

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ETANOL/SUSTRATO PARA DOS CEPAS
AISLADAS DEL AMBIENTE AGRÍCOLA COLOMBIANO EN UN MEDIO A
BASE DE XILOSA CON PRUEBA DE OXIDO-FERMENTACIÓN POSITIVA**

JOHN JAIRO MELO MONTES



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXCATAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2011**

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ETANOL/SUSTRATO PARA DOS CEPAS
AISLADAS DEL AMBIENTE AGRÍCOLA COLOMBIANO EN UN MEDIO A
BASE DE XILOSA CON PRUEBA DE OXIDO-FERMENTACIÓN POSITIVA**

JOHN JAIRO MELO MONTES

**Trabajo de trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo con mención en Genética**

Director

GODFREY IDROBO LIBREROS

B.Sc

Codirector

DELLY BRIGITTE TOSSE

Bacterióloga

Asesora

LUZ MARINA FLOREZ PARDO

Doctorada en ciencias químicas

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

John Jairo Melo Montes, 1977

Evaluación de la relación etanol/sustrato para dos cepas aisladas del ambiente agrícola colombiano en un medio a base de xilosa comercial con prueba de oxido-fermentación positiva

Palabras clave:

Etanol

Pentosas

Xilosa

Arabinosa

Glucosa

Oxidofermentación

Heterofermentador

Bacterias fermentadoras

Cepas promisorias

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de grado titulado “Evaluación de la relación etanol/sustrato para dos cepas aisladas del ambiente agrícola colombiano en un medio a base de xilosa comercial con prueba de oxido-fermentación positiva”, presentado por el estudiante John Jairo Melo Montes, para optar al título de biólogo con mención en genética, fue revisado por el jurado y calificado como:

Godfrey Idrobo Libreros

Delly Brigitt Tosse

Jurado

DEDICATORIA

A mi familia en especial a mi madre por su amor y apoyo incondicional.

A Godfrey Idrobo por comprensión, apoyo y gran respaldo.

A Angélica Castellanos por su ayuda y guianza.

Y a todos los que de alguna manera hicieron posible este trabajo

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mi papá Robert, mi mamá Lucy y mis hermanos Nini, Fran y Diana; mis abuelos Gentil y Elvia. Especialmente a mi mamá quien ha apoyado mi proceso de formación académica como también personal. Gracias a todos por su apoyo, amor y compañía durante los momentos buenos y los más difíciles de mi vida.

A la Universidad Autónoma de Occidente por proveer espacios de trabajo y reactivos.

A la Universidad del Valle, institución donde recibí la mayoría de mis conocimientos durante el desarrollo de mi carrera. A Delly Brigitte por su confianza, consejos y apoyo. Al laboratorio de biología por facilitarme implementos y espacios para el desarrollo de algunas actividades de mi proyecto.

Al grupo de investigación GRUBIOC, quienes permitieron que este trabajo fuera posible, en especial a mi director Godfrey Idrobo quien me ha apoyado y respaldado ante las dificultades durante mi formación académica y personal, por depositar su confianza en mí. A la profesora Luz Marina Flórez por su apoyo y confianza. A Angélica Castellanos por sus oportunos aportes académicos y personales, brindándome su sincera amistad. En general a todos los demás compañeros de laboratorio que estuvieron durante el desarrollo de este trabajo por su compañía y empatía.

Al Ministerio de Agricultura de Desarrollo Rural por financiar el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. ETANOL	5
2.2. XILOSA	5
2.3. ARABINOSA	6
2.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	6
2.4.1. Hongos y levaduras	6
2.4.2. Bacterias	7
2.5. METABOLISMO BACTERIANO DE LA XILOSA	8
2.5.1. Primer paso catabólico	8
2.5.2. Conversión de la D-xilulosa-5-fosfato	9
3. OBJETIVOS	12
3.1. OBJETIVO GENERAL	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3.3. HIPÓTESIS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. ÁREA DE ESTUDIO	13
4.2. ORGANISMOS DE ESTUDIO	13
4.2.1. Cultivo en medio sólido	13
4.2.2. Aislamiento y selección	15
4.2.3. Descripción microscópica	15

4.2.4.	Prueba de asimilación de los azúcares glucosa y arabinosa.....	16
4.2.5.	Prueba de oxido-fermentación (OF)	17
4.2.6.	Prueba de producción de gas (Microfermentaciones).....	18
4.2.7.	Evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas promisorias	19
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1.	AISLAMIENTOS.....	21
5.2.	MICROMORFOLOGÍA BACTERIANA	21
5.3.	SELECCIÓN DE OXIDO-FERMENTADORES	22
5.4.	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	24
6.1	PROPUESTA DE DISEÑO	30
6.	CONCLUSIONES	31
7.	GLOSARIO	32
8.	LITERATURA CITADA	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural de la xilosa.....	6
Figura 2. Ruta metabólica para la utilización de la xilosa, xilosa isomerasa (XI), xilulosa cinasa (XK).....	9
Figura 3. Ruta de fermentación anaeróbica de la xilosa, diferenciando (PPP) ruta de las pentosas fosfato y (PKP) ruta de la fosfoacetolasa, a) y b), c) y d) son alternativas para el mismo producto dependiendo del tipo de microorganismo.	11
Figura 4. Esquema del procesamiento del material vegetal para la siembra en cajas petri con medio sólido y xilosa (X).....	14
Figura 5. Criterios de descripción macroscópica de colonias.	15
Figura 6. Siembra por estrías.....	17
Figura 7. Tubo de prueba para oxido-fermentación con tapón de vaselina.	18
Figura 8. Frasco para crear ambiente de anaerobiosis.	19
Figura 9. Montaje de fermentación. Inóculo (a), montaje fase reproductiva y fermentativa (b), disposición para toma muestra de fermentación (c).	20
Figura 10. Número de aislamientos bacterianos obtenidos por cada fuente estudiada. De la fuente de Bosque nublado (suelo) se aisló una levadura incluida en el conteo.....	21
Figura 11. Diversidad micromorfológica bacteriana aislada para las fuentes estudiadas, compuesta por bacilos Gram positivos (B+) y negativos (B-), además de cocos Gram positivos (C+) y una levadura (L).....	22
Figura 12. Macromorfología de algunas de las cepas aisladas y micromorfología de algunas de las seleccionadas como promisorias, bacilos Gram positivos (AM20) y Gram negativos (AM71) y coco Gram positivo (AM67).	22
Figura 13. Diversidad metabólica las cepas aisladas de las fuentes estudiadas. OF, oxido-fermentadora; O, oxidadoras; No OF, No oxido-fermentadora. (1) Material en descomposición - pasto, (3) Cogollos, (4) Estiércol de vaca, (9) Material en descomposición – suelo, (15) Bosque nublado - suelo, (19) Suelo, (20) Suelo, (21) Fruto amarillo altamente degradado, (41) Residuos de caña de azúcar, suelo y material en descomposición.....	23

Figura 14. Pruebas de oxido-fermentación en medio Hugh & Leifson. Tubos sin y con tapón de vaselina., mostrando los resultados de OF positivos. El tubo número 20, correspondientes a la cepa AM20, muestra el desplazamiento de la vaselina por la producción de gas, además el medio permite visualizar la movilidad.	23
Figura 15. Valores obtenidos en la producción de etanol hasta las 72 horas de fermentación.	25
Figura 16. Valores mostrados hasta las 72 horas de fermentación, para consumo de xilosa y producción de etanol que llevan a establecimiento de sus valores Y(p/s).	26
Figura 17. Biomasa producida hasta las 52 horas de fermentación, muestra la baja producción de por parte de las cepas AM3 y AM58.	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Origen de muestras para la selección preliminar de los microorganismos a partir de materia orgánica	13
Tabla 2. Tabla resumen de tamizaje de cepas promisorias	24
Tabla 3. Valore de rendimiento $Y(p/s)$ para las cepas promisorias y valor teórico para los 40g/L de xilosa usados en la fermentación	27
Tabla 4. Tabla de diseño de experimentos aleatorizada, diseño factorial ajustado a central compuesto.....	31
Tabla 5. Tabla de diseño experimental.....	31

RESUMEN

La xilosa es el azúcar más abundante en la biosfera después de la glucosa. Junto con la glucosa son los azúcares principales en los residuos de lignocelulosa. Lo que convierte a estos residuos en una importante materia prima para la producción de biocombustibles de segunda generación. No obstante se requiere encontrar microorganismos capaces de metabolizar estos residuos y producir derivados que sean útiles como combustibles. En este orden de ideas el trópico tiene una alta diversidad de vida microbiana, pero, es el recurso natural menos conocido de la megadiversidad colombiana. Estimaciones pronostican que pueden llegar a existir entre 1 y 10 millones de especies de bacterias (IIRBAV, 2001). Algunas, como *Zymomonas mobilis* (Matiz *et al.* 2002), albergan una importante maquinaria fermentativa productora de etanol que en comparación a las levaduras pueden generar teóricamente más rendimiento (Najafpour *et al.* 2002). El presente trabajo se enfocó en obtener bacterias que produzcan etanol a partir de xilosa, que en principio, pudiesen ser útiles para fermentar hidrolizados de caña de azúcar. Se realizaron aislamientos en medio selectivos con xilosa como fuente de carbono, a partir de muestras de material vegetal con evidencia de degradación. Se aislaron 31 cepas bacterianas que además crecieron en medios de cultivo con glucosa y arabinosa a las que se les realizó pruebas en medio Hugh & Leifson para determinar el uso oxidativo/fermentativo de la xilosa, seleccionándose 11 cepas que resultaron positivas que además producen gas. Con aquellas tamizadas se realizaron fermentaciones para evaluar su capacidad productora de etanol obteniendo un rendimiento máximo $Y(p/s)$ de 0.15 en una bacteria Gram negativa, mostrando el 32.2% del valor teórico. Mediante el análisis de las secuencias de la región de ADN ribosomal 16S se encontró que las cepas AM3 y AM58, seleccionadas como promisoras en la producción etanol sin evidencia de consumo, pertenecen al phylum proteobacteria y la clase gammaproteobacteria.

1. INTRODUCCIÓN

El continuo incremento en el consumo de los combustibles fósiles y de los productos derivados del petróleo, para atender las necesidades energéticas y consumistas de la humanidad, ha generado problemas irreparables a nuestro planeta, como el efecto invernadero y la contaminación de aguas y suelos con productos no reciclables. Así mismo, la gran demanda y el agotamiento acelerado de estos, trae consigo problemas en la economía mundial ocasionados por los exagerados precios de los combustibles. Todo esto ha motivado la investigación de posibles alternativas de obtención a escala industrial que sean innovadoras y amigables con el medio ambiente.

Una alternativa para aliviar la dependencia a los recursos fósiles y en especial a los productos derivados del petróleo, se encuentran el etanol carburante. El etanol es una fuente de energía alternativa que proporciona una posible solución a la crisis energética, ventaja radica en que el CO₂ generado en su combustión constituye el alimento para las plantas que posteriormente serán convertidas en biocombustible. De esta manera no se compromete el ciclo natural del CO₂ en la atmósfera.

