

OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR MEDIO DE FERMENTACIÓN
SÓLIDA A PARTIR DE CÁSCARAS DE PIÑA

CARLOS ANDRÉS GARAY HERNÁNDEZ
NATALIA PEÑA PEÑA

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2018

OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR MEDIO DE FERMENTACIÓN
SÓLIDA A PARTIR DE CÁSCARAS DE PIÑA

CARLOS ANDRÉS GARAY HERNÁNDEZ
NATALIA PEÑA PEÑA

Proyecto integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
MARTHA LUCIA MALAGÓN MICÁN
Ingeniera Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D, C
2018

Nota de Aceptación (dirección de investigación)

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá D.C., agosto de 2018

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director de Investigaciones

Ing. ARMANDO FERNÁNDEZ CÁRDENAS

Director del Departamento de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

En primer lugar quiero dedicarle este logro a Dios y agradecerle por todas las bendiciones que me ha regalado a lo largo de mi vida, por cada una de las experiencias las cuales me han llenado de felicidad, fortaleza, aprendizajes y fe para seguir afrontado los nuevos retos.

A mis padres por su amor incondicional con el cual me han apoyado a lo largo de toda mi vida, por el tiempo que me han dedicado con el objetivo de formar la persona que soy en este momento, por estar a mi lado afrontando cada uno de los tropiezos que se han presentado, por sus consejos llenos de sabiduría la cual me ha servido de inspiración para culminar esta gran etapa de mi vida.

A mi hermano mayor por ser mi compañero incondicional, por sus grandes enseñanzas llenas de sabiduría, por ser esa persona que se ha preocupado en enseñarme numerosas cosas que he aplicado a lo largo de mi vida, trasmitirme esa pasión con la que realiza sus labores entregando todo lo posible y un poco más para hacer lo mejor en cada ocasión.

A mi negra, mi hermana menor por ser una persona que me llena de amor día a día y me da fuerzas en los momentos de tristeza y cansancio y me acompaña en los momentos de alegría y en mis triunfos, tu inteligencia también hace parte de las cosas que me llenan de inspiración junto con tu dedicación.

A mi hermana mayor por ser un ejemplo de valentía y de fortaleza frente a los obstáculos más difíciles y demostrarme que todo es posible si uno se lo propone.

A mi novia, mi amiga, mi confidente y mi gran compañera de tesis, por cada uno de esos bellos momentos de alegría que hemos compartido y por esas bellas discusiones que nos hacen mejores persona, mejor pareja y me enseña cosas útiles para la vida, por esa sonrisa que me da fuerzas en los momentos difíciles y por esa mirada preciosa de aliento cuando las cosas no van bien.

A la familia de mi novia que nos acompañó en los buenos y malos momentos brindándonos una mano o mejor dicho seis manos de apoyo con el objetivo de que todo nos saliera excelente.

Carlos Andrés Garay Hernández

DEDICATORIA

A Dios por haber permitido la culminación de este proyecto, por darme fuerzas para seguir adelante y enfrentar los problemas que se presentaron.

A mí amada piti, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional e inquebrantable apoyo, por su paciencia, sus sabios consejos y todo su amor. Todo en mi vida es y ha sido posible gracias a ti.

A mi madre por todos sus sacrificios, desvelos que han hecho posible que yo pueda culminar mis metas.

A Isabel por su paciencia, infinito amor y siempre estar ahí brindándome todo su apoyo.

A mi Carqui, mi compañero inseparable en cada jornada de trabajo y estudio, mi dulce, paciente e incondicional novio y mejor amigo.

Natalia Peña Peña

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación Universidad de América por haber sido nuestro segundo hogar durante estos años y la institución que nos formó, profesional y humanamente.

Al semillero de investigación BIOTECFUA y a nuestra directora por permitirnos llevar a cabo esta investigación.

A la profesora Adriana Páez por su inmensa generosidad, tiempo, paciencia, y conocimiento destinado a la realización de este proyecto y sobre todo por su valioso apoyo y dedicación cuando se nos presentaron contratiempos.

A nuestros amigos por su apoyo moral y sus consejos durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	22
OBJETIVOS	23
1. GENERALIDADES	24
1.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	24
1.1.1 Composición estructural de la lignocelulosa	24
1.1.2 Composición secundaria de la lignocelulosa	26
1.2 PRETRATAMIENTO LIGNOCELULÓSICO	26
1.2.1 Pretratamiento físico	27
1.2.2 Pretratamiento químico	27
1.2.3 Pretratamiento microbiológico	27
1.3 MÉTODOS DE HIDRÓLISIS Y APLICACIONES	29
1.3.1 Hidrólisis ácida	29
1.3.2 Hidrólisis enzimática	30
1.4 FERMENTACIÓN SÓLIDA	32
1.5 BIORREACTOR	35
1.5.1 Biorreactor discontinuo o batch	36
1.5.2 Biorreactor semicontinuo	36
1.5.3 Biorreactor continuo	36
1.5.5 Biorreactor de tambor rotatorio	37
1.6 TRICHODERMA RESEEI	38
1.6.1 Principales factores que influyen en el crecimiento de <i>Trichoderma reesei</i>	39
1.7 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS	40
1.8 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	41
1.8.1 Método del DNS	41
1.9 PIÑA (<i>ANANAS COMOSUS</i>)	42
1.9.1 Variedades	43
1.9.2 Residuos utilizados	45
1.9.3 Composición química	45
1.10 PRODUCCIÓN DE PIÑA EN COLOMBIA	46
2. SELECCIÓN DE MUESTRA DE PIÑA	48
2.1 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN	48

2.1.1	Requisitos de madurez	48
3.	METODOLOGÍA	51
3.1	OBTENCIÓN DE RESIDUOS Y MUESTREO	51
3.1.1	Proceso de obtención	51
3.2	PRETRATAMIENTO FÍSICO	52
3.2.1	Secado	52
3.2.2	Molienda y tamizado	52
3.3	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	53
3.3.1	Determinación de humedad	53
3.3.2	Determinación de extraíbles	54
3.3.3	Porcentaje de lignina	54
3.3.4	Determinación de holocelulosa	56
3.3.5	Determinación de celulosa y hemicelulosa	56
3.4	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS	57
3.5	HIDRÓLISIS MICROBIOLÓGICA	58
3.6	ADECUACIÓN DE LA MUESTRA HIDROLIZADA	59
3.7	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	60
3.7.1	Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico	60
3.7.2	Curva de calibración método DNS	60
3.7.3	Cuantificación de azúcares	60
3.8	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CELULASAS TOTALES	61
4.	PRE DISEÑO DEL BIORREACTOR ROTATORIO	63
4.1	SELECCIÓN DEL BIORREACTOR	63
4.2	SELECCIÓN DE MATERIAL	65
4.2.1	Tambor rotatorio	65
4.2.2	Estructura rotatoria	66
4.3	SISTEMA DE AGITACIÓN	66
4.4	SISTEMA DE CONTROL DE LA TEMPERATURA	67
4.5	AIREACIÓN	67
4.6	GEOMETRÍA	68
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	71
5.1	PROCESO DE OBTENCIÓN	71
5.2	PRETRATAMIENTO FÍSICO	72
5.2.1	Secado	72
5.2.2	Molienda y tamizado	72

5.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	74
5.3.1 Porcentaje de humedad	74
5.3.2 Determinación de extraíbles	75
5.3.3 Determinación de contenido de lignina	76
5.3.4 Determinación de holocelulosa	77
5.3.5 Determinación de porcentaje de celulosa	78
5.3.6 Determinación de porcentaje de hemicelulosa	78
5.4 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS	81
5.5 HIDRÓLISIS MICROBIOLÓGICA	83
5.6 ADECUACIÓN DE LA MUESTRA HIDROLIZADA	88
5.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	89
5.8 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CELULASAS TOTALES	90
6. CONCLUSIONES	94
7. RECOMENDACIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXOS	103

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura de la celulosa.	25
Figura 2. Estructura de hemicelulosa	25
Figura 3. Estructura de la lignina.	26
Figura 4. Mecanismo de pre tratamiento lignocelulósico.	28
Figura 5. Hidrólisis enzimática	31
Figura 6. Vista microscópica de <i>Trichoderma reesei</i>	39
Figura 7. Cuadriculas de la cámara de Neubauer.	41
Figura 8. Reacción entre DNS y azúcares.	42
Figura 9. Piña Cayena Lisa	43
Figura 10. Piña perolera.	44
Figura 11. Piña manzana	44
Figura 12. Piña Gold MD2	45
Figura 13. Cultivos frutales en Colombia.	47
Figura 14. Tabla de color de maduración de la piña.	49
Figura 15. P&ID montaje de biorreactor	63
Figura 16. Biorreactor sin aireación forzada	67
Figura 17. Biorreactor con aireación forzada	67
Figura 18. Volumen ocupado por el lecho	68
Figura 19. Recuento de concentración celular	82

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Morfología de <i>Trichoderma reesei</i>	39
Imagen 2. Centro de acopio Corabastos	71
Imagen 3. Cáscaras recolectadas	71
Imagen 4. Cáscaras seleccionadas	71
Imagen 5. Cáscaras de piña golden	72
Imagen 6. Cáscaras de piña cortadas	72
Imagen 7. Molino de martillos	73
Imagen 8. Montaje del sistema vibratorio	73
Imagen 9. Cáscara de piña desecada	75
Imagen 10. Montaje soxhlet	75
Imagen 11. Determinación de lignina insoluble en ácido.	76
Imagen 12. Determinación de holocelulosa	77
Imagen 13. Celulosa obtenida	78
Imagen 14. Conteo celular por medio de cámara de Neubauer	81
Imagen 15. Proceso de hidrólisis dos días después de inocularlo	85
Imagen 16. Proceso de hidrólisis cuatro días después de inocularlo	85
Imagen 17. Proceso de hidrólisis seis días después de inocularlo	85
Imagen 18. Montaje de la boquilla de 3/4 a 1/2 en el biorreactor	86
Imagen 19. Crecimiento luego de dos días con aireación libre	86
Imagen 20. Crecimiento luego de dos días con aireación forzada	86
Imagen 21. Crecimiento luego de diez días de inoculación sin aireación forzada	87
Imagen 22. Crecimiento luego de diez días con aireación forzada	87
Imagen 23. Crecimiento luego de veinte días con aireación libre	87
Imagen 24. Crecimiento luego de veinte días con aireación forzada	87
Imagen 25. 10g de sustrato hidrolizado suspendido en 100mL de agua destilada	88

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de las cáscaras de piña variedad MD2	46
Tabla 2. Importancia de los criterios de selección	64
Tabla 3. Valoración para las alternativas del biorreactor.	64
Tabla 4. Masa obtenida en el proceso de tamizado	74
Tabla 5. Caracterización química de las cáscaras de piña	79
Tabla 6. Composición de algunos residuos	80
Tabla 7. Datos de curva de calibración	89
Tabla 8. Concentración de azúcares reductores	89
Tabla 9. Sobrenadante con aireación forzada	91
Tabla 10. Sobrenadante sin aireación forzada	91
Tabla 11. Sustrato con aireación forzada	92
Tabla 12. Sustrato sin aireación forzada	93

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Determinación de porcentaje de humedad	53
Ecuación 2. Determinación de porcentaje de extraíbles.	54
Ecuación 3. Porcentaje de lignina soluble en ácido.	55
Ecuación 4. Contenido de sólidos de la muestra de biomasa.	56
Ecuación 5. Porcentaje de holocelulosa.	56
Ecuación 6. Porcentaje de celulosa.	57
Ecuación 7. Porcentaje de hemicelulosa.	57
Ecuación 8. Concentración celular.	58
Ecuación 9. Concentración celular en caso de dilución.	58
Ecuación 10. Volumen del lecho ocupado	69
Ecuación 11. Altura del lecho ocupado	69
Ecuación 12. Volumen de un cilindro	70
Ecuación 13. Porcentaje de humedad	83

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Volúmenes de piña por departamento en Colombia	47
Gráfico 2. Resultado gráfico de análisis multicriterio	65
Gráfico 3. Curva de calibración	89
Gráfico 4. Actividad enzimática sobrenadante con aireación forzada	91
Gráfico 5. Actividad enzimática de sobrenadante sin aireación forzada	92
Gráfico 6. Actividad enzimática de sustrato con aireación forzada	92
Gráfico 7. Actividad enzimática de sustrato sin aireación forzada	93

LISTA DE CONVENCIONES

FES: Fermentación en Estado Solido
A_w: Actividad de agua
SSF: Solid State Fermentation
pH: Potencial de hidrogeno
°C: Grados Celsius
nm: Nanómetros
µm: Micrómetros
mm: Milímetros
cm: Centímetros
mg: Miligramos
g: Gramos
Kg: Kilogramos
NTC: Norma Técnica Colombiana
°Bx: Grados Brix
rpm: Revoluciones por minuto
%(p/p): Porcentaje peso a peso
NaOH: Hidróxido de sodio
Na: Sodio
K: Potasio
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
mL: Mililitros
L: Litros
FP: Papel de filtro o filter paper
FPU: Unidades de papel de filtro o filter paper units
V: Voltios
TC: Controlador de temperatura
atm: Atmosferas
PVC: Poli cloruro de vinilo
V_{apa}: Volumen aparente
ε: Nivel de llenado del tambor
W: Watts
Abs: Absorbancia
min: Minutos
esp: Esporas

GLOSARIO

AZÚCARES REDUCTORES: son hidratos de carbono que contienen grupos aldehído que son oxidados a ácidos carboxílicos por un agente oxidante débil en solución acuosa.¹

BIORREACTOR: es un equipo en el que se realiza un proceso químico catalizado por un organismo o una enzima en el que se deben considerar y controlar los requerimientos nutricionales de los organismos a utilizar.²

CÁMARA DE NEUBAUER: es una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos, en cuyo campo central se ubican dos cuadrículas de recuento que permiten hacer un conteo celular.³

CARACTERIZACIÓN: establecer características de una muestra utilizando técnicas y métodos para determinar propiedades químicas, físicas, grupos funcionales, entre otros.⁴

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: proceso que transforma moléculas de gran tamaño en moléculas fácilmente degradables, rompiendo sus enlaces, mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas en presencia de un medio acuoso.⁵

MÉTODO DNS: es utilizado para la cuantificación de azúcares reductores, haciendo uso de un método espectrofotométrico por la lectura de la absorbancia.⁶

REACTOR DE TAMBOR ROTATORIO: es un reactor que consiste en un cilindro que gira horizontalmente alrededor de su eje, en el cual ingresa aire por una sección en la cabeza del reactor y no a la fuerza a través del lecho del sustrato.⁷

RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS: están compuestos principalmente por tres tipos de biopolímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, envueltos en una compleja estructura.⁸

¹ GUNAWARDENA, Gamini. Reducing Sugar. [Consultado el abril 1, 2018]. Disponible en: <http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/q-r/reducing-sugar/>

² Facultad de Ciencias Químicas Universidad Veracruzana. UNIDAD 2. BIORREACTORES Y SU APLICACIÓN. [Consultado el Abr 14, 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>

³ BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro. En: Neubauer Chamber Cell Counting , Celoromics.

⁴ PECK, Robert y GALE, Paul. Characterization of Organic Compounds. En: Anal. Chem. Ene., vol. 24, no. 1, p. 116-120

⁵ WALKER, L. P. y WILSON, D. B. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview. 1991. p. 3-140960-8524

⁶ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: Analytical Chemistry. Mar 1., vol. 31, no. 3, p. 426-428

⁷ Seepsa. Biorreactor de tambor giratorio continuo (CRDB). [Consultado el Abr 14, 2018].

RESIDUOS ORGÁNICOS: son residuos biodegradables resultantes del procesamiento de alimentos que pueden ser transformados en un nuevo producto después de someterse a un tratamiento biológico aeróbico o anaeróbico.⁹

⁸ BARROSO CASILLAS, Miguel. Pretratamiento De Biomasa Celulósica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería. E.U.I.T. Forestal (UPM), 2010. p. 115

⁹ ODLARE, Monica. Organic Residues. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2005.

RESUMEN

En este proyecto de investigación se tiene como propósito la obtención de productos con valor agregado como azúcares reductores para la posterior producción de bioetanol, xilitol, ácido láctico, entre otros, a partir de residuos lignocelulósicos de tipo agroindustrial, a su vez buscar alternativas a los métodos convencionales de obtención de azúcares reductores como la hidrólisis química y la hidrólisis con enzimas aisladas con el fin de reducir costos y evitar el uso de sustancias corrosivas como el ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio usados en la hidrólisis química.

Por esto se evaluó la viabilidad del uso de la fermentación sólida para la obtención de azúcares reductores a partir de cáscara de piña de la variedad MD2, más conocida como “piña Golden” haciendo uso del hongo *Trichoderma reesei*.

Las cáscaras de piña se adquirieron en el centro de acopio de Corabastos, este se encuentra ubicado en la ciudad de Bogotá, Colombia en la Carrera 58 No. 80 – 87 sur en donde las cáscaras representan un subproducto de su venta principal, estas fueron reunidas en bolsas aisladas, recogidas el día domingo 20 de marzo por un muestreo aleatorio simple. Se seleccionaron manual y cualitativamente teniendo en cuenta el estado de maduración según la norma técnica colombiana NTC 729-1 y la limpieza de las cáscaras de piña, para evitar la generación de procesos de transformación como la fermentación. Posteriormente se llevaron a cabo pretratamientos físicos como secado, molienda y tamizado con el objetivo de facilitar el desarrollo de los procesos posteriores.

Por otro lado se establecen los compuestos químicos presentes en la cáscara de piña los cuales pueden afectar su rendimiento al someterla a un proceso de hidrólisis y por ende la obtención de azúcares reductores, por lo que se hizo una caracterización de las cáscaras de piña se realizó siguiendo normas técnicas para determinar compuestos químicos como el contenido de extraíbles, por la norma TAPPI 204 cm-97, celulosa, hemicelulosa por la norma ASTM D1103-55 T y lignina por la norma TAPPI 222 om-02, y propiedades físicas como contenido de humedad, por la norma A.O.A.C 934.06, ya que estas propiedades son importantes para conocer la viabilidad de uso y la estrategia de la extracción de la celulosa. Se obtuvo un porcentaje de humedad del 38%, el contenido de lignina total es 14,56%, bajo en comparación con los otros compuestos presentes en el material y comparado con otros materiales con composición estructural similar como el bagazo de caña y las maderas duras y blandas, el porcentaje de celulosa fue 40,35% y hemicelulosa de 20,89% estas dos últimas corresponden a un total de holocelulosa de 61,24%.

Dado que el contenido de lignina es bajo, se decide que no es necesario hacer un pretratamiento debido a que el microorganismo seleccionado es capaz de realizar el proceso de hidrolisis en materiales como el bagazo de caña de azúcar que

contienen un porcentaje de lignina inferior a 20%, por lo que se realizó una pre experimentación para determinar el porcentaje de humedad que permite el crecimiento del hongo. Posteriormente se analizó el efecto de la aireación en la hidrólisis enzimática.

Para llevar a cabo el proceso de hidrólisis en fermentación sólida se realizó la construcción de biorreactores de tambor. Este biorreactor consiste en recipientes de vidrio de fácil acceso en el mercado con volumen de 4L, 16cm de diámetro interno y longitud de 23cm, a los cuales se les realizaron modificaciones en la entrada de aire para evaluar su influencia en el crecimiento del microorganismo y por ende la obtención de azúcares reductores. Para tener un control de la aireación y la temperatura en el lecho se tomó una muestra de 100g de sustrato con humedad ajustada al 70%.y se determinó que la altura del lecho dentro del biorreactor debía ser de 1,077cm teniendo en cuenta la geometría calculada para una semicircunferencia en donde se permite un flujo de aire en la parte inferior del lecho.

Finalmente se miden los azúcares reductores presentes usando la técnica de DNS el resultado con aireación forzada fue de 2,236 g/L, mientras que la concentración de azúcares reductores obtenida en la hidrólisis sin aireación forzada fue de 1,369 g/L. La actividad enzimática de celulasas totales en el reactor con aireación forzada fue de 22.29 FPU/mL y el del reactor sin aireación forzada fue de 12,46 FPU/mL.

PALABRAS CLAVE: Fermentación sólida, *Trichoderma reesei*, cáscaras de piña, azúcares reductores, actividad enzimática.

INTRODUCCIÓN

En Colombia el manejo de los residuos sólidos causa preocupación ambiental debido a que el 83% de estos son depositados en rellenos sanitarios y solo el 17% se recuperan y se utilizan en el ciclo productivo, se cree que en el año 2030 de seguir con esta tendencia se presentará una emergencia sanitaria debido a la alta tasa de emisiones de gases de efecto invernadero.¹⁰ Adicionalmente se estima que los residuos orgánicos corresponden al 61,5% y dentro de esta categoría los residuos generados por los alimentos son los más representativos, en vista de que en sus diversas etapas de producción y consumo se pierden 9,76 millones de toneladas de alimentos al año a lo largo del país, lo cual equivale al 34% de la oferta disponible de alimentos destinada al consumo humano.¹¹

Teniendo en cuenta las cifras emitidas por la encuesta nacional agropecuaria (ENA) en Colombia se presentaron un total de 8.871 hectáreas de piña sembradas en el año 2015, en el que el área productiva correspondía a un 51,38% de donde se obtuvieron 125.150 toneladas debido a que se presenta una facilidad de producción por ser un clima tropical y tener un suelo apto para su siembra con un pH entre 5 y 6 en diversas áreas del país¹², los residuos generados por este tipo de cultivos representan un 65% del fruto debido a la parte de la piña que no es consumida dentro de lo cual se encuentra la corona, el corazón, las cáscaras y el material vegetal¹³, estos residuos son considerados una materia prima de bajo costo para la producción de productos con mayor valor agregado debido a que en su estructura se puede encontrar una gran cantidad de celulosa y hemicelulosa que al ser hidrolizada genera azúcares reductores, este proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo por medio de una fermentación en estado sólido que se basa en el crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre,¹⁴ posteriormente estos azúcares reductores suelen ser utilizados en la producción de bioetanol, xilitol y otros productos obtenidos por un proceso de fermentación.

¹⁰ Departamento Nacional de Planeación, et al. Política Nacional Para La Gestión Integral De Residuos Sólidos Bogotá D.C.: 2016.

¹¹ Departamento Nacional de Planeación, et al. Política Nacional Para La Gestión Integral De Residuos Sólidos Bogotá D.C.: 2016.

¹² DANE y Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales Características Del Cultivo De La Piña (Ananas Comosus L.). 2016.

¹³ RODRIGUEZ,A. J. Efecto Del Tamaño De Particula Y Concentración De Las Enzimas Celulasa Y Celobiosa, En La Hidrólisis Del Rastrojo De La Piña Para La Producción De Etanol. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2012.

¹⁴ TRIANA,Cristian. Producción De Etanol a Partir De Residuos Provenientes Del Cultivo De Café Universidad Nacional de Colombia, 2010.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener azúcares reductores por medio de fermentación sólida a partir de cáscaras de piña Golden (*Ananas comosus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las cáscaras de piña en cuanto al porcentaje de humedad, extraíbles, lignina, celulosa y hemicelulosa.
- Pre diseñar y elaborar el biorreactor rotatorio a nivel laboratorio.
- Hidrolizar mediante fermentación sólida.
- Determinar las mejores condiciones de aireación y humedad en la hidrólisis.
- Cuantificar los azúcares reductores a las cáscaras de piña hidrolizadas.

1. GENERALIDADES

1.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Un material lignocelulósico está constituido por tejidos vegetales cuyas células están compuestas por una pared celular que a su vez está constituida por un entrecruzamiento de micro fibrillas de celulosa formando capas de hemicelulosa sobre la cual se deposita lignina, para poder aprovechar los componentes presentes en un material lignocelulósico como los azúcares es necesario conocer los componentes principales de su pared y su distribución. Esta distribución es una respuesta a la necesidad de los vegetales de absorber radiación solar sosteniendo su estructura aérea, a su vez le confiere mayor resistencia a agentes patógenos y a la tensión mecánica, y ayuda a mejorar su regulación hídrica.¹⁵

1.1.1 Composición estructural de la lignocelulosa. Los componentes estructurales del material lignocelulósico están constituidos por tres tipos de polímeros que son la celulosa la cual corresponde aproximadamente a la mitad del material, la lignina que corresponde a un 20% de la estructura y la hemicelulosa. La celulosa y la lignina pueden unirse directamente o por medio de la hemicelulosa. También pueden darse tejidos vegetales en los cuales no hay presencia de lignina por lo que cuenta con otro compuesto formado por sustancia péctidas.¹⁶ La proporción de los compuestos puede variar dependiendo del tipo de material lignocelulósico. La estructura y composición química de los materiales lignocelulósicos son los factores clave que interviene en la eficacia de su pretratamiento, hidrólisis y posterior transformación para la obtención de productos con mayor valor agregado.¹⁷

1.1.1.1 Celulosa. Es la molécula más abundante en la tierra ya que es el polímero mayoritario de las paredes celulares de las plantas. Es un homopolímero constituido por unidades repetitivas de D-glucosa caracterizados por la unión de enlaces glucosídicos β -1,4 como se observa en la figura 1 que se encuentran en largas cadenas lineales las cuales se denominan microfibrillas, estos a su vez están unidos por puentes de hidrogeno de los grupos hidroxilos a nivel intermolecular y fuerzas de van der Waals, la celulosa presenta semicristalinidad ya que presenta zonas altamente ordenadas pero a su vez una región amorfa que le confiere facilidad de degradación enzimática. La celulosa es el polímero más abundante del mundo, de elevado peso molecular con un grado de polimerización entre 200 y

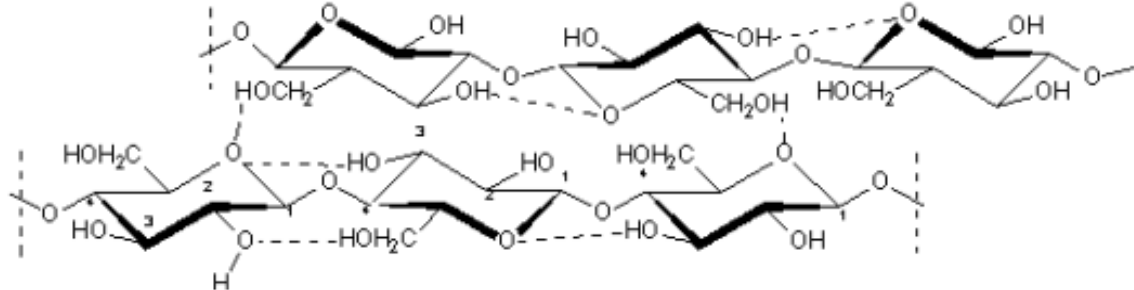
¹⁵ BARROSO. Op. Cit., p. 3

¹⁶ DOMINE, Marcelo Eduardo y CHÁVEZ SIFONTES, Marvín. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. En: Avances En Ciencias E Ingeniería. vol. 4, no. 4, p. 15-46

¹⁷ BELLIDO, Carolina. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo. Fermentación Conjunta De Los Penta Y Hexa Carbohidratos Con Pichia Stipitis. Madrid: Universidad de Valladolid, 2013.

