

Taller: Introducción a la Producción de Celulasas a partir de Residuos Vegetales

Objetivo del taller

Que los aprendices, a partir de una lectura corta y contextualizada, identifiquen y comprendan las etapas de un proceso biotecnológico, reconozcan los componentes del medio de cultivo, los métodos de seguimiento del proceso, los equipos involucrados y manejen conceptos básicos relacionados con la producción de bioetanol.

El bioetanol es un biocombustible renovable que se obtiene a partir de materias primas ricas en azúcares o carbohidratos, y se utiliza principalmente como alternativa parcial a los combustibles fósiles. Su producción mediante procesos biotecnológicos permite aprovechar residuos agroindustriales y agrícolas, contribuyendo a la sostenibilidad y a la economía circular.

Los residuos como melaza, cáscaras de frutas, bagazo de caña, residuos de yuca o restos de cereales contienen azúcares fermentables o polisacáridos que pueden transformarse en etanol mediante la acción de microorganismos, comúnmente levaduras o bacterias específicas.

La conversión de celulosa en glucosa es un proceso de hidrólisis que descompone el polímero estructural de las plantas en su monómero básico, la glucosa ($C_6H_{12}O_6$). Se logra mediante enzimas (celulasas) o ácidos fuertes que rompen los enlaces β -1,4-glucosídicos, siendo una ruta fundamental para producir biocombustibles y materias primas químicas a partir de biomasa.

La hidrólisis enzimática se logra a través de microorganismos (hongos, bacterias) utilizan celulasas para romper la celulosa. Es un método eficiente que incluye el uso de endocelulasas para reducir la cristalinidad, exocelulasas para liberar celobiosa y β -glucosidasas para producir finalmente glucosa.

Esta glucosa pasa al proceso de fermentación, en el cual la levadura convierte a los azúcares en alcohol. La levadura más comúnmente utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000) porque puede producir etanol a una concentración de hasta 18% en el caldo de fermentación. *Saccharomyces* también está generalmente reconocida como inocua (GRAS, por sus siglas en inglés) como aditivo para alimentos de consumo humano (Lin y Tanaka, 2006). En la fermentación ideal, alrededor de 95% del azúcar se convierte a etanol y dióxido de carbono, 1% se convierte en materia celular de las levaduras y 4% en otros productos como el glicerol (Boulton et al., 1996). Las enzimas representan alrededor del 10% del costo de producción del etanol (Wingren et al., 2003).

Pasos de la Ruta Metabólica (Fermentación Alcohólica):

Glucólisis: La glucosa se descompone en dos moléculas de piruvato, produciendo 2ATP y reduciendo NAD^+ a $NADH$

Descarboxilación del Piruvato: El piruvato se convierte en acetaldehído y libera CO_2 mediante la enzima piruvato descarboxilasa.

Reducción del Acetaldehído: El acetaldehído se reduce a etanol, utilizando el $NADH$ generado en la glucólisis y regenerando NAD^+ para que la fermentación continúe, catalizado por la alcohol deshidrogenasa (ADH).

El proceso productivo inicia con la preparación del sustrato, el cual corresponde al residuo vegetal o agroindustrial que servirá como fuente de carbono. Dependiendo de su composición, el sustrato puede requerir un pretratamiento, como trituración, calentamiento o hidrólisis, para facilitar la liberación de azúcares fermentables. Se utilizará una enzima celulosa industrial para producir la hidrólisis enzimática y liberar la glucosa.

Una vez preparado el medio de cultivo, se realiza la esterilización, generalmente en una autoclave, con el objetivo de eliminar microorganismos contaminantes que puedan afectar la fermentación o disminuir el rendimiento en bioetanol.

De manera paralela, se prepara un preinóculo, cultivando el microorganismo fermentador en un medio líquido estéril bajo condiciones controladas de temperatura y pH, usualmente en una incubadora. Este preinóculo se utiliza para obtener un inóculo, que consiste en una mayor cantidad de células activas listas para iniciar el proceso fermentativo.