Apoyándose en la disponibilidad de los residuos de la producción agrícola y, en los demás residuos vegetales, se puede obtener este biocarburante por procesos fermentativos de microorganismos; investigaciones en el mundo han llevado al hallazgo de levaduras, bacterias y hongos, entre ellos *Pichia stipitis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* (Agbogbo & Cowar-Kelly 2008), por nombrar algunos, capaces de utilizar azúcares de cinco y/o seis carbonos como sustrato, fermentándolos hasta lograr la producción de etanol. Aunque en su mayoría son cepas que se han modificado genéticamente para lograr dicha producción, aún se debe continuar la búsqueda, ya que la robustez que requiere su uso a nivel industrial no se ha alcanzado satisfactoriamente. La producción de etanol, mediante procesos fermentativos, está como una de las principales opciones de la ingeniería de las vías metabólicas de los microorganismos; por lo tanto, se debe iniciar por el aislamiento e identificación de microorganismo presentes en ambientes inexplorados. Entre los adelantos de manipulación genética hasta el momento, se pueden

mentar los realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, a quien se le ha insertado un gen para mejorar el rendimiento de transformar un sustrato en etanol en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Lee *et al.* 2003), buscando aumentar la resistencia a concentraciones altas de etanol, la asimilación de los sustratos del carbono y aumentar el crecimiento en diversidad de azúcares.

Las bacterias que han sido reportadas con un buen potencial de fermentación de xilosa a etanol son principalmente anaerobias facultativas y tienen propiedades muy importantes como el tiempo corto de generación, corto periodo de fermentación y flexibilidad metabólica para fermentar xilosa entre otras pentosas y hexosas, sin embargo el principal problema que se ha encontrado en la fermentación por estas bacterias es la producción de subproductos metabólicos, tales como ácidos orgánicos (acético, láctico y butírico) y butanodiol junto con el etanol, lo que hace que la producción de etanol sea baja.

La iniciativa de encontrar microorganismo de hábitats propios de la región vallecaucana que fermenten xilosa produciendo etanol, nació en el proyecto de investigación “*Utilización de microorganismos para la producción de etanol a partir de azúcares obtenidos de residuos de caña*” en un convenio entre el grupo GRUBIOC (Grupo de investigación en biocombustibles) de la Universidad Autónoma de Occidente, la Universidad del Valle y Cenicaña (Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia), cuyo objetivo general es evaluar microorganismos colectados de diversas fuentes que sean potencialmente productores de etanol a partir de azúcares de cinco (C5, xilosa y arabinosa) y seis carbonos (C6, glucosa), provenientes de la hidrólisis de residuos de caña de azúcar.

Por tal razón, y adicional a que estos azúcares son los componentes más abundantes de la celulosa y la hemicelulosa (Sánchez 2008), se escogió trabajar con la xilosa considerando su mayor abundancia y como fuente de carbono para aislar bacterias nativas con capacidad de fermentarla y evaluando luego su producción de etanol. Para conseguir esto, se recolectaron muestras de materia orgánica de diferentes municipios y localidades de Colombia, de las cuales se hicieron siembras en medio sólido, escogiendo aquellos microorganismos que presentaron crecimiento rápido, se les evaluó su capacidad fermentativa mediante pruebas de oxido-fermentación, considerando promisorias aquellas con resultado positivo a las cuales, posteriormente, se les realizó pruebas de fermentación

en batch, analizando mediante la técnica de HPLC la producción de etanol. Con ello se realizó el planteamiento de un diseño factorial 2^2 rotacional central con réplica para la búsqueda de mejores condiciones en la producción de etanol para dos cepas seleccionadas, considerando los factores de agitación y temperatura.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ETANOL

El etanol conocido también como alcohol etílico, es un líquido incoloro, inflamable, de olor y sabor agradable, miscible en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos. Es un componente fundamental de las bebidas alcohólicas, se utiliza también como disolvente, limpiador, combustible, en la fabricación de acetaldehído, perfumes, pinturas, barnices y explosivos, y como intermedio en síntesis orgánica de diversos compuestos (ácido acético, éter, butadieno, etc.). Debido a que la molécula de etanol contiene oxígeno, ésta permite una combustión más completa en el motor de automotores, disminuyendo así las emisiones tóxicas a la atmósfera. (Eggeling 1994).

Se obtiene sintéticamente a partir del etileno por hidratación catalítica o por reacción de adición con ácido sulfúrico. También se produce etanol por fermentación de productos naturales ricos en hidratos de carbono tales como caña de azúcar, papa, yuca, maíz, arroz, trigo, banano, centeno y productos con altos contenidos de almidón.

2.2. XILOSA

Es un azúcar compuesto de cinco carbonos ($C_5H_{10}O_5$) o también llamado pentosa de forma genérica, por sus cinco carbonos que conforman su estructura (Figura 1). Es un producto intermediario del metabolismo de diversos organismos del reino animal y se encuentra en la fracción hemicelulósica de las plantas como la caña, maíz café y trigo, entre otros (Nápoles *et al.* 2006) . Es responsable de una variedad de procesos metabólicos importantes y es usado en estudios de metabolismo bacteriano, donde es un intermediario del metabolismo de la hemicelulosa (Saxena 2006). Su obtención a partir de residuos vegetales puede ser, entre otras, por hidrólisis ácida o por enzimática, y aunque la segunda es más lenta, ocurre en condiciones que excluyen la formación de productos tóxicos (Horton 2004).

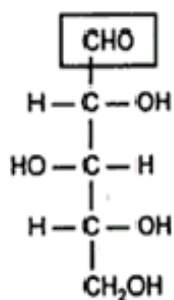


Figura 1. Fórmula estructural de la xilosa.

2.3. ARABINOSA

Es un azúcar compuesto de cinco carbonos (pentosa), que se encuentra en menor proporción con respecto a la D-xilosa, en la estructura celular vegetal (Arni *et al.* 2007), en otras palabras, aunque está presente de manera significativa en muchas hemicelulosas (Wyman & Davison 1996), según Nápoles *et al.* (2001) en la caña de azúcar no supera el 8.7% de la cantidad de xilosa,

2.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

En la última década se ha demostrado la utilización de pentosas y su bioconversión a etanol por diferentes cepas de hongos, levaduras y bacterias, generándose otros subproductos como polioles, ácidos acético y láctico a condiciones de pH y temperaturas diversas.

2.4.1. Hongos y levaduras

Los hongos filamentosos, desde hace unos 70 años aproximadamente, se conoce de algunos que presentan potencial para fermentar pentosas como la xilosa y que producen etanol, ellos generalmente pertenece a los géneros *Fusarium* (Singh & Kumar 1991), *Rizhopus* (Perlman 1950), *Monilia* (Gong *et al.* 1983), *Neurospora* (Deshpande *et al.* 1986) y *Paecilomyces* (Wu *et al.* 1986), sin embargo, algunos factores críticos como su largo tiempo de

generación y fermentación, baja tolerancia al sustrato y productos, adicional a la secreción de ácidos, hacen de ellos poco atractivos para obtención de etanol.

Por otro lado, las levaduras se han considerado los organismos más adecuados e interesantes para los investigadores en la producción de bioetanol desde los comienzos de la biorefinería. Esto debido a que son capaces de crecer en una variedad de azúcares con una alta tolerancia al sustrato y a etanol, sin embargo ellas lo hacen preferiblemente en hexosas, pero pocas cepas son capaces de utilizar pentosas y convertirlas a etanol (Dien *et al.* 2003, Hahn-Hagerdal *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2010). Actualmente, en diferentes partes del mundo, y teniendo en cuenta como principales exponentes a Brasil y a Estados Unidos, la tecnología de la producción de etanol utiliza cepas de levaduras, siendo el género *Saccharomyces* sp. el más ampliamente utilizado. Las cualidades que hacen de este microorganismo sea el más empleado, son su capacidad de convertir rápidamente los azúcares a etanol, alta tolerancia a etanol (más de 80 g/L), elevada osmotolerancia a variaciones de la temperatura y resistencia a un ambiente ácido (Jimenez & Benitez 1987), sin embargo presenta una deficiencia y es que no es capaz, de forma natural, fermentar la xilosa, aunque si la consume en presencia de D-ribosa y otros sustratos como lo reportó Van *et al.* (1993).

Pichia stipitis es también una levadura de interés, ya que tiene una capacidad superior a la de cualquier otra, hasta el momento, para fermentar xilosa produciendo etanol (Jeffries *et al.* 2007), y además es capaz de realizar fermentación tanto aeróbica como anaeróbica, en otras palabras fermentar con presencia o en ausencia de oxígeno, y no produce xilitol como producto no deseado en la fermentación de pentosas (Nigam 2001) como si lo producen *Candida polymorpha* y *Pichia miso* (Singh & Mishra 1995). Pero existe una restricción importante el proceso de industrialización de *P. stipitis* y es su baja tolerancia a etanol.

2.4.2. Bacterias

Fred *et al.* (1919) reportó una bacteria aislada del suelo *Lactobacillus pentoaceticus* que mostró la capacidad de fermentar xilosa y arabinosa, con producción de ácidos acético y

láctico, además de trazas de etanol y dióxido de carbono. Con el paso del tiempo muchas otras bacterias han sido descritas y comparadas con las levaduras, en la fermentación de celulosas y hemicelulosa, entre ellas se puede mencionar *Klebsiella oxytoca*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Thermus thermophilus*, *Bacteroides succinogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Aerobacter* sp., *Thermoanaerobacter aciditolerans* (Fred *et al.* 1922, Dehority 1965, Singh A. & Mishra 1995), pero un reducido número de manera natural son capaces de fermentar xilosa y llevarla a etanol bajo condiciones anaeróbicas. *Zymomonas mobilis* es una bacteria Gram negativa que ha sido descrita con mayores tasas específicas de consumo de azúcares y velocidades de producción de etanol que las levaduras, con una importante menor producción de biomasa y mayor tolerancia a etanol (Dient *et al.* 2003), pero tiene como limitante importante la capacidad silvestre de únicamente fermentar glucosa, fructosa y sacarosa, por lo que se han realizado diversos trabajos en los que se le introducen y expresan genes para fermentar xilosa y producir etanol, como lo ha realizado Zhang *et al.* (1995) de manera satisfactoria.

2.5. METABOLISMO BACTERIANO DE LA XILOSA

2.5.1. Primer paso catabólico

La bioconversión de pentosas como xilosa a etanol es una de las más importantes áreas de investigación de producción de biocarburantes a partir de procesos fermentativos, dado que la xilosa compone en un 80% la hemicelulosa de las plantas y de residuos como el bagazo de caña (Nápoles 2001) haciendo de ella el segundo azúcar más abundante en la naturaleza. El primero paso que realizan las bacterias puede ser desarrollado en dos rutas, por las cuales ellas pueden llevar la D-xilosa a D-xilulosa-5-fosfato:

2.5.1.1. Ruta de la xilosa isomerasa

Para llevar a cabo esta transformación metabólica, la mayoría de bacterias utilizan una enzima isomerasa (xilosa isomerasa), con la cual realizan una isomerización de la D-xilosa a D-xilulosa, que luego es fosforilada por una xilulosa cinasa produciendo D-xilulosa-5-fosfato (Lachke, 2002) (Figura 2).

