



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
"PEDRO RUIZ GALLO"  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**

**Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de  
*Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, para la producción  
de etanol celulósico en Lambayeque, 2012**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Luis Alberto Collazos Silva  
Br. Rubi Suggey Ortiz Baca**

**LAMBAYEQUE, PERÚ  
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA**  
**Y PARASITOLOGÍA**



**Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de  
*Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, para la producción  
de etanol celulósico en Lambayeque, 2012**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Luis Alberto Collazos Silva**

**Br. Rubi Suggey Ortiz Baca**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

**Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de  
*Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, para la producción  
de etanol celulósico en Lambayeque, 2012**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

M. Sc. Clara Cueva Castillo

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

**SECRETARIO**

\_\_\_\_\_

Lic. Julio Silva Estela

**VOCAL**

\_\_\_\_\_

Dra. Carmen Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

\_\_\_\_\_

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

## *Dedicatoria*

*Con todo cariño, a quien lo hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños,  
por motivarme, por el consejo oportuno, por tu sacrificio a ti mamá.*

*Luis A. Collazos Silva*

## *Dedicatoria*

*A mi madre que con sus enseñanzas, su ejemplo y consejos ha hecho de mí la persona que  
soy ahora, siempre encontré en ti a la mejor amiga del mundo.*

*Rubi S. Ortiz Baca*

## *Agradecimientos*

*Al omnipotente Dios, por la vida, por guiarme por la senda del bien, por ser quien me alienta cada día.*

*A Reina Silva D. y Valentín Collazos R., mis padres, y a María S., mi tía, por su apoyo constante; y demás familiares, quienes confiaron en mí.*

*A la Dra. Carmen Rosa Carreño por su enseñanza y guía en esta investigación.*

*A Rubi Ortiz, amiga, porque hiciste comfortable esta investigación, por todas las responsabilidades y carejadas compartidas, por saber trabajar conmigo; a todos los amigos por extender de múltiples formas su mano cuando lo necesite, también a Susan por llegar a mi vida, entenderme y apoyarme.*

*A las innumerables personas que conociéndome o no, me brindaron su apoyo físico, espiritual y/o emocional.*

*Luis A. Collazos Silva*

## *Agradecimientos*

*Agradezco a Dios, a mis padres Magdalena Baca S. y José Ortiz V., gracias por su sacrificio y apoyo en toda esta etapa de mi vida; a John H. Zúñiga D., que hubiera sido de mí sin tu llegada a mi vida, gracias por estar a mi lado; a toda mi familia, abuelos, tíos, primos, sobrinos que con su aliento y alegría hicieron días más confortables; a todos mis amigos, son esa parte de mi vida que llevo siempre en mi corazón, cada recuerdo que tengo de ustedes forman sonrisas; a Luis Collazos S., por la paciencia que tuviste hacia mi persona en toda esta investigación, ahora ya "hermano de tesis"; a la Dra. Carmen Carreño por toda su paciencia y enseñanzas. Con todo el cariño y amor a todos por sus motivaciones, comprensión, sacrificios, enseñanzas y alegrías.*

*Rubi S. Ortiz Baca*

## Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Base teórica.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Materiales.....	17
3.1.1 Material biológico.....	17
3.1.2 Población y muestra de estudio.....	17
3.2 Métodos .....	18
3.2.1 Variables en estudio.....	18
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	18
3.2.3 Lugar de muestreo.....	18
3.2.4 Obtención de las muestras de bagazo de caña de azúcar.....	18
3.2.5 Pretratamiento de las muestras de bagazo de caña de azúcar....	22
3.2.6 Aislamiento de hongos filamentosos.....	22
3.2.7 Identificación de hongos filamentosos.....	22
3.2.8 Detección de hongos filamentosos lignocelulolíticos.....	27
3.2.9 Valoración indirecta de la degradación de lignocelulosa .....	27
3.2.10 Selección preliminar de hongos lignocelulolíticos.....	33
3.2.11 Valoración de la degradación del papel filtro.....	33
3.2.12 Cuantificación de la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar.....	37
3.2.13 Selección de un hongo filamentoso nativo.....	37
3.2.14 Determinación del rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar.....	42
3.3 Análisis de datos.....	42
IV.RESULTADOS... ..	48
4.1 Hongos filamentosos aislados e indentificados del bagazo de caña de azúcar.....	48
4.2 Hongos filamentosos lignocelulolíticos seleccionados.....	58



4.3 Actividad celulolítica de los hongos filamentosos nativos degradadores de papel filtro.....	58
4.4 Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar.....	58
4.5 Hongo filamentoso nativo con mayor actividad hidrolítica.....	76
4.6 Rendimiento alcohólico en bagazo de caña hidrolizado por un hongo filamentoso nativo.....	76
V.DISCUSIÓN.....	79
VI.CONCLUSIONES .....	84
VII.RECOMENDACIONES .....	85
VIII.RESUMEN .....	86
IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
X.ANEXOS .....	94

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Hongos filamentosos identificados en bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”, 2013.....	50
<b>Tabla 2.</b>	Hongos filamentosos nativos con micelio visible sobre bloques de madera, después de 15 días, a 30°C .....	62
<b>Tabla 3.</b>	Hongos filamentosos lignocelulolíticos seleccionados.....	67
<b>Tabla 4.</b>	Hongos filamentosos nativos colonizadores de papel filtro...	69
<b>Tabla 5.</b>	Hongos filamentosos nativos degradadores de papel filtro...	71
<b>Tabla 6.</b>	Porcentaje (%) de peso del papel filtro perdido por efecto de hongos lignocelulolíticos nativos.....	72
<b>Tabla 7.</b>	Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 24 horas.....	73
<b>Tabla 8.</b>	Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 48 horas.....	74
<b>Tabla 9.</b>	Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 72 horas.....	75
<b>Tabla 10.</b>	Cuantificación de la producción de etanol en bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” hidrolizado con <i>Aspergillus</i> sp. P16.....	78

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación geográfica de las empresas de producción agroindustrial Tumán y Pucalá en Lambayeque, 2012 ( <a href="https://maps.google.com.pe">https://maps.google.com.pe</a> ).....	19
<b>Figura 2.</b>	Montículo de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” en la Empresa Agroindustrial Tumán, 2012.....	20
<b>Figura 3.</b>	Obtención de muestra de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	20
<b>Figura 4.</b>	Muestras de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” para el aislamiento de hongos filamentosos.....	21
<b>Figura 5.</b>	Fragmentación de las muestras de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	23
<b>Figura 6.</b>	Muestras de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” fragmentadas para el aislamiento de hongos filamentosos.....	23
<b>Figura 7.</b>	Suspensiones de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” en agua destilada esterilizada más Tween 80...	24
<b>Figura 8.</b>	Hongos filamentosos desarrollados en agar papa dextrosa más cloranfenicol.....	24
<b>Figura 9.</b>	Cultivos puros de hongos filamentosos nativos.....	25
<b>Figura 10.</b>	Impresión con cinta adhesiva en el centro de la colonia fúngica.....	25
<b>Figura 11.</b>	Cinta adhesiva sobre lámina portaobjeto con una gota de azul de lactofenol.....	26
<b>Figura 12.</b>	Hongos filamentosos nativos desarrollados en agar extracto de malta durante 7 días.....	28
<b>Figura 13.</b>	Bloques de madera esterilizados en autoclave.....	28
<b>Figura 14.</b>	Bloques de madera depositados en el medio de cultivo, manteniendo un ángulo de 45° de separación respecto a la superficie.....	29
<b>Figura 15.</b>	Adición de una capa superficial de agar extracto de malta sobre agar agua inclinado.....	30

<b>Figura 16.</b>	Agar agua con una capa superficial de agar extracto de malta.....	30
<b>Figura 17.</b>	Hongos filamentosos nativos desarrollados sobre agar agua con una capa superficial de agar extracto de malta.....	31
<b>Figura 18.</b>	Bloques de madera depositados sobre el micelio fúngico.....	31
<b>Figura 19.</b>	Incubación de hongos filamentosos para la investigación de la degradación de lignocelulosa.....	32
<b>Figura 20.</b>	Caldo Sales Minerales con tiras de papel filtro Whatman.....	34
<b>Figura 21.</b>	Caldo sales minerales con papel filtro inoculado con hongos filamentosos.....	34
<b>Figura 22.</b>	Desarrollo de hongos filamentosos sobre papel filtro Whatman.....	36
<b>Figura 23.</b>	Desprendimiento del micelio fúngico adherido al papel filtro.	36
<b>Figura 24.</b>	Obtención del peso del papel filtro degradado.....	38
<b>Figura 25.</b>	Bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” lavado con agua destilada.....	38
<b>Figura 26.</b>	Secado del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” a temperatura ambiente.....	39
<b>Figura 27.</b>	Bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” deshidratado.....	39
<b>Figura 28.</b>	Molienda de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	40
<b>Figura 29.</b>	Bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” pretratado.....	40
<b>Figura 30.</b>	Proceso fermentativo para la hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	41
<b>Figura 31.</b>	Prueba de glucosa oxidasa en los hidrolizados de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	41
<b>Figura 32.</b>	Suspensión de conidios de hongo filamentosos lignocelulolítico.....	43

<b>Figura 33.</b>	Caldo sales minerales con bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” inoculado con hongos filamentosos lignocelulolíticos nativos.....	44
<b>Figura 34.</b>	Prueba de glucosa oxidasa en hidrolizados de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” por 0, 24 y 48 horas.....	44
<b>Figura 35.</b>	Suspensión de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en azul de metileno.....	45
<b>Figura 36.</b>	Cámara de conteo de Levy con el rayado de Neubauer cargada con suspensión de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
<b>Figura 37.</b>	Fermentación alcohólica del hidrolizado de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar”.....	46
<b>Figura 38.</b>	Destilación del filtrado obtenido de la fermentación alcohólica.....	46
<b>Figura 39.</b>	Utilización del vinómetro en la medición del grado alcohólico del destilado obtenido.....	47
<b>Figura 40.</b>	Frecuencia de muestras de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. “caña de azúcar” positivas al aislamiento de hongos filamentosos en Lambayeque, 2013.....	49
<b>Figura 41.</b>	Hongos filamentosos nativos desarrollados en agar papa dextrosa.....	51
<b>Figura 42.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Aspergillus</i> sp. (a) y <i>Paecilomyces</i> sp. (b).....	52
<b>Figura 43.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Cladosporium</i> sp. (a) y <i>Trichoderma</i> sp. (b).....	53
<b>Figura 44.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Penicillium</i> sp. (a) y <i>Rhizopus</i> sp. (b).....	54
<b>Figura 45.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Mucor</i> sp. (a) y <i>Monilia</i> sp. (b).....	55
<b>Figura 46.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Cephalosporium</i> sp. (a) y <i>Trichocladium</i> sp. (b).....	56
<b>Figura 47.</b>	Observación microscópica (400x) de <i>Colletotrichum</i> sp.....	57

<b>Figura 48.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos lignocelulolíticos.....	59
<b>Figura 49.</b>	Hongos filamentosos nativos desarrollados sobre bloques de madera durante 15 días.....	60
<b>Figura 50.</b>	Hongos filamentosos nativos, con (a) y sin micelio visible (b) sobre el bloque de madera.....	61
<b>Figura 51.</b>	Colonización del bloque de madera por hongos filamentosos nativos, (a) escasa, (b) regular, (c) buena.....	64
<b>Figura 52.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 15 días.....	65
<b>Figura 53.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 30 días.....	65
<b>Figura 54.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 60 días.....	66
<b>Figura 55.</b>	Papel filtro colonizado por hongos filamentosos nativos.....	68
<b>Figura 56.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos según la colonización del papel filtro.....	68
<b>Figura 57.</b>	Papel filtro degradado por hongos filamentosos nativos.....	70
<b>Figura 58.</b>	Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos según degradación del papel filtro.....	70
<b>Figura 59.</b>	Cultivo de <i>Aspergillus</i> sp. P16 lignocelulolítico.....	77

## **I. INTRODUCCIÓN**

Las fuentes fundamentales de energía han sido los combustibles fósiles, básicamente petróleo, gas natural y carbón; sin embargo, éstos se están agotando y por el contrario, la demanda mundial de energía se está incrementando, sugiriéndose que el consumo de 12 Giga toneladas en el 2007 aumentará hasta 24 en el 2025 (Abril, 2008). Ante la escasez de petróleo, se desarrollarán nuevas técnicas de extracción, con incrementos constantes de los precios, que no permitirán su uso como combustible masivo. Además, la problemática de la quema de combustibles fósiles, responsable en parte del efecto invernadero, la deforestación y la destrucción parcial de la capa de ozono, obligan a la búsqueda de alternativas como fuentes renovables de energía, entre los que se mencionan la hidráulica, eólica, nuclear, solar y la biomasa lignocelulósica.

Con la biomasa lignocelulósica se está investigando mayoritariamente la obtención de etanol para la producción de biocombustibles líquidos, como el etanol carburante o etanol anhidro desnaturalizado, que a su vez se puede

mezclar con la gasolina en diferentes proporciones, constituyendo el gasohol, sin necesidad de realizar grandes cambios en los motores, además que se puede utilizar la infraestructura existente para la distribución de la gasolina.

Como materia prima para la obtención del alcohol en Latinoamérica predomina *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”, seguido por *Hordeum vulgare* “cebada” y *Beta vulgaris* “remolacha”, siendo Brasil el principal productor mundial de bioetanol, con 300 destilerías y un rendimiento promedio de 0,085 L de etanol por kg de caña de azúcar. A su vez, en Norteamérica predominan *Zea mays* L. “maíz” y la cebada; en Europa la remolacha y *Triticum aestivum* “trigo” y en Asia la caña de azúcar, maíz, cebada y *Sorghum bicolor* L. “sorgo dulce”, concluyéndose que la caña de azúcar y los cereales son las principales fuentes para la producción de bioetanol, con 74 y 21 %, respectivamente (MINEM, 2010), condición que contradice la característica de un biocombustible de no competencia con la industria alimentaria y genera polémica en su aceptación a nivel mundial. Por ejemplo, como resultado del impulso a la producción de biocombustibles en Estados Unidos el 2008, se incrementó la superficie cultivada de maíz, desplazando el área cultivable de *Glycine max* L. “soya” y generando alza en el precio del maíz en el mercado internacional (Carreón *et al.*, 2009).

En el Perú existen aproximadamente 72 000 hectáreas sembradas de caña de azúcar y en promedio 20 000 ha son destinadas a la obtención de etanol. Tradicionalmente en las empresas agroindustriales se ha producido alcohol etílico como un subproducto, basado en la transformación de la melaza; sin embargo, este tipo de alcohol etílico contiene un alto porcentaje (4 %) de agua, por lo que no puede ser considerado para obtener alcohol carburante, resultante de la mezcla del etanol anhidro con una sustancia desnaturizante en una proporción volumétrica no menor de 0,2 % ni mayor a 3 % (Reyes *et al.*, 2003; Abril, 2008).

La producción de etanol a partir de caña de azúcar y granos está muy cuestionada por sus implicancias éticas, al convertir alimentos en combustibles para automóviles y su efecto en la disminución de la disponibilidad e incremento del precio. Además, la relación salida/entrada entre la energía liberada durante la combustión de etanol y su producción es de 1,1 – 1,2, lo



que significa que prácticamente se utiliza en su obtención la misma energía que se pueda obtener posteriormente (Abril, 2008). Como alternativa, se plantea la utilización de biomasa lignocelulósica, como la madera, residuos forestales, papel reciclado, residuos agrícolas, de la industria papelera e industriales como el bagazo de caña de azúcar.

El bagazo es el subproducto de la molienda de caña de azúcar, en el que permanecen el jugo residual y la humedad provenientes del proceso de extracción. La mayoría del bagazo producido, que equivale a una tercera parte de la caña molida en el mundo, sirve como combustible para la generación de vapor en las empresas agroindustriales productoras de azúcar. El bagazo está compuesto fundamentalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y hemicelulosa deben ser hidrolizadas a azúcares simples, para luego ser fermentadas con producción de etanol. A su vez, la lignina es un polifenol que produce un efecto negativo en los procesos fermentativos, por lo que se requiere de tecnología que permita su degradación. Los hongos filamentosos poseen sistemas enzimáticos que permiten la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, obteniéndose azúcares que pueden utilizarse en la producción de alcohol celulósico. Los microorganismos que presentan mayor eficiencia son los que se desarrollan en los residuos que contienen celulosa y lignina como el bagazo de caña de azúcar, por lo que se requiere que sean aislados e identificados para investigar su actividad en el laboratorio y seleccionarlos para la producción de alcohol.

Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación, teniendo como objetivos aislar e identificar hongos filamentosos en el bagazo de caña de azúcar; seleccionar hongos filamentosos nativos lignocelulolíticos; valorar la actividad celulolítica en el papel filtro; cuantificar la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar; seleccionar el hongo filamentoso nativo con mayor actividad hidrolítica, así como también, determinar el rendimiento alcohólico en bagazo de caña hidrolizado por un hongo filamentoso nativo.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Con el objetivo de determinar el potencial como productores de exoglucanasas, uno de los componentes del complejo enzimático celulasa, se investigaron 104 hongos, aislados de suelo con hojarascas. Los sobrenadantes libres de células de estos hongos se utilizaron para calificar el grado de desintegración del papel filtro, seleccionándose el 55,6 %. Los aislados seleccionados fueron cultivados en caldo Czapeck con papel filtro como fuente de carbono y se cuantificó la actividad exoglucanasa, valorando los azúcares reductores. Los mayores valores correspondieron a *Chrysosporium* sp. HU216 (0,120 UI mL<sup>-1</sup>), *Fusarium* sp. HU218D (0,137 UI mL<sup>-1</sup>) y *Fusarium* sp. HU251A (0,112 UI mL<sup>-1</sup>). Se concluyó que los hongos filamentosos nativos son potenciales productores de exoglucanasas (Vilches, 2002).

Las celulasas son enzimas de importancia biotecnológica, requiriéndose encontrar microorganismos eficientes en la producción de algunos compuestos del sistema, como las endoglucanasas. En este contexto, en agar celulosa 1 % se aislaron 130 hongos filamentosos, entre los que se identificaron 19 géneros, predominando *Penicillium* sp. (14,67 %), *Trichoderma* sp. (13,33 %) y *Aspergillus* sp. (11,33 %). El valor máximo de la hidrólisis de la celulosa en placa de petri fue 133 mm para *Trichoderma* sp. En cultivo sumergido, pH 5,5, a 30 °C, durante 8 días, la actividad CMCasa fue de 0,299 UI mL<sup>-1</sup> para *Fusarium moniliforme* y 0,653 UI mL<sup>-1</sup> para *Trichoderma viride*. Se demostró la producción de endoglucanasas por hongos filamentosos nativos (Carreño & Flores, 2003).

En suelos agrícolas de la provincia de Ferreñafe se aislaron 70 hongos filamentosos productores de exoglucanasas, entre los que predominaron *Cladosporium* sp. y *Chrysosporium* sp. con una frecuencia de 25,71 %. A continuación, se investigó la actividad exoglucanasa sobre papel filtro, determinando que 11,43 % de los hongos presentaron una degradación Muy Buena y 75 % de pérdida de peso del papel filtro, mientras que el 47,14 % de los hongos presentaron una degradación Buena y 50 % de pérdida de peso de papel filtro. A su vez, 1,43 % de los hongos presentó 60 % de pérdida de peso del papel filtro. Posteriormente, se cuantificaron los azúcares reductores liberados por la actividad sobre el papel filtro (APF), encontrando que los mayores valores correspondieron a *Aspergillus* sp. FSen0847 y *Cladosporium* sp. FSen0936 con 0,107 UI mL<sup>-1</sup> (Constantino & Manayay, 2005).

Se ha llevado diversos estudios para la búsqueda de organismos con capacidad celulolítica, como los mencionados por Cuervo *et al.* (2009), en los que se investigó la capacidad de *Fusarium concolor* para deslignificar la paja de trigo en 5 días. A su vez, Zhang *et al.* (2007) utilizaron *Coriolus versicolor* en el pretratamiento del bambú, observando disminución en el contenido de lignina y hemicelulosa y un aumento de hasta 37 % en la tasa de sacarificación del tratamiento. Por su parte, Schilling *et al.* (2009) trataron restos de pino y abeto con hongos de la podredumbre parda, *Gloeophyllum trabeum* y *Fomitopsis pinicola*, incrementando el producto en la sacarificación.

En el beneficio húmedo del café, la pulpa y el mucílago constituyen los subproductos más abundantes, representando en promedio 60 % del peso, que cuando no se utiliza adecuadamente genera contaminación del ambiente en las zonas cafetaleras. En el presente estudio se investigaron los microorganismos presentes en estos residuos, obteniéndose 26 bacterias, 13 hongos filamentosos y 2 levaduras. Mediante las pruebas de identificación comercial y el análisis de secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR con primers universales RN y RW para bacterias y primers ITS1 e ITS4 para hongos filamentosos y levaduras, se confirmaron *Achromobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Cellulosimicrobium*, *Pseudomonas* y *Promicromonospora*. A su vez, entre los hongos se identificó *Cladosporium lignicola* y *Penicillium brevicompactum*. Este último hongo filamentoso presenta un gran potencial, debido a su producción de pectinasa que cataliza la degradación del compuesto presente en la pared celular de las plantas. Se concluyó que la pulpa de café constituye un residuo al que se le puede dar valor agregado como fuente de microorganismos de interés industrial (Payán, 2011).

Una alternativa atractiva a la bioconversión es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde los hongos hidrolíticos y los microorganismos fermentativos como *Saccharomyces cerevisiae* están en un mismo biorreactor. La SSF consolida la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares en un solo paso; sin embargo, la actividad de las celulasas puede ser inhibida por los productos finales como la celobiosa y la glucosa. Además, la degradación de la materia vegetal genera además de las hexosas, grandes cantidades de azúcares como la xilosa y arabinosa que no pueden ser fermentadas por *S. cerevisiae*, por lo que se está investigando la manipulación genética para el transporte y fermentación de las pentosas (Chandrakant & Bisaria, 1998; Cuervo *et al.*, 2009).

## 2.2 Base teórica

### a. Material lignocelulósico: bagazo de caña de azúcar

La lignocelulosa constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por fotosíntesis. Anualmente se forman 200 000 millones de toneladas en el mundo. La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, que se estructuran en largas cadenas lineales o microfibrillas unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. A su vez, la hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucorónico, D-galacturónico y D-glucorónico. Por su parte, la lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que dan soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Mejía *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2011).

La lignina es el segundo polímero natural más abundante en el planeta, después de la celulosa; sin embargo, es mucho más resistente a la biodegradación. La molécula de lignina es un heteropolímero complejo tridimensional formado por tres bloques principales: los cinnamil alcoholes, que tienen una estructura de fenil propano (C6-C3). A su vez, entre éstos existen uniones carbono – carbono (-C-C-) o del tipo -C-O-C entre dos anillos, dos cadenas laterales de propano o un anillo y una cadena lateral y a veces existe más de una unión entre cualquiera de los dos bloques (Wainwright, 1995).