1000, es muy estable y resistente químicamente y también a la tracción mecánica.¹⁸

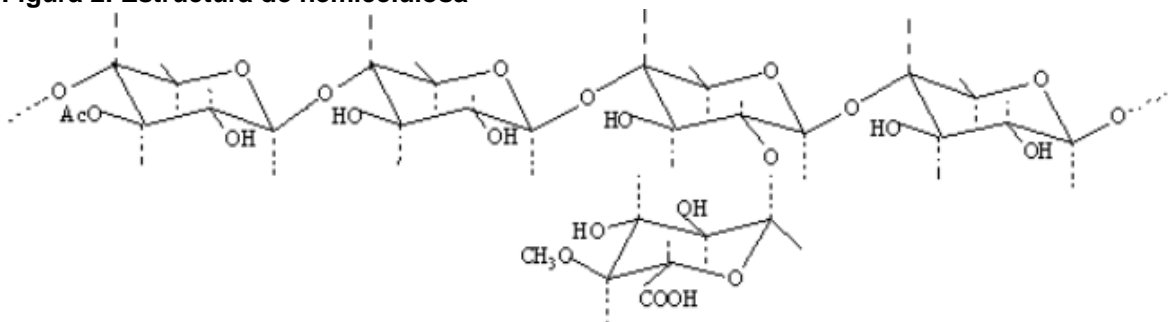
Figura 1. Estructura de la celulosa.



Fuente: BELLIDO, Carolina. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo. Fermentación Conjunta De Los Penta Y Hexa Carbohidratos Con Pichia Stipitis. Madrid: Universidad de Valladolid, 2013.

1.1.1.2 Hemicelulosa. Forma parte de las paredes de las células vegetales, recubre la superficie de las fibras de celulosa y permite el enlace de pectina.¹⁹ Es un heteropolisacárido es decir un polisacárido compuesto por más de un tipo de monómero, está formado por pentosas como la D-xilosa y la L-arabinosa, hexosas como la D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, desoxihexosas como la L-ramnosa, L-fucosa y ácidos urónicos como la D-glucurónico, D-galacturónico, 4-O-metilglucurónico, (figura 2) su cadena principal puede estar constituida tanto como por monosacáridos diferentes como por monosacáridos iguales que a su vez tendrán una gran variedad de ramificaciones.²⁰ Entre estos monosacáridos tienen más presencia la glucosa, la galactosa o la fructosa.

Figura 2. Estructura de hemicelulosa



Fuente: BELLIDO, Carolina. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo. Fermentación Conjunta De Los Penta Y Hexa Carbohidratos Con Pichia Stipitis. Madrid: Universidad de Valladolid, 2013.

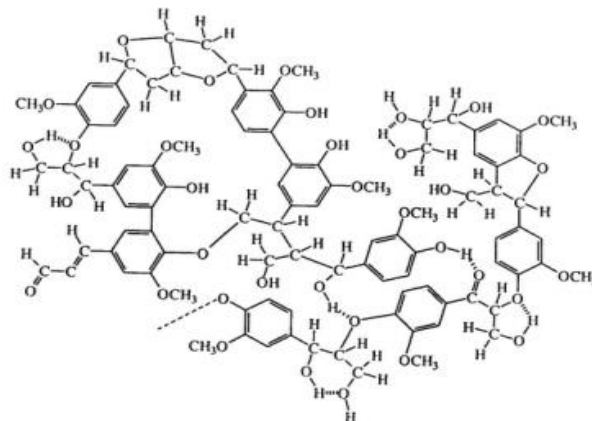
¹⁸ Ibid., p. 14.

¹⁹ RABEMANOLONTSOA, Harifara y SAKA, Shiro. Various pretreatments of lignocellulosics. En: Bioresource Technology. vol. 199, p. 83-91

²⁰ BELLIDO Op., Cit., p. 15.

1.1.1.2 Lignina. Este es un heteropolímero amorfo a su vez tridimensional y ramificado formado principalmente por alcoholes aromáticos llamados alcoholes cinamílicos: *p*-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidro-3,5-dimetoxicinamílico), como se observa en la figura 3, que actúan como precursores de la lignina y representan las unidades básicas de este polímero, la lignina presenta una alta solubilidad en agua a 180°C bajo condiciones neutras del mismo modo que la hemicelulosa.²¹

Figura 3. Estructura de la lignina.



Fuente: BELLIDO, Carolina. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo. Fermentación Conjunta De Los Penta Y Hexa Carbohidratos Con *Pichia Stipitis*. Madrid: Universidad de Valladolid, 2013.

1.1.2 Composición secundaria de la lignocelulosa. Generalmente se presentan en menor proporción y se pueden encontrar de dos tipos, los de bajo peso molecular los cuales son hidrosolubles o extraíbles haciendo uso de solventes orgánicos y por otro lado materiales minerales que se estiman como cenizas en los análisis químicos.²²

1.2 PRETRATAMIENTO LIGNOCELULÓSICO

El pretratamiento del material lignocelulósico es muy importante para el proceso debido a que en el momento de realizar la hidrólisis enzimática la lignina presente impide el acceso de la enzima para poder interactuar con la celulosa y hemicelulosa para así obtener los azúcares reductores, la finalidad del pretratamiento es aumentar la digestibilidad de los materiales y debido a la gran

²¹ Ibid., p. 17.

²² BARROSO CASILLAS, Miguel. Pretratamiento De Biomasa Celulósica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería. E.U.I.T. Forestal (UPM), 2010. p. 115

variedad de ellos existen varios tipos de pretratamientos dependiendo del tipo de biomasa, entre los cuales se encuentran los métodos físico y químicos.²³

1.2.1 Pretratamiento físico. Este consiste en una reducción del tamaño del material por fragmentación, triturado y molido para así reducir la cristalinidad desordenando las cristalitas presentes en la fase amorfa, este proceso facilita la accesibilidad de las enzimas aumentando la conversión de celulosa a azúcares reductores debido a un incremento del área superficial específica, también propicia una disminución del tiempo de digestión y del grado de polimerización lo que permite incrementar los rendimientos de la posterior hidrólisis.²⁴

1.2.2 Pretratamiento químico. Para estos procedimientos se utilizan agentes químicos tales como ozono, ácidos, bases, peróxidos y variedad de solventes orgánicos, el pretratamiento básico ha sido uno de los más relevantes debido a que el uso de hidróxidos como el de sodio y potasio permiten la disolución de lignina causando un aumento en el área de superficie de contacto reduciendo de esta forma el grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa.²⁵

1.2.3 Pretratamiento microbiológico. El mecanismo de hidrólisis por medio de enzimas tiene ventajas frente a la hidrólisis química debido a su mayor eficiencia de conversión, menor requerimiento de energía y una disminución en la formación de inhibidores que afecten el proceso,²⁶ no obstante una gran variedad de factores fisicoquímicos y sobre todo de composición le confieren a la biomasa lignocelulósica una resistencia a la hidrólisis enzimática debido a que la lignina crea una barrera física que impide el fácil acceso a la fracción de azúcar por este motivo se realiza un proceso de deslignificación que aumenta el número de poros y el área superficial disponible.

La deslignificación biológica en comparación a las técnicas tradicionales presenta un menor impacto ambiental, mayor rendimiento del producto debido a la selectividad lo que conlleva a una menor producción de reacciones secundarias, que puedan inhibir los procesos posteriores y una menor demanda energética.

Distintos microorganismos dentro de los cuales podemos encontrar bacterias y hongos que son capaces de degradar la lignina pero los que presentan una mayor eficiencia son los denominados basidiomicetos de podredumbre blanca que

²³ KARAGÖZ,P., et al. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. En: Bioresource Technology. vol. 104, p. 361-357

²⁴ BELLIDO,Carolina. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo. Fermentacion Conjunta De Los Penta Y Hexa Carbohidratos Con Pichia Stipitis. Madrid: Universidad de Valladolid, 2013.

²⁵ Ibid., p. 20.

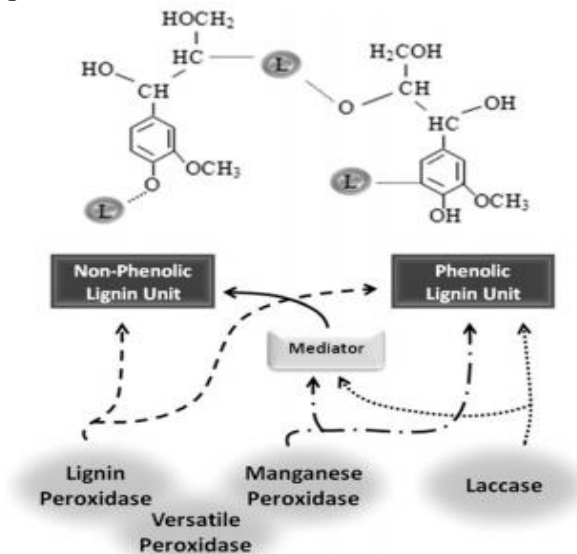
²⁶ TAHERZADEH,M. J. y KARIMI,K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. En: BioResources. vol. 2, no. 3, p. 472

pueden despolimerizar y mineralizar la lignina ya que han desarrollado un sistema enzimático oxidativo extracelular e inespecífico para la degradación de este tipo de moléculas el cual se puede observar en la figura 4.

El proceso implica distintas actividades enzimáticas tales como peroxidasas, oxidasas y reductasas, este proceso de degradación de la lignina está basada en la oxidación no específica de un electrón de los anillos bencénicos en las diferentes subestructuras de lignina por las hemoperoxidasas extracelulares que actúan de forma sinérgica con las oxidasas generadoras de peróxido.²⁷

Estas peroxidasas poseen dos características sobresalientes, la primera es que tiene un potencial redox alto debido a la estructura de bolsillo del grupo hemo que favorece la oxidación de anillos aromáticos no fenólicos y la segunda que pueden generar un oxidante de proteínas debido a la transferencia de electrones al cofactor del grupo hemo formando un radical catalítico libre de triptófilo en la superficie de la proteína.²⁸

Figura 4. Mecanismo de pre tratamiento lignocelulósico.



Fuente: MORENO, Antonio, et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. En: Critical Reviews in Biotechnology. vol. 35, no. 3, p. 342-354

²⁷ RUIZ, Francisco y MARTINEZ, Angel. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. En: Microbial Biotechnology. vol. 2, no. 2, p. 164-177

²⁸ Ibid., p. 15.

Este tipo de procesos son útiles para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas en los usos industriales de la biomasa celulósica. Generalmente se realizan estos procesos en la industria de la pulpa y el papel para bio pulverización o biobleaching, estos hongos y sus enzimas ligninolíticas están atrayendo actualmente mucha atención como enzimas ligninolíticas y su acción selectiva sobre los componentes de la lignina. Mientras que la lignina peroxidasa puede oxidar directamente los compuestos fenólicos y no fenólicos, el manganeso peroxidasa y la lacasa solo pueden actuar sobre compuestos fenólicos.²⁹

Esto significa que de diferentes enzimas oxidativas producidas por organismos que degradan lignina, solo un grupo de hemoperoxidasas basidiomicetas podría atacar directamente la red de lignina no fenólica. Estas enzimas incluyen lignina peroxidasa (LiP), una versátil peroxidasa (VP) y manganeso peroxidasa (MnP). El Mn^{3+} resultante de la acción de estas peroxidases oxida compuestos fenólicos pero, en presencia de lípidos insaturados, también puede oxidar la lignina no fenólica a través de radicales de peroxidación.

1.3 MÉTODOS DE HIDRÓLISIS Y APLICACIONES

La estructura compleja que presenta los materiales lignocelulósicos está conformada por varias fracciones que deben ser procesadas de manera individual para garantizar una eficiente conversión de la biomasa a compuestos como el etanol, la fracción con mayor proporción en los materiales lignocelulósicos corresponde a la celulosa, la cual a su vez está compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$ agrupados en estructuras superiores que presentan una alta cristalinidad dificultando la obtención de azúcares reductores a partir de la celulosa³⁰, por ende este proceso tiene como objetivo la transformación de macromoléculas con alto nivel de degradación en moléculas más pequeñas es decir azúcares reductores monoméricos, para llevar a cabo el proceso de hidrólisis se rompen los enlaces en presencia de un medio acuoso obteniéndose así mayoritariamente glucosa y xilosa. Existen diversos tipos de hidrólisis de los cuales los más representativos son la hidrólisis ácida, alcalina y enzimática.

1.3.1 Hidrólisis ácida. la hidrólisis ácida basa su funcionamiento en un proceso químico que hace uso de catalizadores ácidos que modifican las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa como la hemicelulosa y la celulosa hasta obtener sus monómeros elementales³¹, este tipo de hidrólisis los catalizadores ácidos utilizados son los ácidos sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico,

²⁹ Ibid., p. 16

³⁰ OLIVA DOMINGUEZ, Jose. Efectos De Los Productos De Degradación Originados En La Explosión Por Vapor De Biomasa De Chopo Sobre *Kluyveromyces Marxianus*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2003.

³¹ Ibid., p. 23

siendo estos dos últimos los que se emplean mayoritariamente en las industrias,³² estos ácidos se pueden emplear concentrados y diluidos.

Los de ácidos concentrados operan a bajas temperaturas obteniendo altos rendimientos de conversión que para la glucosa son superiores al 90%, sin embargo, al utilizarse una gran cantidad de ácido en la impregnación del material a hidrolizar y a los costos que conlleva su recuperación, junto con los efectos corrosivos que obliga a realizar una alta inversión en equipos traen como consecuencia desfavorable la elevación de los costos generando de esta forma que no sea rentable el proceso, además este proceso está relacionado a una costosa neutralización que se debe realizar antes del proceso de fermentación.³³

Los procesos que se llevan a cabo con ácidos diluidos tienen un bajo consumo de ácido, por lo que para compensar el bajo rendimiento debe realizarse a altas temperaturas próximas a los 240°C para así poder alcanzar rendimientos aceptables de glucosa, en este proceso se opera con una concentración de ácido de 1% (p/v) y un tiempo de residencia de 6-12 segundos, con ácidos diluidos solo se alcanza un rendimiento del 60%, al emplear temperaturas tan elevadas se genera una mayor corrosión en los equipos y por otro lado aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos lo que afectara el proceso de fermentación.

1.3.2 Hidrólisis enzimática. Este proceso es catalizado por medio de distintas enzimas que debido a su función de degradar celulosa se denominan celulasas, este tipo de hidrólisis es medioambientalmente sostenible ya que las principales celulasas utilizadas en los procesos son de origen fúngico³⁴ especialmente los hongos de podredumbre blanca, parda o blanda, los dos últimos tienen la capacidad de realizar una acción en la celulosa, pero solo los hongos de pudrición blanca pueden degradar la lignina³⁵ para poder realizar la degradación de la lignina en la biomasa esta clase de hongos cuenta con la acción de enzimas ligno-degradantes como las peroxidases y las lacasas³⁶, el complejo celulolítico de hongos está formado por componentes que tienen diferentes actividades y mecanismos los cuales son:³⁷

³² GALBE, M. y ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. En: Applied Microbiology and Biotechnology. vol. 59, no. 6, p. 618-628

³³ OLIVIA Op., Cit., p. 24

³⁴ SUN, Ye y CHENG, Jiayang. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. England: Elsevier Ltd, 2002. p. 1-110960-8524

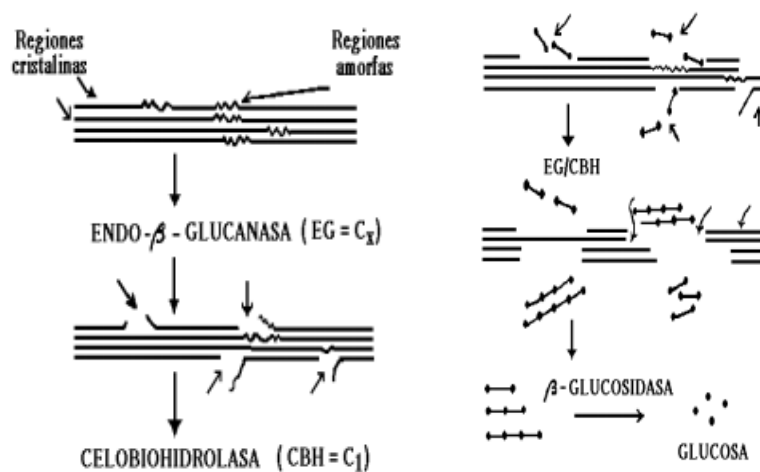
³⁵ ALVIRA, P., et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. En: Bioresource Technology; Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives. vol. 101, no. 13, p. 4851-4861

³⁶ KUMAR, Adep y SHARMA, Shaishav. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: Bioresour Bioprocess. vol. 4, no. 1,

³⁷ BELLIDO. Op. Cit., p. 20

- Endo- β -glucanasas: como la β - (1,4)-glucanglucanohidrolasa que actúan al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -(1,4) glucosídicos y generando nuevos terminales de cadena no reductores, obteniendo varios oligosacáridos de varias longitudes, generalmente actúan sobre celodextrinas y derivados como la hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa y adicionalmente sobre celulosa amorfa.³⁸
- Exo- β -glucanasas: como la celobiohidrolasa que actúan sobre los extremos no reductores de la cadena obtenida por la acción de la endoglucanasa liberando moléculas de celobiosa y Glucohidrolasa que se encuentran en pequeña proporción y actúan sobre los extremos no reductores liberando glucosa, entre el 50 y el 80% del complejo celolítico corresponde a estas enzimas³⁹
- β - glucosidasa las cuales completan el proceso hidrolizando la celobiosa y los oligosacáridos por lo que evita la inhibición producida por la acumulación de la celobiosa en el medio de reacción, convirtiendo los fragmentos de estos materiales a glucosa.⁴⁰

Figura 5. Hidrólisis enzimática



Fuente: OLIVA DOMINGUEZ, Jose. Efectos De Los Productos De Degradación Originados En La Explosión Por Vapor De Biomasa De Chopo Sobre *Kluyveromyces Marxianus*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2003.

³⁸ GAITÁN, Diana y PÉREZ, Liliana. Aislamiento Y Evaluación De Microorganismos Celulolíticos a Partir De Residuos Vegetales Frescos Y En Compost Generados En Un Cultivo De Crisantemo (*Dendranthema Grandiflora*). Pontificia universidad Javeriana, 2007.

³⁹ Ibid., p. 5.

⁴⁰ Ibid., p. 5.

1.3.2.1 Mecanismo de acción enzimática. La hidrólisis enzimática es muy compleja e involucra muchas etapas y mecanismos de acción sobre el sustrato los cuales son:⁴¹

- Adsorción de la celulasa en el sustrato a través del dominio de unión.
- Ubicación de un enlace susceptible a hidrólisis sobre la superficie del sustrato (terminaciones de cadena si se trata de Celobiohidrolasas, división de enlaces si es Endogluconasas).
- Formación del complejo Enzima-Sustrato.
- Hidrólisis del enlace β -glucosídico seguida por el deslizamiento simultáneo de la enzima a lo largo de la cadena de Celulosa.
- Desorción de las celulasas del sustrato.
- Hidrólisis de la Celobiosa por la acción de las β -Glucosidasas e inhibición de la enzima por producto formado.

1.4 FERMENTACIÓN SÓLIDA

La fermentación en estado sólido (FES) es una técnica basada en el crecimiento de microorganismos bajo condiciones controladas sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre, el agua presente en los sistemas de FES se encuentra en una forma compleja dentro de la matriz sólida como una fina capa, bien absorbida sobre la superficie de las partículas o con una interacción más débil en las regiones porosas del sólido para la generación de productos de interés, en la actualidad esta técnica se utiliza en la producción de enzimas de uso industrial, combustibles y concentrados ricos en nutrientes para animales, generalmente, para la obtención de estos productos se utilizan como sustratos sólidos residuos agroindustriales, lo que representa una ventaja debido a que, se obtienen productos de interés industrial y, por otro lado, se resuelven problemas de deposición de residuos sólidos.

En estudios comparativos entre la fermentación sólida y la fermentación líquida sumergida se han mostrado ciertas ventajas para la FES las cuales son⁴²:

- Baja actividad de agua (a_w) que podría reducir la contaminación por bacterias permitiendo trabajar en condiciones asépticas.
- Condiciones ambientales similares a las de los hábitats en donde se encuentran los microorganismos utilizados en FES.

⁴¹ TRIANA, Cristian. Producción De Etanol a Partir De Residuos Provenientes Del Cultivo De Café Universidad Nacional de Colombia, 2010.

⁴² Bashir Sajo Mienda; Ahmad Idi y Abdulhamid Umar. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - an Overview. 2011. 2229-791X

- La composición del medio suele ser simple debido a que el sustrato proporciona todos los nutrientes necesarios para el proceso.
- Pueden utilizarse diseños simples de reactores por las bajas especificaciones de los sustratos.
- Se caracteriza por no requerir altos niveles de energía por lo que puede disminuir los costos de operación ya que no es necesario agitación mecánica ni tratamientos en autoclave.
- La baja disponibilidad de humedad facilita la producción de compuestos específicos que probablemente no se produzcan en la fermentación líquida.

Los microorganismos más comúnmente empleados en la fermentación sólida son los hongos filamentosos, seguidos de las levaduras, los actinomicetos y las bacterias. Los hongos filamentosos son los microorganismos más eficientes en la degradación de sustratos sólidos por su potencial de excreción de enzimas hidrolíticas, y el crecimiento mediante hifas por lo que resulta más fácil su colonización y la utilización de los nutrientes disponibles debido al poder de penetrar en el sustrato sólido.

Los hongos filamentosos son los microorganismos con mejor adaptación al proceso de fermentación sólida debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, sin embargo es posible utilizar bacterias las cuales están involucradas principalmente en el proceso de compostaje y en algunos procesos de alimentos⁴³, también se puede utilizar levaduras en procesos de producción de bioetanol y la producción de ciertos alimentos y piensos⁴⁴.

Lo que le otorga a los hongos filamentosos su buen funcionamiento en el proceso FES es el crecimiento fúngico por medio de hifas y su excelente tolerancia a la baja actividad de agua (a_w) y las altas condiciones de presión osmótica, el modo de crecimiento por hifas genera una gran ventaja a los hongos filamentosos sobre los microorganismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos, este crecimiento fúngico es una combinación de puntas de hifas sobre una gran extensión y la generación de nuevas puntas de hifas mediante ramificación.

A pesar de que la extensión se lleva a cabo solo en la punta a una velocidad lineal y constante la frecuencia de ramificación le confiere un patrón exponencial de crecimiento biomásico.⁴⁵

⁴³ DOELLE,Horst W.; MITCHELL,David y Rolz Carlos. Solid Substrate Cultivation. London u.a: Elsevier Applied Science, 1992. p. 4461851668799

⁴⁴ SAUCEDO,G., et al. Potencial of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving Schwanniomyces castellii. En: Biochemistry and Biotechnology. vol. 36, p. 47-61

⁴⁵ RAIMBAULT,Maurice. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. En: Electronic Journal of Biotechnology. Dec 15,. vol. 1, no. 2, p. 174-188

A continuación el cuadro 1. Menciona los microorganismos más utilizados en la fermentación sólida:

Cuadro 1. Principales grupos de microorganismos involucrados en SSF

Micro flora	Proceso SSF
<i>Bacteria</i>	
<i>Clostridium sp.</i>	Ensilado, comida
<i>Lactobacillus sp</i>	Ensilado, comida
<i>Streptococcus sp.</i>	Compostaje
<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostaje
<i>Serratia sp.</i>	Compostaje
<i>Bacillus sp.</i>	Compostaje, amilasa
<i>Fungi</i>	
<i>Altemaria sp.</i>	Compostaje
<i>Penicilium notatum, roquefortii</i>	Penicilina, queso
<i>Lentinus edodes</i>	Hongo shiitake
<i>Pleurotus oestreatus, sajor-caju</i>	Hongo
<i>Aspergillus niger</i>	Alimento, proteína, amilasa, ácido cítrico
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tempeh, soja, amilasa, lipasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	Koji, comida, ácido cítrico
<i>Amylomyces rouxii</i>	Yuca, arroz
<i>Beauveria sp., Metharizium sp.</i>	Control biológico, bioinsecticida
<i>Trichoderma sp.</i>	Control de compostaje biológico
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Compostaje, degradación de lignina
<i>Rhizopus sp.</i>	Compostaje, alimento, enzimas, ácidos orgánicos
<i>Mucor sp.</i>	Compostaje, comida, enzima
<i>Monilia sp.</i>	Compostaje
<i>Fusarium sp.</i>	Compostaje
<i>Aspergillus sp.</i>	Compostaje, industrial
<i>Levadura</i>	
<i>Endomycopsis burtonii</i>	Yuca, arroz
<i>Schwanniomyces Castellii</i>	Etanol, amilasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimento, etanol

Fuente: Bashir Sajo Mienda; Ahmad Idi y Abdulhamid Umar. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - an Overview. 2011. 2229-791X

Las principales aplicaciones de la fermentación sólida se puede observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Principales aplicaciones de SSF

Sector económico	Aplicación	Ejemplos
Fermentación industrial	Producción de enzimas	Amilasa, amiloglucosidasa, celulasa, proteasa, pectinas, xilanos, glucoamilasa
	Productos bioactivos	Micotoxinas, giberelinas, alcaloides, antibióticos, hormonas
	Producción de ácido orgánico	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico, ácido láctico
	Biocombustible	Producción de etanol
	Compuestos diversos	Pigmentos, biosurfactantes, vitaminas, Xanthan
Industria agroalimentaria	Biotransformación de residuos de cultivos	Comida tradicional fermentada (Koji, sake, ragi, tempeh), enriquecimiento proteico y producción de proteína unicelular, producción de hongos.
	Aditivos alimentarios	Compuestos aromáticos, colorantes, grasas esenciales y ácidos orgánicos
Control ambiental	Biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos	Residuos cafeinados, pesticidas, bifenilos policlorados (PCB)
	Desintoxicación biológica de agroindustrial desechos	Pulpa de café, cáscaras de mandioca, harina de canola, cáscara de café

Fuente: Bashir Sajo Mienda; Ahmad Idi y Abdulhamid Umar. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - an Overview. 2011. 2229-791X

1.5 BIORREACTOR

Un biorreactor es un equipo en el que se realiza un proceso o reacción química que es catalizada por un organismo o una enzima. Para lograr alta eficiencia en los procesos realizados por microorganismos es necesario considerar sus requerimientos ambientales y controlarlos, los factores más importantes a tener en cuenta son: el flujo de gases, como el aire, la temperatura, ya que en la mayoría

de los casos, los procesos biológicos son una fuente importante de calor, pH, oxígeno disuelto y velocidad de agitación.⁴⁶

Pueden usarse tres tipos de operación de un reactor según la alimentación del sustrato: discontinuo o batch, semicontinuo y continuo.

