

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO-BIOQUÍMICAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**  
**MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO: DIVERSIDAD MICROBIANA**

**SELECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS ANAEROBIOS TERMÓFILOS  
PRODUCTORES DE ETANOL**

**ELABORADO POR:**

**Lic. CARLA FABIANA CRESPO MELGAR**

**ASESORES:**

**MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA Ph.D.**

**LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES Ph.D.**

**Prof. BO MATTIASSON**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2009**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO-BIOQUÍMICAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**  
**MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO: DIVERSIDAD MICROBIANA**

**SELECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE  
MICROORGANISMOS ANAEROBIOS TERMOFILOS  
PRODUCTORES DE ETANOL**

**ELABORADO POR:**

**Lic. CARLA FABIANA CRESPO MELGAR**

**ASESORES:**

**MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA PhD**

**LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES Ph.D.**

**Prof. BO MATTIASSON**

**(Tesis elaborada para optar al grado de Magister Scientarum)**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2009**

# SCREENING, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC ANAEROBIC BACTERIA AS ETHANOL PRODUCERS

## ABSTRACT

Thermophilic anaerobic bacteria are able to produce ethanol as the main fermentation product from all utilizable hexoses, di- and polysaccharides, as well as from various pentoses. They also have some process advantages due to high growth temperatures, such as easier product recovery, minimized contamination risk, lower costs of pumping and stirring and no aeration and cooling problems. However, there are few efficient thermophilic anaerobic strains. Even though this process is a hope to face up the energy crisis all over the world.

The aim of this research was to screen, isolate and identify thermophilic anaerobic microorganisms as ethanol producers from agro-industrial residues and simple substrates. From 27 consortia, the consortium B was selected as the best ethanol producer. The culture conditions were optimized through factorial designs determining nitrogen source and concentration (1 g/L urea) and Carbon: Nitrogen ratio (12.8 g: 1g).

Due to the low ethanol production by the consortium B, bacterial strains were isolated from it. Eight strains were recovered and strain 45B was the best ethanol producer. Mass balances, kinetics and yields were determined based on products formation and substrate consumption. Ethanol was the major respect to other by-products with a yield of 0,38 g/ g  $\alpha$ -D xylose consumed. The ethanol yield enhanced when other substrates were fermented, being comparable with conventional processes of ethanol production using yeast and other bacterial strains. Strain 45B was characterized and identified by sequencing the 16S rDNA gene.

The strain 45B has a homology of 99.1% with *Caloramator viterbiensis*. Due to its morphologic and biochemical features, it is proposed as a novel strain able to produce ethanol from a wide spectrum of substrates under thermophilic anaerobic conditions.

*Keywords: Ethanol, anaerobic thermophilic bacteria, Caloramator spp.*

## SELECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS TERMOFILOS PRODUCTORES DE ETANOL

### RESUMEN

Las bacterias termófilas anaerobias son capaces de producir etanol como principal producto de fermentación a partir de un amplio espectro de sustratos, como hexosas, di- y polisacáridos y varias pentosas. Existen muchas ventajas de llevar a cabo fermentaciones a elevadas temperaturas sin necesidad de aereación y enfriamiento, entre ellas, la remoción constante de etanol y el bajo riesgo de contaminación. Sin embargo, son muy pocas las bacterias termófilas anaerobias eficientes, aun así este proceso es una esperanza ante la crisis mundial de energía.

El objetivo de esta investigación fue seleccionar, aislar e identificar microorganismos termófilos anaerobios productores de etanol partiendo de la utilización de residuos agroindustriales y sustratos simples. A partir de 27 consorcios, se seleccionó el consorcio B por su rendimiento en la producción de etanol. Se optimizaron condiciones de cultivo mediante diseños factoriales, determinando, fuente y concentración de nitrógeno (1 g/L urea) y proporción Carbono: Nitrógeno (12.8g: 1g).

Debido a la baja producción de etanol del consorcio B, se aislaron cepas bacterianas del mismo. Ocho cepas fueron recuperadas, siendo la cepa 45B la mejor productora de etanol. Se establecieron balances de masas, cinéticas y rendimientos en función a la formación de productos y consumo de sustrato. Etanol fue el producto mayoritario respecto a otros (ácidos orgánicos, etc) con un rendimiento de 0.38 g / g de  $\alpha$ -D xilosa consumida. El rendimiento de la producción de etanol mejoró cuando otros sustratos fueron fermentados, siendo comparable al obtenido por vías convencionales con levaduras y bacterias. La cepa 45B fue caracterizada e identificada mediante la secuenciación del gen 16S ADN<sub>r</sub>.

La cepa 45B tuvo 99.1% de homología con *Caloramator viterbiensis*, por sus características morfológicas y bioquímicas se la propone como una nueva especie, con potencial de producir etanol, bajo condiciones anaerobias termófilas, a partir de un amplio espectro de sustratos.

*Palabras clave: Etanol, bacterias anaerobias termófilas, Caloramator spp.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al institute de la recherche pour le development (IRD), por la concesión de la beca y el soporte económico.

Al proyecto Microbial diversity del programa ASDI-SAREC, por el soporte para la realización de esta investigación.

A mis asesores, Maria Teresa Alvarez Ph.D., Enrique Terrazas Ph.D. y Prof. Bo Mattiasson por compartir sus enseñanzas.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas y del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund – Suecia, por acogerme y por los buenos momentos compartidos.

A mis queridos amigos, todos ustedes saben lo importantes que son para mi.

Y por sobretodo a mi familia, por apoyarme siempre con mucho cariño y comprensión.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

**ABSTRACT**

**RESUMEN**

**AGRADECIMIENTOS**

<b>CAPÍTULO I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
	III.1. Justificación	4
	III.2. Objetivos de la investigación	6
	III.2.1. Objetivo general	6
	III.2.2. Objetivos específicos	6
<b>CAPÍTULO IV.</b>	<b>EXTREMÓFILOS</b>	<b>7</b>
	IV.1. Extremófilos en los límites de la vida	7
	IV.2. Ecología y hábitats de los extremófilos	9
	IV.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento	9
	IV.3.1. Clasificación de microorganismos de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento	11
	IV.3.2. Diversidad microbiana a elevada temperatura	12
	IV.4. Ambientes termales	12
	IV.4.1. Áreas geotérmicas	13
	IV.4.1.1. Áreas hidrotérmicas	13
	IV.4.1.1.1. Géiseres	13
	IV.4.1.1.2. Agua termales	13
	IV.5. Termófilos	14
	IV.5.1. Adaptaciones moleculares a la termofilia	15
	IV.5.2. Perspectivas del uso de microorganismos termófilos	16
<b>CAPÍTULO V.</b>	<b>BIOMASA COMO RECURSO RENOVABLE DE ENERGIA</b>	<b>17</b>
	V.1. Biomasa	17
	V.1.1. Características y utilización de biomasa vegetal	17
	V.2. Material lignocelulósico	18
	V.3. Conversión bioquímica de la biomasa	22
	V.3.1. Biodegradación y modificación de material lignocelulósico	22
	V.3.2. Digestión anaerobia	24
	V.3.2.1. Proceso microbiológico y bioquímico de la digestión anaerobia	24
<b>CAPÍTULO VI.</b>	<b>PRODUCCIÓN DE ETANOL</b>	<b>26</b>
	VI.1. Producción de etanol en el tiempo	26
	VI.2. Microbiología y bioquímica de la formación de etanol	27
	VI.2.1. Microorganismos relacionados a la fermentación de etanol	27
	VI.2.1.1. Fermentación etanólica realizada por levaduras	28
	VI.2.1.2. Fermentación etanólica realizada por bacterias mesófilas	29

VI.2.1.3. Fermentación etanólica realizada por bacterias termófilas	30
VI.2.2. Rutas metabólicas de producción de etanol	31
VI.2.2.1. Ruta metabólica de Emdden-Meyerhof (EM)	32
VI.2.2.2. Ruta metabólica heteroláctica (Fosfocetolasa)	34
VI.2.2.3. Ruta metabólica de Entner-Doudoroff (ED)	35
VI.3. Procesos de producción de etanol	37
VI.3.1. Alcance de la producción del etanol a partir de materiales alternativos	38
VI.3.2. Tecnología basada en la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos	38
VI.3.3. Aspectos prometedores de la utilización de materiales lignocelulósicos	40
VI.3.3.1. Hidrólisis enzimática de celulosa	40
VI.3.3.2. Tecnología fermentativa de la conversión de xilosa en etanol	41
<b>CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
VII.1. Medio de cultivo	42
VII.2. Material biológico	42
VII.2.1. Colección y selección de muestras termófilas	42
VII.2.2. Material agroindustrial	46
VII.3. Determinaciones analíticas	46
VII.3.1. Determinación de la velocidad de crecimiento	46
VII.3.2. Cuantificación de etanol en fase gaseosa	46
VII.3.3. Cuantificación de etanol, sub-productos y consumo de substratos en fase líquida	46
VII.3.4. Análisis de gases como producto de la fermentación	47
VII.4. Activación y selección de consorcios	47
VII.4.1. Condiciones de cultivo en batch	47
VII.4.2. Selección primaria de consorcios anaerobios termófilos basada en la producción de etanol a partir de la utilización de material agroindustrial: paja de trigo y melaza de caña	47
VII.4.3. Selección secundaria de consorcios anaerobios termófilos basada en la fermentación de D-xilosa o D-glucosa para la producción de etanol	47
VII.5. Optimización de la producción de etanol mediante la aplicación de diseños factoriales	48
VII.5.1. Influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol	48
VII.5.2. Influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de etanol	48
VII.5.3. Diseño factorial basado en la modificación de las concentraciones de xilosa y urea en el medio de cultivo y su efecto en la producción de etanol	48
VII.6. Aislamiento, selección y caracterización de cepas aisladas del consorcio B	49
VII.6.1. Aislamiento y selección de cepas termofilas anaerobias	49
VII.7. Influencia de la privación de fuente de nitrógeno en la producción de etanol por la cepa 45B	50
VII.8. Producción de etanol por la cepa 45B a partir de la utilización de otros substratos: $\alpha$ -D glucosa, $\alpha$ -D xilosa,	

D-celobiosa y D-sacarosa	50
VII.9. Caracterización de la cepa 45B	50
VII.9.1. Caracterización microscópica	50
VII.9.1.1. Microscopía óptica	50
VII.9.1.2. Microscopía electrónica	50
VII.9.1.2.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	50
VII.9.1.2.2. Microscopía electrónica de escaneo (SEM)	50
VII.9.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa 45B	51
VII.9.3. Perfil metabólico de carbohidratos de la cepa 45B	51
VII.9.4. Identificación de la cepa 45B por ADNr 16S	51
VII.9.4.1. Extracción de ADN	51
VII.9.4.2. Amplificación del gen 16S ADNr por PCR	52
VII.9.4.3. Detección de los productos del PCR	53
VII.9.4.4. Purificación de los productos del PCR	53
VII.9.4.5. Secuenciación	53
VII.9.4.6. Análisis de secuenciación e identificación	53

## **CAPÍTULO VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES 54**

VIII.1. Crecimiento y producción de etanol a partir de la utilización de residuos agroindustriales: paja de trigo y melaza de caña	54
VIII.2. Selección secundaria de consorcios anaerobios termófilos basada en la fermentación de D-xilosa o D-glucosa para la producción de etanol	56
VIII.2.1. Cinética de crecimiento del consorcio seleccionado	58
VIII.3. Optimización del proceso de producción de etanol por el consorcio microbiano B a través de la aplicación de diseños factoriales	59
VIII.3.1. Influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol	59
VIII.3.2. Influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de etanol	62
VIII.3.2.1. Balance de masas de los productos de fermentación	64
VIII.3.3. Diseño factorial basado en la modificación de las concentraciones de xilosa y urea en el medio de cultivo y su efecto en la producción de etanol	66
VIII.3.3.1. Análisis de regresión múltiple	69
VIII.4. Aislamiento, selección y caracterización de cepas aisladas del consorcio B	71
VIII.4.1. Aislamiento y selección de cepas termófilas anaerobias	71
VIII.4.2. Influencia de la privación de fuente de nitrógeno en la producción de etanol por la cepa 45B	73
VIII.4.3. Producción de etanol por la cepa aislada 45B a partir de la utilización de otros substratos: $\alpha$ -D glucosa, $\alpha$ -D xilosa, D-celobiosa y D-sacarosa	75
VIII.4.4. Caracterización de la cepa 45B por microscopía electrónica	78
VIII.4.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	78
VIII.4.4.2. Microscopía electrónica de escaneo (SEM)	79
VIII.4.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa 45B	80
VIII.4.6. Perfil metabólico de la cepa 45B	81
VIII.4.7. Identificación de la cepa 45B	82



<b>CAPÍTULO IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO X.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento y consecuencias moleculares para la célula (Madigan, M., et al., 2000)

Figura 2. Relación entre la temperatura y la velocidad de crecimiento de un típico psicrófilo, mesófilo, termófilo e hipertermófilo (Extractado de Madigan, M., et al., 2000)

Figura 3. Asociación química de la pared celular vegetal (Extractado de Pereira, L., 2003)

Figura 4. Hidrólisis del 4-O-metilglucuronoxilano y celulosa como resultado de un tratamiento físico químico (Extractado de Pereira, L., 2003)

Figura 5. Patrón de degradación de lignina como resultado del tratamiento fisicoquímico (Extractado de Pereira, L., 2003)

Figura 6. Estructuras simplificadas y sitios de ataque enzimático a polímeros de lignocelulosa (Extractado de Roehr, M., et al 2001)

Figura 7. Esquema de reacciones de la digestión anaeróbica de materiales poliméricos. (Extractado de Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991)

Figura 8. Ruta metabólica de Embden-Meyerhof y principales productos de fermentación (Extractado de Madigan et al., 2000)

Figura 9. Fermentaciones bacterianas que proceden de la ruta metabólica de Embden Meyerhof (EM) (Extractado de Roehr, et al, 2001)

Figura 10. Ruta metabólica heteroláctica (Fosfocetolasa) (Extractado de Roehr, et al, 2001)

Figura 11. Crecimiento del consorcio B en 5g/L de  $\alpha$ -D xilosa a pH 7 y 60°C en cultivo batch

Figura 12. Crecimiento del consorcio B bajo tres condiciones de cultivo diferentes

Figura 13. Incremento de la densidad óptica en el tiempo y producción de etanol del consorcio B cuando cloruro de amonio y urea son utilizados como fuente de nitrógeno

Figura 14. Crecimiento del consorcio B

Figura 15. Superficie de respuesta del diseño factorial, variables independientes: xilosa (g/L) y urea (g/L), variable dependiente: Etanol (g/L)

Figura 16. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa aislada 45B, y morfología microscópica de la misma a diferentes etapas de crecimiento

Figura 17. Crecimiento de la cepa 45B, de la condición +1 del experimento de privación de nitrógeno

Figura 18. Morfología microscópica de la cepa 45B mediante TEM

Figura 19. Morfología microscópica de la cepa 45B mediante SEM

Figura 20. Perfil de temperaturas empleadas durante el crecimiento de la cepa 45B

Figura 21. Árbol filogenético que determina la distancia filogenética de la cepa 45B con secuencias de cepas relacionadas

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas del los extremófilos (Schiraldi, Ch., et al., 2002)
- Tabla 2. Limites de temperatura conocidos en la actualidad para el crecimiento de diferentes organismos vivientes (Madigan, M., et al., 2000)
- Tabla 3. Especies bacterianas y fúngicas productoras de etanol como principal producto de la fermentación (Lin, Y., et al. 2006)
- Tabla 4. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas comunes y diferentes desechos
- Tabla 5. Características de las muestras colectadas
- Tabla 6. Esquema del diseño factorial 32: Variables independientes (Urea g/L) y (Xilosa g/L), variable dependiente (Etanol g/L)
- Tabla 7: Primers utilizados en el PCR 16S rDNA. Tm y GC% fueron determinados usando el calculador Finnzymes disponible en [www.finnzymes.com/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)
- Tabla 8. Formación de etanol y metano por el crecimiento de consorcios cultivados en melaza de caña y paja de trigo como substratos
- Tabla 9. Ensayo de producción de etanol a partir de la fermentación de D-xilosa y D-glucosa
- Tabla 10. Parámetros metabólicos determinados cuando el consorcio B es cultivado en medio mineral anaeróbico suplementado con D-xilosa como única fuente de carbono, a pH neutro y 60°C de temperatura
- Tabla 11. Parámetros utilizados para determinar la influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol
- Tabla 12. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B cuando es cultivado en 4g/L de  $\alpha$ - D xilosa como único substrato
- Tabla 13. Parámetros metabólicos determinados cuando el consorcio B es cultivado en medio mineral anaeróbico suplementado con D-xilosa como fuente de carbono y cloruro de amonio o urea como fuente de nitrógeno, a pH neutro y 60°C de temperatura.
- Tabla 14. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B cuyo es cultivado en 4g/L de  $\alpha$ - D xilosa como único substrato

Tabla 15. Esquema del diseño factorial: Variables independientes (Urea g/L) y (Xilosa g/L), variable dependiente (Etanol g/L)

Tabla 16. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B en cada uno de los experimentos del diseño factorial

Tabla 17. Características de las cepas aisladas provenientes del consorcio B

Tabla 18. Diseño experimental de privación de nitrógeno cuando la cepa 45B es cultivada en xilosa como fuente de carbono

Tabla 19. Sumario de los parámetros metabólicos de la cepa 45B, productos de fermentación, velocidades de crecimiento, proporciones de etanol respecto a los sub-productos

Tabla 20. Sumario de los parámetros metabólicos de la cepa 45B cuando fue cultivada en diferentes substratos: productos de la fermentación, velocidades de crecimiento, proporciones de etanol respecto a los sub-productos

Tabla 21. Perfil de temperaturas empleadas durante el crecimiento de la cepa 45B

Tabla 22. Perfil metabólico de la cepa 45B

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El incremento en el costo del petróleo junto al aumento en la dependencia de la importación del mismo, proporciona una oportunidad a la biotecnología para la producción de biocombustibles y productos químicos de valor agregado, haciendo de ésta económicamente competitiva y factible debido al desarrollo de nuevas tecnologías que permiten el reemplazo de los combustibles de automotores basados en el petróleo y los petroquímicos, y el abastecimiento de energía a partir de recursos sostenibles y renovables como las plantas, los materiales derivados de plantas y los residuos de las mismas (Jarboe L.R., *et al.* 2007).

Alrededor de todo el mundo, numerosos simposios y convenciones son llevados a cabo, con el propósito fundamental de discutir la llamada “Crisis de energía” donde muchas nuevas ideas y conceptos para mejorar los procesos de conversión de energía son discutidos. Alternativas al uso de combustibles derivados del petróleo son requeridas para reducir la dependencia mundial en el uso de estos recursos no renovables. El etanol, a partir de biomasa con alto contenido de celulosa y hemicelulosa muestra una especial atención como posible sustituto del petróleo y sus derivados (Naotaka K. *et al.*, 1986).

El bioetanol es uno de los más importantes combustibles renovables que contribuye a la reducción del impacto ambiental negativo generado a través de la utilización mundial del petróleo como combustible. Aunque la producción de etanol se lleva a cabo por un proceso complicado, la transformación de recursos biológicos como los cultivos energéticos (caña de azúcar, maíz y otros) o el material lignocelulósico requiere el acondicionamiento o pretratamiento de la materia prima para su conversión a etanol con el uso de los microorganismos fermentativos (Cardona C., *et al.* 2007).

La producción de etanol a partir de los residuos agrícolas y forestales, residuos sólidos municipales, cultivos energéticos y otras formas de material lignocelulósico, puede sostener la producción de energía, reducir los déficits de producción, disminuir la contaminación urbana del aire contribuyendo a reducir la red de acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera (Wyman, C., *et al.* 1994).

Debido a la alta productividad y tolerancia al etanol, algunas levaduras y bacterias tales como *Zymomonas sp.*, son los microorganismos comunmente usados en la producción industrial de etanol. Sin embargo, estos microorganismos fermentan un reducido número de sustratos. Recientemente, bacterias etanológicas de característica extremófila son estudiadas como una alternativa al uso de levaduras. La elevada temperatura empleada para su crecimiento ofrece muchas ventajas al proceso, tales como la facilidad con la que se recupera el producto, el amplio espectro respecto al consumo de sustratos que permite la utilización de fuentes de carbono baratas disponibles en la agricultura, residuos forestales y municipales (Wyman, C., *et al.* 1994).

Como la producción industrial de etanol es dependiente de la actividad microbiana, particularmente de las levaduras, reacciones metabólicas exotérmicas son producidas, conduciendo de esta manera al incremento en la temperatura del proceso y reduciendo a su vez la productividad de etanol. Otra principal desventaja del proceso de fermentación etanólica con el uso de levaduras, es su necesidad de aireación, que a su vez conduce al incremento de biomasa y decremento en la productividad de etanol (Sree, K. *et al.* 2000).

En este sentido y por las grandes desventajas de los sistemas de producción de etanol, mencionadas anteriormente, recibe considerable atención el uso potencial de bacterias anaerobias termófilas como sistemas de producción de etanol y su aplicación tiene la principal ventaja de llevar a cabo la fermentación etanólica de diversos substratos, sin necesidad de aireación a elevadas temperaturas, lo cual, permite la remoción constante del producto disminuyendo así los costos de producción. Sin embargo, es difícil hallar bacterias anaerobias termófilas apropiadas, las cuales produzcan etanol eficientemente. En el presente trabajo se describe la selección, el aislamiento, la identificación y la caracterización de bacterias anaerobias termófilas con potencial uso en la producción de etanol, aunque estos sistemas son nuevas alternativas de producción, el conocimiento de los mismos es todavía reducido, aún así este proceso es una esperanza para resolver la crisis de energía en el futuro.

## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

La conversión de glucosa a etanol ha sido muy bien estudiada, el proceso de fermentación etanólica realizada por el hombre es una de las más antiguas y simples aplicaciones de los microorganismos (Génesis 1: 21), pero la demanda de industrialización es creciente, el incremento en el uso de recursos energéticos y las consideraciones económicas a las que conllevan, reflejan problemas en la producción industrial de grandes cantidades de etanol (Ahring B., *et al.* 1999).

La utilización de lignocelulosa a partir de biomasa vegetal, representa un importante recurso disponible para la producción de energía y diversos compuestos químicos de valor agregado (Coughlan, M.P., *et al.* 1992). La conversión de materiales vegetales crudos (plantas, productos derivados de plantas y residuos) en etanol como biocombustible, es una atractiva alternativa para el abastecimiento de combustibles. Hoy en día, la conversión de la fracción celulósica del material lignocelulósico a etanol, produce pocos problemas técnicos y microbiológicos, contrariamente a lo establecido con la conversión de hemicelulosas (Hahn-Hagerdal, B., *et al.* 1991 y 1993).

Aunque numerosos estudios han sido realizados, la mayoría de ellos involucran una producción de etanol a partir de la fermentación de recursos biológicos, en los que pocas especies entre las cuales, levaduras, hongos y bacterias convierten material lignocelulósico en etanol, con un satisfactorio rendimiento y productividad. Cultivos enriquecidos de bacterias termófilas anaerobias fueron estudiados en cuanto a su capacidad productora de etanol, y muchas bacterias nuevas fueron aisladas con este fin (Ahring B., *et al.* 1999).

Las bacterias anaerobias termófilas estudiadas por su potencial en la producción de etanol (Cook, G.M., *et al.* 1994) han sido clasificadas, y fueron identificadas especies bacterianas tales como: *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Wiegel, J., *et al.* 1981 y Kannan, V., *et al.* 1985), *Clostridium thermocellum* (Viljoen, J.A., *et al.* 1926; McBee, R.H.1954; Ng, T.K., Ben-Bassat, A. *et al.* 1981), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Wiegel, J., *et al.* 1979; Donmez, S., *et al.* 1992) (reclasificado como *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*) (Lee, Y., *et al.* 1993), *Thermoanaerobium brockii* (Zeikus, J.G., *et al.* 1979; Ben-Bassat, A., *et al.* 1981) (reclasificado como *Thermoanaerobacter brockii*) (Lee, Y., *et al.* 1993), *Clostridium thermosaccharolyticum* (McClung, L.S. 1935; Mistry, F., *et al.* 1989) (reclasificado como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) (Collins, M.D., *et al.* 1994) y *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A (Weimer, P.J. 1985; Lee, Y., *et al.* 1993). La mayor ventaja del uso de los microorganismos mencionados anteriormente en la producción de etanol es su habilidad de convertir una variedad de carbohidratos propios del material lignocelulósico a etanol (Sommer P., *et al.* 2004).



## **CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **III.1. Justificación**

Con la inevitable depleción del abastecimiento de energía mundial, es creciente el interés por la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de energía (Zaldivar, J. *et al.* 2001). El etanol es un importante químico industrial con un emergente potencial como biocombustible de reemplazo a los combustibles fósiles (Avci, A., *et al.* 2006). Adicionalmente, el etanol posee baja reactividad fotoquímica en la atmósfera, reduciendo su impacto en la formación de ozono, tiene menor efecto contaminante y su impacto ambiental no es significativo, comparado al combustible fósil (Stephanopoulos, G., *et al.* 1991). Actualmente, el etanol es el único combustible renovable que es producido en cantidades comerciales, pero su demanda se incrementa cada vez más, debido al interés económico y ambiental (Bruce, W., 2008). Por esta razón, se ha incrementado la necesidad de utilizar materiales crudos alternativos, en adición al maíz y la caña de azúcar, los cuales hoy en día, son el recurso primario para la producción de etanol (Avci, A., *et al.* 2006).

Así mismo, los elementos dominantes en el costo de producción de etanol son: la disponibilidad de sustratos, y la tecnología de procesamiento de los mismos. La producción de etanol a partir de residuos forestales y agrícolas, residuos orgánicos municipales sólidos, cultivos energéticos y otras de formas de material lignocelulósico, podría contribuir al abastecimiento de energía, reducir déficits de producción, y disminuir la contaminación ambiental, evitando la acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera (Wyman, C., *et al.* 1994).

Las fermentaciones microbianas ofrecen una atractiva alternativa para la producción sostenible de energía. Durante la fermentación se pueden utilizar varios tipos de material lignocelulósico o residuos orgánicos para producir compuestos energéticos, tales como etanol, metano, butanol e hidrógeno (Claassen *et al.* 1999; Zeikus, 1980).

La completa utilización del sustrato es uno de los prerequisites, para demostrar que el proceso de producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, es económicamente competitivo (Galbe, M. y Zacchi, G., 2002). Esto significa que todos los tipos de carbohidratos de la celulosa y hemicelulosas, deben ser convertidos a etanol, y que los microorganismos utilizados lleven a cabo esta conversión eficientemente.

Historicamente, el microorganismo más utilizado en el proceso convencional de fermentación etanólica es *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, muchas bacterias, levaduras y hongos han sido reportados por su potencial de producir etanol (Lin, Y., 2006). Las bacterias anaerobias termófilas han sido sugeridas como microorganismos alternativos para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, debido a su habilidad de metabolizar naturalmente ambos carbohidratos (hexosas y pentosas), encontrados en el material lignocelulósico (Lynd, L., 1989).

El uso de estos microorganismos tiene ventajas potenciales asociadas con la producción de etanol a temperaturas elevadas, incluyendo altas velocidades de bioconversión, conduciendo a la reducción en tiempos de fermentación. A elevadas temperaturas la solubilidad de oxígeno y otros gases decrece, favoreciendo el mantenimiento de condiciones anaerobias a largo plazo. Existe una mejor disponibilidad de sustrato debido al incremento de su solubilidad por efecto de la temperatura. La viscosidad del medio de fermentación decrece a elevadas temperaturas, por tanto, la energía requerida para su agitación sería minimizada. Además, existe bajo riesgo de contaminación y recuperación facilitada de producto a elevadas temperaturas (Wiegel, 1980 y Lynd, 1989).

En el proceso convencional de fermentación etanólica, comúnmente se producen reacciones metabólicas exotérmicas, que conducen al incremento en la temperatura del proceso, reduciendo la productividad del mismo; con el uso de microorganismos anaerobios termófilos se puede aprovechar este incremento de temperatura, para minimizar el uso de energía adicional requerida en el proceso, esto llevado a cabo sin afectar el rendimiento en la producción de etanol (Wiegel, 1980).

Existen muchas ventajas que demuestran el potencial de las bacterias anaerobias termófilas para la producción de etanol, pero estos microorganismos también poseen grandes desventajas, y una de ellas es la formación de múltiples productos finales en adición al etanol, como otros alcoholes, ácidos orgánicos y una mezcla de gases. Sin embargo, muchos estudios confirman la disposición de éstos microorganismos y su amplia distribución en fuentes naturales. Debido a esto, éste tipo de microorganismos son sujetos a un exhaustivo trabajo de selección por vía natural o ingeniería genética y son una alternativa para la solución a la crisis mundial de energía (Lin, Y., 2006).

Por las anteriormente explicadas, el presente proyecto de investigación pretende contribuir al proceso de biorremediación a través de la fermentación etanólica de residuos agroindustriales, mediante el empleo de microorganismos termófilos anaerobios, propios de zonas geotérmicas del altiplano boliviano. La finalidad fundamental es la selección, aislamiento e identificación de bacterias potenciales en la producción de etanol, para posteriormente establecer un sistema eficaz de producción del mismo.

En este sentido, se estudiaron bacterias termófilas anaerobias capaces de crecer, metabolizar residuos agroindustriales y producir etanol a una temperatura extrema de 60 °C. Dichas bacterias fueron estudiadas mediante técnicas de adaptación, selección y aislamiento a condiciones extremas de temperatura, en sistemas de cultivo batch. De igual manera, se estudió el potencial de consorcios microbianos productores de etanol y se identificó el microorganismo responsable de la producción de etanol, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, contribuyendo así a la identificación de la diversidad microbiana de Bolivia.

## **III.2. Objetivos de la investigación**

### **III.2.1. Objetivo general**

- Seleccionar, aislar e identificar microorganismos anaerobios termófilos productores de etanol, realizando fermentaciones con residuos agroindustriales y sustratos definidos presentes en el material lignocelulósico.

### **III.2.2. Objetivos específicos**

- Realizar una selección primaria y secundaria de microorganismos anaerobios termófilos productores de etanol, mediante la fermentación de residuos agroindustriales y sustratos definidos.
- Determinar un balance de masas de los diferentes productos del metabolismo fermentativo considerando el rendimiento en la producción de los mismos, por el consorcio microbiano con mejor capacidad productora de etanol.
- Optimizar la producción de etanol del consorcio B mediante la aplicación de diseños factoriales, estableciendo condiciones adecuadas de cultivo como son: tipo de fuente de nitrógeno, concentración de nitrógeno y proporción Carbono : Nitrógeno.
- Seleccionar y aislar cepas bacterianas productoras de etanol, utilizando técnicas de anaerobiosis de roll-tube y cultivo bifásico a partir del consorcio microbiano B.
- Optimizar la producción de etanol mediante la privación de fuente de nitrógeno, determinando el balance de masas, las cinéticas de crecimiento y producción, y rendimientos de la producción de etanol en función a la formación de biomasa y el consumo de sustrato, en cultivos batch de la cepa 45B.
- Determinar el incremento en la producción de etanol respecto al consumo de diferentes sustratos, estableciendo el balance de masas, las cinéticas de crecimiento y producción, y rendimientos de la producción de etanol en función a la formación de biomasa y el consumo de sustrato en cultivos batch.
- Identificar la cepa 45B productora de etanol, a través de la secuenciación del gen 16S ADN<sub>r</sub> y comparar el grado de homología mediante el alineamiento del gen con secuencias homólogas de cepas tipificadas.
- Caracterizar mediante pruebas bioquímicas y estudios de morfología macro y microscópica la cepa 45B.

## **CAPÍTULO IV. EXTREMÓFILOS**

### **IV.1. Extremófilos en los límites de la vida**

Los extremófilos procariotas fueron los primeros representantes de la vida en la tierra y son los responsables de la génesis de estructuras geológicas durante la evolución y la creación de todos los ecosistemas actualmente conocidos, ya que la vida microbiana no se halla limitada a ambientes específicos (Van den Burg, B., 2003).

