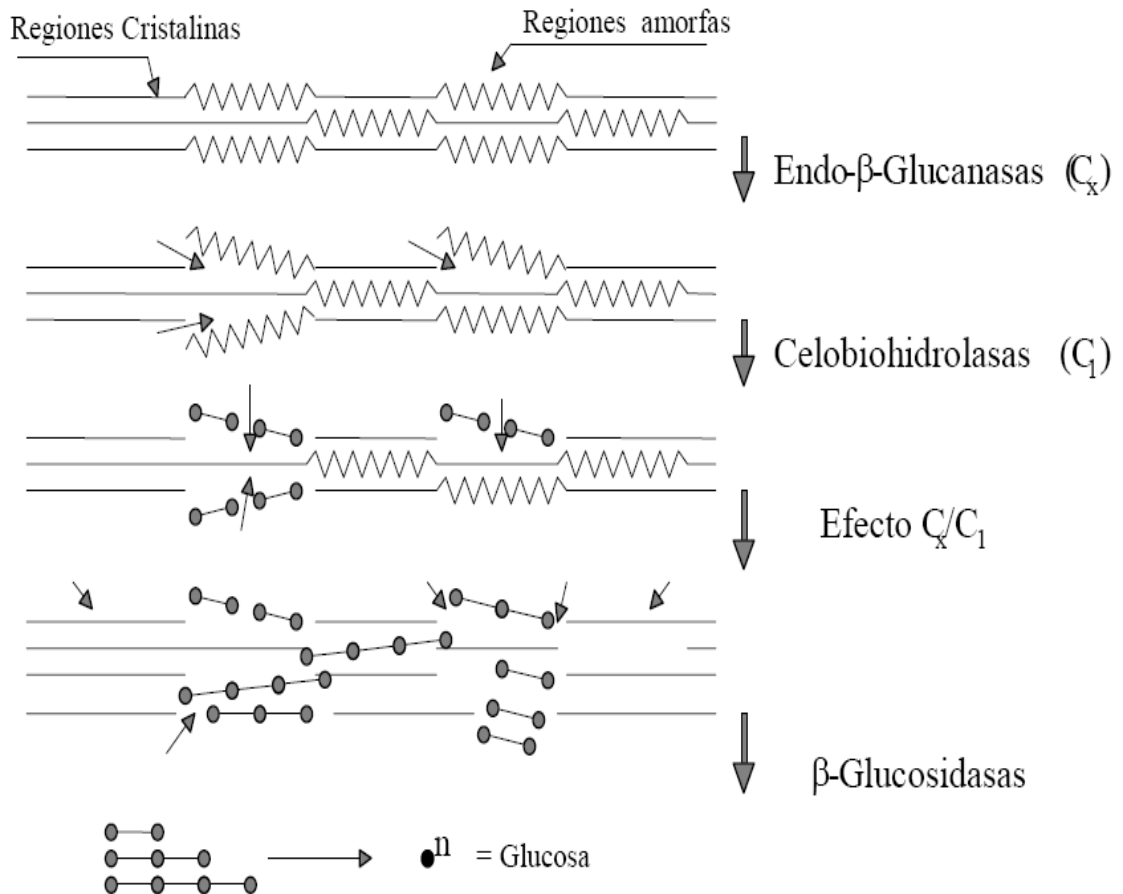


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Tomada de Oliva, J., 2003)

Este complejo de proteínas de origen enzimático, en conjunto logran la degradación de la celulosa (polímero de alta complejidad), en monómeros de baja complejidad como la glucosa, con el fin de metabolizarla y cumplir así con funciones vitales (Bioinformática de celulasas).

En adición a los tres grupos principales de enzimas celulosas, existen también un número de enzimas auxiliares que atacan la hemicelulosa, tales como glucuronidasas, acetilesterasas, xilanasas, β -xilosidasas, galactomannanasas y glucomannanasas (Romano, S., *et al.*, 2005).

2.4.2.1.1. Extracción de enzimas

En el caso de muchas enzimas hidrolíticas sencillas de origen microbiano, la proteína se libera en el medio del cultivo y se separa de las células mediante centrifugación, siendo esta la única etapa necesaria para su extracción.

La homogenización del tejido seleccionado en una solución tampón adecuada es la técnica más ampliamente utilizada, ya que minimizan la desnaturalización y degradación de las enzimas. El pH, la fuerza iónica y la composición del medio que se utiliza para la extracción de una enzima son de gran importancia en este proceso (Gacesa, P. y Hubble J. 1990).

Actualmente la tendencia industrial es el reemplazo de muchas enzimas provenientes de tejidos animal o vegetal por aquellas que resultan de la aplicación de cultivos de microorganismos seleccionados, que generan la enzima específica.

Se puede incrementar el rendimiento de una enzima específica por un determinado organismo, recurriendo a modificar sus condiciones ambientales, o bien, a formar por vía genética cepas mutantes, en las cuales la producción de la enzima puede ser varias veces superior que en la cepa original. De este modo procesos de selección, adaptación y mutación han mejorado considerablemente la producción de enzimas a partir de microorganismos (Biblioteca digital de la Universidad de Chile).

2.4.2.2. Actividad enzimática

Debido a que se necesita muy bajas concentraciones de enzima para catalizar una reacción, su determinación directa es difícil, por consiguiente la efectividad de una enzima se evalúa generalmente, siguiendo la desaparición del sustrato o la aparición de un producto formado en la reacción. La reacción catalizada enzimáticamente se desarrolla bajo condiciones cuidadosamente controladas, sacándose muestras para control a intervalos de tiempo apropiados.

Para el caso de las enzimas celulasas se expresa la actividad de las enzimas en unidades se basan en la conversión de una cantidad arbitraria de sustrato, en un lapso definido de tiempo y con una cantidad determinada de enzima. Se tienen técnicas estandarizadas a condiciones definidas de pH, temperatura y concentraciones de sustrato (Terán, M. 1984).

2.4.2.2.1. Factores que afectan la actividad enzimática

La actividad enzimática puede ser alterada por factores físicos o químicos y por ello las enzimas actúan dentro de un intervalo óptimo de temperatura y pH fuera de la cual su actividad disminuye.

2.4.2.2.1.1. Efecto del pH

La actividad de las enzimas depende mucho de la concentración de iones hidrogeno del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo, del sustrato, o del complejo enzima sustrato; todo esto llega a influir en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato. En los casos en que los sustratos no son ionizables (la mayoría

de los hidratos de carbono y de los lípidos), los grupos iónicos de las enzimas son los únicos afectados por el pH.

Por esta razón, todas las enzimas presentan una máxima actividad catalítica a un cierto valor óptimo de pH, en un intervalo de 5 a 8, aún cuando existen excepciones muy importantes, como es el caso de la pepsina del estómago, que tiene un pH óptimo de 1,8. En la Figura 7 se observa que los valores extremos de pH causan la inactivación de enzimas ya que se induce su desnaturalización.

El pH de la mayoría de los alimentos varía entre 3,0 y 7,0 y en pocos casos se encuentra en el lado alcalino; solo las frutas y sus derivados tienen un pH más ácido que llega a ser de 2,2. La inhibición de las reacciones enzimáticas y del crecimiento microbiano en ocasiones se llega a efectuar, si el producto lo permite, por una reducción de pH, mediante la adición de los diferentes ácidos disponibles como aditivos; por lo tanto, si se desea la acción de alguna de las enzimas y el alimento lo permite, se acondicionan el pH y la temperatura para obtener una máxima actividad catalítica (Badui, 1993).

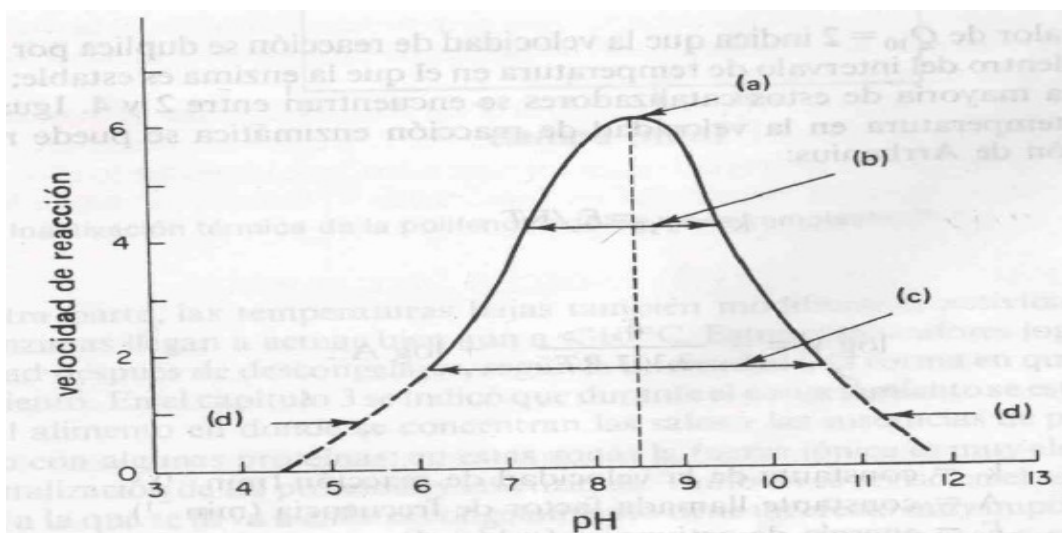


Figura 7. Efecto de pH en la actividad enzimática: (a), óptimo; (b), intervalo de estabilidad de la enzima; (c), intervalo de inactivación reversible, y (d), inactivación instantánea (Tomado de Badui, 1993)

2.4.2.2.1.2. Efecto de la temperatura

Como sucede con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las enzimas aumenta con la temperatura, pero sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando se incrementa mucho la temperatura, se favorece la desnaturalización y consecuentemente esta proteína pierde su capacidad catalizadora. Por esta razón, cada enzima tiene un intervalo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad; la mayoría tiene un pH óptimo entre 30 y 45°C, y se inactiva a más de 55°C (Figura 8).

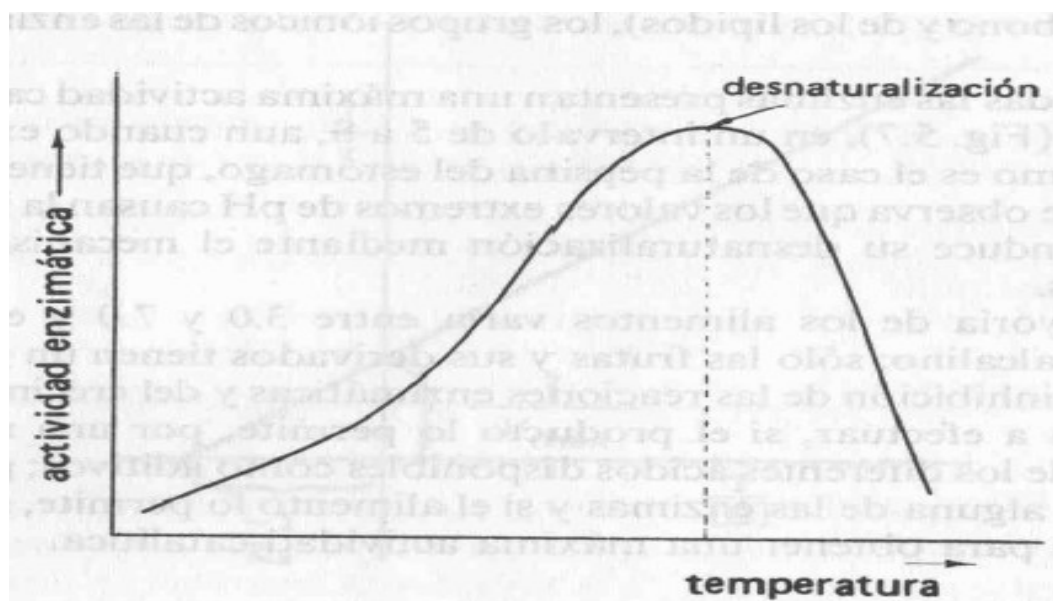


Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de las enzimas (Tomado de Badui, 1993).

2.4.2.3. Producción de enzimas celulasas a partir de hongos

Bacterias y hongos pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Debido a que los anaeróbicos tienen una velocidad de crecimiento muy lento y requieren condiciones de crecimiento anaeróbicas, muchas investigaciones para la

producción de celulasas comercial se han enfocado en los hongos (Wang, 2009).

Los hongos son los organismos más estudiados con respecto a la degradación de celulosa y producción de celulasas. Además tienen ventajas adaptativas que son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis; estas características los distinguen de los demás organismos como los principales descomponedores de materiales celulósicos (Vilches, L. 2002).

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta, el área activa de secreción enzimática. No se descarta que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio con el fin de mantener actividad metabólica.

Las razones para usar los microorganismos como fuentes de enzimas son:

- La obtención de enzimas con intervención de microorganismos es económico en gran escala.
- Los procedimientos son relativamente simples y se los puede realizar en tiempos cortos (Biblioteca digital de la Universidad de Chile).

Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, también producen celulasas. El hongo *Trichoderma reesei (viride)* es el mejor productor de celulasa extracelular, por lo que la mayoría de los estudios concernientes

a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo (Vilches, L. 2002).

2.4.2.4. Aplicaciones industriales

Actualmente existe un gran interés en utilizar las enzimas celulasas en varios procesos industriales ya sea convencionales como el tratamiento de basura, en la conversión de desechos vegetales en fertilizantes o alimentos para animales, o en nuevos procesos como la textilería o la fabricación de detergentes.

Dentro de la industrias alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Así mismo se usan en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorara la digestión de rumiantes.

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado (*biostoning biobleaching*). Tradicionalmente el desteñido de este tipo de prendas se efectuaba con piedra pómez (*stone wash*). Una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas, menos desgaste de las lavadoras y menos polvo de piedra pómez en el ambiente de la lavandería.

Las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. El tratamiento con celulasas al papel parece aumentar el área de enlaces entre fibras, mejorando algunas de sus propiedades.

El uso de algunos preparados celulolíticos en el proceso de extracción del aceite han tenido efecto sobre el rendimiento de la extractabilidad del aceite. Las celulasas pueden actuar en la extracción acuosa de aceite a partir de una enzima cruda obtenida de *Aspergillus fumigatus* con actividad celulasa y el efecto sobre el rendimiento en la extracción de aceite a partir de las semillas de ajonjolí, de cacahuete y de girasol (Wikipedia)

2.4.2.4.1. Hidrólisis de residuos celulósicos

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en tres pasos: absorción de las enzimas celulasas en la superficie de la celulosa, la degradación de la celulosa a azúcares fermentables o glucosa y la desorción de las celulasas. Una clase de fermentación importante de la glucosa es la fermentación alcohólica (Romano, S., *et al.*, 2005).

La degradación enzimática de materiales celulósicos, es estimulada por la perspectiva de que esta investigación contribuiría al desarrollo en gran escala a procesos de conversión que beneficiarían a la humanidad en una forma sustancial.

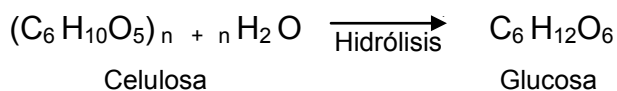
Algunos de estos procesos de conversión potenciales son:

- Ayudar a resolver problemas de eliminación de desechos.
- Disminuir la contaminación del medio ambiente.
- Aliviar la escases de alimentos y nutrientes para animales.
- Mejorar el manejo de bosques y tierras extensas, suministrando un mercado para maderas de baja calidad, que se desarrollan en tierras pobremente cultivadas.
- Disminuir la dependencia del hombre hacia los combustibles fósiles, proveyendo un recurso conveniente y renovable de energía en forma de etanol (Lucio, G. 1982).

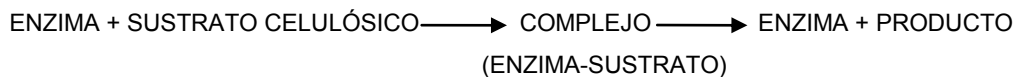
La sacarificación de los materiales celulósicos, utilizando las enzimas celulasas, no presentan el problema de la formación de productos indeseables como los que se presentan en las otras formas de hidrólisis (ácida, básica, etc.). En la actualidad los estudios de hidrólisis se están orientando a la utilización de enzimas para la sacarificación de subproductos celulósicos por las ventajas de del proceso que ofrecen.

La hidrólisis completa de la celulosa consiste en el rompimiento de los enlaces entre moléculas de glucosa, a cada unidad se añade una molécula de agua, produciéndose el azúcar glucosa (Terán, M. 1984).

Según Terán, M. (1984) la reacción es:



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



2.4.2.4.1. Producción de bioetanol

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible. El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina

en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales (<http://www.miliarium.com>).

La fermentación alcohólica es la transformación de sustratos azucarados por la acción de microorganismos, que durante su ciclo de vida consumen el sustrato y fabrican etanol y otros compuestos bioquímicos, como resultado de su metabolismo (Afanador, A. 2005)

Las plantas crecen gracias al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa la planta (Figura 9).