1.5.1 Biorreactor discontinuo o batch. En un biorreactor batch no hay flujo de entrada ni de salida, por lo que la concentración inicial de los microorganismos que son inoculados no es alterada por nutrientes adicionales o por el lavado, así mismo el volumen de sustrato permanece constante. En un bioproceso por lotes, el único material agregado y eliminado durante el curso de la operación es el intercambio de aire / gas, antiespumante y agentes de control de pH. El proceso se detiene hasta que el sustrato sea consumido por la biomasa, este tiempo requerido se denomina tiempo de retención. Los procesos por lotes se han incrementado significativamente hoy en día y se usan ampliamente para producir biomoléculas especiales para usos en industrias químicas, biotecnológicas y farmacéuticas. La producción de estos bioproductos de alto valor agregado contribuye a una porción significativa y creciente de los ingresos y ganancias de las industrias de bioprocesos.⁴⁷

1.5.2 Biorreactor semicontinuo. Un biorreactor semicontinuo se caracteriza por la alimentación de un sustrato estéril, la ausencia de flujo de salida y el aumento en el volumen (acumulación de masa total) en el biorreactor, está restringido por la capacidad volumétrica del reactor. Son utilizados principalmente en la industria alimentaria, farmacéutica, y en aplicaciones de biopolímeros (PHB).⁴⁸

1.5.3 Biorreactor continuo. En un biorreactor continuo se tiene una alimentación y se retiran productos continuamente. Bajo ciertas condiciones el cultivo puede alcanzar un estado estacionario, son de tipo tanque completamente agitado (CSTR) o tipo tubo con flujo tapón (PFR)⁴⁹.

1.5.4 Biorreactores usados en fermentación sólida. Los biorreactores FES de uso común se pueden dividir en cuatro tipos según el tipo de aireación o el sistema mixto empleado. Estos pueden clasificarse de la siguiente manera: biorreactores estáticos (lecho fijo, bandejas perforadas), biorreactor agitado (el tambor horizontal o tambor agitado) y biorreactores con aireación forzada o sin ella.

⁴⁶ Facultad de Ciencias Químicas Universidad Veracruzana. UNIDAD 2. BIORREACTORES Y SU APLICACIÓN. [Consultado el Abr 14,2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>

⁴⁷ CINAR, A.; BIROL, G. y PARULEKAR, S. J. Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control. En: CRC Press. p. 648

⁴⁸ Ibid., p. 57

⁴⁹ Ibid., p. 58

La construcción de biorreactores debe tener en cuenta las peculiaridades de la FES la variedad de materiales que pueden usarse como medios de cultivo, y sus características como composición, tamaño, resistencia, porosidad y capacidad de retención de agua, junto con el hecho de la baja humedad del sustrato, que da problemas de sistema de transferencia de calor. La fermentación en estado sólido es un proceso que ocurre en ausencia de agua libre, por lo que los hongos filamentosos son microorganismos adaptados de forma natural para este tipo de condición. La morfología del hongo, con respecto a la presencia de hifas tabicadas o no (que da resistencia más o menos mecánica a posibles disturbios en el medio), y la necesidad o no de esterilidad en el proceso son otros factores que influyen en el diseño de los biorreactores para FES. Por lo tanto, el biorreactor puede o no tener aireación forzada, puede ser sin agitación, agitado ocasionalmente o solo con rotación continua⁵⁰.

El número y los tipos de biorreactores utilizados en escala piloto e industrial son pequeños en comparación con los utilizados en la escala de laboratorio. Se aplican principalmente en escala de laboratorio debido a algunas razones importantes y necesidades que son⁵¹:

- Las hifas pueden dañarse por agitación mecánica, especialmente si no están septadas, lo que permite muy pocos hongos que satisfagan las necesidades de aireación y eliminación de calor;
- El medio sólido puede compactarse durante el proceso, causando muchos problemas;
- Hay dificultades con la inoculación, el control y la esterilización de grandes volúmenes de medio;
- El mantenimiento y los procedimientos para el llenado, vaciado y limpieza de grandes reactores;
- El mantenimiento de la uniformidad es difícil para grandes volúmenes de biomasa.

1.5.5 Biorreactor de tambor rotatorio. Es un reactor que consiste en un cilindro que gira horizontalmente alrededor de su eje, en el cual ingresa aire por una sección en la cabeza del reactor y no a la fuerza a través del lecho del sustrato. Este tipo de reactor puede emplearse en procesos por lotes o batch, si la rotación se hace en discontinuo se deben tener en cuenta las variables como el tiempo y la velocidad de rotación, la temperatura, la humedad y el flujo del aire usado.⁵²

⁵⁰ Ibid., p. 63

⁵¹ Ibid., p. 67

⁵² Seepsa. Op. Cit. p. 1.

Los tambores giratorios se han utilizado como biorreactores para la fermentación en estado sólido desde la década de 1930 y ya se utilizan para fabricar muchos productos. Los biorreactores de tambor giratorio proporcionan una mezcla relativamente suave y uniforme al mejorar el diseño del deflector, ya que no hay agitador dentro del lecho del sustrato. Los principios de ingeniería del biorreactor de tambor rotatorio han recibido recientemente interés para la producción de biocombustibles utilizando materiales celulósicos.⁵³

1.6 TRICHODERMA RESEEI:

La clasificación biológica de *Trichoderma reesei* es la siguiente:⁵⁴

Reino: Fungi
Filum: Ascomycota
Subfilum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Hypocreomycetidae
Orden: Hypocreales
Familia: Hypocreaceae
Género: *Trichoderma*
Especie: *T. reesei*

Trichoderma es un género fúngico que se encuentra en muchos hábitats naturales especialmente en casquetes de hongos, madera podrida y suelo⁵⁵, este género pertenece al grupo de hongos Deuteromicetes más conocidos como hongos imperfectos al orden hifales los cuales se caracterizan por presentar conidióforos la cual es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios.⁵⁶

Trichoderma Reesei es un hongo mesófilo y filamentoso originalmente aislado de las islas Solomon durante la segunda guerra mundial, el cual se somete a un ciclo reproductivo heterotálico y genera cuerpos fructíferos (estromas) con 16 ascosporas que se generan a través de la meiosis y dos rondas de mitosis

⁵³ CINAR,A.; BIROL,G. y PARULEKAR,S. J. Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control. En: CRC Press. p. 648

⁵⁴ CHÁVEZ GARCÍA,Mónica Paola. Producción De *Trichoderma* Sp. Y Evaluación De Su Efecto En Cultivo De Crisantemo (*Dendranthema Grandiflora*). 2007.

⁵⁵ LI,Wan-Chen, et al. *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. En: *Biotechnology for Biofuels*. Jul 3,. vol. 10, no. 1,

⁵⁶ MULAKALA,Chandrika y REILLY,Peter J. *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) Cel7A as a molecular machine: A docking study. En: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. Sep 1,. vol. 60, no. 4, p. 598-605

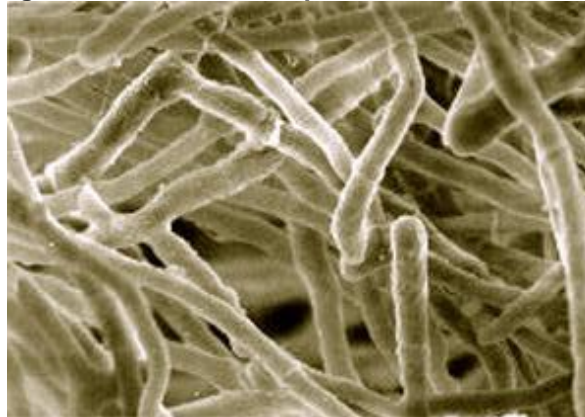
postmeiótica. Cuando se colocan en condiciones favorables, las ascosporas germinan para formar micelios vegetativos y producen esporas asexuales, es decir, conidios.⁵⁷

En la etapa inicial de crecimiento tiene color blanco, que se torna a verde oscuro o amarillento (imagen 1) con esporulación densa. El micelio visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, como un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal.

Imagen 1. Morfología de *Trichoderma reesei*



Figura 6. Vista microscópica de *Trichoderma reesei*



Fuente: Irma Salovuori, VTT Biotechnology

1.6.1 Principales factores que influyen en el crecimiento de *Trichoderma reesei*:

⁵⁷ PALOHEIMO,Marja; HAARMANN,Thomas y MÄKIEN,Susana. Production of Industrial Enzymes in Trichoderma Reesei.

1.6.1.1 Temperatura. Es un factor importante para determinar la tasa de crecimiento de los microorganismos, la germinación de las esporas, crecimiento del micelio y producción de metabolitos, la gran mayoría de los hongos se desarrollan en rangos de temperatura mesofílicos entre 10° y 40°C sin embargo el rango óptimo de temperatura para este tipo de hongos es entre 15 y 30°C.⁵⁸

1.6.1.2 Disponibilidad de agua. La disponibilidad de agua tiene un efecto crítico en la producción de enzimas por parte de los hongos ya que puede afectar la germinación de la espora, así como el crecimiento del micelio, por este motivo en la fermentación sólida los niveles de humedad tienen que ser óptimos, ya que un nivel mayor causa una disminución en la porosidad, modificación en la estructura, disminución en la transferencia de oxígeno, mientras que un nivel menor causa una modificación en la tensión de agua reduciendo la solubilidad de los nutrientes presentes en el sustrato sólido, el contenido de agua en el sustrato sólido generalmente varía en un rango entre el 30 y el 75%⁵⁹.

1.6.1.3 pH. Este juega un papel fundamental en la producción de enzimas extracelulares en los hongos, de este modo la mayoría de cepas de *Trichoderma* crecen en un amplio rango de pH entre 2 a 6 con su punto óptimo en 4.

El microorganismo *Trichoderma reesei* tiene un sistema celulítico dividido en tres enzimas principales, exoglucanasas especialmente la celobiohidrolasa la cual libera la celobiosa que corresponde a un dímero D-glucosa desde los extremos de la cadena de celulosa, endoglucanasas ubicadas aleatoriamente en la cadena de celulosa y las glucosidasas encargadas de producir D-glucosa partiendo de los productos de descomposición oligoméricos solubles.⁶⁰

1.7 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS

Los recuentos celulares son procedimientos que tienen como objetivo determinar el número de células comprendidas en una unidad de volumen, uno de los métodos utilizados para este procedimiento es el conteo por cámara de Neubauer, la cual es una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos con aproximadamente longitudes de 30 x 70mm y con espesor de 4mm, la parte central de la cámara la cual es la zona donde se realiza el conteo está dividida en 3 segmentos los cuales son pulidos y esmerilados, en el campo central se ubican dos cuadrículas de recuento grabadas separadas una de la otra.⁶¹

⁵⁸ NAMPOOTHIRI,K. Madhavan, et al. Process Optimization for Antifungal Chitinase Production by *Trichoderma Harzianum*. 2004. p. 1583-1590/1359-5113

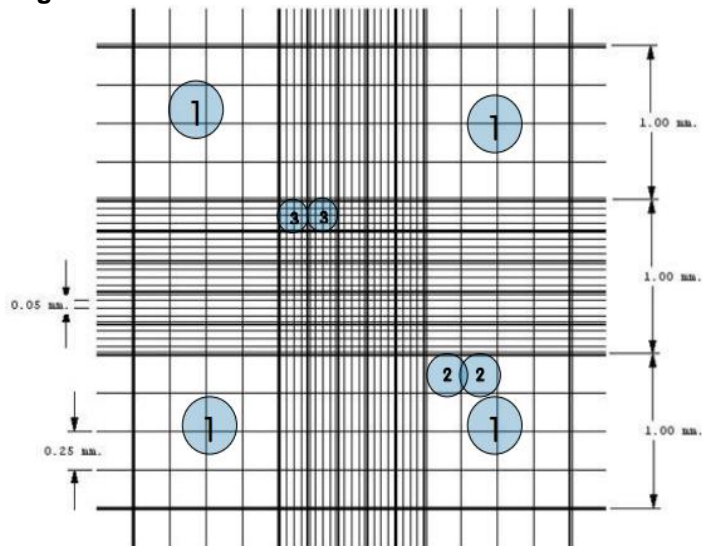
⁵⁹ PÉREZ-GUERRA,N., et al. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. En: Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. vol. 2, no. 3, p. paper 1

⁶⁰ Ibid., p 12

⁶¹ JIMENEZ,Orlando y ALSINA,María Jesús. Cámaras de recuento. En: Revista Del Laboratorio Clínico. vol. 5, no. 1, p. 1-2

Cada cuadrícula de recuento está conformada de 9 cuadrados grandes los cuales cuentan con 1mm^2 de área cada uno, a su vez estos están divididos en 16 cuadrados con aristas de $0,25\text{mm}$, el cuadro central está dividido en 25 cuadros medianos con aristas de $0,2\text{mm}$, los cuadrados medianos presentan en todos los lados líneas límite triples donde la línea central es la frontera y determinan si las células ubicadas en esta zona deben ser contadas o no.⁶²

Figura 7. Cuadrículas de la cámara de Neubauer.



Fuente: BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocítmetro. En: Neubauer Chamber Cell Counting , Celoromics.

Adicionalmente para llevar a cabo el conteo de las células la cámara debe ser cubierta por un cubreobjetos de cristal de aproximadamente $22\text{ mm} \times 22\text{ mm}$ el cual se ubica en el centro de la cámara delimitando un espacio entre la cámara y el cubre objetos de $0,1\text{ mm}$, para llenar la cámara se hace uso de una pipeta que permite medir una alícuota de líquido con una elevada precisión.⁶³

1.8 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

1.8.1 Método del DNS. El DNS es un método de colorimetría en el cual se da una reducción del ácido 3,5- dinitrosalicílico en presencia de calor y de los azúcares reductores que entran en contacto, con el cual determina la presencia de grupos carbonílicos libres ($\text{C}=\text{O}$) de los azúcares reductores, de tal modo que se obtiene un cambio de color visible de amarillo a rojo de tal forma que una mol de azúcar reacciona con una mol de ácido presentándose así una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares presentes en la

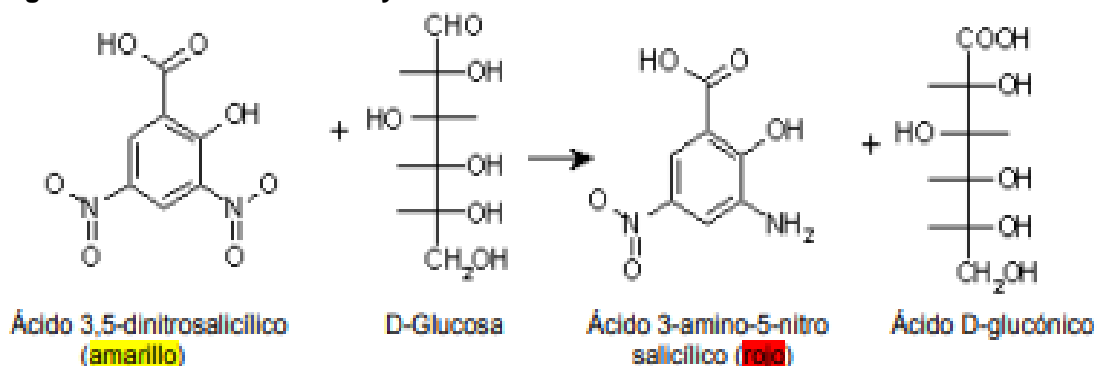
⁶² BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocítmetro. En: Neubauer Chamber Cell Counting , Celoromics.

⁶³ Ibid., p. 2.

muestra analizada.⁶⁴ Estos cambios se leen a través de un espectrofotómetro a una longitud de onda determinada normalmente 540nm. La concentración de azúcar presente en la muestra problema es determinada por la línea recta creada en la curva de calibración del azúcar patrón empleado, la gráfica lleva como coordenada “y” la absorbancia y en el eje “x” se lee la concentración de glucosa.

La reacción se puede observar en la figura 8, esta reacción ocurre debido al grupo OH libre que se presentan en los azúcares reductores, al calentar la muestra se da la oxidación del azúcar mientras que el DNS se reduce.

Figura 8. Reacción entre DNS y azúcares.



Fuente: Manuel Tena Aldave y Jesús V. Jorrín Novo. 31. Extracción Y Ensayo De La Actividad Invertasa De Levadura. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanale.

1.9 PIÑA (*Ananas comosus*)

La piña de nombre científico *Ananas comosus*. Es originaria de América del Sur, no se conoce con certeza el país de su procedencia pero se cree que puede ser de Brasil y Uruguay, y luego se propago a otros países⁶⁵. Esta planta pertenece a la familia de las Bromeliáceas es de tipo herbáceo y perenne, cuenta con raíces que salen de la parte inferior de su tallo siendo muy superficiales ya que normalmente se desarrollan en su mayoría en los primeros 15 centímetros del horizonte del suelo, el tallo es corto donde se insertan las hojas ya que están dispuestas en forma de espiral de forma delgada y larga, las cuales pueden tener más de un metro, poseen un color verde oscuro. El fruto es de forma cilíndrica que se le denomina por su tipo infrutescencia, es decir está formada por una agrupación de frutos, es carnoso y termina en una agrupación de hojas, la pulpa que es la parte comestible es amarilla de diferentes tonalidades dependiendo de la

⁶⁴ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: Analytical Chemistry. Mar 1., vol. 31, no. 3, p. 426-428

⁶⁵ Fondo nacional de fomento de hortifruticultura. Plan De Negocios De Piña, Programa De Transformación Productiva. 2013.

variedad, fibrosa y con un buen aroma, la cual está rodeada de brácteas de color verde las que pasan a un color amarillo al madurar.⁶⁶

Por sus privilegiadas condiciones climáticas Colombia es un país donde se puede escalonar durante todo el año la producción hortofrutícola. Se cultiva en suelos con un pH aproximado de 5,2 a 6,3, donde la temperatura promedio entre los 23°C y 24°C y la humedad relativa fluctúa en el rango de 65% y 75%⁶⁷.

1.9.1 Variedades. En muchas regiones de Colombia se tiene la disponibilidad de recursos hídricos y se cuenta con suelos que permiten el cultivo de distintas variedades de piña, a esto se le suma la expansión en su comercialización y el hecho de que el cultivo sea atractivo desde el punto de vista de la rentabilidad, entre las variedades más importantes que se cultivan en Colombia se encuentran la Cayena Lisa, la piña perolera, la piña manzana, y Gold MD2.⁶⁸

1.9.1.1 Cayena Lisa. Por lo general son frutos de forma tubular, medianos, con peso promedio de 2.4Kg con hojas de color verde oscuro, de bordes lisos, son largas y anchas, su cáscara es de color amarilla, es lisa, tiene ojos hexagonales y poco profundos, la pulpa es de color amarillo claro, tiene bajo contenido de fibra y alto porcentaje de jugo. Presenta poca resistencia a la manipulación, en Colombia su cultivo es escaso y se da principalmente en el Valle del Cauca, su uso principal es en la agroindustria.⁶⁹

Figura 9. Piña Cayena Lisa



Fuente: DANE y Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales Características Del Cultivo De La Piña (*Ananas Comosus L.*). 2016.

1.9.1.2 Piña perolera. Es la variedad de piña más cultivada en Colombia, es grande, de forma cúbica, pesan alrededor de 2 Kg, es de color amarillo-naranja, con ojos profundos, su corona tiene hojas cortas y medianas de color verde oscuro

⁶⁶ DANE. Op. Cit., p. 2

⁶⁷ Íbid. p. 3

⁶⁸ Fondo nacional de fomento de hortifruticultura. Op. Cit, p. 3

⁶⁹ DANE. Op. Cit., p. 3

con bordes lisos. La pulpa es amarilla. Es bastante resistente al transporte. Tiene contenido medio de fibra.⁷⁰

Figura 10. Piña perolera.



Fuente: DANE y Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales Características Del Cultivo De La Piña (*Ananas Comosus L.*). 2016.

1.9.1.3 Piña manzana. Es una modificación de la variedad perolera, es de color rojo intenso cuando madura, tiene ojos menos profundos que la perolera y es menos tolerante a la manipulación y al transporte. La pulpa de la fruta es de color rosado pálido.⁷¹

Figura 11. Piña manzana



Fuente: DANE y Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales Características Del Cultivo De La Piña (*Ananas Comosus L.*). 2016.

⁷⁰ Íbid., p. 3

⁷¹ Íbid., p. 3

1.9.1.4 Piña Gold MD2. Denominada también piña Gold o Golden, esta variedad es la que posee más contenido de azúcares, por lo que es la variedad escogida para la realización de la presente investigación, el fruto es más pequeño comparado con otros, con forma es más simétrica y uniforme, la pulpa es de color amarillo brillante.⁷²

Figura 12. Piña Gold MD2



Fuente: DANE y Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales Características Del Cultivo De La Piña (*Ananas Comosus L.*). 2016.

1.9.2 Residuos utilizados. La piña es la tercera fruta tropical de importancia económica en el mundo, su producción a nivel mundial, entre 2006 - 2010, fue de 17,5 – 18 millones de toneladas de fruta fresca, paralelo al crecimiento en área cultivada y a las ventas de este producto, se da un incremento en subproductos que se obtienen de este cultivo, como la planta entera, los rastrojos (plantas sin raíces), las coronas, los tallos, las cáscaras, la pulpa y el corazón, para este trabajo en particular se analiza las cáscaras debido a que como en la totalidad de la planta y fruto se encuentra celulosa y hemicelulosa la cual puede ser convertida en azúcares reductores es útil para la producción de etanol, pero al ser un residuo de un producto de alimentación no interfiere con el consumo humano.⁷³

1.9.3 Composición química. La composición química de las cáscaras de piña dependen de una serie de factores como, su variedad, las condiciones del cultivo y el grado de madurez del fruto que generan una variación de los compuestos presentes en el material, estos a su vez determinan el comportamiento del sustrato frente a una reacción de hidrólisis.⁷⁴ En la tabla 1 se encuentran los promedios de resultados para la caracterización de cáscaras de piña de la variedad MD2.

⁷² *Íbid.*, p. 3

⁷³ MORENO, Antonio, et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. En: *Critical Reviews in Biotechnology*. vol. 35, no. 3, p. 342-354

⁷⁴ Karla Ramírez Amador, et al. Xylose from lignocellulosic waste in the production and industrial processing of pineapple (*Ananas comosus*). En: *Uniciencia*. Mar 1., vol. 26, no. 1y2, p. 75-89

Tabla 1. Composición de las cáscaras de piña variedad MD2

Ensayo	Resultado
Humedad	7,46% ($\pm 0,01$)
Cenizas	4,25% ($\pm 0,01$)
Solubilidad en agua fría	29,32% ($\pm 0,01$)
Solubilidad en agua caliente	30,93% ($\pm 0,01$)
Solubilidad ciclohexano-etanol	24,74% ($\pm 0,02$)
Lignina	9,05% ($\pm 0,02$)
Celulosa	41,19% ($\pm 0,01$)
Holocelulosa	65,61% ($\pm 0,01$)
Xilano	28,4 g/L ($\pm 0,04$)

Fuente: AMADOR, K. CARRILLO, O. ALVARADO, P. VEGA, J. Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*). Revista Uniciencia 26. p 75-89. Costa Rica. 2012.

Según López Herrera *et al.* No todo el fruto de piña tiene la misma composición química, esta varía dependiendo de cada una de las partes que lo conforman y del estado del material.⁷⁵

1.10 PRODUCCIÓN DE PIÑA EN COLOMBIA

En Colombia el mercado de la piña Golden MD2 creció un 100% para el año 2016 y se ha posicionado como una de las de mayor demanda en territorio colombiano y la más cotizada en el mercado externo, después del banano, la piña constituye uno de los productos frutales más significativos en el consumo de los hogares,⁷⁶ sin embargo en su proceso productivo se generan subproductos, que conllevan problemas ambientales y no se han establecido acciones para aprovechar los residuos y dar mayor valor agregado.

De acuerdo con las cifras reportadas por la Encuesta Nacional Agropecuaria ENA⁷⁷, en el año 2015 se sembró un total 8.871 hectáreas de cultivo de piña, de las cuales el 51,38%, era el área productiva. El departamento de Valle del Cauca mostró el mayor porcentaje con un 35,22%, seguido de Quindío con el 25,29%, Santander 11,68 %, Cauca 10,82 % y Casanare con 7,20 %. El restante 9,79 % los produjo otros 12 departamentos.

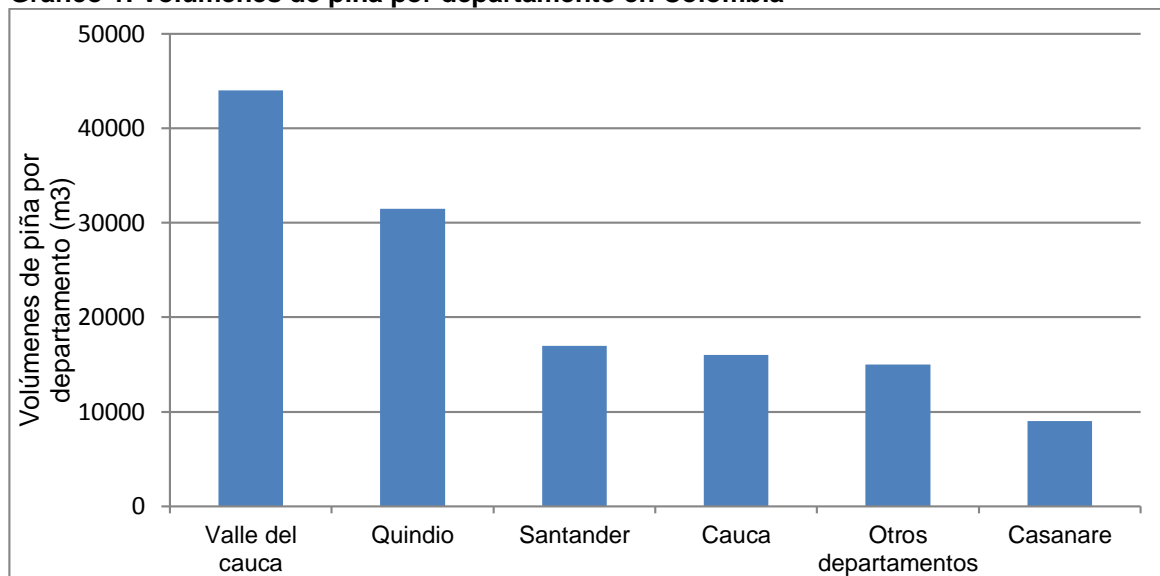
⁷⁵ LÓPEZ-HERRERA; Rodolfo; ROJAS-BAURILLÓN Augusto. Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*) para la alimentación animal. En: Agronomía Mesoamericana, vol. 25, no. 2, p. 383-392

⁷⁶ NEIRA-GARCÍA, Ana María; MARTÍNEZ-REINA, Antonio María y ORDUZ-RODRÍGUEZ, Javier Orlando. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. En: Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria. May 1, vol. 17, no. 2, p. 149-165

⁷⁷ ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA ENA 2015. Técnico Bogotá, 01 De Junio De 2016. 2016.