Las comunidades microbianas se encuentran en las condiciones más diversas, incluyendo ambientes extremos de temperatura, presión, salinidad y pH. La flexibilidad de su genoma permitió probablemente que la vida se adaptara a una amplia gama de ambientes extremos. Consecuentemente, la diversidad procariótica moderna clasificada en base a factores fisicoquímicos que establecen condiciones de crecimiento agrupan especies microbianas como: termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalófilas, halófilas, barófilas y radioresistentes. Esta sistemática artificial no puede reflejar las acciones múltiples de diversos factores ambientales puesto que un microorganismo podría reunir características de varios extremo-grupos (Gomes, J., *et al.* 2004).

Hoy en día se espera que los extremófilos desempeñen un papel predominante en la industria en el futuro cercano. La biotecnología de extremófilos todavía no se halla muy establecida pero su desarrollo rápido asegura implicaciones que alcanzan importantes aplicaciones. La tabla 1, resume algunos usos y productos importantes de la biotecnología, derivados de los extremófilos.

**Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas del los extremófilos (Schiraldi, Ch., et al. 2002)**

Microorganismos	Enzimas y compuestos endógenos	Aplicaciones y productos
<b>Termófilos</b> (50 – 110 °C)	Amilasas	Glucosa y fructosa como edulcorantes
	Xilanasas	Blanqueamiento del papel
	Proteasas	Producción de aminoácidos, procesamiento de alimentos, industria de bebidas y detergentes, etc.
	Celulasas	Glucosa para la producción de etanol
	ADN-polimerasas	Ingeniería genética
<b>Psicrófilos</b> (5 – 20 °C)	Proteasas neutrales	Maduración del queso y productos lácteos
	Amilasas	
	Lipasas	Detergentes
<b>Acidófilos (pH&lt;2)</b>	Ácidos grasos poli-insaturados	Industria farmacéutica
	Ice-proteína	Nieve artificial
	Oxidación del azufre	Biorremediación
<b>Alkalófilos (pH&gt;9)</b>	Proteasas	
	Amilasas	
	Lipasas	Detergentes
<b>Halófilos</b> (3-20% de sal)	Ciclodextrinas	Estabilización de sustancias volátiles
	Antibióticos	Industria farmacéutica
	Caroteno	Industria alimenticia
	Glicerol	Industria farmacéutica
	Solutos compatibles	Industria farmacéutica
	Membranas	Surfactantes

## IV.2. Ecología y hábitats de los extremófilos

El crecimiento y la supervivencia de todos los organismos vivos son controlados por una variedad de factores físicos y químicos, bióticos y abióticos. Los microorganismos extremófilos son aquellos capaces de crecer y cumplir todas sus funciones metabólicas en ambientes extremos. Para definir un ambiente extremo, se debe definir el ambiente no-extremo o normal. No hay definiciones determinantes de un ambiente normal, pero se puede asumir que hay un consenso general sobre algunos de los factores físicos y químicos más importantes. En este sentido, un ambiente normal se halla en rangos de temperatura de 4 a 40°C, pH 5 a 8.5 y tiene una salinidad promedio del 0.9% (Gomes, J., *et al.* 2004).

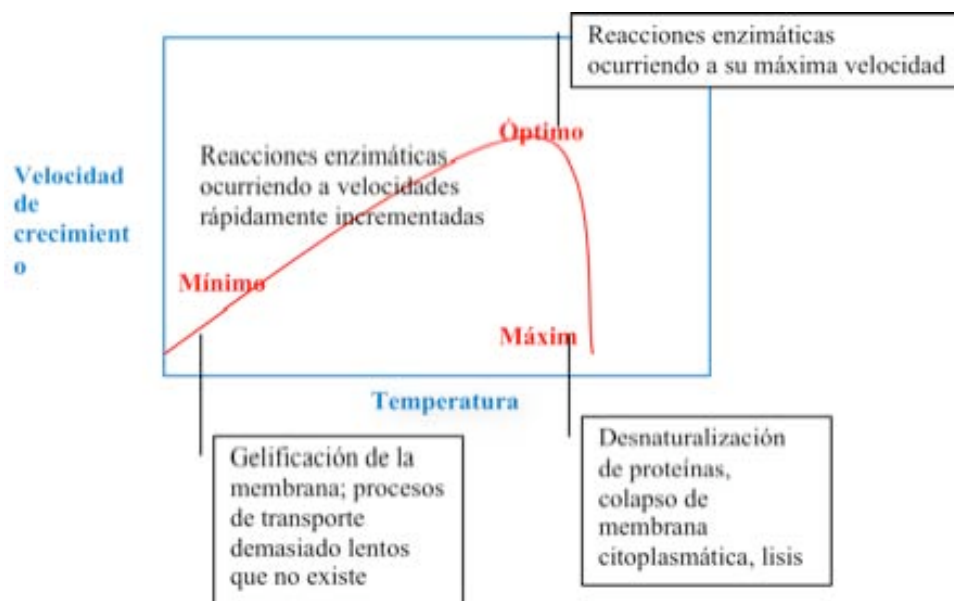
Un microorganismo extremófilo es aquel que vive fuera de un ambiente normal, sin embargo, esta definición no es muy adecuada, debido a que existen muchos microorganismos que pueden sobrevivir fuera de un ambiente normal aunque sus condiciones óptimas de crecimiento se hallen dentro de éste. Un extremófilo, por lo tanto, es considerado como un organismo cuyas condiciones óptimas de crecimiento se encuentran fuera de aquellas que constituyen un ambiente normal, más allá de ambientes normales existe una diversidad de especies que soportan la tensión ambiental (Gomes J., *et al.* 2004).

Existen varios factores bióticos que determinan el crecimiento de extremófilos, pero los más importantes son probablemente las fuentes alimenticias y de energía que el organismo puede utilizar, la disponibilidad de estas fuentes y los mecanismos bioquímicos que los extremófilos poseen (Schiraldi, Ch., *et al.* 2002).

## IV.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento

La temperatura es el factor ambiental más importante que afecta el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Los microorganismos son incapaces de crecer a temperaturas demasiado elevadas o bajas, pero los valores absolutos máximos o mínimos de temperatura varían enormemente entre diversos géneros y especies de microorganismos, y son usualmente un reflejo del rango y el promedio de temperatura de sus hábitats (Madigan, M., *et al.* 2000).

La temperatura afecta organismos vivientes de dos maneras diferentes: cuando la temperatura se incrementa, se producen reacciones químicas y enzimáticas a mayor velocidad y, por tanto, el crecimiento se incrementa rápidamente. Sin embargo, por encima de cierta temperatura, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden ser afectados irreversiblemente. Es así que, cuando la temperatura se incrementa en un rango dado, el crecimiento y la función metabólica son incrementados también, hasta cierto punto en el que se producen reacciones de inactivación y la función celular cae drásticamente a cero. Por tanto, para cada microorganismo existe una *temperatura mínima*, por debajo de la cual no se produce crecimiento. Una *temperatura óptima*, a la cual el crecimiento es más rápido y una *temperatura máxima*, sobre la cual el crecimiento no es posible. La temperatura óptima es siempre más cercana a la temperatura máxima que a la mínima. Estas tres temperaturas son llamadas temperaturas cardinales (Figura 1) y generalmente son características de cada tipo de microorganismo, pero no son completamente definidas, debido a que pueden ser modificadas por otros factores ambientales, en particular la composición del medio de cultivo (Madigan, M., *et al.* 2000).



**Figura 1. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento y consecuencias moleculares para la célula (Madigan, M., et al. 2000).**

La temperatura de crecimiento máxima de un microorganismo dado, a menudo refleja la inactivación de una o más proteínas claves en la célula. Sin embargo, los factores que controlan la temperatura mínima de crecimiento de un microorganismo no están claros en la actualidad. La membrana citoplasmática debe hallarse en un estado fluido para su funcionamiento apropiado, probablemente a una temperatura demasiado baja se produce un congelamiento de la membrana citoplasmática y las funciones de transporte de nutrientes o formación del gradiente de protones no son llevadas a cabo apropiadamente. Esta explicación es soportada por experimentos en los cuales la temperatura mínima para un microorganismo es alterada en cierto grado por ajustes en la composición lipídica de la membrana (Konings, W., 2006). Esto es observado también en las temperaturas cardinales de diferentes microorganismos que difieren ampliamente, algunos microorganismos tienen una temperatura óptima tan baja como 4 °C y otros tan alta como 100 °C (Madigan, M., et al. 2000).

El rango de temperatura en el cual ocurre el crecimiento es incluso mucho más amplio que el mencionado anteriormente, y varía desde temperaturas menores al punto de congelación del agua hasta temperaturas mayores al punto de ebullición del agua. Sin embargo ningún microorganismo puede crecer en todos los rangos de temperatura, y el rango usual para un microorganismo dado se halla alrededor de 30 °C, aunque algunos tienen un rango más amplio que otros (Madigan, M., et al., 2000).

### IV.3.1. Clasificación de microorganismos de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento

Aunque existe una gran variedad de microorganismos, desde aquellos con muy baja temperatura óptima, hasta aquellos con una temperatura óptima muy elevada, es posible clasificarlos en cuatro grandes grupos en base a su temperatura óptima de crecimiento (Figura 2):

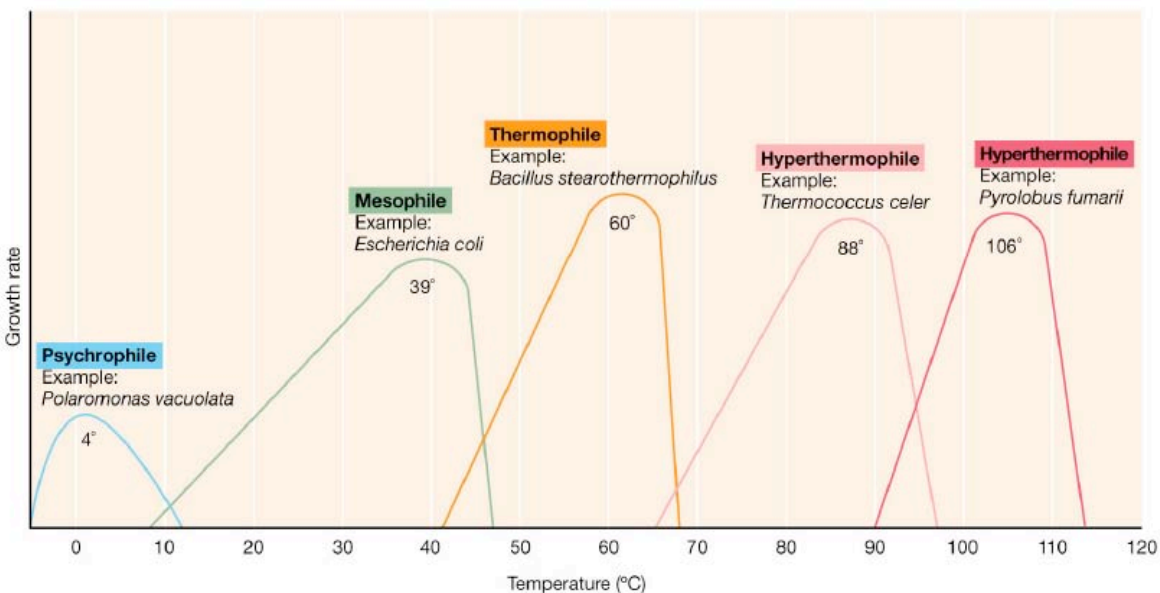
Psicrófilos, con temperatura óptima baja (4°C a 10°C),

Mesófilos, con temperaturas óptimas en el rango medio (10°C a 45°C),

Termófilos con temperatura óptima alta (50°C a 65°C),

Hipertermófilos con temperatura óptima muy elevada (>70°C).

Los mesófilos se encuentran en animales de sangre caliente, en ambientes acuáticos y terrestres a diferentes latitudes; los psicrófilos y termófilos son encontrados en ambientes inusualmente fríos o calientes, respectivamente; los hipertermófilos son encontrados en ambientes extremadamente calientes, tales como lagunas termales, géiseres y agujeros profundos hidrotermales (Madigan, M., *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Relación entre la temperatura y la velocidad de crecimiento de un típico psicrófilo, mesófilo, termófilo e hipertermófilo (Extractado de Madigan, M., *et al.*, 2000).



### IV.3.2. Diversidad microbiana a elevadas temperaturas

La diversidad de especies que existen en un determinado hábitat es una consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente. Actualmente existe un gran interés por el estudio de la biodiversidad de los ambientes extremos, con el fin de determinar cuáles son las características peculiares que permiten a estos microorganismos sobrevivir y qué papel tienen en los ciclos de la naturaleza (Schiraldi, Ch., *et al.* 2002).

El estudio de los microorganismos del agua comenzó en el siglo XIX, siendo su principal objeto las bacterias patógenas, con el fin de controlar las enfermedades transmitidas por este medio. En los últimos años se han descrito varios tipos de comunidades microbianas en diferentes manantiales calientes (Ward, D., *et al.* 1998) y se han aislado un gran número de nuevas bacterias termófilas (Stetter, K., *et al.* 1996). Estos aspectos generales se han incrementado con estudios sobre la aplicación de estos microorganismos en la biotecnología, un ejemplo de ello es la resistencia al calor de enzimas provenientes de termófilos como la polimerasa utilizada en la técnica PCR obtenida de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus* (De la Rosa, M., *et al.* 2000).

Una hipótesis muy sugestiva es que sean posibles antecesores del ser humano, ya que se considera que las primeras formas de vida de la Tierra hace 3 500 millones de años, fueron los microorganismos hipertermófilos anaerobios (Arqueas) (Miller, S., *et al.* 1995; Madigan, M., *et al.* 2000).

### IV.4. Ambientes termales

La vida microbiana se desarrolla en ambientes con elevada temperatura e incluso a temperaturas superiores al punto de ebullición del agua. Sobre los 45 °C de temperatura solo sobreviven formas de vida procariota, pero incluso a este nivel, existe una gran diversidad de bacterias y arqueas. Por consiguiente, las temperaturas debajo de este límite extremo, son comunes en la naturaleza y los microorganismos que alcanzan su crecimiento óptimo debajo de este rango son también muy comunes; tales organismos pueden ser aislados sin gran dificultad (Schiraldi, Ch., *et al.* 2002).

En el presente trabajo se estudiaron los ambientes termo-bióticos que se hallan en el rango termófilo de 45 a 60 °C, según la clasificación realizada por Madigan, M., *et al.* 2000. Temperaturas tan altas como estas son encontradas en la naturaleza solo en ciertas áreas, por ejemplo, los suelos son sujetos al calentamiento solar por largos periodos de tiempo, éstos son a menudo calentados a una temperatura superior a los 50 °C a medio día, y algunos suelos pueden incluso ser calentados a una temperatura de 70 °C; aunque pocos centímetros debajo de la superficie la temperatura es mucha más baja. Es así que este tipo de ambiente termal favorece el crecimiento óptimo de microorganismos termófilos aerobios. Materiales fermentados tales como el compost usualmente alcanzan temperaturas entre 60 a 65 °C; sin embargo, los ambientes generalmente extremos respecto a su temperatura son encontrados en la naturaleza en asociación con fenómenos volcánicos y son denominados áreas geotérmicas (Madigan, M., *et al.* 2000).

Las áreas geotérmicas del mundo son lugares permanentemente calientes y son los hábitats naturales principales de los termófilos (Madigan, M., *et al.* 2000), dichas áreas se caracterizan por tener energía térmica acumulada bajo la superficie de la tierra.

#### **IV.4.1. Áreas geotérmicas**

Existen dos tipos fundamentales de áreas geotérmicas: hidrotérmicas, que contienen agua a alta presión y temperatura, almacenada bajo la corteza de la tierra en una roca permeable cercana a una fuente de calor; y sistemas de roca caliente, formados por capas de roca impermeable que recubren un foco calorífico (Schiraldi, Ch., *et al.* 2002).

##### **IV.4.1.1. Áreas hidrotérmicas**

###### **IV.4.1.1.1. Géiseres**

Un géiser es un tipo de fuente termal que emana periódicamente, expulsando una columna de agua caliente y vapor al aire. La palabra géiser viene de Geysir, nombre de una terma en Haukadalur, Islandia; el nombre, sucesivamente, proviene del verbo islandés gjósa, "emanar". La formación de géiseres requiere una hidrogeología favorable que existe solo en algunas partes del planeta, por lo que son un fenómeno bastante extraño. Existen cerca de 1000 alrededor del planeta, de los cuales un 50% se halla en el Parque Nacional Yellow Stone en USA (Lechetalier, M. 1952).

Los géiseres son bastante raros, debido a que requieren una combinación de agua, calor y fortuitas cañerías. Esta combinación existe en pocos lugares de la Tierra. Los campos de géiseres más grandes del mundo son los siguientes: Parque Nacional Yellowstone, Wyoming, Estados Unidos; Dolina Geiserov; Península de Kamchatka, Rusia; El Tatio, Chile; Zona volcánica Taupo, Nueva Zelanda. Hay otros géiseres individuales alrededor del mundo en California, Perú, Bolivia, México, República Dominicana, Azores, Kenia y Japón, pero no más agrupaciones de ellos (Lechetalier, M. 1952).

La actividad de erupción de los géiseres puede cambiar o cesar debido a la deposición de minerales dentro de los conductos internos o tuberías del géiser, intercambio de funciones con fuentes termales cercanas, influencia de terremotos e intervención humana (Bryan, T. *et al.* 1972).

###### **IV.4.1.1.2. Agua termales**

Se denomina aguas termales a las aguas minerales que salen del suelo con 5°C más que la temperatura superficial. Estas aguas proceden de capas subterráneas de la Tierra que se encuentran a mayor temperatura, las cuales son ricas en diferentes componentes minerales. Se clasifican de acuerdo a su temperatura:

- Aguas frías (menos de 20 °C)
- Aguas hipotermas (21-35 °C)
- Aguas mesotermas (35-45 °C)
- Aguas hipertermas (45-100 °C)

Prácticamente cualquier país puede presentar en sus límites aguas termales. Algunas localizaciones importantes pueden ser zonas volcánicas como Nueva Zelanda, México, Islandia, Japón, Colombia, Bolivia, Perú, Uruguay y Estados Unidos (Lechetalier, M. 1952).

#### IV.5. Termófilos

Los microorganismos termófilos han llamado de gran manera el interés y han sido los microorganismos más estudiados de entre los extremófilos, con mayor atención en sus enzimas, la mayoría de las cuales exhiben actividad óptima alrededor de la temperatura de crecimiento óptimo del microorganismo. En adición a la aplicabilidad de sus enzimas, los termófilos tienen propiedades biológicas que los hacen sujetos interesantes de estudio (Cava, F., *et al.* 2009).

Muchos termófilos (temperatura óptima de crecimiento entre 50 a 70 °C), se hallan presentes en aguas y otros ambientes termales, tales como sedimentos, lodos, rocas y en asociación a otros organismos como algas, plantas y animales. En las aguas termales donde el agua hirviente fluye, gradualmente se enfría estableciendo de esta manera un gradiente térmico. A lo largo de este gradiente crecen muchos organismos. Examinando las aguas termales y otros hábitats termales, así como la distribución de especies a lo largo de este gradiente térmico, es posible determinar los rangos de temperatura para cada tipo de organismo. En la Tabla 2 se presentan los límites de temperatura.

**Tabla 2. Límites de temperatura conocidos en la actualidad para el crecimiento de diferentes organismos vivientes (Madigan, M., *et al.*, 2000).**

<b>Grupo</b>	<b>Límite de temperatura (°C)</b>
<b>Animales</b>	
Peces y otros vertebrados acuáticos	38
Insectos	45-50
Crustaceos	49-50
<b>Plantas</b>	
Plantas vasculares	45
Musgos	50
<b>Microorganismos eucariotas</b>	
Protozoarios	56
Algas	55-60
Hongos	60-62
<b>Procariotas</b>	
<b>Bacterias</b>	
Cianobacterias	70-74
Fototrofos anóxicos	70-73
Bacterias quimiorganótrofos/quimiolitótrofos	95
<b>Arqueas</b>	
quimiorganótrofos/quimolitótrofos	113

Con esta información se concluye que los microorganismos procariotas en general son capaces de crecer a temperaturas más elevadas comparados con los organismos eucariotas. La mayoría de los termófilos son ciertas especies de Arqueas y microorganismos no fototróficos los cuales son capaces de crecer a temperaturas más elevadas comparados con los microorganismos fototróficos (Madigan, M., *et al.*, 2000).

#### **IV.5.1. Adaptaciones moleculares a la termofilia**

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos pueden crecer a temperaturas elevadas, debido a sus enzimas y otras proteínas que son estables al calor y sus macromoléculas funcionan óptimamente a elevadas temperaturas.

Estudios realizados acerca de la estabilidad al calor de este tipo de microorganismos, muestran que muchas de sus enzimas termoestables difieren muy poco de la secuencia de aminoácidos de enzimas de microorganismos mesófilos que catalizan las mismas reacciones. Esto permite deducir que la sustitución de un aminoácido crítico en una o pocas localizaciones, permite un plegado adecuado proporcionando estabilidad al calor. Muchas estructuras tridimensionales han sido estudiadas y comparadas con aquellas análogas de mesófilos, con el objetivo principal de elucidar los mecanismos que involucran a la termoestabilidad (Sternier, R., *et al.* 2001 y Kumar, S., *et al.* 2001) y un gran número de secuencias y factores estructurales fueron descubiertos por su función de proporcionar una elevada estabilidad térmica intrínseca de las proteínas.

Los termófilos producen proteínas especiales denominadas chaperoninas, las cuales son termoestables y resistentes a la desnaturalización y proteólisis. Las proteínas de termófilos desnaturalizadas a elevadas temperaturas, son re-plegadas por las chaperoninas, restaurando así su forma y función nativa (Kumar, S., *et al.* 2001). Se determinó también que la estabilidad al calor es el resultado de un número incrementado de puentes salinos (enlaces iónicos entre cargas positivas y negativas de los aminoácidos) presentes en regiones internas de proteínas, las cuales se hallan altamente condensadas en regiones hidrofóbicas, es así que naturalmente resisten a su despliegue (Madigan, M., *et al.* 2000). Además, las proteínas de microorganismos termófilos al tener su superficie cargada y sus aminoácidos termolábiles menos expuestos, poseen más interacciones iónicas y puentes de hidrógeno, incrementando su hidrofobicidad y decreciendo su flexibilidad (Sternier, R., *et al.* 2001).

Las enzimas y otras proteínas en la célula, la maquinaria sintetizadora de proteínas de los termófilos e hipertermófilos, como también otras estructuras, tales como la membrana citoplasmática deben ser estables al calor. Respecto a las membranas, por ejemplo, los microorganismos psicrófilos poseen una membrana lipídica rica en ácidos grasos insaturados, de esta manera se conserva la fluidez y funcionalidad de la membrana a bajas temperaturas. Contrariamente, los microorganismos termófilos poseen una membrana lipídica rica en ácidos grasos saturados, conservando de esta manera su estabilidad y funcionalidad a altas temperaturas. Los ácidos grasos saturados conforman un ambiente hidrofóbico mucho más fuerte, el cual favorece la rigidez y estabilidad de la membrana (Sternier, R., *et al.* 2001 y Madigan, M., *et al.* 2000).

La mayoría de los hipertermófilos son arqueas, y estos no contienen ácidos grasos en su membrana, en su lugar poseen cadenas hidrocarbonadas C40 compuestas por unidades repetidas de un pentámero denominado fitano, unido por enlaces éter al glicerol fosfato. Además, la mayoría de estas membranas están constituidas por una monocapa y su estructura es mucho más resistente que una bicapa lipídica de bacteria o eucariota (Madigan, M., *et al.* 2000).

#### **IV.5.2. Perspectivas del uso de microorganismos termófilos**

El aumento constante en el número de microorganismos termófilos e hipertermófilos recientemente aislados y el descubrimiento relacionado a sus enzimas, documentan el potencial enorme dentro de este campo científico. Aunque los avances más importantes se han hecho en la década pasada, nuestro conocimiento de la fisiología, metabolismo, enzimología y genética de este fascinante grupo de microorganismos todavía es limitado (Adams, W., *et al.* 1995).

No hay duda de que los extremófilos proveerán los catalizadores nóveles de características únicas. Además, las técnicas modernas como mutagénesis y el silenciamiento de genes conducirán a las enzimas adaptadas a condiciones *in vitro* a ser altamente específicas para incontables usos industriales. La información profunda sobre las características moleculares de sus genes y enzimas debe ser obtenida para analizar la estructura y la función de las proteínas que son catalíticamente activas alrededor del punto de ebullición del agua.

De todas las enzimas, las enzimas de origen termófilo son las que más atrajeron la atención durante las pasadas cuatro décadas (Adams, W., *et al.* 1995). Estas enzimas son de gran interés industrial y biotecnológico, debido a que pueden adaptarse a condiciones industriales drásticas. Existen muchas ventajas de llevar a cabo procesos industriales a temperaturas elevadas, como el incremento en la solubilidad de muchos substratos poliméricos resultando en un decremento de la viscosidad, incremento de la biodisponibilidad, velocidades de reacción mucho más rápidas y un decremento en el riesgo de contaminación microbiana.

Varios tipos de enzimas termoestables son requeridas por la industria, y los principales usuarios de enzimas son las industrias de detergentes, alimentos, almidón, textiles, cueros, papel y la industria farmacéutica (Adams, M., *et al.* 1995).

Además del potencial de los microorganismos termófilos para la producción de enzimas termoestables, se ha sugerido a las bacterias anaerobias termófilas como microorganismos alternativos para la producción de etanol, compuestos orgánicos tales como ácidos orgánicos (ácidos grasos volátiles) y otros alcoholes (isopropanol, butanol, propanodiol). Por ejemplo, existe un gran número de ventajas asociadas con la producción de etanol a elevadas temperaturas, incluyendo altas tasas de bioconversión, bajo riesgo de contaminación y factibilidad en la recuperación del producto (Lynd, L., *et al.* 1989).

## **CAPÍTULO V. BIOMASA COMO RECURSO RENOVABLE DE ENERGÍA**

### **V.1. Biomasa**

Biomasa es un término utilizado para todo aquel material orgánico que proviene de las plantas (incluyendo algas, árboles y cultivos energéticos). La biomasa es producida por plantas verdes convirtiendo la energía solar en material vegetal a través de la fotosíntesis e incluye todos los tipos de vegetación, como también los residuos orgánicos. La biomasa, como recurso, es considerada como materia orgánica, en la cual la energía proveniente del sol es almacenada en enlaces químicos. Cuando los enlaces entre moléculas adyacentes de carbono, hidrógeno y oxígeno son rotos por digestión, combustión y descomposición, estas sustancias liberan su energía química almacenada. La biomasa ha sido siempre considerada como la principal fuente de energía para el hombre y en la actualidad se estima que contribuirá del 10 al 14% en el abastecimiento mundial de energía (McKendry, P., *et al.* 2002).

#### **V.1.1. Características y utilización de biomasa vegetal**

La biomasa es todo aquel material proveniente de las plantas y derivado de la reacción entre el dióxido de carbono del aire, el agua y la luz solar (vía fotosíntesis), para producir carbohidratos que forman los bloques estructurales de la biomasa. Típicamente, la fotosíntesis convierte menos del 1% de la luz solar disponible en energía química. La energía solar a través de la fotosíntesis es almacenada en los enlaces químicos de los componentes estructurales de la biomasa. Si la biomasa es procesada eficientemente química o biológicamente, mediante la extracción de la energía acumulada en los enlaces químicos y la subsecuente energía como producto al combinarse con oxígeno, el carbono es oxidado para producir dióxido de carbono y agua. Este proceso es cíclico porque luego el dióxido de carbono se halla disponible para producir nueva biomasa (McKendry, P., *et al.* 2002).

El valor de un tipo particular de biomasa depende de la propiedades físicas y químicas de las moléculas de las cuales está hecha. El hombre por milenios ha explotado la energía almacenada en estos enlaces químicos, quemando la biomasa como combustible y comiendo plantas por su contenido nutricional de azúcares y almidón. Recientemente, la biomasa fosilizada ha sido explotada como carbón y aceite. A pesar de que la biomasa tarda en convertirse en combustible fósil millones de años, éste es un recurso no renovable que el hombre utiliza. Al quemar combustible fósil se usa la biomasa “vieja” y se la convierte en “nuevo” dióxido de carbono, el cual contribuye al efecto invernadero y disminuye los recursos no renovables. Al quemar “nueva” biomasa no se contribuye a la formación de “nuevo” dióxido de carbono en la atmósfera, debido a que replantando y cosechando biomasa se asegura que el dióxido de carbono se absorbe y retorna a un ciclo nuevo (McKendry, P., *et al.* 2002).

Un factor importante que a menudo se halla oculto en la consideración del uso de biomasa que ayuda a aliviar el calentamiento global, es el tiempo que transcurre entre la liberación instantánea de dióxido de carbono cuando se queman combustibles fósiles y su eventual absorción como biomasa, la cual puede tomar muchísimos años. En los pasados 10 años, hubo un interés mundial renovado, en la biomasa como fuente de energía. Existen diversas razones para este hecho (McKendry, P., *et al.* 2002):

Primeramente, el desarrollo tecnológico relacionado a la conversión, producción de cultivos, etc., promete la utilización de biomasa a bajo costo y con alta eficiencia de conversión. Por ejemplo, los residuos de biomasa de bajo costo son usados como combustible, debido a que el costo de la electricidad es competitivo a menudo con el costo de los combustibles fósiles. Opciones más avanzadas para producir electricidad son atractivas en la actualidad, una de ellas es el uso de los cultivos energéticos con costo efectivo, por ejemplo, la producción de metanol e hidrógeno por diferentes procesos (gasificación, digestión anaerobia, etc) (McKendry, P., *et al.* 2002).

El segundo principal estímulo proviene del sector agroindustrial, en el cual se produce alimentos en exceso. Esta situación condujo al desarrollo de políticas en las cuales la tierra es dejada sin cultivo con el propósito de reducir estos excesos. Problemas relacionados a esto, como la reducción poblacional en áreas rurales y el pago de subsidios para mantener la tierra fértil, favorecen la alternativa de la introducción de cultivos energéticos los cuales no están destinados a la alimentación. La demanda por energía proporcionará un mercado casi infinito para los cultivos energéticos crecidos en dicho exceso de tierra (McKendry, P., *et al.* 2002).

Y tercero, la amenaza potencial del cambio climático, debido a los altos niveles de emisión de gases con efecto invernadero (siendo el más importante el dióxido de carbono), se ha vuelto el principal estímulo para el uso de fuentes renovables de energía. El uso de biomasa es un proceso sostenible, lo que significa que, la biomasa emite aproximadamente la misma cantidad de carbono durante su conversión y su crecimiento. Es así que, el uso de biomasa no contribuye al incremento del dióxido de carbono en la atmósfera (McKendry, P., *et al.* 2002).

Estas tres principales razones no son el único estímulo para utilizar biomasa, debido a que, la biomasa es también una fuente de energía autóctona, disponible en la mayoría de los países y su aplicación puede diversificar el abastecimiento de combustibles en muchas situaciones, las cuales aseguran el abastecimiento de energía.

La conversión de biomasa a energía es llevada a cabo utilizando dos principales procesos tecnológicos: el proceso termo-químico y el bioquímico. Existe una tercera tecnología de conversión de biomasa en energía, ésta es la extracción mecánica (con esterificación) para la producción de bio-diesel (Ghosh, P., *et al.* 1993).