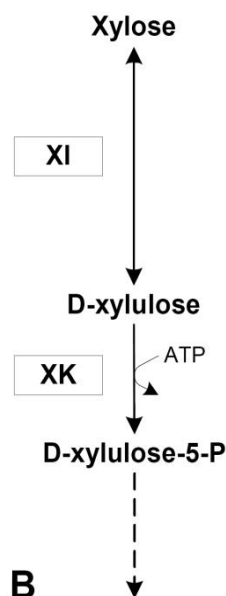


Figura 2. Ruta metabólica para la utilización de la xilosa, xilosa isomerasa (XI), xilulosa cinasa (XK).
(Fuente: Karhumaa *et al.* 2007)

2.5.1.2. Ruta de oxido-reducción

Existen unas pocas bacterias como por ejemplo en los géneros *Corinebacterium* y *Brevibacterium*, que emplean una ruta de oxido reducción en las que convierten inicialmente la xilosa a xilitol, utilizando la enzima xilosa deshidrogenasa dependiente de NADPH (forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato), para luego llevarlo a D-xilulosa-5-fosfato en presencia de la enzima pentitol deshidrogenasa (Mortlock & Wood 1964).

2.5.2. Conversión de la D-xilulosa-5-fosfato

En las bacterias el proceso de conversión de la D-xilulosa-5-fosfato puede desarrollarse por dos rutas, la ruta de las pentosas fosfato y la ruta de la fosfocetolasa.

2.5.2.1. Ruta de las pentosas fosfato

Esta ruta utiliza las enzimas transaldolasa y transcetolasa para convertir la D-xilulosa-5-fosfato a D-gliceraldehído-3-fosfato y D-fructosa-6-fosfato. El primer subproducto entra a

la vía glicolítica llevándolo a la formación de piruvato (Singh & Mishra 1995) que por ejemplo en *Zymomonas mobilis* es llevado a la producción de etanol utilizando las enzimas piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (Figura 3).

2.5.2.2. Ruta de la fosfocetolasa

En esta ruta es importante la actividad de la fosfocetolasa, una enzima que al comienzo se pensaba era específica para *Lactobacilli*, pero ha sido encontrada en varios tipos de bacterias, catalizando la conversión de D-xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato (GADP) y acetil-fosfato (acetil-P). El GADP entra a la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para formar lactato, mientras que el acetil-P toma la ruta para ser convertido a etanol (Mozzi *et al.* 2010) (Figura 3).

2.5.3. Otros productos de la fermentación

El piruvato puede llevar a otros productos como el etano o a diferentes a él según el tipo de vía que utilice la bacteria, por ejemplo si utiliza una vía homofermentativa que es la vía más simple de la fermentación, lleva a la producción de ácido láctico, aun que en algunos casos produce acetato, etanol y formiato en pequeñas cantidades, este proceso fermentativo también es denominado fermentación homoláctica. Si el piruvato se descarboxila, llevará a producir acetaldehído y CO₂, y el acetaldehído será reducido por NADH y alcohol deshidrogenasa para formar etanol, por tal razón a esta vía se le denomina heteroláctica. También el piruvato puede tomar una vía ácida mixta, donde formará ácido acético, etanol, ácido succínico y ácido fórmico) y dependerá del proceso que sufra la coenzima A del microorganismo (Koneman E. *et al.* 2006)

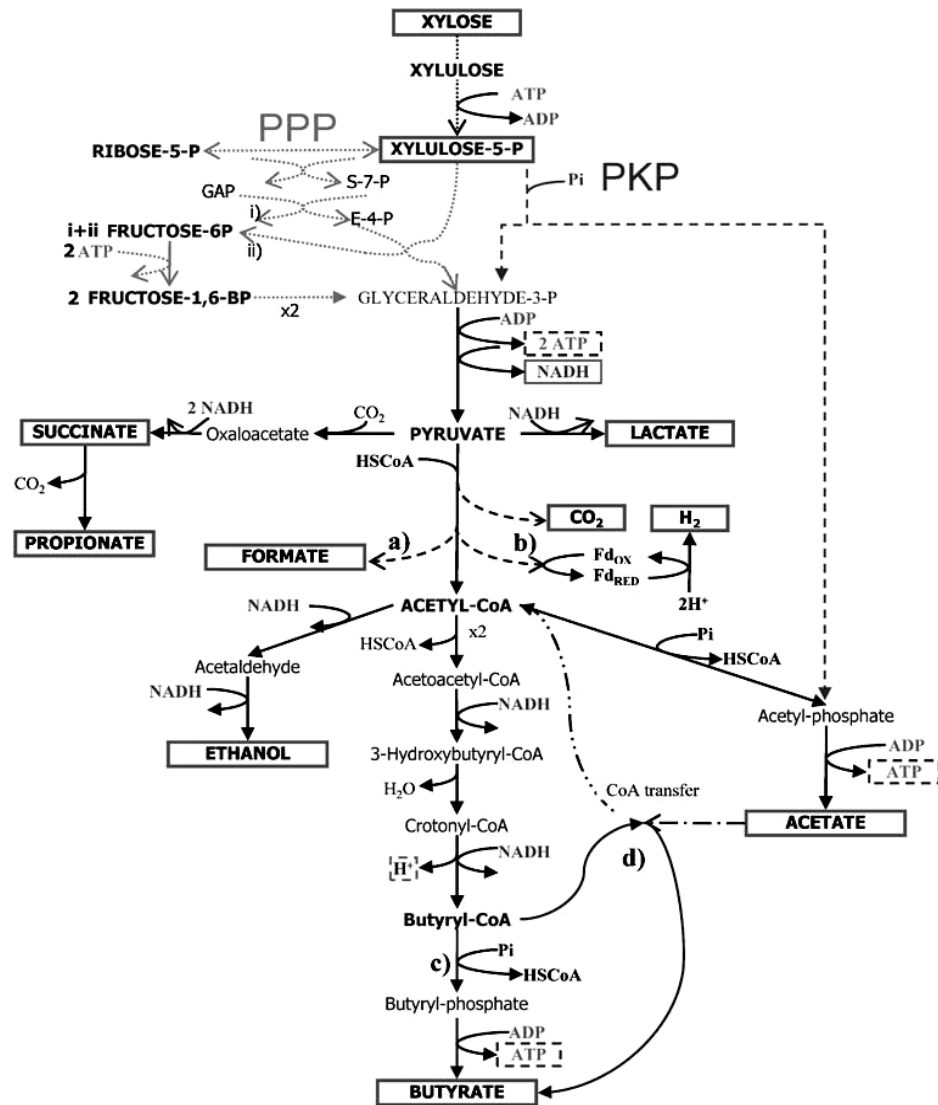


Figura 3. Ruta de fermentación anaeróbica de la xilosa, diferenciando (PPP) ruta de las pentosas fosfato y (PKP) ruta de la fosfoctolasa, a) y b), c) y d) son alternativas para el mismo producto dependiendo del tipo de microorganismo.
(Fuente: Temudo *et al.* 2009)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación etanol/sustrato de dos cepas aisladas de diversas fuentes con prueba de fermentación oxidativa positiva.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar cepas que utilicen xilosa y arabinosa como fuente de carbono y que tengan potencialidad para la producción de etanol
2. Identificación de dos cepas aisladas que realicen fermentación alcohólica
3. Cuantificar para las dos cepas aisladas la producción de alcohol y su relación en masa con el sustrato (xilosa y/o arabinosa y/o glucosa)

3.3. HIPÓTESIS

H_0 : No existe diferencia significativamente alta entre la relación etanol/sustrato en gramos entre las dos cepas aisladas

H_1 : Existe diferencia significativamente alta entre la relación etanol/sustrato en gramos entre las dos cepas aisladas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprendió las zonas boscosas del Valle del Cauca, Armenia e Ibagué, de donde fue recolectado material vegetal en descomposición, estiércol de vaca y frutos (Tabla 1.), cada muestra se rotuló, en bolsas previamente esterilizadas, con su procedencia y hora de recogida. La temperatura registrada en los momentos de recolecta estuvo entre 20 y 32 °C. Las muestras fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.

Tabla 1. Origen de muestras para la selección preliminar de los microorganismos a partir de materia orgánica

Localidad	Muestra	Nº Fuente
Vijes	Material en descomposición (suelo)	9
Vijes	Material en descomposición (pasto)	1
Calima-Darién	Suelo (Bosque nublado)	15
Calima-Darién	Suelo	19
Calima-Darién	Suelo	20
Calima-Darién	Fruto amarillo altamente degradado	21
Km 5 Vía a Cajamarca	Cogollos	3
Vereda Pradera (Cajamarca)	Estiércol de vaca	4
Vía Roza-Yumbo	Caña, suelo y material en descomposición	41

4.2. ORGANISMOS DE ESTUDIO

4.2.1. Cultivo en medio sólido

4.2.1.1. Medio YEAmo2 (Agar Extracto de Levadura modificado)

Para los aislamientos se utilizó un medio modificado en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma, que toma como base el YEA (Yeast Extract Agar) y tiene en

cuenta los requerimientos nutricionales de la mayoría de los microorganismos , pero siendo selectivo mediante la eliminación de otras fuentes de carbono diferentes a la xilosa y la arabinosa. Este medio garantiza el aporte de elementos traza, fundamentales para el funcionamiento de las rutas metabólicas implicadas en el transporte y metabolización de la xilosa y/o arabinosa, además de suplir los requerimientos esenciales de fuente de nitrógeno y fósforo. Su composición peso-volumen es 0.05% de peptona, 0.03% de extracto de levadura, 1,5% de agar-agar y xilosa al 0.5%; para su preparación la xilosa se esterilizó por filtración con membrana de 0,2 μ m en el 30% del agua para evitar el procesos de mutarrotación de este azúcar (Dzhundubaev 1965).

4.2.1.2. Procesamiento de muestras

Con el propósito de obtener bacterias de los materiales recolectados, con guantes y cuchillas estériles se cortó más de un gramo de las partes superficiales de la muestra. Esta muestra se homogenizó en un mortero con un pistilo, para luego pesar un gramo del material y disolverlo en 9 ml de agua peptonada 0.5% estéril. Después de homogenizar esta dilución se realizaron otras diluciones seriadas del orden de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} a partir de la inicial, las cuales nuevamente se homogenizaron por pipeteo. Estas muestras fueron procesadas realizando un aislamiento directo sobre medio sólido de 100 μ L de la dilución (Figura 4).