Por lo general se realizan dos cosechas y según la variedad de la piña y de los factores agroambientales se pueden dar de 15 a los 24 meses y otra de 15 a 18 meses posteriores a la primera cosecha.

Gráfico 1. Volúmenes de piña por departamento en Colombia



Fuente: DANE y ENA. Principales Características Del Cultivo De La Piña (Ananas Comosus L.). 2016.

Según cifras del DANE en el 2014, los cultivos frutales en Colombia abarcan alrededor del 41,9% del total del área agrícola sembrada, estas frutas son en su mayoría banano, piña, cítricos y aguacate.

Figura 13. Cultivos frutales en Colombia.



Fuente: DANE. Censo Nacional Agropecuario 2014. Portafolio. Bogotá. Aug 20.

2. SELECCIÓN DE MUESTRA DE PIÑA

La variedad de piña escogida fue Golden MD2 también conocida como piña Golden, con el fin de continuar con la línea de investigación del semillero BIOTECFUA en el que se investigó la producción de bioetanol y xilitol a partir de las cáscaras de piña Golden y se buscaba investigar una técnica sencilla y económica para su obtención. Además la piña Golden se caracteriza por su gran contenido de azúcares, como glucosa, fructosa, sacarosa los cuales representan cerca de un 85% de los sólidos totales y la fibra representa un 2 a 3% y en menor proporción se encuentran también ácidos orgánicos, sales, proteínas minerales, pigmentos, gomas, pectinas entre otros.⁷⁸ Las cáscaras de la piña, contienen el 11% de sólidos solubles, de los cuales del 75 a 80% son azúcares, del 7 a 9% es ácido cítrico.

2.1 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

La selección de la piña se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por la norma técnica colombiana NTC 729-1⁷⁹ en la que todas las categorías de piña deben estar sujetas a los requisitos, tolerancias permitidas y cumplir ciertas características físicas para su comercialización y consumo, para el desarrollo de esta investigación se tomaron en cuenta las siguientes:

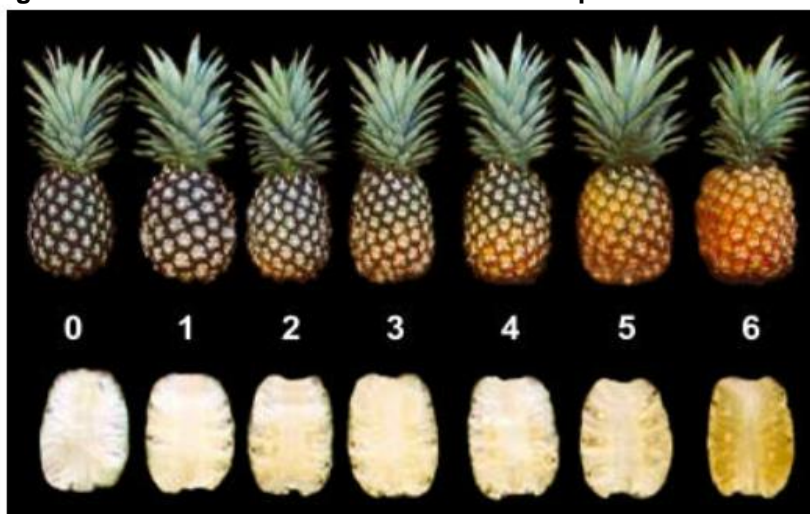
- Deben estar sanas (libres de ataques de insectos y/o enfermedades que demeriten la calidad interna del fruto).
- Deben tener ojos bien formados y llenos.
- Deben presentar un aspecto fresco y consistencia firme.
- Deben estar exentos de cualquier olor y/o sabor extraño (provenientes de otros productos, empaques o recipientes y/o agroquímicos, con los cuales haya estado en contacto).
- Deben estar exentas de quemaduras del sol.

2.1.1 Requisitos de madurez. La madurez de la piña se aprecia visualmente por su color externo y se puede confirmar su estado por medio de la determinación de los sólidos solubles totales y el rendimiento del jugo. Teniendo en cuenta que la fruta inicia su madurez por la base, hacia la corona, en la siguiente Tabla de Color se puede observar el estado de maduración de las cáscaras de piña (Figura 14.)

⁷⁸ SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, et al. Producción De Piña Cayena Lisa Y MD2 (Ananas Comosus L.) En Condiciones De Loma Bonita, Oaxaca. 2015.

⁷⁹ ICONTEC. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 729-1. 1996.

Figura 14. Tabla de color de maduración de la piña.



Fuente: ICONTEC. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 729-1. 1996. P 6.

COLOR 1: algunos ojos del tercio basal han disminuido en la intensidad del verde y surge un leve tono amarillo.

COLOR 2: en la base del fruto se incrementa la cantidad de ojos de la coloración verde con leves tonos amarillos.

COLOR 3: aumenta la intensidad del amarillo en los ojos del tercio basal.

COLOR 4: en la zona basal de la fruta se presenta mayor cantidad de ojos de coloración amarilla con visos anaranjados y muestra además ojos de color verde con leves tonos amarillos en la zona media y de la corona.

COLOR 5: en la zona basal y media se aprecia una coloración amarilla con visos anaranjados. En la zona de la corona aumenta la cantidad de ojos color verde amarillento.

COLOR 6: el fruto presenta una coloración completamente anaranjado.

Por otro lado los valores mínimos y máximos de sólidos solubles totales, que deben presentar cada uno de los estados identificados en la figura 14. Son los siguientes:

Cuadro 3. Contenido de sólidos solubles expresado como grados Brix

COLOR	0	1	2	3	4	5	6
°Bx (Min)	9,3	11.0	12.6	13.2	13.6	14.1	14.5
°Bx (Max)	11.5	12.9	13.5	13.8	14.3	15.1	15.6

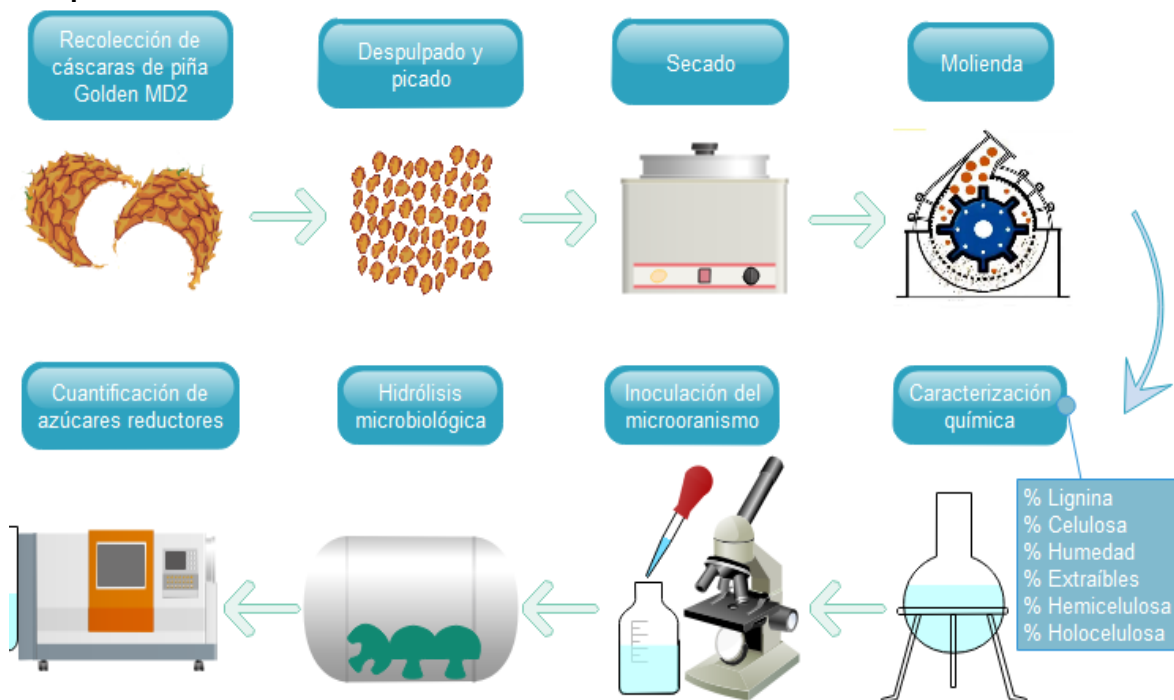
Fuente: ICONTEC. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 729-1. 1996. P 6.

De acuerdo con la figura 14. Se estableció para la obtención de residuos un grado de maduración 4 a 5; maduración donde se encuentra una adecuada concentración de azúcares. Se descartaron los grados 0 a 3 y 6. Los grados de 0 a 3 indican una piña verde y su cáscara no es viable debido a su temprana recolección, lo que la hace propensa a presentar problemas de pudrición, oscurecimiento, daño en los frutículos, presencia de mohos, daños fisiológicos y daños mecánicos, por otro lado el grado 6, muestra una piña totalmente madura, y su cáscara es propensa a una rápida descomposición.

3. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental se divide en una adecuación y caracterización de las cáscaras de piña, hidrólisis microbiológica a partir de fermentación sólida con el hongo *Trichoderma reesei*, obtención de azúcares reductores y determinación de actividad enzimática como se puede observar en el esquema 1.

Esquema 1. Proceso de obtención de azúcares reductores



3.1 OBTENCIÓN DE RESIDUOS Y MUESTREO

3.1.1 Proceso de obtención. Las cáscaras de piña se adquirieron en el centro de acopio de Corabastos, este se encuentra ubicado en la ciudad de Bogotá, Colombia en la Carrera 58 No. 80 – 87 en donde las cáscaras representan un subproducto de su venta principal, estas fueron reunidas en bolsas aisladas, recogidas el día domingo 20 de marzo por un muestreo aleatorio simple.

A continuación se seleccionan una a una visualmente las cáscaras que cumplen con los requisitos previamente mencionados, verificando que sus características correspondan a las de la variedad Golden MD2, además se da especial atención a su color, que corresponda a una piña madura, de grado de madurez 4 o 5 (ver figura 14.), también a su limpieza, es decir que no estén mezcladas con otros residuos, que estén libres de daños ocasionados por insectos para evitar crecimiento de microorganismos indeseados y a su vez se evalúan sus propiedades organolépticas cuidando que estén exentas de cualquier olor que indique un estado de descomposición.

Debido a que los procesos de pre tratamiento no se pueden realizar el mismo día de la recolección de la muestra, se hace necesaria una adecuación de las cáscaras para evitar una posible contaminación por agentes externos o por la presencia de microorganismos que modifiquen su composición y aceleren el proceso de fermentación, estos procesos de transformación se dan principalmente en condiciones de humedad elevada, y presencia de oxígeno, por lo que estas condiciones se deben restringir durante el almacenamiento.

La primera etapa del acondicionamiento de la muestra consiste en un lavado con agua potable y fría, posteriormente se elimina la pulpa de piña que queda adherida a la cáscara, y se reduce su tamaño para facilitar su secado. Una vez seca se almacena en frascos de vidrio sellados y se refrigeran⁸⁰.

3.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO

En el pretratamiento mecánico se involucran dos procesos: secado y molienda, estos se realizan con el objetivo de facilitar el desarrollo de los procesos siguientes. La disminución de tamaño de partículas permite un incremento del área superficial específica, disminución del tiempo de digestión y del grado de polimerización lo que permite incrementar los rendimientos de la hidrólisis.⁸¹

3.2.1 Secado. Se usó una estufa marca TECNAL modelo TE-393/1 MP, con una potencia de 1100W y un voltaje requerido de 220V en el Laboratorio de la Universidad de América. La temperatura de secado fue de $80 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4h, con esta temperatura se garantiza pérdida de humedad y a su vez que no se degraden las estructuras de los azúcares presentes debido a una termólisis⁸².

3.2.2 Molienda y tamizado. Para la molienda se utilizó un molino de martillo marca SIEMENS, con una potencia de 2HP, velocidad de martillo de 1710rpm y motor 1LF3, y se utilizó una malla de 3mm. Posteriormente se emplea un vibro tamiz vertical marca Pinzuar LTDA, modelo PS-35, serie 1358, con voltaje requerido de 110V, con 6 tamices, No. 20, 30,35,40,45 y 50 junto con una tapa y un fondo. Se sitúa el material en el tamiz superior y las partículas van pasando a través de los tamices que tienen diferente luz de malla, finalmente se seleccionan las partículas de diámetro menor a 0.6mm (malla No. 30), tamaño que asegura un

⁸⁰ RAMIREZ,Sandra y REYES,Camila. Aprovechamiento De Residuos Lignocelulósicos De La Ananas Comosus (Piña) Para La Producción De Xilitol Por Hidrólisis Enzimática. Fundación Universidad de América, 2017.

⁸¹ DELGENES,J. P.; PENAUD,V. y MOLETTA,R. Pretreatments for the Enhancement of Anaerobic Digestion of Solid Wastes. En: ChemInform. vol. 34, no. 13,

⁸² GALICIA,Luis, et al. Protocolos De Laboratorio. Laboratorio De Calidad Nutricional De Maiz Y Analisis De Tejido Vegetal 2012. p. 2-6

aumento del área superficial de sustrato por lo tanto de área de contacto disponible para la hidrólisis microbológica⁸³.

3.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

La caracterización de las cáscaras de piña se realizó siguiendo normas técnicas para determinar compuestos químicos como el contenido de extraíbles, por la norma TAPPI 204 cm-97, celulosa, hemicelulosa por la norma ASTM D1103-55 T y lignina por la norma TAPPI 222 om-02, y propiedades físicas como contenido de humedad, por la norma A.O.A.C 934.06 ya que estas propiedades interfieren en el proceso de hidrólisis microbológica de celulosa y hemicelulosa para la obtención de azúcares reductores.

La determinación de la composición de las cáscaras de piña permite hacer la selección del microorganismo que se utilizará en la fermentación sólida, y permite ajustar las condiciones del sustrato para facilitar el proceso de hidrólisis microbológica.

3.3.1 Determinación de humedad. Este análisis se realiza según la metodología de la norma Official Methods of Analysis A.O.A.C 934.06⁸⁴ 15th Edition 1990. El porcentaje de humedad se calcula haciendo uso de la ecuación 1.

Se toma una cápsula con tapa y se somete a secado en estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante una hora, esta se enfría en desecador de 30 a 45 minutos y se pesa (m_1). Se pesan en la cápsula 5g de muestra de la cáscara previamente homogeneizada (m_2). Se somete el conjunto anterior a calentamiento en estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 horas, se enfría en desecador de 30 a 45 minutos y se pesa (m_3). Se repite el procedimiento anterior para el conjunto del crisol con la muestra hasta obtener peso constante.

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

Ecuación 1. Determinación de porcentaje de humedad

$$\%Humedad = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

Dónde:

m1: masa del crisol vacío y de su tapa.

m2: masa del crisol tapado con la muestra antes del secado.

m3: masa del crisol con tapa más la muestra desecada

⁸³ NIÑO, Lilibeth; ACOSTA, Alejandro y GELVEZ, Ricardo. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca. En: Revista Facultad De Ingeniería Universidad De Antioquia. no. 30, p. 155-168

⁸⁴ Codex-Adopted—AOAC Method. AOAC Official Method 934.06 Moisture in Dried Fruits. 2000.

3.3.2 Determinación de extraíbles. Los extraíbles son materiales solubles en agua y solventes orgánicos y generalmente representan una pequeña fracción de la planta, pero no por ello dejan de ser de gran importancia en las características y propiedades de ella. Con la extracción se pueden remover taninos condensados, resinas, ceras, grasas, clorofilas, carotenoides y algunas proporciones de gomas.⁸⁵

La determinación del porcentaje de extraíbles se realiza siguiendo la metodología de la norma TAPPI 204 cm-97⁸⁶. El porcentaje de extraíbles se calcula haciendo uso de la ecuación 2.

Se pesan 7,5g de piña seca, molida y tamizada, se deposita en un dedal de extracción dentro de un equipo soxhlet.

Como solvente se usa una mezcla de 200mL de hexano y 150mL de etanol y se ajusta la llama para recircular el solvente 3 veces por hora. Luego de 4 horas se transfiere la muestra sin extraíbles a un crisol de peso conocido, se seca en la mufla a 105°C durante 4 horas, se transfiere a un desecador por 30 minutos, se pesa y se continúa secando hasta peso constante.

Ecuación 2. Determinación de porcentaje de extraíbles.

$$\% \text{ Extraíbles} = \frac{\text{Peso seco de la muestra} - \text{Peso de la muestra sin extracto}}{\text{Peso de la muestra de la piña}} * 100$$

3.3.3 Porcentaje de lignina. La lignina es la principal responsable de la rigidez en las paredes de las células vegetales, también puede llegar a ser una protección frente al ataque de gérmenes patógenos y agresiones mecánicas.⁸⁷ por tal motivo es importante medir la cantidad inicial de lignina presente en la piña para así determinar la cantidad de material que debe ser extraída en el pretratamiento para que el proceso de hidrólisis sea más efectivo teniendo en cuenta que será más fácil acceder para convertir en azúcares reductores.

3.3.3.1 Lignina insoluble en ácido. La determinación del porcentaje de lignina insoluble en ácido se realiza siguiendo la metodología TAPPI Reaffirmation of T 222 om-02.⁸⁸

⁸⁵ BARROSO CASILLAS, Miguel. Pretratamiento De Biomasa Celulósica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería. E.U.I.T. Forestal (UPM), 2010. p. 115

⁸⁶ TAPPI. Solvent Extractives of Wood and Pulp (Proposed Revision of T 204 Cm-97). 2007.

⁸⁷ Hector Fabio Montaña Morales. Producción De Bioetanol a Partir De Material Lignocelulósico De Moringa Oleífera. Universidad Nacional de Colombia, 2014.

⁸⁸ TAPPI. Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp (Reaffirmation of T 222 Om-02) 2006.

Se pesan 500mg de piña seca, molida y tamizada por medio de una malla No. 40 y 45, libre de extraíbles y con humedad conocida.

La muestra se pone en un beaker y se agregan 15mL de ácido sulfúrico al 72 % gradualmente en pequeños incrementos mientras se revuelve y macera el material con un agitador de vidrio. El vaso de precipitados debe mantenerse en un baño a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Después de que la muestra se haya dispersado, se cubre el vaso con un vidrio de reloj y se mantiene en un baño a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. Se revuelve el material para garantizar una solución completa.

Se agrega agua destilada al matraz y se diluye hasta una concentración del 3% de ácido sulfúrico, se hierve la solución por 4 h, manteniendo un volumen constante mediante la adición frecuente de agua caliente.

Se filtra la suspensión en papel filtro y se lava con agua destilada hasta pH neutro, se seca el crisol con lignina en un horno a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante, se enfría en desecador y se pesa. La masa obtenida es la lignina insoluble en ácido presente.

La solución filtrada (hidrolizado) se utiliza para la determinación de lignina soluble en ácido.

3.3.3.2 Lignina soluble en ácido. La determinación del porcentaje de lignina soluble en ácido se realiza siguiendo la metodología LAP-004.⁸⁹

Se utiliza la solución obtenida después de filtrar la lignina insoluble, mediante método espectrofotométrico, para esto se configura y calibra el espectrofotómetro, se mide la absorbancia del hidrolizado a 205nm, usando una celda de 1 cm. Como un blanco de referencia se debe usar una solución al 4% de H₂SO₄.

Si la lectura de absorbancia excede 0,7, la muestra debe diluirse. Diluya la muestra de manera que la lectura de absorbancia resultante esté entre 0.2 y 0.7.

El blanco debe diluirse en la misma proporción.

Para calcularla se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Porcentaje de lignina soluble en ácido.

$$\%ASL = \frac{\frac{A}{b * a} * df * V * \frac{L}{1000mL}}{\frac{W * T_{final}}{100}} * 100$$

⁸⁹ EHRMAN, Tina. Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass. En: The Science Teacher. Mar 1, . vol. 80, no. 3, p. 48

Dónde:

A=absorbancia a 205nm.

df = factor de dilución.

b = longitud de celda, 1 cm.

a = absorptividad, igual a 110 L / g-cm

V = Volumen filtrado obtenido en la determinación de lignina insoluble en ácido expresado en mL.

W = peso de la muestra de biomasa inicial en gramos.

% Tfinal =% del contenido total de sólidos de la muestra de biomasa calculado así:

Ecuación 4. Contenido de sólidos de la muestra de biomasa.

$$\%T_{final} = \frac{\text{Peso seco de la muestra más papel filtro} - \text{peso del papel filtro}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} * 100$$

3.3.4 Determinación de holocelulosa. La determinación de holocelulosa se realiza siguiendo la metodología descrita en la norma ASTM D1104.⁹⁰

Se pesan 2.5g de piña seca, libre de extractivos, molida y tamizada por medio de una malla No. 40. Se agregan 80mL de agua destilada a 75°C, 0.5mL de ácido acético y 1g de clorito de sodio al 80%. El matraz se mantuvo a 75°C durante 60 minutos, en cuyo momento se añadieron 0,5 ml adicionales de ácido acético y 1g de clorito de sodio al 80% (p / p). El ciclo de 60 minutos se repitió en el transcurso de 4 horas. Al final del período de 4 horas, el matraz se enfrió con agua para detener la reacción. La mezcla se filtró usando un matraz de kitasato y una bomba de vacío; se secó a 105°C hasta peso constante, el peso final es la holocelulosa, puede calcularse el rendimiento de holocelulosa siguiendo la ecuación 5.

Ecuación 5. Porcentaje de holocelulosa.

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{peso de holocelulosa}}{\text{peso seco de la muestra}} * 100$$

3.3.5 Determinación de celulosa y hemicelulosa. La determinación de celulosa se lleva a cabo siguiendo la metodología de la norma ASTM D1103-55 T.⁹¹

Se pesa 1g de holocelulosa obtenida en análisis de cuantificación de holocelulosa (descrita anteriormente) se hace reaccionar con 25mL de hidróxido de sodio al 17,5% durante 45 minutos, luego se diluye con 30mL de agua destilada, se agita y

⁹⁰ American Society for Testing Materials. ASTM D1104-56 Method of Test for Holocellulose in Wood. University of Florida, George A. Smathers Libraries, 1959b.

⁹¹ American Society for Testing Materials. ASTM D1103-55 T Method of Test for Alpha-Cellulose in Wood. University of Florida, George A. Smathers Libraries, 1959a.

se deja reposar. La suspensión de fibra se filtra al vacío, lavando con hidróxido de sodio al 17,5% y agua destilada. Se agregan 15mL de ácido acético al 10% durante 5 min mientras se continúa aplicando vacío, la α -celulosa neutralizada se lava con agua destilada. La muestra obtenida se lleva a secado a 105°C por 4 horas, se transfiere a un desecador por 30 minutos, se pesa, el peso final es la α -celulosa. El rendimiento se calculó con la ecuación 6.

Ecuación 6. Porcentaje de celulosa.

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{peso de celulosa}}{\text{peso seco de la muestra}} * 100$$

La cantidad de hemicelulosa es determina a través de la diferencia entre la cantidad inicial de holocelulosa y la cantidad de celulosa, empleando la ecuación 7.

Ecuación 7. Porcentaje de hemicelulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \frac{\text{Peso de holocelulosa} - \text{peso de celulosa}}{\text{peso de holocelulosa}} * 100$$

3.4 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS

El conteo celular en cámara de Neubauer se realiza siguiendo la metodología descrita a continuación:

Se realiza una preparación de la muestra: cada tipo de muestra a medir debe cumplir con unos parámetros de concentración aptas para su conteo, generalmente el rango de concentraciones que un hematocitómetro (cámara de Neubauer) puede contar esta entre $2,5 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^6$ células por mL, si la concentración de células es menor al valor aconsejado no es posible realizar una estimación lo suficientemente confiable del contenido de células, si por el contrario el número de células es superior a 2,5 millones la probabilidad de cometer errores aumenta de forma considerable al momento de realizar el conteo, por tal razón si se supera esta concentración la muestra debe ser diluida para aproximarse al rango óptimo.⁹²

Teniendo la concentración adecuada para el recuento se introduce la muestra a la cámara, para esto es necesario tomar una alícuota de 10 micro litros de la mezcla preparada, se pone un cubreobjetos sobre la cámara y la punta de la pipeta se ubica en la base del cubre objetos, en el extremo de la cámara, por capilaridad se deja que el líquido penetre entre la cavidad formada por ambas superficies.

⁹² BASTIDAS. Op. cit., p. 2

La cámara de Neubauer es ubicada en la base del microscopio y se fija con ayuda de la pinza ubicada en dicha base, a continuación se enfoca el microscopio hasta que puedan verse de forma clara las células, se ubica la imagen en el primer recuadro de la cámara para iniciar el conteo, en esta etapa existe una convención por la cual si la célula toca el límite superior o el límite izquierdo de las líneas, deben contabilizarse dentro de esta zona, las células ubicadas en los otros límites no se contabilizan en este recuadro si no en el recuadro donde estos límites corresponden al límite superior e izquierdo, con el fin de no contar más de una vez la misma célula.

Una vez realizado el conteo se utiliza la siguiente ecuación para determinar la concentración de la mezcla.

Ecuación 8. Concentración celular.

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \frac{\text{número de células}}{\text{volumen (ml)}}$$

El valor del volumen debe ser calculado teniendo en cuenta las dimensiones del recuadro donde se realizó el conteo, el volumen del recuadrado es igual a:

$$\begin{aligned} 0,1 \text{ cm} * 0,1 \text{ cm} &= 0,01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie} \\ 0,01 \text{ cm}^2 * 0,1 \text{ mm (profundidad)} &= 0,01 \text{ cm}^2 * 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 \\ 0,0001 \text{ cm}^3 &= 0,0001 \text{ ml} \end{aligned}$$

El número de células es la suma de células presentes en los recuadros, el volumen corresponde al total de los recuadros donde se realizó el recuento.⁹³ En caso de haber sido necesario realizar una dilución y adicionalmente que el recuento se haya realizado en cuadros grandes en una cámara de Neubauer la formula quedara:

Ecuación 9. Concentración celular en caso de dilución.