## **V.2. Material lignocelulósico**

El material lignocelulósico representa un recurso renovable importante que puede ser directa o indirectamente utilizado en la producción de biomoléculas y químicos de valor agregado. Sin embargo, la mayoría de estas aplicaciones son limitadas, debido a la asociación cercana que existe entre los principales componentes de la pared celular de las plantas: Celulosa, hemicelulosas y lignina. (Parisi, F., *et al.* 1989; Lynd, L., *et al.* 1991 y Ghosh, P., *et al.* 1993). En este sentido, es sólo a través del entendimiento de su química, que se puede identificar las razones del porque el material lignocelulósico es muy resistente a su degradación por procesos biológicos, como la hidrólisis enzimática y fermentación (Pereira, L., 2003). La estructura básica de toda biomasa lignocelulósica consiste en tres polímeros:

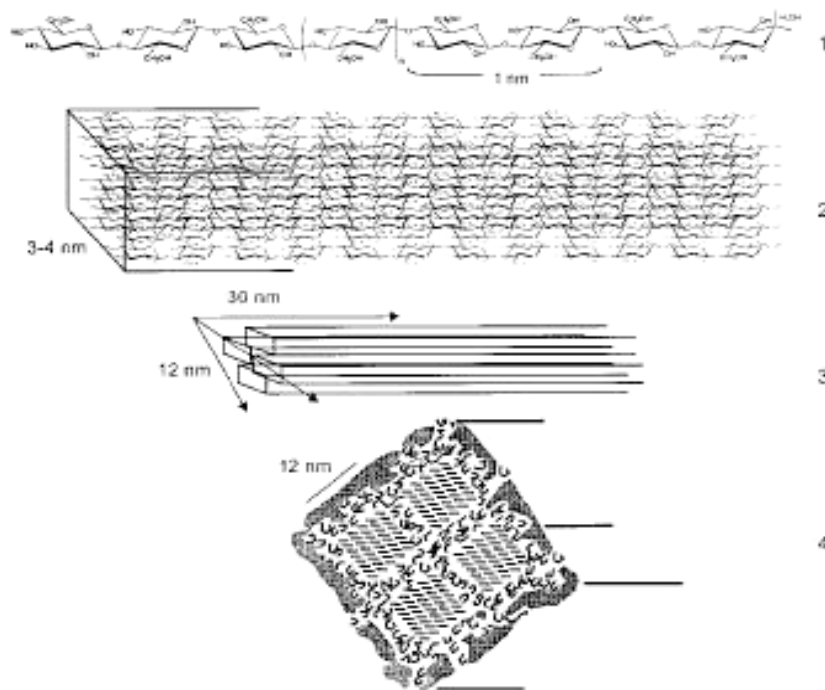
Celulosa  $(C_6H_{10}O_5)_x$ ,

Hemicelulosas como xilano  $(C_5H_8O_4)_m$ ,

Lignina  $[C_9H_{10}O_3 \cdot (OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$ ,

La celulosa es un homopolisacárido lineal, constituido por unidades de glucosa (D-glucopiranosas) unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4) formando la matriz del  $\beta$ -D-glucano. Este polímero está ampliamente distribuido en la naturaleza, presente en plantas primitivas y en plantas altamente evolucionadas. El tamaño de la molécula de celulosa está normalmente dada por su grado de polimerización (GP). Por ejemplo, el número de unidades de glucosa anhidra presentes en una cadena. Sin embargo, el análisis conformacional de la celulosa indica que la celobiosa (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosas) más que la glucosa forma la unidad básica estructural (Fengel, D., *et al*, 1989).

Muchos modelos han sido propuestos para explicar la estructura interna de la celulosa en la pared celular vegetal. La estructura de la celulosa es lineal de cadenas adyacentes, formando una red, insoluble en agua, de agregados de diferente longitud y espesor (Figura 3). Estas fibrillas elementales contienen regiones altamente ordenadas (celulosa cristalina) y regiones irregulares (celulosa amorfa) (Fengel, D., *et al*, 1989). Las fuerzas responsables del mantenimiento de las regiones cristalinas provienen de un extensivo enlace inter e intramolecular de puentes de hidrógeno. De acuerdo a Fengel, D., *et al* (1989), muchas fibrillas elementales con un espesor aproximado de 3.5nm se pueden asociar con otras del mismo espesor, para formar cristales de celulosa. Cuatro de estos agregados cristalinos básicos juntos forman una monocapa de celulosa (Pereira, L., 2003).



**Figura 3. Asociación química de la pared celular vegetal: (1) la estructura de celulosa, con una indicación de la longitud de su unidad básica estructural, celobiosa; (2) acoplamiento de cadenas de**

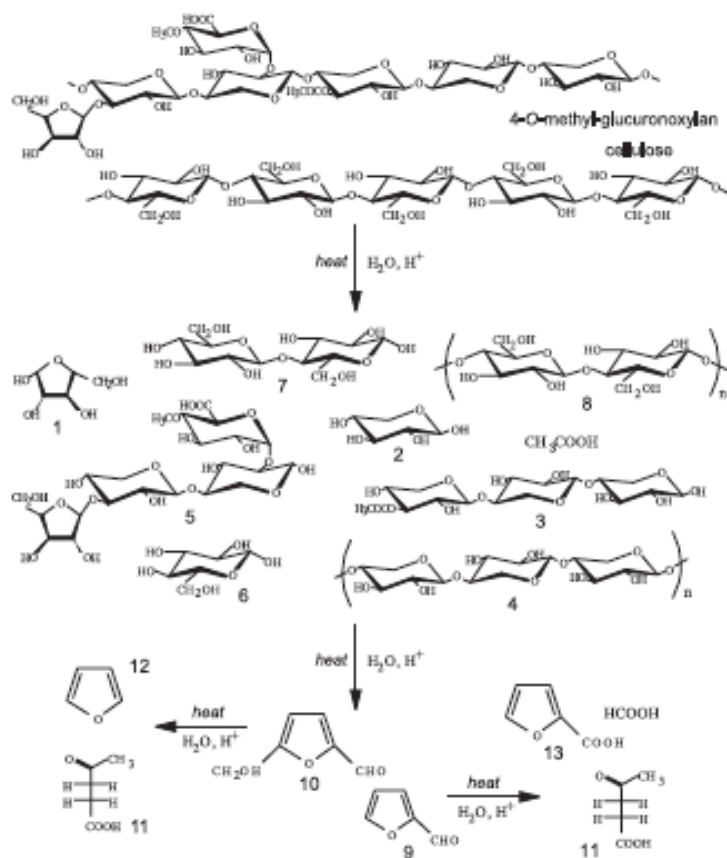


**celulosa en la fibrilla elemental; (3) cristales de celulosa y (4) microfibrilla, mostrando las moléculas de celulosa embebida en una matriz de hemicelulosa y lignina (Extractado de Pereira, L., 2003).**

Las fibras de celulosa proporcionan resistencia y dureza al material lignocelulósico y constituyen el 45 – 50 % en peso del mismo, aproximadamente.

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos de plantas, cuya naturaleza química varía de acuerdo al tipo de tejido y al tipo de especie. Estos polisacáridos están formados por una variedad de bloques estructurales incluyendo pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos (ácido 4-O metil-glucurónico y ácido galacturónico) (Fengel, D., *et al*, 1989). Generalmente las hemicelulosas son clasificadas en cuatro clases: (a) cadenas no ramificadas como xilanos o mananos con uniones 1-4; (b) cadenas helicoidales como xilanos con uniones 1-3; (c) cadenas ramificadas como galactaturomananos con uniones 1-4 y (d) sustancias pecticas como poliramnogalacturomananos. Algunas hemicelulosas, particularmente heteroxilanos, también muestran un grado considerable de acetilación (Pereira, L., 2003).

Las hemicelulosas están estructuralmente más relacionadas a la celulosa que a la lignina y son depositadas en la pared celular en una etapa temprana de la biosíntesis.



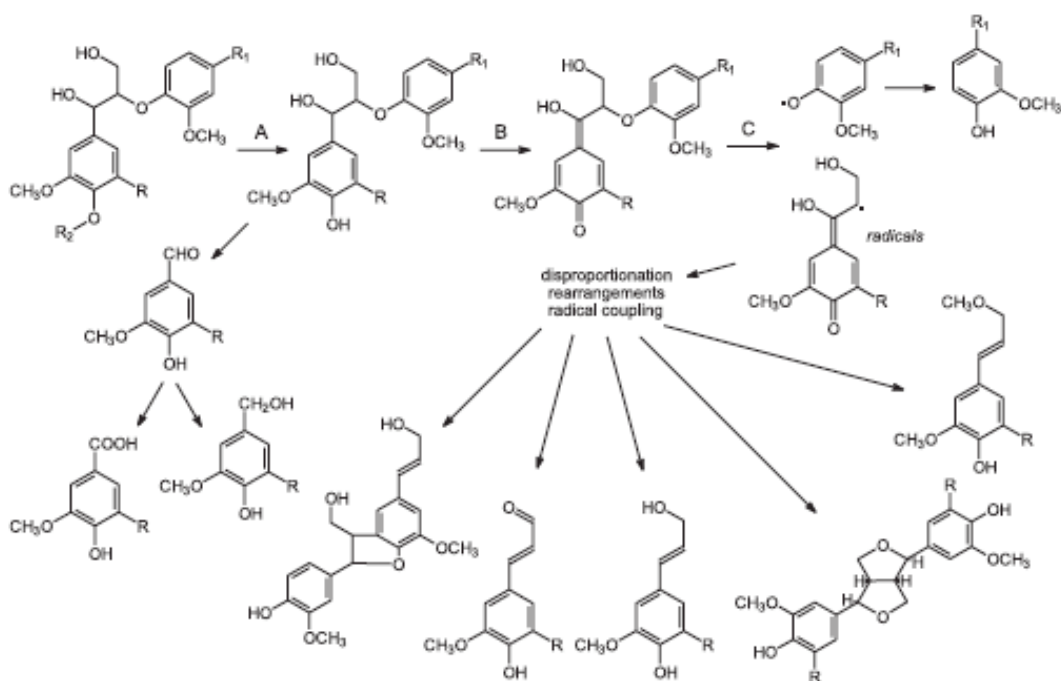
**Figura 4. Hidrólisis del 4-O-metilglucuronoxilano y celulosa como resultado de un tratamiento físico químico. (1) Arabinosa; (2) xilosa; (3) xilooligómeros acetilados (GP de 3); (4) xilooligómeros**

de alta masa molecular; (5) oligosacáridos ácidos, ramificados; (6) glucosa; (7) celobiosa; (8) celooligómeros; (9) furfural; (10) hidroximetilfurfural; (11) ácido levulínico; (12) furano; y (13) ácido 2-furoico. La formación de ácido formico, acético también es indicada (Extractado de Pereira, L., 2003).

La variedad de hemicelulosas usualmente constituye del 25 – 35% en peso del material lignocelulósico. La xilosa es el azúcar predominante derivado de las hemicelulosas, pero la arabinosa puede constituir una cantidad significativa, especialmente en cultivos herbáceos (switchgrass), los cuales son considerados como cultivos energéticos.

En tejidos vegetales, las hemicelulosas están generalmente combinadas con lignina. La lignina es una macromolécula que está primariamente formada por la polimerización de radicales libres de unidades de alcohol *p*-hidroxi cinnamyl con variaciones del contenido de metoxilos. La estructura química de lignina es muy complicada y está compuesta por tres precursores monoméricos: alcohol coniferyl, sinapyl y *p*-coumaryl. La proporción de estos monómeros varía entre especies. Dependiendo del grado de metoxilación, el grupo aromático es *p*-hidroxibenzil (derivado del alcohol *p*-coumaryl), guaiacyl (derivado del alcohol coumaryl) o syringyl (derivado del alcohol sinapyl). La propiedad física más importante de esta macromolécula es su rigidez proporcionando fuerza al tejido vegetal.

El contenido de lignina en el material lignocelulósico generalmente corresponde al 10 – 40% en peso de varias especies herbáceas, como bagaso, maíz, maní, arroz y paja (IRGC's bioenergy Project, 2007).



**Figura 5.** Patrón de degradación de lignina como resultado del tratamiento fisicoquímico. Los grupos hidroxifenólicos son generados por hidrólisis ácida (A) β-O-4 subestructuras de la cuales se forman quinonas (B). Este procedimiento facilita la ruptura homolítica del enlace β-O-4 (C), generando radicales que conducen a la desproporción y acoplamiento de radicales (condensación)

**en una variedad de productos incluyendo fenoles, ácido carboxílico y oligolignoles (Extractado de Pereira, L., 2003).**

La estructura del material lignocelulósico es muy compleja, debido a la fuerte interacción de las moléculas descritas anteriormente, lo cual hace que sea resistente a la conversión por sistemas microbianos y agentes químicos (Pereira, L., 2003).

De la gran variedad de fuentes lignocelulósicas disponibles en la naturaleza, la madera es el material más utilizado a escala mundial, especialmente a causa de su utilización en la fabricación de pastas papeleras, pastas de disolución, industria mobiliaria, industria de la construcción y combustibles (Pereira, L., 2003).

Recientemente, el interés por encontrar nuevos usos para el material lignocelulósico procedente del cultivo agrícola ha aumentado, debido a la sobreproducción de los residuos agrícolas. Para la conversión de celulosa, componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos, en derivados químicos de importancia comercial, son necesarias una serie de etapas previas encaminadas a despolimerizar el substrato lignocelulósico, para conseguir la máxima separación y purificación de la fracción celulósica (Carrasco, C., *et al.* 2008).

### **V.3. Conversión bioquímica de la biomasa**

Los dos principales procesos utilizados para la conversión bioquímica de la biomasa son la digestión anaerobia y la fermentación, junto a procesos menos usados, basados en la conversión mecánica y/o química (Viikari, L., *et al.* 2007).

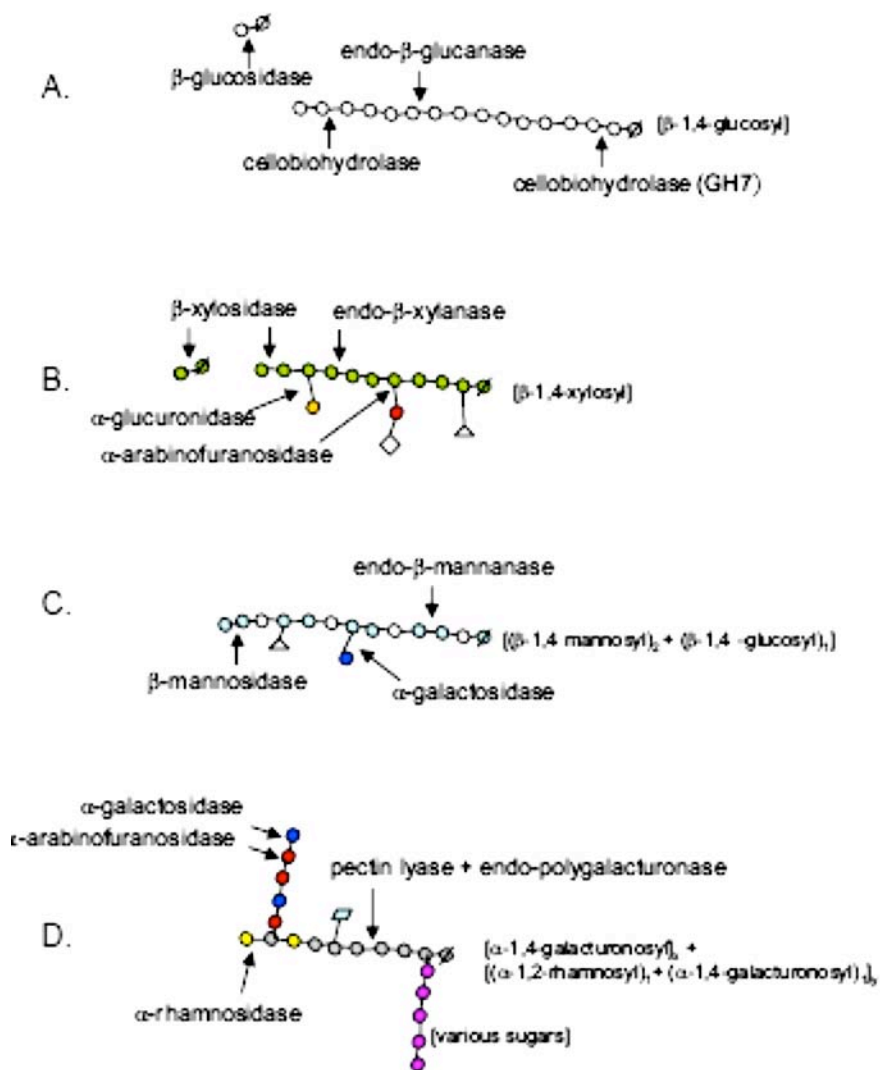
#### **V.3.1. Biodegradación y modificación de material lignocelulósico**

El material lignocelulósico es un ejemplo importante de material crudo abundante, producido en grandes cantidades debido a la explotación forestal, dejando una significativa fracción de productos de desecho. Uno de los desechos agrícolas predominantes en nuestro país es la paja de los diferentes cereales que constituyen la base de nuestra alimentación, entre ellos la quinua, el trigo, arroz, avena y otros, de los cuales se halla en estudio sus propiedades pero se sabe que poseen un contenido significativo de lignocelulosa (Carrasco, C., *et al.* 2008).

Las enzimas (incluyendo las enzimas comercialmente disponibles) que hidrolizan lignocelulosa polimérica en intermediarios más metabolizables, o que reducen la viscosidad de este polisacárido en los cereales alimenticios (por ejemplo la cebada, el centeno, la avena) pueden usarse para mejorar la utilización del fragmento de polisacáridos del material lignocelulósico. En el tratamiento de material lignocelulósico a menudo se realizan procesos térmicos para facilitar su degradación, pero con este procedimiento son generados productos secundarios tóxicos. Debido a este hecho, en la actualidad se prefiere el uso de enzimas termoestables catalizadoras de reacciones específicas mostrando así una ventaja clara respecto al tratamiento térmico, como el proceso normalmente se realiza a altas temperaturas, el estudio de enzimas robustas ha sido indispensable (Viikari, L., *et al.* 2007).

Muchas enzimas se hallan involucradas en la degradación del material lignocelulósico, las cuales a menudo están constituidas por módulos discretos (los más comunes son los módulos catalizadores o los fijadores a hidrato de carbono), los cuales se hallan unidos por enlaces peptídicos. Estos sistemas

enzimáticos múltiples realizan la degradación eficaz de los materiales lignocelulósicos. Además, varios microorganismos producen enzimas individuales múltiples que actúan sinérgicamente (Viikari, L., *et al.* 2007). En la figura 6, se observa una apreciación global de algunos polímeros presentes en la lignocelulosa, y los sitios de ataque de varias enzimas que actúan en estos substratos.



**Figura 6.** Estructuras simplificadas y sitios de ataque enzimático a polímeros de lignocelulosa. A. Fragmento de celulosa en cadena (A) con fragmentos hipotéticos de hemicelulosas (B), glucomananos (C) y pectina (D). Los sitios de ataque de algunas de las principales enzimas sobre el respectivo material son indicados por flechas. El tipo de unión glicosídica de la cadena principal se halla indicada entre corchetes a la derecha de cada fragmento polimérico. Los carbohidratos se hallan indicados por círculos. Blanco=glucosa, verde=xilosa, amarillo=ácido glucorónico, rojo=arabinosa, celeste=manosa, azul= galactosa, gris=ácido galacturónico, y rosado= otros residuos de azúcares. Los grupos acetato se hallan mostrados como triángulos, los grupos fenólicos como diagonales y los grupos metilo como rombos (Extractado de Roehr, M., *et al.* 2001).

El desarrollo de sistemas biotecnológicos económicos y robustos para la producción de compuestos orgánicos de alto valor, constituidos por microorganismos capaces de degradar y utilizar materiales crudos, constituyen una atractiva alternativa en el proceso de biorremediación y producción de compuestos de valor agregado, este es un ejemplo clásico del concepto de biorefinería (Ohara, H., 2003).

### **V.3.2. Digestión anaerobia**

La digestión anaerobia es un proceso microbiano complejo en ausencia de oxígeno, que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano, dióxido de carbono y otros), conocida como biogás, y una suspensión acuosa o lodo que contiene los componentes difíciles de degradar y los minerales presentes en la biomasa en un inicio. El proceso anaerobio ocurre de forma espontánea en la naturaleza cuando se degrada la materia orgánica, produciendo, por ejemplo, el gas de los pantanos, el gas natural de yacimientos subterráneos e incluso el gas metabólico producido en el estómago de los rumiantes (Ghosh, S. *et al.* 1988).

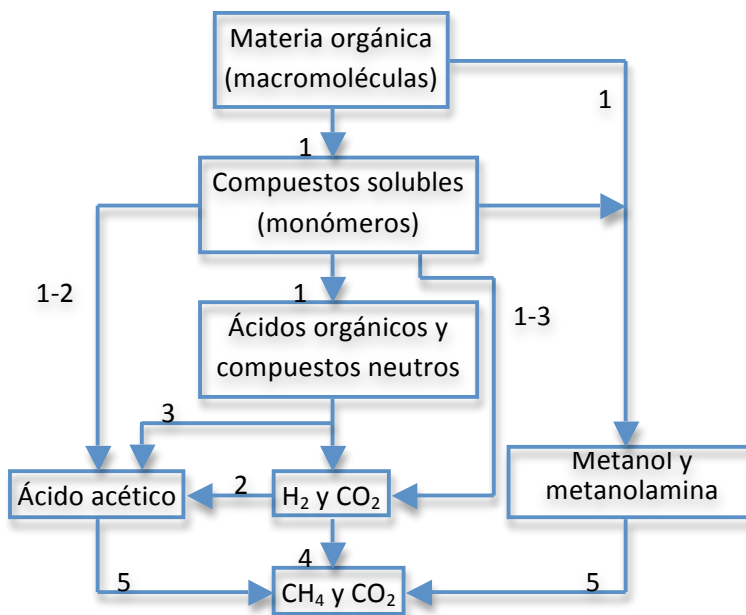
La materia prima preferentemente utilizable para este tratamiento es la biomasa residual, con alto contenido en humedad, especialmente los residuos orgánicos municipales, agrícolas, industriales y ganaderos.

Aunque la digestión anaerobia es un proceso ampliamente conocido, en la actualidad se posee información muy limitada sobre su química y microbiología. Sin embargo, se puede afirmar, en líneas generales, que la digestión anaerobia se desarrolla en cuatro etapas, durante las cuáles la biomasa se descompone en moléculas más pequeñas para formar biogás como producto final, por la acción de diferentes tipos de microorganismos. La conversión biológica del sustrato complejo, en el que se encuentra materia orgánica en suspensión o disuelta, se realiza a través de una serie de reacciones bioquímicas que transcurren tanto consecutiva como simultáneamente y cuyo proceso se puede dividir en cuatro etapas: hidrólisis, fermentación acidogénica, acetogénica, y finalmente, la metanogénica (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

#### **V.3.2.1. Proceso microbiológico y bioquímico de la digestión anaerobia**

Los modelos tradicionales de digestión anaerobia, dividen las reacciones que ocurren durante el proceso de mineralización de la materia orgánica en varias fases, llevadas a cabo por diferentes grupos de microorganismos relacionados entre ellos. De hecho, muchas de estas reacciones ocurren simultáneamente sin una separación clara de fases (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

La primera fase es la hidrólisis de partículas y moléculas complejas, que son degradadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos fermentativos. Como resultado de este proceso, se producen compuestos solubles, que son metabolizados por las bacterias anaerobias. Los compuestos solubles, básicamente son diferentes tipos de oligosacáridos, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos; éstos son fermentados por los microorganismos acidogénicos que producen, principalmente, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno. Los ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs) son transformados posteriormente en: ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).



**Figura 7. Esquema de reacciones de la digestión anaeróbica de materiales poliméricos. (Extractado de Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991). 1: Bacterias hidrolíticas acidógenas, 2: Bacterias homoacetógenas, 3: Bacterias acetógenas, 4: Metanógenos, 5: Metanógenos acetoclásticos.**

## CAPÍTULO VI. PRODUCCIÓN DE ETANOL

El etanol es un importante químico industrial con un potencial emergente como biocombustible para el reemplazo de los combustibles fósiles. Adicionalmente, éste no tiene efectos significantes de impacto ambiental como combustible y tiene menor efecto en la contaminación ambiental y baja reactividad fotoquímica reduciendo así su impacto en la formación de ozono (Stephanopoulos, G., *et al.* 1991).

En los recientes años, la atención creciente ha sido puesta en la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol como combustible. Avances muy significativos han sido desarrollados respecto a la tecnología de la fermentación etanólica (Lin, Y., *et al.* 2006). A continuación, se describe la producción de etanol en el tiempo, incluyendo la biomasa lignocelulósica como recurso, los microorganismos etanológicos y su tecnología.

La fermentación etanólica es un proceso biológico, en el cual el material orgánico es convertido por microorganismos a compuestos más simples como azúcares. Estos compuestos son posteriormente fermentados por microorganismos para producir etanol y dióxido de carbono (Lin, Y., *et al.* 2006).

La síntesis de etanol vía microbiana convencionalmente es llevada a cabo por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias del género *Zymomonas spp.*; pero existen otros microorganismos etanológicos alternativos. Un tema de gran impacto es el estudio de las bacterias termófilas anaerobias etanológicas. Hoy en día, este sistema puede ser una solución para la actual demanda mundial de combustibles derivados del petróleo (Wiegel y Ljungdahl, 1981).

Muchos estudios confirman la disposición de microorganismos con potencial para producir etanol y su amplia distribución en fuentes naturales. Éste tipo de microorganismos son sujetos a un exhaustivo trabajo de selección por vía natural o ingeniería genética y son una alternativa para la solución a la crisis mundial de energéticos (Lin, Y., *et al.* 2006).

### VI.1. Producción de etanol en el tiempo

La fermentación de azúcares y su conversión a etanol es un arte muy antiguo. En Babilonia y Samaria 6000 años A.C., ya se conocía que las levaduras producían etanol. En el siglo XIV D.C., en China y el Medio Oriente se elaboraban bebidas alcohólicas de granos fermentados. Cagniard de la Tour en Francia, Schwann y Kutsing en Alemania, antes de Pasteur, plantearon que los productos de la fermentación: el etanol y dióxido de carbono provenían de la actividad de seres microscópicos. Pasteur en 1891 investigó que la enfermedad de los vinos era causada por bacterias anaeróbicas y progresó el conocimiento de la fermentación de frutos y granos vegetales. En 1891 Barrer y Hillier, aislaron bacterias del género *Zymomonas spp.* como responsables de la baja acidez de la sidra. Entre 1923-1924, Lindner en México estudió la fermentación del aguamiel o jugo azucarado de agave durante la fabricación del pulque, una bebida alcohólica con un 4 a 6 % de contenido etanólico, de la cual se aisló una bacteria denominada *Termobacterium mobile* (Lin, Y., *et al.* 2006).

En 1937 Shimwell aisló *Zymomonas spp.* durante la primera etapa de la fermentación de la cebada al elaborar cerveza, así como en los suelos de la cervecería, en los cepillos de lavado de las cubas de fermentación, y le dió el nombre provisional de *Achromobacter anaerobium*. En 1950, se sugirió el

nombre de *Saccharomonas spp*, más tarde fue denominada *Zymomonas anaerobia*. En 1956 ya se había reportado como: *A. anaerobium* y *T. mobile*, ésta última fermenta la sacarosa y produce un levano, polímero de fructosa de diversos usos en la industria.

Historicamente, los microorganismos más usados en la fermentación etanólica han sido las levaduras, y entre ellas *Saccharomyces cerevisiae*, la cual puede producir concentraciones tan elevadas de etanol como del 18% en un caldo de fermentación. Por este motivo, *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo de elección en procesos industriales de producción de etanol. Esta levadura puede crecer en azúcares simples, como glucosa y en el disacárido sacarosa. *Saccharomyces cerevisiae* es también reconocida como segura (GRAS, Generally Regarding As Safe), como aditivo en alimentos para el consumo humano. Es así, que se considera como el microorganismo ideal para la producción de bebidas alcohólicas y la producción de pan (Lin, Y., *et al.* 2006).

## **VI.2. Microbiología y bioquímica de la formación de etanol**

### **VI.2.1. Microorganismos relacionados a la fermentación de etanol**

La fermentación etanólica es un proceso biológico, en el cual el material orgánico es convertido por microorganismos en compuestos más simples, como los azúcares. Éstos posteriormente son fermentados para producir etanol, dióxido de carbono, y otros compuestos tales como hidrógeno y ácidos orgánicos; dependiendo del tipo de microorganismo y la ruta metabólica de conversión. Durante todo el proceso de conversión de biomasa lignocelulósica en etanol, existen principalmente dos tipos de microorganismos, los que convierten azúcares fermentables en etanol y los que producen enzimas para catalizar reacciones de hidrólisis del material lignocelulósico complejo (Lin, Y., *et al.* 2006).

Los microorganismos utilizados en la industria para la producción de etanol, son seleccionados para proporcionar la mejor combinación posible de características para el proceso y equipo usado. Las características deseadas en el proceso industrial de producción de etanol dependen del microorganismo usado en la fermentación (Lin, Y., *et al.* 2006). El microorganismo debe poseer:

1. Alto rendimiento de producto por unidad de sustrato asimilado,
2. Alta capacidad fermentativa
3. Substantial tolerancia al etanol
4. Habilidad para permanecer viable a elevadas temperaturas
5. Estabilidad a las condiciones de fermentación
6. Tolerancia a bajos pH

Muchos reportes y revisiones han sido publicados en la producción de etanol por microorganismos fermentativos, y muchas bacterias, levaduras y hongos han sido reportados por su capacidad de producir etanol como principal producto de la fermentación (Tabla 3).



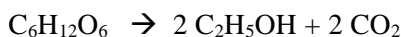
**Tabla 3. Especies bacterianas y fúngicas productoras de etanol como principal producto de la fermentación (Lin, Y., et al. 2006)**

Microorganismos mesófilos	mmol etanol/mmol glucosa	Referencia
<i>Clostridium sporogenes</i>	4.15	Miyamoto 1997
<i>Clostridium indolis</i>	1.96	Miyamoto 1997
<i>Clostridium sphenoides</i>	1.8	Miyamoto 1997
<i>Clostridium sordelli</i>	1.7	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas mobilis</i>	1.9	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas mobilis subsp. pomaceas</i>	1.7	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1.5 (0.8)	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	0.84 (1.46)	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1.1 (1.4)	Miyamoto 1997
<i>Erwinia amylovora</i>	1.2	Miyamoto 1997
<i>Escherichia coli KO11</i>	0.7–0.1	Dien et al. 2003
<i>Escherichia coli LY01</i>	40–50 g etanol/L	Dien et al. 2003
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.1	Miyamoto 1997
<i>Streptococcus lactis</i>	1.0	Miyamoto 1997
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.94–0.98	Matthew et al. 2005
<i>Klebsiella aerogenes</i>	24 g etanol/L	Ingram et al. 1998
27817- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5.1–91.8 g etanol/L	Vallet et al. 1996
L-041- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25-50 g etanol/L	Leticia et al. 1997

En la actualidad, la investigación más exitosa está enfocada en el desarrollo de nuevos biocatalizadores, que fermentan eficientemente mezclas de azúcares. Con un interés particular, se estudia el aislamiento de nuevos microorganismos que fermentan xilosa, *Escherichia coli* y otras bacterias gram negativas genéticamente modificadas para la producción de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* genéticamente modificadas para la producción de etanol en base a la conversión de pentosas (Roehr, et al. 2001).

#### VI.2.1.1. Fermentación etanólica realizada por levaduras

La fermentación de azúcares a etanol realizada por levaduras tiene una importante posición entre diferentes procesos industriales. Las levaduras de interés industrial son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum (carlsbergensis)*, *Schizosaccharomyces pombe*, y especies de *Kluyveromyces*. La conversión óptima de azúcares a etanol requiere que la levadura sea capaz de tolerar altas concentraciones de etanol, debido a que el etanol inhibe el crecimiento y la fermentación (Del Castillo Agudo, 1985).



Las levaduras son capaces de utilizar una diversidad de sustratos, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar glucosa, maltosa, maltotriosa, trehalosa, galactosa, manosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y deoxirribosa (Roehr, *et al.* 2001). En general, son capaces de crecer y fermentar eficientemente etanol a pH de 3.5 – 6 y temperaturas de 28 – 35 °C. Aunque la tasa de producción de etanol es mayor a elevadas temperaturas (40°C), la productividad general de la fermentación decrece debido a la inhibición por producto (Jones, *et al.* 1981).