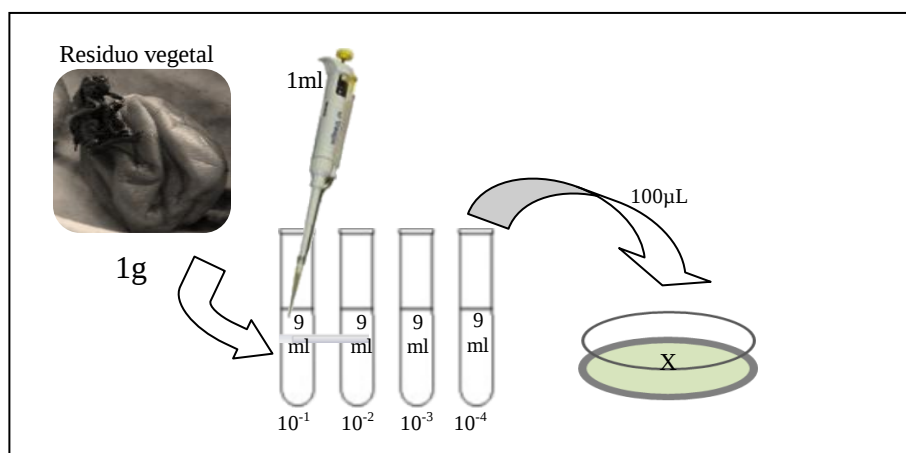


Figura 4. Esquema del procesamiento del material vegetal para la siembra en cajas petri con medio sólido y xilosa (X).

En cajas petri con medio YEAmo2 utilizando xilosa como fuente de carbono, fórmula que fue modificada a la previamente descrita por Vanegas y sus colaboradores (2004) se inocularon 100µl de las diluciones provenientes de cada muestra e incubadas a 27°C y 35°C por 24 horas (Binder, Modelo KB720, USA).

4.2.2. Aislamiento y selección

Se realizó observación de crecimiento a las 24 horas, escogiendo y separando por resolución macroscópica, de acuerdo a un patrón de crecimiento similar o morfotipo, que incluso es útil para considerar el índice de diversidad (Haldeman & Amy 1993). La morfología macroscópica fue categorizada siguiendo criterios de elevación, borde y color de la colonia entre otras características como se muestran en la Figura 5.

Criterios	Guía ilustrativa									
1. Forma	1.1 Puntiforme	1.2 Alargada	1.3 Circular	1.4 Irregular	1.5 Filamentosa	1.6 Rizoide	1.7 Plumiforme			
2. Tamaño	2.1 (X < 2 mm) pequeño		2.2 (2 < X < 3 mm) mediano			2.3 (3 < X < 5 mm) Grande				
3. Borde	3.1 Entera	3.2 Estrellada	3.3 Lobulada	3.4 Ondulada	3.5 Festoneada	3.6 Filamentosa				
4. Color	4.1 Blanca	4.2 Habana	4.3 Amarilla	4.4 Rosada	4.5 Roja	4.6 Transparente	4.7 Brillante	O: Opaca T:Traslucida		
5. Superficie	5.1 Lisa	5.2 Rugosa	5.3 Cerebriforme	5.4 En anillos concentricos						
6. Elevación	6.1 Convexa	6.2 Pulvinada	6.3 Umbonada	6.4 Elevada	6.5 Aplanada					
7. Consistencia	7.1 Dura/Cerosa	7.2 Viscosa	7.3 Membrana	7.4 Gelatinosa	7.5 Mucosa					

Figura 5. Criterios de descripción macroscópica de colonias.

4.2.3. Descripción microscópica

Luego de aproximadamente 15 pases sucesivos, separando patrones similares se realizó prueba de pureza, y tinción de Gram para describir micromorfológicamente. Para esta prueba se utilizó cristal violeta, lugol Gram, alcohol-acetona y safranina además de agua destilada y solución fisiológica al 0.9% (Leboffe 2002). Comprobada la pureza y realizada tinción de Gram, a cada aislado puro se le asignó un código alfanumérico conformado por las letras AM, donde A significa que fue aislado en la Universidad Autónoma de Occidente

y M que pertenece al proyecto de microorganismo al cual está adscrito este trabajo de investigación. Las pruebas Gram se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Bailey & Scott (2007) como se describe seguidamente:

En portaobjetos limpio y desengrasado se realizó lo siguiente para cada cepa

- Se preparó los frotis bacterianos a partir de cultivos sólidos con no más de 24 horas
- Se fijó con calor (mechero).
- Se agregó cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y
- Se dejó actuar 1 minuto.
- Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
- Se agregó lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejó actuar 1 minuto.
- Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordente.
- Se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente saliera incoloro.
- Se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente.
- Se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y dejó actuar 1 minuto.
- Se lavó con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
- Se dejó secar la preparación a temperatura ambiente.
- Se observó al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
- Se tomó registro fotográfico de los frotis con el objetivo de mayor aumento
- Se describió las características de los microorganismos observados e indicó como Gram positivos o negativos según su coloración

Las cepas aisladas y con sus nomenclatura asignada fueron cultivadas el caldo de cultivo, donde pasadas 24 horas de incubación se conservaron en crioviales con un 10% del volumen total en glicerol para ser almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización.

4.2.4. Prueba de asimilación de los azúcares glucosa y arabinosa

A los aislados se les probó su capacidad para crecer en un medio sólido con glucosa y otro con arabinosa como fuente de carbono, la siembra se realizó por estrías (Figura 6).

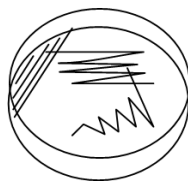


Figura 6. Siembra por estrías.

4.2.5. Prueba de oxido-fermentación (OF)

4.2.5.1. Medio Hugh & Leifson

Es un medio semisólido que contiene en volumen, importantes cantidades de peptona, específicamente un 0.2% que representa una baja cantidad que permitiendo una reducida formación de productos finales alcalinos a partir de la oxidación de aminoácidos; una cantidad de carbohidrato, 1% de xilosa, que eleva la producción de ácidos, haciendo el medio más sensible en su detección (Beck, 2002). Contiene fuentes de sales como 0.5% de NaCl, 0.03% de K_2HPO_4 , un indicador de pH ajustado a la basicidad del medio, el 0.003% de azul de bromotimol y un valor de 0.3% de agar – agar (Hugh & Leifson 1953) que permite la consistencia semisólida del medio.

4.2.5.2. Selección de oxido-fermentadoras

Se realizaron nuevos cultivos a partir de las réplicas recientes, para realizar la prueba de oxido-fermentación con cepas de 24 horas de crecimiento, y conocer cuáles de ellas fermentan xilosa. Se utilizó el medio propuesto por Hugh & Leifson (1953) con xilosa. La prueba se estandarizó siguiendo los criterios de Andrew (1976), principalmente en el paso de crear un medio anóxico para el crecimiento en tubos tapados, por lo que se empleó vaselina estéril para sellar el agar e impedir el paso de oxígeno hacia el cultivo (Figura 7). Está reportado por Andrew (1976) que haciendo la siembra de esta forma, el porcentaje de oxígeno que trasfunde hacia el medio es similar a usar un medio con aceite mineral burbujeado con nitrógeno gaseoso durante 18 horas, es decir que la vaselina se escogió por ser una opción más rápida y de alta confiabilidad para limitar el contacto con el oxígeno en los tubos de cultivo. Se incubó a 27°C y se tomaron los resultados hasta las 48 horas,

después de la siembra, teniendo en cuenta que el metabolismo de una bacteria puede seguir la vía oxidativa y/o fermentativa. En la primera, el aceptor final de electrones debe ser el oxígeno y por consiguiente el proceso es aeróbico, presentando además una baja acidez que puede ser apreciable en el medio Hugh & Leifson cuando este se torna de color amarillo en la superficie de contacto con el oxígeno. Por la otra vía, el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico y el proceso es anaerobio, originando mucha acidez en poco tiempo, de tal manera que el color amarillo se extiende por todo el medio en un tiempo máximo de 48 horas, estos cambios son apreciables gracias al azul de bromotimol.



Figura 7. Tubo de prueba para oxido-fermentación con tapón de vaselina.

4.2.6. Prueba de producción de gas (Microfermentaciones)

4.2.6.1. Medio de microfermentaciones

Se utilizó medio líquido YEAmo2 y xilosa al 5% como fuente de carbono en tubos de ensayo con tubo Durhan en el fondo. Este medio para las microfermentaciones fue suplementado con 0.0133% de sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), que se ha encontrado con efecto significativo en la producción de etanol en fermentaciones con levaduras (Palukurty *et al.* 2008).

4.2.6.2. Selección de productoras de gas

Ya que las cepas en un proceso metabólico de xilosa vía glucólisis pueden producir gases además de alcoholes y ácidos, se realizó una prueba para determinar la producción de gases que consistió en inocular con asa bacteriológica cada una de las cepas en un tubo de ensayo

con medio YEAmo2 suplementado con hierro y sellado completamente. Los tubos se incubaron simulando una jarra de anaerobiosis con capacidad de 2L, mediante un frasco de boca ancha, con tapa y sellado con parafilm. Generándole además una alta tensión de CO₂ y agotamiento de oxígeno mediante combustión (Figura 8). Las lecturas se realizaron a hasta las 48 horas estandarizando la presencia de gas en más de la mitad del tubo Durhan como positiva.



Figura 8. Frasco para crear ambiente de anaerobiosis.

4.2.7. Evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas promisorias

Las cepas que metabólicamente mostraron utilizar la xilosa, glucosa y arabinosa como fuente de carbono con prueba OF positiva y producción de gas, fueron catalogadas como promisorias y llevadas a ensayos de fermentaciones, considerando la misma temperatura de 27°C en la que han crecido desde su aislamiento, una agitación intermedia de 150 r.p.m para favorecer el crecimiento bacteriano, un pH básico inicial de 7.2 y una concentración de xilosa de 40g/L. Bajo estas condiciones se realizó un sondeo sobre su capacidad fermentativa.

4.2.7.1. Preparación de inóculos

Para la preparación de los inóculos, un criovial de cada cepa fue agregado en 40ml de caldo de fermentación con xilosa al 40% p/v y un pH de 7.2. Los inóculos se incubaron en

volumen medio 150 ml en erlenmeyers bafleados durante 24 horas a una temperatura de 27°C y 150r.p.m. (Figura 9a). A cada inóculo se le realizó muestreos de 1.5 ml en diferentes tiempos de 0, 12 y 24 horas para realizar análisis posteriores.



Figura 9. Montaje de fermentación. Inóculo (a), montaje fase reproductiva y fermentativa (b), disposición para toma muestra de fermentación (c).

4.2.7.2. Preparación de la etapa fermentativa

Cumplidas las 24 horas se detuvo su agitación para realizar la etapa reproductiva, de los cuales se tomaron 15 ml de cada inóculo y se adicionaron en 135 ml de medio nuevo. Se utilizó un montaje diseñado para la toma de muestras posteriores. Cada inóculo fue sembrado con réplica a la misma temperatura por 8 horas utilizando tapones de algodón (Figuras 9b y 9c).