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \frac{\text{número de células} * 10000}{\text{volumen (ml)} * \text{dilución}}$$

3.5 HIDRÓLISIS MICROBIOLÓGICA

Los microorganismos más comúnmente empleados en la fermentación sólida son los hongos filamentosos, seguidos de las levaduras, los actinomicetos y las bacterias. Los hongos filamentosos son los microorganismos más eficientes en la degradación de sustratos sólidos por su potencial de excreción de enzimas hidrolíticas, y el crecimiento mediante hifas por lo que resulta más fácil su

⁹³ BASTIDAS,. Op. Cit. p 3.

colonización y la utilización de los nutrientes disponibles debido al poder de penetrar en el sustrato sólido.

En esta investigación el microorganismo seleccionado para realizar el proceso de hidrólisis de las cáscaras de piña es el hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, debido a que estos microorganismos corresponden al grupo de hongos de podredumbre blanca, los cuales han evolucionado con la capacidad de degradar los componentes principales de la pared celular vegetal como la lignina, celulosa y hemicelulosa.⁹⁴ Este proceso de degradación ocurre debido a la presencia de enzimas degradadoras de lignina conocidas como lacasas y peroxidasas.⁹⁵

Por otro lado, conocer la composición del sustrato utilizado como soporte para la fermentación en estado sólido y hacer un correcto pretratamiento físico es esencial ya que de ello depende el éxito del proceso. En cada reactor se introducen 100g de cáscaras de piña molidas y tamizadas con un tamaño de partícula inferior a 0.6mm, como fuente de carbono y se ajusta su humedad a 70%, posteriormente, los reactores con los residuos se esterilizan en autoclave a 15psi, 120°C, durante 30 min, se dejan enfriar hasta 22°C y en forma aséptica se inocula con una solución de medio de cultivo de $5,06 \times 10^6$ esporas/mL de *Trichoderma reesei*.

Los biorreactores se ubican en la estructura de rotación y ésta dentro de una caja hecha de poliestireno expandido para conservar su temperatura alrededor de 20°C la cual es controlada por medio de un indicador de temperatura ubicado en el interior de los biorreactores estando en contacto con el sustrato durante 20 días aproximadamente.

3.6 ADECUACIÓN DE LA MUESTRA HIDROLIZADA

Para la adecuación de la muestra se siguió la metodología descrita por Muniswaran et al⁹⁶. Para 10 gramos de sustrato hidrolizado, se agregan 100mL de agua destilada y se agita a 130 rpm a temperatura de 28°C durante 2 horas. La mezcla se filtra a través de una tela de nylon de malla 200. La porción líquida se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se usa para analizar los azúcares reductores y la actividad enzimática. La porción sólida se utiliza para determinación de actividad enzimática.

⁹⁴ SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. En: Biotechnology Advances. vol. 27, no. 2, p. 185-194

⁹⁵ KUMAR, Adep y SHARMA, Shaishav. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: Bioresour Bioprocess. vol. 4, no. 1,

⁹⁶ MUNISWARAN, P. K. Ananda; SELVAKUMAR, Pitchaivelu y Charyulu, N C L Narasimha. Production of cellulases from coconut coir pith in solid state fermentation. En: Journal of Chemical Technology AND Biotechnology. Jun. vol. 60, no. 2, p. 147-151

3.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de azúcares reductores se lleva a cabo haciendo uso del método DNS desarrollado por Miller⁹⁷. Se analiza cada tratamiento de hidrólisis previamente realizado.

3.7.1 Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico. El reactivo es preparado en caliente, pesando 0,5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15g de sal Rochelle (Tartrato de Na-K) y 0,8g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 40mL de agua destilada, luego en agitación es agregado lentamente el tartrato de Na-K y se añade lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. El recipiente se pone en baño de maría a una temperatura de 92°C con agitación constante por aproximadamente una hora, de manera que pasado este tiempo no se observen partículas sólidas de las sustancias utilizadas; se enfría el reactivo y se completa con agua destilada a un volumen de 50mL, se filtra y almacena inmediatamente en frasco de ámbar debido a que este es sensible a la luz.

3.7.2 Curva de calibración método DNS. Para la construcción de la curva de calibración por medio de la cual se determinaran las concentraciones desconocidas de azúcares presentes en las muestras hidrolizadas se debe preparar una solución patrón de glucosa cuya concentración sea de 2g/L, posteriormente se realizan diluciones, finalmente se realiza la medición de las absorbancias de cada una de estas muestras a una longitud de onda de 540nm, las cuales son graficadas versus la concentración conocida de glucosa y de esta forma poder realizar la linealización para obtener una ecuación en donde se reemplazara el valor de las absorbancias de las muestras hidrolizadas para obtener la concentración de azúcares en la muestra. ⁹⁸

3.7.3 Cuantificación de azúcares. inicialmente para obtener un medio líquido al cual se le pueda medir la absorbancia es necesario que para cada gramo de sustrato inicial se le agreguen 10mL de agua destilada los cuales son agitados a 130rpm a temperatura de 27°C durante dos horas, esta mezcla se filtra por medio de un papel filtro millipore de 0,45 micrómetros del cual se obtiene una porción líquida que debe ser centrifugada a 10000rpm durante 15 min a 4°C de este proceso se obtendrá un sobrenadante⁹⁹ el cual se utilizara para la medición de azúcares reductores mediante el método DNS haciendo uso del reactivo previamente preparado.

⁹⁷ MILLER., Op. Cit., p 2.

⁹⁸ GAITÁN, Diana y PÉREZ, Liliana. Aislamiento Y Evaluación De Microorganismos Celulolíticos a Partir De Residuos Vegetales Frescos Y En Compost Generados En Un Cultivo De Crisantemo (*Dendranthema Grandiflora*). Pontificia universidad Javeriana, 2007.

⁹⁹ MOHTAR, Wan; MUHANNAD, Illayan y KADER, Jalil. Solid substrate and submerged culture fermentation of sugar cane bagasse for the production of cellulase and reducing sugars by a local isolate, *Aspergillus terreus* SUK-1. En: *Journal of Microbiology and Biotechnology*. vol. 10, no. 5, p. 770-775

En tubos de ensayo se adicionan 0,25mL de cada una de las muestras hidrolizadas, de las cuales se desconoce la concentración de azúcar, se agrega 0,25mL de reactivo DNS, se agitan los tubos en vórtex, se calientan en baño maría a una temperatura de 92°C por 10 min. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalisílico es reducido en presencia de calor, por el contacto con azúcares reductores, se desarrolla un cambio de color de amarillo a naranja ladrillo, se sumergen en agua fría por 10min para frenar la reacción y se agregan 2,5mL de agua destilada; el cambio de coloración puede determinarse por lecturas de densidad óptica, haciendo uso de equipo de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm¹⁰⁰. Es necesario preparar el blanco adicionando 0,25mL de extracto de piña sin realizar el proceso de hidrólisis y 0,25mL de reactivo DNS en un tubo de ensayo al cual se le realiza el mismo proceso descrito anteriormente.

3.8 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CELULASAS TOTALES

Para la determinación de la actividad total de celulasas en el sustrato se utiliza la técnica de actividad de papel de filtro de acuerdo al procedimiento de Adney *et al*¹⁰¹

Para las muestras de enzimas se añade 1 tira de papel filtro Whatman No. 1 de 1cm x 6cm la cual debe ser enrollada, se adiciona 1mL de buffer citrato de sodio 0.05M pH 4.8 y debe saturar la tira de papel de filtro, se toman 0,5mL del sobrenadante obtenido después de adecuar la muestra hidrolizada como se indicó en el ítem 3.6. Se deben hacer al menos dos diluciones de cada muestra de enzima, con una dilución que libera un poco más de 2,0 mg de glucosa (cantidad absoluta) y una levemente menos de 2,0 mg de glucosa. Los valores esperados según lo descrito corresponden a 2,1 y 1,9 mg de glucosa, respectivamente, para estas dos diluciones. La mezcla se incuba durante 1h a 50°C, se agregan 3mL de reactivo DNS para detener la reacción y se mezcla bien.

La suspensión se mezcla bien y los tubos se transfieren a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se deja enfriar y se añaden 20mL de agua destilada. Finalmente, los tubos se dejan reposar durante al menos 20 minutos para permitir que la fracción sólida se sedimente, y el sobrenadante se lee en un espectrofotómetro a 540 nm. Para la preparación del blanco se sigue el mismo procedimiento evitando la adición del papel filtro Whatman para corregir la cuantificación de azúcares reductores presentes en la preparación de la enzima. Los mg de glucosa producidos en esta prueba son la actividad del papel de filtro (FP).

¹⁰⁰ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: Analytical Chemistry. Mar 1, vol. 31, no. 3, p. 426-428

¹⁰¹ ADNEY, B. y BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. Golden, Colo: National Renewable Energy Laboratory, 2008.

Para el cálculo de la actividad de celulasas totales:

Se construye una curva patrón usando cantidades absolutas de glucosa (mg / 0.5mL) trazadas contra 540nm. Usando este estándar, indicando los valores de absorbancia de los tubos de muestra en glucosa. Indicar las diluciones utilizadas a las concentraciones de enzimas:

$$\text{Concentración} = \frac{1}{\text{Dilución}} = \frac{\text{Volumen de enzimas en dilución}}{\text{Volumen total de dilución}}$$

Estimar la concentración de la enzima que habría liberado exactamente 2 mg de glucosa al trazar la glucosa producida contra la concentración de la enzima. Y finalmente calcular la unidad de FPase (FPU):

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentración de enzima para producir 2mg de glucosa}}$$

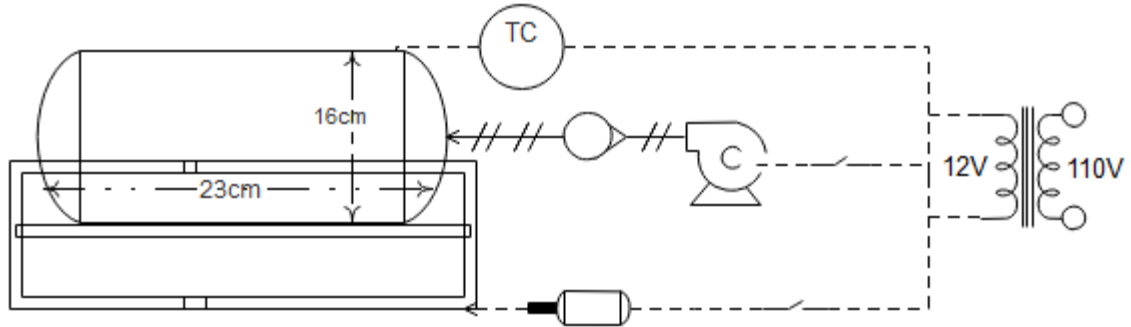
Las unidades de FPU se basan en la unidad internacional (IU)

1 IU = 1 micromol min⁻¹ de sustrato convertido
= 1 micromol min⁻¹ de glucosa formada durante la reacción de hidrólisis
= 0,18 mg min⁻¹ cuando el producto es glucosa

4. PRE DISEÑO DEL BIORREACTOR ROTATORIO

En la figura 15 se puede observar el diagrama de instrumentos de la estructura del biorreactor en donde se evidencia el uso de la bomba de aire para la aireación, el controlador de temperatura y el moto reductor que transfiere el movimiento.

Figura 15. P&ID montaje de biorreactor



4.1 SELECCIÓN DEL BIORREACTOR

Para la selección del biorreactor se toman en consideración los criterios operativos de diseño y control de la fermentación en estado sólido.

- Evitar la entrada de organismos que contaminen el medio y que contenga los microorganismos deseados.
- El volumen del lecho debe permanecer constante, es decir que no haya evaporación.
- Asegurar el tiempo de residencia necesario para el crecimiento del microorganismo.
- Mantener constante la temperatura.
- Se debe proporcionar oxígeno al cultivo para organismos aerobios por medio de aireación y agitación.
- Facilidad en la inoculación y control.
- Facilidad en mantenimiento y procedimientos para el llenado, vaciado y limpieza de los biorreactores.

Para evaluar los criterios descritos en la selección del biorreactor se utiliza un análisis basado en el proceso analítico jerárquico (AHP).

Se asigna un valor numérico a una escala de influencia arbitraria de 1 a 5 que describe la importancia que tiene cada criterio en la toma de decisión donde 1 es “poco importante” y 5 “muy importante” que se puede ver en la tabla 2.

Tabla 2. Importancia de los criterios de selección

Criterio	Importancia
Aireación	5
Contaminación	5
Tiempo de residencia	4
Volumen constante	4
Facilidad de diseño y operación	3
Costos de operación	2

Los principales factores a considerar son la prevención contra la contaminación durante el proceso, originada por el ingreso de microorganismos, esporas u otras impurezas, y que permita el ingreso de un flujo de aire para evaluar su influencia en el crecimiento del microorganismo. A estos dos criterios se les da una importancia de “5” en la escala de influencia porque son “muy importantes” para el desarrollo del proceso.

En segundo lugar se le da importancia de “4” en la escala de influencia debido a que son “importantes”, al tiempo residencia que será el requerido por el microorganismo para su crecimiento y posterior producción de enzimas, que según pre experimentación es de 25 días y al volumen que debe ser constante, esto se refiere a que no haya pérdidas de humedad por evaporación. Finalmente, los criterios con menor importancia son la facilidad de diseño y operación con valor de “3” en la escala de influencia y los costos de operación con valor de “2” en la escala de influencia.

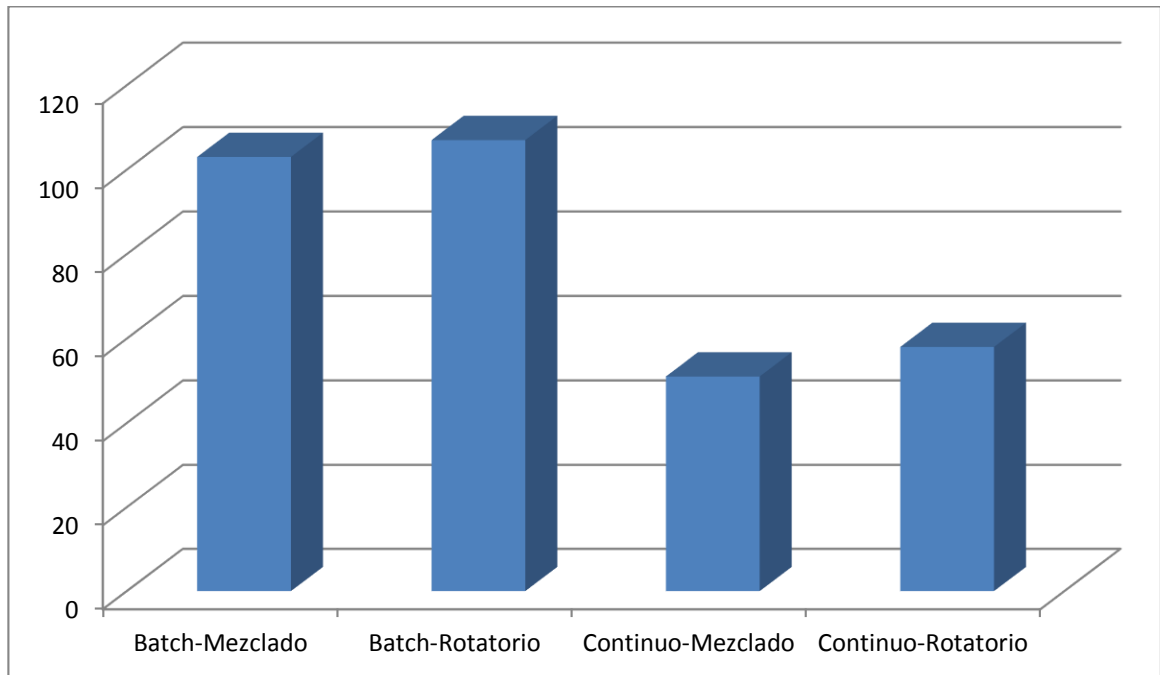
Para la selección del biorreactor se consideran: biorreactor discontinuo o batch y continuo basándose en dos tipos de agitación, rotatorio y mezclado.

Se establece un sistema de valoración arbitrario de 1 a 5 donde 1 representa un bajo cumplimiento del requerimiento por parte del tipo de biorreactor y 5 un alto cumplimiento.

Tabla 3. Valoración para las alternativas del biorreactor.

Criterio/Biorreactor	Importancia	Batch- Mezclado	Batch- Rotatorio	Continuo- Mezclado	Continuo- Rotatorio
Aireación	5	4	4	2	3
Baja contaminación	5	4	5	2	3
Tiempo de residencia	4	5	5	3	3
Volumen constante	4	5	5	1	1
Facilidad diseño y operación	3	5	4	3	2
Costos de operación	2	4	5	3	3
Total		103	107	51	58

Gráfico 2. Resultado gráfico de análisis multicriterio



Según el análisis mostrado en el gráfico 2, el biorreactor que mejor se ajusta a las especificaciones del proceso de hidrólisis haciendo uso de fermentación sólida es el de tambor rotatorio en estado discontinuo o batch.

4.2 SELECCIÓN DE MATERIAL

4.2.1 Tambor rotatorio El material de construcción para el biorreactor se seleccionó teniendo en cuenta las siguientes especificaciones:

- Debe ser transparente para poder visualizar el crecimiento del hongo sin necesidad de abrir el reactor.
- Debe soportar hasta 2 atm y 121°C para someterlo al proceso de esterilización en autoclave.
- No debe presentar corrosión en contacto con agua, aire o metano.
- Debe ser químicamente inerte.
- Se debe construir en una sola pieza.
- Debe estar disponible en Bogotá con un bajo costo.
- Debe ser hermético para fases líquida y gaseosa.
- Debe operar a temperatura ambiente.

Los materiales analizados para la construcción del tambor rotatorio según su transparencia, su baja corrosión y su inercia química son:

- Vidrio.
- Acrílico transparente.
- Policloruro de vinilo transparente.

Teniendo en cuenta que la temperatura de transición vítrea del acrílico es de 105-106°C y la temperatura de transición vítrea del policloruro de vinilo es de 82-87°C¹⁰² se descartan debido a que no son materiales apropiados para someterse a una esterilización por autoclave. Por lo que el material seleccionado para la elaboración del tambor rotatorio es el vidrio.

4.2.2 Estructura rotatoria

Para la elaboración de la estructura rotatoria se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Material liviano.
- Bajo costo.
- Rígido.
- Resistente.
- Fácil de perforar y sellar.
- Proporcione resistencia mecánica.
- Disponibilidad en Bogotá.

Según consultas realizadas en establecimientos especializados en la comercialización de materiales de construcción el material que más se ajustaba a los parámetros solicitados es el policloruro de vinilo (PVC).

4.3 SISTEMA DE AGITACIÓN

Se utiliza para mejorar los fenómenos de transferencia de calor, masa e incubación del hongo. En cada experimento se utilizó un tipo de agitación intermitente, una agitación de un minuto al día, ya que según previas investigaciones, presenta los mejores resultados en la producción de enzimas celulolíticas¹⁰³ y a su vez en la obtención de azúcares reductores. Para controlar la agitación, los biorreactores se sitúan sobre una estructura que consta de un sistema de rodillos que giran de forma continua asistidos por un moto reductor, de inducción de corriente alterna (AC) que cuenta con una capacidad máxima de arrastre de 6Kg, requiere 12V de alimentación, y su eje rota a 32rpm, éste traslada el movimiento a la estructura por medio de un sistema de poleas, y ésta a los recipientes, los cuales giran a 12rpm.

¹⁰² George Wypych. Handbok of Polymers. 2012.

¹⁰³ DÍAZ, Ana Belén. Reciclado Del Orujo De Uva Como Medio Sólido De Fermentación Para La Producción De Enzimas Hidrolíticas De Interés Industrial. Universidad de Cádiz, 2009.

4.4 SISTEMA DE CONTROL DE LA TEMPERATURA

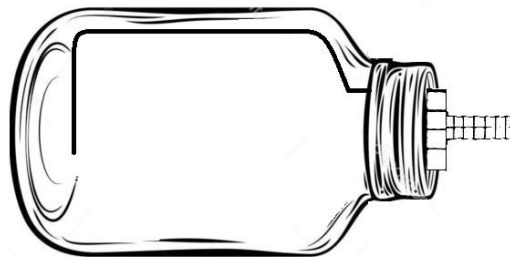
Para hacer la medición de la temperatura se utilizó un termómetro digital de marca Milwaukee modelo TH310 que estaba en contacto con el sustrato. La temperatura estuvo en $19 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.5 AIREACIÓN

El aire necesario para proveer el oxígeno requerido para el desarrollo de los microorganismos se proporciona de dos maneras con el fin de estudiar la influencia de la aireación en la obtención de azúcares reductores.

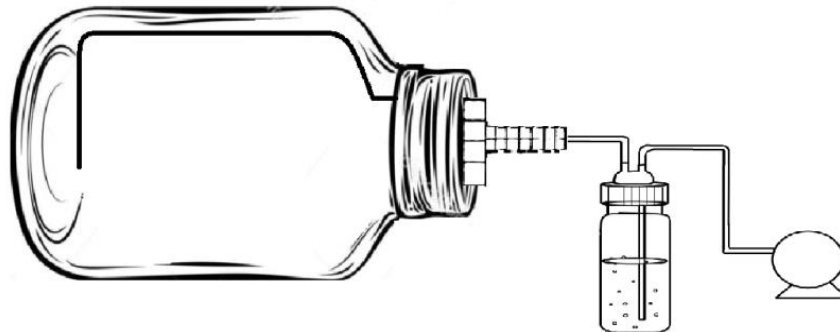
1. Sin aireación forzada: se evaluó situando una boquilla con un orificio de 3,5 cm de diámetro en la tapa del biorreactor para permitir el ingreso del aire a través de un filtro de nitrocelulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de forma análoga a la figura 16.

Figura 16. Biorreactor sin aireación forzada



2. Con aireación forzada: usando una bomba de aire marca JENECA modelo AP-9802, con un caudal de aire de 120mL/min que se regula usando un rotámetro, este ingresa al reactor a través de una boquilla de 3,5 cm de diámetro que cuenta con un filtro de nitrocelulosa de $0,45 \mu\text{m}$, para impedir el paso de microorganismos ajenos al proceso o agentes contaminantes como se observa en la figura 17.

Figura 17. Biorreactor con aireación forzada



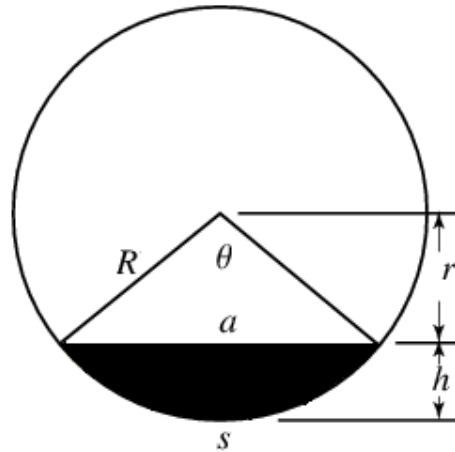
4.6 GEOMETRÍA

La hidrólisis se realiza en medio sólido haciendo uso de biorreactores de tambor rotatorio. El diseño de los biorreactores de tambor rotatorio se basó en la facilidad de adquisición en el mercado por lo que se seleccionaron recipientes de vidrio de 4L, 16 cm de diámetro interno y longitud de 23 cm y se le incorporó con un alambre moldeado en el interior que funciona a modo de raspador con el fin de retirar las cáscaras de piña que puedan quedar adheridas a las paredes del reactor.

Teniendo en cuenta que mientras el biorreactor de tambor rotatorio se encuentra detenido tendrá el mismo comportamiento de un biorreactor de bandejas es necesario limitar la altura del lecho formado con el fin de permitir una adecuada transferencia de oxígeno y así evitar la elevación de la temperatura en el medio tomando en cuenta la geometría observada en la figura 18 tomada de Wolfram. Para esto se considera que la relación entre la superficie superior y el volumen ocupado por el lecho depende del radio interno del biorreactor y de su nivel de llenado.

Inicialmente se determinó experimentalmente la densidad aparente de las cáscaras de piña con diámetro de partícula menor a 0,6mm con humedad del 70%, el valor obtenido fue 0,745g/mL, este valor puede ser utilizado para calcular el volumen ocupado por el lecho si se utiliza una muestra de 100g de cáscaras de piña.

Figura 18. Volumen ocupado por el lecho



Wolfram.Circularsegment.May24,.Disponible en:<http://mathworld.wolfram.com/CircularSegment.html>

Siendo R el radio del biorreactor, θ el ángulo central, s la longitud del arco, h la altura del lecho, y r la altura de la porción triangular, se tiene que:

Ecuación 10. Volumen del lecho ocupado

$$V = \frac{LR^2}{2}(\theta - \sin \theta)$$

Dónde:

$V = \text{Volumen}$

$L = \text{Longitud}$

$R = \text{Radio}$

$\theta = \text{Ángulo central}$

Ecuación 11. Altura del lecho ocupado

$$h = R \left(1 - \cos \frac{\theta}{2} \right)$$

Dónde:

$h = \text{Altura del lecho}$

$R = \text{Radio}$

Experimentalmente se tiene que:

$R = 8\text{cm}$

$L = 23\text{cm}$

$V_{\text{apa}} = 134.228\text{mL}$

Por lo que a partir de la ecuación 1. Se puede calcular el ángulo θ

$$134.228\text{mL} = \frac{23\text{cm} * 8^2}{2}(\theta - \sin \theta)$$

$\theta = 1,05$

Usando la ecuación 2 se calcula la altura del lecho.

$h = 1,077\text{cm}$

Usando 100g de cáscaras de piña con una humedad de 70%, se obtiene un volumen aparente ocupado por el lecho de 134,228mL, y una altura del lecho de 1,077cm lo cual asegura un espacio suficiente sobre su superficie permitiendo una buena agitación del medio y transferencia de aire en el interior del lecho para el control de la temperatura.

El volumen total del biorreactor se calcula como el volumen de un cilindro.