El contenido de celulosa en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenecen y oscila entre 35 y 50 % en peso seco. La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de moléculas de pectinas, proteínas, almidón y lípidos. A su vez, la hemicelulosa y la lignina corresponden a 20 - 35 % y 5 - 30 % en peso seco, respectivamente. La lignina tiene función

protectora de la celulosa y hemicelulosa, que en conjunto se denominan holocelulosa (Martínez *et al.*, 2008).

El cultivo de caña de azúcar está entre los que tienen mayor capacidad para convertir la energía solar en biomasa. Es capaz de almacenar hasta 1,7 % de la energía existente en la radiación incidente en un cultivo experimental con irrigación, tal que en los cañaverales se almacena aproximadamente el equivalente a 1 tonelada de petróleo por cada tonelada de azúcar que puede producirse. En Cuba anualmente son procesadas 70 millones de toneladas de caña, con las que se producen 20,5 millones de toneladas de bagazo y una cantidad similar de residuos agrícolas cañeros (RAC), que incluyen paja, cogollos y hojas. El bagazo representa 30 % de los tallos verdes molidos y se obtiene con 50 % de humedad, lo que significa que por cada hectárea cosechada es posible obtener al año 13,5 t de bagazo, equivalentes a 2,7 toneladas de combustible equivalente ( $tce=37,5 \text{ MJ kg}^{-1}$ ). Por su parte, en la composición química de bagazo se menciona 47 % de carbono; 6,5 % de hidrógeno, 44 % de oxígeno y 2,5 % de cenizas (Reyes *et al.*, 2003).

La lignocelulosa está en los residuos agroindustriales como el bagazo de caña, residuos derivados del maíz, arroz, sorgo y trigo entre otros, que parecen ser una buena alternativa para la producción de etanol, desde el punto de vista económico, de abundancia y de desarrollo rural. A manera de ejemplo, la industria azucarera en México obtiene como subproducto en promedio 14,1 millones de toneladas de bagazo de caña por zafra, concentrados en los 59 ingenios del país. Este bagazo puede ser convertido en 7,05 millones de litros de etanol por día, esto es aproximadamente el 7 % en volumen de la gasolina consumida por día. El etanol a presión y temperatura ambiente es líquido, incoloro, inflamable, soluble en agua y fácilmente almacenado y transportado; no obstante, es un líquido higroscópico y forma un azeótropo con el agua, dando lugar a un producto que tiene el 96 % v/v de etanol en agua, el cual no debe ser usado en mezclas gasolina-etanol, debido a que puede ocurrir separación de fases (Carreón *et al.*, 2009).

El etanol anhidro (<0,4 % v/v de humedad) se utiliza para la oxigenación de gasolinas y para aumentar el octanaje de las mismas. En comparación con las gasolinas, el contenido energético del etanol es aproximadamente un tercio

menor con respecto a la gasolina o diesel; sin embargo, su calor de vaporización es casi tres veces mayor y su número de octanos también es superior. Los motores de combustión interna que utilizan gasolina pueden emplear como energético mezclas de ésta conteniendo hasta 20 % de etanol. El desarrollo tecnológico en Brasil ha permitido la comercialización de automóviles que pueden emplear mezclas de etanol hasta del 95 % en gasolina y desde el 2003 se comercializan los vehículos denominados Flex-Fuel (de combustible flexible), los cuales tienen un sistema modificado de inyección de combustible que permite llenar el tanque de combustible con gasolina oxigenada con MTBE, cualquier mezcla de gasolina-etanol anhidro o bien etanol anhidro puro. En relación a la emisión de gases, hay una reducción del 33 % en las emisiones de monóxido de carbono, 10 % en hidrocarburos totales, 15 % en benceno, 15 % en 1,3, butanedieno, una ligera disminución de óxidos de azufre, pero un incremento de un 5 % en las emisiones de óxidos de nitrógeno (Carreón *et al.*, 2009; MINEM, 2010)

La conversión de la lignocelulosa a etanol involucra el pretratamiento (procesamiento e hidrólisis), detoxificación de la hemicelulosa, sacarificación enzimática de la celulosa, fermentación y recuperación del etanol (destilación y deshidratación). Cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa, es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos necesitan ser pretratados para facilitar la depolimerización de la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa. Así pues, el objetivo del procesamiento consiste, por un lado, en incrementar el área expuesta de la materia prima, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa y por otro, generar jarabes de azúcares ricos en pentosas y hexosas (Saha, 2004; Carreón *et al.*, 2009).

El bagazo es el subproducto o residuo de la molienda de la caña, la fibra leñosa de la caña, en el que permanecen el jugo residual y la humedad provenientes del proceso de extracción. En la práctica aproximadamente la mitad es fibra y la otra mitad es jugo residual con variaciones que resultan de los procesos de la molienda y de la variedad y calidad de la caña (Chen, 1997). Es considerado un residuo agroindustrial que contiene 45,51 – 45,66 % de fibra bruta; 90,95 – 90,98 % de fibra neutra detergente (FND); 59,88 – 59,92 % de

fibra ácido detergente (FAD); 47,49 – 47,88 % de celulosa y 31,07 – 31,98 % de hemicelulosa. También contiene 27,22 %  $\pm$  0,8 % de lignina klason (Mesa *et al.*, 2009). En su composición química se ha determinado 24,8 % de carbono, 2,53 % de hidrógeno, 21,43 % de oxígeno, 0,25 % de azufre, 2,03 % de cenizas, 44,42 % de humedad, 4,17 % de carbono fijo, 97,27 % de volátiles y 2,15 % de ceniza (Díaz, 2008).

En la provincia de Chiclayo, en Lambayeque, se presenta la mayor cantidad de residuos agrícolas, agroindustriales y de la industria de la madera, alcanzando 1,3 Mt anuales (FAO, 2010). Las empresas agroindustriales azucareras procesan diariamente 11 t de caña de azúcar (APPAB, 2004) y el bagazo de caña de azúcar representa el 30 % de los tallos verdes molidos. La gran mayoría del bagazo producido sirve como combustible, para la generación de vapor en las empresas productoras de azúcar, tal que 1 t de bagazo fresco (libre de humedad, base insoluble en agua pero quemado con 50 % de humedad) equivale a 2,2 barriles de aceite combustible o 92,4 galones o 350 L (Chen, 1997; Reyes *et al.*, 2003; Díaz, 2008).

#### **b. Degradación del material lignocelulósico**

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas). Los hongos basidiomicetes y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares. En este grupo se encuentran las bacterias de los géneros *Cellulomonas* y *Streptomyces*, los basidiomicetes responsables de la pudrición de la madera como *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Vorvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta*, así como también algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei* y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Por su parte, los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de celulosomas, destacando las bacterias *Clostridium* y *Ruminococcus* y los hongos *Anaeromyces mucronatus*, *Coecomyces communis* y *Cyllamyces aberencis*,



*Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp. (Lynd *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2009).

Los microorganismos aerobios producen celulasas con diferente especificidad y modos de acción, actuando con sinergismo para hidrolizar la celulosa. Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupados en tres componentes principales: las endo- $\beta$ -glucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), que cortan aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -glucosídicos en regiones amorfas de la celulosa, generando oligosacáridos de diferente tamaño y disminuyendo el largo de las cadenas con incremento de los azúcares reductores; las exo- $\beta$ -glucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas (CBHs, EC 3.2.1.91) que actúan sobre los extremos no reductores de las cadenas de celulosa, liberando glucosa o unidades de celobiosa y las  $\beta$ -glucosidasas o celobiasas (EC 3.2.1.21), que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa (Lynd *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2011).

Las celulasas son sintetizadas por una gran variedad de bacterias y hongos, pero relativamente pocos microorganismos pueden producir las enzimas necesarias para degradar la celulosa cristalina. Los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos y sus ventajas adaptativas. Las especies más estudiadas pertenecen al género *Trichoderma*, considerado uno de los mayores productores de enzimas, aunque especies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Neurospora*, también son buenos productores de celulasas. Por su parte, la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos generales de las celulasas han sido realizados usando *Trichoderma reesei*; sin embargo, la búsqueda de una eficiente y posiblemente mejor fuente de celulasas continúa, debido a la baja actividad  $\beta$ -glucosidasa, limitante de la velocidad y extensión de la hidrólisis (Ferrer *et al.*, 2011).

Las celulasas son inducibles, es decir, solamente son formadas en presencia del sustrato. Por tanto, la expresión de celulasas y hemicelulasas está controlada principalmente por las fuentes de carbono. En presencia de la D-glucosa la transcripción se encuentra reprimida, mientras que en ausencia de

ésta y en presencia de la celulosa la transcripción es fuertemente inducida. Aún más, las enzimas celulolíticas pueden co-inducirse por diversos mono y disacáridos, como soforosa, xylobiosa, lactosa, D-xylosa y L-sorbosa (Wainwright, 1995; Martínez *et al.*, 2008).

La molécula de lignina es muy compleja, tal que solo pocos microorganismos, principalmente hongos y actinomicetos poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo su biodegradación. Ésta parece implicar dos mecanismos: o bien la molécula es degradada a unidades más sencillas o se degradan *in situ* los dobles enlaces y las cadenas laterales. La aparición de compuestos como el ácido vainílico y el coniferaldehído durante las etapas tempranas de la degradación de la lignina sugiere que está implicado el primer mecanismo. El corte del anillo *in situ* ha sido también descrito. La secuencia de la degradación parece empezar con la demetilación, para producir ácidos difenólicos que poseen dos grupos hidroxilos adyacentes. Los anillos se abren luego por una dioxigenasa para originar una cadena alifática unida a la lignina y éstas cadenas a su vez se escinden del polímero, mediante una oxigenasa denominada lacasa. Las cadenas laterales son degradadas por oxidasas en forma similar. Una característica de la degradación de la lignina “es que es un proceso altamente oxidativo, descrito como una explosión de la molécula mediante reacciones de oxidación” (Wainwright, 1995; Cuervo *et al.*, 2009).

Entre los microorganismos degradadores de la madera constituida básicamente por lignina, celulosa, hemicelulosa y compuestos fenólicos, están los hongos pertenecientes a las subdivisiones Basidiomycotina y Ascomycotina. Por definición los descomponedores de la madera son aquellos causantes de la pérdida de peso y cambios estructurales, distinguiéndose tres tipos de pudrición: blanca, blanda y café. En la pudrición blanca los microorganismos degradan profunda y completamente los componentes lignocelulósicos. Se conocen dos formas: en una ocurre una deslignificación selectiva y las hemicelulosas (poliosas) y la lignina son atacadas en estados tempranos. En la otra forma, la lignina y los carbohidratos son atacados más o menos uniformemente. Esta pudrición es causada por *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* y en ambos casos la madera toma un color blanco descolorido. A su vez, la pudrición blanda ocurre cuando el daño microbiano es

muy superficial y la madera se torna húmeda y esponjosa, como en el ataque de *Aspergillus* sp. Por su parte, la pudrición café es causada por los microorganismos como *Fomitopsis pinicola*, que degradan las hemicelulosas, la celulosa despolimerizada y la lignina desmetilada (Saldarriaga & Pineda, 2001; Martínez *et al.*, 2008).

Los principales hongos implicados en la degradación de la lignina pertenecen al grupo de los hongos de la podredumbre blanca, siendo el más estudiado y conocido *Phanerochaete chrysosporium*. Los hongos descomponedores de la lignina se utilizan para la deslignificación en la producción de pulpa de madera para papel, en el blanqueo de la pulpa, en el tratamiento de los efluentes que contienen residuos derivados de la lignina y en la conversión de la lignina a productos químicos de valor comercial (Wainwright, 1995).

### **c. Biocombustibles**

Los biocombustibles líquidos son compuestos de la química orgánica (alcoholes, éteres, ésteres, ácidos grasos) producidos a partir de materia vegetal como las plantas herbáceas, oleaginosas y leñosas, residuos de la agricultura y actividad forestal, residuos residenciales, comerciales e industriales como los aceites comestibles que ya cumplieron su ciclo de uso y los subproductos o residuos grasos y aceitosos de la industria alimentaria y ganadera. La principal forma de utilización de los biocombustibles líquidos es como combustibles únicos o en mezcla en motores a gasolina y diesel. En el Perú se vienen utilizando los biocombustibles líquidos Alcohol Carburante y Biodiesel. Ambos contribuyen a la diversificación de la matriz energética y a la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero (MINEM, 2010).

En términos de la ley, alcohol carburante se define como el etanol anhidro desnaturalizado, obtenido de la mezcla del etanol anhidro con una sustancia desnaturalizante en capacidad volumétrica no inferior a 2 % ni superior a 3 % en el caso de ser gasolina sin contenido de plomo. A su vez, Gasohol es la mezcla que contiene gasolina (de 97, 98, 90, 84 octanos y otros según sea el caso) y alcohol carburante. Por su parte, el Biodiesel es el combustible compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de

cadena largas derivadas de recursos renovables como aceites vegetales o grasas animales para ser usados en motores de ciclo diesel. Cuando el biodiesel es puro, sin mezcla alguna y cumple con las especificaciones detalladas en las Normas Técnicas Peruanas se denomina Biodiesel B100. A su vez, Diesel BX es la mezcla que contiene Diesel N°2 y Biodiesel puro, donde X representa el porcentaje en base volumétrica de Biodiesel puro contenido en la mezcla, siendo el diferencial volumétrico el porcentaje de Diesel N°2 o Diesel con menos de 50 ppm de azufre (MINEM, 2010; MINEM, 2011 SPDA, 2011).

Tomando en cuenta el tipo de materia prima utilizada y la tecnología de conversión, los biocombustibles pueden ser de cuatro generaciones. Los de primera generación incluyen los producidos a partir de cultivos como maíz, caña de azúcar, remolacha, soya, palma, con tecnología sencillas como la fermentación (bioetanol) y la transesterificación (biodiesel). A su vez, los de segunda generación emplean diversas formas de biomasa lignocelulósica y tecnología no convencional. Por su parte, los de tercera generación utilizan cultivos energéticos especiales derivados o adaptados, a través de técnicas avanzadas de genética molecular y cultivos transgénicos para obtener mayor eficiencia en los procesos de conversión a biocombustibles. Por ejemplo, diseño de eucaliptos y álamos con bajo contenido de lignina o plantas con alto contenido de azúcares y aceite o tolerantes a la sequía. Finalmente, los de cuarta generación incorporan el concepto de bioenergía con balance negativo de carbono. La producción de agro energía y biocombustibles se combina con tecnologías de captura y almacenamiento de carbono en la materia y de la tecnología de proceso. Se trata principalmente de plantas que almacenen grandes cantidades de dióxido de carbono (MINEM, 2010).

#### **d. Marco legal**

El comité multisectorial de bioenergía conformado por el Ministerio de Agricultura, Ambiente, Energía y Minas, Producción así como por Industrias del Espino, MAPLE, PetroPerú, PROINVERSION REPSOL, Sociedad Nacional de Industrias y Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, teniendo como coordinador al Ministerio de Energía y Minas en su primer informe de 2010 y

segundo informe de 2011, mencionan la normatividad sobre los biocombustibles.

La ley 28054, Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles promulgada en 2003 estableció el marco general para promover dicha actividad con base a la libre competencia y acceso al mercado, con el objetivo de diversificar el mercado de biocombustibles, fomentar el desarrollo agropecuario y agroindustrial, así como generar empleo, disminuir los niveles de contaminación ambiental, además de constituir una alternativa ante el cultivo ilícito de la hoja de coca. Mediante el Reglamento de esta Ley, aprobado mediante Decreto Supremo N° 013-2005-EM se promovieron las inversiones para la producción y comercialización de biocombustibles, difundiendo las ventajas económicas, sociales y ambientales de su uso. Asimismo, se establecieron los requisitos técnicos de seguridad para su producción y distribución, de modo que salvaguarde la salud pública y el medio ambiente y coadyuve a la Estrategia Nacional de Lucha Contra las Drogas, promoviendo la inversión en cultivos alternativos en las zonas cocaleras del Perú.

Mediante Decreto Supremo N° 021-2007-EM se aprobó el Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles, el cual tiene como objetivo establecer los requisitos para la comercialización y distribución de los Biocombustibles, así como lo referente a las Normas Técnicas de Calidad del Alcohol Carburante, Biodiesel B100, Gasohol y Diesel BX. También se establece la obligación de comercialización de Biodiesel B100 mezclado con Diesel 2 en una proporción de 2 % (Diesel B2) a partir del 01 de enero de 2009 y de alcohol carburante en la gasolina en una proporción de 7,8 % (Gasohol) a partir del 01 de enero de 2010.

Mediante DS N° 091-2009-EM, se modificaron artículos del Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles y entre otras disposiciones se establece un cronograma para la implementación del uso de Gasohol de manera progresiva en el territorio nacional, iniciando el 01 de enero del 2010 en Piura y Chiclayo. Por su parte, la Ley 27446-Ley del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental (SEIA) establece un proceso uniforme que comprende los requerimientos, etapas y alcances de las evaluaciones del impacto ambiental de los proyectos de inversión. Su reglamento aprobado

mediante DS N°019-2009.MINAM establece un listado de inclusión de los proyectos de inversión sujetos al sistema. Así, en el referido listado se encuentran los proyectos de inversión de plantas de biocombustibles (biodiesel B100, alcohol carburante), correspondientes al Subsector Industrial del Ministerio de la Producción, en su condición de entidad competente, conforme al artículo N°18 de la Ley del SEIA.

Según la normatividad, la producción y uso de biocombustibles es de carácter multisectorial y entre los organismos competentes se encuentran el Ministerio de Agricultura-MINAG (provee las áreas disponibles con actitud agrícola para la producción de biocombustibles), el Ministerio de Energía y Minas-MINEM (autoriza la comercialización de biocombustibles y sus mezclas con gasolina y el diesel 2), el PRODUCE (autoriza la instalación y funcionamiento de las plantas productoras de biocombustibles), Pro Inversiones (promueve los proyectos PROBIOCH y PROAMAZONIA) y el Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería – OSINERMIN (controla y fiscaliza).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por muestras de bagazo de caña de azúcar, hongos filamentosos nativos y un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

Se consideró como población a los hongos filamentosos presentes en el bagazo de caña de azúcar de las agroindustrias de producción azucarera Pucalá y Tumán en Lambayeque y se trabajó con los hongos aislados de 96 muestras, cifra que fue calculada según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), con una prevalencia de 96 %, determinada por los autores en un muestreo piloto (Anexo 1).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Variables en estudio**

Las variables cualitativas fueron los hongos filamentosos nativos degradadores de lignina y celulosa.

### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla (Alvitres, 2000), según el cual se aislaron e identificaron los hongos filamentosos, se seleccionaron hongos lignocelulolíticos, se valoró la actividad celulolítica en papel filtro, se cuantificó la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar y se determinó el rendimiento alcohólico.

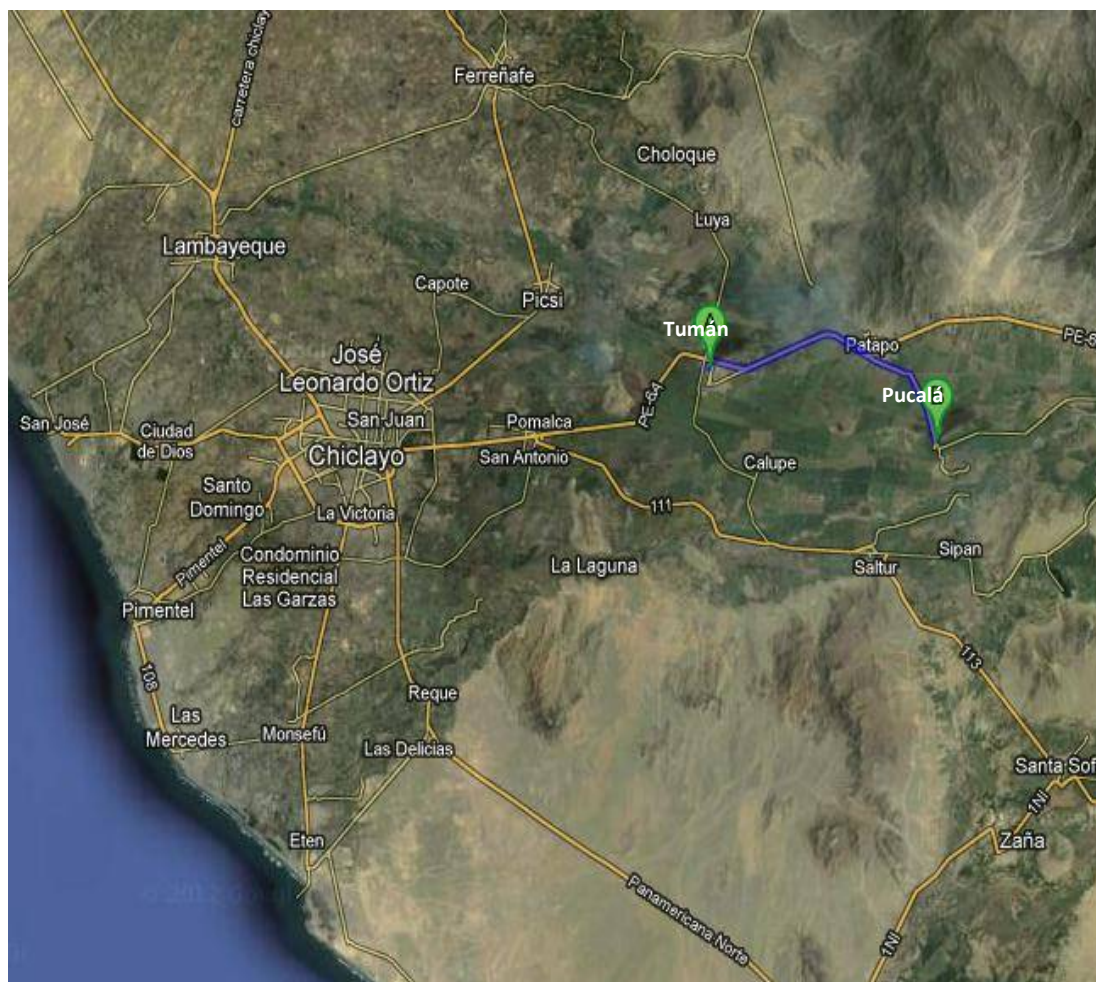
### **3.2.3 Lugar de muestreo**

Para el aislamiento de hongos filamentosos se colectaron 96 muestras de bagazo de caña de azúcar, de los montículos acopiados en las agroindustrias de producción azucarera Tumán y Pucalá en Lambayeque (Figura 1). La empresa Agroindustrial Tumán está ubicada en el distrito de Tumán, entre las coordenadas 6° 44' 47" latitud sur y 79° 42' 16" longitud oeste. A su vez, la empresa agroindustrial Pucalá está en el distrito de Pucalá, entre las coordenadas 6° 35' y 6° 48' latitud sur y 79° 21' a 79° 4' longitud oeste (PCM-ONGEI, 2013).