4.2.7.3. Etapa fermentativa

Pasadas las ocho horas de la etapa reproductiva, se sellaron los erlenmeyers con parafilm y silicona, para propiciar el ambiente anaeróbico dentro del recipiente. Se tomaron 5ml como muestra de cada fermentación en tubos tapa roja al vacío a los tiempos en horas 0, 3, 5, 10, 27 y 34. Se almacenaron las muestras en congelación a -20°C (Figura 9c).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTOS

De las nueve fuentes procesadas se obtuvieron 30 cepas bacterianas y una levadura, observándose que el suelo de bosque nublado y suelo de Camila-Darién fueron quienes más aislamientos permitieron, posiblemente por el aporte vegetal que deja las cosechas de frutos y la biomasa generada por el follaje de los árboles caducifolios de la zona. De igual manera los cogollos y los residuos de caña de azúcar tuvieron un aporte importante de bacterias cultivables (Figura 10).

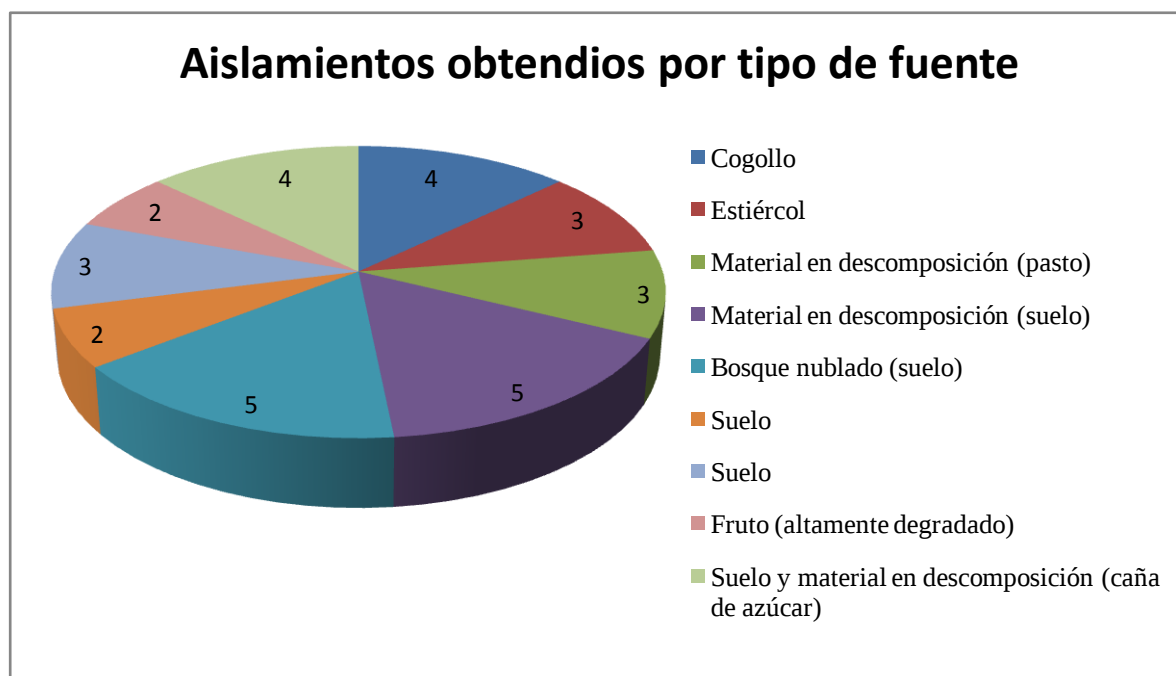


Figura 10. Número de aislamientos bacterianos obtenidos por cada fuente estudiada. De la fuente de Bosque nublado (suelo) se aisló una levadura incluida en el conteo.

5.2. MICROMORFOLOGÍA BACTERIANA

Al realizar las coloraciones y observándolas en placas bajo el microscopio, a 100X con aceite de inmersión, se caracterizaron micromorfológicamente (Figura 11) 31 microorganismos de los cuales el 67.7% son bacilos Gram positivos, el 19.3% bacilos Gram negativos, el 9.7% cocobacilos Gram positivos y el 3.2% son levaduras. Mostrando

que casi un 80% son microorganismos Gram positivos (Figura 12), algo particular para las muestras de suelo (Grant 1983).

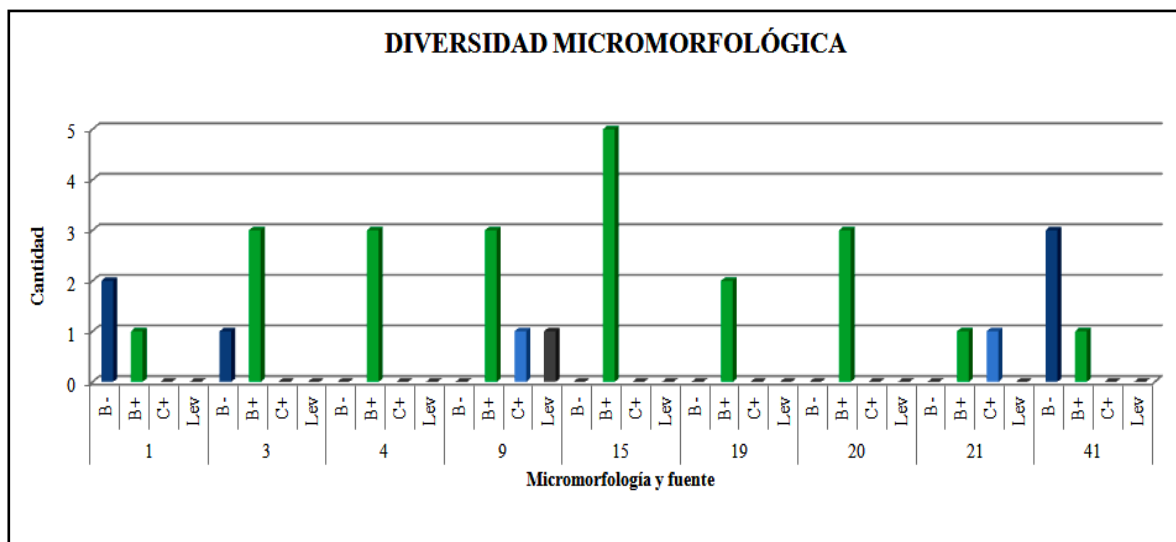


Figura 11. Diversidad micromorfológica bacteriana aislada para las fuentes estudiadas, compuesta por bacilos Gram positivos (B+) y negativos (B-), además de cocos Gram positivos (C+) y una levadura (L).

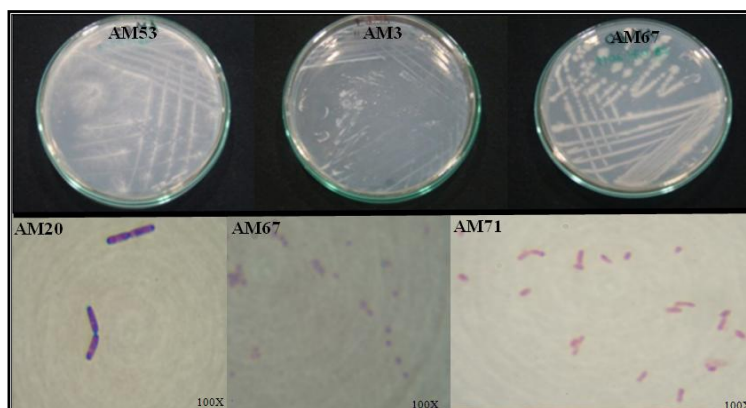


Figura 12. Macromorfología de algunas de las cepas aisladas y micromorfología de algunas de las seleccionadas como promisorias, bacilos Gram positivos (AM20) y Gram negativos (AM71) y coco Gram positivo (AM67).

5.3. SELECCIÓN DE OXIDO-FERMENTADORES

Caracterizadas las cepas micromorfológicamente, se les hizo prueba de crecimiento otros dos azúcares, obteniendo que todas las cepas asimilan las tres fuentes de carbono (xilosa, glucosa y arabinosa). Seguidamente se realizó la prueba de oxido-fermentación (OF) con xilosa como fuente de carbono para todas, observándose que el 55% no la oxidan ni fermentan, (No OF), el 10% la oxidan (O) y el 35% la oxido-fermentan, encontrándose este último grupo en las fuentes: cogollo, estiércol de vaca, suelo de bosque nublado, fruto amarillo altamente degradado y residuos de caña de azúcar (Figura 13).

En esta prueba se observó que el tapón de vaselina ayuda en la identificación de cepas productoras de gas (Figura 14), sin embargo a todas las cepas paralelamente se les realizó pruebas de microfermentación para confirmarlo, determinando que 17 cepas son productoras de gas, un número que es superior al observado con la prueba OF, lo que permite afirmar que las microfermentaciones son más concluyentes. Entre estas productoras de gas se encuentran las 11 con resultado positivo en las pruebas OF, haciendo de ellas cepas promisorias para la producción de etanol (Tabla 2).

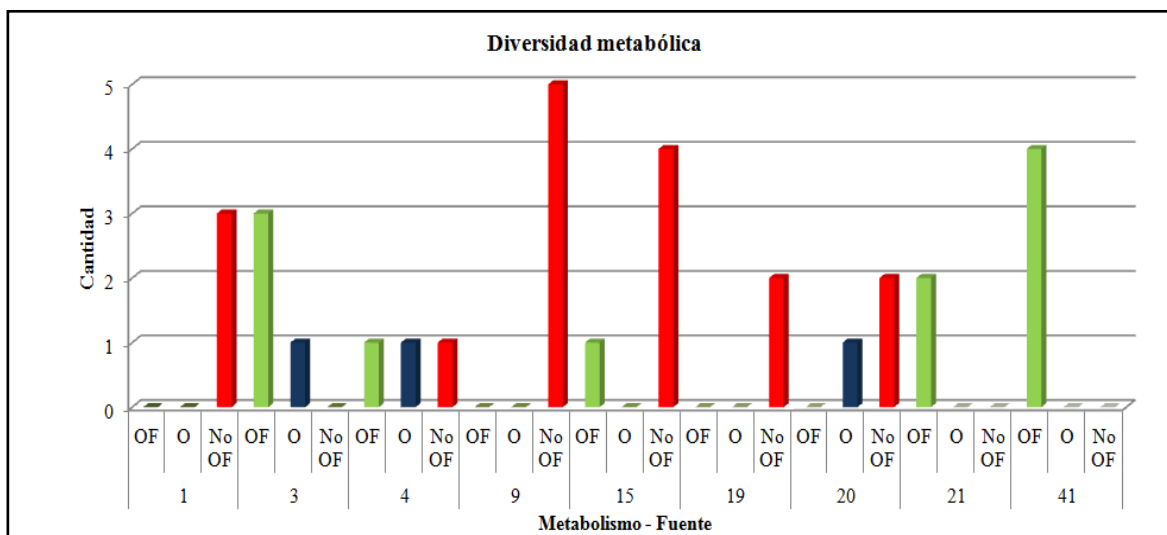


Figura 13. Diversidad metabólica las cepas aisladas de las fuentes estudiadas. OF, oxido-fermentadora; O, oxidadoras; No OF, No oxido-fermentadora. (1) Material en descomposición - pasto, (3) Cogollos, (4) Estiércol de vaca, (9) Material en descomposición - suelo, (15) Bosque nublado - suelo, (19) Suelo, (20) Suelo, (21) Fruto amarillo altamente degradado, (41) Residuos de caña de azúcar, suelo y material en descomposición.