Ecuación 12. Volumen de un cilindro

$$V = L\pi R^2$$

$$V = 23 * \pi * 8^2$$

$$V = 4624,42\text{cm}^3$$

Por lo que se puede definir el nivel de llenado del tambor (ϵ) como la relación entre el volumen del lecho y el volumen total del tambor:

$$\epsilon = \frac{V_{lecho}}{V_{total}}$$

$$\epsilon = \frac{134.228\text{cm}^3}{4624,42\text{cm}^3} = 0,03$$

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 PROCESO DE OBTENCIÓN

Las cáscaras de piña se adquirieron en el centro de acopio de Corabastos, (imagen 2) este se encuentra ubicado en la Ciudad de Bogotá, Colombia en la Carrera 58 No. 80 – 87 sur en donde las cáscaras representan un subproducto de su venta principal, estas fueron reunidas en bolsas aisladas, el día domingo 20 de marzo en el horario de 9a.m a 11:00 a.m.

Imagen 2. Centro de acopio Corabastos



Fuente: <https://plazadecorabastos.jimdo.com/qui%C3%A9nes-somos/nuestra-historia/>

Se realizó una selección de las cáscaras como se observa en la imagen 3 y 4, confirmando que sus características correspondan a las de la variedad Golden MD2, que su color corresponda a una piña madura según la norma técnica colombiana NTC 729-1 un color entre 4 y 5, que estén libres de daños ocasionados por insectos para evitar crecimiento de microorganismos indeseados.

Imagen 3. Cáscaras recolectadas



Imagen 4. Cáscaras seleccionadas



Posteriormente se realizó una adecuación de las cáscaras para evitar contaminación por agentes externos, inicialmente se hizo un lavado con agua potable y fría, se elimina la pulpa de piña que queda adherida a la cáscara como se observa en la imagen 5, y se reduce su tamaño para facilitar su secado (imagen 6). Una vez seca se almacena en frascos de vidrio sellados y se refrigeran.

Imagen 5. Cáscaras de piña golden



Imagen 6. Cáscaras de piña cortadas



A lo largo de todo el proceso hasta la etapa de secado donde se reduce la probabilidad de descomposición del material se almacenaron las cáscaras en una nevera de poliestireno expandido, luego de esta etapa se transfiere el material a recipientes de vidrio sellados con tapa para evitar el aumento de la humedad y la contaminación del sustrato.

5.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO

En el pretratamiento físico se reduce el contenido de humedad presente en las cáscaras para retardar los procesos de descomposición y se disminuye el tamaño de partícula para aumentar el área superficial específica de las cáscaras de piña y por ende la capacidad de acción enzimática del microorganismo.

5.2.1 Secado. Se midieron 3500g de cáscara de piña golden y se secaron en una estufa marca TECNAL, modelo TE-393/1 MP, con una potencia de 1100W y un voltaje requerido de 220V en el Laboratorio de la Universidad de América. La temperatura de secado fue de 80 ± 2 °C, durante 10 horas, terminado este procedimiento se observó una gran disminución de volumen y masa de las cáscaras, debido a su alto porcentaje de humedad. Finalmente, se obtuvieron 2170g de cáscaras de piña seca lo que indicó una humedad de 38%.

5.2.2 Molienda y tamizado. Las cáscaras de piña resultantes del proceso de secado se molieron en un molino de martillos marca SIEMENS, con una potencia de 2HP, velocidad de martillo de 1710rpm y motor 1LF3 el cual se puede observar en la imagen 7, y se utilizó una malla de 3mm, en este proceso se producen

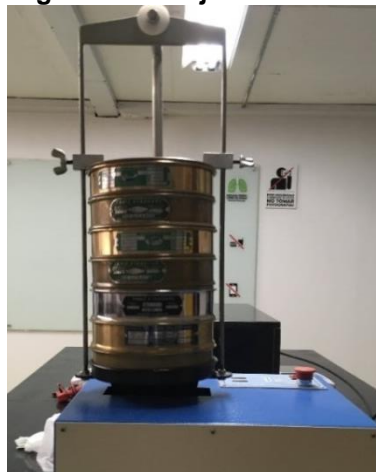
perdidas de masa debido al flujo de aire que arrastra las partículas más finas que son expulsadas por la parte superior del molino debido a la fuerza centrífuga que experimentan las partículas por la velocidad con la que giran los martillos, adicionalmente en las uniones de la estructura superior con la base se escapan partículas del material.

Imagen 7. Molino de martillos



La muestra obtenida se tamizó en un sistema de vibro tamiz vertical marca Pinzuar LTDA, modelo PS-35, serie 1358, con voltaje requerido de 110V compuesto por 6 mallas de especificación NTC 32 (ASTM E-11-87)¹⁰⁴ No. 20, 30, 35, 40, 45 y 50, con una tapa y un fondo (imagen 8), después de tamizadas y separadas las partículas según su diámetro se seleccionaron las cáscaras de piña cuyo diámetro de partícula era menor a 0,6mm¹⁰⁵ (debajo de la malla No. 30), la suma de la masa obtenida fue de 1014g lo que corresponde a un 47,12% de la masa total obtenida en los tamices, la cual fue de 2152g, esto indica una pérdida de 18g durante la molienda y tamizado.

Imagen 8. Montaje del sistema vibratorio



¹⁰⁴ ICONTEC. NTC 32. Tejido De Alambre Y Tamices Para Propósitos De Ensayo. 2002.

¹⁰⁵ NIÑO LÓPEZ., Op. Cit., p. 323

La masa presente en cada una de las mallas luego del proceso de tamizado se puede observar en la tabla número 4.

Tabla 4. Masa obtenida en el proceso de tamizado

Malla N°	Gramos de muestra	Tamaño de partícula (mm)
20	628	0,85
30	510	0,6
35	396	0,5
40	389	0,425
45	165	0,355
50	64	<0,3
Pérdidas	18	----
Total	2170g	

Debido a que el material obtenido desde la malla número 30 es apto para el proceso de hidrólisis se realiza un mezclado de las partículas obtenidas en las mallas 35, 40, 45 y 50.

5.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los compuestos químicos presentes en la cáscara de piña difieren según las condiciones de cultivo, como el clima, zonas de cultivo, variedad, el grado de madurez, entre otros, los cuales pueden afectar el rendimiento de la cáscara de piña (sustrato) al ser sometido a una reacción de hidrólisis.

Por tal motivo es necesario cuantificar los compuestos químicos presentes en la cáscara de piña, y así seleccionar los procesos y microorganismos más eficientes para la obtención de azúcares reductores.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de las cáscaras de piña.

5.3.1 Porcentaje de humedad. El porcentaje de humedad se calculó para las cáscaras de piña que tenían un secado previo debido al alto contenido de agua que tiene la piña. El análisis se realizó por duplicado (imagen 9) utilizando la ecuación 1.

Análisis 1.

La masa del crisol vacío y de su tapa fue: 24,7462g

La masa del crisol con tapa más la muestra antes del secado fue: 29,7285g

La masa del crisol con tapa más la muestra desecada hasta peso constante fue: 29,1158g.

$$\%Humedad = \frac{29,7285 - 29,1158}{29,7285 - 24,7462} * 100 = 12,29\%$$

Análisis 2.

La masa del crisol vacío y de su tapa fue: 25,3202g

La masa del crisol con tapa más la muestra antes del secado fue: 30,6002g

La masa del crisol con tapa más la muestra desecada hasta peso constante fue: 29,9699g

$$\%Humedad = \frac{30,6002 - 29,9699}{30,6002 - 25,3202} * 100 = 11,93\%$$

$$Promedio = \frac{12,29 + 11,93}{2} = 12,11\%$$

Imagen 9. Cáscara de piña desecada



5.3.2 Determinación de extraíbles. Se tomó una masa de muestra de 10g, teniendo en cuenta que el porcentaje de humedad de la muestra de la piña es de 12,11% por lo tanto, la muestra para análisis de extraíbles sin humedad es 8,789g y se introdujo en un montaje soxhlet como se muestra en la imagen 10.

Imagen 10. Montaje soxhlet



El porcentaje de extraíbles se calculó con la ecuación 2.

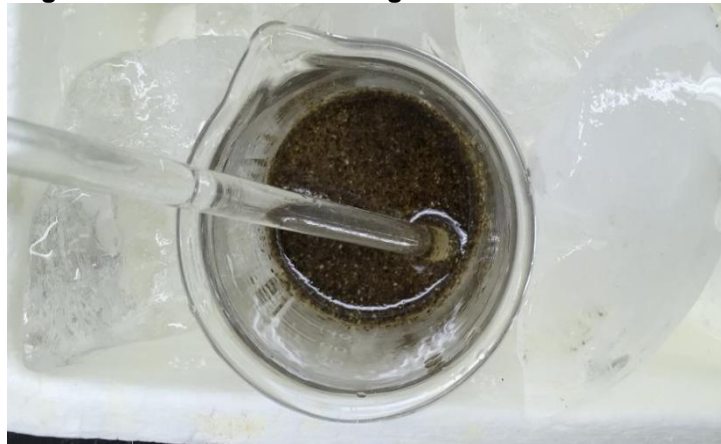
La masa de la muestra libre de extraíbles fue de 8,0491g se secó en una mufla a 105°C hasta peso constante durante 4 horas y la masa obtenida fue de 7,1867g.

$$\%Extraíbles = \frac{8,789 - 7,1867}{8,789} * 100 = 18,23\%$$

5.3.3 Determinación de contenido de lignina. El contenido de lignina corresponde a la suma de lignina insoluble en ácido y lignina soluble en ácido.

5.3.3.1 Lignina insoluble en ácido. Se tomó una muestra de 0,5g libre de extraíbles y humedad. (imagen 11)

Imagen 11. Determinación de lignina insoluble en ácido.



La masa del papel filtro usado fue de 0,3215g.

La masa del papel filtro más la masa de lignina húmeda fue de 1,2037g, se secó en mufla a 105°C hasta peso constante y la masa obtenida de papel filtro más lignina fue de 0,3534g, por lo tanto la masa de lignina insoluble en ácido fue de 0,0319g.

$$\%Lignina\ insoluble\ en\ ácido = \frac{0,0319}{0,5} * 100 = 6,38\%$$

5.3.3.2 Lignina soluble en ácido. El hidrolizado obtenido de la filtración de lignina insoluble en ácido es utilizado para el análisis de lignina soluble en ácido, mediante método espectrofotométrico usando una longitud de onda de 205nm.

El volumen del hidrolizado obtenido de la filtración de lignina insoluble en ácido es de 360mL al cual se le mide absorbancia a longitud de onda de 205nm, estos datos fueron:

1. 0,445 unidades de Absorbancia.
2. 0,463 unidades de Absorbancia.
3. 0,447 unidades de Absorbancia.
4. 0,457 unidades de Absorbancia.
5. 0,451 unidades de Absorbancia.

Al hacer un promedio se obtiene una absorbancia de 0,452.

Para la determinación del porcentaje de lignina soluble en ácido se usan las ecuaciones 3 y 4 (página 56).

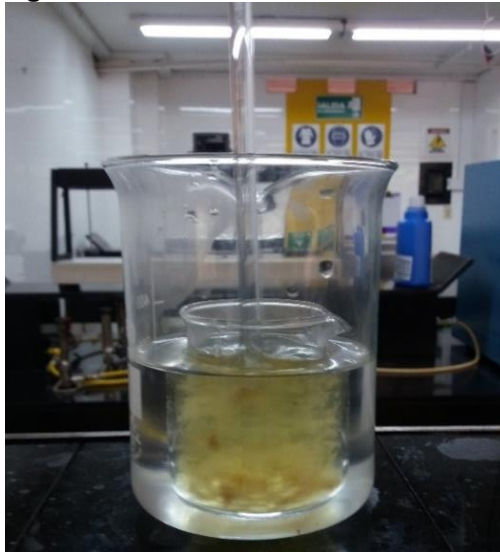
$$\%T_{final} = \frac{0,3534 - 0,3215}{1,2037 - 0,3215} * 100 = 3,616\%$$

$$\%ASL = \frac{\frac{0,452}{1\text{cm} * \frac{110L}{g \cdot \text{cm}}} * 360\text{mL} * \frac{L}{1000\text{mL}}}{\frac{0,5g * 3,616}{100}} * 100 = 8,18\%$$

Por lo que el porcentaje total de lignina es: 6,38+8,18=14,56%

5.3.4 Determinación de holocelulosa. Para la cuantificación del porcentaje de holocelulosa se tomaron 2,5g de la muestra de cáscaras de piña libre de extraíbles con la cual se realizó el procedimiento de la norma ASTM D1104, el montaje de dicho procedimiento se puede observar en la imagen 12.

Imagen 12. Determinación de holocelulosa



La masa de la muestra obtenida luego de la filtración y secado corresponde a la cantidad de holocelulosa la cual fue de 1.5312g, al reemplazar el valor obtenido en la ecuación 5. Se obtiene:

$$\% \text{Holocelulosa} = \frac{1,5312g}{2.5g} * 100 = 61,25\%$$

5.3.5 Determinación de porcentaje de celulosa. Para este cálculo se toma 1 g de holocelulosa y se realiza el procedimiento de la norma ASTM D1103-55 T, después de secar la muestra obtenida hasta peso constante se obtuvo una masa de 0,7589g (imagen 13), la cual corresponde a la cantidad de celulosa.

Imagen 13. Celulosa obtenida



$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{peso de celulosa}}{\text{peso seco de la muestra}} * 100$$

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{0,6589g}{1g} * 100 = 65.89\%$$

El porcentaje de celulosa presente en la muestra de holocelulosa es de 65.89% lo que representa un 40,35% de la muestra total.

5.3.6 Determinación de porcentaje de hemicelulosa. Teniendo en cuenta que la cantidad de hemicelulosa corresponde a la diferencia entre la cantidad de holocelulosa y celulosa, al reemplazar en la ecuación 7 se obtiene:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \frac{1g - 0,6589g}{1g} * 100 = 34.11\%$$

El porcentaje de hemicelulosa presente en la muestra de holocelulosa es de 34,11% lo que representa un 20,89% de la muestra total.

La caracterización química de la cáscara de piña Golden se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Caracterización química de las cáscaras de piña

Compuestos	Composición (%)
Extraíbles	18,23
Humedad	12,11
Lignina total	14,56
Holocelulosa	61,25*

*El porcentaje de holocelulosa se divide en: celulosa 40,35% y hemicelulosa 20,89%

Los resultados arrojados por la caracterización experimental del sustrato corresponden a valores cercanos a los típicos de la cáscara de piña de la variedad MD2 señalados por Amador, Carrillo, Alvarado y Vega donde obtuvieron valores de humedad de 7,46%, holocelulosa de 65,61%, celulosa de 41,19% y lignina total de 9,05%¹⁰⁶, en primer lugar el valor de la humedad representa la cantidad de agua presente después del proceso inicial de secado que se hace con el objetivo de realizar la molienda de forma eficiente, este valor corresponde a 12,11%, el cual dará la base para ajustar el porcentaje de humedad necesario para el crecimiento del microorganismo, este porcentaje se debe al contenido intrínseco del material la cual se encuentra en mayor proporción en la pulpa unida a la cáscara.

Por otro lado, se observa una importante cantidad de extraíbles presentes en la muestra que corresponden principalmente a proteínas, vitaminas, lípidos, minerales, clorofila entre otros, los componentes estructurales secundarios del material como terpenos, resinas, fenoles y algunos hidratos de carbono de bajo peso molecular se obtienen con ayuda de disolventes.¹⁰⁷

Otros compuestos con mayor interés para la hidrólisis microbiológica corresponden a la lignina y a la holocelulosa, que es a su vez ésta última es la suma de celulosa y hemicelulosa, la lignina según los análisis realizados de caracterización arroja un total de 14,56% lo cual indica que la cáscara de esta variedad de piña tiene un soporte estructural en la pared celular que le otorga rigidez y permeabilidad al agua ofreciendo una estabilidad a la degradación, la holocelulosa que conforma la cáscara de piña corresponde al 61,25% la masa total de holocelulosa corresponde a un 65,69% de celulosa y 34,11% de hemicelulosa, es decir por cada gramo de holocelulosa 0,6569 gramos representan la celulosa y 0,3411 gramos son de hemicelulosa, estas cantidades

¹⁰⁶ RAMIREZ, Op., Cit., p 36

¹⁰⁷ BARROSO CASILLAS, Miguel. Pretratamiento De Biomasa Celulósica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería. E.U.I.T. Forestal (UPM), 2010. p. 115

se traducen en un porcentaje global del material de 40,35% y 20,89% respectivamente.

Estos valores obtenidos permiten elegir el microorganismo adecuado para realizar la hidrólisis, analizando estos valores se observa que en comparación a otros compuestos hay un bajo contenido de lignina que no impediría la penetración del microorganismo para realizar el proceso de hidrólisis para así generar azúcares fermentables, por otra parte se observa que el contenido de azúcares iniciales como celulosa y hemicelulosa se presentan en mayor proporción lo que es útil para un microorganismo con la capacidad de hidrolizar este tipo de azúcares para convertirlos en azúcares más simples susceptibles a ser fermentados, teniendo en cuenta estos valores se analizaron sustratos con composiciones similares a los de la piña¹⁰⁸ como se muestran a continuación en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de algunos residuos

Materias primas lignocelulósicas	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de caña de azúcar	42	25	20
Sorgo dulce	45	27	21
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera blanda	45-50	25-35	25-35
Rastrojo de Maíz	38	26	19
Paja de arroz	32	24	18
Cáscaras de nueces	25-30	25-30	30-40
Periódico	40-55	25-40	18-30
Pastos	25-40	25-50	10-30
Paja de trigo	29-35	26-32	16-21
Residuos de plátano	13.2	14.8	14
Bagazo	54.87	16.52	23.33
Fibras de calabaza	66.59	17.44	15.46
Residuos agrícolas	5-15	37-50	25-50
Basura clasificada	60	20	20
Hojas	15-20	80-85	0
Pelos de semilla de algodón	80-95	5-20	0
Papel	85-95	0	0-15
Pasto Varilla	45	31.4	12

Fuente: KUMAR,Adepu y SHARMA,Shaishav. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: Bioresour Bioprocess. vol. 4, no. 1

¹⁰⁸ KUMAR,Adepu y SHARMA,Shaishav. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: Bioresour Bioprocess. vol. 4, no. 1,

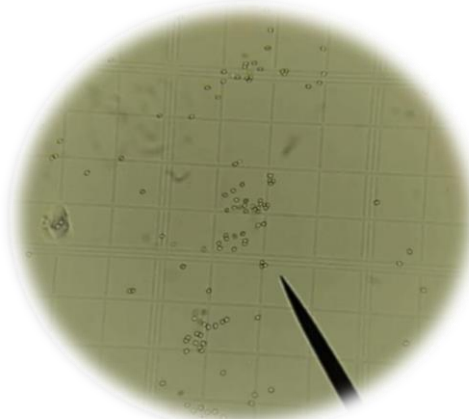
Basándose en estos datos se determinó que las materias primas con composición similar a las cáscaras de piña Golden son el bagazo de caña y madera dura por tal motivo se realizó una revisión bibliográfica donde se encontró una variedad de microorganismos adecuados para hidrolizar estos materiales, basados en la publicación realizada por Saritha, Arora y Lata¹⁰⁹ se determinó que uno de los microorganismos lignocelulolíticos que presenta mayor eficiencia en el proceso de hidrólisis para esta materia prima es *Trichoderma reesei* debido a que cuenta con la capacidad de hidrolizar celulosa y hemicelulosa mientras realiza una acción enzimática en la lignina presente que corresponde al 14,56% evitando que se dificulte la hidrólisis de los azúcares iniciales.

5.4 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS

La cepa utilizada de *Trichoderma reesei* fue comprada en un cepario en la ciudad de Bogotá. Inicialmente se realiza una esterilización por medio de autoclave de la cantidad necesaria de agua para inocular el microorganismo, con el fin de no contaminar el medio con esporas en el ambiente, la cual a su vez ajusta la humedad del sustrato, se introdujo una cantidad de esporas de *Trichoderma reesei* en el agua con ayuda de un asa hasta observar una coloración verdosa produciendo turbidez en el agua.

Se toma una cantidad de aproximadamente 10 micro litros del agua con el microorganismo por medio de un capilar, el cual se ubica sobre el cubreobjetos soportado en la cámara de Neubauer, por capilaridad el líquido realiza el llenado de la cámara la cual se ubicó en la platina del microscopio, se utilizó el lente 40X t se enfocó la imagen hasta que se observen con claridad las células y las líneas de las cuadrículas como se observa en la imagen 14.

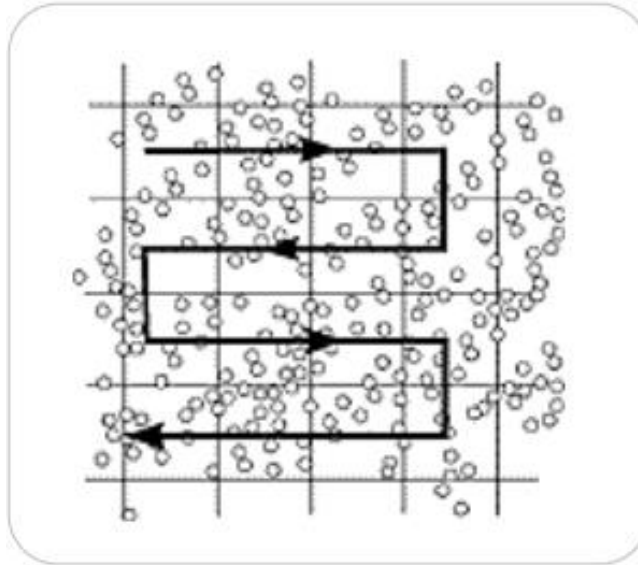
Imagen 14. Conteo celular por medio de cámara de Neubauer



¹⁰⁹ SARITHA,M.; ARORA,Anju y Lata. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. En: Indian J Microbiol. vol. 52, no. 2, p. 122-130

Debido a la cantidad de células que se pueden observar se realiza un conteo en forma de zig-zag como lo muestra la figura 19 para disminuir la posibilidad de cometer errores en el conteo.

Figura 19. Recuento de concentración celular



Fuente: BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro. En: Neubauer Chamber Cell Counting , Celoromics.

Se realiza el conteo en el cuadro central de la cámara de Neubauer compuesta por 25 cuadrículas más pequeñas en su interior. El número total de células se determina mediante la suma de las cantidades presentes en cada cuadro arrojando un valor total de 506 esporas, conociendo el volumen de la cámara que corresponde a 0,0001mL se calcula la concentración así:

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{esp}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Esporas}}{\text{volumen}}$$

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{esp}}{\text{ml}}\right) = \frac{506}{0,0001\text{ml}}$$

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{esp}}{\text{m}}\right) = 5,06 \times 10^6$$

Con este valor es posible determinar que la concentración es apta para la inoculación del sustrato debido a que es una cantidad significativa de células para realizar el proceso de hidrólisis.

5.5 HIDRÓLISIS MICROBIOLÓGICA

En esta etapa los biorreactores que contienen el sustrato de cáscaras de piña junto con el raspador, que entra en contacto directo con el material, son esterilizados por medio de un proceso de exposición a vapor a alta presión y temperatura en el interior de un autoclave durante 30 minutos, durante este proceso se eliminan cualquier tipo de microorganismo presente con el fin de obtener un control sobre el proceso, ya que la presencia de esporas de otros hongos puede modificar la cantidad de azúcares iniciales hidrolizados afectando así los resultados obtenidos, adicionalmente este proceso influye en el pretratamiento del sustrato debido a que genera una redistribución de la lignina presente y una “autohidrólisis”, esto se debe a la combinación de fuerzas mecánicas como las caídas de presión con efectos químicos en los grupos acetilo de la hemicelulosa que facilitan su hidrólisis,¹¹⁰ el proceso de hidrólisis ocurrido en esta etapa se debe al ácido acético producido a partir de los grupos acetilo de hemicelulosa que genera glucosa y monómeros de xilosa¹¹¹.

Posteriormente al proceso de esterilización se realizó la inoculación del microorganismo en el sustrato al interior de los biorreactores y se ajustó la humedad del medio. Con el fin de evaluar la condición de humedad en la hidrólisis se realizó la experimentación con dos porcentajes de humedad distintos, el primero con una humedad total de 80% y el segundo con 70% ajustados según la ecuación número 13:

Ecuación 13. Porcentaje de humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{g \text{ de agua añadidos} + g \text{ de agua contenidos en el sustrato}}{g \text{ de agua añadidos} + g \text{ de sustrato humedo}}$$

Análisis 1.

Tomando 100 g de sustrato húmedo con una humedad inicial de 12,11% se ajustó la humedad al 80% de la siguiente forma:

$$80\% = \frac{g \text{ de agua añadidos} + 12,11g}{g \text{ de agua añadidos} + 100g}$$

$$g \text{ de agua añadidos} = 339,45$$

¹¹⁰ RAIMBAULT, Maurice. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. En: Electronic Journal of Biotechnology. Dec 15., vol. 1, no. 2, p. 174-188

¹¹¹ MOSIER, Nathan, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. vol. 96, no. 6, p. 673-686

Se determinó experimentalmente que la densidad del agua destilada utilizada fue de $1,002 \text{ g/cm}^3$ por lo que el volumen del agua fue de:

$$V = \frac{339,45 \text{ g}}{1,0002 \text{ g/cm}^3}$$

$$V = 339,38 \text{ cm}^3$$

Análisis 2.

Tomando 100 g de sustrato húmedo con una humedad inicial de 12,11% se ajustó la humedad al 70% de la siguiente forma:

$$70\% = \frac{\text{g de agua añadidos} + 12,11 \text{ g}}{\text{g de agua añadidos} + 100 \text{ g}}$$

$$\text{g de agua añadidos} = 192,97$$

Esta masa corresponde a un volumen de agua de:

$$V = \frac{192,97 \text{ g}}{1,0002 \text{ g/cm}^3}$$

$$V = 192,93 \text{ cm}^3$$

Estos biorreactores fueron ubicados en la estructura rotatoria donde se garantizaba un minuto de agitación al día ya que este tiempo ofrece un buen rendimiento en la producción de enzimas¹¹², durante la hidrólisis microbológica el sustrato se mantuvo a una temperatura de $19 \pm 2^\circ\text{C}$ y después de ajustar su humedad tenía un pH de 4,2, muy cercano al valor óptimo de crecimiento del hongo *Trichoderma reesei*.

Después de transcurridos 15 días no se observó crecimiento del hongo en el sustrato con humedad del 80%, salvo en áreas con poca humedad. Mientras que el hongo inoculado en el sustrato con humedad de 70% sí mostró un crecimiento a lo largo de toda la superficie del sustrato, lo que indica actividad enzimática y a su vez presencia de azúcares reductores.

El crecimiento del hongo en un medio con 70% de humedad se puede observar por medio de las imágenes 15,16 y 17:

¹¹² DÍAZ, Ana Belén. Reciclado Del Orujo De Uva Como Medio Sólido De Fermentación Para La Producción De Enzimas Hidrolíticas De Interés Industrial. Universidad de Cádiz, 2009.

