



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19327

48

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA/83/003**

Contrato No. 87/73

Proyecto: Degradación enzimática de residuos
agroindustriales

1er. Año de Actividades

País: Venezuela

Cuarto Informe Técnico (Final)

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA
LATINA Y EL CARIBE**

**COMISION NACIONAL DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA**

**PROYECTO "DEGRADACION
ENZIMATICA DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES(Contrato N°87/73)"**

IV INFORME TECNICO

Preparado por:

- **Victor Carrizales**
- **Malva Ramirez**

Mayo, 1990

TABLA DE CONTENIDO

Introducción general.....	1
Actividad 1204.....	2
1. Introducción.....	2
2. Materiales y equipos.....	3
3. Metodología.....	4
4. Resultados y discusiones.....	6
5. Conclusiones.....	13
6. Referencias.....	14
Figuras	
1. DEIV y DRIV para muestras de sorgo.....	7
2. DEIV y DRIV para muestras de bagacillo.....	12
3. DEIV para muestras de sorgo y bagacillo. Efecto del tiempo de reacción.....	11
Actividad 1205.....	16
Actividad 1206.....	17

INTRODUCCION GENERAL.

El presente informe recopila los resultados finales correspondientes a la actividad 12.04, 12.05 y 12.06 de los términos de referencia del contrato UNIDO- Venezuela, del proyecto "Degradación enzimática de residuos agroindustriales". En esta primera parte se reporta la evaluación biológica de los pretratamientos por explosión térmica efectuados a las materias primas seleccionadas, como una continuación de la actividad 12.04, reportada parcialmente en el tercer informe en relación al efecto de los pretratamientos por explosión térmica e hidrólisis ácida sobre el comportamiento biológico de los residuos soca de sorgo y bagacillo de caña (Carrizales y Col, 1989); en la segunda parte se reporta lo referente el envío de técnicos venezolanos a recibir adiestramiento en Chile y en la última el programa de trabajo para el nuevo año del proyecto.

ACTIVIDAD 12.04

1). INTRODUCCION

En esta actividad se reporta algunos experimentos y resultados que no pudieron ser presentados totalmente en el pasado Informe III, ya que hubo problemas laborales en nuestra Universidad que afectaron los ensayos biológicos efectuados en el Laboratorio de Nutrición y Forrajes de la Universidad de Oriente con sede en Maturín Edo. Monagas. En ese sentido, se está presentando los estudios de pretratamiento de las materias primas por el método de explosión térmica.

La evaluación biológica se presenta en términos de la digestibilidad enzimática *in vitro* (DEIV) y la digestibilidad ruminal *in vitro* (DRIV). La metodología seguida para los pretratamientos y su evaluación fue descrita en el tercer informe (Carrizales y col. 1989).

2.- MATERIALES Y EQUIPOS.

2.1.- Material celulósico: Se utilizó soca de sorgo y bagacillo de caña, los cuales fueron previamente caracterizados y los resultados reportados en el segundo informe Técnico sobre el análisis de las materias primas (Sánchez y Col, 1989).

2.2.- Enzima celulasa: se usó dos tipos de celulasa. La primera fue preparada en el laboratorio a partir de un cultivo de *Trichoderma viride* QM 9414 sobre afrecho de trigo; la metodología para la preparación, extracción y evaluación de la actividad enzimática de esta enzima fue descrita en el segundo informe Técnico (Carrizales y Col, 1989). La otra forma de celulasa usada para algunos experimentos, fue un polvo crudo liofilizado de celulasa de *T. viride* la cual fue suministrado por Sigma.

2.3.- Equipos para el pretratamiento.

2.3.1.- Explosión térmica: el equipo usado consistió de un autoclave Baskerville de 750ml de capacidad que trabaja a 300 atm y 300C. La descripción detallada de éste está reportada en el tercer informe Técnico (Carrizales y Col, 1989).

3.-METODOLOGIA.