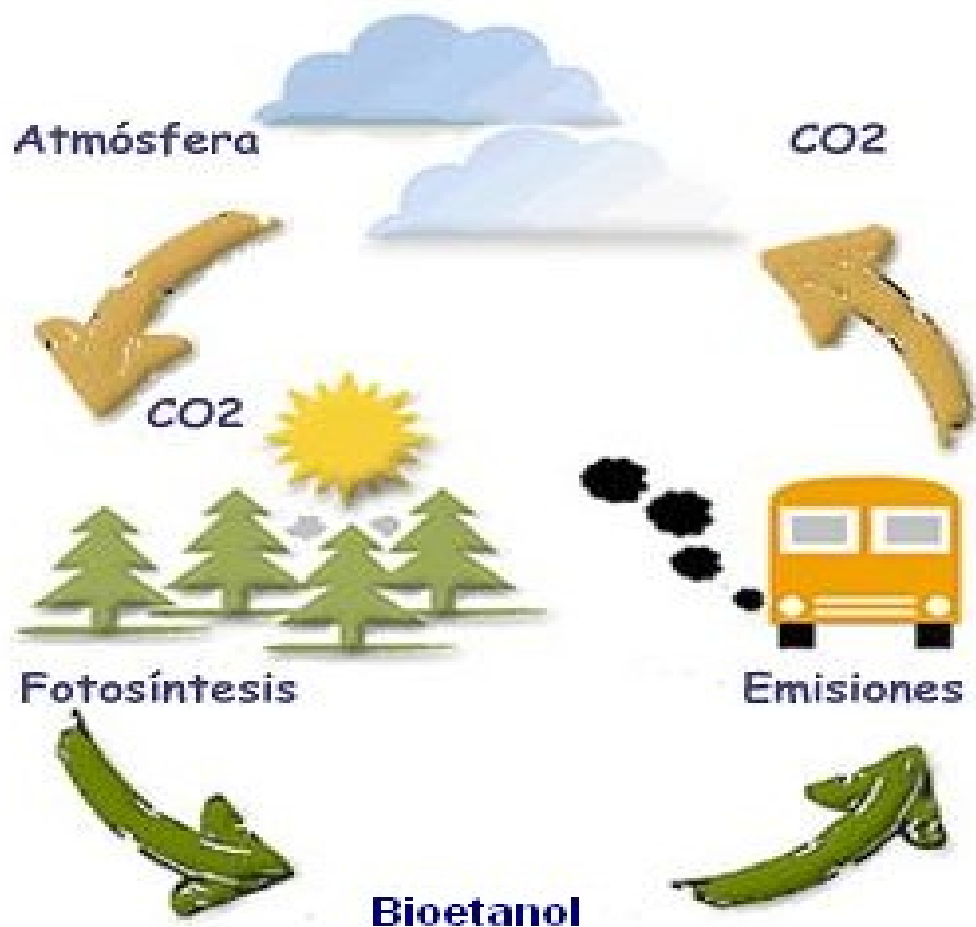


Figura 9. Ciclo del bioetanol. (Tomado de <http://www.scribd.com>)

Dependiendo del método de producción y de la fuente de obtención, es generalmente aceptado que el bioetanol da una reducción del 70% de CO₂, lo que significa que 3,5% menos de CO₂ en una mezcla al 5%. (<http://www.scribd.com>).

La producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos generalmente incluyen tres etapas fundamentales: a) La conversión de carbohidratos en azúcares simples o asimilables por los microorganismos productores de alcohol, b) La fermentación de estos azúcares a etanol y c) Finalmente la separación del etanol y otros productos por destilación.

La alternativa de emplear residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, constituye hoy día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo. La existencia en los diversos países iberoamericanos, de abundantes recursos lignocelulósicos, justifica la dedicación por parte de estas naciones, de un esfuerzo importante al desarrollo y adaptación de tecnologías tendientes a la utilización integral y racional de los mismos (Romano, S., *et al.*, 2005).

2.5. HIPÓTESIS

Las hipótesis que se plantearon en la investigación son:

2.5.1. Hipótesis nula (H₀)

$$T1 = T2 = T3 \dots \dots n$$

Interpretación: Todos los tratamientos dan igual actividad enzimática de celulasas.

2.5.2. Hipótesis alternativa (H₁)

$$T1 \neq T2 \neq T3 \dots \dots n$$

Interpretación: En todos los tratamientos no se da igual actividad enzimática de celulasas.

2.6. SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.6.1. Variable independiente: Residuos de banano (hojas, pseudotallo y raquis) y cepas (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*).

2.6.2. Variable dependiente: Enzimas celulasas

2.6.3. Unidad de observación: Extracto de enzimas celulasas

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN

Las modalidades básicas de la investigación son: bibliográfica y experimental.

En la investigación bibliográfica se revisaron trabajos de investigación tecnológica en tesis de grado, revistas científicas, folletos, boletines de prensa, etc.; para respaldar con datos bibliográficos y resaltar la importancia tecnológica del estudio para la economía local.

La modalidad experimental se aplicó al desarrollar el diseño experimental para obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*) y mediante la recopilación de información obtenida del análisis estadístico de los factores en estudio.

3.2. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

El nivel o tipo de investigación del presente proyecto, se basó en un estudio de asociación de variables que aspira responder preguntas de investigación relacionados a los residuos de banano (sustratos) y cepas de los hongos comestibles, pretendiendo evaluar la dependencia e interacción entre las variables estudiadas o factores y sus distintos niveles. Por lo tanto, el presente estudio fue de tipo correlacional y exploratorio.

3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

Para la obtención de las enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, encargadas de intervenir en el proceso de hidrólisis de la celulosa a partir de residuos del cultivo del banano se llevará a cabo los siguientes pasos:

3.3.1. Método para la obtención de las enzimas celulasas

Recolección de los residuos de banano. Los residuos orgánicos fueron recolectados en el lugar donde se producen y trasladados a la ciudad de Ambato a la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos (UOITA).

Selección y acondicionamiento de los residuos de banano. Se seleccionó a los residuos de apariencia firme, color y olor característico para ser lavados, cortados y deshidratados en un secador con flujo de aire a 60°C, luego fueron almacenarlos en un lugar fresco y ventilado, para utilizarlos durante la experimentación.

Fermentación sólida. Se colocaron 12 g de residuos de banano en matraces de 500ml, el tamaño de partícula de los residuos fue de 0,5 y 1cm aproximadamente y se ajustó la humedad al 80%. Posteriormente, los matraces con los residuos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 14,7 psi durante 30 minutos. Se dejó enfriar hasta 22°C. Se adicionó el inóculo de la cepa correspondiente en una proporción del 2% del peso húmedo del sustrato y se mezcló homogéneamente. Se incubaron los matraces por 24 días a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa de 60-70% hasta que el micelio cubra totalmente los residuos.

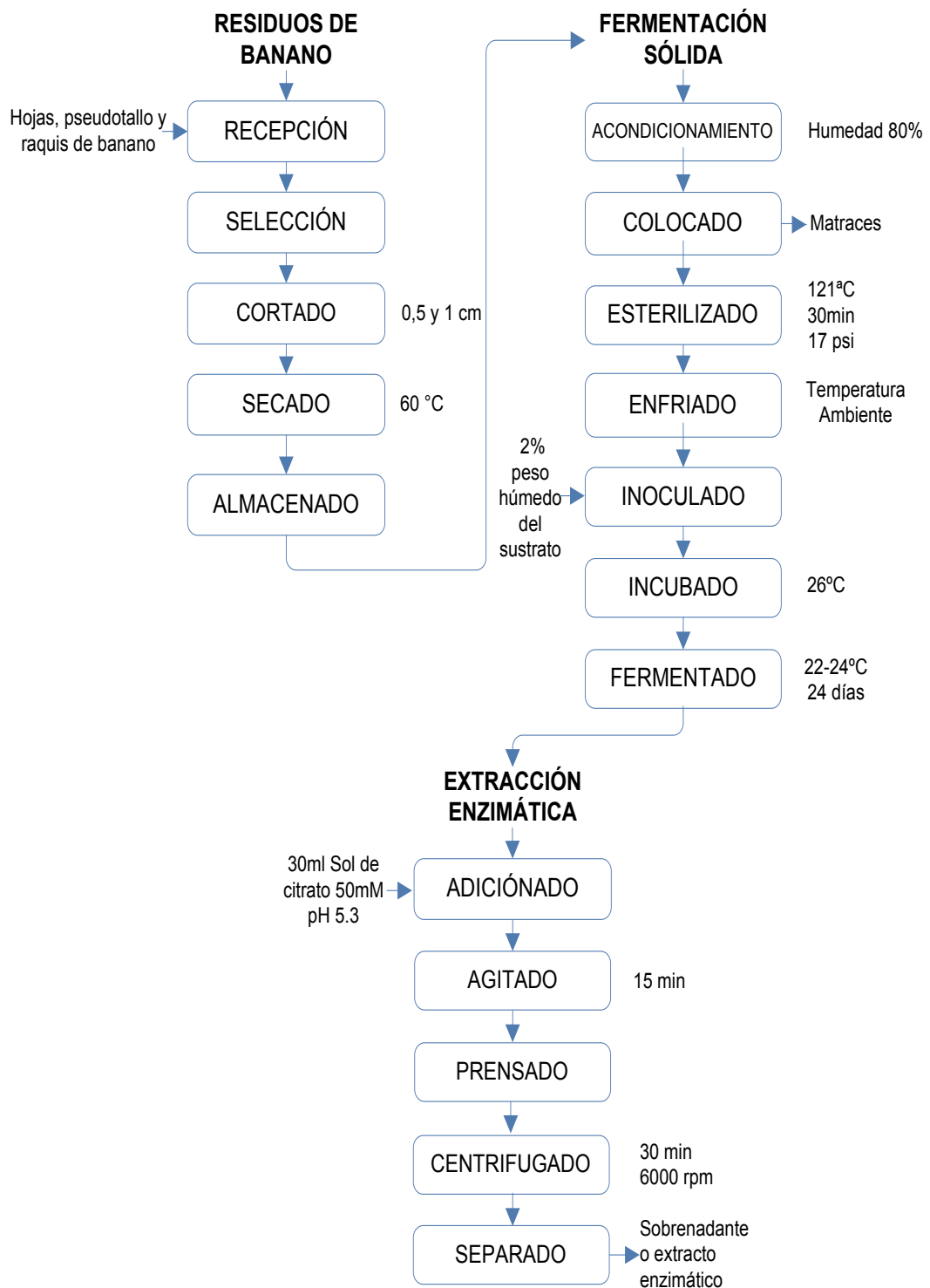


Gráfico 3. Diagrama de flujo para la obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*), utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)

Extracción de enzimas: Al tiempo definido de fermentación, se adicionó a cada matraz 30ml de solución amortiguadora de citrato 50mM, pH 5,3 y se agitaron durante 15min, para seguidamente prensarle y el volumen obtenido se distribuyó en tubos para centrifugarlos por 30 min a 6000 rpm para separar el sobrenadante o extracto enzimático.

3.3.2. Metodologías aplicadas para el análisis de los residuos de banano

3.3.2.1. Determinación de humedad.

Se realizo según el Método 930,15 A.O.A.C. 1996.

3.3.2.2. Análisis químico

3.3.2.2.1. Extracción de solubles en alcohol–benceno

Se aplicó el método descrito por Núñez, C. (2008), fundamentándose en que los solventes se extraen todas las sustancias de baja polaridad como resinas, ácidos grasos, hidrocarburos, parte de los taninos, etc. Se realizó en extractor tipo Soxhlet.

3.3.2.2.2. Eliminación de los compuestos solubles en agua caliente

Núñez, C. (2008), basado en que el agua caliente disuelve todos los extractivos que no fueron solubles en la etapa anterior. Incluye el resto de los taninos, azúcares, aminoácidos, alcoholes, etc.

3.3.2.2.3. Determinación del contenido de lignina insoluble en ácido

La determinación de lignina insoluble en ácido según el método de Klason descrita por descrita por Núñez, C. (2008) se realizó en las

muestras libres de sustancias extraíbles, la muestras se mezclaron con 15 ml de H₂SO₄ al 72%, se agitaron con frecuencia a 15°C durante dos horas. Las mezclas se diluyeron con agua destilada, se colocaron a reflujo durante cuatro horas, se filtraron, y los residuos se secaron hasta masa constante.

3.3.2.2.4. Determinación del contenido de Celulosa

El contenido porcentual de celulosa se determinó mediante el método de Kûrshner–Höffer descrita por Orea-Igarza, U. *et al*, 2006. Los materiales libres de sustancias extraíbles se le añadieron 25 ml de mezcla reactiva de HNO₃–etanol (1:4), se colocaron a reflujo en baño de agua durante una hora, se decantaron y se añadieron una nueva cantidad de mezcla reactiva, repitiendo esta operación tres veces. Posteriormente se añadieron 25 ml de KOH al 1% durante 30 minutos, se filtraron y los sólidos se secaron.

3.3.2.2.5. Estimación del contenido de hemicelulosas totales

Se determinó según lo describió Orea-Ugarza, U.; Cordero E. y Gomes, R. (2006). Las hemicelulosas totales se estimaron por diferencia entre 100% y la suma del porcentaje de celulosa y lignina

3.3.3. Metodología aplicada para la determinación de actividad enzimática de las celulasas

Al tiempo definido de fermentación sólida (24 días), los tratamientos que presentaron crecimiento micelial fueron sometidos inmediatamente a extracción enzimática para ser aplicadas en un volumen de 5 ml a un sustrato indicador (45ml de carboximetil celulosa) acondicionado en baño termostático a 50°C, con agitación oscilatoria (100

rpm) para mantener la suspensión en un estado homogéneo, por el lapso de una hora, para inmediatamente realizar la determinación de azúcares reductores.

Para la determinación de la actividad enzimática se determinó en primera instancia los azúcares reductores, datos con los que se partió para el cálculo de actividad enzimática.

3.3.3.1. Determinación de azúcares reductores

Se aplicó el método de Lane y Eynon (1923), que se basa en que al existir diversos métodos de cuantificación de carbohidratos basados en la capacidad reductora de los azúcares que tienen libre el grupo carbonilo. Estos carbohidratos son capaces de reducir elementos como el Cobre (Cu^{+2}), el Hierro, (Fe^{+3}) o el Yodo (I_0).

En el caso específico del cobre, este es reducido desde Cu^{+2} a Cu^{+1} . En este sentido, en el método de Lane y Eynon (1923) se hace reaccionar sulfato cúprico con azúcar reductor en medio alcalino, formándose óxido cuproso, el cual forma un precipitado rojo ladrillo. Este método utiliza azul de metileno como indicador, el cual es decolorado una vez que todo el cobre ha sido reducido, lo que indica el fin de la titulación.

3.3.3.1.1. Método de cálculo de concentración de azúcares reductores y actividad enzimática

La Ecuación 1 es la relación matemática para la determinación de azúcares reductores que describe el método empleado, es el siguiente:

$$\text{C.A.R. (Cantidad de glucosa formada)} = \frac{V_1 - V_2}{V_3} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde

C.A.R.= Concentración de azúcares reductores o cantidad de glucosa formada.

V₁= 0.056 g de glucosa (kte.), correspondiente a la cantidad estándar de glucosa 1% que reduce la soluciones A y B de Fehling.

V₂ = Volumen de hidrolizado que contiene 45ml de sol de CMC+5 ml de extracto enzimático obtenido.

V₃ = Volumen del hidrolizado gastado en la titulación de las soluciones A y B de Fehling.

El cálculo de la actividad de las enzimas celulasas según Loera y Córdova (2003), que se basa el lo expresado en la Ecuación 3, previo a la aplicación de la Ecuación 2, que es la transformación de unidades de concentración de la glucosa a μ moles de glucosa*min para que sean las unidades afines al posterior cálculo de actividad enzimática. A continuación se detallan las ecuaciones mencionadas:

$$\mu \text{ moles de glucosa} * \text{min.} = \frac{\text{glucosa formada (g)} * 10^6 \mu \text{ moles}}{60 (\text{min}) * 180 (\text{g})} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

glucosa formada= concentración de azúcares reductores, provenientes de la Ec. 1.

10⁶ μ moles = Factor de conversión

60 (min)= Tiempo de hidrólisis (kte.).

180 g= Peso molecular de la glucosa (kte.).

Para las celulasas provenientes de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*, se ha definido a la unidad de actividad enzimática como "UI/g de materia seca" a la liberación de 1 μ mol de

glucosa de una solución al 0,5% de carboximetil celulosa (CMC) en 60 minutos, a 50°C y a un pH de 5,3.

$$UI/g \text{ materia seca} = \frac{C.R.A.*V_4}{V_5 * M_1} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde

C.R.A. = Cantidad de glucosa expresada en μ moles de glucosa*min.

V₄ = Volumen del extracto enzimático obtenido en la extracción de las enzimas celulasas.

V₅ = Volumen de extracto enzimático aplicado para la hidrólisis del sustrato indicador carboximetil celulosa, correspondiente a 5ml (kte.).

M₁ = Peso de los residuos deshidratados empleados en la fermentación sólida de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* correspondiente a 12g (kte.).

UI = cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores (xilosa o glucosa) por minuto en las condiciones de reacción.

3.3.3.2. Método para evaluar las condiciones óptimas de acción de las celulasas

Es importante señalar que después de determinar los mejores tratamientos, es decir el extracto enzimático con la mayor actividad enzimática proveniente de la mejor interacción sustrato-cepa, mediante la determinación de azúcares reductores, se analizó:

3.3.3.2.1. pH

Mediante el uso del potenciómetro, se preparó sustrato puro carboximetil celulosa con las siguientes variaciones de pH: 4,0; 4,5; 5,0; 5,3; 5,5; 6,0 y 7,0; para posteriormente someterlas a la acción de las

enzimas celulasas obtenidas por el lapso de una hora a un baño termostático (50°C) con movimiento oscilatorio de 100 rpm.