La fermentación alcohólica se lleva a cabo cuando el inóculo se adiciona al medio que contiene el sustrato. Durante esta etapa, el microorganismo transforma los azúcares en etanol y dióxido de carbono, proceso que puede realizarse en frascos de laboratorio o en un biorreactor, donde se controlan variables como temperatura, pH y tiempo de fermentación.

El seguimiento del proceso fermentativo incluye la medición de pH, la determinación del consumo de azúcares, el crecimiento microbiano mediante recuento celular, y la observación microscópica a través de la coloración de Gram, que permite verificar la pureza del cultivo. Estos parámetros son clave para evaluar la eficiencia del proceso.

Finalizada la fermentación, se procede a la separación de los sólidos y células microbianas del caldo fermentado, comúnmente mediante el uso de una centrífuga. El líquido obtenido contiene el bioetanol diluido, el cual requiere una etapa adicional de purificación, generalmente mediante destilación, para concentrar el alcohol.

Todas estas etapas integradas conforman un proceso biotecnológico, en el cual se emplean microorganismos, residuos como sustrato, condiciones controladas y equipos específicos para transformar materiales de bajo valor en un biocombustible renovable, contribuyendo al aprovechamiento sostenible de los recursos.

Responda las siguientes preguntas:

1. ¿Qué es un proceso biotecnológico?
2. Mencione brevemente para que se usan las siguientes etapas del proceso biotecnológico:
 - Producción preinóculo
 - Producción inóculo
 - Esterilización
 - Fermentación
 - Separación
 - Purificación
3. ¿Qué es un sustrato?

4. Realice una lista con algunos ejemplos de los sustratos que se mencionan para la obtención de bioetanol:

- Residuos agrícolas
- Residuos forestales
- Desechos agroindustriales

5. Determine para el caldo Sabouraud la fuente de carbono, nitrógeno, sales minerales, micronutrientes para una correcta obtención de las levaduras.

6. ¿Por qué es importante realizar el seguimiento a la fermentación?

7.Cuál es la finalidad para realizar el seguimiento de

- Recuento microbiano:
- pH:
- Concentración de azúcares:
- Coloración de Gram:

8. Explique brevemente el uso de los equipos para llevar a cabo el proceso biotecnológico

Equipo	Función
Autoclave	
Incubadora	
Biorreactor	
Centrífuga	
Espectrofotómetro	
Cabina de flujo laminar	

9. Subrayar en la lectura las etapas del proceso biotecnológico y elaborar un diagrama de flujo del proceso.

10. Definir con sus propias palabras:

- Sustrato
- Preinóculo e inóculo
- ¿Por qué se necesita agitar el sustrato una vez inoculado?
- ¿Por qué se usa inóculo en fase exponencial?
- En que relación v/v se debe agregar el inóculo a una fermentación?
- ¿En qué etapa se controla pH, temperatura y oxígeno?
- ¿Qué riesgo hay si no se esteriliza correctamente?
- ¿Cuándo se realiza una separación de las células, se debe continuar usando el precipitado (pellet) o el sobrenadante? Explique
- Identificar qué parámetros se pueden medir durante la fermentación.

Bibliografía

S. González Arranz, "Diseño de un nuevo material sostenible a partir de celulosa bacteriana de residuos orgánicos de producción local en un marco de economía circular," Tesis de Bachillerato, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad de Madrid, Madrid, 2021.

J. A. Toscano Avila, "Estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*," Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Tungurahua, 2019.

G. O. Jean, "Aplicación de microalgas para la remoción de nutrientes en efluentes agrícolas: Revisión de literatura," Tesis de Bachillerato, Universidad Zamorano, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, 2020.

J. L. C. Pacheco, S. K. M. Yee, M. L. C. Zentella y J. E. E. Marvan, "Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones," Revista Especializada En Ciencias Químico Biológicas, vol. 7, (1), mar., pp. 18-25, 2004.