3.1.- Explosión térmica: El material con un 50% de humedad es colocado en un portamuestra dentro del reactor en el cual se ha agregado previamente 90 ml de agua para generar el vapor requerido para el pretratamiento. El reactor es cerrado y se inicia el calentamiento, dejando la válvula de bola abierta hasta lograr el desplazamiento del aire que está dentro del reactor. Una vez alcanzada la temperatura de 100C se cierra la válvula y se continúa el calentamiento hasta alcanzar la presión deseada. Esta es mantenida durante un tiempo de reacción seleccionado (en los experimentos a presión constante, el tiempo fue de 5 minutos) y luego se procede a despresurizar rápidamente el reactor. Posteriormente se remueve el cabezal y se extrae el portamuestra en caliente. El material tratado se seca a 100C durante 24 horas, para ser luego analizado (Carrizales y Col, 1989). La experiencia fue realizada de dos maneras. Primero, se fijó el tiempo de reacción en 5 minutos y se varió la presión entre 180 y 336 PSI. La segunda, se realizó manteniendo la presión constante en 225 PSI y se varió el tiempo de reacción en 2, 5 y 10 minutos. Esta última presión fue seleccionada tomando en consideración los resultados obtenidos de los primeros ensayos.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Digestibilidad enzimática in vitro (DEIV)

Se siguió la técnica sugerida por Jones y Hayward (1973), la cual consiste en tratar 200 mg de muestra con una solución de enzima celulolítica con una actividad de 1 UI/ml (una unidad internacional equivalente a la cantidad de micromoles de glucosa liberados por minuto) a las condiciones de 50°C y 48 horas de incubación a un pH de 4.8.

La enzima fue previamente obtenida de un cultivo semisólido del mohó *Trichoderma viride* ATCC 9414 tal como se discutió en el informe II de este proyecto.

3.2.2 Digestibilidad ruminal in vitro (DRIV)

Para la determinación de la DRIV se usó la técnica de Tilley y Terry (1963). A tal efecto las muestras de material tratado fueron

enviadas al Laboratorio de Nutrición y Forrajes de la Universidad de Oriente.

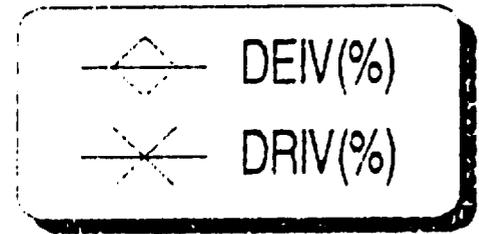
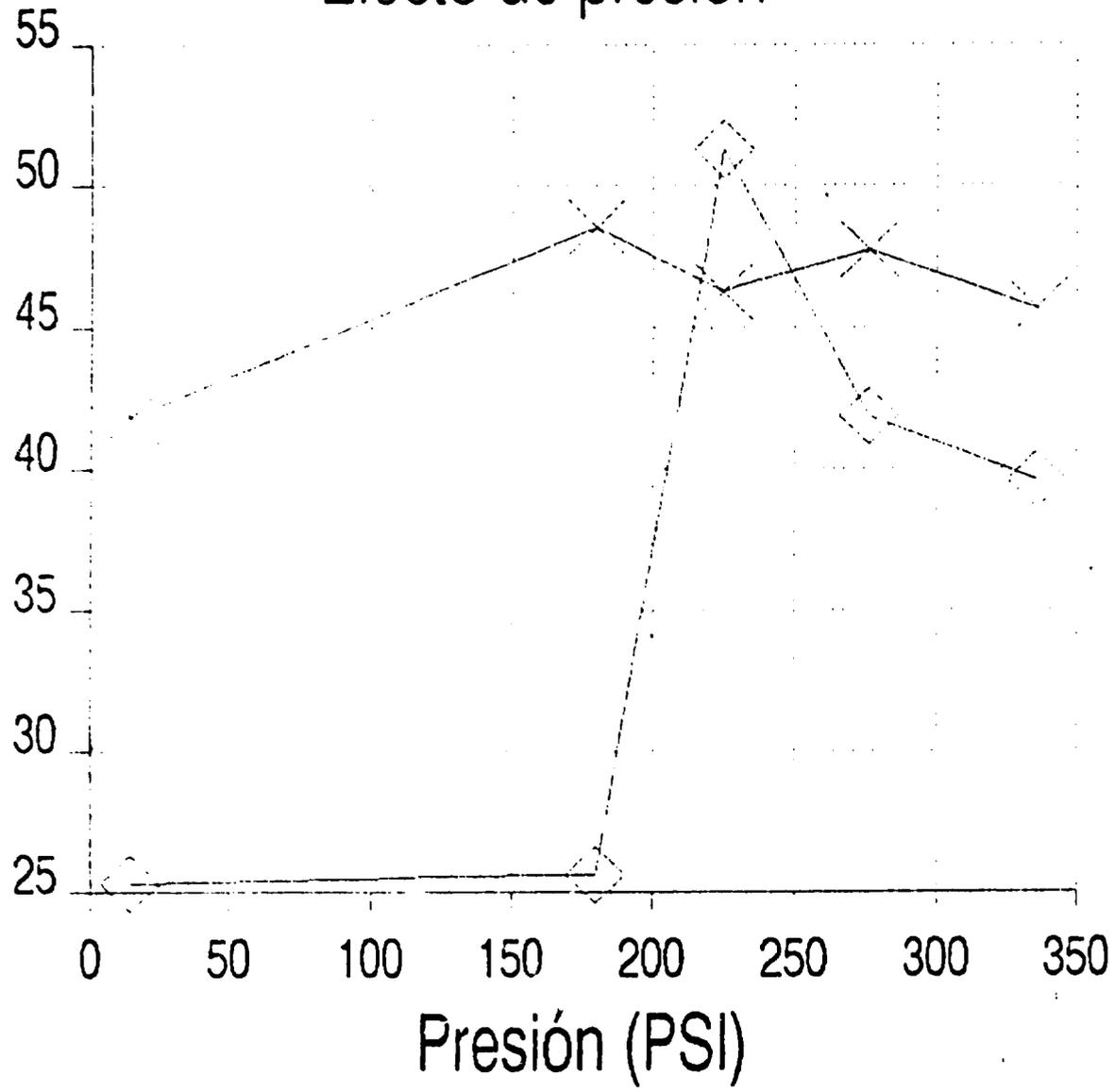
4.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.