### **3.2.4 Obtención de las muestras de bagazo de caña de azúcar**

En los montículos de bagazo de caña de azúcar, a 25 cm de profundidad (Figuras 2, 3), se colectaron aproximadamente 20 g de residuos con signos de degradación, se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 4), debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron para su procesamiento en la sección Biotecnología Microbiana del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.





**Figura 1.** Ubicación geográfica de las empresas de producción agroindustrial Tumán y Pucalá en Lambayeque, 2012 (<https://maps.google.com.pe>).



**Figura 2.** Montículo de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” en la Empresa Agroindustrial Tumán, 2012.



**Figura 3.** Obtención de muestra de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.





**Figura 4.** Muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” para el aislamiento de hongos filamentosos.

### **3.2.5 Pretratamiento de las muestras de bagazo de caña de azúcar**

El bagazo de caña de azúcar fue cortado en fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> (Figuras 5, 6) y del material obtenido se tomaron 5 g y se depositaron en frascos con 50 mL de agua destilada esterilizada más Tween 80 al 0,1 % (Figura 7). A continuación, la suspensión se homogenizó manualmente durante 15 minutos para favorecer el desprendimiento de esporas y fragmentos de hifas.

### **3.2.6 Aislamiento de hongos filamentosos**

Para el aislamiento de los hongos filamentosos según Carreño & Flores (2003), de cada suspensión acuosa de bagazo, se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría sobre agar papa dextrosa (PDA) más cloranfenicol (Anexo 2) y se incubó en aerobiosis a 30 °C, durante 5 días. A continuación, las colonias desarrolladas (Figura 8) fueron agrupadas con base a su morfología, se seleccionó una representativa de cada grupo y éstas fueron cultivadas en PDA a 30 °C, por 72 horas, constituyendo los cultivos puros de hongos filamentosos (Figura 9) que se guardaron en refrigeración a 8 °C.

### **3.2.7 Identificación de hongos filamentosos**

Para identificar los hongos filamentosos nativos según Barnett & Hunter (1999), los cultivos puros se sembraron en PDA a 30 °C, por 72 horas determinándose las características macroscópicas de las colonias. A continuación, según Labarca *et al.* (2006) se utilizó la técnica de “impresión con cinta adhesiva transparente” (Figuras 10, 11), para determinar las características microscópicas del micelio vegetativo y las estructuras reproductivas. Sobre la colonia de cada hongo se depositó cuidadosamente un fragmento de cinta adhesiva de 6 cm de longitud y después éste se llevó a una lámina portaobjetos conteniendo una gota de azul de lactofenol, se presionó suavemente y se observó con objetivo de 40x.



**Figura 5.** Fragmentación de las muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.

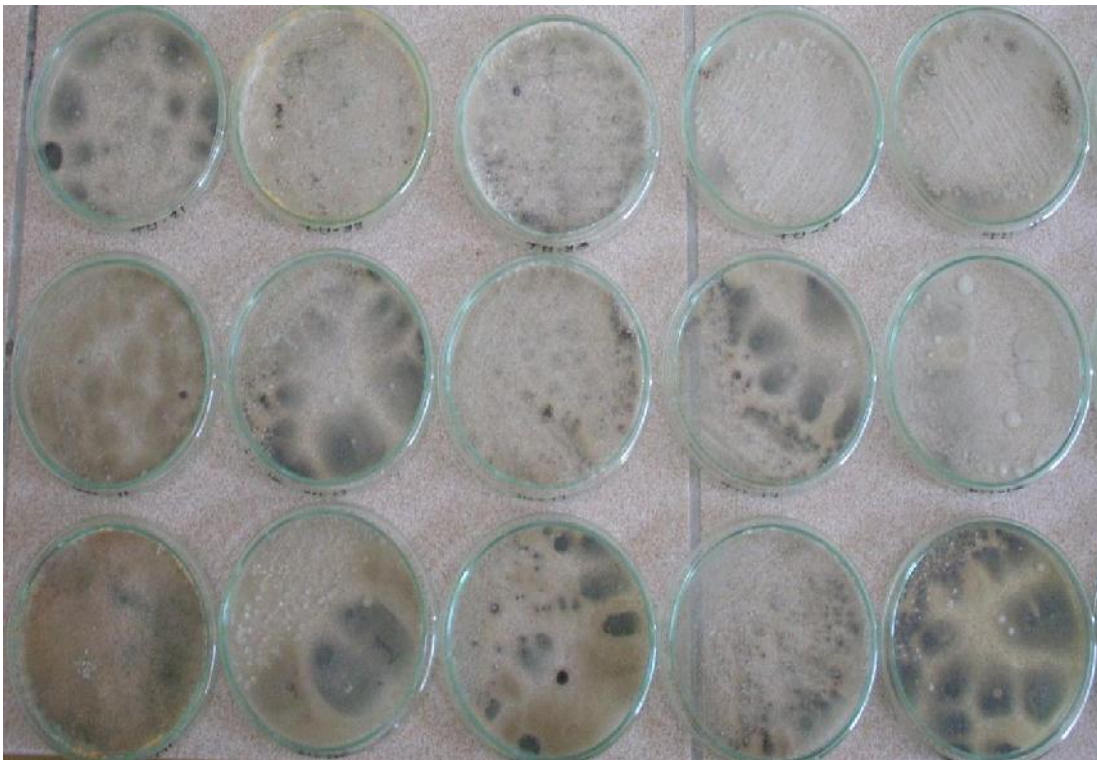


**Figura 6.** Muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” fragmentadas para el aislamiento de hongos filamentosos.





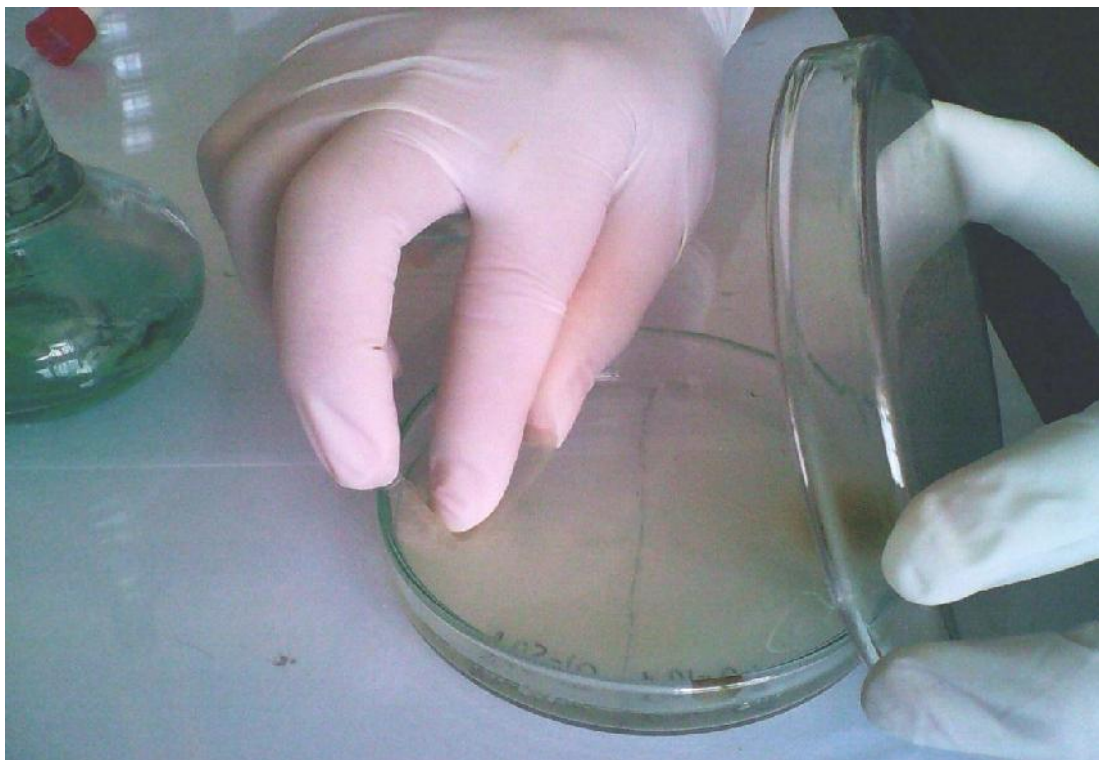
**Figura 7.** Suspensiones de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” en agua destilada esterilizada más Tween 80.



**Figura 8.** Hongos filamentosos desarrollados en agar papa dextrosa más cloranfenicol.



**Figura 9.** Cultivos puros de hongos filamentosos nativos.



**Figura 10.** Impresión con cinta adhesiva en el centro de la colonia fúngica.





**Figura 11.** Cinta adhesiva sobre lámina portaobjeto con una gota de azul de lactofenol.



### **3.2.8 Detección de hongos filamentosos lignocelulolíticos**

Según Saldarriaga & Pineda (2001), los hongos filamentosos nativos fueron cultivados en PDA a 30 °C, por 72 horas. A continuación, un fragmento (0,5 cm) del micelio se sembró en el centro de frascos de vidrio con 15 mL de agar extracto de malta 2,5 % (Anexo 3) y se incubó a 30 °C, por 1 semana. Después, se tomó un bloque de madera de *Pinus* sp. “pino” de 4 x 1 x 0,5 cm previamente esterilizado en autoclave y se depositó en el extremo final del medio de cultivo, tal que se mantuvo un ángulo de  $\pm 45^\circ$  de separación respecto a la superficie (Figuras 12, 13, 14). Después de la incubación a 30 °C por 15 días, se investigó el desarrollo de los hongos sobre los bloques de madera, considerándose como lignocelulolíticos aquellos que formaron micelio visible macroscópicamente.

### **3.2.9 Valoración indirecta de la degradación de lignocelulosa**

Según la metodología de Saldarriaga & Pineda (2001), modificada por los autores, en frascos de vidrio conteniendo 25 mL de agar agua (Anexo 4) inclinado, se depositó una capa superficial de 0,5 mL de agar extracto de malta 2,5 % y sobre ésta se sembró un fragmento (0,5 cm) del micelio del hongo filamentoso previamente seleccionado (Figuras 15, 16, 17). Después de 72 horas de incubación a 30 °C, se depositó un bloque de madera y se incubó a 30 °C, durante 2 meses (Figuras 18, 19). Para valorar la degradación a los 15, 30 y 60 días, se observó el desarrollo del micelio sobre el bloque de madera, calificándolo según una escala convencional elaborada por los autores donde 0 – 25 % del área colonizada correspondió a colonización escasa, 26 – 50 % a colonización regular y 51 – 100 % a colonización buena.



**Figura 12.** Hongos filamentosos nativos desarrollados en agar extracto de malta durante 7 días.



**Figura 13.** Bloques de madera esterilizados en autoclave.



**Figura 14.** Bloques de madera depositados en el medio de cultivo, manteniendo un ángulo de  $45^\circ$  de separación respecto a la superficie.





**Figura 15.** Adición de una capa superficial de agar extracto de malta sobre agar agua inclinado.



**Figura 16.** Agar agua con una capa superficial de agar extracto de malta.

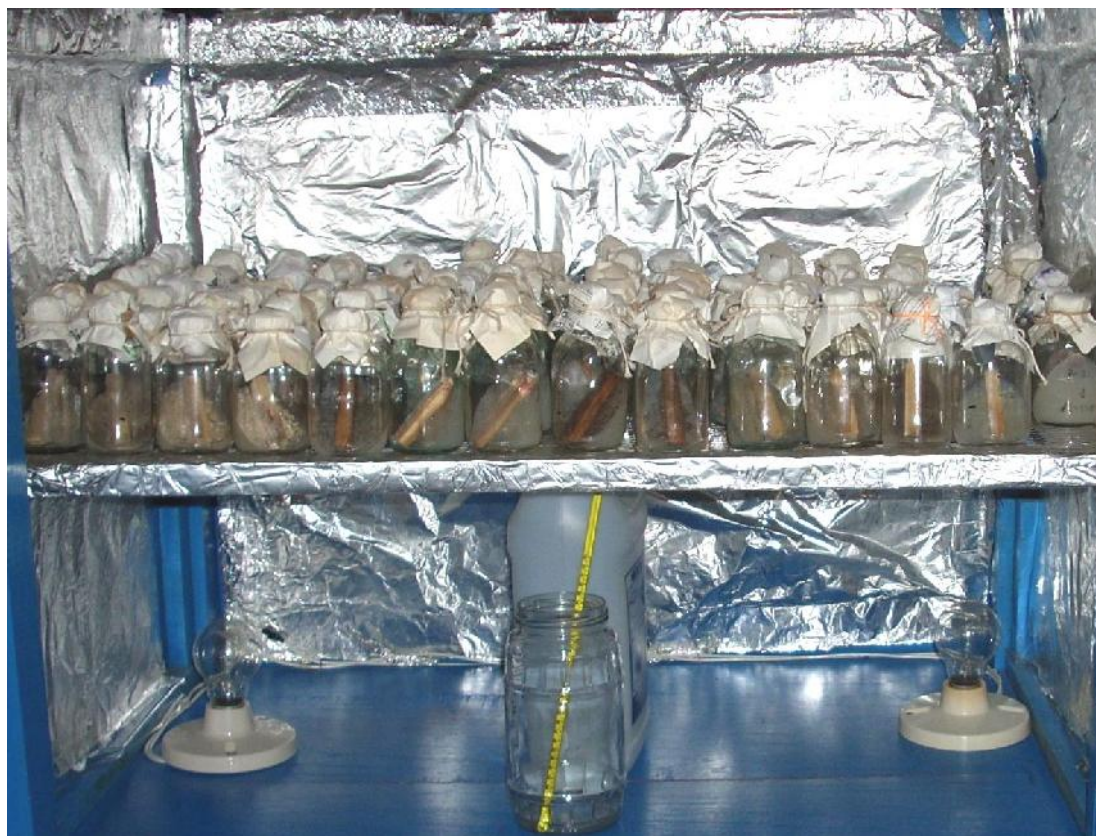


**Figura 17.** Hongos filamentosos nativos desarrollados sobre agar agua con una capa superficial de agar extracto de malta.



**Figura 18.** Bloques de madera depositados sobre el micelio fúngico.





**Figura 19.** Incubación de hongos filamentosos para la investigación de la degradación de lignocelulosa.

## **Escala convencional para calificar la colonización del bloque de madera**

<b>Área colonizada (%)</b>	<b>Calificativo</b>
0 - 25	Escasa
26 – 50	Regular
51 - 100	Buena

### **3.2.10 Selección preliminar de hongos lignocelulolíticos**

Los hongos filamentosos que colonizaron 51 – 100 % del área del bloque de madera a los 60 días fueron seleccionados para la siguiente fase de la investigación.

### **3.2.11 Valoración de la degradación del papel filtro**

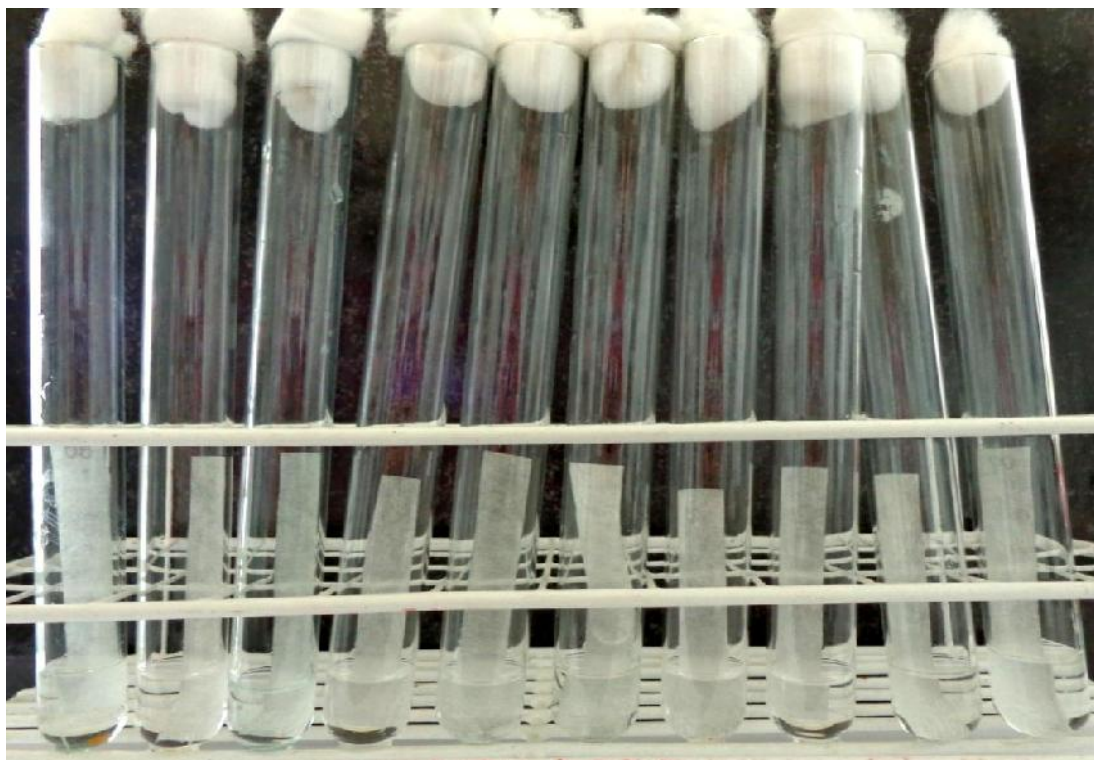
Según la metodología de Constantino & Manayay (2005) modificada por los autores, se realizó la valoración de la degradación del papel filtro calificando el área colonizada y degradada y determinando el peso perdido.

#### **a. Obtención del inóculo**

Cada hongo filamentoso nativo se cultivó en PDA a 30 °C, por 72 horas y luego se obtuvo una suspensión de conidios en solución salina esterilizada (NaCl 0,87 % p/v), que se estandarizó a  $2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>, con ayuda de la cámara de conteo de Levy con el rayado de Neubauer.

#### **b. Siembra de hongos filamentosos nativos en papel filtro**

En tubos de ensayo de 20 mL de capacidad conteniendo 2 mL de caldo Sales Minerales (Anexo 5), se depositaron verticalmente tiras de papel filtro Whatman N° 1, de 6 x 1 cm (Figura 20), con un peso inicial previamente conocido (Pi). A continuación, cuidadosamente se inocularon 0,2 mL de la suspensión de conidios, tratando que se distribuya uniformemente en el papel filtro (Figura 21) y los tubos fueron incubados a 30° C, con agitación diaria durante 15 minutos, por 25 días.



**Figura 20.** Caldo Sales Minerales con tiras de papel filtro Whatman.



**Figura 21.** Caldo sales minerales con papel filtro inoculado con hongos filamentosos.



### **c. Calificación del área del papel filtro colonizada**

Para valorar el área del papel filtro colonizada por los hongos filamentosos, transcurridos 25 días de incubación se observó el desarrollo del micelio sobre el papel filtro (Figura 22) y se calificó con una escala convencional, donde 0 – 50 % del área colonizada correspondió a colonización escasa, 51 – 80 % a regular y 81 – 100 % a colonización buena.

#### **Escala convencional para calificar la colonización del papel filtro**

<b>Área de papel filtro con micelio (%)</b>	<b>Calificativo</b>
0 – 50	Escasa
51 – 80	Regular
81 – 100	Buena

### **d. Calificación del área del papel filtro degradada**

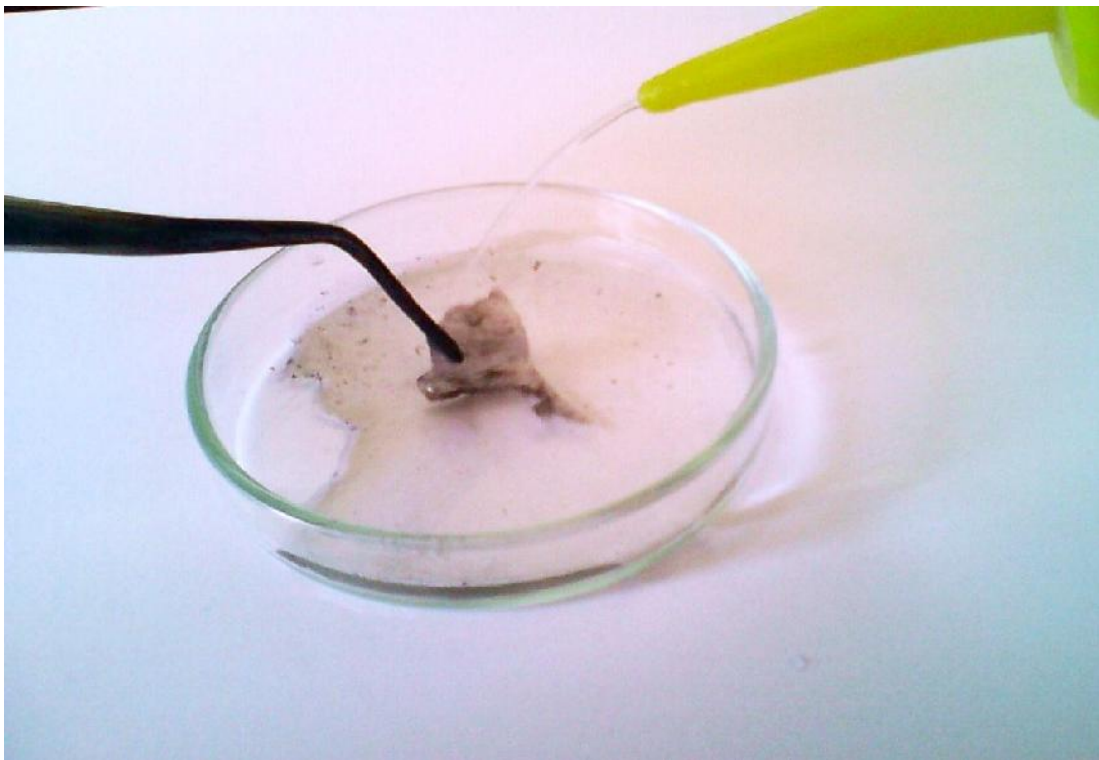
Para valorar el área del papel filtro degradada por los hongos filamentosos, cada papel fue extraído con ayuda del asa micológica y con una piseta el micelio adherido fue retirado cuidadosamente (Figura 23). Luego, se observó el porcentaje del área degradada y se calificó con una escala convencional, donde 0 % del área degradada correspondió a un calificativo de degradación no observable, 1 – 40 % a regular, 41 – 80 % a buena y 81 – 100 % a degradación muy buena.

#### **Escala convencional para calificar la degradación del papel filtro**

<b>Área del papel filtro degradada (%)</b>	<b>Calificativo</b>
0	No observable
1 – 40	Regular
41 – 80	Buena
81 – 100	Muy buena



**Figura 22.** Desarrollo de hongos filamentosos sobre papel filtro Whatman.



**Figura 23.** Desprendimiento del micelio fúngico adherido al papel filtro.

#### **e. Determinación de la pérdida de peso del papel filtro**

Para determinar la pérdida de peso del papel filtro, cada papel filtro fue secado en estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante y después fue pesado, Pf (Figura 24). La diferencia entre el peso inicial y final se expresó como porcentaje de peso perdido (Anexo 6).