3.3.3.2.2. Temperatura

Mediante el uso de un baño termostático con movimiento oscilatorio de 100 rpm. Al sustrato puro carboximetil celulosa (CMC) sal de sodio al 0,5% con las enzimas celulasas obtenidas se las sometió a siguientes temperaturas: 37°C, 50°C y 60°C, por el lapso de seis horas, tomando una muestra cada hora.

3.3.4. Metodología empleada para la producción de bioetanol

3.3.4.1. Pretratamiento alcalino a los residuos de banano

Mediante método aplicado por González, J. (2009) que aplica Na(OH) 0,74 g de hidróxido de calcio/g de residuo seco, sometiendo a 90°C por el lapso de 90 horas; se fundamenta en que el hidróxido rompe la estructura de la lignina, permitiendo la accesibilidad a la celulosa y por ende a la acción de las enzimas celulasas.

3.3.4.2. Fermentación alcohólica

Se adaptó de acuerdo al método que aplico Cardona, C. (2004), en el que a los productos de las reacciones de hidrólisis se la sometió a fermentaciones alcohólicas en reactores de plásticos adaptados a escala de laboratorio. Se garantizaron las condiciones de fermentación utilizadas industrialmente (32°C y pH entre 3,5 y 4,0). Se concentró los medios con una sola concentración (6°Brix). Se utilizó levadura comercial (Levapan, 1 g/l) y se adicionaron al medio urea (1.48 g/l), sulfato de amonio (0.24 g/l). La fermentación se llevó a cabo durante 9 días. Se determinó la concentración de azúcares reductores al principio y al fin del cultivo. El contenido de etanol se estableció al término del proceso.

3.3.4.3. Medición de los grados alcohólicos

Según el método areométrico de los Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, España, (1986).

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

Para el proyecto investigativo se tiene como población los residuos del cultivo orgánico de banano, provenientes de la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas.

De la población de residuos frescos provenientes de los cultivos de banano, se trabajará con las siguientes partes: hojas, pseudotallo y raquis.

3.4.3. Diseño experimental

La presente investigación corresponderá a un diseño experimental de clasificación doble, denominado diseño factorial A*B, dado que se ensayaron dos factores de estudio diferentes. El diseño factorial fue (3*3) lo que equivale a 9 tratamientos, cada tratamiento con tres réplicas. Si se denota por A*B a los factores que actúan respectivamente con a y b niveles.

Los factores y los niveles se detallan a continuación:

Factor A: Residuos de banano (sustrato)

a₀=Hojas de banano

a₁=Pseudotallo de banano

a₂=Raquis de banano

Factor B: Cepas

$b_0 = \textit{Pleurotus ostreatus}$

$b_1 = \textit{Pleurotus pulmonarius}$

$b_2 = \textit{Lentinula edodes}$

A continuación se presenta la notación de tratamientos aplicados al diseño experimental:

Factores		Tratamientos
A	B	
Hojas de banano	<i>Pleurotus ostreatus</i>	a_0b_0
Hojas de banano	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	a_0b_1
Hojas de banano	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	a_0b_2
Pseudotallo de banano	<i>Pleurotus ostreatus</i>	a_1b_0
Pseudotallo de banano	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	a_1b_1
Pseudotallo de banano	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	a_1b_2
Raqis de banano	<i>Pleurotus ostreatus</i>	a_2b_0
Raqis de banano	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	a_2b_1
Raqis de banano	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	a_2b_2

3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.5.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE: Residuos de banano y cepas de hongos

Cuadro 4. Variable independiente: Residuos de banano y cepas

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORIA	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
<p>Residuos de banano y Cepas Son las variables que intervienen directamente en el proceso de producción de enzimas celulasas</p>	<p>Tecnología de la fermentación sólida para la producción de enzimas a partir del micelio de hongos</p>	<p>Tipos de residuos de bananos</p> <p>Cepas de hongos (<i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Lentinula edodes</i>)</p>	<p>Cuál es el tipo de residuo de banano adecuado para la producción de enzimas celulasas?</p> <p>¿Cuál de las cepas a emplearse es la más eficiente para la producción de enzimas celulasas?</p>	<p>Diseño experimental e informes por diseño</p> <p>Actividad enzimática de las celulasas (Loera y Córdova, 2003)</p>

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

3.6. PLAN DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

Para la recolección de la información necesaria del presente proyecto de investigación en la fase experimental implicó el análisis químico de los residuos de banano, la determinación de azúcares reductores del extracto enzimático obtenido, determinación de la temperatura y pH óptimo de las enzimas celulasas obtenidas, análisis de costos la obtención de las enzimas celulasas, y la aplicación de estas para la obtención de azúcares fermentables con la subsecuente producción de etanol.

Se requirieron los siguientes materiales, equipos y reactivos disponibles en los laboratorios de FCIAL-UOITA:

3.6.1. Materiales

3.6.1.1. Materias primas

Cepas. Las cepas a utilizarse en el presente estudio fueron:

- *Pleurotus ostreatus* var. Florida CP-184 de la colección del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente Cuba
- *Pleurotus pulmonarius* N. 20 Pamela Fungi
- *Lentinula edodes* (Shiitake) procedente de Wb-Laboratory–Canadá)
- *Saccharomyces cerevisiae* de fabricación nacional

Sustratos. Los residuos agrícolas provenientes del cultivo de banano que se emplearon en la investigación son los siguientes:

Hojas, pseudotallos y raquis de banano procedentes de Santo Domingo de los Tsáchilas.

3.6.1.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Incubadora
- Balanza de humedad
- Potenciómetro
- Autoclave Aquatron
- Cámara de fermentación
- Desecador
- Equipo de reflujo
- Baño termostático
- Refrigeradora
- Hidrómetro
- Termómetro digital
- Brixómetro
- Cocina doméstica
- Equipo de destilación
- Alcoholímetro

3.6.1.3. Materiales de laboratorio

- Matracas Erlenmeyer de 250 ml.
- Cajas Petri
- Pipetas de 10, 5, 2, y 1ml
- Matracas de 1000, 500, 250ml
- Vasos de precipitación de 250 y 500ml
- Balones aforados de 500, 250 y 50 ml.
- Bureta de 100 ml
- Frascos de vidrio de boca ancha de capacidad ½ litro
- Pinzas

- Gradillas
- Asas microbiológicas
- Varillas de agitación
- Cuchillos
- Bisturí
- Aguja de disección o asa de platino estéril
- Espátula
- Fundas plásticas transparentes
- Papel aluminio
- Papel Filtro
- Hilo

3.6.1.4. Reactivos

Para medio de cultivo:

- Agar patata dextrosa (PDA)–Merck
- Agar malta dextrosa–Merck
- Granos de trigo–Mercado local de la ciudad de Ambato

Para extracción enzimática y determinación de azúcares reductores:

- Acido cítrico
- Citrato de sodio
- Solución amortiguadora de citrato (50mM; pH 5,3)
- Carboximetilcelulosa (CMC) sal de sodio al 0,5%
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Azul de metileno (1%)
- Glucosa
- Etanol
- Benceno

- Ácido sulfúrico al 72%
- Agua destilada
- Mezcla reactiva de HNO₃-etanol(1:4)
- Hidróxido de potasio (KOH) al 1%
- Hidróxido de calcio (CaOH)

3.7. PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Se basó en la tabulación de datos obtenidos según las variables de cada hipótesis; manejo de información y estudio estadístico de datos para presentación de resultados. Para comprobar las hipótesis se realizó un ANOVA generado en los paquetes informáticos: Excel 2007, STATGRAPHICS®Plus versión 4.0, para determinar los mejores tratamientos y las semejanzas o diferencias. Además se empleó la Prueba de Tukey con los paquetes STATGRAPHICS®Plus versión 4.0 y MSTATC.EXE; paquetes estadísticos disponibles en la Universidad Técnica de Ambato, en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Las representaciones en tablas y gráficas de dispersión se realizaron en hojas electrónicas de EXCEL 2007. Finalmente el trabajo de investigación se redactó en Microsoft Word 2007.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Desde la Tabla 1 hasta la 15, se indican los resultados obtenidos de los siguientes análisis: análisis químicos de los residuos del cultivo de banano, determinación de la concentración de azúcares reductores, actividad de las enzimas celulasas, efectos de la temperatura, tiempo y pH de reacción en la actividad enzimática de las celulasas obtenidas, sólidos solubles durante la hidrólisis enzimática (°Brix) y fermentación alcohólica, análisis, cuantificación de etanol obtenido y obtenible. Además se presenta un análisis económico de la tecnología de obtención de las enzimas celulasas.

4.1.1. Análisis químico de los residuos del cultivo de banano

El análisis químico de los residuos del cultivo de banano, en la obtención de enzimas celulasas, permitirá conocer la composición de la fibra contenida en los residuos, es decir la cuantificación de sus partes constitutivas: celulosa, hemicelulosa y lignina.

En la Tabla 1, se reporta los datos experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos (lignocelulósicos) del cultivo de banano en base seca, donde se evidencia que la celulosa es la fracción mayoritaria de la fibra. Las hojas contienen 36,6% de celulosa, seguida por el pseudotallo con 35,3%, valor que es corroborado por Viswanathan *et al*, 1989, que reporta un valor de 35,9%; mientras que el

porcentaje de celulosa en el raquis es 30,6%. Por lo tanto, son residuos que tienen una alta factibilidad de ser utilizados como sustrato de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, y *Lentinula edodes* (hongos de pudrición blanca que usan celulosa como fuente de carbono para satisfacer sus requerimientos nutricionales) para la producción de enzimas celulasas, las cuales al aplicarlas a los residuos de banano pretratados los hidrolizan a sus azúcares constitutivos.

Con respecto a las hojas, la hemicelulosa, poseen un valor alto de 27,39%, con respecto al del pseudotallo y al raquis. Guarnizo, A. (2009) afirma que la hemicelulosa se perfila como otra fuente de azúcares fermentables.

En cuanto al contenido de lignina en hojas presenta un valor de 8,5%, en pseudotallo 5,2%, y en raquis 9,85%. Según Terán, M. (1982), la lignina es la que restringe el acceso de las celulasas a la celulosa, por lo que se hace necesaria una etapa de pretratamiento previa a la hidrólisis de la celulosa, con el propósito de alterar la estructura del material lignocelulósico y así facilitar la acción de las enzimas.

Palacios, A. (2007), indica que el raquis es el residuo de banano que posee la mayor cantidad de fibra cruda en base seca, con un valor de 53,90%, seguido del pseudotallo con 35,30%, mientras que el porcentaje de fibra en hojas es de 34,20%.

4.1.2. Verificación de crecimiento micelial en los distintos tratamientos

En la Tabla 3, se muestra un reporte de la verificación de la presencia de crecimiento micelial 24 días después de la inoculación, mediante una inspección visual. En el tratamiento a_0b_2 (hojas-*Lentinula edodes*) no existió crecimiento micelial. En los tratamientos a_2b_0 , a_2b_1 , y

a_2b_2 en los que el raquis (factor a_2) actuó como sustrato no proliferó ninguna de las tres cepas (factor b) empleadas. Consecuentemente en los tratamientos en los que no existió crecimiento micelial no fueron sujetos a los análisis propuestos en el presente estudio.

Ardón, C. 2007, afirma que un sustrato no funciona como tal cuando no poseen las fuentes nutricionales que requieren las cepas de hongos y/o no son capaces de utilizarlos en su forma natural sin que hayan sido sujetos a algún proceso de degradación bioquímica o microbiológica. Sin embargo el raquis es un sustrato con alto valor de fibra bruta (lignina, hemicelulosa y celulosa), y una potencial fuente de materia prima para la producción de etanol.

4.1.3. Determinación de la concentración de azúcares reductores

La cantidad de glucosa liberada en la hidrólisis enzimática se determinó por medio del método cuali-cuantitativo de Lane y Eynon (1923), que determina la concentración de azúcares reductores (glucosa), la misma que ha sido liberada como resultado de la degradación de la celulosa contenida en la carboximetil celulosa. Se precisó realizar el cálculo de la concentración de azúcares reductores para la posterior determinación de la actividad enzimática, aplicando las Ecuaciones 1, 2 y 3 que se detalla en el Capítulo 3, página 47.

Los valores experimentales de la concentración de azúcares reductores (g de glucosa/50 ml de hidrolizado) formados durante la hidrólisis de la carboximetil celulosa, por la acción de las enzimas celulasas obtenidas de los distintos tratamientos se muestra en la Tabla 4. De entre los tratamientos (con presencia de crecimiento micelial) que fue factible la extracción enzimática de las celulasas, los valores promedios de concentración de azúcares reductores tienen un mínimo de 0,032 g de glucosa/50 ml de hidrolizado pertenecientes al tratamiento a_0b_1 (hojas-

Pleurotus. pulmonarius) y un valor máximo de 0,176 g de glucosa/50 ml de hidrolizado correspondiente al tratamiento a₁b₂ (pseudotallo-*Lentinula edodes*).

4.1.4. Determinación de actividad enzimática

La determinación de actividad enzimática es una forma de medir la cantidad de enzima producida (Terán, M., 1982). Con los valores reportados en la Tabla 4, se procedió a calcular los valores de actividad enzimática que se observan en la Tabla 5. El tratamiento a₁b₂ (pseudotallo-*Lentinula edodes*) al generar una máxima actividad enzimática con un valor de 8,14, se define como el mejor tratamiento. Se identifica también que el tratamiento a₁b₁ (pseudotallo-*P. pulmonarius*) presenta un valor de actividad de 6,47 UI/g materia seca secundando la máxima actividad enzimática. La diferencia de valores de actividad enzimática radica en que el metabolismo de los micelios de *Lentinula edodes* y *P. pulmonarius* es distinto y por ende la cantidad de enzima producida va a variar a pesar de haberse producido en el mismo sustrato (pseudotallo).

P. ostreatus también ha sido reconocido como productor de enzimas lignolíticas (Guillén-Navarro *et al.*, 1998), más que de celulasas y xilanasas. En el presente estudio la actividad de celulasas expresada por *P. ostreatus* fueron aparentemente superiores a los reportados por Marques *et al.*, 2007 para *P. ostreatus* IE8, quien encontró una máxima actividad de 1,16 UI/g de materia seca de bagazo de caña de azúcar en 19 días de fermentación. En *Trametes sp.*, el valor que obtuvo es de 9,56 UI/g de materia seca de bagazo de caña de azúcar, un poco más alto que el producido en el tratamiento a₁b₂ por *Lentinula edodes* obtenido en este trabajo, que fue de 8,14 UI/g de materia seca, en 24 días de fermentación. Las variaciones de los valores de actividad enzimática se atribuyen a que son distintas las especies de los hongos, al tiempo de fermentación sólida

y al tipo de sustrato que se maneja en el presente estudio con respecto al reportado por Marques *et al.*, 2007 que fue caña de azúcar. Sin embargo se lo tomo como referencia debido a que el método con el que se determinó actividad enzimática en este trabajo es el mismo al empleado en este trabajo de investigación.

Cabe mencionar que la máxima producción de azúcares reductores obtenida de extracto enzimático proveniente de la fermentación sólida de pseudotallo-*Lentinula edodes*, se debió a que esta cepa al poseer un complejo sistema enzimático de tipo lignocelulósico, es capaz de generar enzimas celulasas capaces de degradar celulosa presente en la carboximetil celulosa que actuó como sustrato puro o indicador

4.1.4.1. Análisis estadístico de las actividades de las enzimas celulasas obtenidas

En la Tabla 9, se reporta el análisis de varianza de la actividad de las enzimas celulasas en UI (μ moles de glucosa/minuto)/g de materia seca, obtenidas de los distintos tratamientos. Se establece que existe diferencia altamente significativa ($\alpha < 0,05$) para los residuos (sustratos) y las interacciones AxB, más no existe diferencia significativa ($\alpha < 0,05$) en las cepas y en replicas.

Al no existir diferencia significativa en el factor B, cepas, se entiende que para obtener la misma cantidad de enzimas celulasas podría trabajarse con *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* o *Lentinula edodes* (*Shiitake*) ya que no incide en los resultados de actividades de las enzimas celulasas, aunque se sugiere utilizar *Shiitake* por ser un hongo más manejable en cuanto a su fermentación sólida.

La prueba de Tukey para el efecto principal, Factor A, correspondiente a los residuos (hojas, pseudotallo y raquis) que

mostraron diferencia altamente significativa ($\alpha < 0,05$) se presentan en la Tabla 13, donde el mayor valor de la media de actividad enzimática se da en pseudotallo de banano con un valor de 6,96 (UI/g de materia seca).

Existe interacción cuando las diferencias entre las respuestas medias para dos niveles de un factor no son iguales para todos los niveles del otro factor. La prueba de diferencia significativa de Tukey para el efecto de las interacciones AxB (residuos-cepas) expuesta en la Tabla 14, clasifica a las mismas en cuatro grupos, de los cuales se destaca el Grupo A que corresponde al mejor, a_1b_2 (pseudotallo-*Lentinula edodes*).

En el Gráfico 4, se muestra la representación gráfica del análisis estadístico de la interacción de los residuos de banano y cepas de los hongos en función de las actividades enzimáticas, donde es perceptible que el mayor efecto de la interacción se da con el residuo pseudotallo y la cepa *Lentinula edodes* como lo indica el análisis de interacciones en la Tabla 15. Entre las cepas *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* existe un paralelismo, es decir que estas cepas tienen el mismo comportamiento con los tres tipos de residuo.