La Figura 1 muestra el efecto de la presión sobre la digestibilidad enzimática *in vitro* (DEIV) y la digestibilidad ruminal *in vitro* (DRIV) de la soca de sorgo, para un tiempo de reacción de 5 minutos. Puede observarse en esta figura, que la presión fue variada desde 180 Psia (190°C) hasta 336 Psia (220°C). En este caso, la presión más favorable fue de 225 psia (200°C) en la cual la DEIV alcanzó un valor de 51,30%. A estas condiciones el incremento de la digestibilidad con respecto a la muestra control (25,30%) fue de 102,77%. Hasta ahora no se ha entendido el por qué la DEIV para la presión de 180 Psia se mantuvo similar a la obtenida a las condiciones de control (14,7 Psia). En todo caso se tiene previsto repetir esta experiencia antes de continuar la nueva etapa del segundo año. Sin embargo, la tendencia de los resultados indica que la presión de 225 psia ha de ser la más conveniente para los tratamientos. Se observa igualmente en la presente figura, que la DRIV no varió sustancialmente (45,68 - 48,56%) con respecto a la muestra control (41,88%), por lo tanto, estos últimos resultados parecen indicar que no tiene sentido pretratar por explosión térmica a la soca de sorgo para ser usada directamente en alimentación animal, a menos que haya habido inconveniente con la técnica empleada. En general algunos nutricionistas sostienen que es necesario alimentar a los animales donantes del líquido ruminal con un forraje parecido o similar al empleado para la evaluación ruminal (González, 1988). La medición de la digestibilidad ruminal *in vitro*, tal como se efectuó en este estudio, no siguió estos criterios ya que igual argumento podría desprenderse al utilizar una celulasa producida en un sustrato distinto a aquel a ser usado en los ensayos de DEIV. Es por ello que las pruebas definitivas tendrán que hacerse desde el punto de vista microbiológico. En este sentido se podría conocer si tal comportamiento es similar para el crecimiento de microorganismos celulolíticos, tal como está planteado en el presente proyecto en los experimentos planificados para la segunda etapa.