### **3.2.12 Cuantificación de la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar**

#### **a. Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar**

Se realizó el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar, para lo cual se pesaron 250 g, se lavaron tres veces con agua potable, se enjuagaron cinco veces con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente por 1 semana y luego fueron molidos en fragmentos de 0,1 cm<sup>2</sup> (Figuras 25 a 29). Posteriormente, fue utilizado como fuente de carbono en la preparación del caldo de fermentación con sales minerales (Anexo 7).

#### **b. Proceso fermentativo**

Cada hongo filamentoso seleccionado fue cultivado en PDA a 30 °C durante 5 días y luego se obtuvo una suspensión de conidios, que se estandarizó a  $2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> mediante la cámara Levy con el rayado de Neubauer. A continuación, en matraces de 50 mL de capacidad con 25 mL de caldo sales minerales más 0,25 g de bagazo de caña pretratado se inoculó 1 mL de la suspensión de conidios (Figura 30), se homogenizó y se incubó a 30 °C, con agitación manual por 15 minutos diarios. Posteriormente, la glucosa (mg dL<sup>-1</sup>) liberada por la hidrólisis de la lignocelulosa a las 24, 48 y 72 horas fue cuantificada utilizando el método de Glucosa Oxidasa (Figura 31, anexo 8).

### **3.2.13 Selección de un hongo filamentoso nativo**

Con base a la concentración de glucosa liberada por la hidrólisis de la lignocelulosa presente en el bagazo de caña de azúcar, se seleccionó el hongo filamentoso nativo que alcanzó la mayor concentración de glucosa en el menor tiempo posible.



**Figura 24.** Obtención del peso del papel filtro degradado.



**Figura 25.** Bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” lavado con agua destilada.





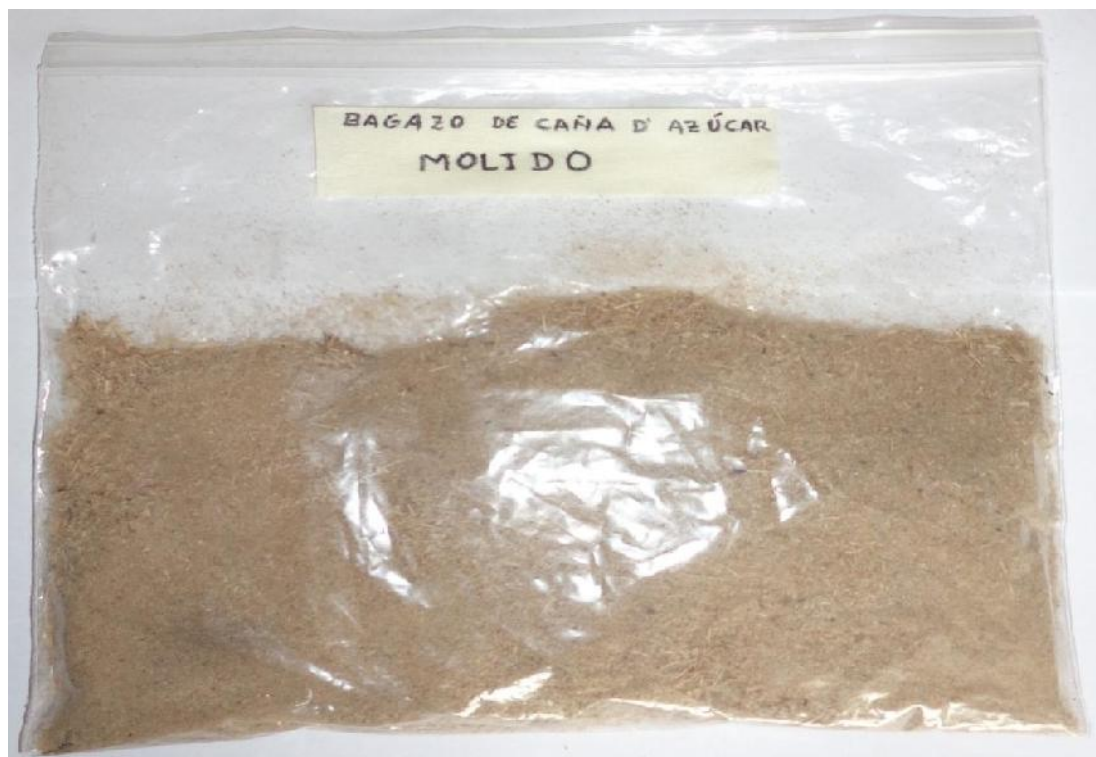
**Figura 26.** Secado del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” a temperatura ambiente.



**Figura 27.** Bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” deshidratado.



**Figura 28.** Molienda de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”



**Figura 29.** Bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” pretratado.





**Figura 30.** Proceso fermentativo para la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.



**Figura 31.** Prueba de glucosa oxidasa en los hidrolizados de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.

### **3.2.14 Determinación del rendimiento alcohólico de bagazo de caña hidrolizado por un hongo filamentoso nativo**

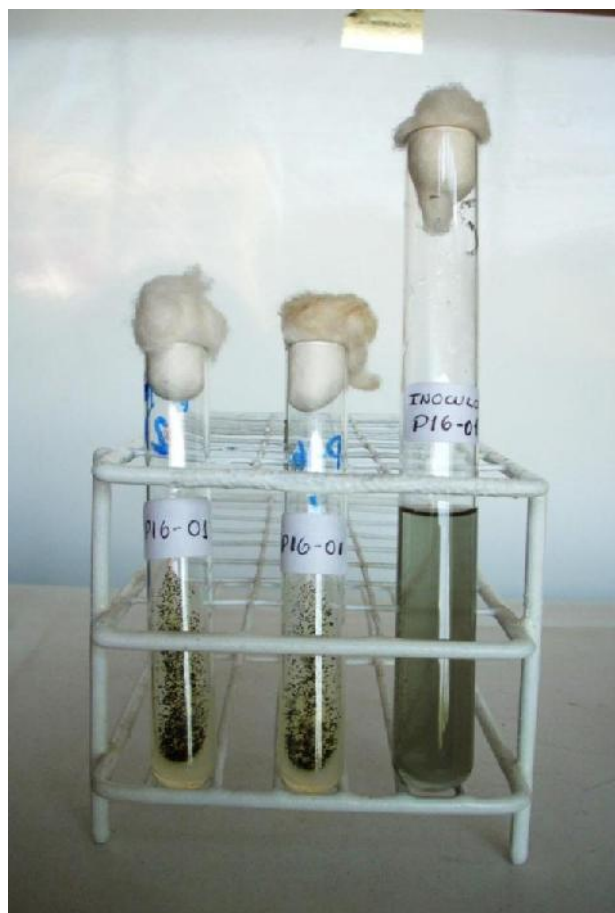
El hongo filamentoso nativo seleccionado se cultivó en PDA durante 5 días, luego se obtuvo y se estandarizó una suspensión de conidios con  $2 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 32) mediante la cámara de Levy con el rayado de Neubauer. Posteriormente, en tres frascos de 500 mL de capacidad con 350 mL de caldo sales minerales más 3,5 g de bagazo de caña de azúcar pretratado, se inoculó 1 mL de la suspensión de conidios, los frascos se incubaron por 24 horas a 30 °C (Figura 33). Después, se tomaron muestras de 5 mL del caldo fermentado para cuantificar la glucosa por el método de glucosa oxidasa (Figura 34) y en simultaneo los caldos fueron inoculados con una suspensión estandarizada de  $2 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *Sacharomyces cerevisiae*, incubándose en anaerobiosis, a 30 °C, por 72 horas (Figuras 35, 36, 37).

Finalizada la incubación, los caldos fermentados fueron filtrados y destilados durante 90 minutos (Figura 38). Al producto de la destilación se le determinó el grado alcohólico utilizando un vinómetro (Figura 39) y finalmente se calculó el rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por un hongo filamentoso nativo lignocelulolítico.

### **3.3 Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron determinar la capacidad lignocelulolítica de los hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol celulósico. En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2010.

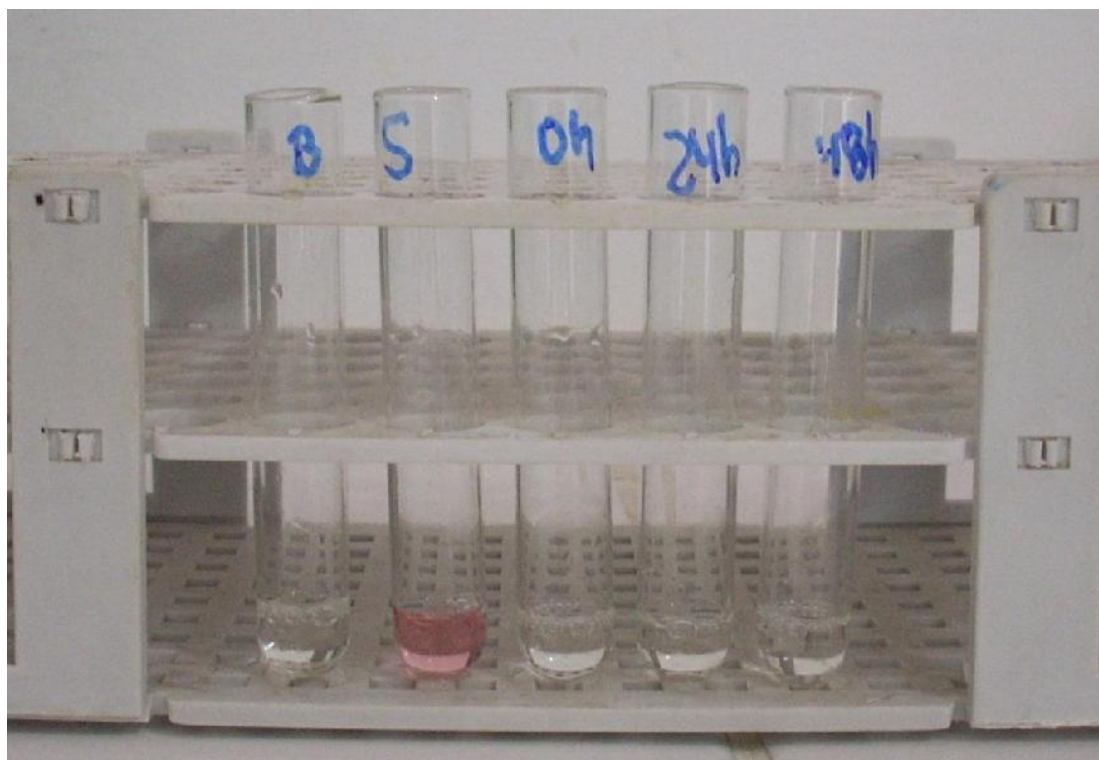




**Figura 32.** Suspensión de conidios de hongo filamentoso lignocelulolítico.



**Figura 33.** Caldo sales minerales con bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” inoculado con hongos filamentosos lignocelulolíticos nativos.



**Figura 34.** Prueba de glucosa oxidasa en hidrolizados de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” por 0, 24 y 48 horas.



**Figura 35.** Suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* en azul de metileno.



**Figura 36.** Cámara de conteo de Levy con el rayado de Neubauer cargada con suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*.





**Figura 37.** Fermentación alcohólica del hidrolizado de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.



**Figura 38.** Destilación del filtrado obtenido de la fermentación alcohólica.



**Figura 39.** Utilización del vinómetro en la medición del grado alcohólico del destilado obtenido.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Hongos filamentosos aislados e identificados del bagazo de caña de azúcar

El 96.9 % (93) de las muestras de bagazo de caña de azúcar fue positivo al aislamiento de hongos filamentosos (Figura 40), obteniéndose 171 cultivos puros.

Se identificaron 14 géneros de hongos filamentosos nativos, siendo los más frecuentes *Aspergillus* sp. con 39,18 % (67) y *Paecilomyces* sp. con 35,67 %. Las menores frecuencias correspondieron a *Cladosporium* sp. (8,19 %); *Trichoderma* sp. (5,26 %); *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. (2,93 %); *Mucor* sp. y *Monilia* sp. (1,18 %); así como *Cephalosporium* sp., *Trichocladium* sp., *Verticillium* sp., *Memnoniella* sp., *Colletotrichum* sp. y *Chrysosporium* sp. (0,58 %) respectivamente (Tabla 1, figuras 41 a 47).

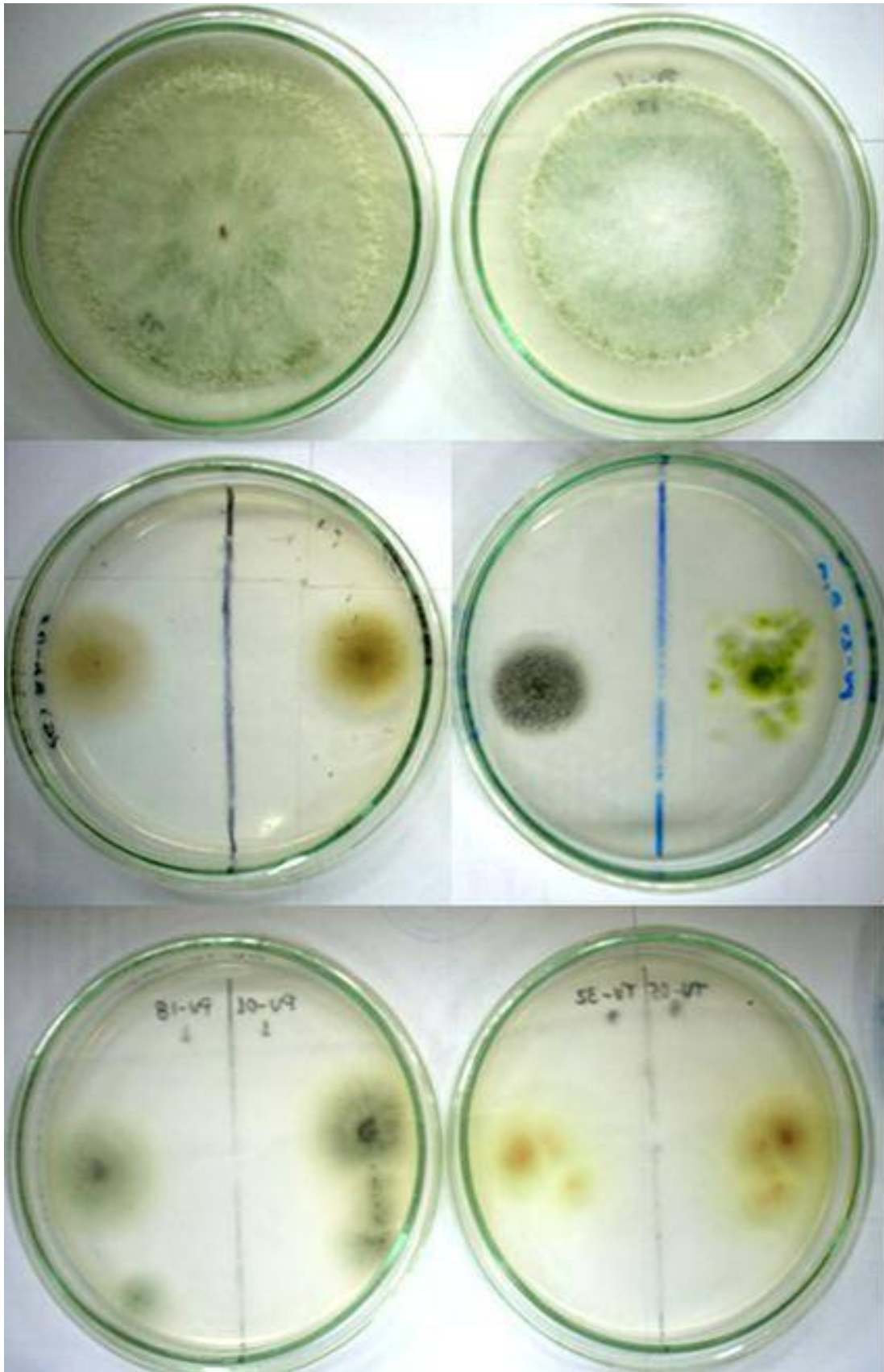


**Figura 40.** Frecuencia de muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” positivas al aislamiento de hongos filamentosos en Lambayeque, 2013.

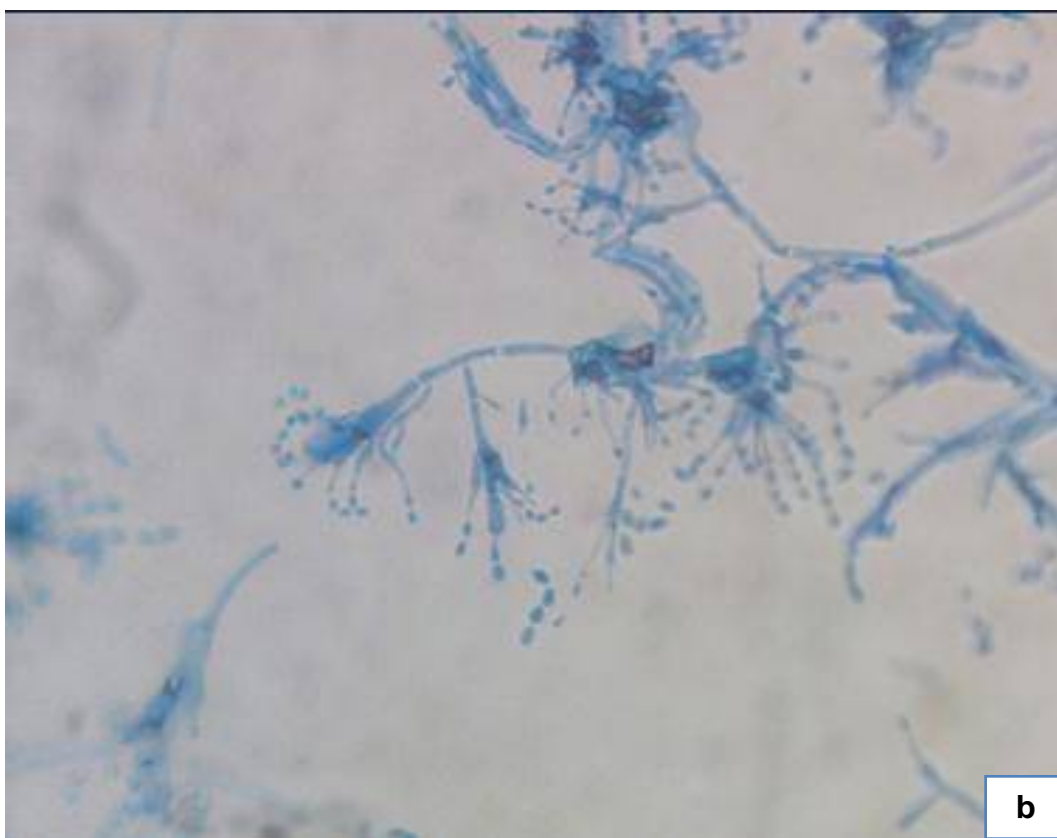
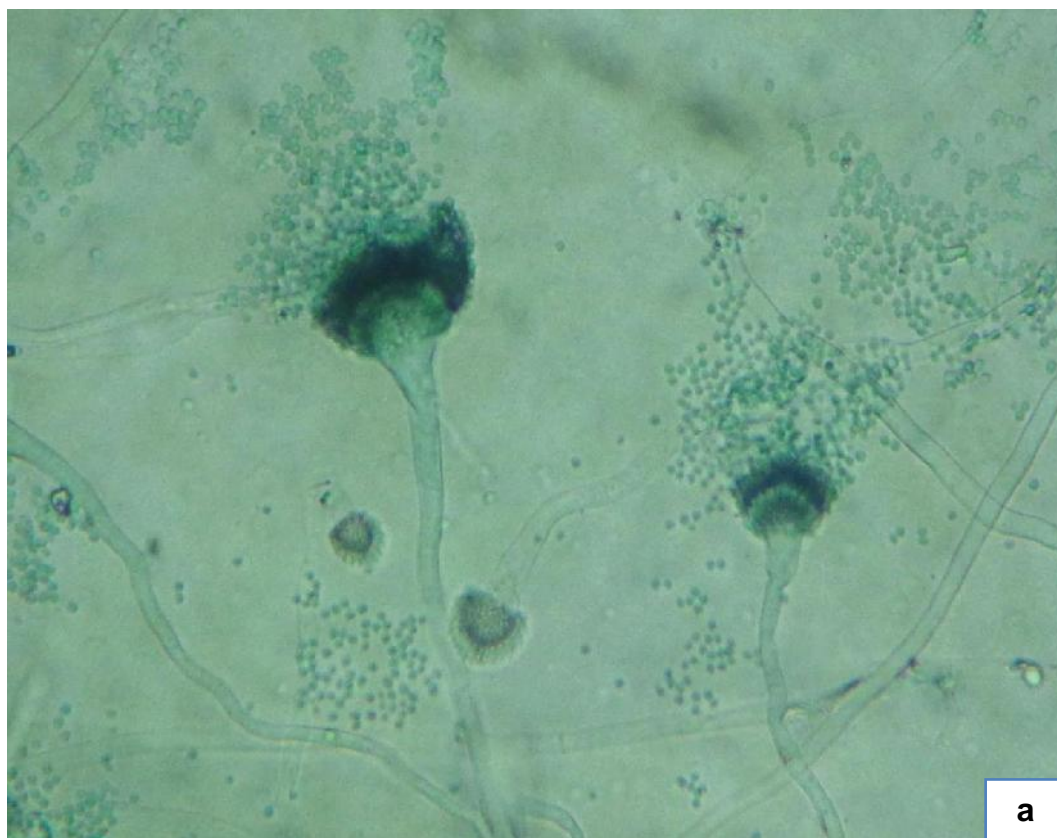
**Tabla 1.** Hongos filamentosos identificados en bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”, 2013.