Imagen 15. Proceso de hidrólisis dos días después de inocularlo



Imagen 16. Proceso de hidrólisis cuatro días después de inocularlo



Imagen 17. Proceso de hidrólisis seis días después de inocularlo



Luego de haber observado crecimiento en un medio con 70% de humedad se analizó la influencia de la aireación en el crecimiento del microorganismo, para este procedimiento se realizaron dos modificaciones de la variable del flujo de aire alimentado al biorreactor.

En el primer caso el aire fue suministrado por una bomba que proveía un flujo de aire de 120mL/min que se saturaba con agua antes de entrar por una boquilla de $\frac{3}{4}$ de pulgada por $\frac{1}{2}$ de pulgada incrustada en la tapa del biorreactor como lo muestra la imagen 18, para el segundo caso el aire entraba sin ser forzado al biorreactor a través de un orificio de $\frac{3}{4}$ de pulgada, posteriormente se realizó la inoculación del microorganismo en el sustrato.

Imagen 18. Montaje de la boquilla de $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{2}$ en el biorreactor



Transcurridos dos días de incubación se evidenció que el microorganismo que se encontraba en el biorreactor con aireación forzada mostró un mayor crecimiento en comparación al que se encontraba al interior del biorreactor con aireación libre, observándose zonas en las cuales se producía aglomeraciones de sustrato rodeado por un material que a la vista se ve esponjoso de color blanco lo cual correspondería a esporas del microorganismo, el crecimiento se puede observar en las imágenes 19 y 20.

Imagen 19. Crecimiento luego de dos días con aireación libre



Imagen 20. Crecimiento luego de dos días con aireación forzada



En un periodo posterior a diez días luego de la inoculación del microorganismo la tasa de crecimiento de los biorreactores con aireación forzada siguió siendo mayor que la tasa de crecimiento de los biorreactores con aireación libre, mostrando mayor colonización como se observa en las imágenes 21 y 22.

Imagen 21. Crecimiento luego de diez días de inoculación sin aireación forzada



Imagen 22. Crecimiento luego de diez días con aireación forzada



Luego de una incubación de veinte días, el patrón de crecimiento evidenciado en el transcurso del proceso siguió con la misma tendencia, es decir que el microorganismo en los biorreactores con aireación forzada mostró un mayor crecimiento lo cual se puede observar en las imágenes 23 y 24.

Imagen 23. Crecimiento luego de veinte días con aireación libre



Imagen 24. Crecimiento luego de veinte días con aireación forzada

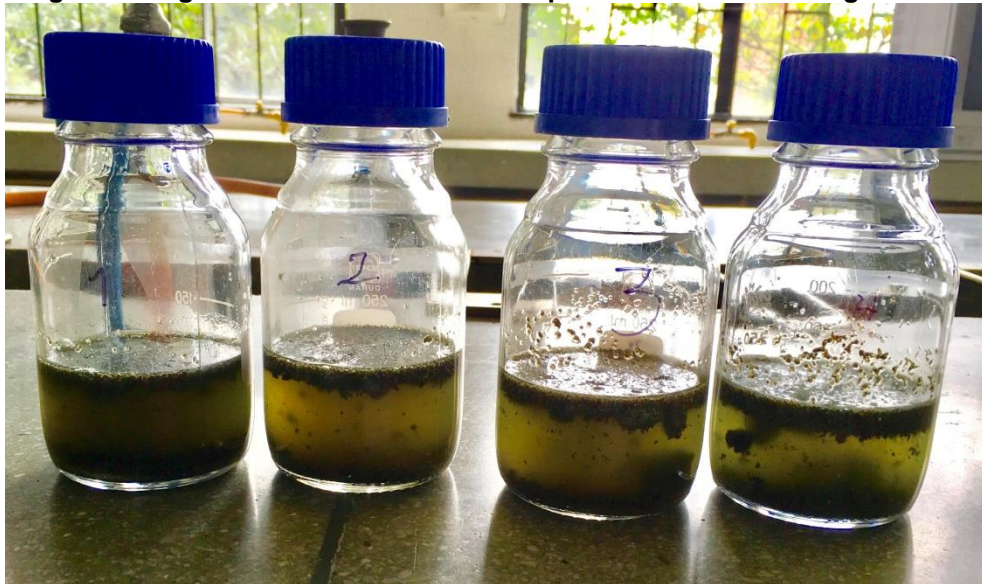


Teniendo en cuenta el crecimiento observado a lo largo del tiempo, partiendo de las mismas condiciones de humedad, temperatura y agitación para los dos tipos de aireación suministrados a los biorreactores se puede evidenciar de forma general que en un reactor de tambor rotatorio la aireación presenta un efecto positivo en el crecimiento del microorganismo *Trichoderma reesei*, en un estudio realizado por Díaz se determinó que la producción de las enzimas se veía afectada por la aireación, de tal modo que al aumentar el caudal de aire desde 0mL/min hasta 120mL/min aumentaba la producción de enzimas, alcanzando actividades entre 5 y 11 veces mayores que si no se aplica aireación alguna.¹¹³

5.6 ADECUACIÓN DE LA MUESTRA HIDROLIZADA

Se tomaron 10 gramos de sustrato hidrolizado de cada biorreactor, y se lavaron con 100mL de agua destilada, se agitaron a 130 rpm a temperatura de 28°C durante 2 horas en una incubadora de agitación marca N-BIOTEK modelo NB-205L. La mezcla se filtró a través de una tela de nailon de malla 200 haciendo uso de una bomba de vacío.

Imagen 25. 10g de sustrato hidrolizado suspendido en 100mL de agua destilada



La porción sólida se re-suspendió en buffer citrato de sodio 0,05M, se agitó a 150 rpm por 2h a 4°C en una incubadora de agitación, la porción líquida fue centrifugada en una centrifuga marca DAMON modelo IEC HN-S a 10.800g durante 15 minutos a 4°C. El mismo procedimiento se siguió para las cáscaras de piña molidas y tamizadas sin hidrolizar y el sobrenadante obtenido se utilizó como blanco en la determinación de azúcares reductores.

¹¹³ DÍAZ., Op. Cit. p 228

5.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se determinaron los azúcares reductores producidos en cada muestra de sustrato hidrolizado mediante la técnica de DNS por triplicado, tomando como blanco el sobrenadante obtenido de las cáscaras de piña sin hidrolizar. El control se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la aireación en la hidrólisis microbológica. Los datos de absorbancia obtenidos de cada muestra hidrolizada a 540nm se representan en la tabla 7 y posteriormente se reemplazaron en la ecuación de la línea de tendencia dada por la curva patrón (gráfico 3) realizada utilizando glucosa.

Gráfico 3. Curva de calibración

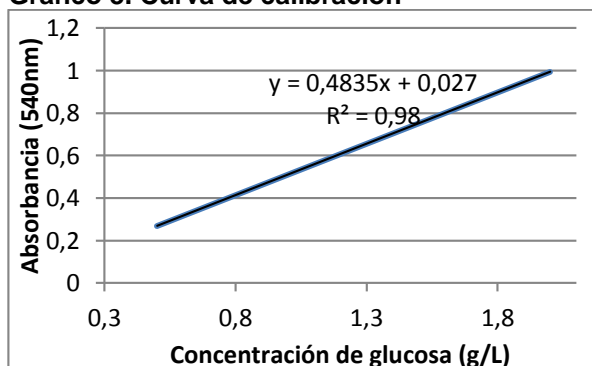


Tabla 7. Datos de curva de calibración

[glucosa] (g/L)	Abs. (540nm)
0,5	0,26875
0,7	0,36545
1,0	0,5105
1,5	0,75225
1,7	0,84895
2,0	0,994

Tabla 8. Concentración de azúcares reductores

Aireación forzada 1		Aireación forzada 2		Sin aireación forzada 1		Sin aireación forzada 2	
Concentración	Abs.	Concentración	Abs.	Concentración	Abs.	Concentración	Abs.
2,235780765	1,108	1,826266805	0,91	1,094105481	0,556	1,046535677	0,533
2,144777663	1,064	1,745604964	0,871	1,321613237	0,666	1,394002068	0,701
2,21302999	1,097	2,037228542	1,012	1,36918304	0,689	1,141675284	0,579

La concentración de azúcares reductores para las cáscaras de piña hidrolizadas con aireación forzada fue de 2,236g/L, mientras que la concentración de azúcares reductores obtenida en la hidrólisis sin aireación forzada fue de 1,369g/L. Estos resultados permiten determinar que es suficiente el pretratamiento físico como la reducción de tamaño del sustrato para obtener azúcares reductores, no es necesario realizar pre-tratamientos químicos al sustrato debido a la baja composición de lignina, polímero que reduce la eficiencia de la hidrólisis.¹¹⁴

¹¹⁴ PRASAD,S.; SINGH,Anoop y JOSHI,H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. En: Resources, Conservation and Recycling. p. 1-39

Estos resultados se asemejan a los reportados por Yusoff *et al*¹¹⁵ quienes hidrolizaron por medio de fermentación sólida bagazo de caña cuya composición es muy similar a la de las cáscaras de piña, obtuvieron una concentración máxima de azúcares reductores de 3,85g/L utilizando aireación forzada de 1.0 v/v/m.

Por otro lado según lo reportado por Choonut *et al*.¹¹⁶ la hidrólisis química presenta un mayor rendimiento en la producción de azúcares reductores a partir de cáscaras de piña, en la mayoría de casos se obtiene un 32% más de azúcares reductores que en la fermentación sólida, pero se presenta el problema de que los tratamientos requieren uso de reactivos corrosivos que deben recuperarse para evitar la inhibición de las enzimas después del proceso de hidrólisis.

5.8 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CELULASAS TOTALES

La determinación de actividad de celulasas totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Mandels *et al*¹¹⁷ al sobrenadante obtenido de la centrifugación a 10800g descrita en 3.6.

Los mejores resultados se obtuvieron en el sobrenadante de la muestra obtenida en el reactor con aireación forzada con 22.29FPU/mL seguida del sobrenadante obtenido de la muestra del reactor sin aireación forzada con 18,32FPU/mL.

Por otro lado el análisis del sólido remanente que fue re-suspendido con solución tampón citrato de sodio 0,05M pH 4.8 del reactor que tenía aireación forzada tuvo una actividad de celulasas de 11,56FPU/mL y el que no tenía aireación forzada fue de 7.805FPU/mL.

Estos resultados se pueden comparar con los reportados por Díaz¹¹⁸ quien determinó que usando un biorreactor de tambor rotatorio obtiene la mayor actividad de celulasas utilizando aireación forzada de 120mL/min. A su vez reporta que los mejores rendimientos en la producción de enzimas se obtuvieron con el biorreactor de tambor rotatorio.

¹¹⁵ MOHTAR,Wan; MUHANNAD,Illayan y KADER,Jalil. Solid substrate and submerged culture fermentation of sugar cane bagasse for the production of cellulase and reducing sugars by a local isolate, *Aspergillus terreus* SUK-1. En: Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 10, no. 5, p. 770-775

¹¹⁶ CHOONUT,Aophat; SAEJONG,Makorn y Kanokphorn Sangkharak. The Production of Ethanol and Hydrogen from Pineapple Peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. En: International Conference on Alternative Energy in Developing Countries and Emerging Economies. p. 243-248

¹¹⁷ EVELEIGH,Douglas, et al. Measurement of saccharifying cellulase. En: Biotechnol. Bionengng. p. 21-34

¹¹⁸ DÍAZ., Op., Cit p. 210

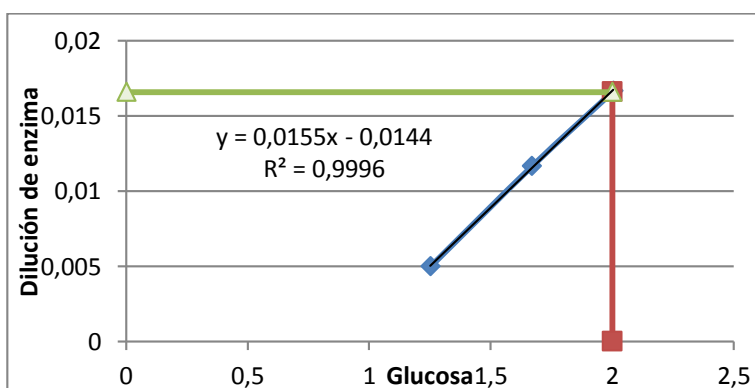
Teniendo en cuenta los resultados reportados en la investigación desarrollada por Yusoff¹¹⁹ en la que hidrolizan bagazo de caña por medio de fermentación sólida y sumergida utilizando el hongo *Aspergillus terreus* se puede afirmar que el hongo *Trichoderma reesei* presenta mayor actividad de enzimas celulasas y se demuestra que la fermentación en estado sólido presenta una alternativa viable con mayor producción de azúcares reductores y enzimas celulasas que la fermentación sumergida lo cual presenta una ventaja ya que la fermentación en estado sólido es mucho más sencilla, económica y se requiere menor gasto hídrico¹²⁰.

Cálculo de unidades de actividad enzimática

Tabla 9. Sobrenadante con aireación forzada

Dilución	Buffer citrato (mL)	Enzima	Concentración	Glucosa (g/L)	Absorbancia (540nm)
1	1	0,5	0,01666667	2,0041365	0,996
2	1,15	0,35	0,01166667	1,66907963	0,834
3	1,35	0,15	0,005	1,25129266	0,632

Gráfico 4. Actividad enzimática sobrenadante con aireación forzada



$$\frac{0,37}{0,016} = \frac{23,125FPU}{mL}$$

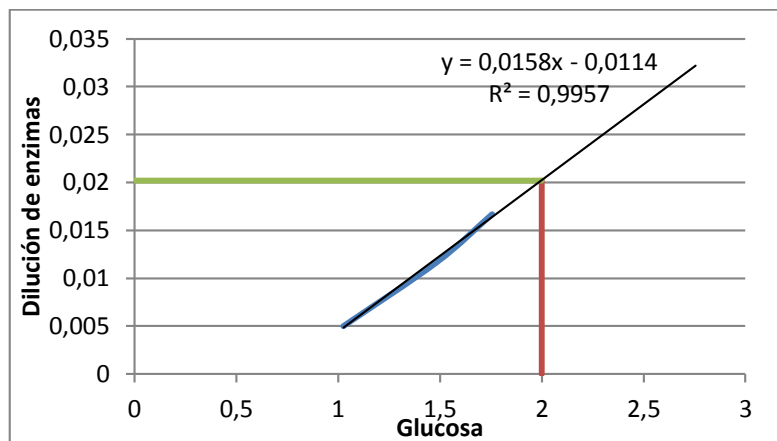
Tabla 10. Sobrenadante sin aireación forzada

Dilución	Buffer citrato (mL)	Enzima	Concentración	Glucosa (g/L)	Absorbancia (540nm)
1	1	0,5	0,01666667	1,48500517	0,876
2	1,15	0,35	0,01166667	1,26163392	0,745
3	1,35	0,15	0,005	1,01344364	0,523

¹¹⁹ YUSOFF., Op. Cit p. 774

¹²⁰ SUBRAMANIYAM,R. y VIMALA,R. OLID STATE AND SUBMERGED FERMENTATION FOR THEPRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY. En: International Journal of Science and Nature.

Gráfico 5. Actividad enzimática de sobrenadante sin aireación forzada



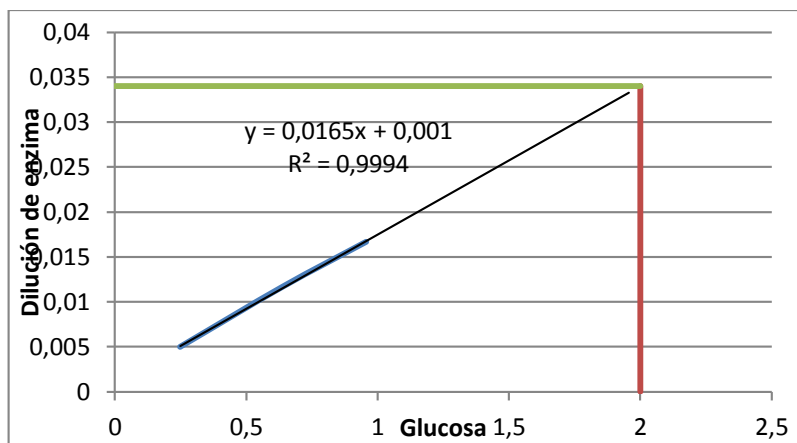
$$\frac{0,37}{0,0202} = \frac{18,32FPU}{mL}$$

Tabla 11. Sustrato con aireación forzada

Dilución	Buffer citrato (mL)	Enzima	Concentración	Glucosa (g/L)	Absorbancia (540nm)
1	1	0,5	0,01666667	0,95553257	0,489
2	1,15	0,35	0,01166667	0,63702172	0,335
3	1,35	0,15	0,005	0,24819028	0,147

Debido a que la concentración de glucosa da mucho menor que 2,0 mg, se extrapola la línea de tendencia.

Gráfico 6. Actividad enzimática de sustrato con aireación forzada

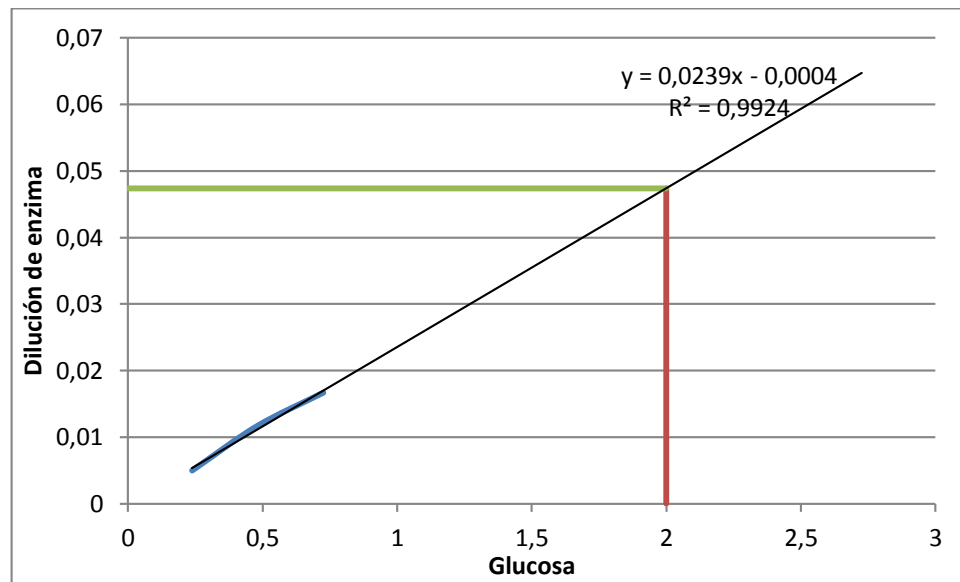


$$\frac{0,37}{0,032} = \frac{11,56FPU}{mL}$$

Tabla 12. Sustrato sin aireación forzada

Dilución	Buffer citrato (mL)	Enzima	Concentración	Glucosa (g/L)	Absorbancia (540nm)
1	1	0,5	0,01666667	0,72595657	0,378
2	1,15	0,35	0,01166667	0,47983454	0,259
3	1,35	0,15	0,005	0,23784902	0,142

Gráfico 7. Actividad enzimática de sustrato sin aireación forzada



$$\frac{0,37}{0,0474} = \frac{7,805FPU}{mL}$$

6. CONCLUSIONES

- Se realizó una caracterización de las cáscaras de piña Golden MD2 en donde se evidencia que los porcentajes de su composición corresponden a un 12,11% de la humedad, un 18,23% de los extraíbles, 14,46% de lignina, 61,25% la holocelulosa de la cual el 40,35% es celulosa y 20,89% corresponde a hemicelulosa lo que conlleva a determinar que el contenido de lignina es bajo en comparación a materiales de composición estructural similares como el bagazo de caña de azúcar, la madera dura y blanda las cuales tienen un contenido de lignina de 20, 18-25, 25-35% respectivamente¹²¹ por lo que se toma la decisión de seleccionar un microorganismo capaz de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa en presencia de lignina y así evitar el proceso de pre-tratamiento.
- Se determinó que el microorganismo *Trichoderma reesei* presenta un complejo enzimático celulolítico capaz de hidrolizar cadenas largas de azúcares hasta glucosa, demostrado por la reproducción y colonización del sustrato y por los azúcares reductores obtenidos que fueron medidos por la técnica de DNS 20 días después de su inoculación en el sustrato observando concentraciones de 2,236 g/L con aireación forzada y de 1,369 g/L sin aireación forzada.
- Se realizó un pre diseño de los biorreactores en donde se determinó la importancia de la selección del material debido a que deben cumplir con las especificaciones de diseño teniendo en cuenta que es necesario que resistan a una exposición a una temperatura de 120°C y proporcionen la capacidad de visualizar el interior para observar el crecimiento del microorganismo,
- Se determinó la importancia de la altura del lecho del sustrato dentro del biorreactor que correspondió a 1,077cm para el correcto control de la temperatura y la aireación para que la temperatura no sobrepase los límites de un hongo mesófilo (15 -20°C) además al ser un microorganismo aerobio debe contar con un flujo de aire alrededor de 100 a 180mL/min que garantice su correcto metabolismo, por tal motivo se seleccionó un reactor de tambor rotatorio que garantizara la agitación del sustrato para evitar la muerte del microorganismo.
- Se evaluaron las variables de humedad y aireación en el crecimiento del hongo que a su vez conlleva a la obtención de azúcares reductores debido a que al realizar la hidrólisis a una humedad del 80% el microorganismo no presentó desarrollo mientras que al llevar a cabo el proceso a una humedad del 70% se evidenció crecimiento del microorganismo a lo largo del sustrato, bajo esta

¹²¹ KUMAR, Op. Cit. p. 2

condición de humedad se evaluó la aireación en la obtención de azúcares reductores, teniendo un mejor rendimiento cuando es sometido a aireación forzada.

- Se obtienen azúcares reductores por medio de la hidrólisis microbiana haciendo uso de la fermentación sólida, la cual es una metodología eficiente evidenciada por los resultados del método de DNS en el que se da un mayor contenido de azúcares reductores en las muestras hidrolizadas en comparación a las cáscaras de piña sin hidrolizar, se presentaron mejores resultados en cuanto a obtención de azúcares reductores y actividad de enzimas celulasas cuando se realizó bajo condiciones de aireación forzada (120mL/min) presentando una actividad enzimática de 22,29 FPU/mL.

7. RECOMENDACIONES

- Hacer uso de diferentes microorganismos con el objetivo de evaluar cual presenta una mayor eficiencia en el proceso de obtención de azúcares reductores.
- Analizar el resultado de llevar a cabo este proceso sin realizar pretratamiento físico es decir sin secado y molienda con el objetivo de determinar si es posible disminuir los costos, ya que con estos procesos se invierte en energía y se producen pérdidas de material liviano por corrientes de aire afectando el rendimiento real del material utilizado
- Evaluar el rendimiento de la obtención de un producto de mayor valor como el bioetanol partiendo del mismo sustrato y el mismo microorganismo para determinar la viabilidad de realizar una planta a escala piloto.

BIBLIOGRAFÍA

ADNEY,B. andBAKER,J. Measurement of cellulase activities. Golden, Colo: National Renewable Energy Laboratory, 2008.

ALVIRA,P., et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY; SPECIAL ISSUE ON LIGNOCELLULOSIC BIOETHANOL: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES. vol. 101, no. 13, p. 4851-4861

American Society for Testing Materials. ASTM D1103-55 T Method of Test for Alpha-Cellulose in Wood. University of Florida, George A. Smathers Libraries, 1959a.

American Society for Testing Materials. ASTM D1104-56 Method of Test for Holocellulose in Wood. University of Florida, George A. Smathers Libraries, 1959b.
BARROSO CASILLAS,Miguel. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. E.U.I.T. Forestal (UPM), 2010. p. 115.

Bashir Sajo Mienda; Ahmad Idi andAbdulhamid Umar. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. 2011.

BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro. En: NEUBAUER CHAMBER CELL COUNTING, CELOROMICS.

BELLIDO, Carolina. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentacion conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis. Madrid.: Universidad de Valladolid, 2013.

CHÁVEZ GARCÍA, Mónica Paola. Producción de trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (dendranthema grandiflora). 2007.

CHOONUT, Aophat; SAEJONG, Makorn and Kanokphorn Sangkharak. The Production of Ethanol and Hydrogen from Pineapple Peel by Saccharomyces cerevisiae and Enterobacter aerogenes. En: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ALTERNATIVE ENERGY IN DEVELOPING COUNTRIES AND EMERGING ECONOMIES. p. 243-248

CINAR,A.; BIROL,G. andPARULEKAR,S. J. Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control. En: CRC PRESS. p. 648

Codex-Adopted–AOAC Method. AOAC Official Method 934.06 Moisture in Dried Fruits. 2000.

DANE and Encuesta Nacional Agropecuaria. Principales características del cultivo de la Piña (*Ananas comosus* L.). 2016.

DELGENES, J. P.; PENAUD, V. and MOLETTA, R. Pretreatments for the Enhancement of Anaerobic Digestion of Solid Wastes. En: *ChemInform*. vol. 34, no. 13,

Departamento Nacional de Planeación, *et al.* Política Nacional para la gestión integral de residuos sólidos Bogotá D.C.: 2016.

DÍAZ, Ana Belén. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Universidad de Cádiz, 2009.

DOELLE, Horst W.; MITCHELL, David and Rolz Carlos. Solid substrate cultivation. London u.a: Elsevier Applied Science, 1992. 446 p. ISBN 1851668799

DOMINE, Marcelo Eduardo and CHÁVEZ SIFONTES, Marvin. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. En: *AVANCES EN CIENCIAS E INGENIERÍA*. vol. 4, no. 4, p. 15-46

EHRMAN, Tina. Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass. En: *THE SCIENCE TEACHER*. Mar 1, .vol. 80, no. 3, p. 48

ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA ENA 2015. técnico Bogotá, 01 de Junio de 2016. 2016.

EVELEIGH, Douglas, et al. Measurement of saccharifying cellulase. En: *BIOTECHNOL. BIONENGNG*. p. 21-34

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Veracruzana. UNIDAD 2. BIORREACTORES Y SU APLICACIÓN. [Consultado el Abr 14, 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>

GAITÁN, Diana and PÉREZ, Liliana. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dendranthema grandiflora*). Pontificia universidad Javeriana, 2007.

GALBE, M. and ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. En: *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. vol. 59, no. 6, p. 618-628

GALICIA,Luis, *et al.* Protocolos de Laboratorio. Laboratorio de calidad nutricional de maiz y analisis de tejido vegetal 2012. 2-6 p.
George Wypych. Handbok of Polymers. 2012.