Por arriba de la presión de 225 psia se observó una reducción de la digestibilidad enzimática *in vitro*, lo cual se interpretó como una posible caramelización de los azúcares provenientes de la hemicelulosa (Ulmer y colaboradores, 1981).

D
i
g
e
s
t
i
b
i
l
i
d
a
d
(
%

Fig. 1. DEIV Y DRIV para muestras de sorgo
Efecto de presión



La figura 2, muestra la DEIV y la DRIV del bagacillo de caña. Obsérvese en esta figura que a 226 psia (200°C) se logró una mayor DEIV (44,4%), lo cual representó un incremento del 131,25% con respecto a la muestra control (19,20%). Por arriba de esta presión, la DEIV comenzó a decrecer, tal como se observó en la figura anterior. En relación a la DRIV se evidenció poco efecto de la presión ya que el aumento relativo de la digestibilidad varió entre el 33,63 al 36,93% para presiones de 180 a 336 psia. En general estos experimentos parecen indicar que la soca de sorgo es más recomendable como sustrato ya que los niveles de DEIV y DRIV fueron superiores a los mostrados por el bagacillo de caña. Los estudios de tratamiento térmico del bagacillo de caña reportados por Morjanoff y Gray (1987) señalaron que con 4 minutos de tratamiento a 220°C, la DEIV fue del 45,2%.

La figura 3, muestra los cambios de la DEIV en los sustratos sorgo y bagacillo como una función del tiempo de reacción y manteniendo constante la presión de 225 Psia (200°C). En ese sentido, se puede observar en esta figura que el sorgo pareciera requerir mayor tiempo de reacción para alcanzar un nivel de digestibilidad por arriba del 55%. A estas mismas condiciones, el bagacillo presenta mucho deterioro al ser sometido a largos tiempos de reacción. Similares experimentos realizados por Puri y Pearce (1986), indicaron que con tiempos de 5 minutos a 200°C, se pudo alcanzar hasta un 55% de DEIV, sin embargo, cuando al sustrato le fue incorporado hidróxido de sodio o hidróxido de calcio, la digestibilidad se mejoró sustancialmente (70% y 66% respectivamente). De una manera similar los investigadores Morjanoff y Gray (1987) incrementaron la DEIV del bagacillo de caña hasta un 57% mediante la adición al bagacillo de caña de 1 a 2% de ácido sulfúrico durante el proceso de autohidrólisis. En los experimentos reportados en este informe no se hizo intento de añadir sustancias químicas para la autohidrólisis ya que se creyó que tal práctica contribuiría a incrementar los costos de operación de un proceso de autohidrólisis por explosión térmica. Sin embargo, el mismo deberá evaluarse en términos del costo total por cada unidad de DEIV obtenida.

La figura 3 muestra igualmente que los tiempos de reacción cercanos o superiores a 10 minutos causan un detrimento a la DEIV de ambos sustratos. Este mismo comportamiento fue observado por los autores anteriores cuando se trató bagazo de caña a tiempos superiores de 5 minutos. Para estos experimentos, no se analizó la composición de la fracción líquida, la cual fue muy reducida en volumen, ya que la misma se quedó atrapada en el sustrato.

Además, la humedad inicial de trabajo para el sustrato fue baja(50%) por cuanto el interés de los experimentos estuvo basado en usarlo para cultivos semisólidos. Por consiguiente, no sería conveniente desde el punto de vista económico, eliminar los sólidos solubles formados durante la autohidrólisis. Es de señalar igualmente que el material sometido a pretratamiento fue de un tamaño de partícula muy similar(0,8 mm) al usado por otros investigadores(1,0 mm), lo cual en algunos casos puede influir grandemente cuando se compara resultados distintos con aquellos reportados en la literatura.

En general la autohidrólisis efectuada a una presión de 225 Psia(200°C) parece ser muy conveniente para la consecución de los experimentos contemplados para el futuro de este proyecto ya que ésta ha demostrado ser una manera efectiva de adecuar los residuos lignocelulósicos a la acción enzimática o microbiana. En tal sentido, estos resultados indican que hay una alta posibilidad de usar bagacillo y/o sorgo, pretratado por explosión térmica, como un sustrato para el crecimiento de microorganismos celulolíticos.