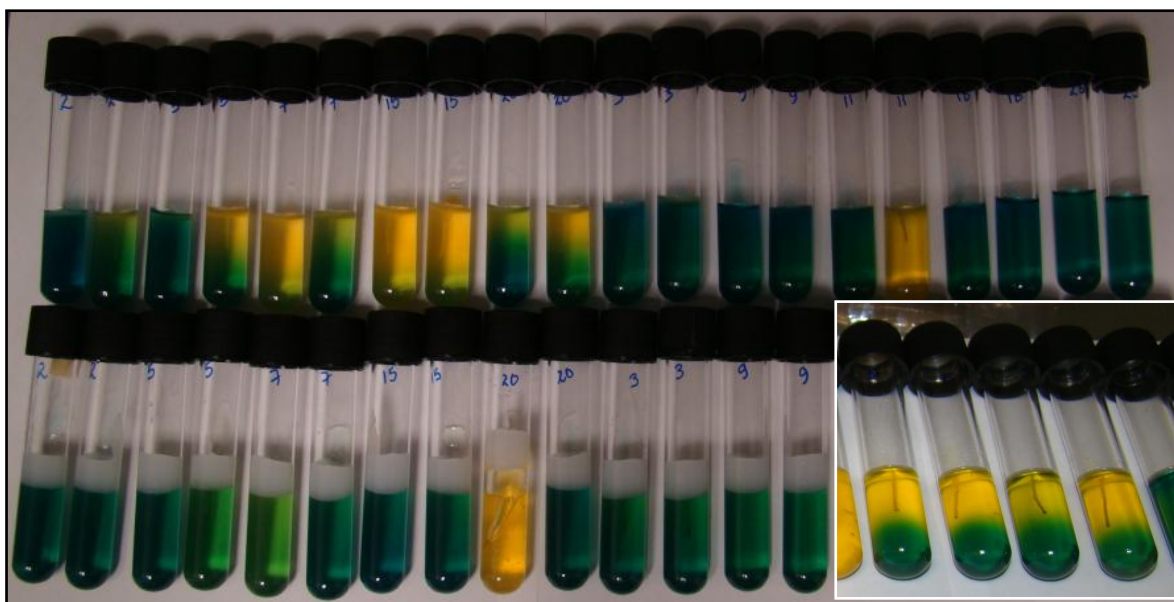


Figura 14. Pruebas de oxido-fermentación en medio Hugh & Leifson. Tubos sin y con tapón de vaselina., mostrando los resultados de OF positivos. El tubo número 20, correspondientes a la cepa AM20, muestra el desplazamiento de la vaselina por la producción de gas, además el medio permite visualizar la movilidad.

Tabla 2. Tabla resumen de tamizaje de cepas promisorias

	Cepa	Tipo microbiológico	Asimilación de azúcares	OF	Gas
1	AM2	Bacilo Gram -	X, G, A	O	+
2	AM3	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
3	AM5	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
4	AM7	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
5	AM9	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
6	AM15	Bacilo Gram +	X, G, A	O	-
7	AM20	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
8	AM23	Bacilo Gram -	X, G, A	No OF	+
9	AM25	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	+
10	AM28	Bacilo Gram -	X, G, A	No OF	-
11	AM48	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
12	AM49	Levadura	X, G, A	No OF	-
13	AM51	Bacilo Gram+	X, G, A	No OF	+
14	AM52	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
15	AM53	Coco Gram +	X, G, A	No OF	-
16	AM56	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
17	AM57	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
18	AM58	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
19	AM59	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
20	AM60	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	+
21	AM61	Coco Gram +	X, G, A	No OF	-
22	AM62	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	+
23	AM63	Bacilo Gram +	X, G, A	O	+
24	AM64	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
25	AM65	Bacilo Gram +	X, G, A	No OF	-
26	AM66	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
27	AM67	Coco Gram +	X, G, A	OF	+
28	AM69	Bacilo Gram +	X, G, A	OF	+
29	AM70	Bacilo Gram -	X, G, A	OF	+
30	AM71	Bacilo Gram -	X, G, A	OF	+
31	AM72	Bacilo Gram -	X, G, A	OF	+

5.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Las 11 cepas seleccionadas como promisorias, por su capacidad de usar las tres fuentes de carbono probadas, mostrar capacidad para oxido-fermentar xilosa y producir gas, mostraron tener la capacidad de producir etanol, algunas en mayor proporción de acuerdo a los valores

obtenidos mediante HPLC. Cepas como la AM7, principalmente, muestran una buena producción de etanol, sin embargo en el tiempo estos valores disminuyen, indicando esto la posibilidad de que estén utilizando su producto, siendo ello una característica no deseable las cepas restan importancia. Existen dos cepas que muestra una producción de etanol más constante en el tiempo, sin consumo hasta el tiempo evaluado, las cepas AM3 y la AM58 con valores no inferiores 0.84 mg/ml, lo que hace de ellas las de mayor importancia (Figura 15).

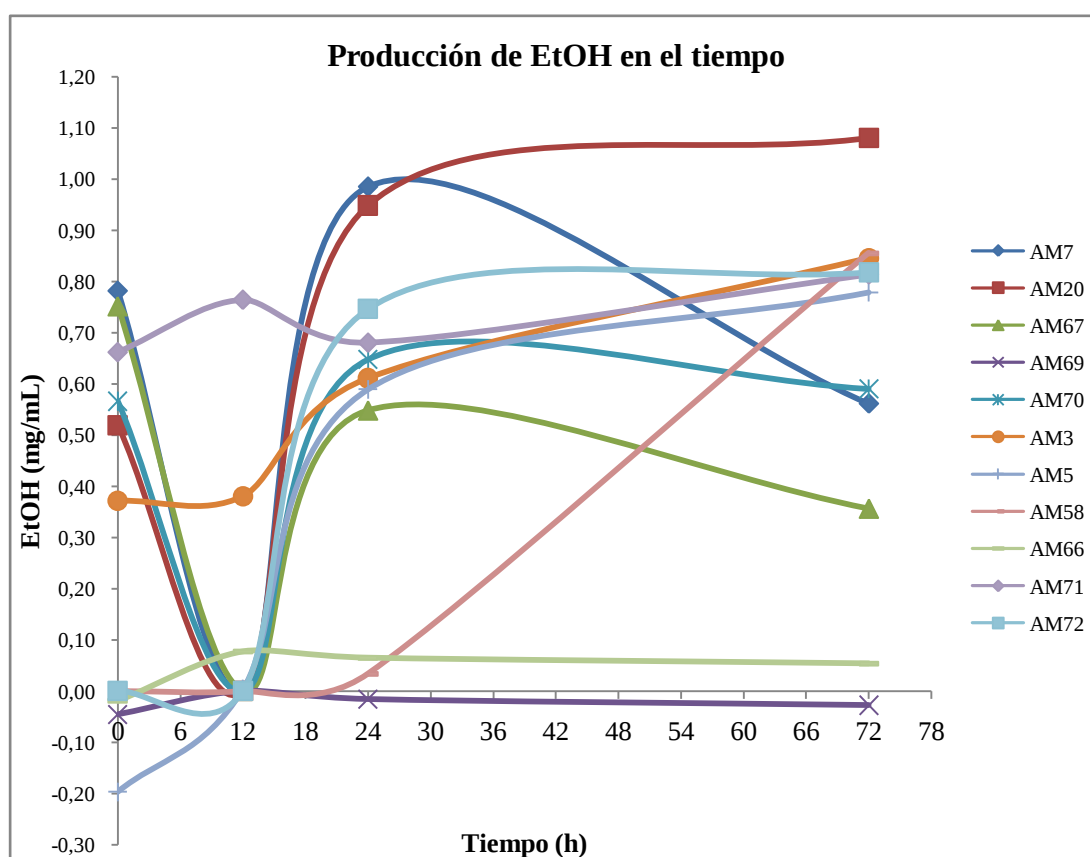


Figura 15. Valores obtenidos en la producción de etanol hasta las 72 horas de fermentación.

El consumo de sustrato es también una característica importante a tener en cuenta, ya que nos permite establecer una relación de eficiencia en su conversión a producto (etanol) (Figura 16). Esta relación se estableció como un valor de rendimiento $Y_{p/s}$ (rendimiento producto-sustrato), que indicó cuánto etanol se produce a partir de una cantidad de sustrato consumida, por lo que la cepa AM72 es la de mejor rendimiento y las cepas AM66, AM67

y AM69 tienen uno muy bajo, lo que hace de estas últimas las cepas menos confiables para optimización del proceso fermentativo (Tabla 3). Mientras que aquellas que han sido consideradas como más importantes de acuerdo a su producción de etanol presentan un $Y(p/s)$ de 0.030 y 0.031 respectivamente, valores que son bajos con respecto al rendimiento teórico ($Yp/s = 0.51$), posiblemente relacionados con las condiciones de fermentación. Valores que podrían ser mejorados realizando una exploración en búsqueda de unas condiciones más óptimas para el desempeño de su maquinaria enzimática relacionada con sus procesos metabólicos. Además estas cepas AM3 y AM58, a diferencia de la mayoría, muestran un baja producción de biomasa en el tiempo (Figura 17) dando la idea de que el sustrato utilizado está más dirigido a los productos de la fermentación lo que las hace aún más especiales.