Las levaduras, en condiciones anaerobias, metabolizan glucosa a etanol, principalmente por la ruta metabólica de Embden-Meyerhof. La reacción en general involucra la producción de 2 moles de etanol, dióxido de carbono por mol de glucosa fermentada. Es así que cada gramo de glucosa puede teóricamente producir 0.51g de etanol. Sin embargo, el rendimiento de etanol en la práctica no excede el 90 – 95% del valor teórico, esto debido al requerimiento de nutrientes para la síntesis de biomasa y otras reacciones de mantenimiento celular. Reacciones secundarias también ocurren en la fermentación, conduciendo a la producción de glicerol y succinato (Oura, E., 1977). Más adelante se ilustrará con un esquema simplificado el catabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la ruta metabólica de Embden-Meyerhof.

#### **VI.2.1.2. Fermentación etanólica realizada por bacterias mesófilas**

Un gran número de bacterias son capaces de formar etanol, sin embargo, muchos de estos microorganismos generan múltiples productos finales en adición al etanol. Estos incluyen otros alcoholes como butanol, isopropanol y 2,3-butanodiol; ácidos orgánicos como acetato, butirato, formiato y lactato; polioles como arabitol, glicerol y xilitol; cetonas como la acetona; o varios gases como metano, dióxido de carbono e hidrógeno. Estos microorganismos son capaces de producir etanol como producto mayoritario (por ejemplo, a una concentración mínima de 1mol de etanol por mol de de glucosa utilizada, como se puede observar en la tabla 3) (Roehr, *et al.* 2001).

Muchas bacterias (por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, *Spirochaeta*, *Bacteroides*, etc.) como las levaduras metabolizan glucosa por la ruta metabólica de Embden-Meyerhof. Sin embargo, muchas bacterias utilizan la ruta metabólica de Entner-Doudoroff como alternativa, para el consumo de glucosa y la producción de etanol (Roehr, *et al.* 2001). La bioquímica de la ruta metabólica de Entner-Doudoroff será detallada más adelante.

Múltiples productos finales pueden ser producidos por microorganismos los cuales conducen fermentaciones mixtas de ácidos, como el grupo entérico de bacterias facultativas anaerobias. Las posibles rutas metabólicas son complejas, el fosfoenolpiruvato producido en la ruta metabólica de Embden-Meyerhof puede ser posteriormente convertido en diversos productos como etanol, formiato, acetato, succinato, lactato y 2,3-butanodiol, estas rutas metabólicas serán descritas más adelante (Roehr, *et al.* 2001).

Como se observa en la tabla 3, un gran número de bacterias puede producir relativamente elevadas concentraciones de etanol, aunque algunas cepas mesófilas de *Clostridium* son capaces de producir mayores concentraciones de etanol, sólo *Zymomonas mobilis* puede ser reconocida como un estricto productor de etanol (Roehr, *et al.* 2001).

*Zymomonas mobilis* ha demostrado producir una elevada concentración de etanol, sin inhibición por producto (Maiorella, *et al.* 1981). En adición, la producción de etanol en aerobiosis es también posible ya que *Zymomonas mobilis* no es afectada por el efecto Pasteur. Sin embargo, el tipo de sustrato tiene un efecto limitante en la producción de etanol. Aunque todas las cepas bacterianas pueden utilizar glucosa, sólo el 50% de ellas puede convertir sacarosa en glucosa. Ésta es una desventaja, debido a que el uso de sacarosa causa excesivas cantidades de productos no deseados durante la fermentación. La producción de ácidos orgánicos (acetato, lactato, etc.) causa problemas durante la destilación de etanol (Roehr, *et al.* 2001).

Los valores óptimos de temperatura y pH para este microorganismo son 30 – 40 °C y 4 – 5 unidades de pH, respectivamente. *Zymomonas mobilis* posee una ruta metabólica homofermentativa de etanol y tolera concentraciones superiores a los 120 g/L de etanol, y tiene una mayor productividad específica de etanol 2.5 veces mayor a *Saccharomyces cerevisiae* (Sprenger, *et al.* 1996). *Zymomonas mobilis* es un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) y tiene necesidades nutricionales simples. A pesar de su capacidad como etanológeno, su mayor desventaja es no poder convertir una variedad de sustratos en etanol (Lin, Y., *et al.* 2006).

*Escherichia coli* genéticamente modificada es otra bacteria muy valuable en la producción de etanol. La construcción de cepas recombinantes de *E. coli*, tiene muchas ventajas como biocatalizador en la producción selectiva de etanol (Millichip y Doelle, 1989), ésta fue una de las aplicaciones más exitosas de la ingeniería metabólica. *E. coli* tiene muchas ventajas, incluyendo su capacidad de fermentar un amplio espectro de sustratos, no requiere factores de crecimiento complejos y su previo uso industrial (por ejemplo, la producción de proteína recombinante). La mayor desventaja del uso de *E. coli* es su estrecho rango de pH de 6 – 8 (Lin, Y., *et al.* 2006).

#### **VI.2.1.2. Fermentación etanólica realizada por bacterias termófilas**

Las cepas seleccionadas normalmente operan mejor a pH de 4.5 y 28 – 30°C, y presentan una inactivación drástica a temperaturas elevadas (Keim, C., 1983). Incluso, el sustrato debe ser enfriado debido a que la fermentación es exotérmica. Las ventajas del uso de microorganismos termófilos en la producción de etanol son numerosas, ya que la producción de etanol con levaduras a 50 °C no ha sido posible aún. De acuerdo a Wiegel (1980) algunas de las ventajas de la fermentación etanólica a elevadas temperaturas son las siguientes:

1. Los termófilos exhiben elevada actividad catabólica a temperaturas óptimas de crecimiento. Esto resulta en tiempos de fermentación más cortos, elevadas productividades y sobre todo un incremento en la eficiencia de la fermentación.
2. La solubilidad de oxígeno y otros gases en el medio de fermentación decrecen con el incremento de temperatura. Este fenómeno soporta el establecimiento y el mantenimiento de condiciones anaerobias. La temperatura óptima de los termófilos extremos es de 66 – 69 °C y a esta temperatura la solubilidad de oxígeno en el medio es 80 % menor que a 30 °C.
3. Los sustratos con baja solubilidad a temperatura ambiente podrían exhibir mayor solubilidad a la temperatura óptima de fermentación, conduciendo a que la disponibilidad del sustrato no sea el factor limitante del proceso.

4. La viscosidad del medio de fermentación decrece con el incremento de temperatura. Es así que la energía requerida para mantener la agitación apropiada del medio de cultivo puede ser reducida.
5. La recuperación de etanol es incrementada a temperaturas elevadas. Este hecho puede ser utilizado en combinación al proceso de remoción continua de etanol (por ejemplo, la vacufermentación, o fermentación al vacío). El incremento de etanol en fase gaseosa decrece el requerimiento de succión para una eficiente recuperación de producto.
6. La actividad metabólica de los microorganismos y los efectos de la fricción por la agitación generan grandes cantidades de calor. Es así que los requerimientos de energía adicional para mantener los fermentadores a temperaturas deseadas así como el requerimiento de enfriamiento después de la esterilización son minimizados.
7. Comparados a bacterias mesófilas, las condiciones de esterilidad no son tan esenciales en un proceso termófilo. Actualmente no se conocen patógenos termófilos anaerobios. Sin embargo, la contaminación con hongos termófilos y otras bacterias es posible.

Un significativo interés ha sido puesto en el microorganismo anaerobio termófilo extremo, *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Wiegel y Ljungdahl, 1981). En adición a su naturaleza termófila extrema (temperatura óptima de 69°C), este microorganismo tiene dos principales ventajas sobre otros organismos:

(1) Exhibe un amplio rango de pH óptimo de 5.5 – 8.5 (y su crecimiento ocurre a pH 4.5 – 9.5).

(2) Fermenta carbohidratos con muy alto rendimiento. *Thermoanaerobacter ethanolicus* es capaz de utilizar un amplio espectro de sustratos para producir etanol. Estos incluyen, almidón, celobiosa, lactosa y varias pentosas.

La conversión de celulosa a etanol puede ser llevada a cabo por varias bacterias anaerobias termófilas anaerobias, como *Clostridium thermocellum* (Ingram, *et al.* 1987), también por algunos hongos filamentosos como *Monilia sp.* (Saddler y Chan, 1982), *Neurospora crassa* (Gong *et al.* 1981), *Neurospora sp.* (Yamauchi *et al.* 1989), *Zygosaccharomyces rouxii* (Pastore *et al.* 1994), *Aspergillus sp.* (Sugawara *et al.* 1994), *Trichoderma viride* (Ito *et al.* 1990) y *Paecilomyces sp.* (Gervais y Sarrette 1990).

Sin embargo, estudios en el proceso de fermentación utilizando estos microorganismos han demostrado que el proceso es muy lento (3 – 12 días) y con un rendimiento muy bajo (0.8–60 g/L de etanol), lo cual se debe probablemente a la baja tolerancia de los microorganismos a elevadas concentraciones de etanol. Otra desventaja del proceso, particularmente de la fermentación bacteriana, es la producción de varios compuestos, tales como acetato y lactato (Herrero y Gomez 1980; Wu *et al.* 1986).

## VI.2.2. Rutas metabólicas de producción de etanol

En microorganismos procariotas existen 3 rutas metabólicas para la desasimilación de azúcares: la clásica ruta metabólica de Embden-Meyerhof (EM), la cual es también usada por la mayoría de los eucariotas,

incluyendo las levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*; la ruta metabólica heteroláctica o de la fosfoacetolasa y la ruta metabólica de Entner-Doudoroff.

### VI.2.2.1. Ruta metabólica de Embden-Meyerhof (EM)

Esta es la ruta metabólica de la glicólisis (Figura 8), esta ruta metabólica es operada por *Saccharomyces cerevisiae* para producir etanol y dióxido de carbono, también es operada por otras bacterias para producir una variedad de ácidos grasos (AGVs), alcoholes y gases. Muchos de los productos finales de esta ruta metabólica son componentes esenciales en alimentos y bebidas, y algunos son importantes en la industria de solventes (Madigan *et al.* 2000).

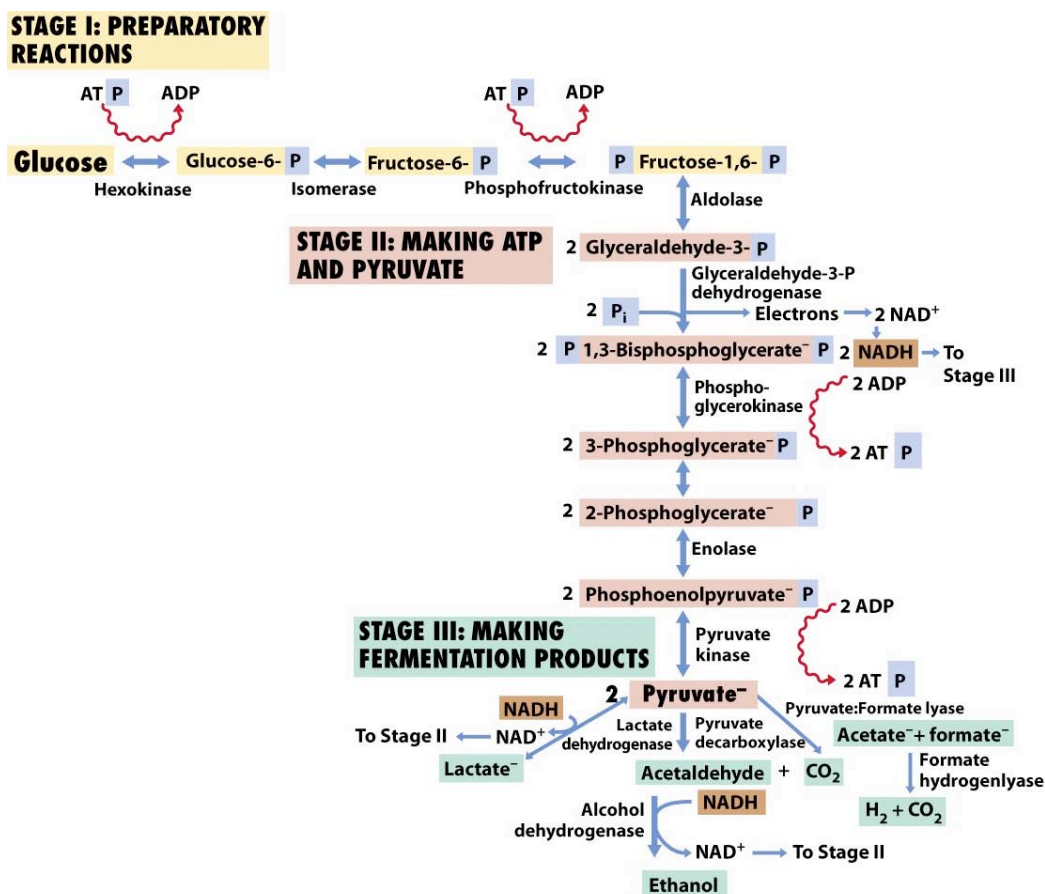


Figura 8. Ruta metabólica de Embden-Meyerhof y principales productos de la fermentación (Extractado de Madigan *et al.* 2000).

En las primeras tres etapas de esta ruta metabólica se llevan a cabo reacciones preparatorias: fosforilación y rearrreglo de la hexosa para el clivaje en 2 triosas. Cada triosa es oxidada y fosforilada seguida de dos fosforilaciones a nivel de sustrato. Las levaduras reducen piruvato a etanol y dióxido de carbono (Madigan *et al.* 2000).

La fermentación que ocurren a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof llevada a cabo por bacterias, puede conducir a un amplio espectro de productos finales, dependiendo de la ruta metabólica

en los pasos reductivos después de la formación de piruvato. A continuación se describe algunas de las rutas metabólicas procedientes del piruvato (Figura 9). Usualmente las fermentaciones bacterianas son distinguidas por sus productos finales en uno de los siguientes grupos:

*Fermentación homoláctica:* En este tipo de fermentación el ácido láctico es el único producto final, siendo esta la ruta metabólica de las bacterias homofermentativas (Madigan *et al.* 2000).

*Fermentación de ácidos mixtos:* Ésta es la ruta metabólica principal de las enterobacterias. Los productos finales son una mezcla de lactato, acetato, formiato, succinato y etanol con la posible formación de una mezcla de gases como dióxido de carbono e hidrógeno (si la bacteria posee la enzima formato dehidrogenasa, la cual cliva el formiato a gases) (Madigan *et al.* 2000).

*Fermentación de butanediol:* En este tipo de fermentación se forman ácidos mixtos, pero además se forma 2,3 butanediol por la condensación de dos moléculas de piruvato. A través de esta ruta se disminuye la formación de ácidos, debido a que el butanediol es neutral, pero se puede producir la formación de acetoina como intermediario (Madigan *et al.* 2000).

*Fermentación de ácido butírico:* Al igual que la fermentación butanol acetona, ésta es llevada a cabo por bacterias del género *Clostridia*. En adición al ácido butírico se forman acetato, dióxido de carbono e hidrógeno a partir de la fermentación de azúcares. Mínimas cantidades de etanol e isopropanol pueden también ser formadas (Madigan *et al.* 2000).

*Fermentación de butanol-acetona:* El butanol y la acetona fueron descubiertos como los principales productos finales de la fermentación por *Clostridium acetobutylicum*, durante la primera guerra mundial (Madigan *et al.* 2000).

*Fermentación de ácido propiónico:* Aunque los azúcares pueden ser convertidos directamente a ácido propiónico, las bacterias productoras de ácido propiónico fermentan lactato a acetato, dióxido de carbono y propionato. La formación de propionato es un proceso complejo e indirecto e involucra 5 o 6 reacciones (Madigan *et al.* 2000).

**Figura 9. Fermentaciones bacterianas que proceden de la ruta metabólica de Embden Meyerhof (EM) (Extractado de Roehr, *et al.* 2001).**

#### **VI.2.2.2. Ruta metabólica heteroláctica (Fosfocetolasa)**

Esta ruta metabólica presenta como enzima clave la fosfocetolasa, la cual cliva las pentosas fosfato en gliceraldehido-3-fosfato y acetil fosfato. Las bacterias heterofermentativas utilizan esta ruta metabólica de fermentación donde la glucosa fosfato es oxidada a 6-fosfogluconato, el cual es oxidado y decarboxilado para formar fosfato (Roehr, *et al.* 2001).

A diferencia de la ruta metabólica EM, las oxidaciones mediadas por NAD se llevan a cabo antes del clivaje del sustrato. La pentosa fosfato es subsecuentemente clivada a gliceraldehido-3-fosfato (G3P) y acetil fosfato. El G3P es convertido en ácido láctico por las mismas enzimas de la ruta EM. Esta rama de la ruta metabólica contiene una oxidación acoplada a una reducción. 2 ATPs son producidos por la fosforilación a nivel de sustrato. El acetil fosfato es reducido en dos etapas a etanol, el cual equilibra las dos oxidaciones antes del clivaje, pero no rinde ATP. La reacción general es: Glucosa  $\rightarrow$  1 lactato + 1 etanol + 1 dióxido de carbono con una ganancia de 1 ATP. La eficiencia de esta ruta es la mitad de de la ruta metabólica de EM (Madigan *et al.* 2000).

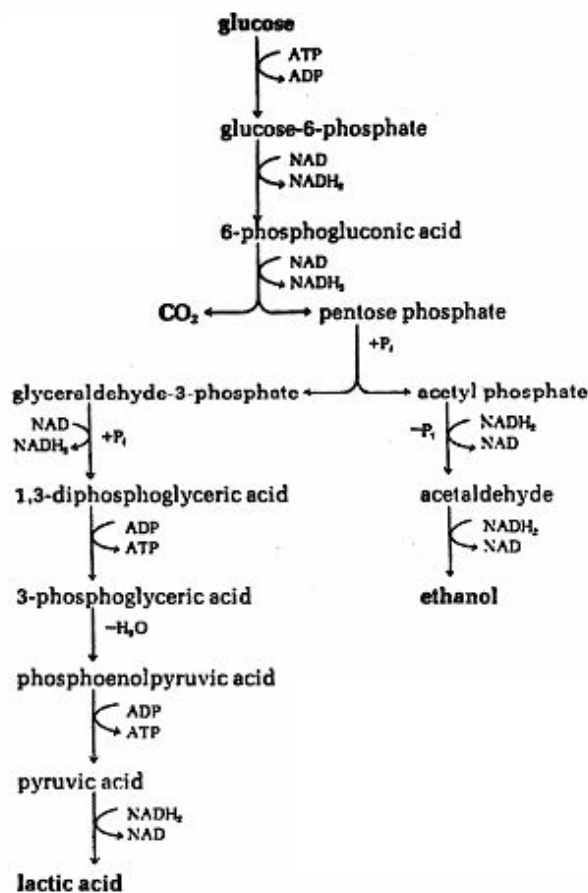
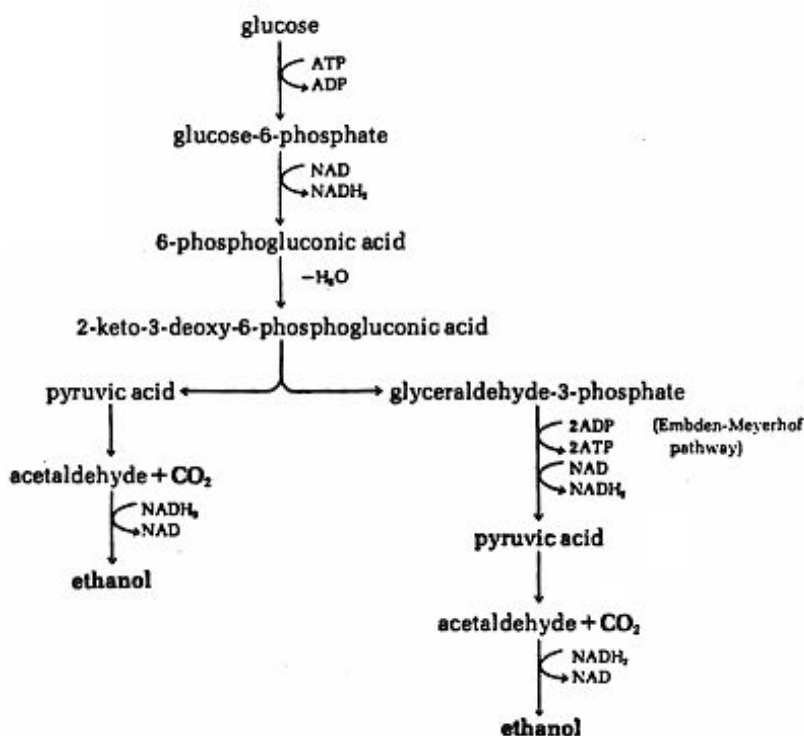


Figura 10. Ruta metabólica heteroláctica (Fosfocetolasa) (Extractado de Roehr, *et al.* 2001).

### VI.2.2.3. Ruta metabólica de Entner-Doudoroff (ED)

Solo pocas bacterias y entre ellas la más notable *Zymomonas spp.* emplean esta ruta metabólica de fermentación. Sin embargo, muchas bacterias, especialmente aquellas pertenecientes al género *Pseudomonaceae* utilizan esta ruta metabólica para degradar carbohidratos durante el metabolismo respiratorio. La ruta metabólica de ED produce 2 piruvatos a partir de glucosa (igual a la ruta de EM) pero al igual que la ruta metabólica de la fosfocetolasa, la oxidación ocurre antes del clivaje, y el rendimiento de la red de energía es un mol de ATP (Matthew, *et al.* 2005).





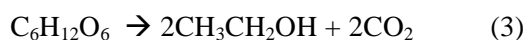
**Figura 10. Ruta metabólica heteroláctica (Fosfocetolasa) (Extractado de Roehr, *et al.* 2001).**

En la ruta metabólica de ED, la glucosa fosfato es oxidada a 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato, el cual es clivado a piruvato y GAP, éste último es oxidado a piruvato por enzimas propias de la ruta metabólica de EM, 2 ATPs y son producidos por fosforilación a nivel de sustrato. El piruvato de cada una de las rutas es reducido a etanol y dióxido de carbono, de la misma manera que las levaduras. Es así que la reacción general es: Glucosa → 2 etanol + 2 dióxido de carbono y una ganancia de 1 ATP en la red de energía (Matthew, *et al.* 2005).

En la producción tradicional de etanol *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza glucosa por la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (EM). Además de esta ruta, la ruta metabólica de Entner-Doudoroff (ED) es una vía adicional para el consumo de glucosa por muchas bacterias, como *Zymomonas spp.* El elevado rendimiento y productividad de etanol observados en *Zymomonas spp.*, son la consecuencia de su única fisiología. *Zymomonas spp.* es el único microorganismo que metaboliza glucosa anaeróticamente usando la ruta de ED opuestamente a la ruta de EM o glicólisis (Matthew, *et al.* 2005).

En la ruta metabólica de ED se produce sólo la mitad de ATP por mol de glucosa, de lo que se produce en la ruta metabólica de EM. Como consecuencia de esto, *Zymomonas spp.*, produce menos biomasa que las levaduras, y más carbono es dirigido a la formación de productos. También, como consecuencia del bajo rendimiento de ATP, *Zymomonas spp.*, mantiene un alto flujo de glucosa a través de la ruta metabólica de ED. Todas las enzimas involucradas en la fermentación son expresadas constitutivamente y las enzimas que realizan la fermentación forman el 50% de las proteínas totales en la célula (Sprenger, 1996). *Zymomonas spp.* tiene potenciales ventajas sobre las levaduras, en la industria de la producción de etanol

Las bacterias anaerobias termófilas pertenientes al género *Clostridium*, *Thermoanaerobacter* y *Thermoanaerobacterium* son conocidas por su capacidad de producir elevadas concentraciones de etanol a partir de carbohidratos (Ng *et al.*, 1981; Weimer, 1985; Wiegel y Ljungdahl, 1981). Estas bacterias utilizan la ruta metabólica de Entner-Doudoroff (fosforoclástica) para la oxidación de substratos, la cual resulta en la producción de etanol e hidrógeno junto con ácidos orgánicos (por ejemplo, acetato, butirato y lactato; Zeikus, 1980). Se considera que la producción de hidrógeno a partir de carbohidratos ocurre junto con la producción de acetato (ecuación 1) o butirato (ecuación 2), mientras que la producción de solo etanol no va acompañada de la producción de hidrógeno (ecuación 3) (Thauer, *et al.* 1977; Wiegel, 1980).



Esto implica que cuando la producción de hidrógeno es optimizada (producción de acetato), la producción de etanol disminuye y viceversa. Dependiendo del microorganismo, el rendimiento de etanol (e hidrógeno) varía substancialmente desde trazas hasta concentraciones significantes (Wiegel, 1980; Zeikus, 1980). La ecuación 3 proveniente de la ruta metabólica de ED, resulta en casi una completa conversión de glucosa a etanol, pero es rara entre bacterias y sólo fue reportada en *Zymomonas mobilis* (Wiegel, 1980; Zeikus, 1980).

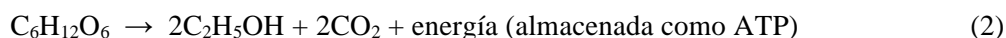
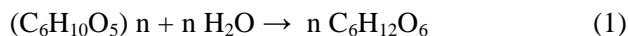
Aunque las tasas de tolerancia al etanol y la conversión de hexosas por bacterias anaerobias termófilas son menores a aquellas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o la bacteria mesófila *Zymomonas mobilis*, la ventaja de estas bacterias es su diversidad metabólica, con capacidad de degradar una gran variedad de carbohidratos de origen lignocelulósico (Sommer, P., *et al.* 2004).

### VI.3. Procesos de producción de etanol

Los materiales crudos que contienen azúcares o materiales que se transforman en azúcares, pueden utilizarse como substratos de la fermentación etanólica. Los materiales crudos fermentables pueden agruparse como los materiales directamente fermentables, los materiales de contenido lignocelulósico y los residuos urbano-industriales. La fermentación directa de la caña de azúcar, remolacha y melazas para la producción de etanol también ha sido reportada (Bryan, 1990; Ganesh, *et al.* 1995; Ravi, *et al.* 1997).

Resíduos que contienen azúcares que pueden transformarse en glucosa, se usan como substratos de fermentación bajo condiciones aerobias y anaerobias.

La glucosa se convierte a etanol y dióxido de carbono (Ingram *et al.* 1998). La estequiometría de este proceso es detallada por las siguientes ecuaciones:



Teóricamente, 100 g de glucosa producirían 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono. Sin embargo, en la práctica, los microorganismos usan glucosa para su crecimiento y el rendimiento real es menor al 100%. Las cepas seleccionadas deben tener tolerancia a concentraciones altas de azúcar y de etanol producido. En un proceso de fermentación etanólica, se seleccionan microorganismos capaces de mantener las mejores características en el proceso y equipo a usarse (Ingram *et al.* 1998).

### **VI.3.1. Alcance de la producción del etanol a partir de materiales alternativos**

El proceso de fermentación a partir de cualquier sustrato que contenga azúcares puede derivar en etanol. La variedad de sustratos utilizados en la producción de etanol a través de la fermentación es clasificada en tres tipos principales: azúcares, almidones y materiales lignocelulósicos (Lee, J. 1997).

Los azúcares (a partir de caña de azúcar, remolacha, melazas y frutas) pueden ser convertidos a etanol directamente. Los almidones (provenientes del maíz, yuca, papa y otros tubérculos) deben ser primero hidrolizados, por la acción de enzimas a azúcares fermentables. Un aumento dramático actual en la tecnología de producción de etanol basada en el almidón de maíz, puede no ser práctico porque la producción de maíz para la producción etanol podría competir con la producción agrícola, limitando su cultivo como alimento (Lin, Y., *et al.* 2006).

El material lignocelulósico (a partir de madera, cultivos energéticos, residuos de la agricultura y residuos de la industria del papel) deben ser convertidos en azúcares, esto se lleva a cabo generalmente por métodos fisicoquímicos. Una vez que los azúcares simples son liberados, los microorganismos pueden fermentarlos rápidamente (Lin, Y., *et al.* 2006).

Hoy en día, el elemento dominante en el costo de la producción de etanol es el sustrato, por ejemplo, el almidón, algunos almidones fermentables y la sacarosa son fácilmente obtenidos a partir de productos de la agricultura como la paja de trigo, los residuos del maíz y el bagaso de caña, respectivamente. La expansión de este proceso de fermentación hacia la utilización de sustratos de menor costo, como la lignocelulosa, ofrece un gran potencial para la reducción en los costos de producción (Lee, J. 1997).

### **VI.3.2. Tecnología basada en la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos**

Investigación extensa se lleva a cabo para la conversión de materiales lignocelulósicos a etanol (Yanase, *et al.* 2005). Esta conversión incluye dos procesos:

1. hidrólisis de celulosa de los materiales lignocelulósicos a azúcares reducidos fermentables
2. fermentación de los azúcares a etanol.

La hidrólisis normalmente es catalizada por enzimas celulolíticas y la fermentación se lleva a cabo por levaduras o bacterias. Los factores identificados que afectan la hidrólisis de la celulosa incluyen: la porosidad, es decir, la superficie accesible de las fibras, su cristalinidad, otros productos tales como la lignina y las hemicelulosas (McMillan, 1994). La presencia de lignina y hemicelulosas restringen el

acceso de las enzimas celulolíticas a la celulosa, reduciendo así la eficacia de la hidrólisis. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en los residuos agrícolas son presentados en la tabla 4.

**Tabla 4. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas comunes y diferentes desechos**

<b>Resíduo</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
<b>Madera dura</b>	40 - 50	24 - 40	18 - 25
<b>Madera suave</b>	45 - 50	25 - 35	25 - 35
<b>Cáscara de nuez</b>	25 - 30	25 - 30	30 - 40
<b>Césped</b>	25 - 40	35 - 50	10 - 30
<b>Paja de trigo</b>	33 - 40	20 - 25	15 - 20
<b>Cascarilla de arroz</b>	40	18	5.5
<b>Hojas</b>	15 - 20	80 - 85	0
<b>Estiércol</b>	1.6 - 4.7	1.4 - 3.3	2.7 - 5.7
<b>Resíduos sólidos primarios</b>	8-15	NA	24 - 29
<b>Papel</b>	85 - 99	0	0 - 15
<b>Papel periódico</b>	40 - 55	25 - 40	18 - 30

Extractado de McMillan, 1994.

La remoción de lignina y hemicelulosas conduce a la reducción de cristalinidad y al aumento de porosidad, pero esto sólo es logrado mediante procesos de pretratamiento fisicoquímico del material lignocelulósico, mejorando así la hidrólisis enzimática significativamente (McMillan, 1994). El pretratamiento debe poseer las siguientes características:

- (1) mejorar la degradación de azúcares o la habilidad, como consecuencia de ésto, de ser hidrolizados por enzimas;
- (2) evitar la pérdida de hidratos de carbono;
- (3) evitar la formación de subproductos inhibitorios de la hidrólisis subsecuente o del proceso de fermentación;

(4) costo reducido (Sun, Y., *et al.* 2002).

La factibilidad económica de la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, requiere una eficiente conversión de todos los carbohidratos constituyentes de este material complejo a etanol (Galbe y Zacchi, 2002; Ingram *et al.*, 1998; Olsson y Hahn-Hagerdal, 1996).

Muchos microorganismos termófilos anaerobios, capaces de utilizar una variedad de carbohidratos constituyentes del material lignocelulósico, producen etanol e hidrógeno, otro biocombustible valuable (Koskinen *et al.* 2008; Mistry y Cooney, 1989). En la coproducción de etanol e hidrógeno, substanciales cantidades de ambos biocombustibles pueden ser obtenidos (Wu *et al.*, 2007).

La principal limitación de obtener etanol a partir material lignocelulósico es, que la mayoría de los azúcares no son aptos para la fermentación con bacterias u otros microorganismos directamente. Los azúcares se hallan formando la matriz de celulosa, el material fibroso que representa el 75 o 85% de la planta. Sin embargo, con la ayuda de enzimas se puede descomponer la celulosa en sus sub-unidades, que son fermentadas por microorganismos, convirtiéndolas en etanol. Este proceso se ha denominado como producción de ‘oro verde’ que podría reemplazar al ‘oro negro’ crudo, importado. Ésto potencializa la reducción del consumo de combustibles fósiles de manera sostenible (Olsson y Hahn-Hagerdal, 1996).