Es bueno señalar que la literatura cita que los residuos celulósicos tratados por explosión térmica pueden ser usados como sustrato para el crecimiento de microorganismos(Morjanoff y Gray, 1987; Ulmer y col,1981). En nuestro Laboratorio no han podido ser iniciados todavía experimentos de cultivo semisólido sobre bagacillo o sorgo tratado por explosión térmica, dado a la poca cantidad de material que es obtenido, la cual no es suficiente para los ensayos de cultivo semisólido tal como se tiene previsto en este proyecto para la segunda etapa. En ese sentido, actualmente se está diseñando un sistema de tratamiento de mayor capacidad a fin de realizar los experimentos de cultivo sin mayor limitación del material tratado.

En relación con la disponibilidad de los sustratos bagacillo y soca de sorgo, es bueno señalar que en el primer informe se estableció que el sorgo sería la materia prima más importante a ser usada en este proyecto, ya que los niveles de producción o generación de soca de sorgo esperados para 1995 serían de alrededor de tres millones de toneladas métricas, sin embargo, si se toma en consideración la nueva realidad económica que está viviendo actualmente Venezuela, se llegaría a la conclusión de que este sustrato no estará disponible a mediano y a largo plazo en las cantidades previstas en el Informe I(Alvarez y colaboradores, 1988). Para el presente año, no habrá producción significativa de sorgo en Vene