Hongos filamentosos	Cultivos	
	Número	%
<i>Aspergillus</i> sp.	67	39,18
<i>Paecilomyces</i> sp.	61	35,67
<i>Cladosporium</i> sp.	14	8,19
<i>Trichoderma</i> sp.	9	5,26
<i>Penicillium</i> sp.	5	2,93
<i>Rhizopus</i> sp.	5	2,93
<i>Mucor</i> sp.	2	1,18
<i>Monilia</i> sp.	2	1,18
<i>Cephalosporium</i> sp	1	0,58
<i>Trichocladium</i> sp.	1	0,58
<i>Verticillium</i> sp.	1	0,58
<i>Memnoniella</i> sp.	1	0,58
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	0,58
<i>Chrysosporium</i> sp.	1	0,58

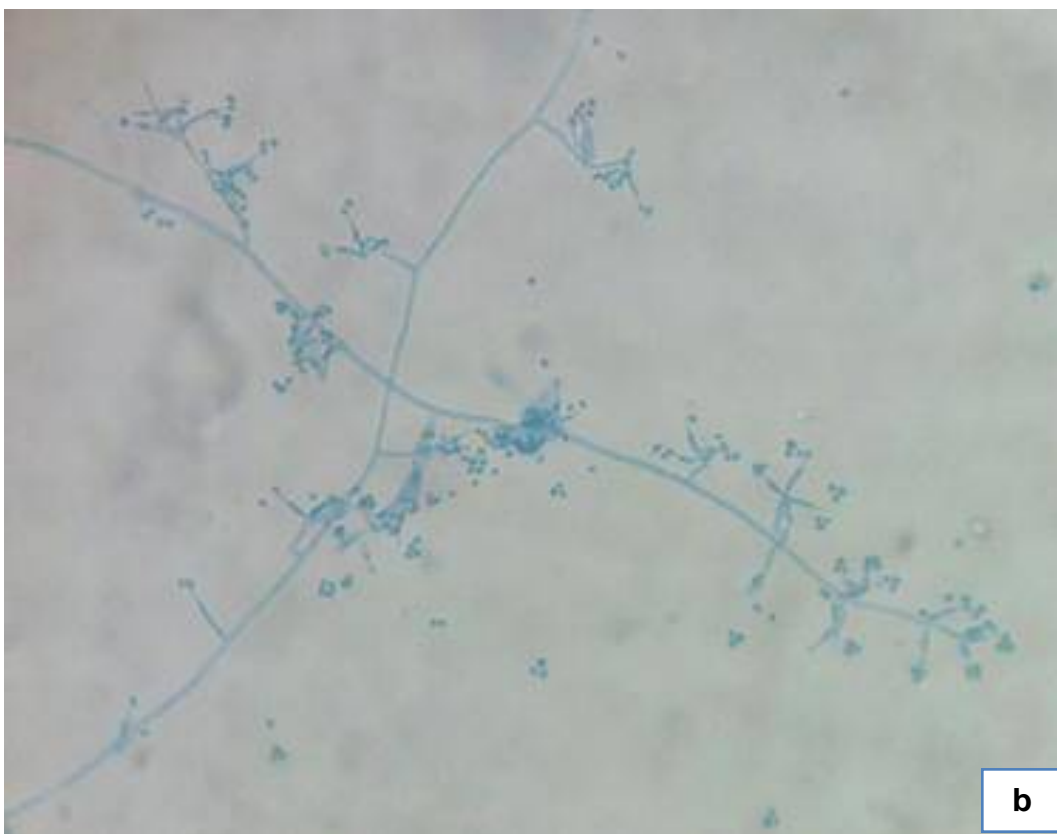




**Figura 41.** Hongos filamentosos nativos desarrollados en agar papa dextrosa.

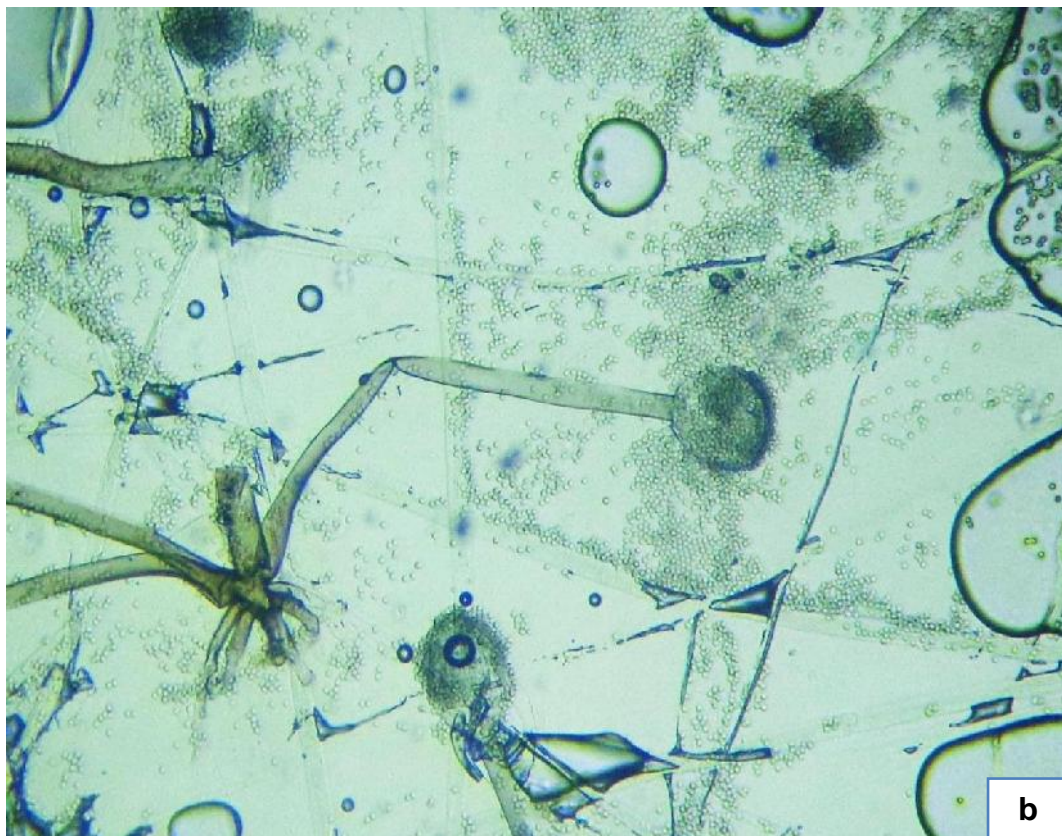
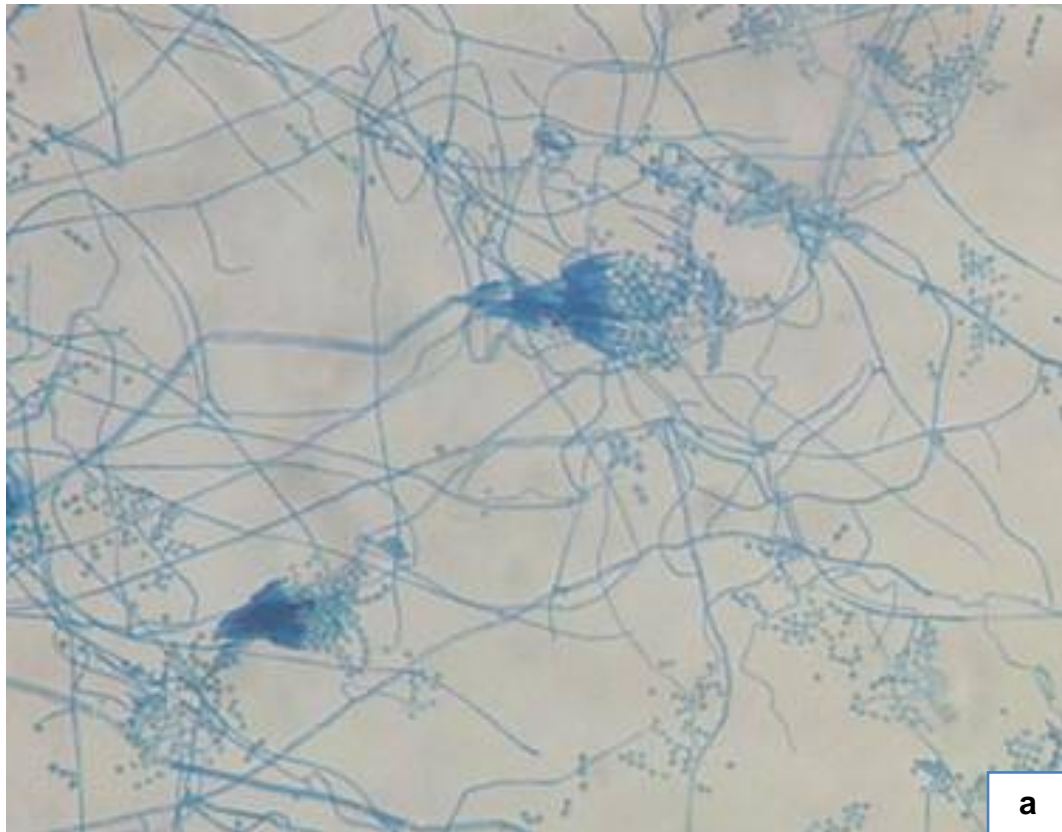


**Figura 42.** Observación microscópica (400x) de *Aspergillus* sp. (a) y *Paecilomyces* sp. (b).

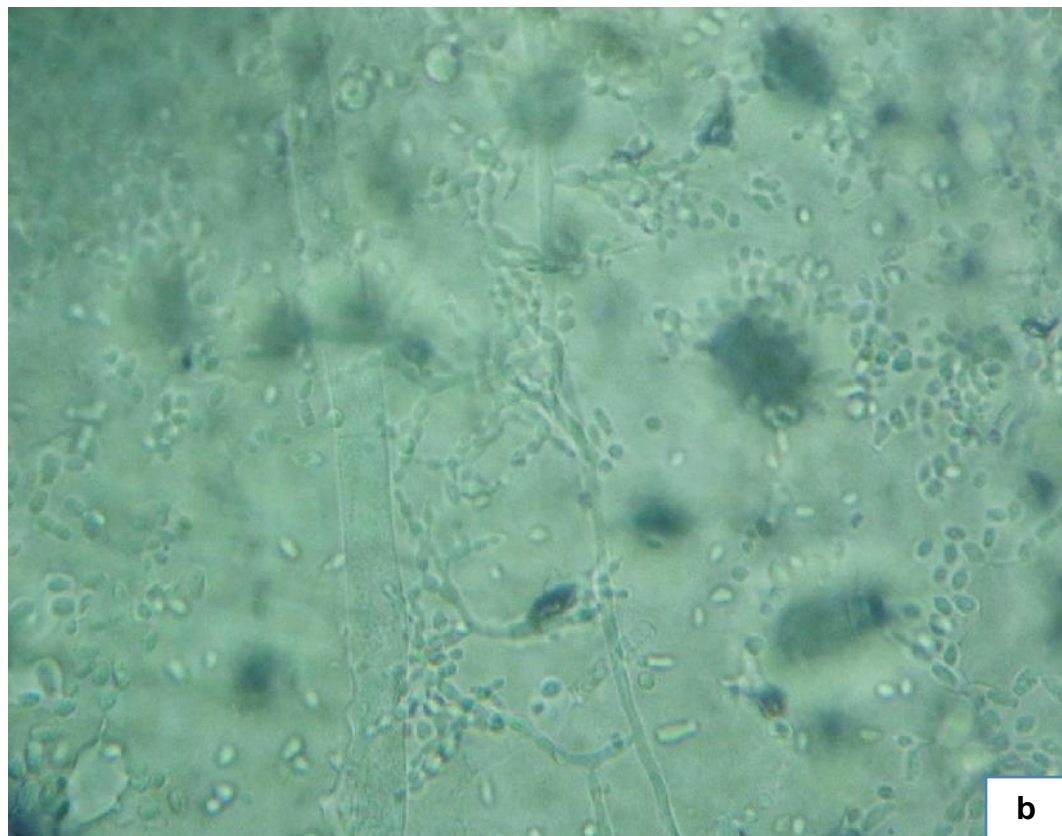


**Figura 43.** Observación microscópica (400x) de *Cladosporium* sp. (a) y *Trichoderma* sp. (b).

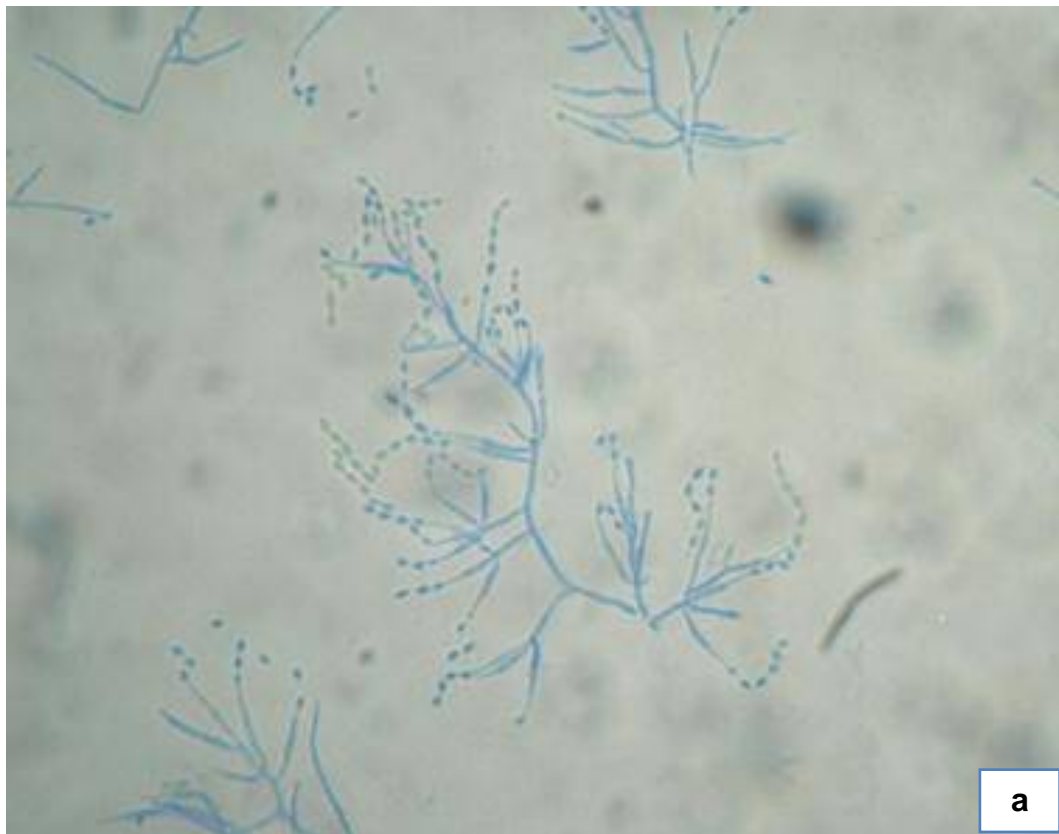




**Figura 44.** Observación microscópica (400x) de *Penicillium* sp. (a) y *Rhizopus* sp. (b).

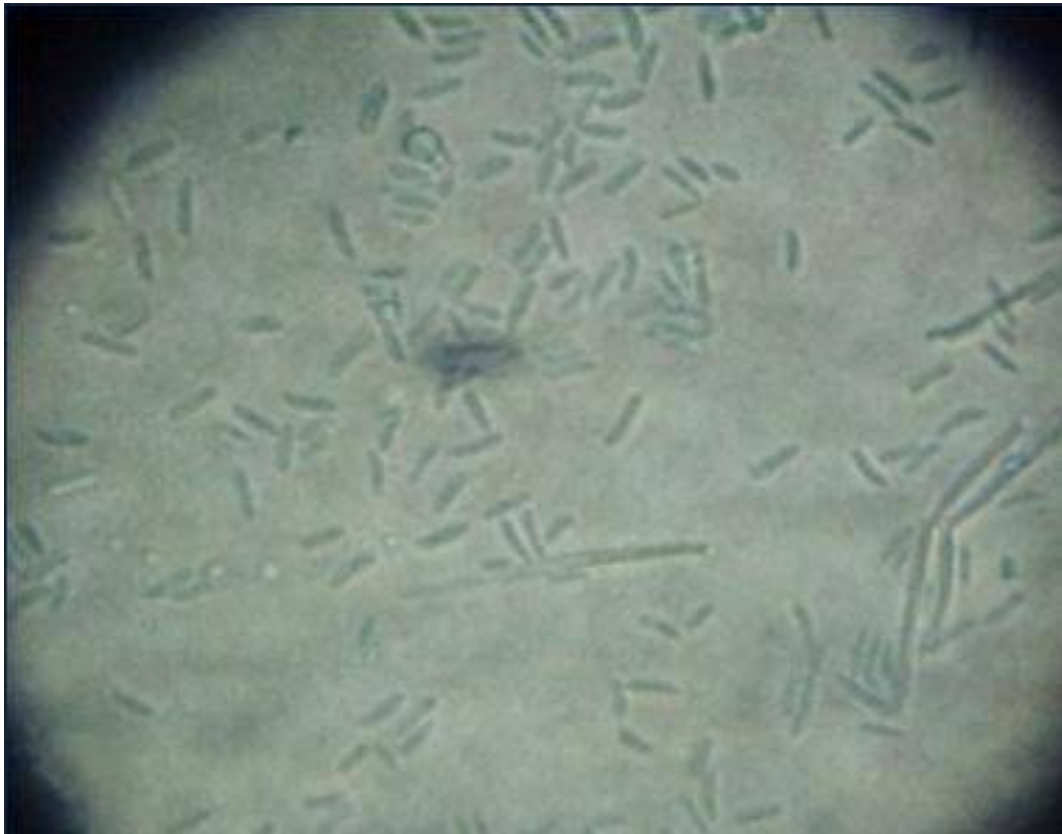


**Figura 45.** Observación microscópica (400x) de *Mucor* sp. (a) y *Monilia* sp. (b).



**Figura 46.** Observación microscópica (400x) de *Cephalosporium* sp. (a) y *Trichocladium* sp. (b).





**Figura 47.** Observación microscópica (400x) de *Colletotrichum* sp.

## **4.2 Hongos filamentosos lignocelulolíticos seleccionados**

El 62,57 % (107) de los hongos filamentosos nativos formaron micelio visible sobre el bloque de madera después de 15 días de incubación (Figuras 48, 49), considerándose lignocelulolíticos (Figura 50, tabla 2).

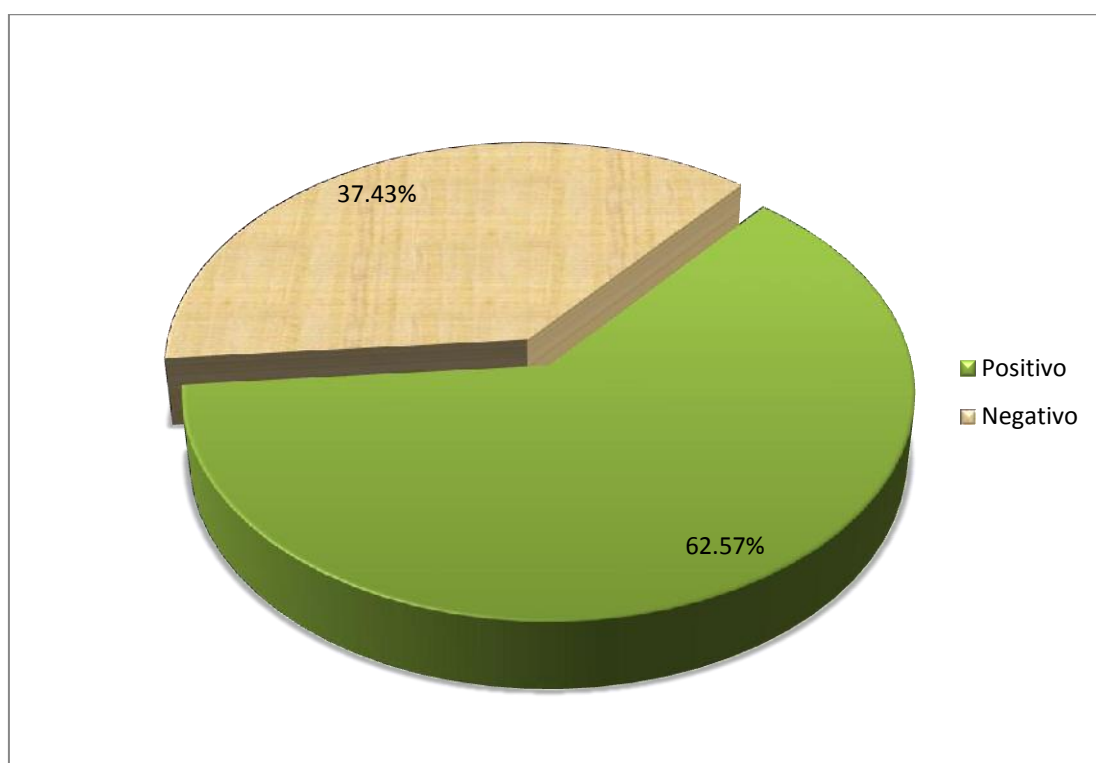
En la valoración indirecta de la degradación de lignocelulosa (Figura 51), el porcentaje de hongos con buena colonización del bloque de madera fue de 27,10 % después de 15 días, 44,86 % después de 30 días y 48,60 % después de 60 días de incubación (Figuras 52, 53, 54, anexo 9). Debido a que presentaron una buena colonización del bloque de madera, fueron seleccionados 52 hongos filamentosos nativos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Tabla 3).

## **4.3 Actividad celulolítica de los hongos filamentosos nativos degradadores de papel filtro**

El 5,77 % (3) de los hongos filamentosos nativos correspondientes a tres cultivos de *Aspergillus* sp. presentaron una buena colonización del papel filtro (Figuras 55, 56, tabla 4). Por su parte, 9,62 % (5) de los hongos correspondientes a tres cultivos de *Aspergillus* sp. y dos de *Trichoderma* sp. evidenciaron buena degradación del papel filtro (Figuras 57, 58, tabla 5). A su vez, el porcentaje de pérdida de peso del papel filtro osciló entre 12,5 a 71,43 %. El mayor valor (71,43 %) se registró con *Trichoderma* sp. P10 y P39 (Tabla 6).

## **4.4 Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar**

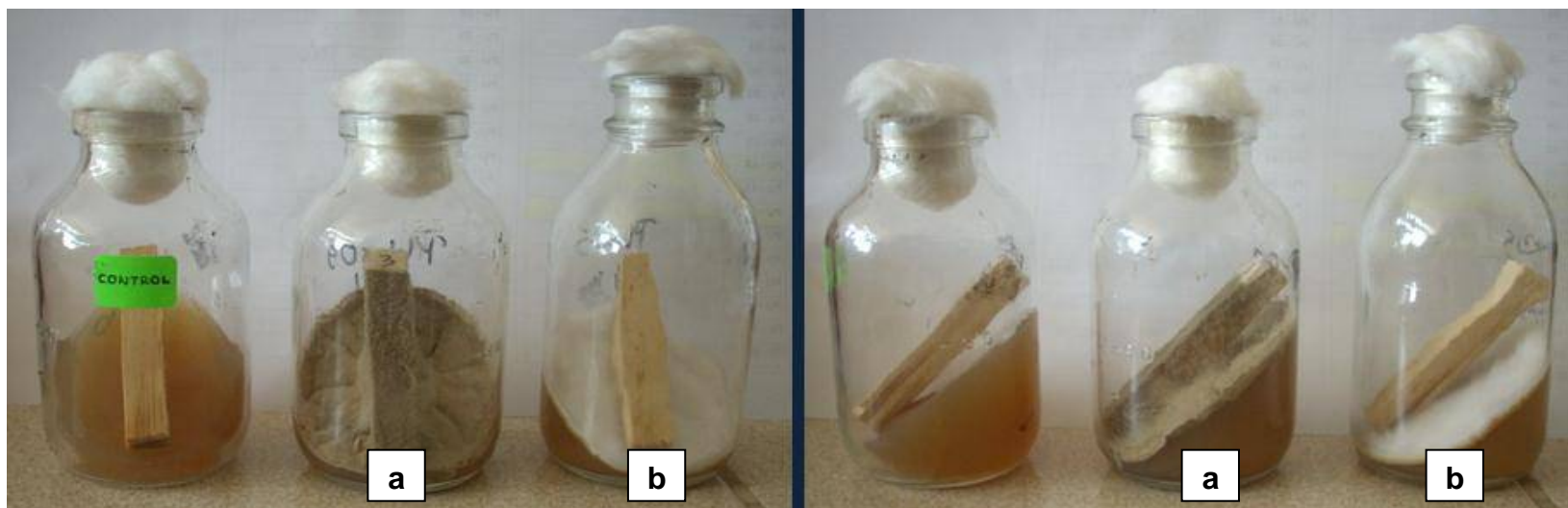
En la cuantificación de la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar se alcanzó 30,19 mg dL<sup>-1</sup> para *Aspergillus* sp. P16 y 21,53 mg dL<sup>-1</sup> para *Paecilomyces* sp. P13 a las 24 horas de incubación; 28,71 mg dL<sup>-1</sup> para *Aspergillus* sp. P15 y 18,58 mg dL<sup>-1</sup> para *Paecilomyces* sp. P13 a las 48 horas. A su vez, a las 72 horas se obtuvieron valores de 22,52 mg dL<sup>-1</sup> para *Aspergillus* sp. P23 y 16,99 mg dL<sup>-1</sup> para *Aspergillus* sp. T40 (Tablas 7, 8, 9).