### **VI.3.3. Aspectos prometedores de la utilización de materiales lignocelulósicos**

#### **VI.3.3.1. Hidrólisis enzimática de celulosa**

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo por enzimas celulolíticas, que son favorablemente específicas (Beguin y Aubert, 1994). Las celulasas normalmente son una mezcla de varias enzimas, al menos tres grupos del complejo de celulasas están involucradas en el proceso del hidrólisis:

(1) Las endoglucanasas (EG, endo-1,4-  $\beta$ -D-glucanohidrolasa o EC. 3.2.1.4.), que atacan las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa, creando los extremos de cadenas libres;

(2) Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiodehidrolasa o EC. 3.2.1.91.), que degradan más la molécula removiendo las unidades de celobiosa de los extremos de las cadenas libres;

(3)  $\beta$ -glucosidasas (EC. 3.2.1.21.), que hidrolizan las moléculas de celobiosa produciendo de esta manera moléculas de glucosa disponibles para la fermentación (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

Además de estos tres grupos del complejo de enzimas celulolíticas, existe también un número de enzimas auxiliares que atacan la hemicelulosa, como las glucuronidasas, las acetilesterasas, las xilanasas,  $\beta$ -xylosidasas, galactomananasas y glucomanasas (Duff y Murray, 1996).

Todas las reacciones de hidrólisis, en las cuales se emplean enzimas suman un costo total mucho menor comparado al costo de los métodos fisicoquímicos, debido a que la hidrólisis enzimática normalmente es llevada a cabo en condiciones normales (pH 4.8 y temperatura 45 - 50°C), además no se liberan productos contaminantes no deseados (Duff y Murray, 1996).

Microorganismos como los hongos y las bacterias producen celulasas que se utilizan en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos; estos microorganismos son aeróbios o anaeróbios, mesófilos o termófilos (Wu *et al.*, 2007).

En la actualidad las bacterias termófilas reciben una especial atención, debido a su capacidad de producir complejos celulolíticos, con enzimas altamente activas y a su vez realizan el proceso de fermentación etanólica. Estas dos características realzan el potencial de estos sistemas biológicos, simplificando de esta manera, el proceso de producción de etanol. Sin embargo, durante esta conversión se producen cantidades bajas de etanol y significantes de otros sub-productos tales como el ácido acético (Panagiotou *et al.*, 2005).

Las especies microbianas como *Neurospora*, *Monilia*, *Paecilomyces*, poseen la habilidad de fermentar celulosa directamente a etanol (Singh *et al.* 1992). Bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces* son productoras de celulasas (Bisaria, 1991). Aunque muchas bacterias productoras de enzimas celulolíticas han sido estudiadas, particularmente, las bacterias anaerobias tales como *Clostridium thermocellum* y *Bacteroides cellulosolvens* producen celulasas con actividad específica elevada, pero no producen cantidades grandes de enzima. Esto debido a que los anaerobios tienen una velocidad de crecimiento muy lenta, característica que condiciona su aplicación a gran escala (Wiegel *et al.* 1983).

### **VI.3.2. Tecnología fermentativa de la conversión de xilosa en etanol**

Los principales azúcares fermentables a partir de la hidrólisis de material lignocelulósico son glucosa y xilosa. La fermentación de glucosa a etanol puede ser llevada a cabo eficientemente por *Saccharomyces cerevisiae*. En contraste, la fermentación de xilosa es un reto, debido a que sólo pocos microorganismos tradicionales pueden fermentar xilosa a etanol, aunque muchos microorganismos utilizan xilosa como fuente de carbono. Muchos esfuerzos han sido puestos en la optimización de la conversión de xilosa a etanol (Jeffries y Shi 1999; Ho *et al.* 1999; Ingram *et al.* 1987; Zhang *et al.* 1995). Sin embargo, bajos rendimientos de etanol, formación de otros productos, pH neutral como requerimiento de crecimiento e intolerancia a elevadas concentraciones de etanol y xilosa, son las desventajas del uso de microorganismos en fermentaciones a mayor escala (Bothast *et al.* 1997). Actualmente, la conversión bacteriana de xilosa a etanol, es establecida con microorganismos genéticamente modificados; pero otra desventaja de éstos es su actividad a pH neutro, debido a que el control de invasión por otros microorganismos complica el proceso (Palmqvist y Hahn-Hagerdal 2000).

Aunque existe un significativo progreso en esta tecnología, todavía existen muchos problemas, uno de ellos es la inhibición por producto. La inhibición por etanol ha recibido mucha atención en la conversión microbiana de xilosa en etanol (Ghasem *et al.* 2004; Jeewon 1997; Palmqvist y Hahn-Hagerdal 2000). Las levaduras fermentadoras de xilosa no crecen en condiciones anóxicas y no fermentan cuando las condiciones son totalmente aerobias. En este sentido, el desarrollo de eficiente fermentación de glucosa y xilosa es requerida para la aplicación a escala industrial (Lin, Y., *et al.* 2006).

Las bacterias anaerobias termófilas extremas son capaces de formar etanol como principal producto de fermentación a partir de todas las hexosas utilizables, di- y polisacáridos, como también a partir de varias pentosas como ribosa y xilosa (Wiegel *et al.* 1983).

## **CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VII.1. Medio de cultivo**

Todos los experimentos fueron realizados en viales de 100 mL conteniendo 80 mL de medio mineral anaeróbico y nitrógeno como atmósfera gaseosa. El medio mineral anaeróbico utilizado fue descrito previamente por Angelidaki *et al.*, 1990; pero se realizaron las siguientes modificaciones: se omitió el uso de cisteína y en su lugar sulfuro de sodio fue utilizado como agente reductor a una concentración de 0.5 g/L. La solución de vitaminas fue preparada de acuerdo al stock de vitaminas DSM-141 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) pero no se utilizó ácido lipoico como parte de esta solución (la composición general del medio se halla detallada en anexos).

Posteriormente el medio de cultivo fue suplementado con la respectiva fuente de carbono como sustrato. La solución de vitaminas, fuente de carbono y el agente reductor fueron esterilizados por filtración y posteriormente adicionados al medio de cultivo después de que éste fue esterilizado por autoclave (121 °C, 20 min). Se utilizó agua calidad milipore y los reactivos químicos fueron de grado analítico.

### **VII.2. Material biológico**

#### **VII.2.1. Colección y selección de muestras termófilas**

Muestras de material en descomposición, sedimentos y aguas, fueron colectados anaeróbicamente en frascos plásticos de 100 mL de capacidad, los cuales fueron llenados, sellados y mantenidos a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Las muestras biológicas para la selección de consorcios con capacidad hidrolítica y productora de etanol fueron recolectadas de zonas propias del altiplano boliviano con elevada actividad geotérmica, cuyas características se hallan detalladas en la tabla 5.

**Tabla 5. Características de las muestras colectadas**

Nro	Código	Substrato	Localidad	Coordenadas	Altitud (msnm)	Temperatura (°C)	pH	Características
1.	C	Melaza de caña	Miraflores/Pueblo Tarapaya	S19°27.969', W65°47.523'	3408	58	6.73	Aguas termales con contenido de algas y materia organica en descomposicion
2.	D	Melaza de caña	Miraflores/Pueblo Tarapaya	S19°27.969', W65°47.523'	3408	58	6.73	Aguas termales con contenido de algas y materia organica en descomposicion
3.	G	Melaza de caña	Obrajes	S17°14.575', W66°59.410'	3806	68	7.42	Aguas termales con contenido de algas
4.	H	Melaza de caña	Obrajes	S17°14.575', W66°59.410'	3806	68	7.42	Aguas termales con contenido de algas
5.	K	Melaza de caña	Capachos	S17°53.483', W67°02.668'	3736	52	7.16	Lodo
6.	L	Melaza de caña	Pueblo Poopo	S18°22.792', W66°57.530'	3790	60	6.86	Lodo con contenido de algas
7.	FT8	Melaza de caña	Capachos	S17°53.483', W67°02.668'	3736	52	7.16	Lodo



8.	FT12	Melaza de caña	Urmiri de Pazña	ND	ND	60	6.79	Lodo negro
9.	4F	Melaza de caña	Caranavi	ND	ND	25	4.21	Planta procesadora de café
10.	II	Melaza de caña	Caranavi	ND	ND	25	4.21	Planta procesadora de café
11.	DD	Melaza de caña	Elinge-Suecia	ND	ND	ND	ND	Planta de tratamiento de aguas
12.	38-1	Melaza de caña	Challviri	S22°32', W67°38'	ND	45	ND	Laguna termal
13.	E1	Melaza de caña	Lakajahuira	S19°11', W67°4'	ND	ND	ND	Lodo de rio
14.	A	Paja de trigo	Chaqui	S19°37.469', W65°34.302'	3721	65	6.56	Lodo negro con hojas de eucalipto en descomposicion
15.	B	Paja de trigo	Chaqui	S19°37.469', W65°34.302'	3721	65	6.56	Lodo negro con hojas de eucalipto en descomposicion
16.	E	Paja de trigo	Chaqui	S19°37.469', W65°34.302'	3721	62	ND	Lodo con contenido de algas
17.	F	Paja de trigo	Chaqui	S19°37.469', W65°34.302'	3721	62	ND	Lodo con contenido de algas

18.	I	Paja de trigo	Sajama	S18°05.860', W69°01.729'	4410	85	7.6	Geiser con algas naranjas
19.	J	Paja de trigo	Sajama	S18°05.860', W69°01.729'	4410	85	7.6	Geiser con algas naranjas
20.	BX	Paja de trigo	Palos Blancos	ND	ND	25	ND	ND
21.	FT8	Paja de trigo	Capachos	S17°53.483', W67°02.668'	3736	52	7.16	Lodo
22.	FT12	Paja de trigo	Urmiri de Pazña	ND	ND	ND	6.79	Lodo negro
23.	4F	Paja de trigo	Caranavi	ND	ND	25	4.21	Planta procesadora de café
24.	II	Paja de trigo	Caranavi	ND	ND	25	4.21	Planta procesadora de café
25.	DD	Paja de trigo	Elinge/Suecia	ND	ND	ND	ND	Planta de tratamiento de aguas
26.	38-1	Paja de trigo	Challviri	S22°32', W67°38'	ND	45	ND	Laguna termal
27.	E1	Paja de trigo	Lakajahuira	S19°11', W67°4'	ND	ND	ND	Lodo de rio

ND. Característica no determinada

## **VII.2.2. Material agroindustrial**

El material agroindustrial fue paja de trigo y melaza de caña, utilizados como sustratos. Ambos fueron esterilizados por autoclave a 121 °C, durante 1h, evitando de esta manera toda posible contaminación por esporas. La cantidad utilizada de material lignocelulósico fue determinada de acuerdo a su contenido teórico de celulosa y hemicelulosa, ambas ajustadas a una concentración final de 5 g/L en el medio de cultivo (ver anexos).

## **VII.3. Determinaciones analíticas**

### **VII.3.1. Determinación de la velocidad de crecimiento**

El crecimiento en los diferentes sustratos fue determinado por la medición de la densidad óptica de los cultivos, utilizando un espectrofotómetro a 620 nm de longitud de onda. La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial fue determinada graficando el logaritmo neperiano de la densidad óptica versus el tiempo de incubación en horas. Debido a la presencia de turbidez del material lignocelulósico utilizado como sustrato, el crecimiento fue monitoreado indirectamente por la presencia de gas producido.

### **VII.3.2. Cuantificación de etanol en fase gaseosa**

La evolución en la producción de gases durante el proceso de fermentación, fue determinada por cromatografía de gases (GC1000, Perkin Elmer) cuando una muestra de aproximadamente 400 uL de fase gaseosa recolectada durante fermentación, fue inyectada a 250 °C en el cromatógrafo de gases equipado con una columna Elite-5 (Perkin Elmer) a 50 °C. La fase móvil utilizada fue hidrógeno a un flujo de 50 PSI, aproximadamente. Las concentraciones de etanol y metano fueron cuantificadas mediante un detector de ionización de llama a 200 °C.

La curva de calibración para la determinación de etanol en fase gaseosa fue preparada con estándares a diferentes concentraciones de etanol en fase líquida, en viales de dimensiones similares a los utilizados para el proceso de fermentación cerrados herméticamente. Dichos estándares fueron incubados por al menos 4 h a 60 °C, para asegurar la distribución de etanol entre las fases gaseosa y líquida, manteniendo un equilibrio entre ambas. La cantidad detectada de etanol correspondió a la concentración total de etanol cuando éste se halla en un sistema en equilibrio entre las fases gaseosa y líquida.

### **VII.3.3. Cuantificación de etanol, sub-productos y consumo de sustratos en fase líquida**

La cuantificación de los diferentes sustratos y productos finales de fermentación (etanol, lactato y ácidos grasos volátiles: ácido acético, propiónico y butírico) fue determinada por HPLC equipado con una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 55 °C. La fase móvil utilizada fue 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un flujo de 0.6 ml/min, con un detector de índice de refracción. Antes del análisis por HPLC, las muestras fueron

enfriadas a 4 °C por al menos 4 h y posteriormente 1 mL de las muestras fue acidificado con 10 uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20 % (p/v) y filtrado a través de una membrana de 0.45 µm de poro.

#### **VII.3.4. Análisis de gases como producto de la fermentación**

El análisis de dióxido de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y metano fue realizado con un cromatógrafo de gases (Varian 4000) equipado con un detector de conductividad térmica, este análisis fue descrito previamente por Parawira W., *et al.* (2004).

#### **VII.4. Activación y selección de consorcios**

Los productos finales de la fermentación, así como los substratos fueron cuantificados antes, durante y después de la incubación. La proporción 2% (v/v) fue utilizada como concentración de inóculo inicial en medio líquido y en roll-tubes para aislamiento. El inóculo para cada experimento fue tomado de la fase temprana estacionaria de un cultivo previo. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

##### **VII.4.1. Condiciones de cultivo en batch**

Para la activación y selección de consorcios hidrolíticos de residuos agroindustriales y productores de etanol, se establecieron cultivos en batch, mediante la técnica de Hungate modificada para el cultivo de anaerobios estrictos (Hungate *et al.* 1969).

Todos los ensayos fueron desarrollados bajo condiciones de cultivo a una temperatura de 60°C, sin agitación y anaerobias (creando una atmósfera saturada de N<sub>2</sub>).

##### **VII.4.2. Selección primaria de consorcios anaerobios termófilos en base a la producción de etanol a partir de la utilización de material agroindustrial: paja de trigo y melaza de caña**

La selección de consorcios fue llevada a cabo cultivando las muestras colectadas en viales conteniendo medio complejo, constituido por medio mineral anaeróbico y paja de trigo o melaza de caña. La cantidad de estos substratos en el medio fue determinada de acuerdo a su contenido teórico de celulosa y hemicelulosas ajustadas a una concentración final de 5 g/L de glucosa y xilosa. Este medio de enriquecimiento no estuvo constituido de otras fuentes de carbono alternativas (ver anexos).

Los cultivos enriquecidos fueron inoculados e incubados a 60°C y pH neutro por 48 h. Los consorcios fueron seleccionados en base al criterio de síntesis de etanol como producto mayoritario.

##### **VII.4.3. Selección secundaria de consorcios anaerobios termófilos en base a la fermentación de D-xilosa o D-glucosa para la producción de etanol**

Los consorcios previamente enriquecidos en cultivos con material agroindustrial, fueron inoculados en medio mineral anaeróbico definido a pH neutro, conteniendo D-xilosa o D-glucosa a una concentración de 5 g/L e incubados a 60°C, con el fin de establecer un balance de masas mediante el monitoreo de la cinética producción de etanol y otros productos del metabolismo.

## **VII.5. Optimización de la producción de etanol mediante la aplicación de diseños factoriales**

### **VII.5.1 Influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol**

El medio de cultivo mineral anaeróbico tiene en su composición D-xilosa 4 g/L y cloruro de amonio 3 g/L (como fuente única de nitrógeno), manteniendo una relación equivalente g: g de Carbono:Nitrógeno de 1: 0.5, respectivamente.

Un diseño experimental fue establecido para determinar la influencia de la concentración de nitrógeno en el proceso, y de esta manera optimizar la producción de etanol. De tal forma, tres relaciones equivalentes (g: g Carbono: Nitrógeno) fueron estudiadas: 1: 0.32, 1: 0.5 (condición inicial) y 1: 0.65. La productividad de etanol fue comparada cuando el cultivo alcanzó su fase estacionaria.

### **VII.5.2 Influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de etanol**

Para seleccionar el mejor consorcio productor de etanol se utilizó cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, presente en el medio mineral anaeróbico (Angelidaki *et al.* 1990). Se planteó la utilización de urea como fuente de nitrógeno alternativa y se comparó la producción de etanol cuando el cultivo alcanzó su fase estacionaria.

### **VII.5.3. Diseño factorial basado en la modificación de las concentraciones de xilosa y urea en el medio de cultivo y su efecto en la producción de etanol**

Se realizó un diseño factorial completo  $3^2$ , por triplicado, donde se estudiaron variaciones en las concentraciones de D-Xilosa y Urea (Tabla 6). Para este diseño, se prepararon viales con medio mineral anaeróbico mediante la técnica de Hungate (1969) y la producción de etanol y sub-productos, velocidades de crecimiento y consumo de sustrato fueron monitoreadas hasta que el consorcio alcanzó su fase estacionaria temprana de crecimiento.

Todos los datos fueron procesados mediante el empleo del programa estadístico: Statistica 6.0 (versión Windows).

**Tabla 6. Esquema del diseño factorial 3<sup>2</sup>: Variables independientes Urea (g/L) y Xilosa (g/L), variable dependiente, Etanol (g/L)**

Número de experimentos	Niveles	
	Urea	Xilosa
1	1	1
2	1	0
3	1	-1
4	0	1
5	0	0
6	0	-1
7	-1	1
8	-1	0
9	-1	-1
<b>Niveles</b>	<b>Concentración (g/L)</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
-1	1	5
0	3	10
1	5	15

## VII.6. Aislamiento, selección y caracterización de cepas aisladas del consorcio B

### VII.6.1. Aislamiento y selección de cepas termofilas anaerobias

Cepas bacterianas fueron aisladas a 60°C y pH neutro, utilizando técnicas anaerobias tradicionales como: Técnica de roll-tube (Hungate, R.E., 1969 y Bryant, M.P., 1972) y cultivo bifásico.

Para dicho aislamiento se utilizó medio mineral anaeróbico solidificado con agar-agar al 3%, 5 g/L de D-xilosa como sustrato y 1 g/L de extracto de levadura como co-sustrato. Las diferentes colonias fueron colectadas con agujas estériles y cultivadas en el mismo medio carente de agar-agar, este procedimiento fue repetido hasta observar un solo tipo de colonias.

Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio mineral anaeróbico y se determinó la producción de etanol de cada una de ellas. Este fue el parámetro utilizado para seleccionar una sola cepa y realizar posteriormente su caracterización.

### **VII.7. Influencia de la privación de fuente de nitrógeno en la producción de etanol por la cepa 45B**

Debido a los resultados obtenidos en el último diseño factorial, se estableció un diseño experimental en el que se disminuyó la concentración de la fuente de nitrógeno, para determinar su influencia en la producción de etanol con una cepa pura y a su vez, establecer la concentración óptima de urea en el medio de cultivo.

### **VII.8. Producción de etanol por la cepa 45B, a partir de la utilización de otros substratos: $\alpha$ -D glucosa, $\alpha$ -D xilosa, D-celobiosa y D-sacarosa**

La cepa 45B fue cultivada en otras fuentes de carbono y energía, tales como D-sacarosa, D-celobiosa, con el fin de comparar las productividades de etanol, respecto a los otros substratos comúnmente utilizados (D-xilosa o D-glucosa). La cinética de producción de etanol y otros productos del metabolismo fue monitoreada, para posteriormente establecer el balance de masas respecto a la producción de etanol y determinar la eficiencia del proceso.

### **VII.9 Caracterización de la cepa 45B**

#### **VII.9.1. Caracterización microscópica**

##### **VII.9.1.1. Microscopía óptica**

El método de Hucker (Claus, D. 1992) fue aplicado para realizar tinción Gram y las bacterias fueron observadas con microscopio óptico (Nikon BH-2). Se tomaron microfotografías de cada etapa de crecimiento de la cepa 45B.

##### **VII.9.1.2. Microscopía electrónica**

###### **VII.9.1.2.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Micrografías electrónicas de toda la célula fueron tomadas en cultivos puros de la cepa 45B, crecidos durante 12 h a 60 °C en medio mineral anaeróbico. El método usado para preparar las células observadas por microscopía electrónica fue descrito previamente por Patel *et al.* (1985). Las células fueron fijadas a un cubreobjetos con glutaraldehído al 2.5 % (en buffer 0.1 M de cacodilato de sodio) durante 2 min y posteriormente sometidas a una tinción negativa con acetato de uranilo por 5 min.

###### **VII.9.1.2.2. Microscopía electrónica de escaneo (SEM)**

Micrografías electrónicas de las células fueron tomadas en cultivos puros de la cepa aislada, crecidos durante 12 h a 60 °C en medio mineral anaeróbico. El método usado para preparar las células para la observación por microscopía electrónica fue descrito previamente por Reynolds, E. *et al.* (1963).

### **VII.9.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa 45B**

El perfil de temperaturas para el crecimiento de la cepa 45B fue determinado en medio mineral anaeróbico conteniendo 5 g/L de celobiosa. La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial a diferentes temperaturas fue determinada graficando el logaritmo neperiano de la densidad óptica versus el tiempo en horas, para cada rango de temperatura.

### **VII.9.3. Perfil metabólico de carbohidratos de la cepa 45B**

El metabolismo de carbohidratos de la cepa 45B fue determinado empleando el test API 20A. Este test consistió de 20 micro-tubos, utilizados para estudiar la fermentación de 20 substratos que pertenecieron a la familia de los carbohidratos, aminoácidos y otros.

La suspensión bacteriana de la cepa 45B de  $OD_{620} = 0.5 (\pm 0.01)$ , equivalente al tubo número 3 de la Escala de Mc Farland ( $900 \times 10^6$  UFC), fue utilizada como inóculo en el test API 20A. Ésta suspensión bacteriana fue posteriormente inoculada en cada uno de los micro-tubos. El test fue incubado a 60 °C durante 48 h en un ambiente anaeróbico y la reacción de acidificación fue observada a las 18, 24 y 48 h. El test fue repetido tres veces para confirmar los resultados obtenidos. Los resultados de utilización de carbohidratos contribuyeron a la caracterización del metabolismo bacteriano de la cepa 45B.

### **VII.9.4. Identificación de la cepa 45B por secuenciación del gen 16S ADNr**

La identificación de la cepa 45B se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr. Se realizó una comparación con secuencias homólogas de cepas tipificadas mediante la opción avanzada BLAST, para clasificar y otorgar una posición taxonómica a la cepa aislada 45B.

#### **VII.9.4.1. Extracción de ADN**

El ADN genómico fue extraído de la cepa 45B, después de 12 h de incubación a 60 °C, el procedimiento de extracción es detallado a continuación:

1.5 mL de cultivo bacteriano fue centrifugado por 3 min a 13000 rpm, y el pellet fue re-suspendido en 700  $\mu$ L de buffer 0.01 M TEC-SDS Tris-HCl pH 8.0 y mezclado vigorosamente para disolver todos los agregados celulares. 2  $\mu$ L de RNAsa (20 mg/ml) (Sigma) y 2  $\mu$ L lisozima (20 mg/ml) (Sigma) fueron adicionados, y se incubó esta mezcla a 37 °C por 20 min. Posteriormente, 1  $\mu$ L proteinasa K (20 mg/ml) (International Biotechnologies, Inc.) fue adicionado, se incubó la mezcla a 55 °C por 30 min. La mezcla fue agitada gentilmente por inversión cada 5 min. Luego fue adicionado 1 volumen (700  $\mu$ L aprox.) de una mezcla fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25: 24: 1) saturada con 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA (Sigma).

La mezcla fue agitada por 30 seg., e incubada a temperatura ambiente por 10 min., luego centrifugada a 13000 rpm durante 10 min en una micro-centrifuga (Bideuge 13; Heraeus Sepatech).

Posteriormente, la fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf nuevo, entonces 1 volumen (600  $\mu$ L aprox.) de la mezcla cloroformo : alcohol isoamílico (24: 1) (Sigma) fue adicionada; la mezcla fue agitada



por 30 seg, y centrifugada a 13000 rpm, durante 10 min. Luego, la fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf nuevo.

El ADN en fase acuosa fue precipitado con 1 volumen (600 uL aprox.) de isopropanol frío e incubado por 15 min a -20 °C (Merck; Alemania), posteriormente fue centrifugado a 13000 rpm, por 15 min, y el sobrenadante fue descartado.

El pellet de ADN fue enjuagado con 70 % (v/v) de etanol (500 uL aprox.) y re-suspendido gentilmente. Posteriormente el pellet de ADN fue secado al aire permitiendo la evaporación de todo el etanol, luego fue re-suspendido en 50 µL de agua Milli-Q, y el ADN fue disuelto a 4 °C por 18 horas. Éste fue guardado a -20 °C hasta su procesamiento.

#### VII.9.4.2. Amplificación del gen 16S ADNr por PCR

La amplificación del gen 16S ADNr fue llevada a cabo con primers universales (Thermo) diseñados para alinear a regiones conservadas del gen bacteriano 16S ADNr. Las características de estos primers se detallan a continuación:

**Tabla 7. Primers utilizados en el PCR 16S rDNA (Tm y GC% fueron determinados usando el calculador Finnzymes disponible en [www.finnzymes.com/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)).**

Primer	Secuencia del Primer 5' - 3'	Tamaño del Primer	Tm (°C)	GC %
8-27 F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	20	61.5	50.0
1492 R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	19	53.7	42.1

La reacción del PCR contenía 10 µL de buffer 5x Phusion<sup>TM</sup> GC (con 7.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, el cual proporciona 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> a la reacción final) (Finnzymes, Finlandia), 0.5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (participa en la denaturación de la plantilla de ADN con alto contenido de GC) (Finnzymes, Finlandia), 5 µL de 2 mM de una mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato (BioLabs, U.K) (proporcionando 0.2 mM de cada desoxiribonucleótido trifosfato en la reacción final), 0.25 µL de cada primer (0.5 µM de cada uno en la reacción final), 0.5 µL de Phusion<sup>TM</sup> DNA polymerase (0.02 U/µL) (Finnzymes, Finlandia), y 2 µL de la plantilla de ADN a una concentración final de entre 17-33 ng en un volumen total de reacción de 50 µL.

La amplificación fue llevada a cabo con un termociclador (Whatman Biometra, Alemania). La reacción de PCR para lograr la denaturación inicial del ADN fue de 98 °C durante 4 min, seguida por 30 ciclos con el siguiente perfil: 98 °C por 30 seg para la denaturación, 53 °C por 30 seg para el alineamiento y 72 °C por 1 min, para la extensión. La extensión final fue llevada a cabo a 72 °C durante 10 min después de la reacción de amplificación.

#### **VII.9.4.3. Detección de los productos del PCR**

Los productos del PCR, coloreados con 6x colorante naranja (Fermentas), fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v) (Saveen Werner, Suecia), en buffer 1X TAE con bromuro de etidio (Mercury, U.S.A). 10 µL de marcador de ADN de 1kb (O'gene ruler; Fermentas) fue cargado para detectar la banda del 16S, la cual, fue posteriormente visualizada por transiluminación con luz UV. (Los geles fueron fotografiados usando una cámara digital *Kodak EDAS 290*). Las bandas de 16S fueron cortadas y guardadas a -20 °C para su posterior amplificación.

#### **VII.9.4.4. Purificación de los productos del PCR**

Los productos del PCR fueron purificados usando el kit de extracción de geles QIAEX<sup>®</sup>II (150) (QIAGEN). Posteriormente se midió la concentración de ADN purificado usando el método de Nanodrop (Nanodrop Technologies, INC.Wilmington, U.S.A, NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000; full-spectrum U.V/ris spectrophotometer). Una concentración de 20 ng/100 bases (300 ng del ADN 16S de 1.5kb) es requerido para su secuenciación.

#### **VII.9.4.5. Secuenciación**

Las muestras purificadas de ADN fueron etiquetadas y mantenidas a 4 °C hasta su envío para secuenciación. La secuenciación fue llevada a cabo por MWG Biotech AG, Martinsried, Alemania con el método de dideoxy (Sanger *et al.*, 1981). La secuenciación fue conducida en una sola dirección usando el primer forward (8-27 F) utilizado en el PCR.

#### **VII.9.4.6. Análisis de secuenciación e identificación**

La secuencia del ADNr 16S fue buscada en el GenBank (National Centre for Biotechnology Information; NCBI) usando la opción de BLAST avanzado para lograr una búsqueda rápida, alineamiento y comparación con secuencias altamente similares (Megablast).

## **CAPÍTULO VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **VIII.1. Crecimiento y producción de etanol a partir de la utilización de residuos agroindustriales: paja de trigo y melaza de caña**

Las técnicas más exitosas reportadas hasta la fecha, involucran el aislamiento y la selección de microorganismos propios de la naturaleza, los cuales exhiben la capacidad de crecer a elevadas temperaturas y a su vez producir etanol. La producción de etanol a partir de material lignocelulósico (residuos agroindustriales) es un importante criterio de selección, cuando se considera su aplicación en la vida real (Hahn-Hägerdal, *et al.* 1993; Zacchi, G., 1988 y Hinman, N.D., 1989).

En este sentido, muestras de diferentes ambientes geotérmicos naturales fueron utilizadas para establecer cultivos anaerobios termófilos enriquecidos, en los cuales los diferentes consorcios fueron estudiados en cuanto a su capacidad de utilizar residuos agroindustriales (paja de trigo y melaza de caña), como sustratos y a su vez producir etanol como producto principal después de un tiempo de fermentación de aproximadamente 48 h.

Un total de 27 consorcios fueron cultivados en medio mineral anaeróbico complejo (debido a la adición de material agroindustrial) a pH neutro y 60°C de temperatura. Como se observa en la tabla 5, la mayoría de las muestras produjeron cantidades significantes de etanol, pero también de metano, ambos como productos finales de fermentación. Sólo pocos cultivos enriquecidos produjeron etanol y no así metano.

A continuación, se seleccionaron todos aquellos consorcios capaces de producir etanol a una concentración igual o mayor a 0.25 g/L, es decir, 12 consorcios que posteriormente fueron cultivados en medio mineral anaeróbico, suplementado con glucosa o xilosa a 5 g/L de concentración, para realizar la selección secundaria basada en la fermentación de estos sustratos simples.