4.1.5. Efecto de la temperatura, tiempo y pH de reacción en la actividad de las enzimas celulasas

Los efectos de factores como la temperatura, tiempo y pH pueden actuar como inhibidores. La inhibición de las enzimas es una materia importante puesto que los estudios de inhibición han suministrado informaciones válidas de la estructura y mecanismos enzimáticos y porque obviamente la inhibición debe minimizarse para que la actividad de una reacción catalizada por una enzima se máxima (Wiseman, A. 1991).

4.1.5.1. Efecto de la temperatura y tiempo

La Tabla 6, muestra el efecto de la temperatura y tiempo en la actividad de las celulasas (UI/g de materia seca), en donde se evidencia que a la temperatura de 50°C, se produce mayor actividad enzimática. Vilchez, L. (2002) cita en su trabajo que Pardo & Forchiassin (1998, 1999), establecieron que la temperatura óptima para la actividad del sistema celulolítico se halla en el rango de 50-55°C. Así también se observa en la Tabla 6 que ha temperaturas superiores e inferiores a la óptima, las enzimas celulasas producidas a partir de pseudotallo como sustrato y la cepa *Lentinula edodes* hidrolizan en menor grado la carboximetil celulosa, lo que se refleja en los bajos valores de actividad enzimática.

En el Gráfico 5, se visualiza que la actividad enzimática de las celulasas ocurre rápidamente durante la primera hora de reacción y alcanza la máxima actividad a las dos horas y media aproximadamente, pasado este tiempo la formación de glucosa no existe, es decir ya no se da el rompimiento de las moléculas de la carboximetil celulosa (sustrato indicador).

4.1.5.2. Efecto del pH

En la Tabla 7 y Gráfico 6, se muestra que a un valor de pH 5,3 se maximiza la actividad enzimática de las celulasas en una hora de reacción, verificándose que la hidrólisis de la celulosa por acción de las celulasas según Badui (1993), se ve influenciada por la concentración de iones hidrogeno del medio, debido a que se afecta el grado de ionización de los aminoácidos del complejo enzima-sustrato. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. A un pH menor o mayor 5,3 la actividad de la enzima disminuye, y por ende la formación de glucosa es baja.

La especificidad de la catálisis hace que las celulasas actúen a condiciones bastante específicas y óptimas de pH y temperatura; para celulasas se estableció 5,3 y 50°C son las condiciones óptimas de pH y temperatura respectivamente. Carrillo (2002), afirma que la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá del control de estas dos variables. Por este motivo es recomendable el uso de soluciones tampón, que modifican la fuerza iónica del medio, produciendo diferentes efectos sobre la hidrólisis, según el tipo y cantidad de electrolito utilizado.

Vilches, L. 2002, manifiesta que Szczodrak, *et al.* (1982), determinaron la actividad celulolítica de 17 especies de hongos, entre las que *Aspergillus terreus* F-413 mostró la más alta actividad en un rango de pH entre 4,8-5,3; corroborando el resultado obtenido de pH 5,3 en se maximizó la actividad de las enzimas celulasas obtenidas.

En general, las enzimas son activas en un rango limitado de pH. Usualmente cada enzima tiene un pH óptimo porque, al igual que otras proteínas, los enzimas poseen muchos grupos ionizables de forma que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo (Wiseman, A. 19991).

4.1.6. Pretratamiento alcalino de los residuos del cultivo de banano

Tras el pretratamiento alcalino se caracterizó de nuevo a los residuos a llevarse a hidrólisis enzimática, cuyos resultados reportados en la Tabla 2, aparecen como incrementos en el porcentaje de lignina, y hemicelulosa en los tres tipos de residuos en comparación con los valores reportados en el Tabla 1 (residuos no tratados). Los porcentajes de celulosa si muestran coherencia en cuanto a su incremento, demostrando la efectividad del pretratamiento. Así se tiene que la celulosa presenta un valor de 41,07% en hojas, 59,68% en pseudotallo y 49,52% en raquis.

Los porcentajes de lignina y hemicelulosa debieron haberse reducido por acción del álcali. Durante el proceso de deslignificación o pretratamiento alcalino, se produjo un incremento en la lignina, y hemicelulosa en el residuo tratado en comparación con el no tratado, hecho que puede deberse a la saponificación de las grasas de estos componentes con el álcali durante el pretratamiento, inclusive parte de los carbohidratos pueden haberse hidrolizado en compuestos solubles que fueron eliminados durante el lavado de los residuos, produciendo un incremento de lignina y hemicelulosa en los residuos pretratados.

El grupo de Bioprocesos de la Universidad de Colombia (2004), reporta un aumento del porcentaje de celulosa de material lignocelulósico de la planta de banano en base seca de un 29,2 a 79,4 y una reducción del 94% de hemicelulosa y 2% de lignina, tras un pretratamiento en el que utilizaron NaOH y Ca(OH)₂. Los resultados concuerdan en cuanto a la tendencia con los reportados para celulosa en esta investigación.

Sánchez, O. y Cardona, C. (2005) corroboran que el complejo lignocelulósico al estar compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos como la celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa, necesitan un pretratamiento que logre desintegrar esa matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático.

4.1.7. Hidrólisis de los compuestos celulósicos

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

Cuando el material celulósico estuvo listo, es decir, concluido el pretratamiento alcalino, con el pH ajustado a 5,3, se adicionó el extracto de las enzimas celulasas obtenidas al medio de reacción en una proporción de 12 UI/g de materia seca. Truss de Vrije, *et al*, (2009), utiliza en sus investigaciones de hidrólisis de celulosa de residuos de paja de *Miscanthus* pretratado para biocombustible 15 de IFPU por g de materia seca.

Una vez acondicionado material celulósico a 50°C (temperatura óptima de las celulasas), se midieron durante las 48 horas de reacción los sólidos solubles (°Brix), los mismos que se reportan en la Tabla 8, en donde se presentan valores decrecientes de sólidos solubles a medida que transcurren el tiempo, de 6 a 2. En la Gráfica 7, se representa los sólidos solubles (°Brix) durante la hidrólisis enzimática de los compuestos celulósicos, en donde se aprecia que durante las primeras 24 horas de hidrólisis ocurre un descenso rápido de los sólidos solubles, luego es claramente perceptible la tendencia a estabilizarse. Con ello se demuestra la efectividad de las celulasas obtenidas para la hidrólisis de azúcares potencialmente fermentables.

4.1.8. Fermentación alcohólica

En la Tabla 9, se muestran los datos de sólidos solubles (°Brix) durante los 9 días de fermentación, tiempo en el que se estabilizó la fermentación. Los °Brix consumidos son de aproximadamente 4 en todos los casos.

En el Gráfico 8, se observa que las curvas de disminución de azúcares para los tres tipos de residuos durante la fermentación alcohólica. Dichas curvas presentan un comportamiento similar, debido a que su acondicionamiento fue idéntico (°Brix iniciales dosificación de levadura, y condiciones de fermentación). Además de que se trataban de

los mismos tipos de azúcares. Las curvas se ajustan a una regresión polinomial (tercer orden) característico de las fermentaciones alcohólicas, con valores de:

$$y = -0,0009x^3 + 0,0245x^2 - 0,6179x + 6; R^2 = 0,9497 \text{ para pseudotallo.}$$

$$y = -0,0044x^3 + 0,0839x^2 - 0,8465x + 6; R^2 = 0,9223 \text{ para raquis.}$$

$$y = -0,0062x^3 + 0,1034x^2 - 0,891x + 6; R^2 = 0,9322 \text{ para hojas.}$$

4.1.8.1. Destilación alcohólica

Con el propósito de concentrar el etanol se procedió a destilar el producto de la fermentación alcohólica, obteniéndose los resultados reportados en la Tabla 10. El mayor rendimiento de alcohol fue la relación de 26,71 ml de etanol puro por 100 g de raquis seco. El raquis posee la mayor proporción de fibra bruta, 53,90%, con respecto a los a hojas y pseudotallo. El pseudotallo le sigue con 20,89 ml etanol por 100 g de residuo seco y por último con 19,04 ml. de etanol por 100 g de hojas secas de banano.

Al comparar la Tabla 9 y 10 se nota que alrededor de 2 °Brix son consumidos en la fermentación alcohólica para producir 1 Gl de etanol. Ponce, A. (2009), obtuvo 1° alcohólico por 1,7g de azúcar o lo que es lo mismo, 1° alcohólico por 1,7 °Brix.

El bioetanol producido a partir de materias lignocelulósicas, también llamado bioetanol de segunda generación, se presenta como alternativa de futuro a los biocombustibles de primera generación. La biomasa lignocelulósica no compite con el mercado alimentario, y, al estar ampliamente distribuida, su coste es menor, lo que contribuye a disminuir el precio final del biocombustible (Tomás, M^a E. 2009).

4.1.8.2. Cantidad de etanol obtenible a partir de residuos del cultivo de banano

En la Tabla 11, se presentan valores de los litros de etanol que se produciría por toneladas de residuos frescos y secos, con el propósito de tener una perspectiva del volumen de alcohol que se obtendría a partir del tonelaje de residuos que se generen en una determinada bananera. La diferencia de litros de etanol producido entre los residuos frescos y secos está directamente relacionada por la humedad que presenta cada tipo de residuo. El raquis en ambos casos es del cual se obtiene mayor volumen de etanol. Así se tiene que el etanol obtenible es de 28,23 litros por tonelada de residuo fresco y 267,10 litros por tonelada de residuo seco. Aycachi, R. (2009) obtiene 160 litros de etanol/tonelada de madera.

4.1.9. Análisis económico de la obtención de enzimas celulasas

Con el fin de conocer la factibilidad de implementar la tecnología de obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida del micelio de setas utilizando como sustrato los residuos del cultivo del banano, se propuso realizar un análisis económico sobre la tecnología de obtención de enzimas celulasas a escala de laboratorio.

El análisis económico se realizó en base al mejor tratamiento, la utilización del sustrato pseudotallo con el hongo comestible *Lentinula edodes* (Shiitake), se consideraron los resultados del balance de materia de los diferentes pasos de obtención. A continuación se detalla el análisis de costos para este tratamiento sobre una base de 25 kg del residuo de banano pseudotallo (sustrato) mensualmente.

Detalles de los aspectos del análisis económico sobre la tecnología de obtención de enzimas celulasas:

4.1.10.1. Materiales directos e indirectos

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD (kg)	VALOR UNITARIO (\$)	COSTO TOTAL
Pseudotallo deshidratado	25,000 kg	0,15	3,75
Cepa	0,014 kg	250,00	3,50
Agar PDA	0,010 kg	160,00	1,60
Trigo	0,250 kg	0,65	0,16
Acido Cítrico	0,034 kg	45,00	1,53
Citrato de Sodio	0,126 kg	60,00	7,56
Fundas plásticas estériles	25 unid.	0,30	7,50
		SUMAN	25,60

4.1.10.2. Personal

Sueldo Mensual (\$)	Días lab.	Horas lab.	c/día (\$)	c/hora (\$)	Costo día (5 hrs.) (\$)	Días a laborar al mes	Costo mensual
313,43	20	8	15,67	1,96	9,79	15,00	146,92

4.1.10.3. Suministros

Suministros	Consumo	Precio unitario (\$)	Total (\$)
Energía eléctrica (Kw/h)	40	0,1353	5,41
Agua (l)	80	0,0003	0,02
Teléfono (min)	20	0,0200	0,40
Gas	1	2,0000	2,00
		SUMAN	7,83

4.1.10.4. Equipos y utensilios

Equipos	Costo (\$)	Capacidad	Tiem. Utilizado (horas)	Vida útil (años)	Deprec. (Anual) (\$)	Mensual (\$)
Autoclave	800,00	50 lt	15	10	80,00	6,67
Incubadora	450,00	3,1 pies ³	72	10	45,00	3,75
Balanza analítica	250,00	5 kg	0,5	10	25,00	2,08
Centrífuga	1200,00	5 kg	25	10	120,00	10,00
pH metro	220,00	0,0-14 pH	1	10	22,00	1,83
Cámara de fermentación	150,00	30 kg	576	10	15,00	1,25
Secador de bandejas	230,00	450 lt aire*min, 50 kg	120	10	23,00	1,92
Tanque pasteurizador	130,00	50Kg	12	10	13,00	1,08
Refrigeradora	300,00	8 pies ³	720	10	30,00	2,50
Guillotina	30,00	2cm ² +2cm ²	25	1	30,00	2,50
Material de vidrio	50,00	-	10	0,5	100,00	8,33
Utensilios	60,00	-	15	5	12,00	1,00
					SUMAN	42,92

4.1.10.5. Costo de producción

Costo de producción mensual	
Materiales directos	25,60
Utilización de equipos	42,92
Suministros	7,84
Personal	146,92
Sub Total(\$)	223,28

4.1.10.6. Resumen del análisis económico realizado

Extracto enzimático producido en un mes (kg)	6,47
Costo de enzima comercial/kg (\$)	\$ 15,68
Costo para la venta de la producción de un mes (\$)	\$101,51
Costo Total de producción (\$)	223,28
Costo de producción por kilogramo (\$)	34,49
Utilidad de la producción mensual (43,69%) (\$)	-97,56
Utilidad por kg de enzima producida (\$)	-15,07

Detalle del estudio económico realizado:

Ingresan: 25 kg de pseudotallo de banano

Se obtiene: 6,47 kg de extracto enzimático y se venden a razón de \$34,49 el kg. Se opera 15 días al mes y se trabajan 5 horas diarias.

En costo unitario de la producción de la enzima celulasas usando el método de cultivo sólido es de \$ 15,68 en el mercado europeo (Velázquez, B. 2010). Comparado con el precio de producción del estudio realizado para obtención de enzimas celulasas se estima su venta en \$ 34,49 por kilogramo, lo que no representa ganancia alguna sino que por el contrario lo que implica pérdidas. Sin embargo, se considera que la producción es a nivel de laboratorio, se justifica dicha pérdida ya que este es un estudio preliminar de una tecnología de producción de enzimas celulasas.

En definitiva la tecnología de producción de enzimas celulasas al hallarse en un proceso de desarrollo, crea expectativas, a corto y mediano plazo, además una reducción significativa de los costos de producción, debido a las grandes empresas productoras de enzimas utilizan hongos que son manipulados genéticamente que producen mayor actividad enzimática y por ende menor costo de producción.

Lo importante de este trabajo es haber determinado que el pseudotallo de banano puede ser un buen sustrato para la producción de enzimas. Adicionalmente a esto se estableció que los tres tipos de residuos de banano son una potencial fuente de celulosa para la producción de bioalcohol. Así también se espera el desarrollo de nuevas aplicaciones para la valorización de subproductos generados del proceso de obtención de enzimas y compensar el estado de pérdida del presente análisis económico.

4.2. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

Se ha rechazado la hipótesis nula que señala que todos los tratamientos dan igual actividad enzimática de celulasas. La discusión presentada en los ítems anteriores se explica la situación del mencionado parámetro evaluado.

En consecuencia, se acepta la hipótesis alternativa, $T \neq 0$, es decir que los tratamientos no dan igual actividad enzimática de celulasas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*, empleando como sustrato los residuos del cultivo de banano, hojas y pseudotallo, no así en raquis.
- Se realizó el análisis químico de los residuos lignocelulósicos del cultivo del banano, evidenciándose que la celulosa es la fracción mayoritaria de la parte lignocelulósica o fibra, obteniéndose valores de 36,60%, 35,30% y 30,60% para hojas, pseudotallo y raquis respectivamente.
- Se determinó que el mejor tratamiento fue el conformado por el sustrato pseudotallo con la cepa *Lentinula edodes* (*Shiitake*) que produjeron un extracto enzimático con la máxima actividad 8,14 UI/ g de sustrato seco, seguido por el tratamiento pseudotallo-*Pleurotus pulmonarius* con 6,47 UI/g de materia seca y por último pseudotallo-*Pleurotus ostreatus* con 6,28 UI/g de materia seca.
- Se determinó que a la temperatura de 50°C y a un pH de 5,3 son las condiciones óptimas para que las enzimas celulasas ejerzan su acción en la hidrólisis de sustratos celulósicos, condiciones a las que las celulasas alcanzan su máximo valor de actividad.
- Al aplicar las enzimas celulasas obtenidas se consiguió transformar residuos celulósicos provenientes del cultivo de banano a azúcares

solubles y bajo la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se logró fermentar hasta obtenerse etanol, en una relación de 24,66 ml de etanol puro por 100g de de raquis seco, siendo este el mejor rendimiento de alcohol producido.

- Al realizar el análisis económico de la “tecnología de obtención de enzimas celulasas”, se concluye el precio de producción de \$ 34,49 por kilogramo, que es relativamente alto al compararlo con el precio del mercado que es \$ 15,68 el kilogramo. Cabe recalcar que al ser este un estudio a escala de laboratorio se necesita buscar ajustes para la aplicación de esta tecnología a nivel industrial.