**Figura 48.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos lignocelulolíticos.



**Figura 49.** Hongos filamentosos nativos desarrollados sobre bloques de madera durante 15 días.



**Figura 50.** Hongos filamentosos nativos, con (a) y sin micelio visible (b) sobre el bloque de madera.

**Tabla 2.** Hongos filamentosos nativos con micelio visible sobre bloques de madera, después de 15 días, a 30°C

Código UNPRG LR	
<i>Aspergillus</i> sp. P01	<i>Aspergillus</i> sp. T44
<i>Aspergillus</i> sp. P05	<i>Cladosporium</i> sp. T18
<i>Aspergillus</i> sp. P15	<i>Colletotrichum</i> sp. P05
<i>Aspergillus</i> sp. P16	<i>Monilia</i> sp. P28
<i>Aspergillus</i> sp. P18	<i>Monilia</i> sp. P30
<i>Aspergillus</i> sp. P19	<i>Mucor</i> sp. P43
<i>Aspergillus</i> sp. P23	<i>Paecilomyces</i> sp. P01
<i>Aspergillus</i> sp. P32	<i>Paecilomyces</i> sp. P02
<i>Aspergillus</i> sp. P35	<i>Paecilomyces</i> sp. P02
<i>Aspergillus</i> sp. T03	<i>Paecilomyces</i> sp. P03
<i>Aspergillus</i> sp. T05a	<i>Paecilomyces</i> sp. P05
<i>Aspergillus</i> sp. T05b	<i>Paecilomyces</i> sp. P09a
<i>Aspergillus</i> sp. T08	<i>Paecilomyces</i> sp. P09b
<i>Aspergillus</i> sp. T10	<i>Paecilomyces</i> sp. P10
<i>Aspergillus</i> sp. T13	<i>Paecilomyces</i> sp. P11
<i>Aspergillus</i> sp. T19	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a
<i>Aspergillus</i> sp. T24	<i>Paecilomyces</i> sp. P13
<i>Aspergillus</i> sp. T25	<i>Paecilomyces</i> sp. P15
<i>Aspergillus</i> sp. T30	<i>Paecilomyces</i> sp. P16
<i>Aspergillus</i> sp. T32	<i>Paecilomyces</i> sp. P17
<i>Aspergillus</i> sp. T34	<i>Paecilomyces</i> sp. P18
<i>Aspergillus</i> sp. T35	<i>Paecilomyces</i> sp. P19
<i>Aspergillus</i> sp. T36	<i>Paecilomyces</i> sp. P21
<i>Aspergillus</i> sp. T39	<i>Paecilomyces</i> sp. P22
<i>Aspergillus</i> sp. T40	<i>Paecilomyces</i> sp. P23
<i>Aspergillus</i> sp. T42	<i>Paecilomyces</i> sp. P24
<i>Aspergillus</i> sp. T43	<i>Paecilomyces</i> sp. P25

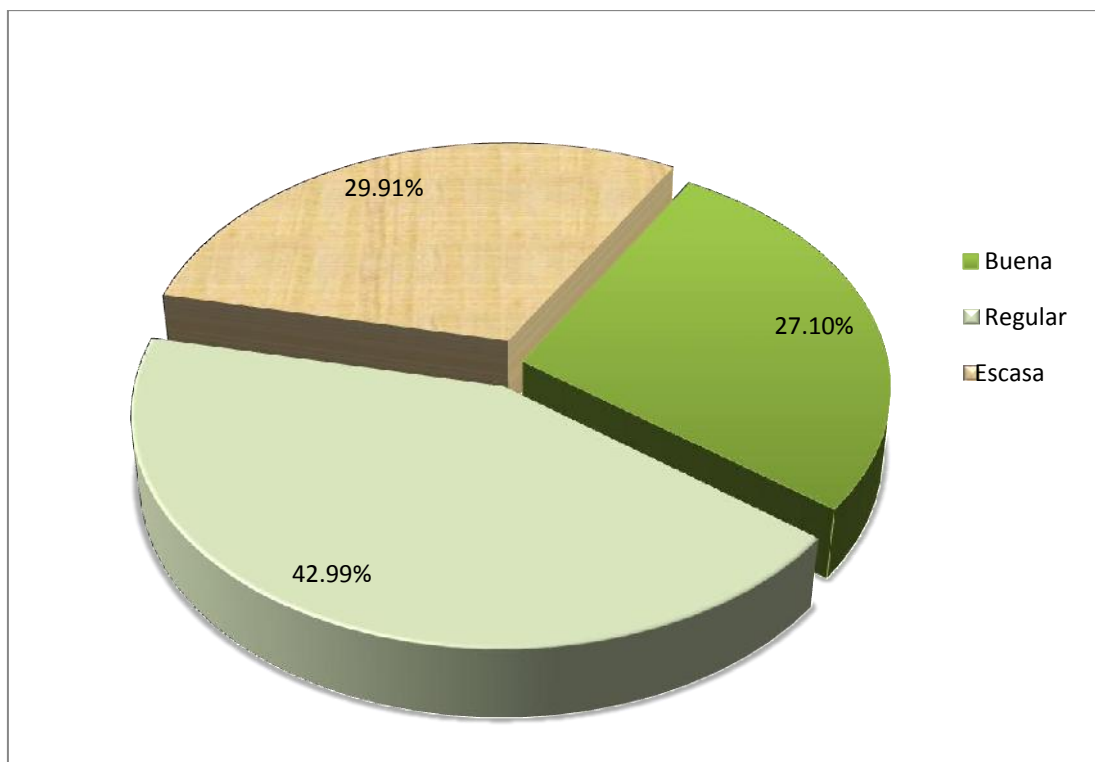


Continuación...

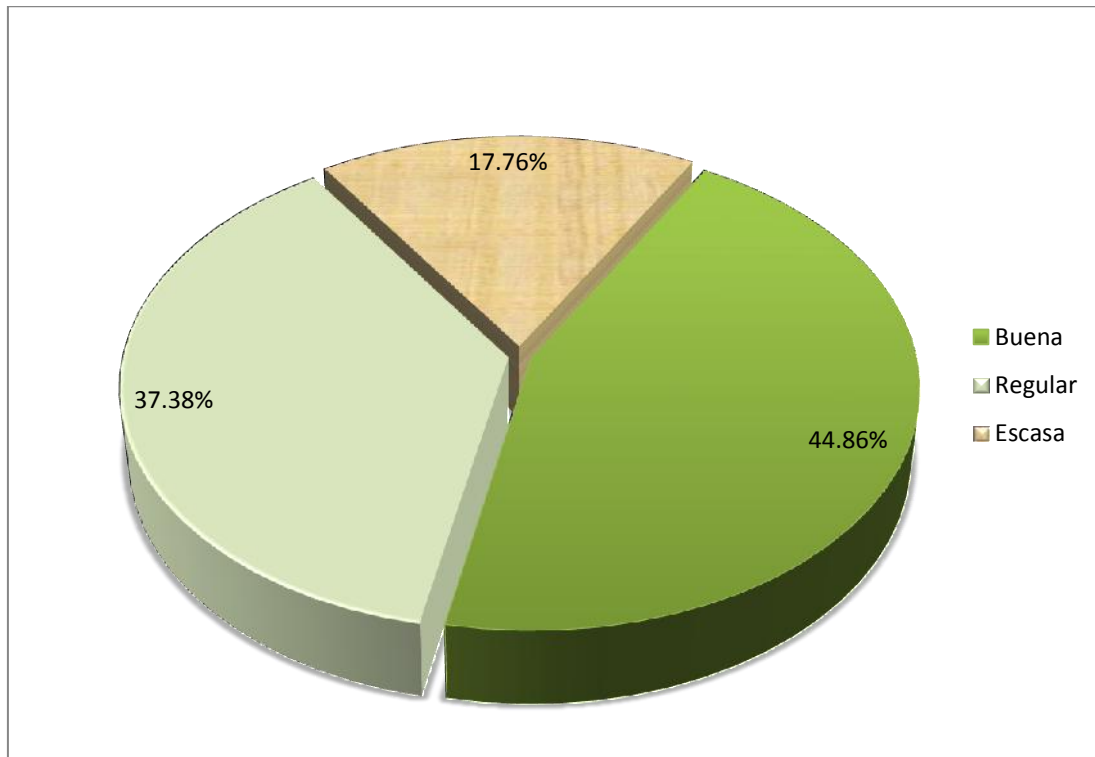
Código UNPRG LR	
<i>Paecilomyces</i> sp. P26	<i>Paecilomyces</i> sp. T14
<i>Paecilomyces</i> sp. P 27	<i>Paecilomyces</i> sp. T15
<i>Paecilomyces</i> sp. P 28	<i>Paecilomyces</i> sp. T16
<i>Paecilomyces</i> sp. P29	<i>Paecilomyces</i> sp. T17
<i>Paecilomyces</i> sp. P31	<i>Paecilomyces</i> sp. T25
<i>Paecilomyces</i> sp. P32	<i>Paecilomyces</i> sp. T31
<i>Paecilomyces</i> sp. P33	<i>Paecilomyces</i> sp. T34
<i>Paecilomyces</i> sp. P35	<i>Paecilomyces</i> sp. T35
<i>Paecilomyces</i> sp. P36	<i>Paecilomyces</i> sp. T43
<i>Paecilomyces</i> sp. P37	<i>Paecilomyces</i> sp. T47
<i>Paecilomyces</i> sp. P38	<i>Paecilomyces</i> sp. T48
<i>Paecilomyces</i> sp. P39	<i>Penicillium</i> sp. T32
<i>Paecilomyces</i> sp. P40	<i>Penicillium</i> sp. P05
<i>Paecilomyces</i> sp. P41	<i>Rhizopus</i> sp. T37
<i>Paecilomyces</i> sp. P43	<i>Rhizopus</i> sp. P16
<i>Paecilomyces</i> sp. P46	<i>Rhizopus</i> sp. P27
<i>Paecilomyces</i> sp. P47	<i>Trichoderma</i> sp. P08
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	<i>Trichoderma</i> sp. P10
<i>Paecilomyces</i> sp. T05	<i>Trichoderma</i> sp. P15
<i>Paecilomyces</i> sp. T06	<i>Trichoderma</i> sp. P16
<i>Paecilomyces</i> sp. T07	<i>Trichoderma</i> sp. P28
<i>Paecilomyces</i> sp. T08a	<i>Trichoderma</i> sp. P30
<i>Paecilomyces</i> sp. T08b	<i>Trichoderma</i> sp. P39
<i>Paecilomyces</i> sp. T09	<i>Trichoderma</i> sp. P44
<i>Paecilomyces</i> sp. T10	<i>Trichoderma</i> sp. T46
<i>Paecilomyces</i> sp. T11	<i>Verticillium</i> sp. P25
<i>Paecilomyces</i> sp. T12	



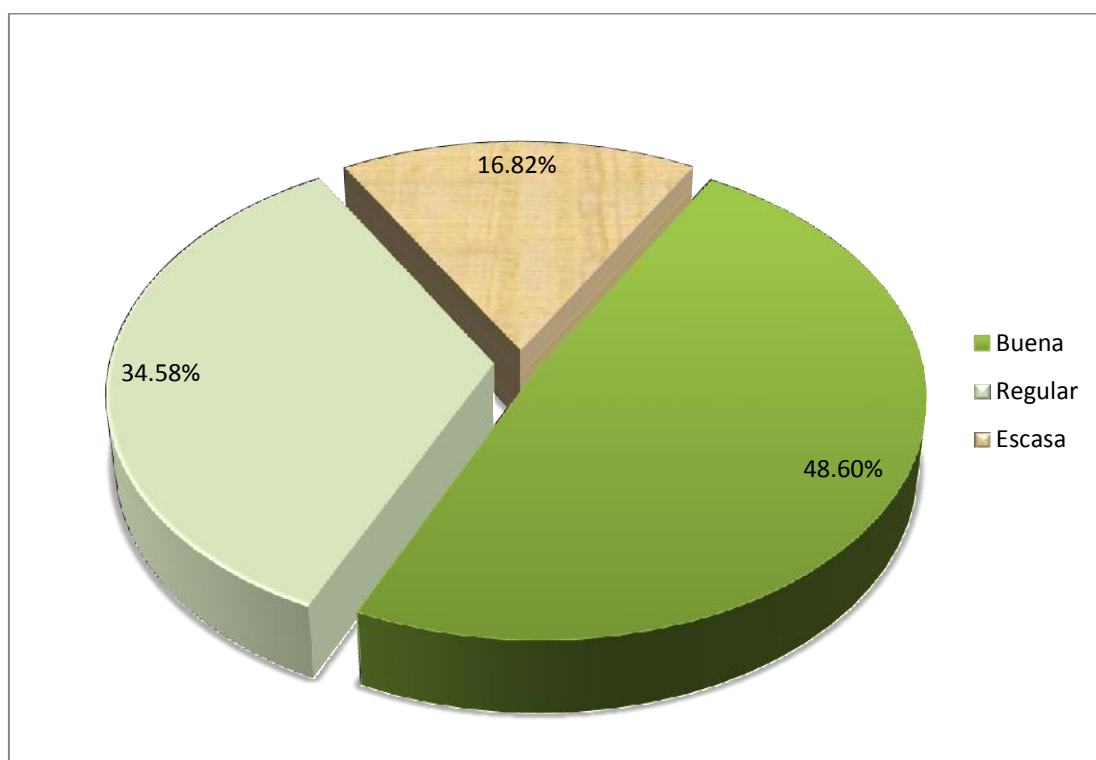
**Figura 51.** Colonización del bloque de madera por hongos filamentosos nativos, (a) escasa, (b) regular, (c) buena.



**Figura 52.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 15 días.



**Figura 53.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 30 días.



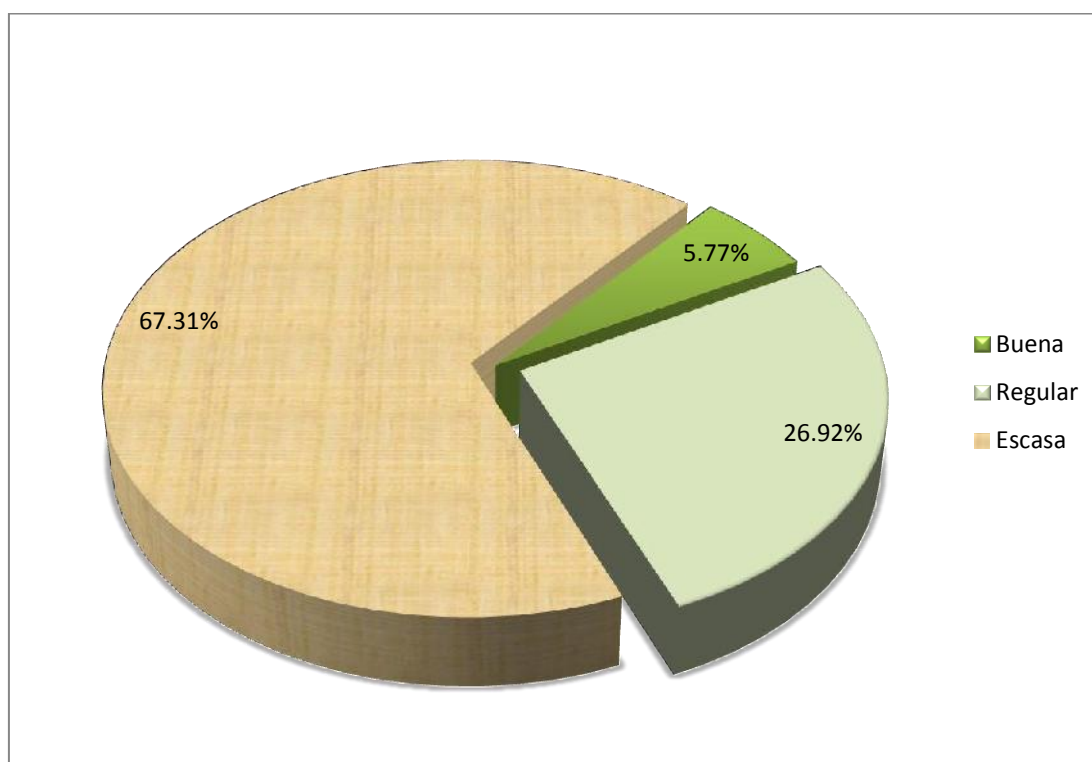
**Figura 54.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos con buena colonización del bloque de madera a los 60 días.

**Tabla 3.** Hongos filamentosos lignocelulolíticos seleccionados

Código UNPRG LR	
<i>Aspergillus</i> sp. P01	<i>Paecilomyces</i> sp. P13
<i>Aspergillus</i> sp. P05	<i>Paecilomyces</i> sp. P18
<i>Aspergillus</i> sp. P15	<i>Paecilomyces</i> sp. P23
<i>Aspergillus</i> sp. P16	<i>Paecilomyces</i> sp. P24
<i>Aspergillus</i> sp. P23	<i>Paecilomyces</i> sp. P25
<i>Aspergillus</i> sp. P32	<i>Paecilomyces</i> sp. P39
<i>Aspergillus</i> sp. P35	<i>Paecilomyces</i> sp. P41
<i>Aspergillus</i> sp. T03	<i>Paecilomyces</i> sp. P46
<i>Aspergillus</i> sp. T05	<i>Paecilomyces</i> sp. P48
<i>Aspergillus</i> sp. T10	<i>Paecilomyces</i> sp. T05
<i>Aspergillus</i> sp. T19	<i>Paecilomyces</i> sp. T07
<i>Aspergillus</i> sp. T25	<i>Paecilomyces</i> sp. T09
<i>Aspergillus</i> sp. T24	<i>Paecilomyces</i> sp. T10
<i>Aspergillus</i> sp. T30	<i>Paecilomyces</i> sp. T11
<i>Aspergillus</i> sp. T32	<i>Paecilomyces</i> sp. T15
<i>Aspergillus</i> sp. T34	<i>Paecilomyces</i> sp. T25
<i>Aspergillus</i> sp. T35	<i>Paecilomyces</i> sp. T34
<i>Aspergillus</i> sp. T39	<i>Penicillium</i> sp. P05
<i>Aspergillus</i> sp. T40	<i>Trichoderma</i> sp. P08
<i>Aspergillus</i> sp. T42	<i>Trichoderma</i> sp. P10
<i>Aspergillus</i> sp. T44	<i>Trichoderma</i> sp. P15
<i>Paecilomyces</i> sp. P02	<i>Trichoderma</i> sp. P16
<i>Paecilomyces</i> sp. P03	<i>Trichoderma</i> sp. P28
<i>Paecilomyces</i> sp. P05	<i>Trichoderma</i> sp. P39
<i>Paecilomyces</i> sp. P10	<i>Trichoderma</i> sp. P44
<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	<i>Trichoderma</i> sp. T46