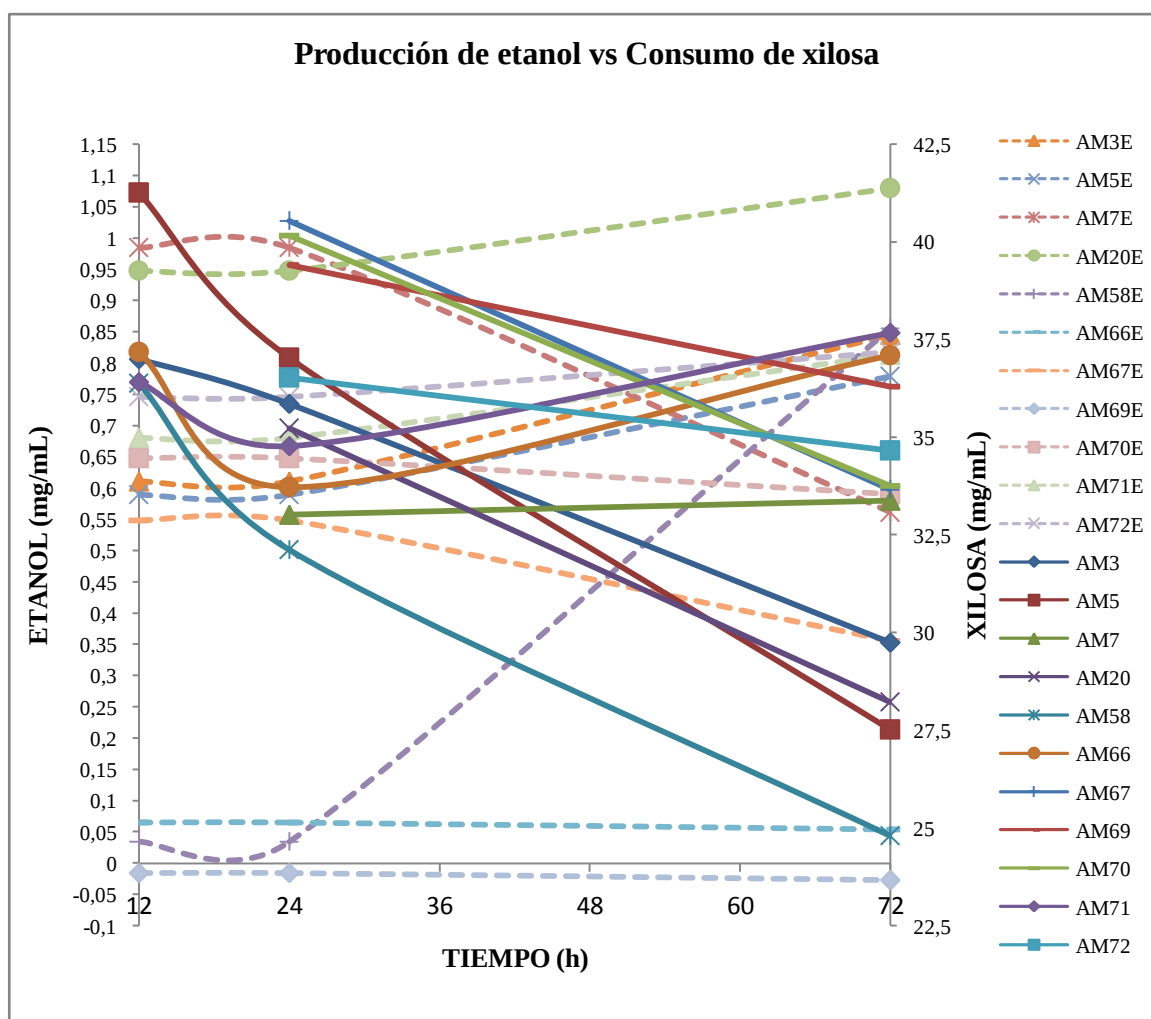


Figura 16. Valores mostrados hasta las 72 horas de fermentación, para consumo de xilosa y producción de etanol que llevan a establecimiento de sus valores $Y(p/s)$.

Tabla 3. Valore de rendimiento $Y(p/s)$ para las cepas promisorias y valor teórico para los 40g/L de xilosa usados en la fermentación

Cepa	Yp/s	Teórico
AM3	0,03	
AM5	0,038	
AM7	0	
AM20	0,033	
AM58	0,031	0.51
AM66	0,005	
AM67	0	
AM69	0	
AM70	0,002	
AM71	0,047	
AM72	0,153	

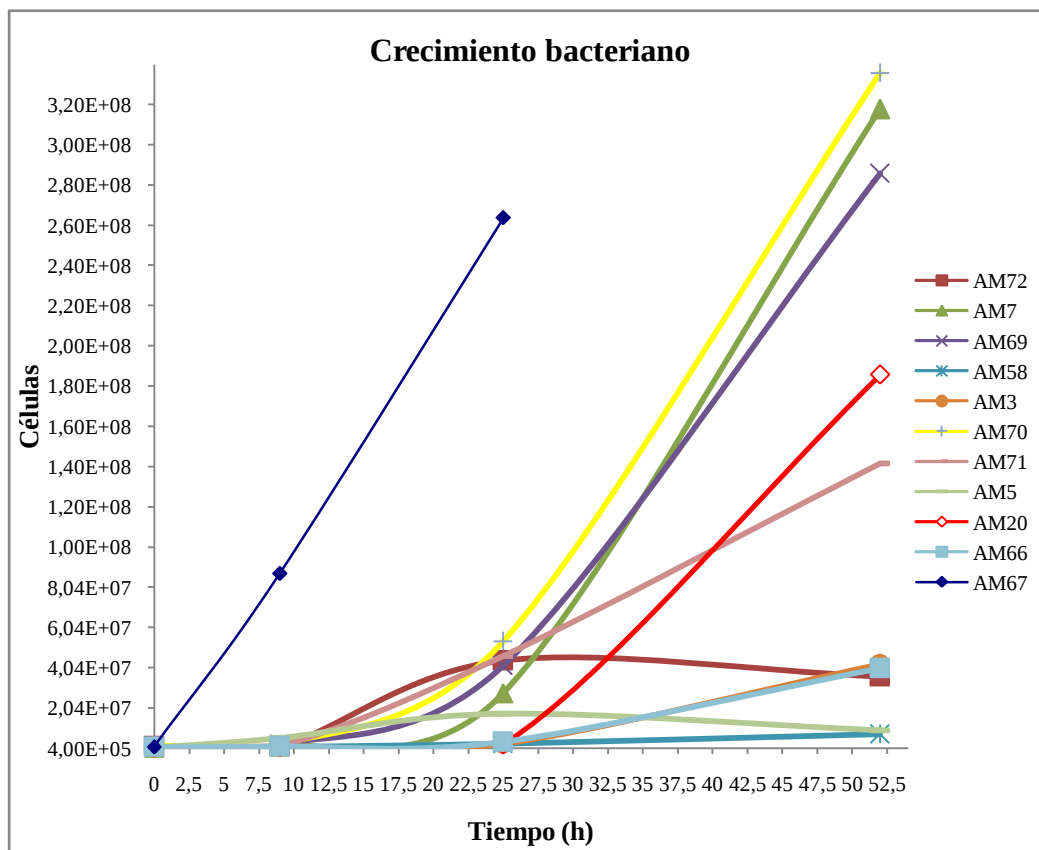


Figura 17. Biomasa producida hasta las 52 horas de fermentación, muestra la baja producción de por parte de las cepas AM3 y AM58.

Dada la importancia que han representado las cepas AM3 y AM58 en el proceso de selección, se encontró que las cepas AM3 y AM58 están ubicadas taxonómicamente dentro del phylum proteobacteria y la clase gammaproteobacteria, mediante el análisis de las secuencias de la región de ADN ribosomal 16S.

Los resultados obtenidos mediante HPLC confirman que el tamizaje ha sido efectivo en la búsqueda de bacterias fermentadoras de xilosa y productoras de etanol aunque los valores producidos no sean altos. Mostrando además ser una técnica de buena sensibilidad para este tipo de investigaciones.

En cuanto al conocimiento de la maquinaria metabólica de estas bacterias, se hace necesario iniciar la exploración de las mejores condiciones en las cuales sus enzimas trabajan para la producción de etanol.

Dada la importante fracción que representa la xilosa en los residuos agrícolas, la evaluación del potencial de las bacterias para producir biocombustibles a partir de ellos ha tomando gran importancia como estrategia en el desarrollo de las bioenergías. Las bacterias aisladas en esta investigación muestran un valor importante de un 32% como productoras de bioetanol, aunque sólo el 26% muestran un rendimiento considerable. Sin embargo estas cepas pueden ser capaces de dar un valor agregado a los residuos agrícolas, favoreciendo de manera importante por el fácil acceso a este recurso biológico que puede representar para los productores e investigadores de los biocombustibles con condiciones de temperatura favorables como las de estas bacterias mesófilas.

Esta investigación, requiere el desarrollo de un diseño para la evaluación del mejoramiento en la búsqueda condiciones para el rendimiento y/o acumulación del metabolito secundario de interés. Para lo cual se parte de que la fermentación es un fenómeno biológico ampliamente conocido, en específico la fermentación alcohólica cumple con el rol biológico de proporcionar energía bajo condiciones de anaerobiosis a los microorganismos unicelulares (bacterias y levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO₂ como desechos consecuencia de la fermentación. Los parámetros de cultivo condicionan la producción de determinados metabolitos secundarios y el control de estos parámetros

permite direccionar la producción en una dirección u otra. Entre los parámetros más importantes podemos mencionar están la temperatura, la concentración de sustrato, el potencial de hidrogeno, el tamaño del inóculo que entra a fermentación, presencia de fósforo (en forma de fosfatos) y otros cofactores y la concentración de macro nutrientes como el nitrógeno.

En el caso de particular de la fermentación de la D-xilosa existen bacterias reportadas como potenciales (Linko 1985; Rosenberg 1980; Skoog & Hahn-Hagerdal 1988.), entre las que se destacan principalmente los anaerobios facultativos que incluyen *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Bacillus macerans*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactobacillus* sp., *Thermomonobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, y los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Estos trabajos evalúan la producción de etanol por gramo de xilosa bajo determinadas parámetros de cultivo sin modificar las condiciones de cultivo, sin embargo no se abordan bajo una estrategia central de diseño estadístico de experimentos, razón por la cual dichas productividades están alejadas de la zona de valores óptimos y lo más importante no brindan información sobre las interacciones que pueden existir entre esos parámetros. Por ejemplo en levaduras los niveles o concentración de azúcar condicionan la producción de biomasa o de etanol; cuando el medio de fermentación es rico en azúcar (como el caso de los jarabes de glucosa de las mieles de la caña de azúcar), durante la fermentación alcohólica la supervivencia de las levaduras se ve afectada porque los procesos de osmoregulación se ven alterados debidos a la alta concentración de sustrato. No obstante, en lo anterior no existe una regla porque en el caso de *C. shehatae* la producción de etanol se ve disminuida considerablemente cuando se cultiva por encima de 30°C o cuando la concentración de xilosa se incrementa (Preez, Bosch & Prior, 1986). Otro de los factores importantes en la producción de etanol a partir de xilosa es la temperatura, se ha observado que valores que favorecen la máxima productividad de biomasa y etanol no necesariamente favorecen la acumulación del etanol y que conforme se aumenta la temperatura los residuales de xilitol y de xilosa se aumentan (Slininger *et al.* 1990) lo cual muestra que valores bajos de temperatura favorecen la producción y acumulación específica de etanol.