5.2. RECOMENDACIONES

- Tomando en cuenta que el análisis químico nos da una visión de la composición de la fibra lignocelulósica contenida en los residuos de banano, se recomienda investigar el uso de le hemicelulosa en la producción de bioalcohol.
- Con el fin de aprovechar al máximo los residuos del banano, se sugiere evaluar la utilización del remanente de la fermentación sólida,, para de este modo aprovecharlos de forma integral.
- Considerando que sin un pretratamiento efectivo, los rendimientos en azúcares son bajos y la celulosa no será accesible a las enzimas celulasas se recomienda comparar otras técnicas de pretratamiento de la biomasa, aunque la aplicación de ácidos diluidos o álcalis diluidos son tecnologías conocidas para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, recientemente se han descrito otras tecnologías teóricamente más eficientes. Entre estas tecnologías están los pretratamientos de «explosión por vapor» y «explosión de fibras por amoniaco» (AFEX, por sus siglas en inglés), entre otras.

- Examinar la estabilidad de las celulasas obtenidas, con el propósito de estudiar la actividad enzimática en relación al tiempo de almacenamiento del medio que contiene la enzima.
- Se recomienda investigar la obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano *Musa cavendish*, con los parámetros establecidos en este estudio con miras a su producción a mayor escala y a ofertar al mercado un producto que abarate sus costos de adquisición.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. DATOS INFORMATIVOS

Título: “Obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*)”

Institución Ejecutora: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Laboratorio Unidad Operativa de Investigaciones en Tecnología de Alimentos UOITA.

Beneficiarios: Bananeros de la costa ecuatoriana

Ubicación: Ambato-Ecuador

Tiempo estimado para la ejecución: 1 año

Inicio: Septiembre 2010

Final: Septiembre 2011

Equipo técnico responsable: Egda. Daysi Paredes Medina, Ing. Mario Álvarez, Ing. Gladys Navas.

Costo: \$ 3200,00

6.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En la obtención de enzimas celulasas es trascendental la elección de la cepa, la misma que debe presentar una alta actividad enzimática y actuar bajo condiciones específicas de pH y temperatura controlables. Las enzimas celulasas deben degradar la celulosa presente en la carboximetil celulosa (sustrato puro).

Se obtiene enzimas celulasas mediante la fermentación sólida de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* durante 24 días, utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano: hojas, pseudotallo y raquis, determinando que el mejor tratamiento es el extracto enzimático que se obtiene de la interacción cepa-sustrato con la máxima actividad enzimática, hidrolizando en mayor proporción los azúcares contenidos en el sustrato puro o indicador carboximetilcelulosa.

OVANDO, S. y WALISZEWSKI, K. 2005, en su publicación "Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en proceso extractivos", se manifiesta que *Trichoderma reesei* que se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolítico que produce y secreta. Además tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4,8 a 50°C durante 48 h.

SÁNCHEZ, O. y CARDONA, C. (2005), en su artículo "Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas", se indica que la mayoría de celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*.

Se realiza la determinación de la actividad de las enzimas celulasas a diferentes tiempos y pH de reacción, constatándose que estas

producen su máxima actividad en condiciones altamente específicas, condiciones que sin lugar a duda proporcionan un direccionamiento para la aplicación de las mismas a los residuos pretratados con álcali, para la producción de azúcares fermentables.

6.3. JUSTIFICACIÓN

El impulso reciente de la bioconversión de residuos agrícolas e industriales ha dado lugar a amplios estudios sobre las enzimas celulolíticas producidas por hongos y bacterias. La celulosa es un valioso recurso de fibra, combustibles y piensos. Las investigaciones sobre la capacidad de microbios para degradar celulosa nativa y modificada han puesto de manifiesto a unos pocos hongos con la capacidad de degradar celulosa nativa. La mayoría de microbios sin embargo pueden degradar la celulosa modificada (M.M.V. Baig, *et al.*, 2004).

Actualmente en el mundo existen sólo dos proveedores del complejo de enzimas celulasas para degradar residuos lignocelulósicos: Novozymes (Dinamarca) y Genencor (EE.UU.) (Velázquez, B., 2010). Por ello la propuesta de obtención de enzimas celulasas, para conseguir enzimas celulasas que permitan aprovechar el pseudotallo de banano, que conjuntamente con la cepa de *Trichoderma reesei*, produzcan extracto enzimático con alta actividad.

Entre los componente residuales de la planta de banano se produce el pseudotallo, el mismo que presenta al natural el 91% de humedad En términos de composición química posee un 35% de celulosa. Por esta razón, el pseudotallo puede ser considerado una fuente alternativa de carbono para la producción de enzimas. El pseudotallo de banano, soporta los frutos de banano que se desechan después de la recolección de frutas contribuyendo a los graves problemas del medio ambiente Debido a su heterogeneidad y la complejidad química, la

biodegradación de la lignocelulosa del pseudotallo del banano requiere la acción coordinada del complejo de enzimas celulasas, para efectuar la hidrólisis extensiva a sus componentes monoméricos (Werner Bessa Vieira, *et al.*, 2007).

Lentinula edodes produjo la máxima actividad enzimática con el pseudotallo como sustrato. Sin embargo de acuerdo a información bibliográfica existe en hongo *Trichoderma reesei* que se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolítico que produce y secreta. Además tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4,8 a 50°C durante 48 h (Ovando, S. y Waliszewski, K. 2005), condiciones similares con las que se trabajó utilizando el pseudotallo de banano, de ahí surge la presente propuesta, ya que requiere la producción de una mayor actividad enzimática por parte de las enzimas celulasas para conseguir altos valores de actividad y por ende de hidrólisis de celulosa tan abundante en el pseudotallo de banano.

Entonces, establecer una tecnología de obtención de enzimas celulasas constituye una herramienta importante para el aprovechamiento de los residuos provenientes de los cultivos de banano. Se obtendrá un complejo enzimático que hidrolice efectivamente los residuos de banano pretratados para la obtención de azúcares fermentables.

6.4. OBJETIVOS

6.4.1. Objetivo General

- Obtener enzimas celulasas por fermentación sólida del hongo *Trichoderma reesei*, utilizando como sustrato el pseudotallo de banano.

6.4.2. Objetivos Específicos

- Implementar la tecnología de obtención de enzimas celulasas a partir de la fermentación sólida del hongo *Trichoderma reesei*, utilizando como sustrato el pseudotallo de banano.
- Determinar el tiempo de vida útil de las enzimas celulasas para degradar el pseudotallo de banano.
- Realizar estudios de estabilidad enzimática del complejo celulolítico con respecto a inhibidores.

6.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La viabilidad de la “Obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*)” será evidente a medida que los objetivos planteados se hayan desarrollado correctamente.

El proyecto de investigación es de tipo tecnológico, ya que con este se puede implementar una metodología de obtención de enzimas celulasas, con la cuales se logre aprovechar de una forma total el pseudotallo de banano, que con la interacción del hongo *Trichoderma reesei*, se consiga un extracto enzimático capaz de hidrolizar la celulosa presente en el mencionado residuo.

El análisis de factibilidad, es de carácter socioeconómico, ya que este tema de investigación puede ser implementado para pequeños y grandes productores de banano, los cuales sabrán aprovechar los residuos que generan de su actividad agrícola y así obtener réditos de lo hasta ahora se considera un tema difícil de manejar por los problemas medio ambientales que ocasionan.

6.6. FUNDAMENTACIÓN

La propuesta de obtención de enzimas celulasas atiende a las siguientes consideraciones:

- La selección del sustrato se realizará en base a antecedentes de la determinación de actividad enzimática de las celulasas que se obtuvo, en la UOITA.
- Para la determinación de actividad enzimática se considera un sustrato y cepa, seleccionada que presenten los máximos valores de actividad que hidrolicen efectivamente la celulosa de los residuos celulósicos.

6.7. METODOLOGÍA. MODELO OPERATIVO

Para la “Obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*)” seguimos el procedimiento mencionado en el presente estudio, con la variación de la cepa en la fermentación sólida será del hongo *Trichoderma reesei*.

6.7.1. Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Tiempo (mes)	Presupuesto (USD\$)
1. Formulación de la propuesta	Obtener enzimas celulasas a partir del hongo <i>Trichoderma reesei</i> utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (<i>Musa cavendish</i>)	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Económicos	1	100,00
2. Financiamiento de la propuesta	Destinar recursos económicos para desarrollo de la propuesta	a) Convenios de Cooperación b) Destinar recursos	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	2	200,00
3. Desarrollo preliminar de la propuesta	Elaborar lo que se propone en propuesta en un 100%	Pruebas preliminares de fermentación sólida y pretratamiento	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	2	600,00
4. Implementación de la propuesta	Ejecutar la propuesta en un 100%	Tecnología de obtención de enzimas	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	4	1500,00
5. Evaluación de la propuesta	Comprobar errores y aciertos en el proceso de la implementación	Aplicación de las enzimas en distintos sustratos	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	3	800,00
					TOTAL	3200,00

6.7.2. Materiales Directos

- Cepa de hongo *Trichoderma reesei*
- Pseudotallo de banano

6.7.3. Materiales Indirectos

- Solución amortiguadora de citrato (50mM; pH 5,3)
- Carboximetil celulosa (CMC) sal de sodio al 0,5%
- Hidróxido de Sodio

6.7.4. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Autoclave
- Incubadora
- Cámara de fermentación
- Potenciómetro
- Desecador
- Baño María
- Refrigeradora
- Hidrómetro
- Termómetro digital
- Cocina doméstica

6.7.5. Descripción del proceso de obtención de enzimas celulasas

A continuación se describe el proceso de de obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*).

Recepción: Se receipta pseudotallo de banano cortado en tucos pequeños y se toma de muestras al azar para realizar el correspondiente análisis químico de fibra.

Selección y lavado: Se retiran las partes del pseudotallo que presenten muestras de magulladuras y lavan para eliminar tierra y otras impurezas.

Cortado: Se desenvuelve las partes que conforman el pseudotallo y se corta en delgadas tiras.

Deshidratado: Las tiras obtenidas se colocan en un desecador con flujo de aire a 60°C, hasta que alcancen una humedad alrededor del 12%.

Troceado: Una vez deshidratado el pseudotallo se proceda a cortar las tiras a un tamaño aproximado de 0,5 y 1 cm.

Preparación del medio de fermentación

Preparación del sustrato: Para el proceso de fermentación sólida se colocan 12 g de residuos de banano en matraces de 500 ml y se ajusta la humedad al 80%.

Esterilización del sustrato: A los matraces con los residuos se esterilizan en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Se deja enfriar hasta 22°C.

Inoculación (mezcla sustrato-micelio): En forma aséptica se mezcla homogéneamente con la cepa del hongo previamente desarrollada en semillas de trigo en una proporción del 2% con respecto al peso húmedo del sustrato.

Incubación-Fermentación sólida (proceso de colonización): Se incuban los matraces contenidos de cepa y pseudotallo por 24 días a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa de 60-70% hasta que el micelio cubra totalmente el pseudotallo.

Extracción de enzimas: Al tiempo definido de fermentación, se adicionó a cada matraz 30ml de solución amortiguadora de citrato 50mM, pH 5,3 y se agitaron durante 15 minutos; para seguidamente prensarle. El volumen obtenido se distribuyó en tubos para centrifugarlos por 30 minutos a 6000 rpm y se separa el sobrenadante al cual es ya el extracto enzimático.

En el Gráfico 11, se presenta el diagrama del balance de materia de la obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*) a partir de 100 kg de pseudotallo, como una referencia de la capacidad de producción de extracto enzimático a mayor escala.

6.8. ADMINISTRACIÓN

En la ejecución de la propuesta antes mencionado se deberá tener en cuenta la administración de los recursos utilizados y estará coordinada por los responsables la propuesta: Egda. Daysi Paredes, Ing. Mario Álvarez e Ing. Gladys Navas.

6.8.1. Administración de la propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsable
Inexistencia de enzimas celulasas en el mercado local	Desaprovechamiento de residuos lignocelulósicos provenientes del cultivo de banano	Obtención de enzimas celulasas, mediante el aprovechamiento del pseudotallo de banano como sustrato del hongo <i>Trichoderma reesei</i>	<p>Determinar la actividad de las enzimas celulasas obtenidas mejor</p> <p>Determinar la condiciones óptimas de acción de las enzimas</p> <p>Aplicar el extracto enzimático obtenido a distintos sustrato</p>	Investigador: Daysi Paredes Medina

6.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Preguntas básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Comunidad científica Pequeños y grandes productores de banano
¿Por qué evaluar?	Evaluar tecnología Corregir errores
¿Para qué evaluar?	Determinar la tecnología de obtención de enzimas celulasas y sus condiciones de acción sobre los sustratos lignocelulósicos
¿Qué evaluar?	La materia prima utilizada La tecnología desarrollada Análisis realizados Enzimas obtenidas
¿Quién evalúa?	Director del proyecto Tutor Calificadores
¿Cuándo evalúa?	Todo el tiempo, desde pruebas preliminares hasta producto obtenido y sus aplicaciones
¿Cómo evaluar?	Mediante instrumentos de evaluación
¿Con qué evaluar?	Experimentación

CAPÍTULO VII

MATERIALES DE REFERENCIA

7.1. BIBLIOGRAFÍA

1. Afanador, A. 2005, "El banano verde de rechazo en la producción de alcohol carburante angélica maría afanador", Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 3 p. 51-68. Junio 2005, Medellín, Colombia. Disponible en: <http://revista.eia.edu.co>.
2. Álvarez, M. Soria, V. Larrea, P. 2003. "Enriquecimiento proteico del banano de rechazo por fermentación sólida para alimento animal". Public Asesores. Quito Ecuador.
3. Ardón, C. 2007, "La producción de los hongos comestibles". Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Maestría en Docencia Universitaria con Especialidad en Evaluación Educativa, Guatemala.
4. Aycachi, R. (2009), "Producción de Bioetanol", Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", Lambayeque.
5. Badui, S. 1993. "Química de los Alimentos". Editorial Pearson. México.
6. Bao, M.; Delgado, S; García, M. y Torres M. 1987. "Aprovechamiento de residuos de plataneras. I. Producción en Islas Canarias, sus características y alternativas de utilización". Revista Agro-química Tecnología de Alimentos. 27:24-30p.
7. Bial-Arístegui, (2002), "El reino de los hongos", Revista Iberoamericana de Micología. 1pp. Disponible en: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com>.
8. Biblioteca digital de la Universidad de Chile. Disponible en: <http://mazinger.sisib.uchile.cl>

9. Bioinformática de celulasas. Disponible en: <http://recursostic.javeriana.edu.com>.
10. Cardona, C.; Sánchez, O.; Ramírez, J. y Alzate, L. 2004, "Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado". Rev. Col. Biotecnol. VOL. VI No. 2 Diciembre, 78-89p. Disponible en : <http://redalyc.uaemex.mx/>.
11. Carrera, J. 2002. "Producción y aplicación de enzimas industriales", Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán Colombia. Disponible en: <http://www.unicauca.edu.co>.
12. Carrillo, F. 2002, "Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación". Universidad Politécnica de Catalunya. España. Disponible en: <http://www.tdr.cesca.es>
13. Cha, D. *et al.*, 1997. Oyster Mushroom–Cultivation Technology and Management (in Korean). 374p.
14. Cuervo, L.; Folch, J. y Quiroz, R. 2009, "Lignocelulosa como Fuente de Azúcares para la Producción de Etanol". Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México. Artículo de Biotecnología, Vol. 13 No. 3. Disponible en: <http://www.smbb.com.mx>.
15. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile, 2010. "Métodos generales para la obtención industrial de enzimas". Sistema de Servicios de Información y Bibliotecas (SISIB). Disponible en: <http://mazinger.sisib.uchile.cl>
16. Dávalos, M.; Zurita, S. 2004. "Implementación de fábrica de papel y derivados empleando residuos de banano como materia prima". Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
17. Escobar, J. 1965. "Producción Moderna de Bananas". Primera edición, Editorial Acribia. Impreso en Zaragoza, España. 27-38-39p.

18. Fernández, L. 2005. "Clonación, expresión y evolución molecular de la lipasa I de *Galactomyces geotrichum*". Tesis Doctoral. Puelva Biotech. Universidad de Granada, S.A. Disponible en: <http://hera.ugr.es>.
19. Fresh Plaza. "Exportaciones bananeras siguen viento en popa". Noticias del sector de frutas y verduras. Publicada el 05/08/2010. Disponible en: <http://www.freshplaza.es>
20. Gacesa, P. y Hubble, J. 1990. "Tecnología de las enzimas". Editorial Acibia, S.A. Zaragoza, España. 36-37p.
21. García y Martínez. 2006. "Uso de follajes del plátano en la alimentación del cerdo". Disponible en: <http://www.sian.info.ve>.
22. González, J. (2009) "Alkaline and oxidative pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production, Internacional Evento: Innovaquímica, Ponencia, Colombia.
23. Grupo de Bioprocesos de la Universidad de Colombia. 2004. Sede Medellín. Disponible en: <http://www.unalmed.edu.co>.
24. Keskar, S.S. 1992. "Cellulase production by *Penicillium janthinellum*". World J. Microbiology. and Biotech.
25. Lamoureux, F. 2007. "Proteoglycans: key partners in bone cell biology". BioEssays, 29:758-771p. Disponible en: <http://webs.uvigo.es>.
26. Lucio, G. 1982. "Obtención de celulasas de *Trichoderma viride* y su utilización para degradar papel periódico". Tesis de Ingeniería Química. EPN, 8p.
27. M.M.V. Baig, M. L. B. Baig, M.I.A. Baig and Majeda Yasmeen. 2004. "Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes". African Journal of Biotechnology Vol 3 (9), 447-450p. September. Disponible en: <http://www.academicjournals.org>.
28. Manjarres, J. 2007, "Producción de enzimas celulolíticas mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., en fase sólida utilizando los residuos de palma pretratados biológicamente con *Pleurotus ostreatus*", Revista Alimenticia No. 6, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://www.utadeo.edu.co>.