**Figura 55.** Papel filtro colonizado por hongos filamentosos nativos.

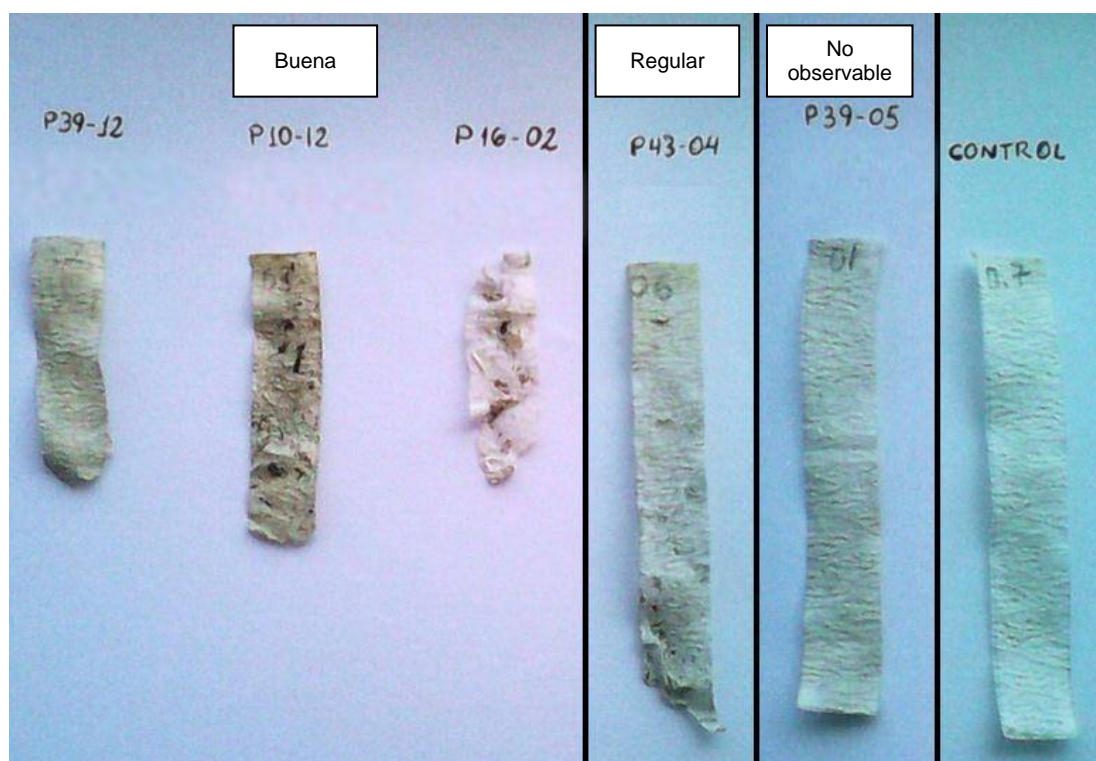


**Figura 56.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos según la colonización del papel filtro.

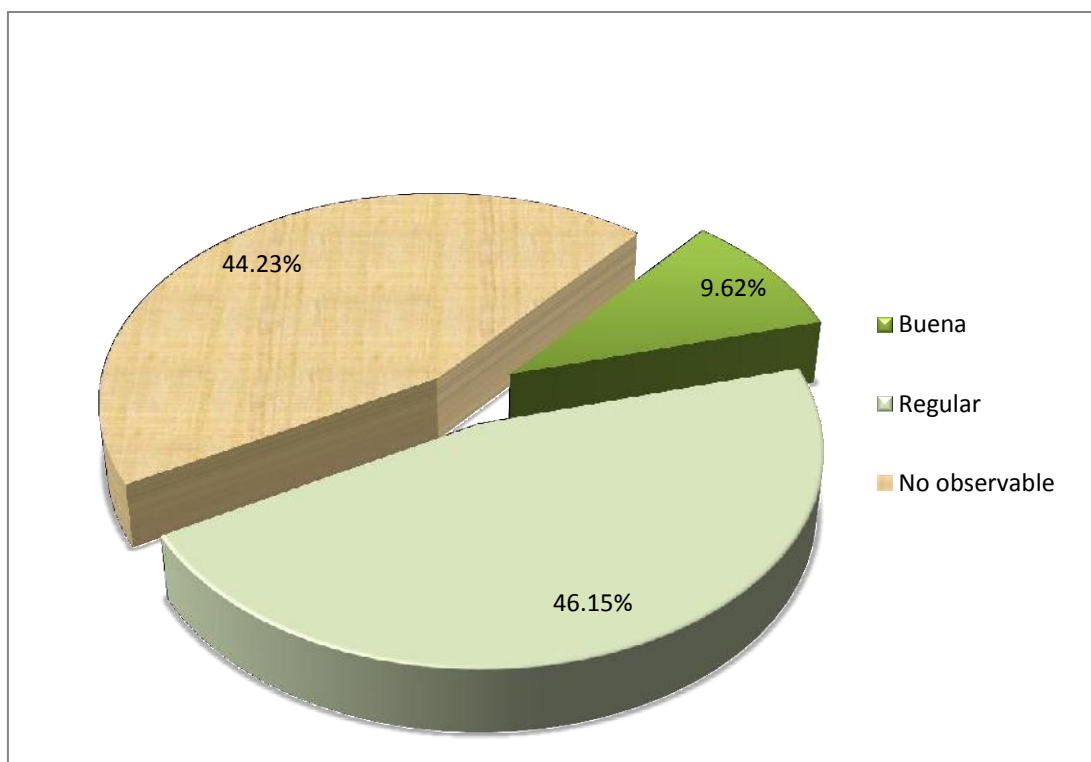


**Tabla 4.** Hongos filamentosos nativos colonizadores de papel filtro

<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Colonización</b>	<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Colonización</b>
<i>Aspergillus</i> sp. P16	Buena	<i>Paecilomyces</i> sp. P 02	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P15	Buena	<i>Paecilomyces</i> sp. P 03	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T30	Buena	<i>Paecilomyces</i> sp. P 05	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P23	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 10	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P35	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T10	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 13	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T19	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 18	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T25	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 23	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T32	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 24	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T34	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 25	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T35	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 39	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T39	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 41	Escasa
<i>Trichoderma</i> sp. P08	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 46	Escasa
<i>Trichoderma</i> sp. P10	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P 48	Escasa
<i>Trichoderma</i> sp. P28	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T 05	Escasa
<i>Trichoderma</i> sp. P39	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T 07	Escasa
<i>Trichoderma</i> sp. T46	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T 09	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P01	Escasa	<i>Paecilomyces</i> sp. T 10	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P05	Escasa	<i>Paecilomyces</i> sp. T 11	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. P05	Escasa	<i>Paecilomyces</i> sp. T 15	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T03	Escasa	<i>Paecilomyces</i> sp. T 25	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T24	Escasa	<i>Paecilomyces</i> sp. T 34	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T32	Escasa	<i>Penicillium</i> sp. P 05	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T40	Escasa	<i>Trichoderma</i> sp. P 15	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T42	Escasa	<i>Trichoderma</i> sp. P 16	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T44	Escasa	<i>Trichoderma</i> sp. P 44	Escasa



**Figura 57.** Papel filtro degradado por hongos filamentosos nativos.



**Figura 58.** Porcentaje (%) de hongos filamentosos nativos según degradación del papel filtro.

**Tabla 5.** Hongos filamentosos nativos degradadores de papel filtro

<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Degradación</b>	<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Degradación</b>
<i>Aspergillus</i> sp. P16	Buena	<i>Trichoderma</i> sp. P15	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. P15	Buena	<i>Trichoderma</i> sp. P16	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. T30	Buena	<i>Trichoderma</i> sp. P44	Regular
<i>Trichoderma</i> sp. P10	Buena	<i>Aspergillus</i> sp. P25	No observable
<i>Trichoderma</i> sp. P39	Buena	<i>Aspergillus</i> sp. T18	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. P23	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P02	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. P35	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P03	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T10	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P05	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T19	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P10	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T25	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T32	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P13	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T34	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P18	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T35	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P23	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T39	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P24	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T03	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P25	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T42	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P39	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T44	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P41	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. P01	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. P46	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. P05	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T05	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T05	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T07	No observable
<i>Aspergillus</i> sp. T24	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T09	No observable
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T10	No observable
<i>Penicillium</i> sp. P05	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T11	No observable
<i>Trichoderma</i> sp. P08	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T15	No observable
<i>Trichoderma</i> sp. P28	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T25	No observable
<i>Trichoderma</i> sp. T46	Regular	<i>Paecilomyces</i> sp. T34	No observable

**Tabla 6.** Porcentaje (%) de peso del papel filtro perdido por efecto de hongos lignocelulolíticos nativos

<b>Código UNPRG LR</b>	<b>%</b>	<b>Código UNPRG LR</b>	<b>%</b>
<i>Trichoderma</i> sp. P10	71,43	<i>Aspergillus</i> sp. T39	12,50
<i>Trichoderma</i> sp. P39	71,43	<i>Aspergillus</i> sp. T03	12,50
<i>Aspergillus</i> sp. P16	68,57	<i>Aspergillus</i> sp. T24	12,50
<i>Aspergillus</i> sp. P15	42,86	<i>Aspergillus</i> sp. P32	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T30	42,86	<i>Aspergillus</i> sp. T40	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. P15	42,86	<i>Paecilomyces</i> sp. P02	0,00
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	42,86	<i>Paecilomyces</i> sp. P03	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. P23	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P05	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T10	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P10	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T25	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T32	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P13	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T34	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P18	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T35	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P23	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. P08	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P24	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. P28	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P25	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. T46	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P39	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. P01	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P41	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. P05	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. P46	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T05	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T05	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T42	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T07	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T44	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T09	0,00
<i>Penicillium</i> sp. P05	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T10	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. P16	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T11	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. P44	28,57	<i>Paecilomyces</i> sp. T15	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. P35	12,50	<i>Paecilomyces</i> sp. T25	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. T19	12,50	<i>Paecilomyces</i> sp. T34	0,00

**Tabla 7.** Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 24 horas

<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>
<i>Aspergillus</i> sp. P16	30,19	<i>Aspergillus</i> sp. P35	23,92
<i>Aspergillus</i> sp. T05	28,57	<i>Aspergillus</i> sp. T30	23,92
<i>Paecilomyces</i> sp. P39	27,75	<i>Aspergillus</i> sp. P32	23,92
<i>Trichoderma</i> sp. P10	25,84	<i>Paecilomyces</i> sp. P10	23,92
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	25,36	<i>Paecilomyces</i> sp. T15	23,92
<i>Trichoderma</i> sp. P39	25,36	<i>Paecilomyces</i> sp. T25	23,92
<i>Aspergillus</i> sp. P23	24,88	<i>Trichoderma</i> sp. P28	23,92
<i>Trichoderma</i> sp. P16	24,88	<i>Aspergillus</i> sp. T03	23,45
<i>Aspergillus</i> sp. P15	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T19	23,45
<i>Aspergillus</i> sp. T10	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P18	23,45
<i>Aspergillus</i> sp. T25	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P23	23,45
<i>Aspergillus</i> sp. T24	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P46	23,45
<i>Paecilomyces</i> sp. P24	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T32	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. P25	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T34	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. P41	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T35	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. T05	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T39	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. T09	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P02	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. T10	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. T07	22,97
<i>Paecilomyces</i> sp. T34	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. T11	22,97
<i>Aspergillus</i> sp. T42	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T44	22,97
<i>Trichoderma</i> sp. P08	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P03	22,13
<i>Trichoderma</i> sp. P15	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P05	22,13
<i>Trichoderma</i> sp. P44	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	22,13
<i>Trichoderma</i> sp. T46	24,40	<i>Penicillium</i> sp. P05	22,13
<i>Aspergillus</i> sp. P01	23,92	<i>Aspergillus</i> sp. T40	22,01
<i>Aspergillus</i> sp. P05	23,92	<i>Paecilomyces</i> sp. P13	21,53

\* Control = 22,78 mg dL<sup>-1</sup>

**Tabla 8.** Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 48 horas

<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	<b>Código UNPRG LR</b>	<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>
<i>Aspergillus</i> sp. P15	28,71	<i>Aspergillus</i> sp. T05	28,57
<i>Paecilomyces</i> sp. P46	28,71	<i>Paecilomyces</i> sp. T10	21,53
<i>Trichoderma</i> sp. P10	28,71	<i>Paecilomyces</i> sp. T25	21,53
<i>Trichoderma</i> sp. T46	28,71	<i>Trichoderma</i> sp. P08	21,53
<i>Trichoderma</i> sp. P44	28,22	<i>Paecilomyces</i> sp. P18	21,05
<i>Aspergillus</i> sp. P32	25,84	<i>Paecilomyces</i> sp. P25	21,05
<i>Paecilomyces</i> sp. T15	25,36	<i>Paecilomyces</i> sp. P23	20,10
<i>Aspergillus</i> sp. P05	24,88	<i>Paecilomyces</i> sp. P24	20,10
<i>Aspergillus</i> sp. P35	24,88	<i>Trichoderma</i> sp. P16	20,10
<i>Aspergillus</i> sp. T30	24,40	<i>Paecilomyces</i> sp. T09	19,62
<i>Aspergillus</i> sp. T42	24,40	<i>Aspergillus</i> sp. T03	19,14
<i>Aspergillus</i> sp. P01	23,92	<i>Aspergillus</i> sp. T34	19,14
<i>Aspergillus</i> sp. P16	23,92	<i>Aspergillus</i> sp. T35	19,14
<i>Aspergillus</i> sp. T10	23,92	<i>Aspergillus</i> sp. T24	19,14
<i>Aspergillus</i> sp. T25	23,92	<i>Paecilomyces</i> sp. T07	19,14
<i>Aspergillus</i> sp. T32	23,92	<i>Paecilomyces</i> sp. T11	19,14
<i>Paecilomyces</i> sp. P10	23,92	<i>Trichoderma</i> sp. P15	19,14
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	23,92	<i>Aspergillus</i> sp. T39	18,97
<i>Trichoderma</i> sp. P39	23,92	<i>Paecilomyces</i> sp. P02	18,97
<i>Aspergillus</i> sp. P23	22,97	<i>Paecilomyces</i> sp. P03	18,97
<i>Paecilomyces</i> sp. P41	22,97	<i>Penicillium</i> sp. P05	18,97
<i>Trichoderma</i> sp. P28	22,97	<i>Aspergillus</i> sp. T44	18,97
<i>Paecilomyces</i> sp. T05	22,49	<i>Paecilomyces</i> sp. P05	18,58
<i>Aspergillus</i> sp. T19	22,01	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	18,58
<i>Paecilomyces</i> sp. P39	22,01	<i>Paecilomyces</i> sp. P13	18,58
<i>Paecilomyces</i> sp. T34	22,01	<i>Aspergillus</i> sp. T40	18,58

\* Control = 22,78 mg dL<sup>-1</sup>



**Tabla 9.** Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con hongos filamentosos por 72 horas

Código UNPRG LR	Glucosa mg dL <sup>-1</sup>	Código UNPRG LR	Glucosa mg dL <sup>-1</sup>
<i>Aspergillus</i> sp. P23	22,52	<i>Aspergillus</i> sp. T42	18,58
<i>Aspergillus</i> sp. T32	22,52	<i>Trichoderma</i> sp. P10	18,58
<i>Aspergillus</i> sp. P32	22,13	<i>Trichoderma</i> sp. P16	18,58
<i>Aspergillus</i> sp. T19	21,74	<i>Trichoderma</i> sp. P39	18,58
<i>Paecilomyces</i> sp. P46	21,74	<i>Trichoderma</i> sp. P44	18,58
<i>Aspergillus</i> sp. P35	21,34	<i>Trichoderma</i> sp. T46	18,58
<i>Paecilomyces</i> sp. P39	21,34	<i>Aspergillus</i> sp. P05	17,79
<i>Aspergillus</i> sp. P15	20,95	<i>Aspergillus</i> sp. T10	17,79
<i>Paecilomyces</i> sp. P25	20,55	<i>Paecilomyces</i> sp. T15	17,79
<i>Aspergillus</i> sp. T25	20,16	<i>Trichoderma</i> sp. P15	17,79
<i>Paecilomyces</i> sp. P10	20,16	<i>Aspergillus</i> sp. P16	17,39
<i>Trichoderma</i> sp. P28	20,16	<i>Aspergillus</i> sp. T03	17,39
<i>Aspergillus</i> sp. T05	28,57	<i>Aspergillus</i> sp. T34	17,39
<i>Paecilomyces</i> sp. P41	19,76	<i>Aspergillus</i> sp. T35	17,39
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	19,76	<i>Paecilomyces</i> sp. T07	17,39
<i>Paecilomyces</i> sp. T10	19,76	<i>Paecilomyces</i> sp. T11	17,39
<i>Aspergillus</i> sp. T24	19,37	<i>Paecilomyces</i> sp. T34	17,39
<i>Paecilomyces</i> sp. P23	19,37	<i>Aspergillus</i> sp. T39	16,99
<i>Paecilomyces</i> sp. P24	19,37	<i>Paecilomyces</i> sp. P02	16,99
<i>Paecilomyces</i> sp. T25	19,37	<i>Paecilomyces</i> sp. P03	16,99
<i>Aspergillus</i> sp. P01	18,97	<i>Paecilomyces</i> sp. P05	16,99
<i>Aspergillus</i> sp. T30	18,97	<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	16,99
<i>Trichoderma</i> sp. P08	18,97	<i>Paecilomyces</i> sp. P13	16,99
<i>Paecilomyces</i> sp. P18	18,58	<i>Penicillium</i> sp. P05	16,99
<i>Paecilomyces</i> sp. T05	18,58	<i>Aspergillus</i> sp. T44	16,99
<i>Paecilomyces</i> sp. T09	18,58	<i>Aspergillus</i> sp. T40	16,99

\* Control = 22,78 mg dL<sup>-1</sup>

#### **4.5 Hongo filamentoso nativo con mayor actividad hidrolítica**

Para determinar el rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado se seleccionó *Aspergillus* sp. P16 (Figura 59), porque alcanzó la mayor concentración de glucosa ( $30,19 \text{ mg dL}^{-1}$ ) en el menor tiempo (24 horas).

#### **4.6 Rendimiento alcohólico en bagazo de caña hidrolizado por un hongo filamentoso nativo**

El rendimiento alcohólico del bagazo de caña hidrolizado por *Aspergillus* sp. P16 fue de  $0,27 \text{ gg}^{-1}$  después de 72 horas de fermentación (Tabla 10).



**Figura 59.** Cultivo de *Aspergillus* sp. P16 lignocelulolítico.

**Tabla 10.** Cuantificación de la producción de etanol en bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” hidrolizado con *Aspergillus* sp. P16

Parámetros	Valores
Glucosa inicial (mg dL <sup>-1</sup> )	29,30
Glucosa consumida (gL <sup>-1</sup> )	0,2930
Concentración del producto (gL <sup>-1</sup> )	0,0795
Coeficiente de rendimiento, Y <sub>p/s</sub> (gg <sup>-1</sup> )	0,27
Porcentaje de conversión (%)	27

## V. DISCUSIÓN

Se aislaron hongos filamentosos en las muestras de bagazo de caña de azúcar, debido a que este residuo agroindustrial contiene azúcares, retenidos en la fibra, después del proceso de extracción del jugo (Valiño *et al.*, 2004). El carbono y humedad (Reyes *et al.*, 2003; Díaz, 2008; Alcarraz *et al.*, 2010) favorecen el establecimiento de bacterias, hongos y levaduras (Valiño *et al.*, 2004).

En la literatura existen reportes de hongos aislados del bagazo (Ferrer *et al.*, 2011) de otros residuos lignocelulósicos como papel y corteza de árboles con indicios de degradación (Ferrer *et al.*, 2011), compost (Mikán & Castellanos, 2004) y residuos del café (Payán, 2011).

En el presente estudio se identificaron 14 géneros de hongos filamentosos. Entre estos *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Monilia*, *Chrysosporium* y *Memnoniella* también fueron reportados en suelos agrícolas por Carreño &

Flores (2003); Constantino & Manayay (2005); Oliva (2008) y Arias & Sigueñas (2009). A su vez, *Cladosporium* y *Penicillium* también fueron aislados de residuos de cafetaleros (Payán, 2011) y *Verticillium* de suelos de bosque y pastoreo (Ortiz & Uribe, 2010).

El hongo filamentoso más frecuente fue *Aspergillus* sp., coincidiendo con Carreño & Flores (2003), Constantino & Manayay (2005), Oliva (2008) y Arias & Sigueñas (2009), quienes identificaron este género como uno de los más frecuentes en suelos agrícolas. Este hongo también fue aislado de suelos sin cultivos establecidos (Dávila & Lloclla, 2004), agua de mar (Tapia, 2002) e inclusive agua y lodo residual (Chambergo & Herrera, 2009; Zuta, 2009).

El 62,57 % de los hongos filamentosos nativos evidenció actividad lignocelulolítica, al desarrollar sobre un bloque de pino. Según Joshi *et al.* (2011) ésta madera blanda está compuesta básicamente por lignina (25 – 35 %), hemicelulosa (25 – 30 %) y celulosa (40 – 50 %) y para metabolizarlos se requieren dos sistemas enzimáticos extracelulares: los que despolimerizaron la lignina por reacciones de oxidación y los que hidrolizan la celulosa y hemicelulosa (Carreón *et al.*, 2009).

La prueba del crecimiento en el bloque de madera se realizó para seleccionar hongos con eficiente actividad celulolítica, capaces de desarrollar con un mínimo contenido de celulosa, por cuanto el mayor porcentaje de éste polisacárido es inaccesible al estar ligado a la lignina a través de la hemicelulosa (Castro *et al.*, 2009). También es posible que los hongos presenten actividad lignolítica; sin embargo, para confirmarla se requiere valorar la actividad de las enzimas lignina peroxidasa y lacasa, que oxidan los anillos aromáticos del polímero (Castro *et al.*, 2009; Páez, 2012).

Los hongos que desarrollaron mayor biomasa en el bloque de madera fueron *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Según Ahammed & Prema (2002), *A. niger*, *A. flavus*, *A. japonicus* y *A. fumigatus* han sido estudiados como degradadores de lignina. Asimismo, la investigación de Ortiz & Uribe (2010) demostró actividad lignolítica por oxidación positiva al guayacol en *Penicillium*. A su vez, no se han encontrado reportes de *Paecilomyces* y *Trichoderma* como lignolíticos, pero si como eficientes



celulolíticos (Vilches, 2002; Carreño & Flores, 2003; Mikán & Castellanos, 2004; Llacza, 2012).

En el proceso convencional para la obtención de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica se consideran cuatro etapas: el pretratamiento para romper la matriz lignocelulósica, la hidrólisis enzimática para despolimerizar la celulosa a glucosa, la fermentación alcohólica y la destilación – rectificación - deshidratación, para obtener el etanol con las especificaciones de combustible (Castro *et al.*, 2009; Tomás, 2010). En este contexto, se requiere estudiar los sistemas enzimáticos extracelulares hidrolíticos para degradar la celulosa y hemicelulosa (Carreón *et al.*, 2009).

En el presente estudio, para la degradación de la celulosa, que en el bagazo corresponde al 48 % del peso (Valiño *et al.*, 2004) se investigó la actividad hidrolítica sobre el papel filtro o FPasa, exoglucanasa, exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa o 1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasa, coincidiendo con Constantino & Manayay (2005), Rodríguez & Piñeros (2007) y Manjarrés *et al.* (2011); no obstante, también se puede investigar la actividad sobre la carboximetilcelulosa o CMCasa, endoglucanasa, 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasa, endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (Carreño & Flores, 2003; Rodríguez & Piñeros, 2007; Manjarrés *et al.*, 2011) y de actividad sobre la celobiosa o  $\beta$ -glucosidasa (Manjarrés *et al.*, 2011).

*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Penicillium* presentaron actividad celulolítica FPasa, observándose colonización, degradación y pérdida de peso. Se coincide con Castellanos *et al.* (2000), Vilches (2002), Constantino & Manayay (2005), Rodríguez & Piñeros (2007) y Ferrer *et al.* (2011). Los fragmentos de celulosa son degradados por el sistema celulosa compuesto por endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. En acción sinérgica, las enzimas degradan la celulosa, liberándose finalmente monómeros de glucosa (Carrillo, 2002; Mejía *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2011).

Las pruebas utilizadas para investigar la actividad celulolítica estuvieron relacionadas entre sí, tal que los hongos con mayor colonización micelial del papel filtro presentaron mayor degradación y pérdida de peso. Por el contrario, Vilches (2002) y Constantino & Manayay (2005) observaron hongos con

abundante crecimiento y una mínima degradación del papel filtro. Se asume que estos hongos secretaron ínfima cantidad de celulasas, cuya acción hidrolítica produce monosacáridos requeridos para el crecimiento micelial, pero no para una desintegración observable del papel (Llacza, 2012). Estos microorganismos no deben ser tomados en cuenta, porque la excreción de celulasas no es significativa (Ferrer *et al.*, 2011).

En la actividad celulolítica sobre el papel filtro destacaron *Aspergillus* y *Trichoderma*, coincidiendo con Aguiar (2001); Constantino & Manayay (2005); Rodríguez & Piñeros (2007); Izarra *et al.* (2010); Manjarrés *et al.* (2011); Llacza (2012) y Srivastava & Agrawal (2012).

*Aspergillus* superó a *Trichoderma* en la colonización y degradación del papel filtro, pero no en la pérdida de peso. Al respecto Manjarrés *et al.* (2011) determinaron que con *Aspergillus* sp. el máximo de actividad FPasa a los 9 días fue de 0,149 UI mL<sup>-1</sup>, superando a *Trichoderma* sp. con 0,100 UI mL<sup>-1</sup> en el día 16, sugiriéndose que debido a que *Aspergillus* hidroliza más eficientemente la celobiosa, disminuye su acción inhibitoria de la actividad de las celulasas, específicamente de las endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Corroborando lo expuesto, Ferrer *et al.* (2011) mencionaron que *Trichoderma* presenta baja actividad  $\beta$ -glucosidasa y débil acción sobre la celulosa cristalina.