**Tabla 8. Formación de etanol y metano por el crecimiento de consorcios cultivados en melaza de caña y paja de trigo como sustratos**

Nro	Código	Substrato	18 hrs	24hrs		48hrs	
			Crecimiento	Etanol (g/L)	Metano (%)	Etanol (g/L)	Metano (%)
1.	*C	Melaza de caña	+	0.59	0.00	0.89	0.00
2.	D	Melaza de caña	+	0.02	0.00	0.02	0.00
3.	*G	Melaza de caña	+++	0.37	0.09	0.58	0.05
4.	*H	Melaza de caña	+++	0.71	0.02	0.56	0.02
5.	*K	Melaza de caña	+	0.27	0.19	0.77	0.04
6.	*L	Melaza de caña	+	0.17	0.14	0.76	0.00
7.	FT8	Melaza de caña	+	0.10	0.04	0.00	0.10
8.	FT12	Melaza de caña	+	0.09	0.04	0.07	0.07
9.	4F	Melaza de caña	+	0.09	0.02	0.07	0.03
10.	II	Melaza de caña	+	0.07	0.04	0.00	0.27
11.	DD	Melaza de caña	+	0.09	0.08	0.05	0.16
12.	38-1	Melaza de caña	+	0.07	0.04	0.06	0.13
13.	*E1	Melaza de caña	+	0.40	0.00	0.12	0.19
14.	*A	Paja de trigo	++	0.43	0.00	0.17	0.02
15.	*B	Paja de trigo	++	0.59	0.00	0.51	0.00
16.	*E	Paja de trigo	+++	0.97	0.07	0.74	0.11
17.	*F	Paja de trigo	+++	0.21	0.17	1.52	0.58
18.	*I	Paja de trigo	+	0.29	0.19	1.75	0.00
19.	*J	Paja de trigo	+	0.26	0.00	0.54	0.27
20.	BX	Paja de trigo	+	0.10	0.00	0.11	0.09
21.	FT8	Paja de trigo	+	0.10	0.00	0.08	0.09
22.	FT12	Paja de trigo	+	0.11	0.08	0.04	0.13
23.	4F	Paja de trigo	+	0.10	0.00	0.05	0.01
24.	II	Paja de trigo	+	0.13	0.01	0.07	0.02
25.	DD	Paja de trigo	+	0.14	0.05	0.06	0.26
26.	38-1	Paja de trigo	+	0.11	0.13	0.10	0.22
27.	E1	Paja de trigo	+	0.08	0.07	0.08	0.10

\*Cultivos seleccionados para el próximo análisis

En el test de selección de consorcios basado en la utilización de substratos crudos y sin la adición de enzimas ni fuentes de carbono alternativas, 12 consorcios fueron seleccionados (C, G, H, K, L, E1, A, B, E, F, I y J) como los mejores productores de etanol entre todos los estudiados. La fermentación de los substratos crudos por los microorganismos resultó en la producción de etanol en un rango de 0.40 – 38.11mM. Estas concentraciones de etanol producido superan a aquellas obtenidas en otros estudios con el uso de cepas puras, en condiciones termófilas anaerobias similares, las cuales alcanzaron una producción de etanol en el rango de 9.8 – 25.7mM utilizando substratos crudos (Sommer, P., *et al.* 2004). Sin embargo, el consumo de substrato no es considerado en este estudio, debido a que no se realizó una caracterización previa del mismo.

Las diferencias en cuanto a la formación de productos finales fue evidente para cada consorcio, en cada substrato. Cada substrato (paja de trigo y melaza de caña) tiene una única composición, particularmente respecto a las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. Las diferencias en cuanto a la composición de los residuos agroindustriales influyen la disponibilidad de los carbohidratos utilizados en la fermentación. Relacionado a esto, la cristalinidad y el grado de polimerización afecta el número de sitios accesibles al ataque enzimático y por tanto la hidrólisis bacteriana del substrato (Schwarz, W., 2001). La estructura del substrato influye el posicionamiento de las enzimas así como la actividad enzimática y la formación de productos. La distribución de las enzimas producidas por los microorganismos constituyentes de los consorcios en el metabolismo de los residuos industriales no ha sido estudiada, sin embargo, en muchos estudios se concluyó que la fuente de carbono afecta el tipo de enzimas producidas (Linder, M., *et al.* 1997; Panda, T., *et al.* 2005 y Lesage-Meessen, L., *et al.* 2002).

La mayor concentración de etanol fue 38.11 mM, producida por el consorcio I, cuyo material biológico fue recolectado en las aguas termales neutras a 60 °C y pH 7 (Localidad Poopó). La habilidad de los consorcios de crecer y degradar material crudo y subsecuentemente convertir xilosa y glucosa a etanol indica la presencia de enzimas celulolíticas, xilanolíticas y glucolíticas activas en los 12 consorcios seleccionados.

### **VIII.2. Selección secundaria de consorcios anaerobios termófilos basada en la fermentación de D-xilosa o D-glucosa para la producción de etanol**

Un total de 12 consorcios seleccionados como productores de etanol a concentraciones iguales o superiores a 0.25 g/L fueron cultivados en medio mineral anaeróbico, suplementado con  $\alpha$ -D glucosa o  $\alpha$ -D-xilosa a una concentración de 5 g/L. Rendimientos en cuanto a la producción de etanol respecto al consumo de substrato (Y etanol producido/ substrato consumido) fueron determinados (Tabla 9). En este sentido, 4 consorcios fueron seleccionados en base a su rendimiento mayor o igual a 0.10 g de etanol producido/ g de substrato consumido.

**Tabla 9. Ensayo de producción de etanol a partir de la fermentación de D-xilosa y D-glucosa**

48 horas de incubación							
Nro	Código	Xilosa consumida (g/L)	Etanol producido (g/L)	Rendimiento Yp/s (g/g)	Glucosa consumida (g/L)	Etanol producido (g/L)	Rendimiento Yp/s (g/g)
1.	C	0.13 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	0.20 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00
2.	G	4.30 ± 0.10	0.40 ± 0.01	0.09	3.40 ± 0.11	0.08 ± 0.03	0.02
3.	H	3.88 ± 0.02	0.09 ± 0.12	0.02	4.18 ± 0.20	0.07 ± 0.11	0.02
4.	K	3.92 ± 0.23	0.03 ± 0.07	0.01	4.00 ± 0.10	0.03 ± 0.07	0.01
5.	L	0.13 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	0.25 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00
6.	E1	4.34 ± 0.30	0.14 ± 0.06	0.03	3.32 ± 0.15	0.27 ± 0.13	0.08
7.	**A	4.05 ± 0.10	0.41 ± 0.07	0.10	5.00 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.01
8.	*B	2.46 ± 0.13	0.96 ± 0.00	0.39	0.74 ± 0.00	0.13 ± 0.04	0.18
9.	**E	0.60 ± 0.30	0.16 ± 0.12	0.27	0.75 ± 0.09	0.05 ± 0.07	0.07
10.	F	2.20 ± 0.11	0.06 ± 0.09	0.03	4.32 ± 0.10	0.08 ± 0.10	0.02
11.	I	3.36 ± 0.22	0.11 ± 0.03	0.03	4.33 ± 0.12	0.10 ± 0.02	0.02
12.	**J	0.12 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00	0.54 ± 0.03	0.16 ± 0.12	0.30

\* Consorcio seleccionado para futuros estudios

\*\* Consorcios productores de metano y etanol

De los consorcios seleccionados, A, B, E y J, el consorcio B fue utilizado en próximos experimentos, debido a su capacidad de crecer y utilizar ambos sustratos y producir los rendimientos más altos en cuanto a la producción de etanol. Cuando  $\alpha$ -D xilosa fue utilizada por el consorcio B, como fuente de carbono, se alcanzó un rendimiento de 0.4 g de etanol producido /g de xilosa consumida. En otros estudios el mayor rendimiento en cuanto a la producción de etanol con cepas aisladas de las mismas características anaerobias termófilas, fue de 0.18 g de etanol producido /g de xilosa consumida (cepa aislada A10, estudiada por Sommer, P., *et al.* 2004).

En cuanto a la utilización de  $\alpha$ -D glucosa por el consorcio B, se registró un rendimiento de 0.2 g de etanol producido/ g de glucosa consumida. Estudios en los que se utilizó este mismo sustrato para la producción de etanol por *Clostridium thermohydrosulfuricum*, bajo las mismas condiciones de cultivo, demostraron un rendimiento en la producción de etanol de 0.3 g de etanol producido/g de glucosa consumida (Cook G., *et al.* 1994). Esto demuestra que el consorcio B posee afinidad por  $\alpha$ -D xilosa como sustrato.

Debido a que la xilosa es una de las pentosas más abundantes en el material lignocelulósico (Franzén *et al.* 1994), la fermentación de xilosa por diferentes microorganismos ha sido extensamente estudiada en la pasada década (Skoog y Hahn-Hägerdal, 1998). La bioconversión de xilosa a etanol a gran escala es de enorme interés económico. Sólo un limitado número de microorganismos fermentadores de pentosas ha sido descrito en la literatura y las herramientas de ingeniería genética han sido limitadas a la introducción de rutas metabólicas de utilización de xilosa y arabinosa. Avances en el desarrollo de cepas

recombinantes han sido alcanzados a través de estrategias de adaptación, incluyendo mutagénesis al azar (Wahlbom *et al.* 2003), ingeniería evolutiva (Sonderegger *et al.* 2004b), etc. El consorcio B estudiado tiene un potencial considerable de ser un candidato nuevo para la bioconversión de material lignocelulósico (paja de trigo) en etanol, el estudio que se reporta en el presente trabajo demuestra que el aprovechamiento de este consorcio microbiano es viable.

Los consorcios A, E y J no se utilizaron en futuros experimentos debido a que no sólo produjeron etanol, metano fue también producido durante la fermentación de los substratos. Un gran número de microorganismos son capaces de formar etanol, sin embargo, muchos de estos microorganismos generan múltiples productos en adición a éste. Estos incluyen otros alcoholes como butanol, isopropanol y 2,3-butanodiol; ácidos orgánicos como acetato, butirato, formiato y lactato; polioles como arabitol, glicerol y xilitol; cetonas como la acetona; o varios gases como metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Roehr, *et al.* 2001).

### VIII.2.1. Cinética de crecimiento del consorcio seleccionado

La cinética de crecimiento microbiano y otras características del metabolismo fermentativo anaerobio fueron establecidas para el consorcio B seleccionado, para lo cual, se utilizó el inóculo de un cultivo previo cuando éste alcanzó su fase estacionaria temprana. Los parámetros metabólicos determinados cuando el consorcio B es cultivado en medio mineral anaeróbico suplementado con D-xilosa como única fuente de carbono, a pH neutro y 60°C de temperatura son detallados en la figura 11 y la tabla 10.

Para establecer la cinética de crecimiento microbiano, se consideró a todos los componentes del consorcio microbiano como un solo tipo de microorganismo, con reacciones metabólicas específicas para éste. Se hizo esta consideración con el fin de conocer la factibilidad del sistema de producción de etanol cuando consorcios microbianos son usados.

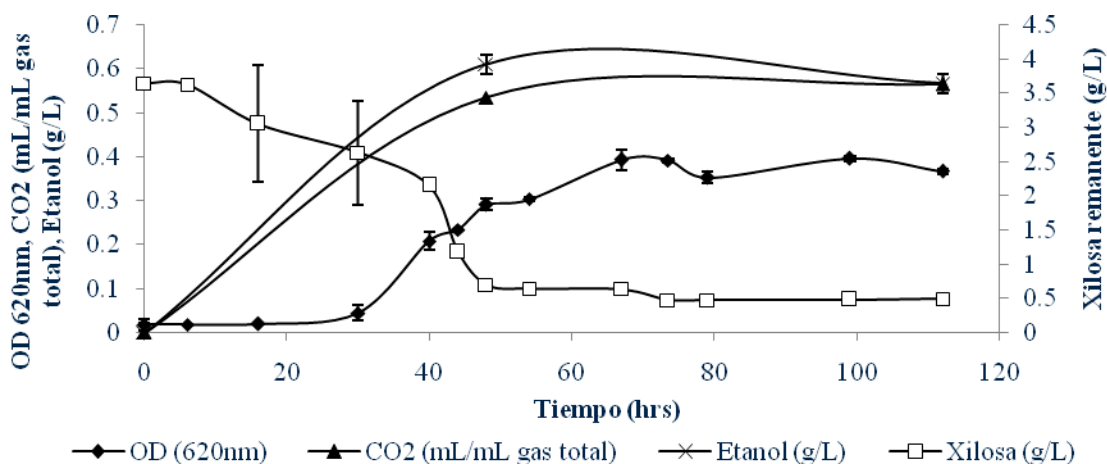


Figura 11. Crecimiento del consorcio B en 5 g/L de  $\alpha$ -D xilosa a pH 7 y 60°C en cultivo batch

**Tabla 10. Parámetros metabólicos determinados cuando el consorcio B es cultivado en medio mineral anaeróbico suplementado con D-xilosa como única fuente de carbono, a pH neutro y 60 °C de temperatura.**

Características	
Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.081
Tiempo de generación (h)	8.55
Xilosa consumida (g/L)	3.15
Etanol producido (g/L)	0.57
Dióxido de carbono (mL/mL gas total)	0.57
Rendimiento (g etanol / g xilosa consumida)	0.18

Una de las principales desventajas del sistema propuesto, es el metabolismo excesivamente lento del consorcio B, el tiempo de generación microbiano es largo, este hecho afectaría la productividad volumétrica de etanol si se propusiera su aplicación como sistema continuo de producción. Sin embargo, en la actualidad existen aplicaciones prácticas, como la técnica de inmovilización microbiana, la recuperación de células, la recirculación de células y/o el control de crecimiento, para incrementar la densidad celular, y de esta forma establecer poblaciones robustas y activas en cuanto a la formación de productos metabólicos deseados (Nuñez, *et al.* 1987).

### VIII.3. Optimización del proceso de producción de etanol por el consorcio microbiano B a través de la aplicación de diseños factoriales

#### VIII.3.1. Influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol

El consorcio B seleccionado fue cultivado en medio mineral anaeróbico constituido por 3 g/L de cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno (Angelidaki *et al.*,1990) y 4 g/L D-xilosa como fuente de carbono, manteniendo de esta manera una proporción equivalente (g: g) de 1 Carbono: 0.5 Nitrógeno.

Mediante este diseño experimental se determinó la influencia de la concentración de nitrógeno en el proceso fermentativo, las proporciones equivalentes (g: g) que se aplicaron son detalladas a continuación (Tabla 11):

**Tabla 11. Parámetros utilizados para determinar la influencia de la concentración de nitrógeno en la producción de etanol**

Condición	Xilosa (g/L)	NH <sub>4</sub> Cl (g/L)	Proporción C: N (g: g)
A	4	2	1: 0.32
B (condiciones iniciales)	4	3	1: 0.5
C	4	4	1: 0.65



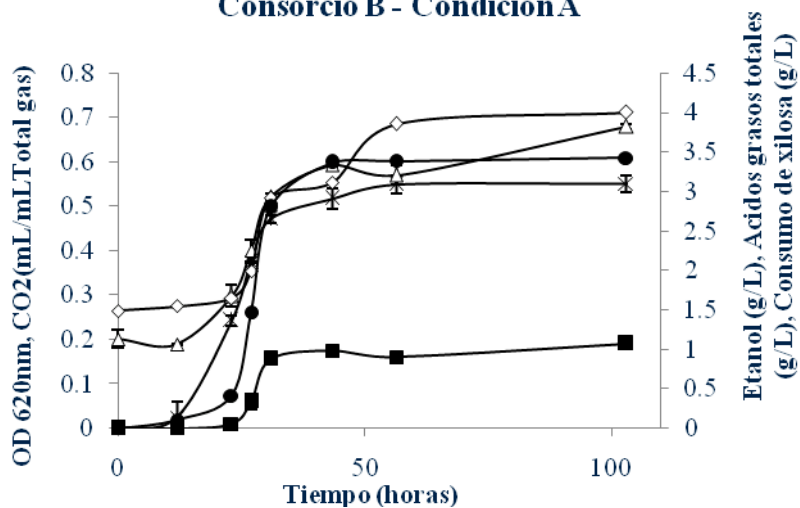
La comparación en cuanto a rendimientos en la producción de etanol, bajo las tres condiciones fue llevada a cabo, cuando el cultivo alcanzó su fase tardía estacionaria y un sumario de los parámetros finales de fermentación es detallado en la tabla 12 y la figura 12.

**Tabla 12. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B cuando es cultivado en 4 g/L de  $\alpha$ - D xilosa como único substrato**

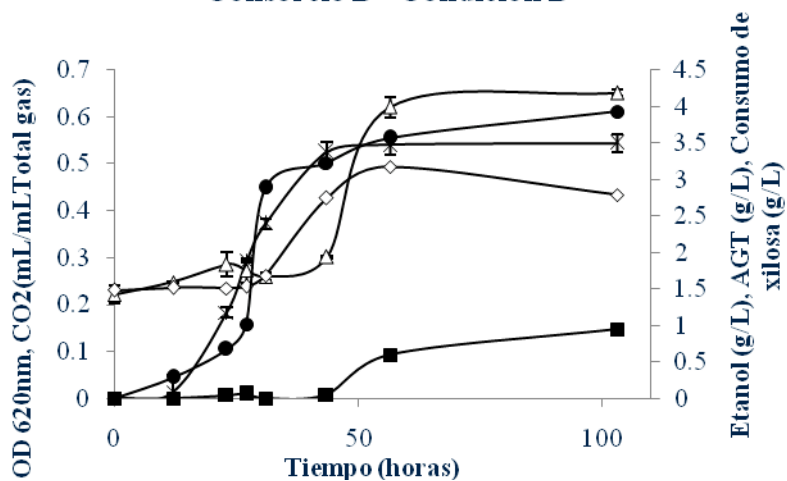
Parámetro medido	A	B	C
<b>Velocidad de crecimiento (<math>h^{-1}</math>)</b>	0.04	0.03	0.02
<b>Tiempo de generación (h)</b>	18.24	20.39	33.00
<b>Xilosa consumida (g/L)</b>	3.42	3.63	3.92
<b>Etanol producido (g/L)</b>	1.07	0.95	0.90
<b>Acetato (g/L)</b>	0.49	0.24	0.45
<b>Lactato (g/L)</b>	1.83	1.02	1.90
<b>Ácidos grasos totales (g/L)</b>	2.52	1.31	2.36
<b>Dióxido de carbon (mL/mL Gas total)</b>	0.55	0.54	0.57
<b>Y<sub>b/s</sub> (g/g)</b>	0.07	0.05	0.06
<b>Y<sub>p/s</sub> (g/g)</b>	0.31	0.24	0.25
<b>Y<sub>p/b</sub> (g/g)</b>	4.47	4.42	4.17
<b>Proporción Etanol: Acetato</b>	2.18	3.96	2
<b>Proporción Etanol: Ácidos grasos volátiles totales</b>	0.42	0.72	0.38

Muchas estudios han revelado que la habilidad de los microorganismos de producir elevados niveles de etanol, depende de las condiciones nutricionales y las funciones protectoras que algunos de estos nutrientes pueden proporcionar. La fuente de nitrógeno asimilable es uno de los componentes más importantes en el medio de fermentación y ha sido reportado como un nutriente limitante en la fermentación etanólica (Thomas e Ingledew, 1990). El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia de la concentración de nitrógeno en la velocidad de crecimiento del consorcio B, asumiendo que este se trataba de un solo tipo de microorganismo con reacciones específicas. En este sentido, se pudo conocer que a bajas concentraciones de nitrógeno se favorece el incremento en la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). Esto nos lleva a pensar que es posible que el nitrógeno a concentraciones moderadas afecte el desarrollo de los microorganismos y consecuentemente la producción de etanol.

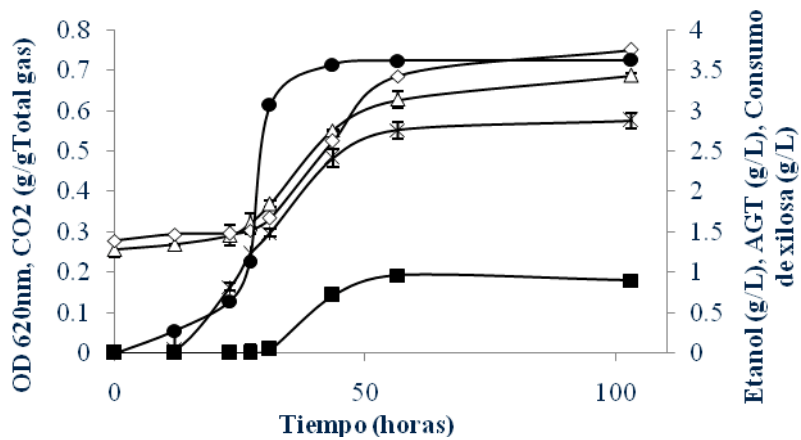
### Consorcio B - Condición A



### Consorcio B - Condición B



### Consorcio B - Condición C



**Figura 12. Crecimiento del consorcio B bajo tres condiciones de cultivo diferentes (dichas condiciones se detallan en la tabla 8). (■) Producción de etanol (g/L), (●) Consumo de xilosa (g/L), (◇) Producción de ácidos grasos totales, AGT (g/L), (Δ) Densidad óptica, OD a 620 nm de longitud de onda, (x) Producción de dióxido de carbono (mL/mL gas total).**

El monitoreo de este experimento también nos permitió conocer el perfil de sub-productos generados durante la fermentación, y determinar las proporciones de los diferentes sub-productos respecto al etanol, estableciendo de ésta manera un balance de masas (no mostrado), en el cual el etanol no es el principal producto de la fermentación cuando es utilizado el consorcio B.

Aunque el rendimiento en cuanto a la producción de etanol fue incrementado en casi un 50 % mediante la aplicación de éste diseño. El experimento permitió determinar otros parámetros que hacen de éste sistema de producción de etanol poco confiable, esto debido a:

- 1) La mayor producción de sub-productos respecto a la producción de etanol.
- 2) El tiempo de generación demasiado extenso, el cual afecta la fiabilidad del sistema si se refiere a términos de productividad volumétrica.
- 3) El consumo incompleto del substrato, que puede definirse como baja afinidad del consorcio por este substrato.
- 4) La elevada producción de dióxido de carbono como sub-producto mayoritario, hay que recordar que éste es el principal causante del calentamiento global (Andress, D., 2002).

Debido a estas razones el sistema de producción de etanol que se propone en el presente trabajo de investigación, necesitó de muchas otras optimizaciones posteriores, tratando de ésta manera corregir las grandes desventajas reflejadas por éste experimento.

### **VIII.3.2. Influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de etanol**

Debido a que el nitrógeno asimilable es uno de los componentes más importantes en el medio de fermentación reportado como un nutriente limitante en la fermentación etanólica (Thomas e Ingledew, 1990). El excesivo costo en la producción etanólica a escala industrial con la utilización de extracto de levadura como fuente de nitrógeno imposibilita su uso, debido a su excesivo costo. En la actualidad se busca otro tipo de suplementos alternativos y se ha demostrado que la urea es una de las mejores alternativas por su costo económico, su rápida asimilación, su elevada solubilidad y su disponibilidad (Jones e Ingledew, 1990).

Después de la optimización realizada con el fin de hallar la concentración ideal de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo y debido a los resultados obtenidos en el anterior experimento, se planteó la posibilidad de utilizar urea como fuente alternativa de nitrógeno, con el objetivo fundamental de reducir los costos de producción e incrementar la eficiencia del proceso. En este sentido, un estudio de comparación fue realizado, utilizando las dos fuentes de nitrógeno propuestas a la concentración ideal revelada por el experimento anterior.

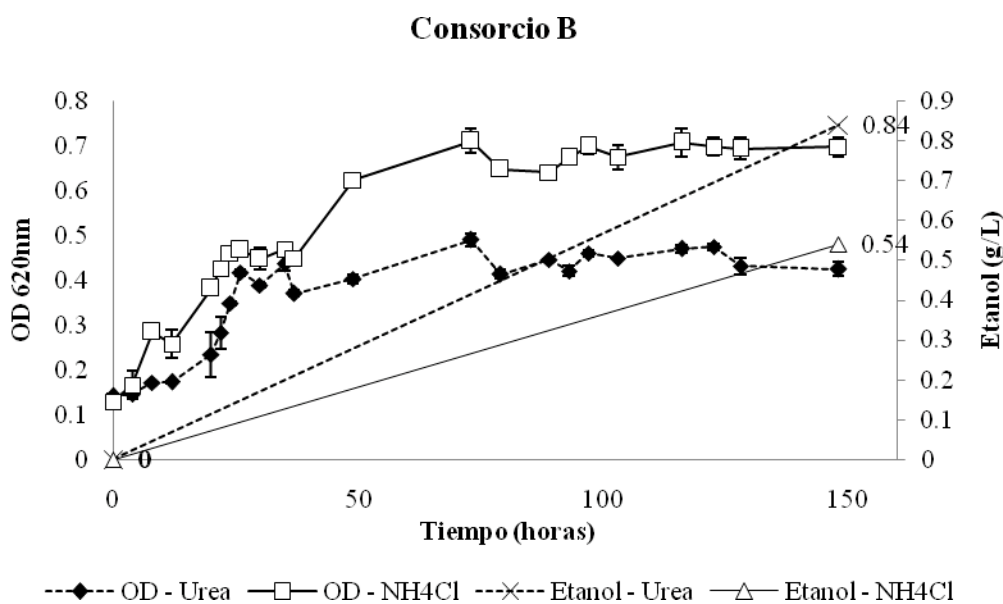
Una concentración de 4 g/L de  $\alpha$ -D xilosa fue utilizada como única fuente de carbono en medio mineral anaeróbico para medir el incremento de la densidad óptica como factor indicador de crecimiento, la

producción inicial y final de etanol y dióxido de carbono. Las características de éste experimento se detallan en la tabla 13.

**Tabla 13. Parámetros metabólicos determinados cuando el consorcio B es cultivado en medio mineral anaeróbico suplementado con D-xilosa como fuente de carbono y cloruro de amonio o urea como fuente de nitrógeno a pH neutro y 60°C de temperatura.**

Características	NH <sub>4</sub> Cl (2 g/L)	Urea (1.1 g/L)
Proporción C :N (g :g)	1C: 0.32N	1C: 0.32N
Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.042	0.037
Tiempo de generación (h)	16.50	18.73
Etanol producido (g/L)	0.54	0.84
Turbidez del medio	Alta	Baja
Dióxido de carbono (mL/mL gas total)	0.57	0.47

Estudios con la utilización de cepas puras anaerobias productoras de etanol confirman el bajo incremento de la densidad celular en el tiempo (Larsen , L., *et al.* 1997), esto confirma los valores de densidad óptica menores a 1, mostrados en la figura 13.



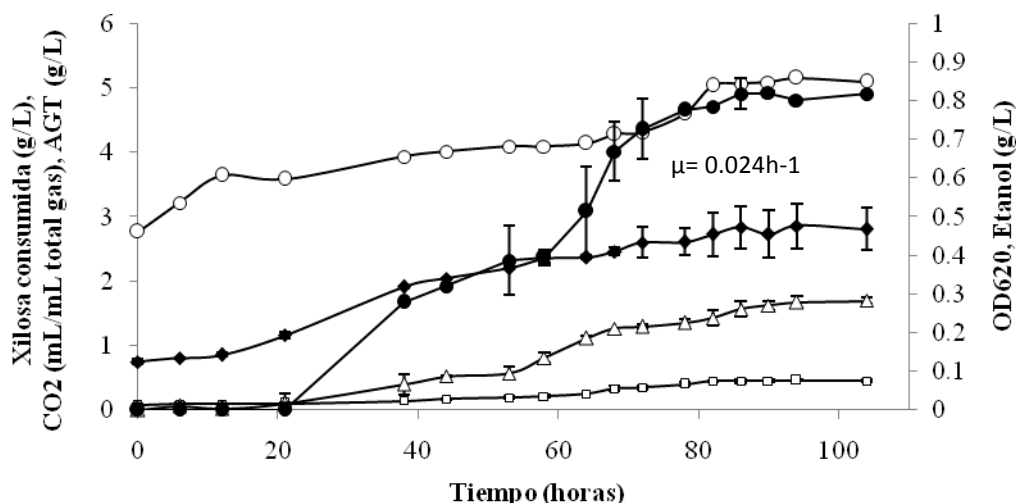
**Figura 13. Incremento de la densidad óptica en el tiempo y producción de etanol del consorcio B cuando cloruro de amonio y urea son utilizados como fuente de nitrógeno**

Como se observa en la tabla y figura anteriores, la utilización de urea como fuente de nitrógeno favorece la producción de etanol y limita la producción de dióxido de carbono y biomasa.

### VIII.3.2.1. Balance de masas de los productos de fermentación

Con las condiciones de cultivo hasta ahora establecidas, se procedió a realizar un balance de masas respecto a los sub-productos de la fermentación cuando  $\alpha$ -D xilosa es utilizada como sustrato.

La figura 14 muestra el comportamiento en cuanto a formación de productos, consumo de sustrato y crecimiento del consorcio B, la cual aporta valiosos datos para realizar el balance de masas.



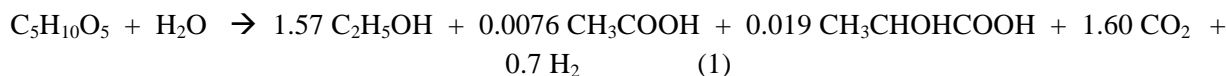
**Figura 14.** Crecimiento del consorcio B. (●) Producción de etanol (g/L), (Δ) Consumo de xilosa (g/L), (○) Producción de ácidos grasos totales, AGT (g/L), (◆) Densidad óptica, OD a 620 nm, (□) Producción de dióxido de carbono (mL/mL gas total)

Todos los productos de fermentación fueron determinados así como los parámetros de crecimiento, rendimientos y cálculos de proporciones de etanol producido respecto a los otros subproductos, dichos datos se hallan resumidos en la tabla 14:

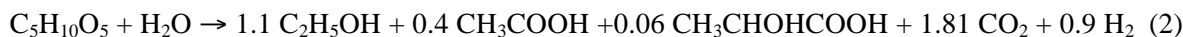
**Tabla 14. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B cuando es cultivado en 4g/L de  $\alpha$ - D xilosa como único sustrato.**

Parámetro	Fuente de carbono : 4 g/L de xilosa Fuente de nitrógeno: 1.1 g/L de urea
Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.024
Tiempo de generación (h)	28.8
Xilosa consumida (g/L)	1.7
Etanol producido (g/L)	0.82
Acetato (g/L)	0.46
Lactato (g/L)	1.71
Ácidos grasos totales (g/L)	2.33
CO <sub>2</sub> (mL/mL gas total)	0.36
Y p/s (g/g)	0.48
Y b/s (g/g)	0.08
Proporción Etanol: Acetato	1.78
Proporción Etanol: Lactato	0.48
Proporción Etanol: Ácidos grasos totales	0.35

El balance de masas de la fermentación anaeróbica fue calculado cuando 11.3 mM  $\alpha$ -D xilosa fueron consumidos por el consorcio, hasta que éste alcanza su fase estacionaria de crecimiento. Este balance es descrito a continuación (en cantidades molares):



En estudios previos realizados, el balance de masas con el uso de cepas anaerobias termófilas puras, tales como *Thermoanaerobacter mathranni* (Larsen, L., et al. 1997), se obtuvo el siguiente balance de masas cuando 13.3 mM  $\alpha$ -D xilosa fueron consumidos por esta bacteria (resultados en cantidades molares):



Como se observa el rendimiento (Y mol de etanol producido/mol de xilosa consumida) en la reacción (1) con el uso del consorcio B, es mayor comparado al de la reacción (2) producida por *Thermoanaerobacter mathranni* (Larsen L., et al. 1997). Esto confirmaría la posibilidad de utilizar un sistema de producción de etanol en el que se utilicen cultivos mixtos. En los cultivos mixtos existen relaciones complejas de simbiosis que favorecen la estabilidad del mismo, debido a la formación de gránulos y flóculos que combaten efectos tóxicos del medio y el ambiente en el que se encuentran. Sin embargo, existe también la posibilidad de competencia por un determinado sustrato y variación en cuanto a la formación de productos (van Lier, et al. 1993).

### VIII.3.3. Diseño factorial basado en la modificación de las concentraciones de xilosa y urea en el medio de cultivo y su efecto en la producción de etanol

El diseño factorial introduce al análisis multivariante que permite encontrar la relación matemática que explica el comportamiento de la variable dependiente (Producción de etanol) a partir de la modificación de dos variables independientes (Concentración de xilosa y urea).

Para la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de etanol se realizaron 9 experimentos (diseño factorial  $3^2$ ) y se analizó el efecto de las variables independientes (fuente de nitrógeno y fuente de carbono) en la concentración de etanol (variable dependiente). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

En éste diseño se evaluó el efecto individual de cada una de las variables, así como el efecto de la interacción de ambas variables en la producción de etanol. Las características de los 9 experimentos realizados se detallan en la tabla 15.