29. Márquez, A.; Mendoza, G.; González, S.; Buntinx, S. y Loera, O. "Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus Níger* AD96.4 en fermentación sólida". Interciencia. Nov 2007, Vol. 32 N° 11.
30. Montoya, S. 2008. "Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*". Tesis de Grado-Maestría en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.
31. Moya, M. 2005. "Producción y usos de los desechos agroindustriales en Centro América". Laboratorio de Polímeros, Universidad Nacional Costa Rica.
32. Mosquera, C. y Rubio, M. 2000. "El reciclaje del papel, celulosa y trichoderma reesei". Departamento de Química, Universidad del Cauca. Popayán. Disponible en: <http://www.monografias.com>
33. Núñez C., 2008. "Análisis Químico de la madera". Disponible en: cenunez.com.ar.
34. Ovando, S. y Waliszewski, K. 2005. "Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en proceso extractivos". Universidad y Ciencia, diciembre, vol. 25, número 042, Villahermosa, México.
35. Palma Pretratada. Revista Alimentica. No. 6 Facultad de Ciencias Naturales. Programa de Ingeniería de Alimentos. Bogotá, Colombia.
36. Pabon, I. y Ospina L. 2009. "Revisión del estado del arte de la tecnología de explosión a vapor y planteamiento de una estrategia de experimentación al interior del grupo de bioprocesos y flujos reactivos de la Universidad Nacional de Colombia". Facultad de Minas. Medellín-Colombia.
37. Palacios, A. 2007. "Utilización de residuos agroindustriales de la costa en la obtención de setas *Pleurotus ostreatus* var. *florida* y *Pleurotus pulmonarius* var. *florida*". Tesis Ing, Alim. Universidad Técnica de Ambato-FCIAL, Ecuador. 101p.
38. Pérez, R. 2005. "Cultivo y selección de cepas *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y

evaluación de su producción”. Disponible en:
<http://redalyc.uaemex.mx>.

39. Ponce, A. (2009) “La Fermentación Del Vino. La Química Entre Dos”.
Disponible en: <http://www.articuloz.com/>.
40. Ponce, T. y Pérez O. 2002. “Celulasas y xilanasas en la industria”.
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav. México,
D.F. Disponible en: <http://www.cinvestav.mx>.
41. Ramírez, I. y Urrego, F. 2005, “Producción de celulasas a partir del
hongo *Trichoderma sp* y aprovechamiento de la fibra prensada de
palma como medio de cultivo”. X Semestre, Ingeniería en alimentos.
Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. Disponible en
<http://www.utadeo.edu.com>.
42. Revista Procesos, “Panorama de los Biocombustibles en Colombia”.
Disponible en www.eafit.edu.com.
43. Rodríguez, I. y Piñeros, Y. 2007. “Producción de complejos
enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de
Trichoderma sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como
sustrato”. Grupo de Aprovechamiento de Recursos Agroalimentarios.
Programa Ingeniería de Alimentos. Universidad Jorge Tadeo Lozano.
Bogotá, Colombia.
44. Romano, S.; González E. y Laborde, M. 2005. “Combustibles
Alternativos”. Red CYTED. Nuevas Tecnologías para la obtención de
Biocombustibles. Ediciones Cooperativas. Buenos Aires, Argentina.
45. Romero, M.; Moya, M.; Cara, C.; Ruiz, E. y Castro, E. 2009. “La poda
del Olivar como fuente de energía renovable: obtención de
biocombustible”. Universidad de Jaén, I Congreso de Cultura del olivo.
46. Ruegg, M. y Tauke, S. 2004, “Actividad de la celulasas de hongos
aislados de suelos de la Estación Ecológica de Juréia-Itatins, Sao
Paulo, Brasil”. Universidad Estatal Paulista, Centro de Estudios
Ambientales. Journal of Botany, Rev. Bras. Bot. Vol 27 no. 2, Sao
Paulo, Brasil.

47. Sánchez, O. y Cardona, C., 2005, "Producción biotecnológica de alcohol carburantel: Obtención a partir de diferentes materias primas" Rev. INTERCIENCIA, Noviembre, Vol 30 No. 11, Colombia.
48. Stutzenberger, F.; Kaufman A. y Lossin, R. 1970. "Cellulotic activity in municipal solid waste composting". Canadian Journal of Microbiology.
49. Terán, M. 1984 "Obtención de celulasas del *Thielavia terrestres* y su utilización para la hidrólisis de subproductos celulósicos". Tesis de Ingeniería Química, EPN, 14pp.
50. Rodríguez, I. y Piñeros, Y. 2007. "Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato". Programa Ingeniería de Alimentos. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.com>
51. Romano D.; González E. y Laborde M. 2005. "Combustibles alternativos". 1ra ed., Ediciones Cooperativas, Buenos Aires, Argentina, 186 pp.
52. Staments, P. y Chilton, J.S. 1983, "The mushroom cultivator", Agarikon Press, Olympia, Washington.
53. Truss de Vrije, *et al*, 2009. "Efficiente hydrogen producción from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosuruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*". Biotechnology for Biofuels. Disponible en: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com>.
54. Velázquez, B. 2010. Curso: "Procesos de Producción de Biomasa Agrícola y Forestal para Uso Energético y sus Implicaciones Logísticas", Ambato, Ecuador.
55. Viswanathan, K.; Kadirlev, R.; Chandrasekaran, D. 1989. "Nutritive value of banana stalk (*Musa cavendish*) as a feed for sheep". Animal Feed Science and Technology. 22(4):327-332p. Países Bajos.

56. Vilches, L. 2002. "Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huela y Hueraz". Lima, Perú. Disponible en: <http://www.cybertesis.edu.pe>.
57. Werner Bessa Vieira; Leonora Ríos Moreira de Souza, Amadeu Monteiro Neto y Edivaldo Ferreira Filho Jiménez. 2007. Revista de Microbiología, Vol.38 no.2, abril / junio. São Paulo, Brasil.
58. Wiseman, A. 19991, "Manual de Biotecnología de los enzimas", Editorial Acibia, S.A. Zaragoza, España. 61p.
59. Yapura, P.; Lacoste, C.; Casanovas, M. y Patrouilleau, R. 2006. "Perspectivas de los biocombustibles en argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica, informe final". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Disponible en <http://www.inta.gov.ar>.
60. Yazdi, M.T.; Woodward, J.R. & Radford, A. 1990. "The cellulase complex of Neurospora crassa activity, stability and release", Journal of General Microbiology. 136, 1313-1319p.
61. <http://es.wikipedia.org>
62. <http://www.scribd.com>, "Microorganismos productores de celulasas Aislados de camélidos sudamericanos para la producción de etanol"
63. <http://www.miliarium.com>. Bioetanol
64. <http://www.infoagro.com>
65. <http://www.bioscripts.net>

ANEXOS

ANEXO A

RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Tabla 1. Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos del cultivo de banano en base seca

Residuo de banano	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Hojas	8,50	36,60	27,39
Pseudotallo	5,20	35,30	24,90
Raquis	9,85	30,60	15,70

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 2. Valores experimentales del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos del cultivo de banano en base seca luego del tratamiento alcalino

Residuo de banano	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Hojas	9,49	41,07	26,01
Pseudotallo	8,16	59,68	25,43
Raquis	10,23	49,52	29,52

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 3. Verificación de la presencia de crecimiento micelial mediante inspección visual, en los distintos tratamientos, luego de 24 días de fermentación sólida

Tratamientos			Presencia de crecimiento micelial
Codificación	Sustrato-Cepa		
T1	a ₀ b ₀	Hojas- <i>Pleurotus ostreatus</i>	SI
T2	a ₀ b ₁	Hojas- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	SI
T3	a ₀ b ₂	Hojas- <i>Lentinula edodes</i>	NO
T4	a ₁ b ₀	Pseudotallo- <i>Pleurotus ostreatus</i>	SI
T5	a ₁ b ₁	Pseudotallo- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	SI
T6	a ₁ b ₂	Pseudotallo- <i>Lentinula edodes</i>	SI
T7	a ₂ b ₀	Raquis- <i>Pleurotus ostreatus</i>	NO
T8	a ₂ b ₁	Raquis- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	NO
T9	a ₂ b ₂	Raquis- <i>Lentinula edodes</i>	NO

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 4. Valores experimentales de la concentración de azúcares reductores (g de glucosa/50 ml de *mezcla reactiva) formados durante la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) por la acción de las enzimas celulasas obtenidas de los distintos tratamientos

Tratamientos		Sustrato-Cepa	Concentración de azúcares reductores (g de glucosa/50 ml de *hidrolizado)			
			R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
T1	a ₀ b ₀	Hojas- <i>Pleurotus ostreatus</i>	0,023	0,040	0,045	0,036
T2	a ₀ b ₁	Hojas- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,050	0,028	0,019	0,032
T3	a ₀ b ₂	Hojas- <i>Lentinula edodes</i>	-	-	-	-
T4	a ₁ b ₀	Pseudotallo- <i>Pleurotus ostreatus</i>	0,175	0,167	0,143	0,162
T5	a ₁ b ₁	Pseudotallo- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,161	0,149	0,155	0,155
T6	a ₁ b ₂	Pseudotallo- <i>Lentinula edodes</i>	0,170	0,183	0,237	0,176
T7	a ₂ b ₀	Raquis- <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	-	-
T8	a ₂ b ₁	Raquis- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	-	-	-	-
T9	a ₂ b ₂	Raquis- <i>Lentinula edodes</i>	-	-	-	-

* 45ml de CMC+5 ml de extracto enzimas celulasas obtenidas, hidrolizadas en baño termostático a 50°C.

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 5. Promedios de los valores de actividad de las enzimas celulasas (UI/g de materia seca), calculadas.

Tratamientos			Vol. promedio Extracto enzimático obtenido (ml)	R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
T1	a ₀ b ₀	Hojas- <i>Pleurotus ostreatus</i>	36±2,31	1,27	2,15	2,47	1,96
T2	a ₀ b ₁	Hojas- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	35,7±0,58	2,62	1,59	1,12	1,78
T3	a ₀ b ₂	Hojas- <i>Lentinula edodes</i>	-	-	-	-	-
T4	a ₁ b ₀	Pseudotallo- <i>Pleurotus ostreatus</i>	25,3±2,31	6,48	6,19	6,18	6,28
T5	a ₁ b ₁	Pseudotallo- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	27,0±0,00	6,72	6,22	6,47	6,47
T6	a ₁ b ₂	Pseudotallo- <i>Lentinula edodes</i>	29,0±3,77	7,45	8,9	8,06	8,14
T7	a ₂ b ₀	Raquis- <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-	-	-	-
T8	a ₂ b ₁	Raquis- <i>Pleurotus pulmonarius</i>	-	-	-	-	-
T9	a ₂ b ₂	Raquis- <i>Lentinula edodes</i>	-	-	-	-	-

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 6. Actividad de las enzimas celulasas (UI/g de materia seca) obtenidas a distintas temperaturas y tiempos

Tiempo de hidrólisis (horas)	37°C			50°C			60°C		
	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	8,46	7,89	8,18	12,42	12,21	12,31	4,32	5,68	5,00
2	8,69	9,66	9,17	13,72	12,96	13,34	4,32	5,37	4,85
3	10,59	9,95	10,27	14,37	14,96	14,66	3,86	5,52	4,69
4	9,22	9,02	9,12	13,40	14,37	13,88	4,32	5,64	4,98
5	8,88	10,26	9,57	15,12	14,58	14,85	4,32	4,68	4,50
6	9,12	9,07	9,10	14,48	14,48	14,48	3,94	5,51	4,72

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 7. Actividad de celulasas (UI/g de materia seca) obtenidas a distintos pHs de reacción

pH	R₁	R₂	Promedio
4	11,09	11,23	11,16
4,5	9,80	9,74	9,77
5	9,01	9,63	9,32
5,3	24,42	24,78	24,60
5,5	11,39	11,23	11,31
6	9,01	9,97	9,49
7	9,36	9,47	9,41

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 8. Variación de los sólidos solubles (°Brix) durante las 48 horas de hidrólisis enzimática del material celulósico pretratado

Tipo de residuo	Sólidos solubles				
	(°Brix)				
	0	12	24	36	48
	(horas)	(horas)	(horas)	(horas)	(horas)
Hojas	6,0	5,0	3,0	2,6	2,0
Pseudotallo	6,0	5,4	3,0	2,8	2,2
Raquis	6,0	5,2	3,0	2,8	2,2

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 9. Variación de los sólidos solubles (°Brix) registrados durante los nueve días de fermentación alcohólica.

Tiempo de fermentación (días)	Sólidos solubles (°Brix)		
	Hojas	Pseudotallo	Raquis
0	6,0	6,0	6,0
2	4,2	4,5	4,2
5	4,0	4,0	4,0
7	2,2	2,2	2,2
8	2,2	2,0	2,2
9	2,0	2,0	2,2

Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 10. Cantidad de etanol obtenido a partir de 100 g de residuos de banano

Tipo de residuo	Residuos secos sometidos al pretratamiento	Vol. del líquido obtenido después de la hidrólisis con enzimas celulasas y la concentración a 6 °Brix	Grado alcohólico del líquido fermentado	Relación volumen de etanol puro por 100 g de residuo seco
	g	ml	°GL	ml etanol/100 g residuo
Hojas	100	850	2,24	19,04
Pseudotallo	100	933	2,24	20,89
Raquis	100	822	3,25	26,71

Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Tabla 11. Cantidad de etanol obtenible a partir de residuos del cultivo de banano

Residuo	Humedad (%)	Sólidos secos (%)	ml etanol producido por 100 g residuo	L de etanol/ t residuo fresco	L de etanol/t de residuo seco
Hojas	79,46	20,54	19,04	39,10	190,40
Pseudotallo	91,20	8,80	20,89	18,38	208,90
Raquis	89,43	10,57	26,71	28,23	267,10

Fuente: Proyecto "Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano"

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 12. Análisis de varianza para la actividad de las enzimas celulasas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculado	p-value
EFFECTOS					
PRINCIPALES					
A : Residuos	248,167	2	124,084	628,26	0,0000
B : Cepas	0,00806667	2	0,00403333	0,02	0,9798
C: Replicas	0,0326	2	0,0163	0,08	0,9212
Interacción					
AB	13,2855	4	3,32137	16,82	0,0000
ERROR	3,16007	16	0,197504		
TOTAL	264,654	26			

Tabla 13. Análisis de Tukey para el factor A (residuos): Valores experimentales de actividad de las enzimas de celulasas (UI/g de materia seca)

Method: 95,0 percent Tukey HSD		
Sustrato	Promedios	Grupos Homogéneos
Raquis de banano	0,0	c
Hojas de banano	1,24667	b
Pseudotallo de banano	6,96333	a

Tabla 14. Prueba de Tukey: Efecto de la Interacción AxB: Valores experimentales de actividad de las enzimas celulasas (UI/g de materia seca)

Cuadrados Medios del Error = 0,19750

Grados de Libertad del Error = 16

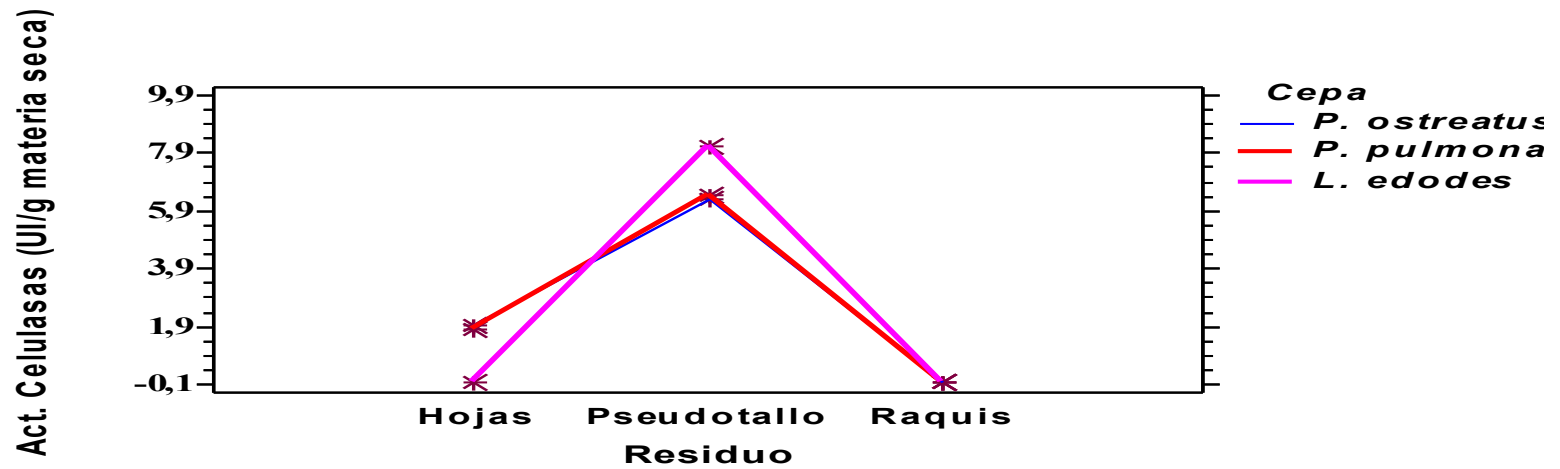
Nº de observaciones para el cálculo de la Media = 3