FIG 2. DEIV Y DRIV para muestras de bagacillo
Efecto de presión

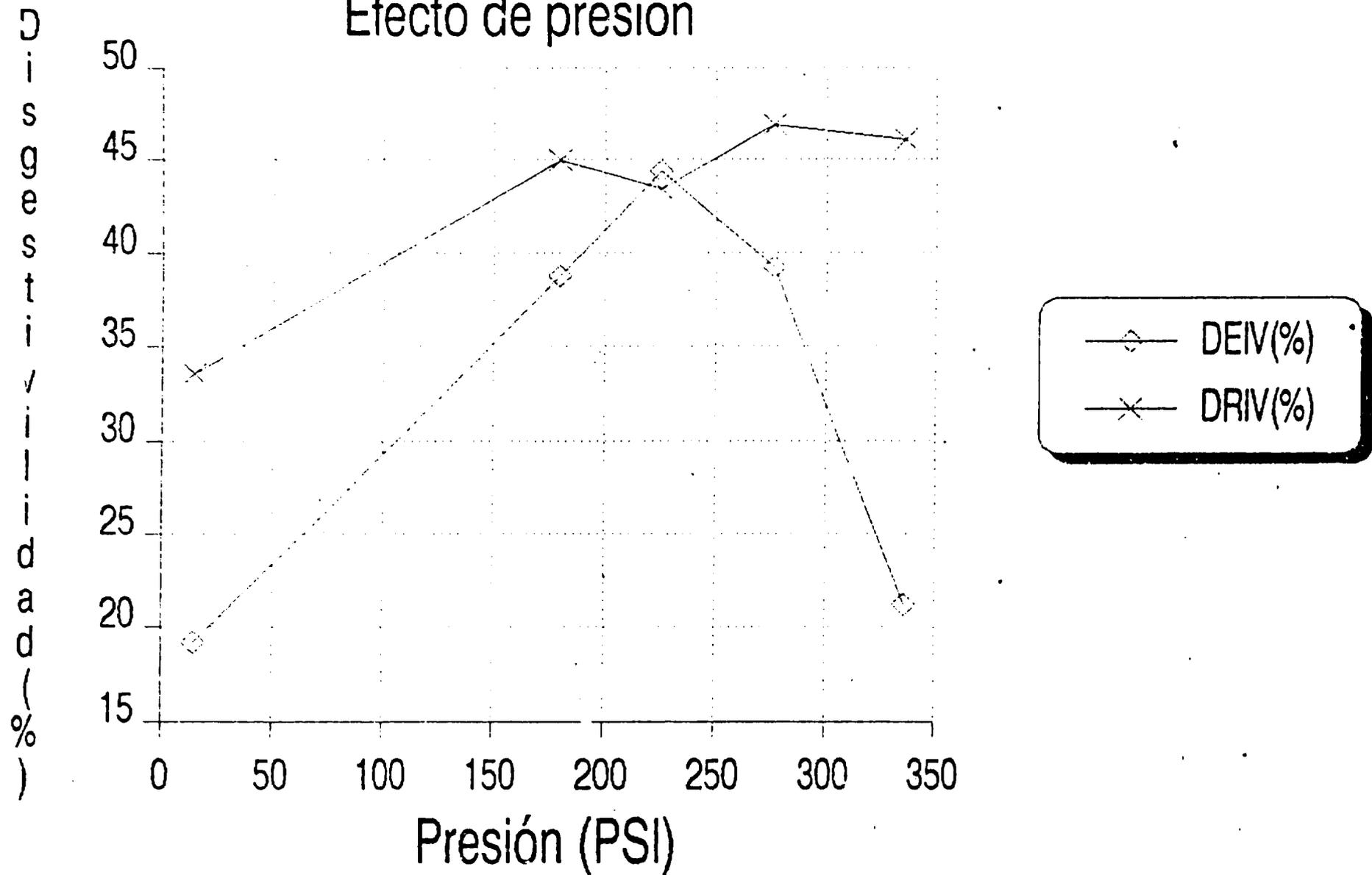
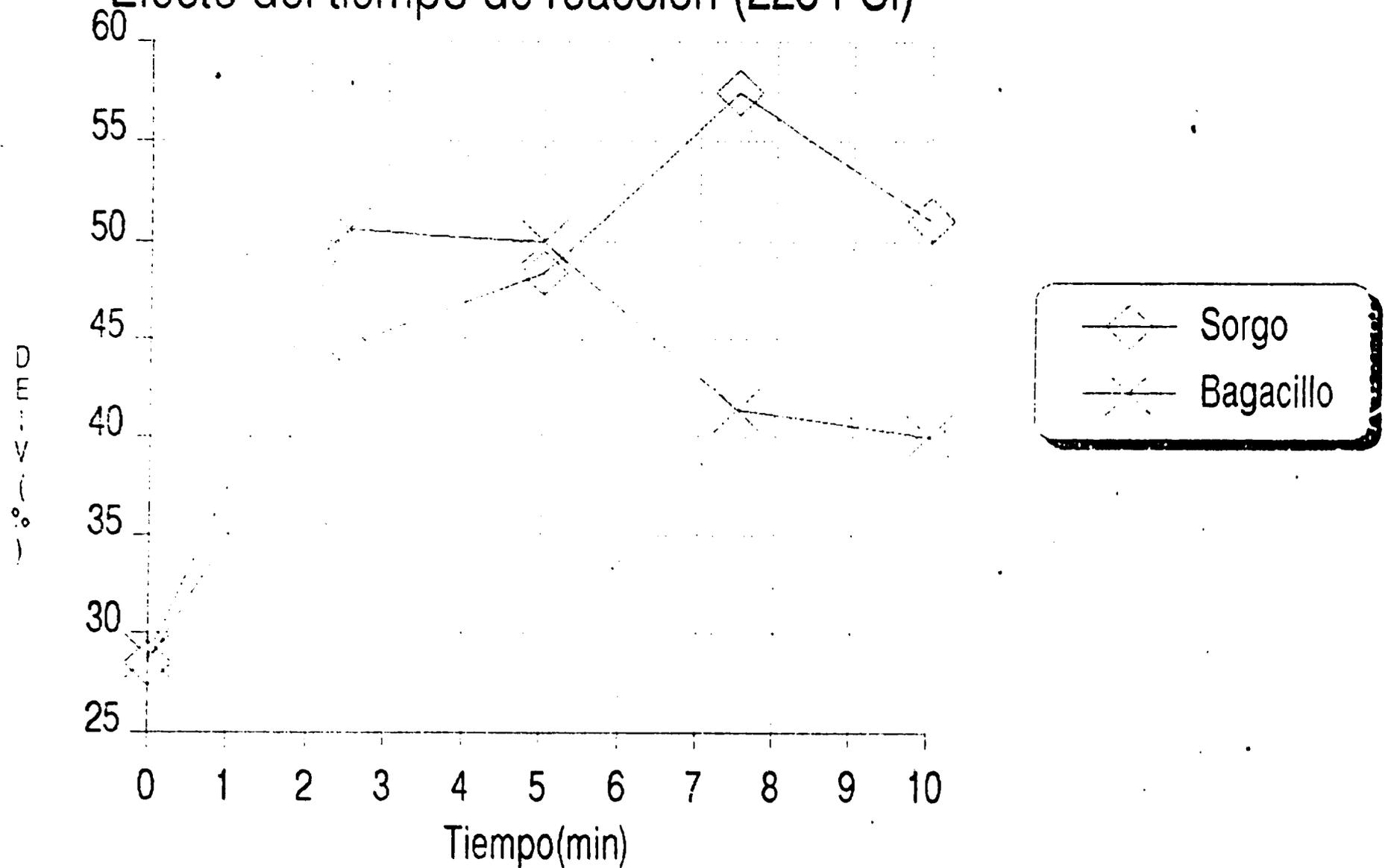