**Tabla 15. Esquema del diseño factorial: Variables independientes (Urea g/L) y (Xilosa g/L), variable dependiente (Etanol g/L)**

Número de experimentos	Niveles		Proporción (g/g) C : N
	Urea	Xilosa	
1	1	1	2.6 : 1
2	1	0	1.7 : 1
3	1	-1	0.9 : 1
4	0	1	4.3 : 1
5	0	0	2.9 : 1
6	0	-1	1.4 : 1
7	-1	1	12.8 : 1
8	-1	0	8.5 : 1
9	-1	-1	4.2 : 1
Niveles	Concentración (g/L)	Concentración (g/L)	
-1	1	5	
0	3	10	
1	5	15	

En los 9 experimentos de éste diseño factorial se monitorearon: velocidades de crecimiento, producción de sub-productos, consumo de substratos, rendimientos de etanol respecto al substrato consumido (Yp/s), formación de biomasa respecto al substrato consumido (Y b/s) y etanol respecto a la producción de biomasa (Yp/b); proporciones de etanol respecto a los otros sub-productos también fueron determinados, todos estos parámetros se hallan detallados en la tabla 16:

**Tabla 16. Sumario de parámetros: productos finales de fermentación y sus proporciones, crecimiento microbiano, rendimientos producidos por el consorcio B en cada uno de los experimentos del diseño factorial**

Parámetros medidos	Número de experimento								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Velocidad crecimiento (h<sup>-1</sup>)</b>	No	No	No	0.06	0.02	No	<b>0.07</b>	0.06	0.1
<b>Tiempo de generación (h)</b>	No	No	No	10.66	34.66	No	<b>9.37</b>	11.36	6.93
<b>Xilosa consumida (g/L)</b>	0.16 (±0.07)	0.41 (±0.09)	0.14 (±0.07)	5.70 (± 0.32)	5.94 (± 0.73)	0.16 (± 0.11)	<b>5.05</b> (± <b>0.62</b> )	4.76 (± 0.12)	3.85 (± 0.35)
<b>Etanol producido (g/L)</b>	0	0	0	0.50 (± 0.05)	0.60 (± 0.01)	0	<b>0.75</b> (± <b>0.01</b> )	0.67 (± 0.01)	0.57 (± 0.02)
<b>Acetato (g/L)</b>	0	0	0	0.37 (± 0.04)	0.40 (± 0.02)	0	<b>0.54</b> (± <b>0.03</b> )	0.50 (± 0.06)	0.33 (± 0.03)
<b>Lactato (g/L)</b>	0	0	0	4.00 (± 0.01)	4.06 (± 0.08)	0	<b>2.56</b> (± <b>0.32</b> )	2.74 (± 0.01)	2.60 (± 0.12)
<b>CO2 (mL/mL Total gas)</b>	0	0	0	0.47 (± 0.03)	0.16 (± 0.25)	0	<b>0.44</b> (± <b>0.01</b> )	0.44 (± 0.01)	0.40 (± 0.02)

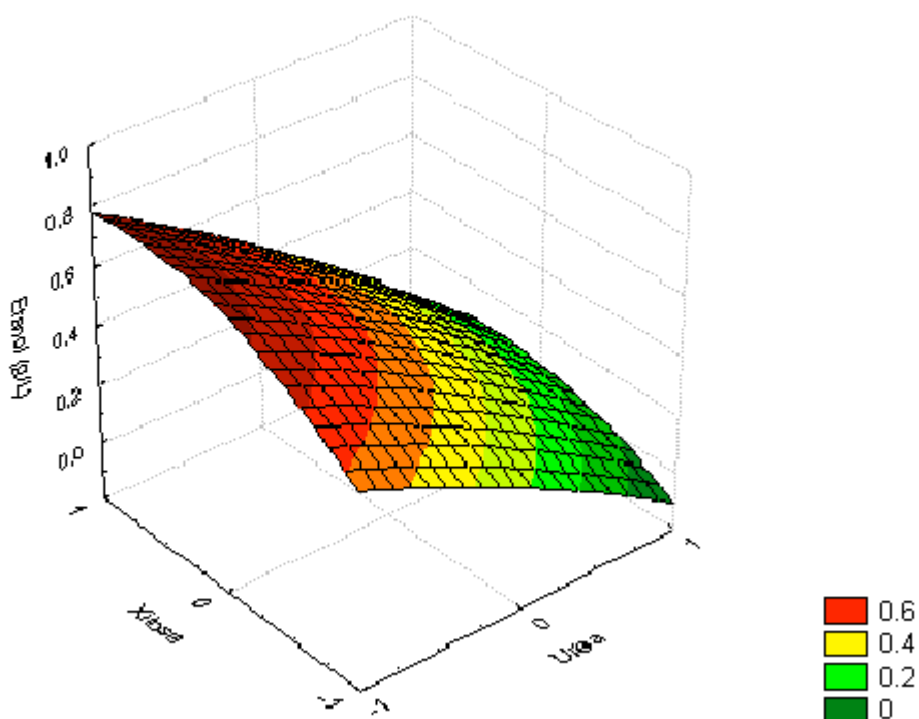


<b>Proporción</b>									
<b>Etanol :</b>	0	0	0	1.35	1.5	0	<b>1.39</b>	1.34	1.73
<b>Acetato</b>									
<b>Proporción</b>									
<b>Etanol:</b>	0	0	0	0.12	0.15	0	<b>0.29</b>	0.24	0.22
<b>Lactato</b>									
<b>Yp/s (g/g)</b>	0	0	0	0.09	0.10	0	<b>0.15</b>	0.14	0.15
<b>Yb/s (g/g)</b>	0	0	0	0.03	0.01	0	<b>0.04</b>	0.04	0.04
<b>Yp/b (g/g)</b>	0	0	0	2.94	2.37	0	<b>3.33</b>	3.49	3.68

En el figura 15 se observa la superficie de respuesta en cuanto a la producción de etanol, la cual muestra las mejores condiciones de cultivo para optimizar la producción de etanol en el sistema. El experimento número 7, es el que señala la tendencia para superar el rendimiento en cuanto a la producción de etanol.

Superficie de respuesta 3D - Diseño factorial - Producción de etanol

$$\text{Etanol (g/L)} = 0.4467 - 0.3317 * x + 0.1133 * y - 0.035 * x * x - 0.045 * x * y - 0.12 * y * y$$



**Figura 15. Superficie de respuesta del diseño factorial, variables independientes: xilosa (g/L) y urea (g/L), variable dependiente: Etanol (g/L)**

El tratamiento estadístico de los datos fue establecido mediante cálculos de promedios (medias) y sus respectivos desvíos estándar. Se realizó un análisis por regresión lineal múltiple.

### VIII.3.3.1. Análisis de regresión múltiple

Variable dependiente: Etanol (g/L) Regresión múltiple = 0.91 F = 14.91 (coeficiente de fisher)

R<sup>2</sup>= 0.83 (coeficiente de correlación) gl = 2,6 (grados de libertad)

Número de casos: 9 ajuste de R<sup>2</sup>= 0.78 p = 0.004

Error estándar estimado: 0.16

Intercepto: 0.34 Std.Error: 0.05 t(6) = 6.55 p = 0.0006

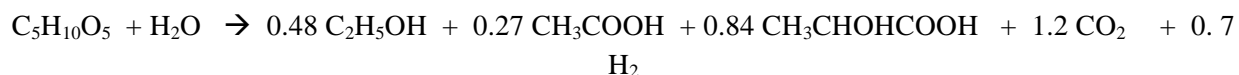
Urea beta= -0.86 Xilosa beta= 0.29

El análisis de regresión múltiple de ambas variables muestra que la variable altamente significativa y que afecta la producción de etanol es la concentración de urea ( $p < 0.004$ ).

N=9	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(6)	p-level
<b>Intercepto</b>			0.34	0.05	6.55	0.0006
<b>Urea</b>	-0.86	0.17	-0.33	0.06	-5.17	0.0020
<b>Xilosa</b>	0.29	0.17	0.11	0.06	1.76	0.1279

De los 9 experimentos, 7, 8 y 9, fueron los que permitieron establecer un balance de masas debido a que se registraron valores significantes de consumo de sustrato y formación de producto, dichos balances son detallados a continuación:

*Experimento 7.* 100mM de D- xilosa adicionados al medio de cultivo y 33.67 mM consumidos



*Experimento 8.* 66.67mM de D- xilosa adicionados al medio de cultivo y 31.76 mM consumidos



*Experimento 9.* 33.33mM de D- xilosa adicionados al medio de cultivo y 25.68 mM consumidos



La mejor condición que combina las variables independientes para la optimización de la producción de etanol estuvo dada por el experimento número 7. Sin embargo, el rendimiento en cuanto a la producción de etanol decreció significativamente (comparado a los otros experimentos de optimización mencionados anteriormente). Ésto es explicado por el hecho de trabajar con cultivos mixtos o consorcios que por la característica de estar compuestos por un número desconocido de géneros y/o especies bacterianas, la producción de diferentes compuestos varía enormemente de un cultivo a otro. Los resultados obtenidos en este último diseño factorial muestran que el sistema de producción de etanol propuesto carece aún de factibilidad para su desarrollo.

Por esta gran desventaja, se planteó el uso de cepas aisladas, en lugar de consorcios microbianos puesto que la respuesta de estos es influenciada por la carga bacteriana de los mismos. Es así que se procedió al aislamiento de las especies bacterianas que conforman el consorcio B.

Otra hipótesis es que probablemente el medio de cultivo no es el adecuado, ya que no sustenta el crecimiento bacteriano cuando repetidas transferencias son efectuadas. La mayor imposibilidad del uso de

consorcios bacterianos es el efecto de la variabilidad genética de la carga bacteriana que presentan (Ahring, B., *et al.* 1999).

#### **VIII.4. Aislamiento, selección y caracterización de cepas aisladas del consorcio B**

##### **VIII.4.1. Aislamiento y selección de cepas termófilas anaerobias**

El consorcio B fue sometido a aislamiento, las cepas bacterianas componentes del mismo fueron aisladas a 60 °C y pH neutro, utilizando las técnicas anaerobias tradicionales de aislamiento como la técnica de roll-tube (Hungate, R.E., 1989 y Bryant, M.P., 1972), cultivo bifásico y placas petri en ambiente anaerobio.

Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio mineral anaeróbico y se determinó la producción de etanol de cada una de ellas. Éste fue el parámetro utilizado para seleccionar una sola cepa y realizar posteriormente su caracterización.

Dos inóculos del mismo consorcio B cultivados durante los experimentos de optimización (urea como fuente de nitrógeno y el experimento 7 del diseño factorial realizado) fueron sometidos a aislamiento. Ocho cepas aisladas fueron recuperadas a partir de las técnicas de aislamiento de Roll-tube (Hungate *et al.*, 1989) y cultivo bifásico. La técnica de aislamiento en placas petri en ambiente anaerobio no permitió recuperar ninguna cepa aislada, por lo que fue descartada.

Las morfologías macro y microscópicas además de la habilidad de producir etanol de cada una de las cepas aisladas son detalladas a en la tabla 17.

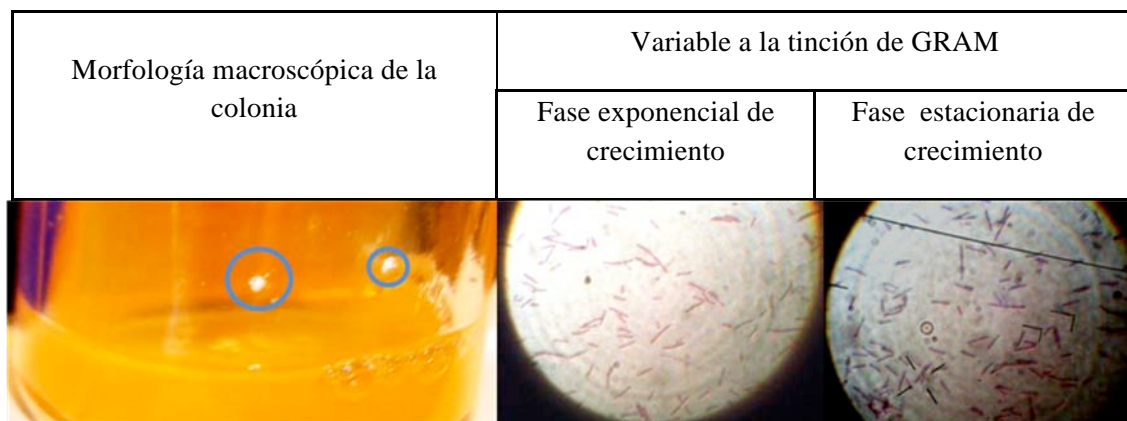
**Tabla 17. Características de las cepas aisladas provenientes del consorcio B.**

<b>Cepas aisladas</b>	<b>Técnica de aislamiento</b>	<b>Morfología macroscópica de las colonias</b>	<b>Morfología microscópica bacteriana</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Etanol (g/L)</b>
<b>1C</b>	Cultivo bifásico	Redondeada pero de bordes irregulares, color crema	Bacilos, algunos unidos en los polos	+	0.15 ( $\pm$ 0.02)
<b>23B</b>	Cultivo bifásico	Forma irregular, cremosa, brillante y de color blanco	Bacilos	+	0.14 ( $\pm$ 0.00)
<b>45B</b>	Cultivo bifásico	Forma redonda, convexa, mucosa y de color blanco	Bacilos largos en fase exponencial	Variable	0.16 ( $\pm$ 0.10)
<b>U2-1</b>	Hungate	Forma redonda, de color amarillo	Bacilos	Variable	0.10 ( $\pm$ 0.02)
<b>U2-3</b>	Hungate	Forma estrellada, de color blanco	Coco bacilares	Variable	0.09 ( $\pm$ 0.03)
<b>U2-4</b>	Hungate	Forma irregular e incolora	Bacilos	Variable	0.11 ( $\pm$ 0.02)
<b>U2-5</b>	Hungate	Forma irregular e incolora	Bacilos	Variable	0.11 ( $\pm$ 0.01)
<b>U2C</b>	Hungate	Forma redonda e incolora	Bacilos	Variable	0.12 ( $\pm$ 0.06)

De las 8 cepas aisladas la mejor productora de etanol fue seleccionada. La cepa 45B fue capaz de producir 0.16 g/L of etanol. Las otras cepas aisladas produjeron etanol en una rango de 0.09 - 0.15 g/L.

La recuperación de la cepa aislada fue dificultosa debido a que el cultivo previo estuvo constituido por medio mineral anaeróbico complejo con  $\alpha$ -D xilosa como sustrato y extracto de levadura como co-sustrato. Las siguientes fotografías resumen las características detalladas en la tabla anterior:

**Figura 16. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa aislada 45B, y morfología microscópica de la misma a diferentes etapas de crecimiento.**



#### VIII.4.2. Influencia de la privación de fuente de nitrógeno en la producción de etanol de la cepa 45B

En el último diseño factorial se demostró una influencia positiva de la menor concentración de nitrógeno en el medio. Sin embargo, los rendimientos obtenidos en cuanto a la producción de etanol, decrecieron respecto a anteriores experimentos. En base a esto, se realizó un diseño experimental en el que se redujo la concentración de urea en el medio, pero con respecto a la concentración utilizada en el experimento en el que se estudió la influencia del tipo de fuente de carbono en la producción de etanol, debido a que con este experimento se alcanzó un rendimiento mayor de producción de etanol. Es importante mencionar que el diseño factorial y el estudio de la influencia de tipo de fuente de nitrógeno descritos con anterioridad fueron basados en la utilización de consorcios microbianos. Sin embargo esta comparación es un parámetro útil para el experimento de privación de nitrógeno con la cepa aislada 45B (Tabla 18, 19 y Figura 17).

**Tabla 18. Diseño experimental de privación de nitrógeno cuando la cepa 45B es cultivada en xilosa como fuente de carbono**

Condición	Urea (g/L)	Xilosa (g/L)
-1	0.5	5
0	1	5
+1	1.5	5

Los resultados obtenidos a partir de este diseño experimental son detallados en la tabla 19.

**Tabla 19. Sumario de los parámetros metabólicos de la cepa 45B, productos de fermentación, velocidades de crecimiento, proporciones de etanol respecto a otros sub-productos.**

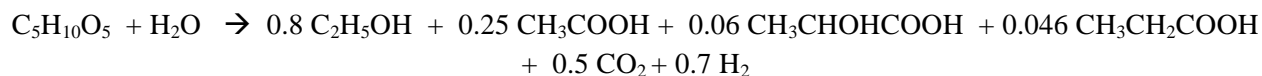
Parámetros	-1	0	1
Velocidad de crecimiento (h-1)	0.009	0.005	0.008
Tiempo de generación (h)	77	138.6	86.6
Yp/s (g/g)	0.24	0.38	0.22
Yb/s (g/g)	0.095	0.093	0.067
Yp/b (g/g)	2.54	4.05	3.33
Xilosa consumida (g/L)	0.7	0.4	0.9
Etanol (g/L)	0.18	0.15	0.20
Lactato (g/L)	0.027	0.021	0.062
Acetato (g/L)	0.075	0.0004	0.13
Propionato (g/L)	0.022	0.052	0.06
Dióxido de carbono (mL/mL Total gas)	0.063	0.043	0.063
Proporción Etanol: Lactato	6.7	7.1	3.2
Proporción Etanol: Acetato	2.4	375.0	1.5
Proporción Etanol: Propionato	8.2	2.9	3.3
Proporción Etanol: Ácidos grasos totales	1.5	2.0	0.8

La concentración de etanol se incrementó en comparación a la concentración de etanol producida cuando la cepa 45B fue recuperada en medio complejo (5 g/L de xilosa como fuente de carbono y 1 g/L de extracto de levadura como inductor), su incremento fue de 0.16 g/L a 0.2 g/L (condición +1), finalmente la concentración de otros sub-productos decreció, éste en comparación a los ensayos realizados con el consorcio B, entonces el etanol fue el producto mayoritario de fermentación.

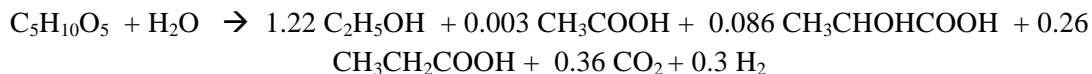
Se estableció el balance de masas cuando la cepa aislada 45B fue cultivada en medio mineral anaeróbico suplementado con 5 g/L de  $\alpha$ -D xilosa como fuente de carbono.

El balance de masas obtenido por el cultivo de la cepa 45B es detallado a continuación.

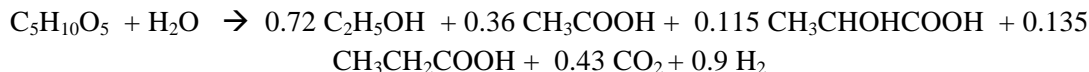
Condición -1. Xilosa fue consumida en una concentración de 4 mM



Condición 0. Xilosa fue consumida en una concentración de 2.67 mM

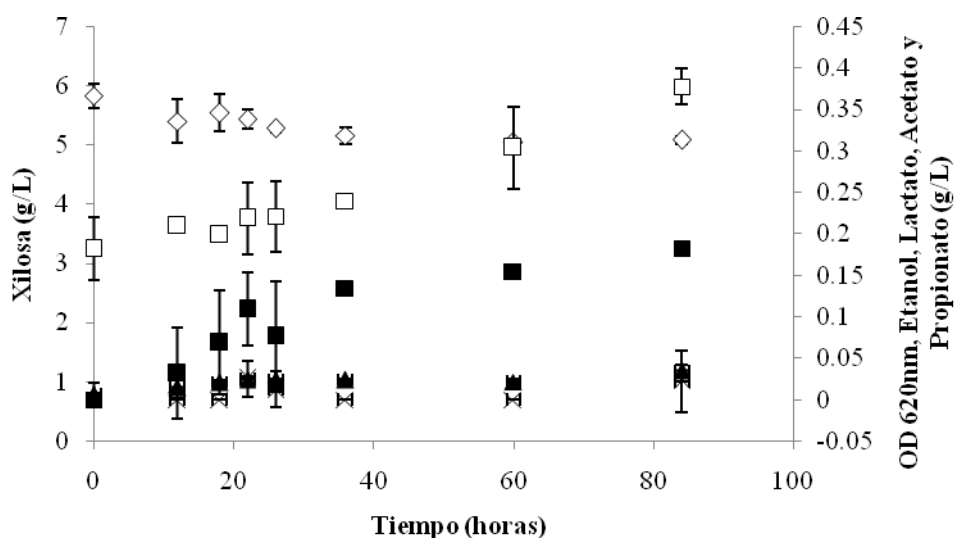


Condición +1. Xilosa fue consumida en una concentración de 6 mM



La concentración apropiada de nitrógeno fue encontrada en este experimento, sin embargo, sólo el 14% de  $\alpha$ -D xilosa fue consumida en el medio de cultivo, esto demuestra que la afinidad de la cepa 45B por el sustrato es baja y probablemente la tasa de consumo de sustrato cuando el consorcio fue cultivado se debió a la presencia de otros microorganismos diferentes de la cepa 45B; por esta razón se propuso el cultivo de la cepa 45B con otros sustratos diferentes a  $\alpha$ -D xilosa, para determinar de esta manera si la productividad de etanol podría ser incrementada.

La cinética de crecimiento bacteriano y la cinética de producción se detallan en figura 17.



**Figura 17.** Crecimiento de la cepa 45B, de la condición +1 del experimento de privación de nitrógeno (dichas condiciones se detallan en la tabla 15). (■) Producción de etanol (g/L), (◇) Consumo de xilosa (g/L), (▲) Producción de lactato (g/L), (x) Producción de propionato (g/L) y (□) Densidad óptica, OD a 620 nm.

#### VIII.4.3. Producción de etanol por la cepa aislada 45B a partir de la utilización de otros sustratos: $\alpha$ -D glucosa, $\alpha$ -D xilosa, D-celobiosa y D-sacarosa

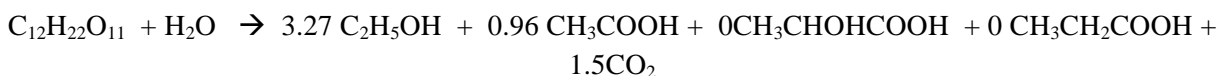
La cepa 45B fue cultivada en otras fuentes de carbono alternativas, tales como  $\alpha$ -D glucosa, D-sacarosa, D-celobiosa, con el fin de comparar las productividades de etanol, respecto al sustrato comúnmente utilizados ( $\alpha$ -D xilosa). La cinética de producción de etanol y otros productos del metabolismo fue monitoreada (Tabla 20), para posteriormente establecer el balance de masas respecto a la producción de etanol y determinar la eficiencia del proceso puesto a consideración.



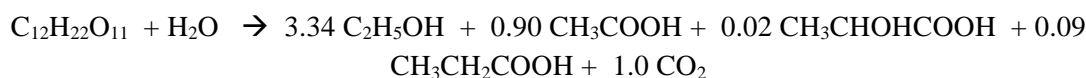
**Tabla 20. Sumario de los parámetros metabólicos de la cepa 45B cuando fue cultivada en diferentes sustratos: productos de la fermentación, velocidades de crecimiento, proporciones de etanol respecto a los sub-productos.**

Parámetros	D-Sacarosa	D-Celobiosa	α-D glucosa	α-D xilosa
<b>Velocidad de crecimiento (h-1)</b>	0.3	0.3	0.6	0.008
<b>Tiempo de generación (h)</b>	2.4	2.4	1.2	86.6
<b>Yp/s (g/g)</b>	0.44	0.45	0.32	0.71
<b>Yb/s (g/g)</b>	0.10	0.08	0.10	0.35
<b>Yp/b (g/g)</b>	4.56	5.44	3.08	2.06
<b>Substrato consumido (g/L)</b>	4.27	4.02	5.09	0.11
<b>Etanol (g/L)</b>	1.88	1.81	1.62	0.08
<b>Lactato (g/L)</b>	0	0.02	0.01	0.01
<b>Acetato (g/L)</b>	0.72	0.64	0.61	0.06
<b>Propionato (g/L)</b>	0	0.08	0.00	0.01
<b>Dióxido de carbono (mL/mL Total gas)</b>	0.49	0.49	0.48	0.05
<b>Proporción Etanol: Lactato</b>		98.32	262.00	6.49
<b>Proporción Etanol: Acetato</b>	2.62	2.83	2.64	1.23
<b>Proporción Etanol: Propionate</b>		22.12		7.46
<b>Proporción Etanol: Ácidos grasos totales</b>	2.62	2.45	2.62	0.91

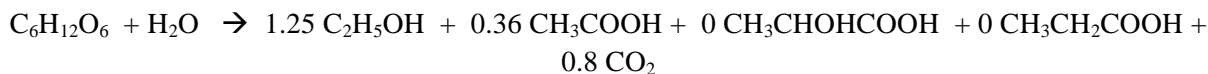
El balance de masas cuando la cepa 45B asimiló 12.47 mM de D (+)Sacarosa y alcanzó la fase estacionaria de crecimiento es descrito a continuación (en cantidades molares):



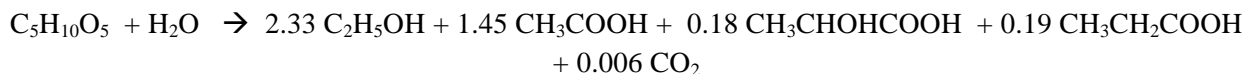
El balance de masas cuando la cepa 45B asimiló 11.74 mM de D(+)Celobiosa:



El balance de masas cuando la cepa 45B asimiló 28.27 mM de α-D Glucosa:



El balance de masas cuando la cepa 45B asimiló 0.37 mM D(+)-Xilosa:



En todos los experimentos con la cepa 45B, etanol fue el principal producto final de fermentación cuando sacarosa, celobiosa, glucosa y xilosa fueron utilizados como sustratos por la bacteria, con este experimento se demostró la capacidad de la cepa 45B de fermentar un amplio espectro de sustratos.

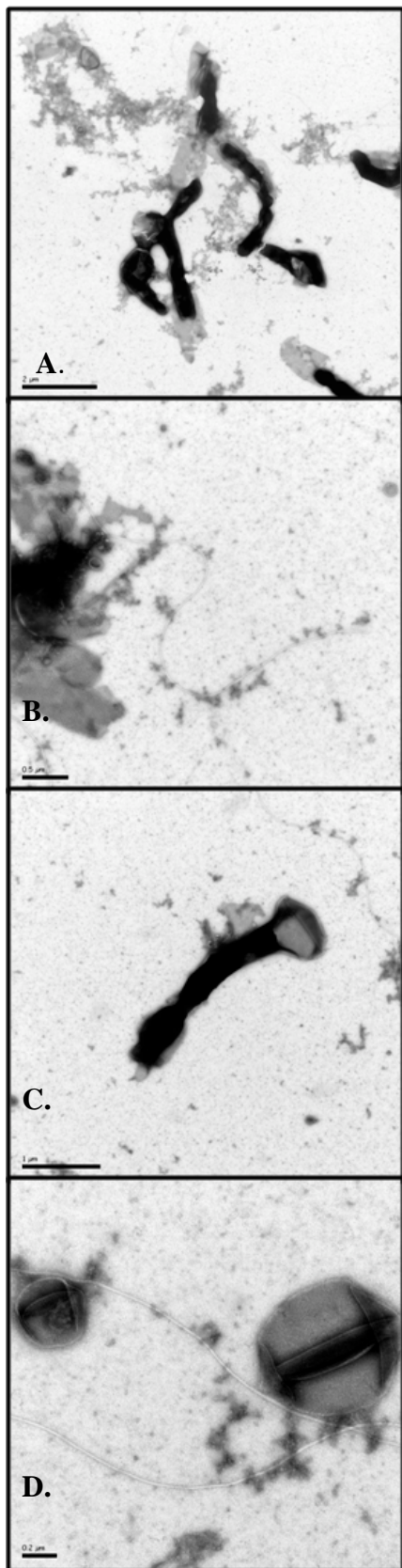
Estudios previos realizados con cepas puras termófilas anaerobias, reportaron un rendimiento teórico de aproximadamente 1.67 mol de etanol/mol de xilosa consumida (0.51 g de etanol/ g de xilosa) (Sommer, P., *et al.* 1999, Hinman, *et al.* 1989, Chung *et al.* 1985). Sin embargo, estos rendimientos fueron alcanzados cuando concentraciones de xilosa superiores a los 10 g/L fueron utilizadas. En este sentido, en el presente estudio rendimientos superiores, tales como 3.27 mol de etanol/mol de sacarosa consumida, 3.34 mol de etanol/mol de celobiosa consumida, 1.25 mol de etanol/ mol de glucosa consumida y 2.33 mol de etanol/ mol de xilosa consumida (0.44, 0.45, 0.32 y 0.71 g de etanol / g de sustrato, respectivamente) fueron alcanzados en el ensayo de consumo de sustratos cuando 5 g/L de los diferentes sustratos fueron suplementados en el medio de cultivo. Muchos microorganismos termófilos anaerobios, capaces de utilizar una variedad de carbohidratos constituyentes del material lignocelulósico producen etanol e hidrógeno (Koskinen *et al.* 2008; Mistry y Cooney, 1989). En la coproducción de etanol e hidrógeno, substanciales cantidades de ambos biocombustibles pueden ser obtenidos (Wu *et al.* 2007).

Cuando la concentración de  $\alpha$ -D xilosa como sustrato excedió los 10 g/L, el rendimiento en cuanto a producción de etanol decreció (Lynd, *et al.* 1990), esto podría ser probablemente explicado por la baja tolerancia de sustrato y/o producto (Sommer, P., *et al.*, 2004). Es así que esta característica debe ser considerada en futuros estudios de caracterización de la cepa 45B.

Cuando  $\alpha$ -D xilosa fue utilizada como único sustrato no fue consumida completamente y solo un 2% del total de xilosa adicionada al medio fue consumida por la cepa 45B. La velocidad de crecimiento fue muy baja, pero aún así, el etanol fue el principal producto de la fermentación, esta característica podría ser ventajosa dependiendo del sistema de producción de etanol utilizado, debido a que generalmente los microorganismos anaerobios tienen un crecimiento celular muy lento pero en sistemas mejor elaborados tales como el cultivo continuo con células inmovilizadas se podría corregir este inconveniente (Gil, G., *et al.* 1991).

#### VIII.4.4. Caracterización de la cepa 45B por microscopía electrónica

##### VIII.4.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)



Micrografías electrónicas de toda la célula fueron tomadas a partir de cultivos puros de la cepa 45B, cultivada durante 12 horas a 60 °C en medio mineral anaeróbico suplementado con celobiosa como fuente de carbono. El método usado para preparar las células para la examinación por microscopía electrónica fue descrito previamente por Patel *et al.*, 1985.

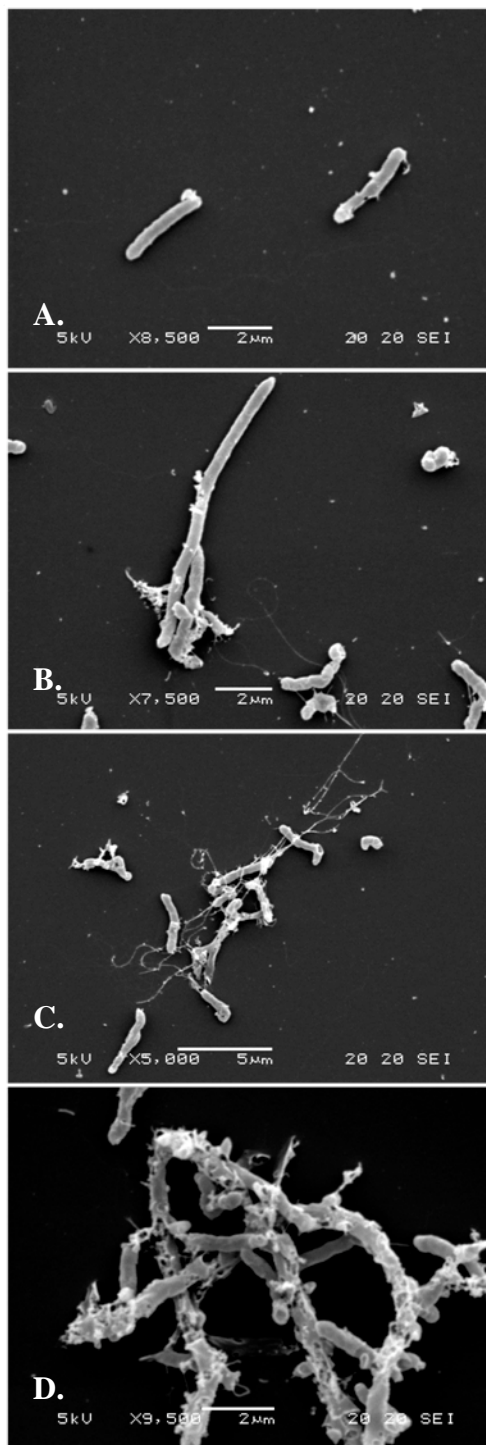
Las micrografías mostradas a continuación resumen las características morfológicas de la cepa 45B.