GUNAWARDENA,Gamini. Reducing Sugar. [Consultado el abril 1,2018].
Disponible en: <http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/q-r/reducing-sugar/>
Hector Fabio Montaña Morales. Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera. Universidad Nacional de Colombia, 2014.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN
ICONTEC. Documentación. Presentación De Tesis, Trabajos De Grado y Otros
Trabajos De Investigación. NTC 1486.6th ed. Bogotá D.C.: 2008.42 p

_____ Referencias Bibliografías. Contenido, Forma y Estructura NTC 5613.
Bogotá D.C.: 2008.38 p

_____ NTC 32. Tejido de alambre y tamices para propósitos de ensayo. 2002.

_____ Referencias Documentales para Fuentes De Información Electronica
NTC 4490. Bogotá D.C.: 1998. 27 p

_____ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA; NTC 729-1. 1996.

JIMENEZ,Orlando andALSINA,María Jesús. Cámaras de recuento. En: REVISTA
DEL LABORATORIO CLINICO. vol. 5, no. 1, p. 1-2

KARAGÖZ,P., *et al.* Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed
straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-
fermentation. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 104, p. 361-357

Karla Ramírez Amador, *et al.* Xylose from lignocellulosic waste in the production
and industrial processing of pinneapple (*Ananascomusus*). En: UNICIENCIA. Mar
1, .vol. 26, no. 1y2, p. 75-89

KUMAR,Adepu andSHARMA,Shaishav. Recent updates on different methods of
pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: BIORESOUR
BIOPROCESS. vol. 4, no. 1,

KUMAR,Adepu andSHARMA,Shaishav. Recent updates on different methods of
pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. En: BIORESOUR
BIOPREOCCESS. vol. 4, no. 1,

LI,Wan-Chen, *et al.* *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-
induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. En:
BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS. Jul 3,.vol. 10, no. 1,

MILLER,G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: ANALYTICAL CHEMISTRY. Mar 1,.vol. 31, no. 3, p. 426-428

MOHTAR,Wan; MUHANNAD,Illayan andKADER,Jalil. Solid substrate and submerged culture fermentation of sugar cane bagasse for the production of cellulase and reducing sugars by a local isolate, Aspergillus terreus SUK-1. En: JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 10, no. 5, p. 770-775

MORENO, Antonio, et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. En: CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY. vol. 35, no. 3, p. 342-354

MOSIER,Nathan, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 96, no. 6, p. 673-686

MULAKALA,Chandrika andREILLY,Peter J. Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei) Cel7A as a molecular machine: A docking study. En: PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOINFORMATICS. Sep 1,.vol. 60, no. 4, p. 598-605

MUNISWARAN,P. K. Ananda; SELVAKUMAR, Pitchaivelu and Charyulu, N C L Narasimha. Production of cellulases from coconut coir pith in solid state fermentation. En: JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Jun.vol. 60, no. 2, p. 147-151

NAMPOOTHIRI, K. Madhavan, *et al.* Process optimization for antifungal chitinase production by Trichoderma harzianum. 2004. 1583-1590

NEIRA-GARCÍA, Ana María; MARTÍNEZ-REINA, Antonio María and ORDUZ-RODRÍGUEZ, Javier Orlando. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. En: CORPOICA CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROPECUARIA. May 1,.vol. 17, no. 2, p. 149-165

NIÑO, Lilibeth; ACOSTA, Alejandro and GELVEZ, Ricardo. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca. En: REVISTA FACULTAD DE INGENIERÍA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. no. 30, p. 155-168

ODLARE, Monica. Organic residues. Uppsala.: Swedish University of Agricultural Sciences, 2005.

OLIVA DOMINGUEZ, José. Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Madrid.: Universidad Complutense de Madrid, 2003.

PALOHEIMO, Marja; HAARMANN,Thomas andMÄKIEN,Susana. Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*.

PECK,Robert andGALE,Paul. Characterization of Organic Compounds. En: ANAL. CHEM. Ene.,.vol. 24, no. 1, p. 116-120

PÉREZ-GUERRA,N., et al. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. En: ELECTRONIC JOURNAL OF ENVIRONMENTAL, AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. vol. 2, no. 3, p. paper 1

PRASAD,S.; SINGH,Anoop andJOSHI,H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. En: RESOURCES, CONSERVATION AND RECYCLING. p. 1-39

RABEMANOLONTSOA,Harifara andSAKA,Shiro. Various pretreatments of lignocellulosics. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 199, p. 83-91

RAIMBAULT,Maurice. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. En: ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Dec 15,.vol. 1, no. 2, p. 174-188

RAMIREZ,Sandra andREYES,Camila. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE LA ANANAS COMOSUS (PIÑA) PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. Fundación Universidad de América, 2017.

RODRIGUEZ,A. J. Efecto del tamaño de partícula y concentración de las enzimas celulasa y celobiosa, en la hidrólisis del rastrojo de la piña para la producción de etanol. San José, Costa Rica.: Universidad de Costa Rica, 2012.

RUIZ,Francisco andMARTINEZ,Angel. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. En: MICROBIAL BIOTECHNOLOGY. vol. 2, no. 2, p. 164-177

SÁNCHEZ,Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. En: BIOTECHNOLOGY ADVANCES. vol. 27, no. 2, p. 185-194

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, *et al.* Producción de Piña Cayena Lisa y MD2 (*Ananas comosus* L.) en condiciones de Loma Bonita, Oaxaca. 2015.

SARITHA,M.; ARORA,Anju andLata. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. En: INDIAN J MICROBIOL. vol. 52, no. 2, p. 122-130

SAUCEDO,G., et al. Potencial of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving Schwanniomyces castellii. En: BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 36, p. 47-61

Seepsa. Biorreactor de tambor giratorio continuo (CRDB). [Consultado el Abr 14,2018].

SUBRAMANIAM,R. and VIMALA,R. OLID STATE AND SUBMERGED FERMENTATION FOR THEPRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND NATURE.

SUN,Ye andCHENG,jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. England: Elsevier Ltd, 2002. 1-11

TAHERZADEH,M. J. andKARIMI,K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. En: BioResources. vol. 2, no. 3, p. 472

TAPPI. Acid-insoluble lignin in wood and pulp (Reaffirmation of T 222 om-02) 2006.

_____ Solvent extractives of wood and pulp (Proposed revision of T 204 cm-97). 2007.

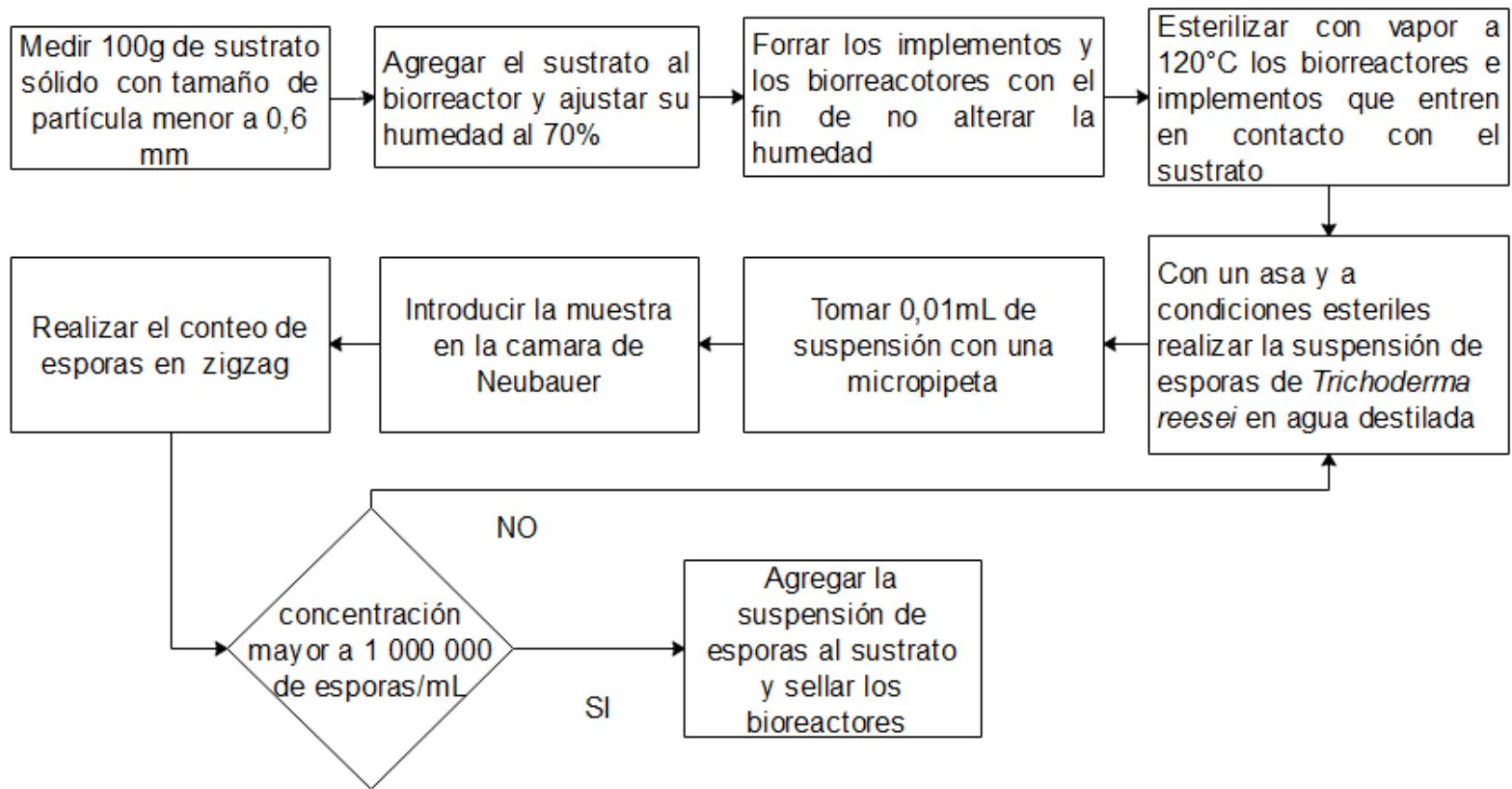
TRIANA,Cristian. Producción de etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café Universidad Nacional de Colombia, 2010.

WALKER,L. P. andWILSON,D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. 1991. 3-14

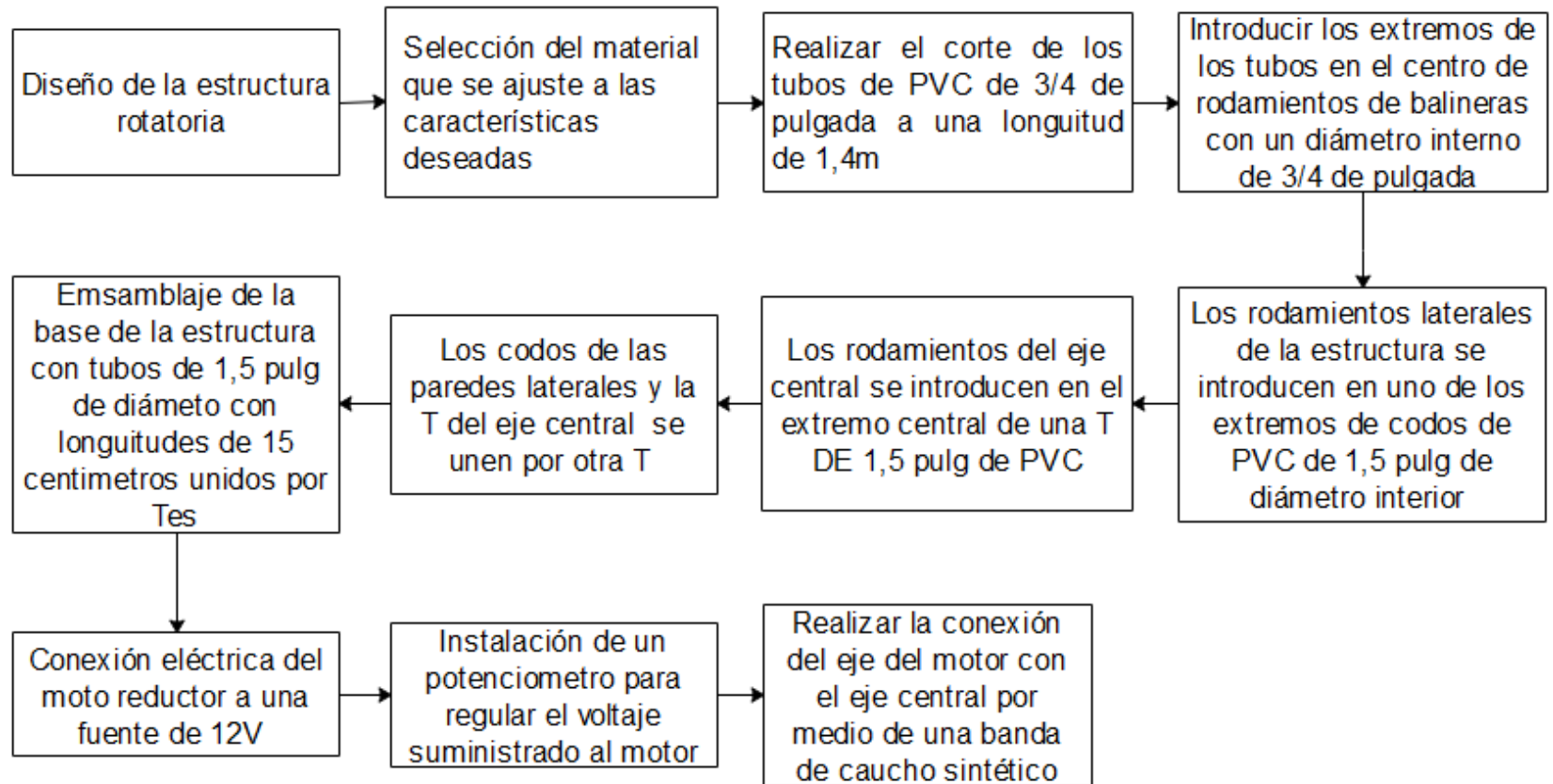
Wolfram. Circular segment. May 24,. Disponible en: <http://mathworld.wolfram.com/CircularSegment.html>

ANEXOS

ANEXO A
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA INCUBACIÓN DEL MICROORGANISMO



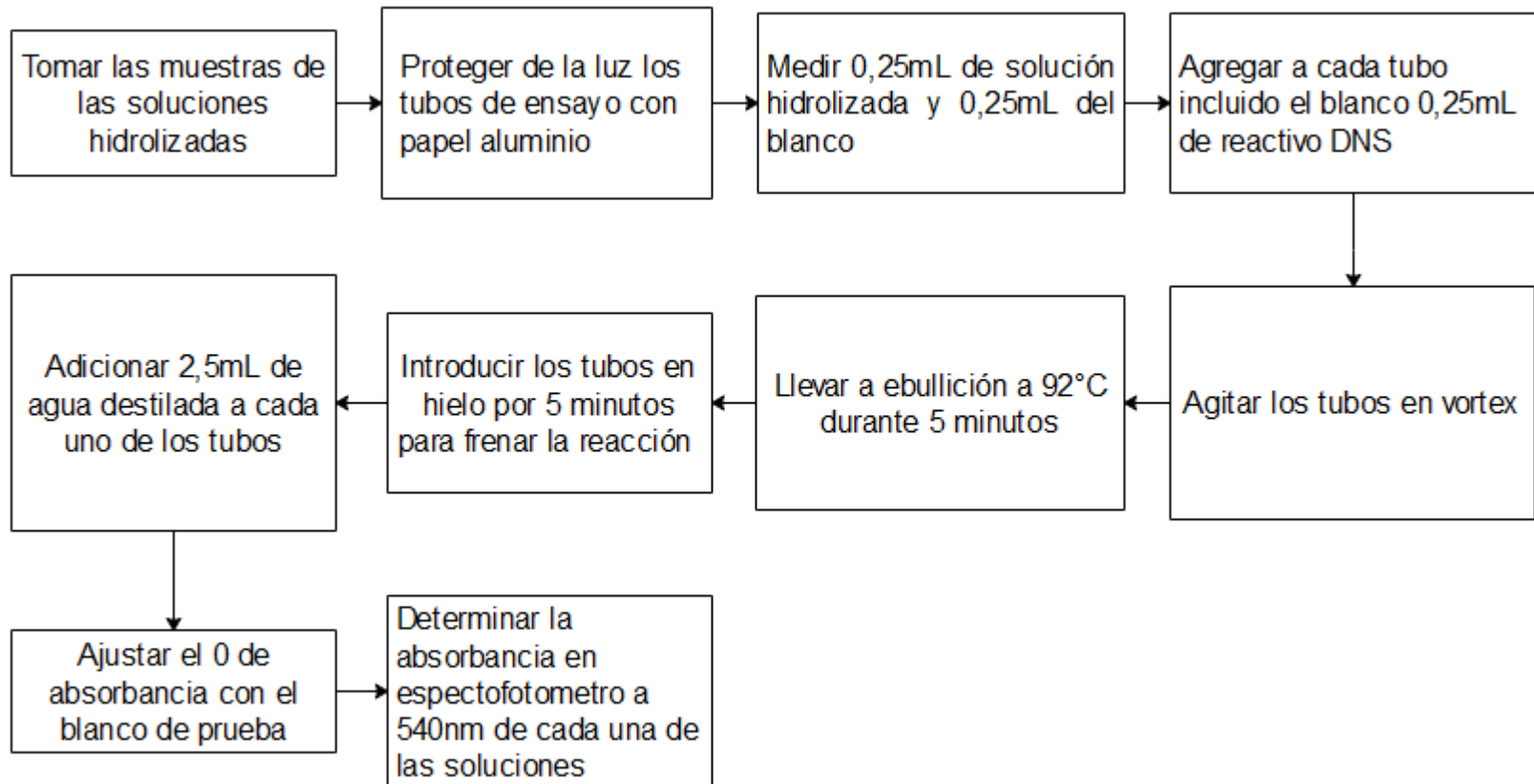
ANEXO B
DIAGRAMA DE FLUJO DE LA REALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA ROTATORIA



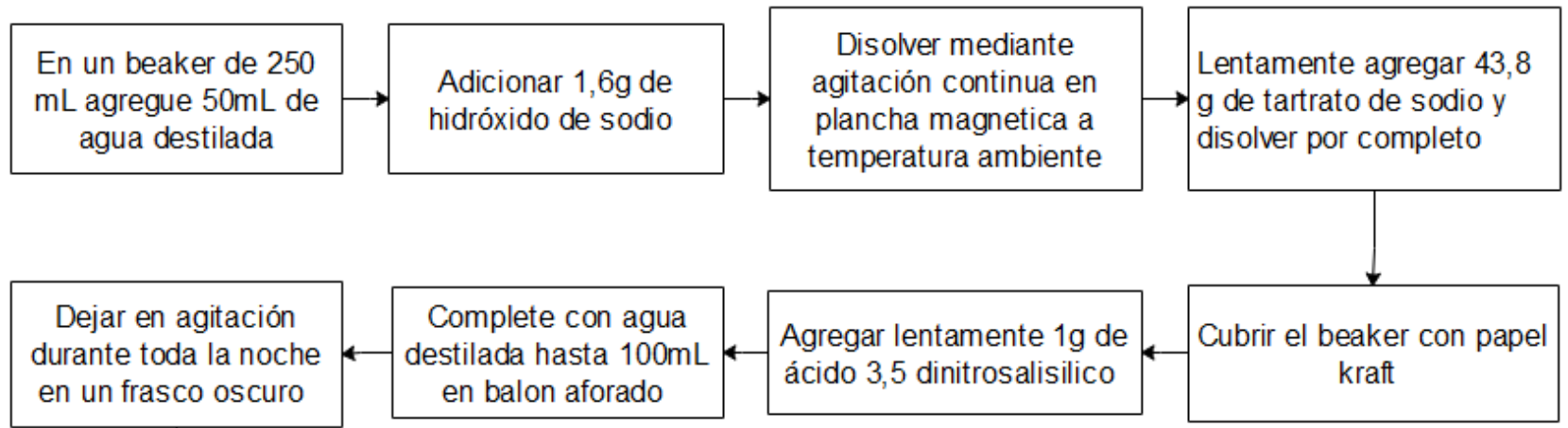
ANEXO C
IMÁGENES DE LA ESTRUCTURA ROTATORIA



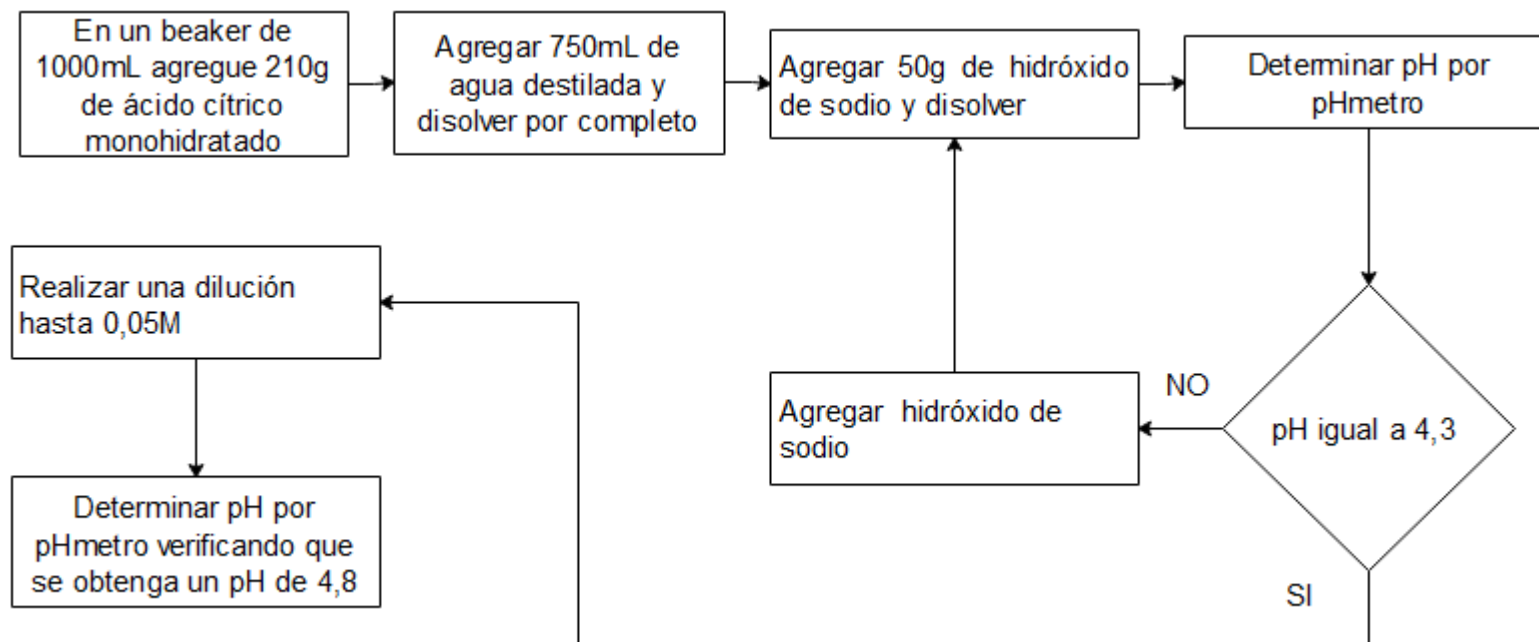
ANEXO D
TÉCNICA DE DNS
(Ácido 3,5 dinitrosalicílico)



ANEXO E
PREPARACIÓN DE REACTIVO DNS



ANEXO F
PREPARACIÓN DE BUFFER CITRATO DE SODIO 0,05M



ANEXO G
FICHA TÉCNICA DE *TRICHODERMA REESEI*

Trichoderma reesei Simmons (ATCC® 26921™)

Strain Designations: **QM 9414 [3019, CBS 392.92, T.V. B118]** / Product Format: **freeze-dried**

GENERAL INFORMATION	CHARACTERISTICS	CULTURE METHOD	SPECIFICATIONS	HISTORY
Permits and Restrictions		View Permits		
Deposited As	<i>Trichoderma viride</i> Persoon : Fries			
Strain Designations	QM 9414 [3019, CBS 392.92, T.V. B118]			
Application	Produces 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Estradiol 17-beta-dehydrogenase-1, Hydroxysteroid dehydrogenase 17 beta, type 1, hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1 Produces 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Produces acylesterase acetyl esterase Produces alpha-1,2-glucuronidase Produces alpha-L-arabinofuranosidase alpha-1,3-arabinosidase Produces endoglucanase Produces endoglucanase III EIII Produces endoglucanase-cellobiohydrolase complex Produces exo-1,4-beta-D-xylosidase beta-xylosidase Produces exo-cellobiohydrolase avicelase, endoglucanase I Produces glucosidase, beta; acid Glucosidase, beta, acid, glucocerebrosidase Produces hydrolase Produces mannan endo-1,4-beta-mannosidase beta-mannanase, mannanase Produces paracelsin Transformation host Produces extracellular hydrolases			
Biosafety Level	1 <i>Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i>			
Product Format	freeze-dried			
Storage Conditions	Frozen: -80°C or colder Freeze-Dried: 2°C to 8°C Live Culture: See Propagation Section			
Type Strain	no			

Trichoderma reesei Simmons (ATCC® 26921™)

Strain Designations: [QM 9414](#) [[3019](#), [CBS 392.92](#), [T.V. B118](#)] / Product Format: **freeze-dried**

GENERAL INFORMATION

CHARACTERISTICS

CULTURE METHOD

SPECIFICATIONS

HISTORY

Preceptrol®

no

Genome Sequenced Strain

Yes

Comments

Produces 1.5-2.0 times more cellulase on cellulose medium than ATCC [24449](#)

EIII core protein of endoglucanase

Ethanol- and polyene-sensitive

Mitochondrial genome sequenced strain (University of Sao Paulo, Brazil).

Genome sequencing strain (the Joint Genome Institute at the Department of Energy, USA).

Trichoderma reesei Simmons (ATCC® 26921™)

Strain Designations: [QM 9414](#) [[3019](#), [CBS 392.92](#), [T.V. B118](#)] / Product Format: **freeze-dried**

GENERAL INFORMATION

CHARACTERISTICS

CULTURE METHOD

SPECIFICATIONS

HISTORY

Medium

[ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar \(PDA\)](#)

[ATCC® Medium 323: Malt agar medium](#)

[ATCC® Medium 325: Malt extract agar \(Blakeslee's formula\)](#)

Growth Conditions

Temperature: 20°C to 25°C

Atmosphere: Typical aerobic

ANEXO H
DIMENSIONES DEL BIORREACTOR