Prueba de Diferencia Significativa de Tukey

$s_{\bar{y}} = 0,2566$ $\alpha = 0,050$

ORDEN ORIGINAL				ORDEN ARREGLADO			
Tratamiento	$a_0b_0 =$	1,960	C	Tratamiento	$a_1b_2 =$	8,140	A
Tratamiento	$a_0b_1 =$	1,780	C	Tratamiento	$a_1b_1 =$	6,470	B
Tratamiento	$a_0b_2 =$	0,000	D	Tratamiento	$a_1b_0 =$	6,280	B
Tratamiento	$a_1b_0 =$	6,280	B	Tratamiento	$a_0b_0 =$	1,960	C
Tratamiento	$a_1b_1 =$	6,470	B	Tratamiento	$a_0b_1 =$	1,780	C
Tratamiento	$a_1b_2 =$	8,140	A	Tratamiento	$a_0b_2 =$	0,000	D
Tratamiento	$a_2b_0 =$	0,000	D	Tratamiento	$a_2b_0 =$	0,000	D
Tratamiento	$a_2b_1 =$	0,000	D	Tratamiento	$a_2b_1 =$	0,000	D
Tratamiento	$a_2b_2 =$	0,000	D	Tratamiento	$a_2b_2 =$	0,000	D

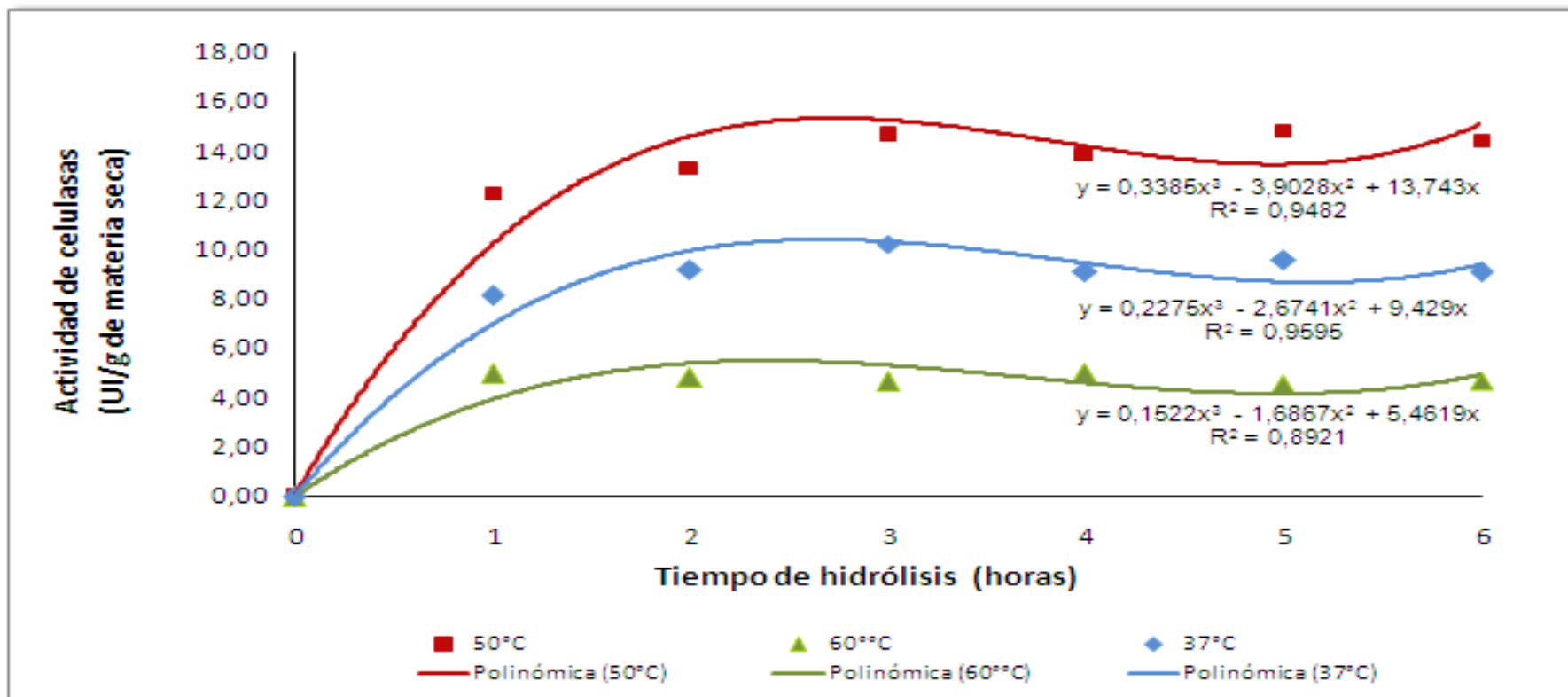
Gráfico 4. Representación gráfica del análisis estadístico de la interacción de los residuos del cultivo de banano y cepas de hongos en función de la actividad enzimática.



ANEXO C

GRÁFICAS DE LAS RESPUESTAS EXPERIMENTALES

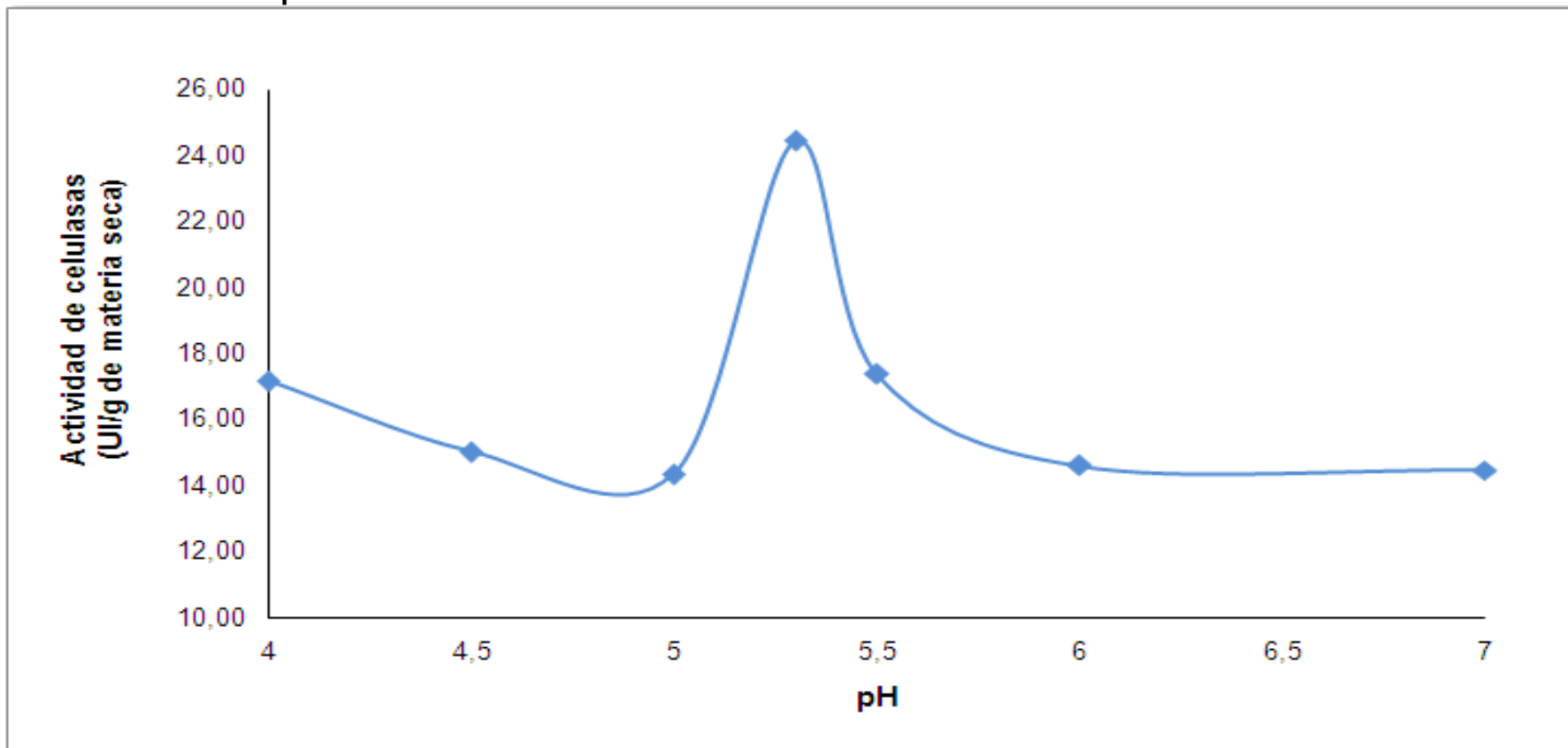
Gráfico 5. Efecto de la temperatura y tiempo en la actividad de las celulasas (UI/g de materia seca)



Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina”

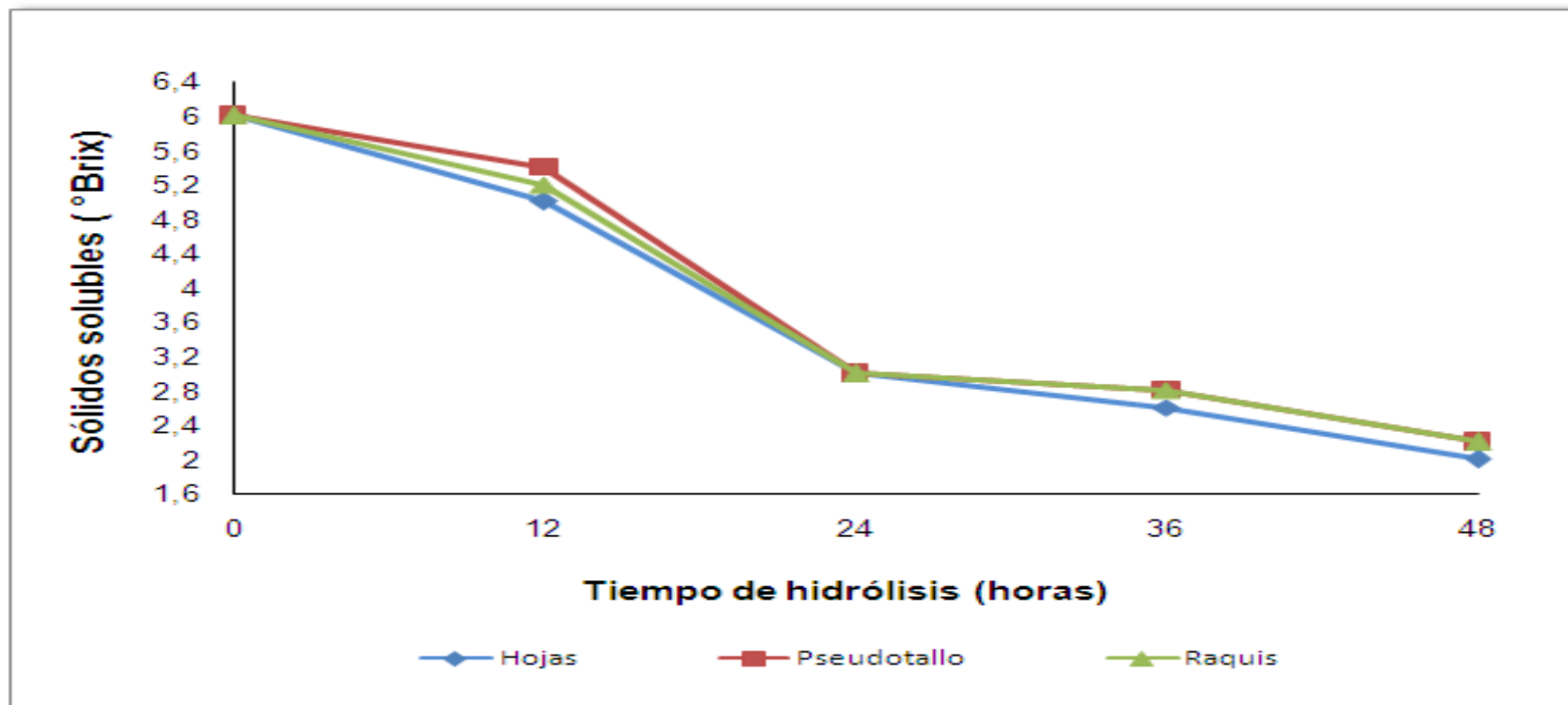
Gráfico 6. Efecto del pH en la acción de las enzimas celulasas obtenidas



Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

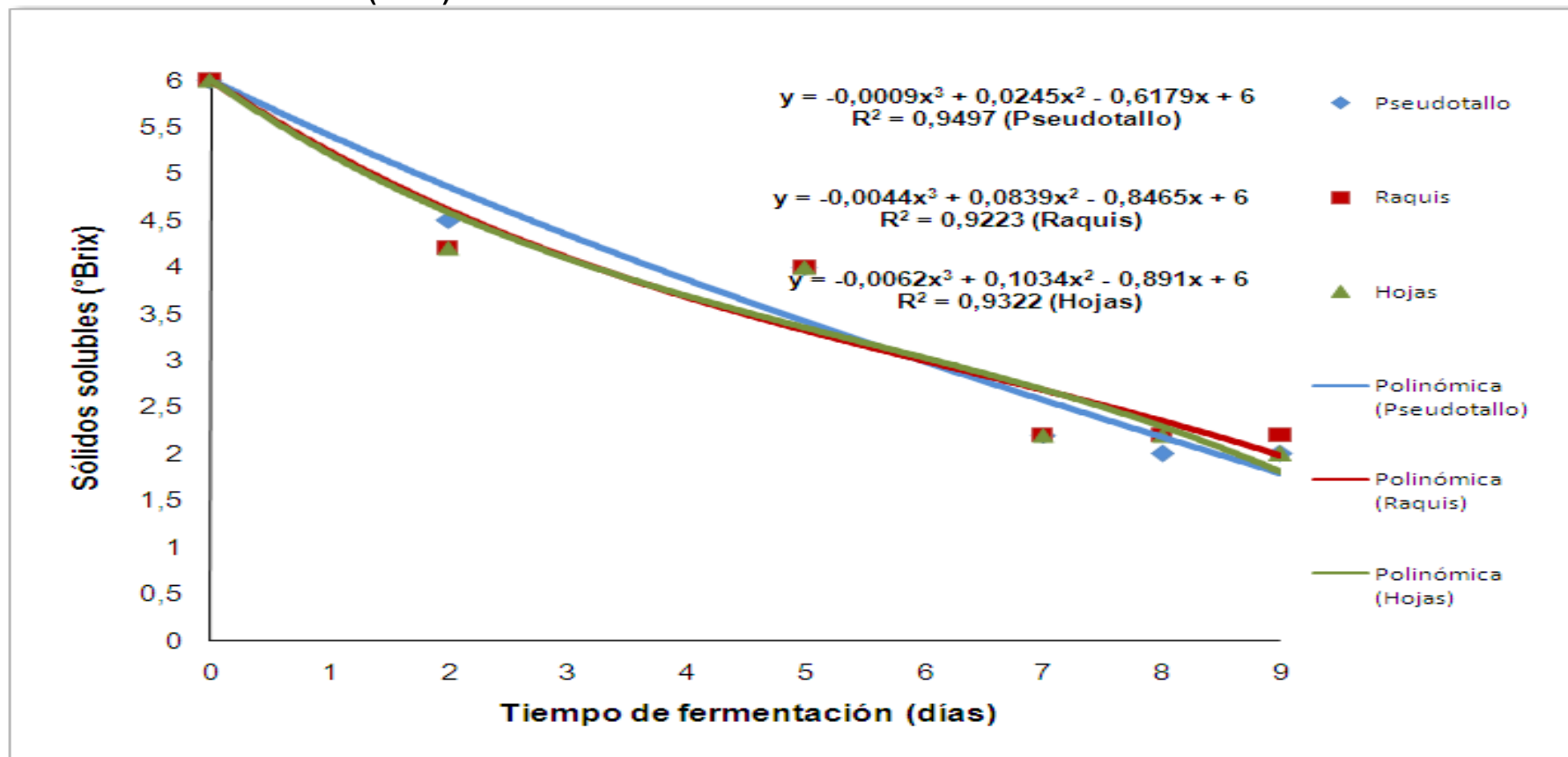
Gráfico 7. Sólidos solubles (°Brix) durante la hidrólisis enzimática de los compuestos celulósicos



Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Gráfico 8. Sólidos solubles (°Brix) durante los nueve días de fermentación alcohólica