**Figura 18. Morfología microscópica de la cepa 45B mediante TEM.**

- A. La cepa 45B está constituido por bacterias de un tamaño aproximado de 2.5 x 0.5  $\mu\text{m}$ , de forma bacilar y por el grosor de la membrana, se asume que son microorganismos positivos a la tinción Gram. También se observó cúmulos de bacterias, embebida en una matriz extracelular, posiblemente secretadas por ellas mismas, para protegerse de las condiciones desfavorables después del proceso fermentativo o durante la fermentación a temperatura extrema (60 °C). Otra característica importante fue la posible presencia de cuerpos de inclusión.
- B. Entre otras características, la microscopía electrónica nos permitió visualizar la presencia de apéndices, algunas de las bacterias poseen flagelos monótricos que superan los 5  $\mu\text{m}$  de longitud.
- C. y D. Se pudo apreciar tambien la presencia de otros cuerpos, probablemente esporas. El óbstaculo de esta hipótesis es la dimensión variable de las mismas (desde 0.2 a 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente).

#### VIII.4.4.2. Microscopía electrónica de escaneo (SEM)

Micrografías electrónicas de las células de la cepa 45B fueron observadas cuando el cultivo alcanzó su fase tardía estacionaria. Algunas características interesantes encontradas durante la observación de las muestras son descritas a continuación:



**Figura 19. Morfología microscópica de la cepa 45B mediante SEM.**

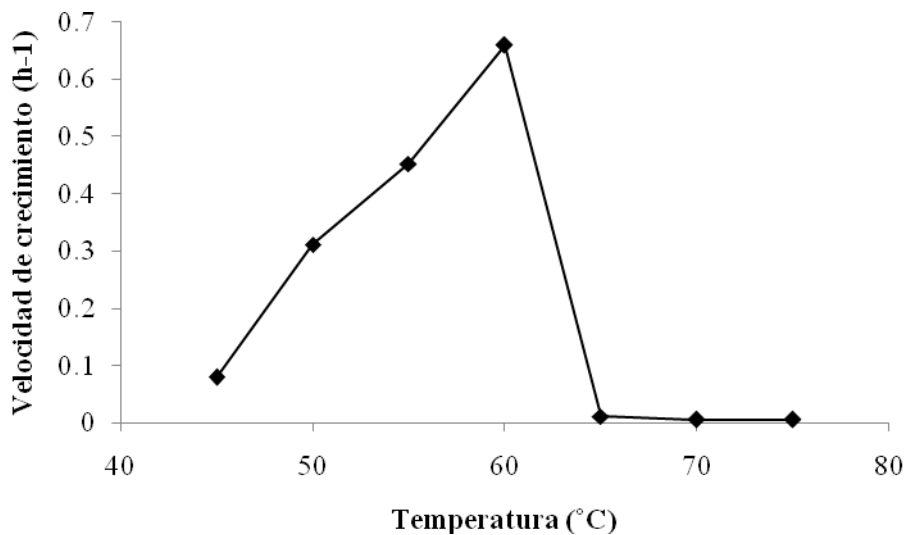
- A. Mediante la microscopía electrónica de escaneo se confirman las dimensiones de la célula bacteriana descritas por el análisis de TEM ( $2.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ , aproximadamente). En la primera micrografía se observa la morfología bacteriana de característica bacilar. También se observa una refringencia en los polos celulares, esta es una característica de formación de esporas, ya que estas son refringentes por efecto de la luz.
- B. Durante la observación microscópica también se determinó la presencia de cúmulos celulares, y en algunos casos células que alcanzan aproximadamente una longitud de 3 veces su tamaño normal, esto pudo deberse a que se hallaban en proceso de división celular polar.
- C. Una característica importante de estos cúmulos celulares es la presencia de una matriz en la cual las células se hallan embebidas, conservando de esta manera agrupaciones estables. Se observó también la presencia de largos flagelos como apéndices celulares.
- D. A mayor resolución se pudo observar que las células agrupadas presentaron poros y/o perforaciones múltiples en toda la superficie celular. Probablemente dichas perforaciones son el resultado del tratamiento agresivo de las células para su observación por microscopía electrónica. Sin embargo ésta es sólo una hipótesis, debido a que no todas las células presentan esta característica sólo aquellas que se hallan agrupadas.

#### VIII.4.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa 45B

Se estableció un perfil de temperaturas durante el crecimiento de la cepa 45B, cuando ésta fue cultivada en medio mineral anaeróbico suplementado con 5 g/L de celobiosa. La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial a diferentes temperaturas fue determinada y es descrita en la tabla 21 y figura 20.

**Tabla 21. Perfil de temperaturas empleadas durante el crecimiento de la cepa 45B.**

Temperatura (°C)	Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (h)
45	0.079	8.77
50	0.311	2.23
55	0.452	1.53
60	0.491	1.41
65	0.011	63.01
70	0.005	138.63
75	0.005	138.63



**Figura 20. Perfil de temperaturas empleadas durante el crecimiento de la cepa 45B**

La cepa 45B alcanzó su velocidad máxima de crecimiento a 60 °C de temperatura, por lo que se la clasificó como una bacteria termófila moderada.

#### **VIII.4.6. Perfil metabólico de la cepa 45B**

El metabolismo fermentativo de la cepa 45B fue examinado empleando el test API 20A (BioMérieux, Francia). El test consistió de 20 micro-tubos usados para estudiar la fermentación de 20 substratos diferentes. Los resultados de utilización de substratos coadyuvaron a la caracterización del metabolismo bacteriano de la cepa 45B. Con este test se demostró una vez más la capacidad de la cepa 45B de fermentar un amplio espectro de substratos. El perfil de substratos utilizados es detallado en la tabla 22.

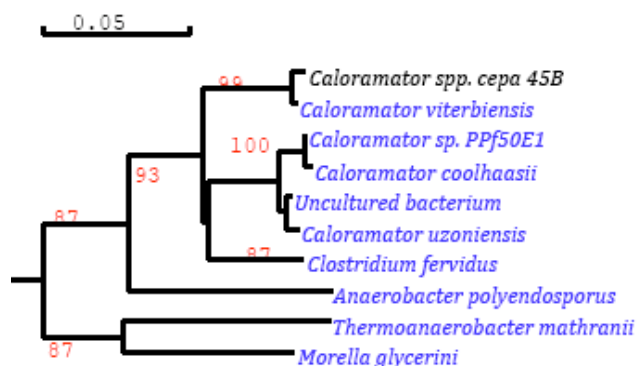
**Tabla 22. Perfil metabólico de la cepa 45B**

<b>Nro.</b>	<b>Substrato</b>	<b>Reacción</b>
<b>1</b>	Indol	-
<b>2</b>	Urea	+
<b>3</b>	D-Glucosa	+
<b>4</b>	D-Manitol	+
<b>5</b>	D-Lactosa	+
<b>6</b>	D-Sacarosa	+
<b>7</b>	D-Maltosa	+
<b>8</b>	Salicina	+
<b>9</b>	D-Xilosa	+
<b>10</b>	L-Arabinosa	+
<b>11</b>	Gelatina	+
<b>12</b>	Esculina	+
<b>13</b>	Glicerol	+
<b>14</b>	D-Celobiosa	+
<b>15</b>	D-Manosa	+
<b>16</b>	D-Melizitiosa	+
<b>17</b>	D-Rafinosa	+
<b>18</b>	D-Sorbitol	+
<b>19</b>	L-Ramnosa	+
<b>20</b>	D-Trehalosa	+

#### VIII.4.7. Identificación de la cepa 45B

La identificación de la cepa se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del gen del 16S ADN. La secuencia del ADN ribosómico 16S (1437bases) fue buscada en el GenBank (National Centre for Biotechnology Information; NCBI) usando la opción de BLAST avanzado para lograr una rápida comparación y alineamiento con secuencias homólogas de cepas tipificadas (Megablast).

La cepa aislada guarda un 99.1 % de homología con la bacteria identificada como *Caloramator viterbiensis* (Seyfried, M., et al. 2002). La posición de la cepa 45B en el árbol filogenético y su relación con otras cepas homólogas tipificadas se muestra en la figura 21.



**Figura 21. Árbol filogenético que determina la distancia filogenética de la cepa 45B con secuencias de cepas relacionadas.**

Para determinar que *Caloramator spp. cepa 45B* es una especie nueva, es necesario realizar un análisis de hibridación de ADN entre el ADN total de la cepa 45B y la especie más cercana en cuanto a homología (*Caloramator viterbiensis*), además es necesario determinar el contenido G+C del material genético de la cepa 45B.

Las características morfológicas macroscópicas de la colonias y microscópicas de la bacteria, así como las características fisiológicas y bioquímicas difieren de *Caloramator viterbiensis*. En este sentido, es posible que la bacteria en estudio *Caloramator spp. cepa 45B* sea una especie nueva, no reportada hasta el momento.

## **CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES**

Un total de 27 consorcios fueron cultivados para determinar su potencial como productores de etanol a partir de residuos agroindustriales, como paja de trigo y melaza de caña utilizados como sustratos, en condiciones anaerobias termófilas a 60 °C de temperatura.

De los 27 consorcios, 12 fueron seleccionados por su capacidad de producir etanol a concentraciones iguales o superiores a 0.25 g/L. De los 12 consorcios seleccionados, cinco consorcios A, B, E, J y B fueron los que demostraron tener los rendimientos más altos en cuanto a la producción de etanol, utilizando  $\alpha$ -D xilosa y  $\alpha$ -D glucosa como sustratos. En este sentido, el consorcio B fue seleccionado por su capacidad de producir etanol con un rendimiento de 0.4 g de etanol producido/ g de xilosa consumida. El consorcio B fue propuesto como sistema productor de etanol, sin embargo su metabolismo careció de estabilidad en cultivos subsecuentes, por lo cual se optimizaron condiciones de cultivo para favorecer la producción estable de etanol.

La cinética de crecimiento microbiano y otras características del metabolismo fermentativo anaerobio, fueron establecidas para el consorcio B, cuando la condición A (4 g/L de xilosa y 2 g/L cloruro de amonio) permitió la optimización del proceso. Por lo que se concluye que una proporción 1 Carbono: 0.32 Nitrógeno favorece la producción de etanol.

Después de la optimización realizada para encontrar la concentración ideal de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, se planteó la posibilidad de utilizar urea como fuente alternativa de nitrógeno, por lo que se concluye un favorecimiento de la producción de etanol cuando úrea es utilizada en comparación a la utilización de cloruro de amonio.

Otra optimización fue llevada a cabo mediante la aplicación de un diseño factorial ( $3^2$ ) y se analizó el efecto de las variables independientes (Fuente de nitrógeno y carbono) en la concentración de etanol (variable dependiente), se determinaron las concentraciones de carbono y nitrógeno, adecuadas para optimizar el proceso, y el mayor rendimiento en cuanto a producción de etanol estuvo dado por la condición número 7 (Proporción 12.8g C : 1g N). Además el análisis de regresión múltiple demostró que la variable altamente significativa y que afecta la producción de etanol es la concentración de urea ( $p < 0.004$ ). Sin embargo, se comprobó una vez más la inestabilidad metabólica del consorcio microbiano B, por lo cual se buscó la cepa bacteriana productora de etanol.

El consorcio B fue sometido a aislamiento y 8 cepas fueron recuperadas, se seleccionó la mejor cepa productora de etanol. La cepa 45B fue capaz de producir 0.16 g/L de etanol. Debido a los resultados obtenidos en el último diseño factorial, que mostró la influencia positiva de la menor concentración de nitrógeno en el medio, se realizó un diseño experimental de privación de nitrógeno. La concentración de etanol se incrementó en un 25% en comparación a la concentración de etanol producida cuando la cepa 45B fue recuperada (condición +1), pero el mejor rendimiento fue dado con la condición 0 (1g urea y 5g xilosa).



La cepa 45B fue cultivada en otras fuentes de carbono alternativas, tales como D-sacarosa, D-celobiosa,  $\alpha$ -D glucosa y  $\alpha$ -D xilosa y los rendimientos alcanzaron niveles superiores, como 3.27 mol de etanol/ mol de sacarosa consumida, 3.34 mol de etanol/ mol de celobiosa consumida, 1.25 mol de etanol/ mol de glucosa consumida y 2.33 mol de etanol/ mol de xilosa consumida (0.44, 0.45, 0.32 y 0.71 g de etanol/g de sustrato, respectivamente). Por lo cual se concluye que la cepa 45B además de poseer un amplio espectro de sustratos, produce etanol con rendimiento elevado, similar a aquellos sistemas industriales y convencionales de producción de etanol.

La cepa 45B fue caracterizada por su perfil metabólico de carbohidratos, microscopía electrónica (TEM y SEM) y perfil de temperaturas durante el crecimiento.

La identificación de la cepa 45B se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del gen del 16S ADN<sub>r</sub> y se determinó que la cepa aislada guarda un 99.1 % de homología con una bacteria caracterizada como *Caloramator viterbiensis* (Seyfried, M., *et al.*, 2002). Para una identificación completa del microorganismo es necesario realizar el análisis de hibridación de ADN entre el ADN total de la cepa 45B y la especie más cercana en cuanto a homología (*Caloramator viterbiensis*). Sin embargo, la identificación mediante la amplificación del gen 16S ADN<sub>r</sub> permitió determinar el género del microorganismo.

Por las características morfológicas macroscópicas de las colonias y microscópicas de las bacterias, además de su fisiología y bioquímica, se plantea la hipótesis de que la bacteria en estudio *Caloramator spp.* cepa 45B, sea una especie nueva no reportada, con potenciales características fisiológicas de producción de etanol a partir de la utilización de un amplio espectro de sustratos en condiciones anaerobias termófilas.

## CAPÍTULO X. REFERENCIAS

- Ahring B.K., Licht D., Schmidt A.S., Sommer, P., Thomsen A.B. 1999. Production of ethanol from wet oxidised wheat straw by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Biores Technol.* 68, 3–9
- Adams M. W. W., Perler F. B., Kelly R. M. 1995. Extremozymes: Exploring the limits de biocatalysis. *Bio/technology.* 13, 662–668
- Andress, D. 2002. Soil Carbon Changes for Bioenergy Crops (Prepared for U.S. Dept of Energy, David Andress and Associates, Kensington, MD)
- Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B.K. 1990. Effects of lipids on the anaerobic digestion of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl Microbiol Biotechnol.* 33, 469–472
- Avci, A., Donmez, S. 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. *Process Biochemistry.* 41, 984–989
- Beguin, P., y Aubert, J. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews.* 13(1), 25-58
- Ben-Bassat, A., Lamed, R. y Zeikus, J.G. 1981. *J. Bacteriol.* 146, 192–199
- Bisaria, V.S. 1991. Bioprocessing of agro-residue to glucose and chemicals. In: Martin AM. *Bioconversion of waste materials to industrial products.* 210–3
- Bothast, R.J., Saha, B.C. 1997. Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol.* 44, 261–86
- Bruce, W. 2008. Ethanol production using continuous multi-staged immobilized microbe bioreactors: a laboratory study. *Environmental Studies, Auburn University*
- Bryan, W.L. 1990. Solid-state fermentation of sugars in sweet sorghum. *Enzyme Microbiol Technol.* 12, 437–42
- Bryant, M. P. 1972. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1324–1328
- Cardona, C., Sanchez, J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology.* 98, 2415–2457
- Carrasco, C. 2008. Hydrolysis and Characterization of quinoa residues for ethanol production (Manuscript in preparation)
- Claassen, P., van Lier, J., Lopez, A., van Niel, E., Sijtsma L. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 741–755
- Cava, F., Hidalgo, A., Berenguer, J. 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles.* 13, 213–231
- Claus, D. 1992. A standardized Gram staining procedure. Technical Information Sheet No. 9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 8, 451-452
- Chung, I.S., Lee, Y.Y. 1985. Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzates of cellulose using high-

- level yeast inocula. *Biotechnol Bioeng.* 27(3), 308–315 Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. y Farrow, A.E. 1994. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826
- Cook, G.M. and Morgan, H.W. 1994. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 84–89
- Coughlan, M.P. 1992. *Bioresour. Technol.* 39, 107–115
- Coughlan, M.P., Ljungdahl, L.G. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. In: Aubert JP, Beguin P, Millet J, editors. *Biochemistry and genetics of cellulose degradation.* London: Academic Press. 11–30.
- Del Castillo Agudo, L. 1985. *Curr. Microbiol.* 12, 41–44
- De la Rosa, J., Mosso, R. 2002. Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. *Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España*
- Dien, S., Srienc, F. y Fuchs, J. 1994. Cell cycle regulation of the *Escherichia coli* nrd operon: requirement for a cis-acting upstream AT-rich sequence. *J Bacteriol.* 176(8), 2415–2426
- Dönmez, S. y Özcelik, F. 1992. *Enz. Microbial Technol.* 14, 413–416
- Duff, S.J.B., Murray, W.D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol.* 55, 1–33
- Fengel, D., Wegener, G. 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter: Berlin
- Franzén C.J., Lindén, G., Niklasson, C. 1994. A new method for studying microaerobic fermentations. II. An experimental investigation of xylose fermentation. *Biotechnol Bioeng* 44, 429–435
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(6), 618–628
- Ganesh, S., Fazlullah Khan, A.K., Suresh, M., Senthil, N. 1995. Character associated for ethanol yield in sweet sorghum. *Madras Agric J.* 82 (5), 361–3
- Ghasem, N., Habibollah, Y., Ku, S., Ku, I. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 92, 251–260
- Ghosh, P., Singh, A. 1993. *Adv. Appl. Microbiol.* 39, 295
- Ghosh, S. y Lall, V. 1988. Kinetics of anaerobic digestion of solid substrates. In: 5th International Symposium on Anaerobic Digestion. Bologna, Italy.
- Gomes, J., Steiner, W. 2004. Extremophiles and Extremozymes, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 223–235
- Gong, C.S., Maun, C.M., Tsao, G.T. 1981. Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus *Monilia* sp. *Biotechnol Lett.* 3, 77–82
- Hahn-Hägerdal, B., Lindén, T., Senac, T. y Skoog, K. 1991. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29, 131–144
- Hahn-Hägerdal, B., Hallborn, J., Jeppsson, H. 1993. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. *CAB International.* 231–290

- Herrero, A.A., Gomez, R.F. 1980. Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*: effect of growth temperature. *Appl Environ Microbiol.* 40, 571–577
- Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W. y Wyman, C.E. 1989. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21, 391–401
- Ho, N.W.Y., Chen, Z.D., Brainard, A.P. 1998. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol.* 64, 1852–9
- Hungate, R. *et al.*, 1989. A roll tube method for cultivation de strict anaerobes. *J. Norris y Ribbons, Methods in Microbiology.* 3B, 117-132
- Hungate, R.E. 1969. *Methods Microbiol.* 3B, 117–132
- Ingram L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 53, 2420–2425
- Ingram, L., Gomez, P., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., York, S.W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng.* 58(2,3), 204–214
- International Risk Governance Council (IRGC), Governing the risks and opportunities of bioenergy, IRGC's bioenergy Project, Geneva, Switzerland, 2007
- Gervais, P., Sarrette, M. 1990. Influence of age of mycelia and water activity on aroma production by *Trichoderma viride*. *J Ferment Bioeng.* 69, 46–50
- Gil, G. H., Jones, W. J., Tornabene, T. G. 1991. Continuous ethanol production in a two-stage, immobilized/suspended-cell bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 300-399
- Jarboe, L., Grabar, T., Yomano, L., Shanmugan, K., Ingram L., 2007. Development of Ethanologenic Bacteria, *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 108, 237–261
- Jeffries, T.W. 1999. Fermentation of d-xylose and cellobiose. In: Verachert H, De Mot R, editors. *Yeast-biotechnology and biocatalysis*. New York: Marcel Dekker
- Jeewon, L. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol.* 56, 1–24
- Jones, A., Ingledew, W. 1994a. Fuel ethanol production: appraisal of nitrogeneous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochem.* 29, 483–8
- Jones, R. P., Pamment, N., Greenfield, P. F. 1981. *Process Biochem.* 6 (4), 41
- Kannan, V. y Mutharasan, R. 1985. *Enz. Microbial Technol.* 7, 87–89
- Keim, C. 1983. Technology and economics of fermentation alcohol- an update. *Bioresour. Technol.* 82, 15–26
- Konings, W. 2006. Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90, 325–342
- Koskinen, P., Lay, C., Beck, S., Tolvanen, K., Kaksonen, A., Orlygsson, J., Lin, Y., Puhakka, J. 2008. Bioprospecting thermophilic microorganisms from Icelandic hot springs for hydrogen and ethanol production. *Energy Fuels.* 22, 134–140

- Kumar, S., Nussinov, R. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216–1233
- Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T., Kobayashi, S. 1990. Volatile compounds produced by fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation. *J Ferment. Bioeng.* 70, 169–172
- Larsen, L., Nielsen, P., Ahring, B.K. 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol.* 168, 114–9
- Lechetalier, M. Cock, T., Leen, R. 1952. Examination, characterization and distribution of extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2714-2724
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* 56, 1–24
- Lee, Y., Jain, M.K., Lee, C., Lowe, S.E. y Zeikus, J.G. 1993. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 41–51
- Lesage-Meessen, L., Labat, M., Asther, M. 2002. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* 38, 685-691
- Leticia, P., Miguel, C., Humberto, G. 1997. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol Lett.* 19(1), 45–47
- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69, 627–642
- Linder, M., Teeri, T. The roles and function of cellulose-binding domains. 1997. *J. Biotechnol.* 57, 15-28
- Lynd, L. 1989. Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria. Critical evaluation of potential and review. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 38, 1–52
- Lynd, L.R., Ahn, H., Anderson, G., Hill, P., Kersey, D.S., Klapatch, T. 1999. *Appl. Biochem. Biotech.* 28/29, 549–570
- Lynd, L.R. 1990. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25, 695–720
- Maiorella, B., Wilke, C. R., Blanch, H. W. 1981. *Adv. Biochem. Eng.* 20,43
- Matthew, H., Ashley, O., Brian, K., Alisa, E., Benjamin, J. 2005. Wine making 101. Available at <http://www.arches.uga.edu/~matthaas/strains.htm>
- MacMillan, D.J. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass, in, *Enzymatic conversión of biomass for fuels production.* Himmel,M., Baker, J. Overend, P. American Chemicals society. 292 – 324
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology.* 83, 37–46
- Mac El roy R.D.1974. Some comments on the evolution de extremophiles, *Biosystems,* 6 74–75
- McClung, L.S. 1935. *J. Bacteriol.* 29, 189–202
- Miller, S., Lazcano, A. 1995. The origin of life: did it occur at high temperatures?. *J. Mol. Evol.* 41, 689-692

- Millichip, R.J., Doelle, H.W. 1989. Large-scale ethanol production from Milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.* 24, 141–145
- Mistry, F.R., Cooney, C.L. 1989. Production of ethanol by *Clostridium thermosaccharolyticum*: I. Effect of cell recycle and environmental parameters. *Biotechnol Bioeng.* 34, 1295–1304
- Madigan, M., Martinko, M. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ed
- Miyamoto, K. 1997. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.htm#Contents>
- Ng TK, Ben-Bassat A, Zeikus JG. 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl Environ Microbiol* 41, 1337–1343
- Nunez, M. J. y Lema, J. M. 1987. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 642-651
- Naotaka, K., Zadrazil, F., Brunnert, H., 1986. Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulerulentum* nov. and *Dichomitus squalens* (Karst.) reid. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16, 45–51
- Ohara, H. 2003. Biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62, 474–477
- Olsson, L. y Hahn-Hägerdal, B. 1996. *Enz. Microbial Technol.* 18, 312–331
- Oura, E. 1977. *Process Biochem.* 12 (3), 19
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. 2000a. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol.* 74, 17–24
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. 2000b. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol.* 74, 25–33
- Panagiotou, G., Villas-Boas, S.G., Christakopoulos, P., Nielsen, J., Olsson, L. 2005. Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *J Biotechnol.* 115, 425–34
- Panda, T., Gowrishankar, B. 2005. Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 160-169
- Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., Mattiasson B. 2004. Volatile fatty acids production during anaerobic mesophilic digestion de solid potato waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 673 – 677
- Parisi, F. 1989. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 38, 53
- Pastore, G.M., Park, Y.K., Min, D.B. 1994. Production of a fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycol Res.* 98, 25–35
- Patel, B.K.C., Morgan, H.W. y Daniel, R.M. 1985. *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 141, 63-69
- Pavlostathis, S. y Giraldo-Gomez E. 1991. Kinetics of Anaerobics Treatment. *Wat. Science Tech.*, Vol. 24, No.8, 35-59

- Pereira, L. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova.* 26 (6) 863-871
- Quillaguamán, J. Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Alvarez, M.T., Delgado, O. 2004. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile bacterium isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 721-725
- Ravi, S.B., Biswas, P.K., Elangovam, M. 1997. Advances in the improvement of sorghum in India. In: Li Dajue, editor. *Proceedings of the First International Sweet Sorghum Conference.* 304–311
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212
- Roehr, M. 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications.* Wiley-VCH. ISBN: 3-527-30199-2
- Rothschild L. J., Manicinielli R. L., 2001. Life in extreme environments, *Nature*, 409, 1092–1101
- Saddler, J.N. y Chan, M.K. 1984. *Can. J. Microbiol.* 30, 212–220
- Saddler, J.N., Chan, M.K.H. 1982. Optimization of *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 16, 99–104
- Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 634-649
- Schiraldi, Ch., De Rosa, M. 2002. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology.* 20 (12)
- Seyfried, M., Lyon, D., Rainey, F.A., y Wiegel, J. 2002. *Caloramator viterbiensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1177-1184
- Singh, A., Kumar, P.K.R., Schugerl, K. 1992. Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 45, 29–55
- Skoog, K., Hahn-Hagerdal B. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microb.* 56, 3389–3394
- Sommer, P., Georgieva, T., Ahring, B.K. 2004. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose. *Biochem Soc Trans.* 32, 283–289
- Sonderegger, M., Schumperli, M., Sauer, U. 2004c. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 70(5), 2892–2897
- Sprenger G.A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett.* 145, 301–307
- Sree N., Sridhar M, Suresh K, *et al.* 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource technology.* 72.1, 43-46
- Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A., Nielsen, J. 1991. *Metabolic engineering: principles and methodologies.* Mexico: Academic Press. 45, 238-245

- Stetter, K. 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *Fems Microbiol. Rev.* 18, 149-158
- Sterner, R., Liebl, W. 2001. Thermophilic adaptation of proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 39–106
- Sugawara, E., Hashimoto, S., Sakurai, Y., Kobayashi, A. 1994. Formation by yeast of the HEMF (4-hydrpxy-2 (or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3 (2H)-furanone) aroma components in Miso with aging. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58, 1134–1135
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83, 1–11
- Thomas, K.C., Ingledew, W.M. 1990. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mash. *Appl Environ Microbiol.* 56, 2046–50
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev.* 41, 100–180
- Vallet, C., Said, R., Rabiller, C., Martin, M.L. 1996. Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the nature of the yeast. *Bioorg Chem.* 24, 319–330
- van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6, 213–218
- van Lier, J.B., Grole, K.C., Frijters, C.T., Stams, A.J.M., Lettinga, G. 1993. Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Appl Environ Microbiol.* 59, 1003–10011
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, J. 2007. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 108, 121–145
- Wahlbom, C.F., van Zyl, W.H., Jonsson, L.J., Hahn-Hagerdal, B., Otero, R.R. 2003. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagnesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. *FEMS Yeast Res.* 3(3), 319–326
- Ward, D. Ferrs, M., Nold, S. y Bateson, M. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 4, 1353-1370
- Weimer, P.J. 1985. *Arch. Microbiol.* 143, 130–136
- Wiegel, J. 1980. Formation of ethanol by bacteria. A pledge for use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experientia.* 36, 1434–1446
- Wiegel J., Ljungdahl L.G. 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 128, 343–348.
- Wiegel, J., Carreira, L.H., Mothershed, C.P., Ljungdahl, L.G. and Puls, J. 1983. Proceedings of Industrial Wood Energy Forum 83, Nashville, TN, Forest Products Society. 482–488
- Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. y Rawson, J.R. 1979. *J. Bacteriol.* 139, 800–810
- Wyman, C. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. *Bioresour Technol.* 50, 3–16



- Wu, J.F., Lastick, S.M., Updegraff, D.M. 1986. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. *Nature*. 321, 887–888
- Wu, S.Y., Hung, C.H., Lin, C.N., Chen, H.W, Lee, A.S., Chang, J.S. 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol Bioeng*. 93, 934–946
- Yamauchi, H., Akita, O., Obata, T., Amachi, T., Hara, S., Yoshizawa, K. 1989. Production and application of a fruity odor in a solidstate culture of *Neurospora sp.* using pregelatinized polish rice. *Agric Biol Chem*. 53, 2881–2888
- Yanase, M., Takata, H., Fujii, K., Takaha, T., Kuriki, T., 2005. Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of potato type L-glucan phosphorylase. *Appl. Environ. Microbiol*. 71 (9), 5433–5439
- Zacchi, G., Skoog, K. y Hahn-Hägerdal, B. 1988. *Biotechnol. Bioeng*. 32, 460–466
- Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 17–34
- Zhang, M., Eddy, C., Daenda, K., Finkelstein, M., Picataggio, S.K. 1995. Metabolic engineering of a pentose pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*. 267, 240–243
- Zeikus, J.G., Hegge, P.W. y Anderson, M.A. 1979. *Arch. Microbiol*. 122, 41–48
- Zeikus J.G., 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann Rev Microbiol*. 34, 423–464

## ANEXOS

### Composición de medios de cultivo:

#### Medio mineral anaeróbico (Angelidaki et al., 1990)

- 10mL, Solución A :  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 300g/L;  $\text{NaCl}$ , 10g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 5g/L
- 2mL, Solución B :  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 200g/L
- 1mL, Solución 2 :  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.5g/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 60mg/L; HCl 25%, 6.5mL;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 120mg/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 100mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25mg/L;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 25mg/L;  $\text{ZnCl}_2$ , 70mg/L;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15mg/L
- 1mL, Solución 3 :  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 3mg/L;  $\text{NaOH}$ , 0.5g/L
- 30mL, Solución 4 :  $\text{NaHCO}_3$ , 85g/L
- 5mL, Solución de agente reductor :  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 25g/L (Esterilización por filtración)
- 1mL, Solución de vitaminas DSM-141 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) : Biotina, 2.0mg/L; Acido fólico, 2.0mg/L; Piridoxina-HCl, 10.0mg/L; TiaminaHCl.2  $\text{H}_2\text{O}$ , 5.0mg/L; Riboflavina, 5.0mg/L; Acido Nicotínico, 5.0mg/L; D-Ca-pantotenato, 5.0mg/L; Vitamina B<sub>12</sub>, 0.1mg/L; Acido p-Amino benzoico, 5.0mg/L (Esterilización por filtración)
- H<sub>2</sub>O destilada csp 1000mL

#### Material lignocelulósico

El material lignocelulósico utilizado como sustrato fue paja de trigo y melaza de caña. Ambos fueron esterilizados por autoclave a 121°C, durante 1 hora evitando de esta manera toda posible contaminación por esporas. La cantidad utilizada de material lignocelulósico fue determinada de acuerdo a su contenido teórico de celulosa y hemicelulosa, ambas ajustadas a una concentración final de 5g/L en el medio de cultivo

Composición teórica del material lignocelulósico (McMillan, 1994):

Residuo	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Paja de trigo	33 – 40	20 - 25	15 – 20
Melaza de caña	41.80 % de Azucares totales		

Para preparar el medio de cultivo con una concentración aproximada:

5g/L de celulosa: 13.7g de paja de trigo deben ser pesados y suspendidos en 1L de medio mineral anaeróbico.

5g/L de hemicelulosas: 22.2g de paja de trigo deben ser pesados y suspendidos en 1L de medio mineral anaeróbico.

5g/L de Azucares totales: 11.9g de melaza de caña deben ser pesados y suspendidos en 1L de medio mineral anaeróbico.