Teniendo en cuenta que las cepas AM3 y AM58 presentaron unos valores aceptables de producción de etanol, acumulación de etanol, consumo de xilosa (Yp/s iguales o superiores a 0,030 mg/mg) y que no consumen etanol en los tiempos de fermentación evaluados se pueden considerar promisorias dentro del conjunto de cepas nativas evaluadas. Por tal razón se propone la profundización del presente trabajo evaluando el efecto de los parámetros de cultivo y la interacción de los mismos sobre la producción de etanol, para tal fin se ha visto y demostrado que los diseños factoriales son los más eficientes para este tipo de experimentos. Los factores en consideración son la concentración de sustrato y la temperatura, los cuales dentro de un esquema de diseño factorial permitirán investigar todas las posibles combinaciones de los niveles de factores en cada ensayo completo realizado o las replicas del experimento.

En específico el diseño debe permitir encontrar si para determinados “t” valores del factor *Temperatura* y “cs” niveles del factor *Concentración de sustrato*, con sus replicas del experimento conteniendo todas las combinaciones “t-cs” de los tratamientos existen valores cruzados que permitan o favorezcan el aumento de la variable de respuesta concentración de etanol. Dicho aumento en la producción de etanol será medido como el efecto que tiene el cambio del nivel del factor en la variable de respuesta. Este diseño permite además determinar cuál es o cuáles son los efectos principales entre los factores evaluados.

6.1 PROPUESTA DE DISEÑO

El diseño que se plantea a continuación (Tabla 4 y 5) permite tener el conocimiento más detallado de las cepas en estudio y permitirá centrarse en determinados valores de los factores para las evaluaciones de interés para el objetivo de la investigación. De igual manera permitirá determinar la influencia de los factores temperatura (T) y Concentración del sustrato (CS) sobre la producción de etanol saber cuáles influyen y como interaccionan entre ellos, aproximarse al optimo, determinar cuáles valores de los factores proporcionan una mejor (entiéndase mayor) respuesta.

Tabla 4. Tabla de diseño de experimentos aleatorizada, diseño factorial ajustado a central compuesto

Orden Est	Orden Corrida	Pt Central	Bloques	Temperatura	Concentración de sustrato
8	1	1	1	30° C	60 g/l
6	2	1	1	30° C	40 g/l
5	3	1	1	25° C	40 g/l
9	4	0	1	27,5° C	50 g/l
1	5	1	1	25° C	40 g/l
4	6	1	1	30° C	60 g/l
7	7	1	1	25° C	60 g/l
2	8	1	1	30° C	40 g/l
3	9	1	1	25° C	60 g/l

Tabla 5. Tabla de diseño experimental

Corrida	A	B
1	+	+
2	+	-
3	-	-
4	0	0
5	-	-
6	+	+
7	-	+
8	+	-
9	-	+

6. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se obtuvo 8 bacterias que mostraron unos valores bajos con respecto al rendimiento teórico de 0.51g/g para la xilosa, y la bacteria aislada en este trabajo de investigación con mayor rendimiento fue la AM72 con un 32.2% con relación al teórico.

Las dos cepas bacterianas AM3 y AM58 que no mostraron consumo de etanol en la fermentación no pasaron del 6.1% de rendimiento teórico.

La cepa con mayor rendimiento fue la AM72, que mostró un 30% del rendimiento teórico, disminuyendo su producción de etanol a las 72 horas.

Las cepas aisladas, particularmente AM3 y AM58 muestran la capacidad de producir etanol, aunque en bajos rendimientos, en otras palabras poseen la maquinaria enzimática para producirlo. Esto las hace importantes para seguir investigándolas, mostrando además que el suelo y los mismos residuos agrícolas son una fuente importante para el aislamiento de microorganismo con capacidad de metabolizar xilosa y producir etanol.

Las cepas AM3 y AM58 están ubicadas taxonómicamente dentro del phylum proteobacteria y la clase gammaproteobacteria.

7. GLOSARIO

MEDIOS DE CULTIVO

Se denomina medio de cultivo a todos aquellos sustratos sólidos, líquidos o semisólidos que favorecen y permiten el desarrollo de los microorganismos en el laboratorio.

SIEMBRA

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra de un microorganismo (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, sea de bacterias o de hongos. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, asa, hisopo o pipeta estéril (American Public Health Association, 1992).

CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

Es un medio con los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos, el cual se encuentra en estado líquido. Habitualmente se realiza en tubos o en matraces. El

crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento, no hay formación de colonias.

CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Es un medio con los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos, el cual se encuentra en estado sólido. Puede ser en tubos o placas. El crecimiento se manifiesta por la formación de colonias en superficie.

AISLAMIENTO

Aislar es separar un microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. En hábitats naturales raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar los distintos tipos de microorganismos presentes para luego así poder identificarlos.

8. LITERATURA CITADA

ANDREW A. R. 1976. Possible Cause of Anomalies in the Oxidation-Fermentation Test. *Journal of Applied Bacteriology*. 43:493-496

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 1992. 3rd ed. Washington D.C. APHA

BANERJEE MAITREYEE. 1989. Kinetics of Ethanolic Fermentation of D-Xylose by *Klebsiella pneumoniae* and Its Mutants. *Applied and environmental microbiology*. 55(5):1169-1177

BECK SUSAN. 2002. NCA review for the clinical laboratory sciences. 4^a Edición.

Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. 320p

DETROY R.W. & P.L BOLEN. Symposium of fuels and Chemicals. 24 -26 de agosto de 1983. Antigua, Guatemala.

DIEN B.S., COTTA MA, T.W. JEFFRIES. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production current status. Appl. Microbiol. Biotechnol., 63:258-266.

DU PREEZ J.C., M. BOSCH & B. A. PRIOR . 1986. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. Enzyme and Microbial Technology. 8 (6):360-364

DZHUNDUBAEV K., L. M. KORNEVA & R. I. KOZHAKHMETOVA. 1965. The mutarotation of α -D-xylose. Chemistry of Natural Compounds. 1(3):168-171

GONG CS, CLAYPOOL TA, MCCRACKEN KD, MANN CM, UENG PP, TSAO GT. 1983. Conversion of pentoses by Yeast. Biotechnol. Bioeng.. 25:85-104.

HAHN-HÄGERDAL B., K. KARHUMA, C. FONSECA, I. SPENCER-MARTINS , M.F. GORWA-GRAUSLUND. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl. Microbiol. Biotechnol., 74: 937-953.

HALDEMAN D. & P. S. AMY. 1993. Diversity within a Colony Morphotype: Implications for Ecological Research. Applied and environmental microbiology. 59(3):933-935

HERNÁNDEZ C. 2003. Crecimiento y Formación de Productos en Cultivos Aeróbicos y Anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con Glucosa, Xilosa Y Celobiosa. Tesis de pregrado. Zacatepec – México, Instituto Tecnológico de Zacatepec. 98p

IIRVAB, INSTITUTO HUMBOLDT, 2001. Pautas y Prioridades en la Investigación de la Diversidad Microbiana. Biosíntesis, Boletín Informativo. 28:1-4

JEFFRIES TW, IV GRIGORIEV , J GRIMWOOD , J.M. LAPLAZA , A. AERTS, A. SALAMOV, J. SCHMUTZ, E. LINDQUIST, P. DEHAL, H. SHAPIRO, Y.S JIN, V. JIMENEZ J. & T. BENITEZ. 1987. Adaptation of Yeast Cell Membranes to Ethanol. Applied and Environmental Microbiology . 53(5):1196-1198

KARHUMAA K, R. GARCIA, B. HAHN-HÄGERDAL & M. GORWA-GRAUSLUND. 2007. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Cell Factories. 6(5):1-10

KONEMAN E. & A. STHEPHEN. 2006. Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª edición. Madrid, España. Ed. Médica Panamericana. 1691p

LACHKE, A. 2002. Biofuel from *D*-xylose — The second most abundant sugar. Resonance. 7(5):50-58

LEBOFFE, M. 2002. Microbiology. Laboratory theory and application. Morton Publishing company. USA. 616p

LINKO, P. 1985. Fuels and industrial chemicals through biotechnology. Biotechnol. Adv. 3:39-63

MATIZ, A., E. TORRES & R. POUTOU. 2002. Producción de Etanol con Células Inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* spp. MVZ-CÓRDOBA. 7(2):216-223

MORTLOCK R.P. & W.A. WOOD. Metabolism of pentoses and pentitols by *Aerobacter aerogenes*. Journal of Bacteriology. 88(4):838-844

MOZZI F., R. R. RAYA & G.M. VIGNOLO. 2010. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications. Singapur .Wiley-Backwell.393p

NAJAFPOUR G. D. & L. J. KANG. 2002. Evaluation and Isolation of Ethanol producer Strain SMP-6. 16th Symp. of Malaysian Chem. Engineers (SOMChE). 3:229-236

NÁPOLES SOLENZAL, A. I., Y. ORTIZ AROCHE, M. VIÑALS VERDE, E. MANGANELLY SANTANA, E. ACOSTA MARTÍNEZ. 2006. Purificación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con carbón activado y resinas de intercambio iónico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(2):124-128

NIGAM J. N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* . 87(1):17-27

PALUKURTY M. A, KUMAR T. N, REDDY B., H. S. & S. N. MULAMPAKA. 2008. Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs. *African Journal of Microbiology Research* (2) 87-94.

PASSOTH & P.M. RICHARDSON. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol*. 25:319–326

ROSENBERG, S. I. 1980. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microb. Technol*. 2:185-193.

SAXENA, A. 2006. Text Book Of Biochemistry. United States. Discovery Publishing House. 620p

SINGH A. & P. MISHRA. 1995. Microbial Pentose Utilization : Current Applications in Biotechnology. Amsterdam, Elsevier Science. 401p

SHARIATI P., W. J. MITCHELL, A. BOYD, F. G. PRIEST. 1995. Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Microbiol. 141:1117-1124

SKOOG, S., AND B. HAHN-HAGERDAL. 1988. Xylose fermentation. Enzyme Microb. Technol. 10:6680.

SLININGER P., R. BOTHAST, M. LADISCH & M. OKOS. 1990. Optimum pH and Temperature Conditions for Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. Biotechnology and Bioengineering. 35: 727-731.

TEMUDO M., T. MATO, R. KLEEREBEZEM & M. LOOSDRECHT. 2009. Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures. Applied Microbiology and Biotechnology. 82(2):231-239

VAN Z. V, B. A. PRIOR, S. G. KILIAN, & E. V. BRANDT. 1993. Role of D-ribose as a cometabolite in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 59(5): 1487–1494

VANEGAS, I.; YEPES, M. Y RUÍZ, O. 2004. Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas. Revista Colombiana de Biotecnología. 6(2): 31-36.

VERTÈS A., N. QURESHI, H. YUKAWA. 2010. Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries. Gran Bretaña, John Wiley & Sons. 559p.

YOSHITAKE, J., H. ISHIZAKI, M. SHIMAMURA, AND T. IMAI. 1973. Xylitol production by an *Enterobacter* species. Agric. Biol Chem. 37: 2261-2267