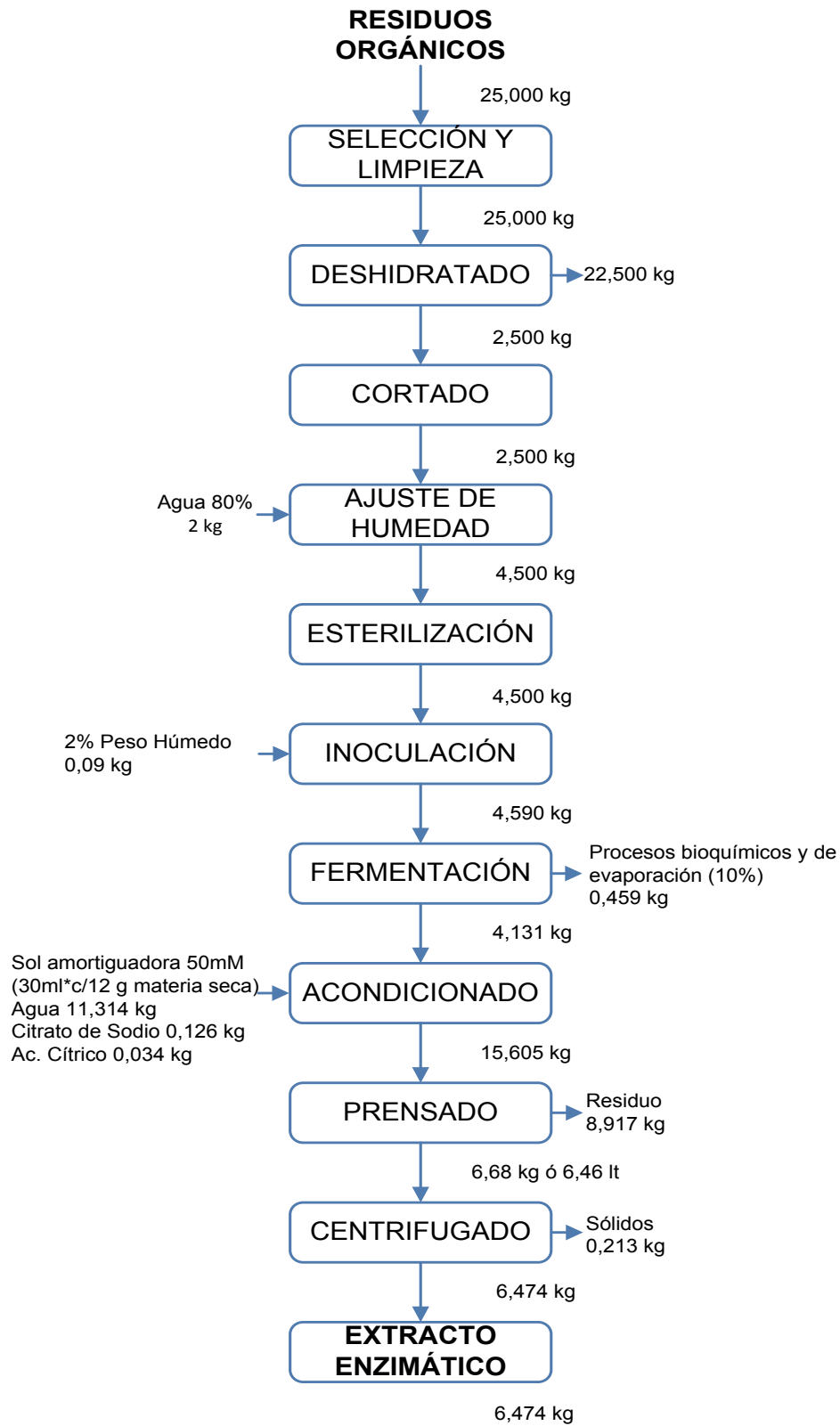
Fuente: Proyecto “Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos, para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo del banano”

Elaborado por: Daysi Paredes Medina

ANEXO D

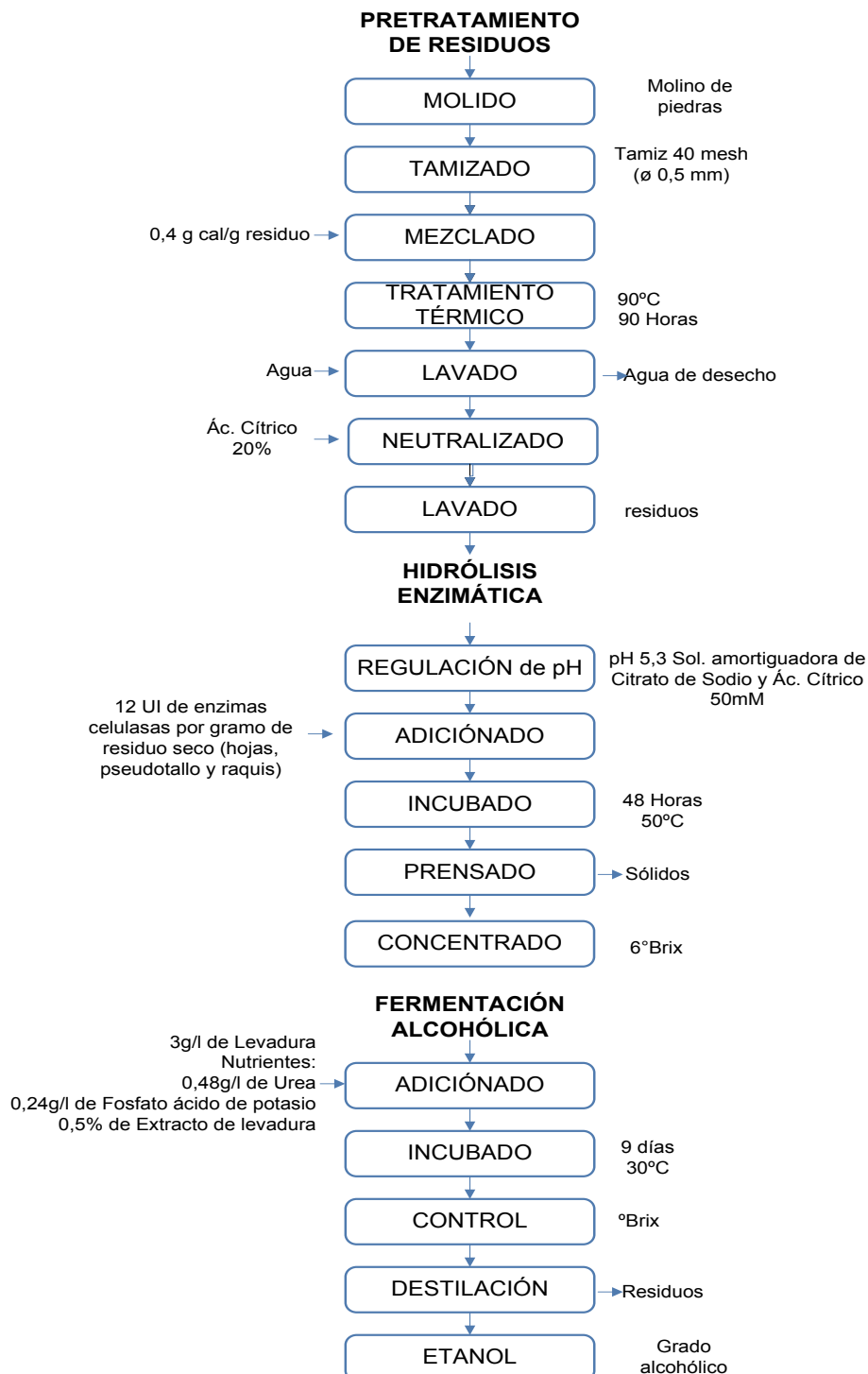
DIAGRAMAS

Gráfico 9. Balance de materia de la obtención de enzimas celulasas



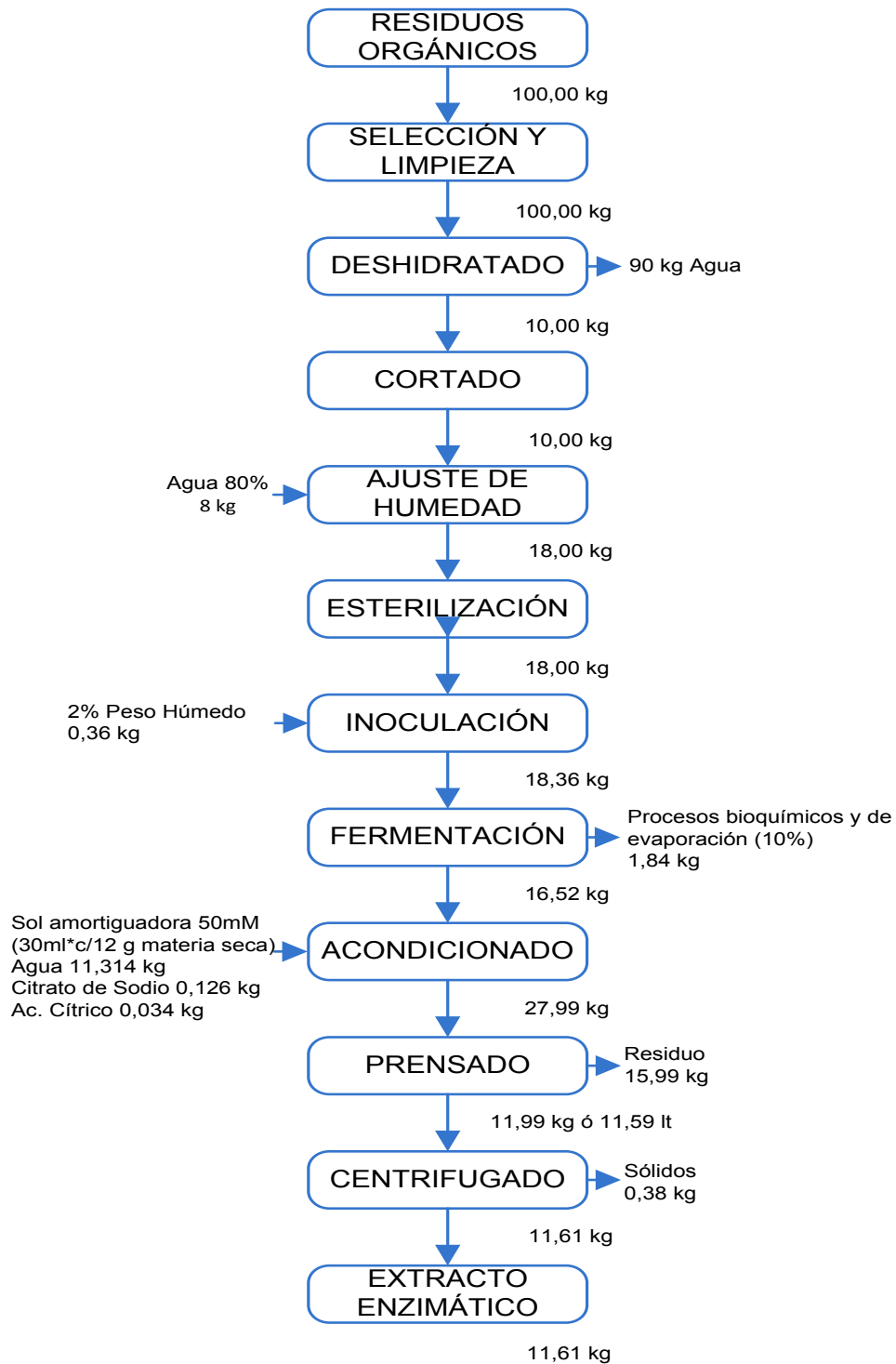
Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Gráfico 10: Diagrama de flujo para la obtención bioetanol utilizando los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)



Elaborado por: Daysi Paredes Medina

Gráfico 11. Balance de materia de la obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*)

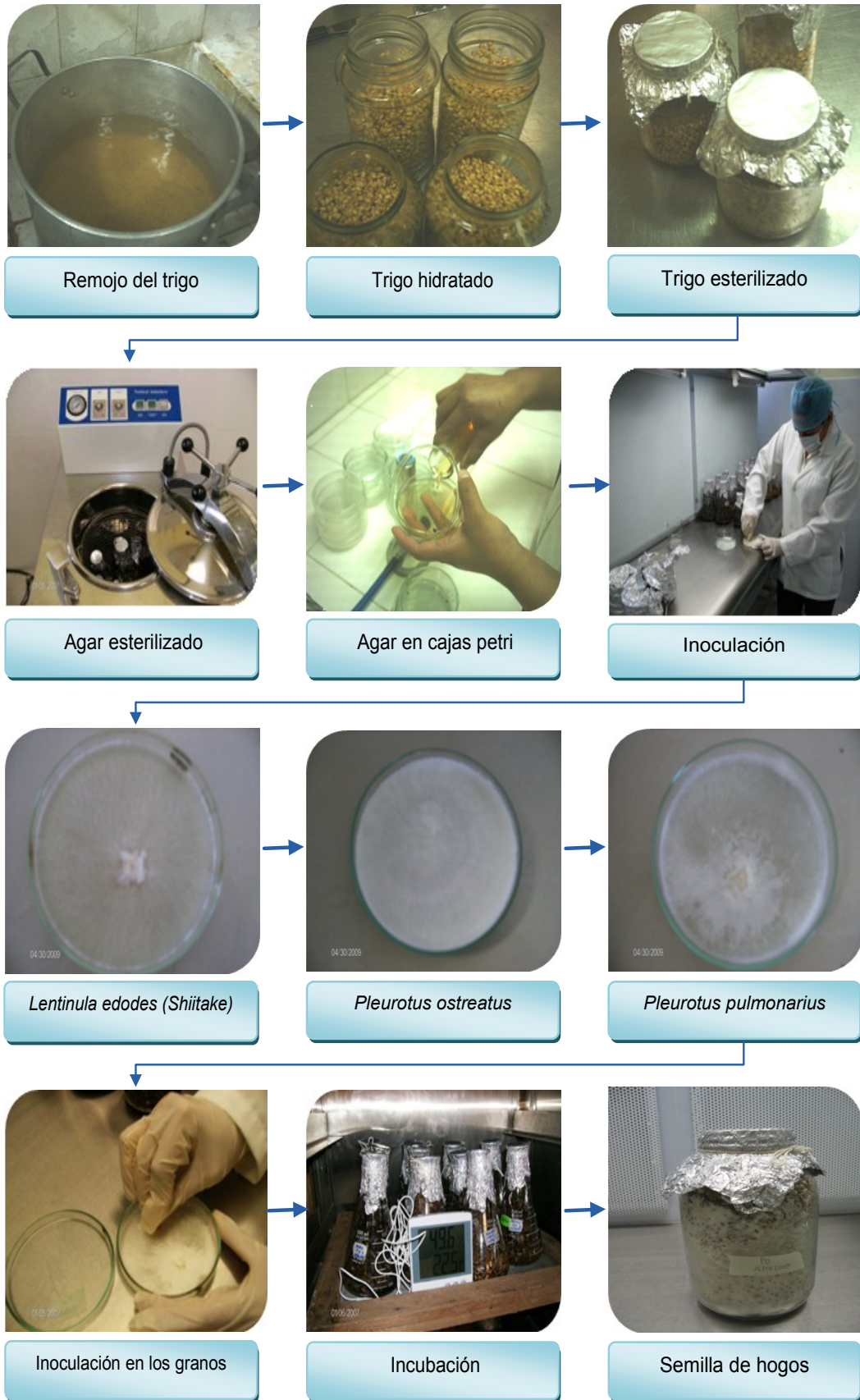


Elaborado por: Daysi Paredes Medina

ANEXO E

FOTOGRAFÍAS

ANEXO E1. Preparación del inóculo o semilla



ANEXO E2. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*), utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)





Extracto enzimático

ANEXO E3. Hidrólisis de la celulosa presente en los residuos de banano pretratados



Extracto enzimático
Residuo pretratado



Extracto enzimático



Regulación de pH



Adición de extracto enzimático obtenido



Incubación



Prensado-filtrado (azúcares fermentables)

ANEXO E4. Pretratamiento alcalino

Preparación de los residuos



Cortado



Molido



Tamizado

Pretratamiento alcalino



Adición de extracto enzimático obtenido



Tratamiento térmico



Lavado



Escurreido



Acondicionado



Residuo pre-tratado

ANEXO E5. Determinación de azúcares reductores



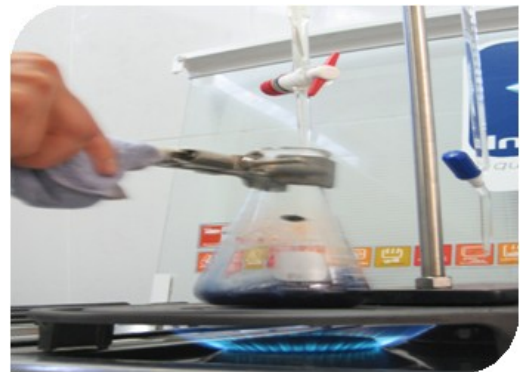
Preparación de soluciones



Adición enzima al sustrato (baño termostático)



Inactivación de la enzima



Titulación (cambio de coloración)



ANEXO E6. Análisis químico de los residuos del cultivo de banano.

Preparación de los residuos del cultivo de banano



Cortado



Molido



Tamizado

Extracción de solubles

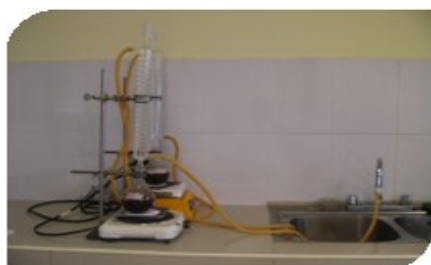


Extrac. equipo soxhlet



Secado de muestras

Determinación de lignina



Equipo de reflujo



Filtrado

Determinación de celulosa



Equipo de reflujo



Filtrado



Secado de muestras

ANEXO E7. Proceso de obtención de bioalcohol



Fermentado



Control de °Brix



Destilado



Etanol



Medición grado alcohólico