El bagazo de caña fue fragmentado y autoclavado, por cuanto los azúcares necesarios para la obtención de alcohol están inmersos en la matriz lignocelulósica. Por tanto, se requiere un pretratamiento para incrementar la accesibilidad del área de superficie de la biomasa, modificar la estructura de la lignina, solubilizar la lignina o la hemicelulosa o para decristalizar y depolimerizar parcialmente la celulosa (Carreón *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009).

En el bagazo de caña pretratado se cuantificó 22,78 mg dL<sup>-1</sup> de glucosa inicial. Al respecto Srivastava & Agrawal (2012) investigaron paja de arroz, paja de trigo y cáscara de arroz y determinaron que el pulverizado incrementó el área superficial y el tamaño de poro de la partícula necesario para la absorción de humedad y penetración de los microorganismos. A su vez, el autoclavado

incrementó el contenido de azúcares reductores, cuantificándose 1,67 – 1,83 mg g<sup>-1</sup>.

Como producto de la actividad lignocelulolítica de los hongos nativos en el bagazo de caña de azúcar, se incrementó el contenido de glucosa. De igual manera aumentaron los azúcares reductores en residuos de paja de arroz, trigo y cáscaras de arroz pulverizados y cultivados con *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* (Srivastava & Agrawal, 2012). Al respecto Castro *et al.* (2009) mencionaron que aproximadamente 70% de la biomasa vegetal está compuesta por azúcares, distribuidos mayoritariamente en la celulosa (glucosa) y en menor proporción en la hemicelulosa (pentosas xilosa y arabinosa y hexosas glucosa, manosa y galactosa).

También se ha reportado que la hidrólisis con celulasas no incrementó el contenido de glucosa en el forraje de residuos de poda pretratados con hidróxido de sodio y sulfato de calcio, sugiriéndose como causa la inhibición de las enzimas por la glucosa y celobiosa liberadas en el pretratamiento del sustrato o en el proceso de la hidrólisis enzimática (Tejada *et al.*, 2011).

Como producto de la fermentación de los residuos lignocelulósicos previamente hidrolizados se obtuvo alcohol. Este resultado coincide con los reportados en residuos de poda (Tejada *et al.*, 2011), bagazo de agave tequilana (Saucedo *et al.*, 2010), biomasa de *Pennisetum purpureum* (Liong *et al.*, 2012) y paja de arroz (Srivastava & Agrawal, 2012).

Mediante la actividad lignocelulolítica de *Aspergillus* sp. P16 se obtuvo glucosa y posteriormente etanol por fermentación, por lo que este hongo filamentoso nativo es promisorio para el bioproceso, dándole valor agregado a la biomasa de los residuos agroindustriales, aumentando la rentabilidad y disminuyendo la contaminación del ambiente.

## VI. CONCLUSIONES

- Se aislaron 171 hongos filamentosos de muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”, identificando *Aspergillus* sp. (39,18 %), *Paecilomyces* sp. (35,67 %), *Cladosporium* sp. (8,19 %), *Trichoderma* sp. (5,26 %), *Penicillium* sp. (2,93 %), *Rhizopus* sp. (2,93 %), *Mucor* sp. (1,18 %), *Monilia* sp. (1,18 %), *Cephalosporium* sp. (0,58 %), *Trichocladium* sp. (0,58 %), *Verticillium* sp. (0,58 %), *Memnoniella* sp. (0,58 %), *Colletotrichum* sp. (0,58 %) y *Chrysosporium* sp. (0,58 %).
- Se seleccionaron 52 hongos filamentosos lignocelulolíticos, pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Penicillium*.
- En la actividad celulolítica en el papel filtro, el 5,77 % de los hongos presentaron buena colonización y el 9,62 % buena degradación. A su vez, la pérdida de peso osciló entre 12,5 a 71,43 %.
- En la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar por los hongos filamentosos nativos se obtuvo 16,99 – 30,19 mg dL<sup>-1</sup> de glucosa.
- El hongo filamentoso con mayor actividad hidrolítica fue *Aspergillus* sp. P16 con 30,19 mg dL<sup>-1</sup> de glucosa después de 24 horas de incubación.
- El rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por *Aspergillus* sp. P16 fue 0,27 gg<sup>-1</sup>, después de 72 horas de fermentación.

## VII. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de *Aspergillus* sp. P16.
- Optimizar las condiciones de hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con *Aspergillus* sp. P16.
- Optimizar las condiciones de fermentación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus* sp. P16.

## VIII. RESUMEN

La producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica es una alternativa sostenible; sin embargo, se requiere de un pretratamiento físico, químico o biológico. En este contexto, se investigaron hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” para la producción de etanol celulósico. Los hongos se aislaron en agar papa dextrosa más cloranfenicol, obteniendo 171 cultivos identificando *Aspergillus* sp. (39,18 %), *Paecilomyces* sp. (35,67 %), *Cladosporium* sp. (8,19 %), *Trichoderma* sp. (5,26 %), *Penicillium* sp. (2,93 %), *Rhizopus* sp. (2,93 %), *Mucor* sp. (1,18 %), *Monilia* sp. (1,18 %), *Cephalosporium* sp. (0,58 %), *Trichocladium* sp. (0,58 %), *Verticillium* sp. (0,58 %), *Memnoniella* sp. (0,58 %), *Colletotrichum* sp. (0,58 %) y *Chrysosporium* sp. (0,58 %). Se seleccionaron los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Penicillium*, porque presentaron una buena colonización de un bloque de madera por 60 días. En la actividad celulolítica en el papel filtro, el 5,77 % de los hongos presentaron buena colonización y el 9,62 % buena degradación. A su vez, la pérdida de peso osciló entre 12,5 a 71,43 %. En la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar por los hongos filamentosos nativos se obtuvo 16,99 – 30,19 mg dL<sup>-1</sup> de glucosa. El hongo filamentoso con mayor actividad hidrolítica fue *Aspergillus* sp. P16 con 30,19 mg dL<sup>-1</sup> de glucosa después de 24 horas de incubación. El rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por *Aspergillus* sp. P16 fue 0,27 gg<sup>-1</sup>, después de 72 horas de fermentación. Se demostró el potencial de los hongos filamentosos para la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abril, A. J. (2008). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Primer Taller Nacional de Etanol-Celulósico. Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/177040176/1er-Taller-Nacional-de-Etanol-Celulosico>
- Aguiar, C. L. (2001). Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulolíticos. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2), 117-121.
- Ahammed, S. & Prema, P. (2002). Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1(6), 102-103.
- Alcántara, R. H. & Zúñiga, J. H. (2012). *Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de agua residual sintética para la generación de energía, por acción de consorcios microbianos nativos en celdas de combustible, Lambayeque, 2012*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Alcarraz, M., Flores, A. & Godoy, J. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 13(26), 1-13.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Arias, L. & Sigueñas, J. E. (2009). *Efecto de hongos nativos solubilizadores de roca fosfórica de bayovar en el desarrollo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Asociación Peruana de Productores de Azúcar y Biocombustibles, APPAB. (2004). Perú: situación de la actividad azucarera. Recuperado de: [http://www.appab.org/files/informe\\_sector\\_azucarero.pdf](http://www.appab.org/files/informe_sector_azucarero.pdf)
- Barnett, H. & Hunter, B. (1999). *Illustrated General of Imperfect Fungy*. EEUU: Burgess Publishing.

- Carreño, C. R. & Flores, C. P. (2003). *Capacidad celulolítica de mohos aislados de suelos agrícolas de la comunidad San José, Lambayeque, 2002*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreón, O. E., Ramos, A. S., Centeno, S., Leal, L. J., Martínez, A. & Fernández, M. T. (2009). Etanol carburante. *BioTecnología*, 13(3), 79-102.
- Carrillo, F. (2002). *Estudio del comportamiento de la Fibra Lyocell frente a la hidrólisis enzimática con celulasas*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, España.
- Castellanos, P., Lancho, A., Vilchez, L. & Huertas, L. (2000). Aislamiento, identificación y selección de cepas productoras de celulasas en dos regiones del Perú. IX Reunión Científica del ICBAR. Lima, Perú.
- Castro, C., Elena, M. & Octavio, P. (2009). Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y proceso de producción. *Ideas CONCYTEG*, 4(54), 1246-70.
- Chambergó, C. L. & Herrera, P. E. (2009). *Efecto de la concentración de sustrato, agitación y tiempo en la degradación fotocatalítica, biodegradación y "Proceso Acoplado" de cianuro en laboratorio. Dren 4000, Lambayeque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Chandrakant, P. & Bisaria, V. S. (1998). Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Critical Reviews Biotechnology*, 18, 295-331.
- Chen, J. C. (1997). *Manual del azúcar de caña*. Balderas, México: Limusa.
- Constantino, A. C. & Manayay, J. F. (2005). *Exoglucanasas de mohos celulolíticos aislados de suelos agrícolas de la provincia de Ferreñafe. Febrero Noviembre; 2004*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Cuervo, L., Folch, J. L. & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotechnología*, 13(3), 11-25.

- Dávila, A. & Lloclla, H. (2004). *Consortios microbianos solubilizadores de fósforo aislados de suelos agrícolas, Lambayeque. Mayo 2002-Febrero 2003*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Delgado, D. K. & Ramos, L. M. (2009). *Temperatura y pH en la producción de pectinasas por Aspergillus niger nativo en bagazo de caña de azúcar (Saccharum officinarum) con cáscara de naranja (Citrus sinensis)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Díaz, R. (2008). Caracterización energética del bagazo de caña de azúcar del ingenio Valdez. Ecuador. Curso internacional: producción y aprovechamiento energético de biomasa. Riobamba, Ecuador.
- Ferrer, Y., León, M., Michelena, G., Dustet, J. C., Duque, A., Ibañez, M. & Tortoló, K. (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *Red de revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 45 (1), 3-12.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la investigación*. México: MC Graw Hill Interamericana Editores S. A.
- Izarra, M. L., Santayana, M. L., Villena, G. K. & Gutiérrez, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasas por *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 139-150.
- Joshi, B., Bhatt M. R., Sharma, D., Joshhi, J., Malla, R. & Sreerama, L. (2011). Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(8), 172-182.
- Labarca, M., Sanabria, N. & Arcia, A. (2006). Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 23, 417-424.
- Llacza, H. F. (2012). *Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

- Liong, Y. Y., Halis, R., Ming, O. & Mohamed, R. (2012). Conversion of lignocellulosic biomass from grass to bioethanol using materials pretreated with alkali and the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *BioResources*, 7(4), 5500-5513.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W. & Pretorius, I. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 3, 506-577.
- Manjarrés, K., Piñeros, Y. & Rodríguez, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), 19-26.
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E. & Folch, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3-4), 119-131.
- Mejía, T., Mujica, F., Gonzales, A. & Ortega, J. (2002). Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. *Revista Avance y Perspectiva*, (21), 267-271.
- Mesa, L., Gonzales, E., Castro, E., Ruiz, E., Romero, I. & Cara, C. (2009). Evaluación de componentes accesorios en la hidrólisis enzimática del bagazo de la caña de azúcar pretratado para la producción de etanol. *Revista Cubana de Química*, 21(2), 80-87.
- Mikán, J. F. & Castellanos, E. D. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1), 58-71.
- Ministerio de Energía y Minas, MINEM. (2010). Análisis de la cadena de valor del alcohol carburante y del biodiesel. Lima, Perú. Recuperado de: <http://www.minag.gob.pe/portal/especiales/bioenergia>
- Ministerio de Energía y Minas, MINEM. (2011). Conclusiones y recomendaciones de normatividad: cadena de valor del alcohol carburante y del biodiesel. Lima, Perú. Recuperado de: <http://www.minag.gob.pe/portal/especiales/bioenergia>

- Oliva, R. (2008). *Evaluación de tres medios de cultivo y tres tiempos en la producción de antibióticos por cepas nativas de hongos filamentosos*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas, FAO. (2010). Bioenergía y seguridad alimentaria "BEFS", El análisis de BEFS para el Perú. Volumen I.
- Ortiz, M. L. & Uribe, D. (2010). Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabanas de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. *Ciencias del Suelo*, 28(2), 169-180.
- Páez, M. G. (2012). *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionadas para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil*. Tesis de Ingeniería. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Payán, C. (2011). *Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (pulpa) provenientes del beneficio del café*. Tesis de Especialización. Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia.
- Presidencia del Consejo de Ministros - Oficina Nacional de Gobierno Electrónico e Informática, PCM-ONGEI. (2013). Recuperado de: [http://www.peru.gob.pe/Nuevo\\_Portal\\_Municipal/portales/Municipalidades/1251/entidad/pm\\_municipalidad.asp](http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/Municipalidades/1251/entidad/pm_municipalidad.asp)
- Pérez, J., Muñoz, A. De la Rubia, T. & Martínez, E. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, 53-63.
- Rodríguez, I. & Piñeros, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 14(2), 35-42.
- Reyes, J. L., Pérez, R. & Betancourt, J. (2003). Uso de la biomasa cañera como alternativa para el incremento de la eficiencia energética y la reducción de la contaminación ambiental. *Centro de Estudios de Termoenergética*, 30(2), 14-20.

- Saha, B. C. (2004). *Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology*. In: *Lignocellulose Biodegradation*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Saldarriaga, Y. & Pineda, F. (2001). *Manual de Micología Aplicada*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Saucedo, J., Castro, A. J., Martínez, M. & Campos, J. (2010). Diseño de un bioproceso para la obtención de etanol anhidro a partir de bagazo del *Agave tequilana* Weber. Recuperado de: <http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2012-01-01&pag=12>
- Schilling, J. S., Tewalt, J. P. & Duncan, S. M. (2009). Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 465-475.
- Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, SPDA. (2011). Criterios de sostenibilidad para la producción de biocombustibles: propuesta de herramientas y entidades responsables de su evaluación por nivel de gobierno. Lima, Perú.
- Srivastava, A. & Agrawal, P. (2012). Saccharifacation by fungi and etanol production by bacteria using lignocellulosic materials. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 411-14.
- Tapia, I. (2002). *Capacidad degradativa del petróleo de hongos aislados de aguas de mar – litoral de puerto Eten. Enero – Mayo – 2002*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Tomás, M. (2010). *Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Tejada, L., Quintana, J., Pérez, J. & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111-16.



- Valiño, E., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T. & Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 145-153.
- Vilches, L. (2002). *Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Wainwright, M. (1995). *Introducción a la biotecnología de los hongos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Zhang, X., Xu, C. & Wang, H. (2007). Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 104, 149-51.
- Zuta, E. J. (2009). Eficiencia de microorganismos nativos antagónicos en la remoción de patógenos de lodos residuales. Pampa de perros. Lambayeque, 2008. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

## **X. ANEXOS**

## ANEXO 1

### Cálculo del número de muestras para el aislamiento de Hongos filamentosos nativos (Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{t^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90)(0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96$$

n= 96 muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con indicios de degradación para el aislamiento de hongos filamentosos nativos.

Dónde:

n=tamaño de muestra

z= 1,96 ( $\alpha=0,05$ ); valor estándar

P=tasa de prevalencia (0,90) presencia de hongos filamentosos nativos en bagazo de caña de azúcar.

q= tasa de ausencia 1-p (0,10).

t=error permitido (0,08)

## ANEXO 2

### Medio de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de hongos filamentosos nativos

Agar papa dextrosa, (PDA) suplementado con cloranfenicol para aislamiento de hongos (en Delgado & Ramos, 2009).

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Papa	250
Dextrosa	20
Agar - agar	20
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

Hervir 250 g de papas (peladas y picadas) en 500 mL de agua destilada durante 20 minutos. Completar a 500 en agua destilada. Filtrar y recepcionar el filtrado en un vaso de precipitación. Añadir 20 g de agar disuelto en 500 mL de agua destilada (baño maría). Completar a 1 litro con agua destilada y distribuir. Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos. Disolver una cápsula de cloranfenicol de 250 mg en 10 mL de alcohol al 95 %. Agregar 2 mL del antibiótico disuelto en un litro de agar PDA.

### ANEXO 3

**Agar extracto de malta 2,5 % para la detección de hongos filamentosos degradadores de lignina y hemicelulosa (en Saldarriaga & Pineda, 2001)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Sacarosa	30
Extracto de malta	15
Extracto de levadura	5
Triptona	2
Agar agar	20
H <sub>2</sub> O csp	1000 mL
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

## ANEXO 4

### Agar agua al 2% (en Saldarriaga & Pineda, 2001)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Agar - agar	20
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.



## ANEXO 5

### Caldo sales minerales para la detección de hongos filamentosos lignocelulolíticos (en Constantino & Manayay, 2005)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
CaSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
H <sub>2</sub> O csp	1000
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

## ANEXO 6

### Porcentaje de peso perdido del papel filtro (en Saldarriaga & Pineda, 2001)

El porcentaje de peso perdido del papel filtro se calculó según la fórmula:

$$PP = \frac{Pi - Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde:

Pi= Peso inicial

Pf = Peso final

PP=Porcentaje de peso perdido

## ANEXO 7

### Caldo de fermentación con sales minerales

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
CaSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
H <sub>2</sub> O csp	1000
pH	7,0
Bagazo de caña de azúcar pretratado	10

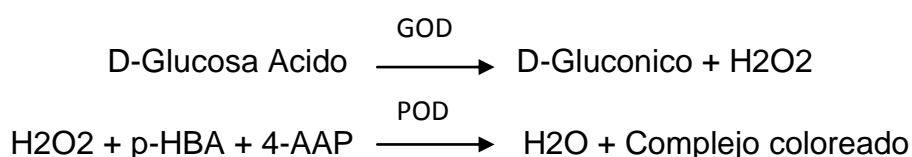
Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

## ANEXO 8

### Método de Glucosa Oxidasa para cuantificar glucosa (en Alcántara & Zúñiga, 2012)

#### Fundamento del Método

La glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) y Peroxidasa (POD). En la primera etapa la glucosa es oxidada a ácido glucónico por la acción de la enzima GOD, liberándose como producto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual en una reacción mediada por la enzima POD, reacciona con el ácido p-hidroxibenzoico y 4-aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm, en cantidad proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.



#### Reactivos

Los reactivos serán conservados entre 2 y 8 °C y protegidos de la luz para que se mantengan estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Composición del reactivo enzimático	
Buffer fosfato pH 7.0	75 mM
Glucosa Oxidasa ( <i>Aspergillus niger</i> )	≥15000 UL <sup>-1</sup>
Peroxidasa	≥ 2000 UL <sup>-1</sup>
4-Aminoantipirina	0.5 mM
Acido p-hidroxibenzoico	10 mM
Azida sódica	0,1 g dL <sup>-1</sup>
Estabilizantes y preservantes no reactivos	c.s.p.

Preparación del reactivo de trabajo: El reactivo se provee listo para su uso. El reactivo con el tiempo puede tomar un leve color rosado, que no afecta los resultados. Descartar el reactivo si su absorbancia contra blanco de agua es superior a 0,4 DO a 505 nm.

### Técnica

Llevar el reactivo a la temperatura que se realizará el ensayo. Las pipetas a utilizar deben estar limpias y libres de residuos para no contaminar el reactivo.

		Blanco	Calibrador	Muestra
Muestra	(mL)	---	---	0,01
Calibrador	(mL)	---	0,01	---
Reactivo	(mL)	1,00	1,00	1,00
Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o temperatura ambiente (20 °C a 25 °C). Leer las absorbancias ajustando a cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo. El color resultante es estable por a lo menos 30 minutos.				

### Cálculo

Factor = $\frac{\text{Concentración del calibrador}}{\text{Abs. Calibrador}}$
Glucosa (mg dL <sup>-1</sup> ) = Factor x Abs. Muestra

## ANEXO 9

### Valoración indirecta de la degradación de lignocelulosa

Colonización de bloque de madera por hongos filamentosos nativos durante 15, 30 y 60 días.

Hongos filamentosos	Colonización / días		
	15	30	60
<i>Aspergillus</i> sp. P15	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P16	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T10	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T19	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T30	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T34	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T35	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T39	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P02	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P03	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P05	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P10	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P23	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P24	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P39	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P41	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P46	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P48	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T05	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T07	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T09	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T10	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T11	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T15	Buena	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T34	Buena	Buena	Buena
<i>Penicillium</i> sp. P05	Buena	Buena	Buena

Continuación...

Hongos filamentosos	Colonización / días		
	15	30	60
<i>Trichoderma</i> sp. P08	Buena	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P15	Buena	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P28	Buena	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P01	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P05	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P23	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P35	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T03	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T25	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T32	Regular	Buena	Buena
<i>Cladosporium</i> sp. T18	Regular	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P11a	Regular	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P13	Regular	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P18	Regular	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. P25	Regular	Buena	Buena
<i>Paecilomyces</i> sp. T25	Regular	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P10	Regular	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P16	Regular	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P39	Regular	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. P44	Regular	Buena	Buena
<i>Trichoderma</i> sp. T46	Regular	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T44	Regular	Regular	Buena
<i>Rhizopus</i> sp. P 27	Regular	Regular	Buena
<i>Verticillium</i> sp. P25	Regular	Regular	Buena
<i>Mucor</i> sp. P43	Escasa	Buena	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. T42	Escasa	Regular	Buena
<i>Aspergillus</i> sp. P32	Regular	Regular	Regular



Continuación...

Hongos filamentosos	Colonización / días		
	15	30	60
<i>Aspergillus</i> sp. T24	Regular	Regular	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. T13	Regular	Regular	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. T43	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P43	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P40	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T06	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T12	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T14	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T16	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T35	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T48	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P11	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P17	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P22	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P28	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P26	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P27	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P29	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P32	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P35	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P36	Regular	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P31	Regular	Regular	Regular
<i>Penicillium</i> sp. T32	Regular	Regular	Regular
<i>Trichoderma</i> sp. P30	Regular	Regular	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. P18	Escasa	Regular	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. T05	Escasa	Regular	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. T36	Escasa	Regular	Regular

Continuación...

Hongos filamentosos	Colonización / días		
	15	30	60
<i>Aspergillus</i> sp. T40	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P01	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P09b	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P15	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P33	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P19	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P21	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. P47	Escasa	Regular	Regular
<i>Paecilomyces</i> sp. T8b	Escasa	Escasa	Regular
<i>Aspergillus</i> sp. P18	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T05	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Aspergillus</i> sp. T08	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Colletotrichum</i> sp. P05	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Monillia</i> sp. P28	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Monillia</i> sp. P30	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. P02	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. P09a	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. P16	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. P37	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. P38	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. T08a	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. T17	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. T31	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. T43	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Paecilomyces</i> sp. T47	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Rhizopus</i> sp. P16	Escasa	Escasa	Escasa
<i>Rhizopus</i> sp. T37	Escasa	Escasa	Escasa