Fig 3. DEIV para muestras de sorgo y bagacillo
Efecto del tiempo de reacción (225 PSI)



ziela ya que la política oficial de aranceles agrícolas permitirá la importación de este rubro. En ese sentido, se fijará mayor atención hacia el sustrato bagacillo de caña, el cual se mantendrá a un nivel de generación muy similar a lo previsto en el informe I de este proyecto.

5. CONCLUSIONES

- Del estudio contemplado en la actividad 12.05 para los términos de referencia del contrato de ONUDI, se infiere que el pretratamiento por explosión térmica mejora sustancialmente la calidad nutricional del bagacillo de caña y la soca de sorgo, en virtud de que la digestibilidad enzimática in vitro de éstos se incrementó en 102,77 y 131,25% respectivamente, cuando la presión usada fue de 225 psia (200°C). En cambio la digestibilidad ruminal in vitro se incrementó en 10,55 y 29,90% para ambos sustratos respectivamente.
- Igualmente se encontró que el rango de tiempo recomendado de tratamiento para provocar la despresurización súbita del reactor, estuvo entre 3 y 5 minutos para el bagacillo de caña y de 5 y 10 minutos para la soca de sorgo. Obviamente, que estos tiempos pueden depender del arreglo que se haga del sustrato dentro del reactor y de la ubicación del termopar que se use para indicar la temperatura de trabajo. En tal sentido, se recomienda estudiar este comportamiento toda vez que se desee modificar las condiciones geométricas del sistema de tratamiento bajo consideración.
- Igualmente es de hacer notar que los estudios previstos para el sustrato soca de sorgo dentro de los planes futuros de este proyecto, no tienen mucho interés ahora, dado a que en Venezuela se ha sentido una reducción sustancial en la generación de la soca de sorgo, debido a la nueva situación económica que está viviendo este país. Por consiguiente, toda la atención se dirigirá hacia el residuo bagacillo de caña.

6. REFERENCIAS

- Alvarez M., Ramirez M., Carrizales V. (1988). Primer Informe Técnico sobre la Disponibilidad y Localización de Residuos Ligno celulósicos en Venezuela. Proyecto "Degradación Enzimática de Residuos Agroindustriales" CONICIT-ONUDI. Caracas, Venezuela.
- Carrizales V., Revel-Chión L., Contreras C., Ramirez M., González M., Ramirez Y., Meza M. (1989). II Informe Técnico sobre los Pretratamientos de las Materias Primas. Proyecto "Degradación Enzimática de Residuos Agroindustriales" CONICIT-ONUDI. Caracas, Venezuela.
- González M. (1989). Comunicación personal. Laboratorio de Forrajes y Nutrición de la Universidad de Oriente. Maturín Edo. Monagas. Venezuela.
- Jones D., Hayward M. (1973). A cellulase Digestion Technique for Predicting the Dry Matter Digestibility of Grasses. J. Sci. Fd. Agric. 24(1419-1426).
- Morjanoff P., Gray P., (1987). Optimization of Steam Explosion as a Method for Increasing Susceptibility of Sugarcane Bagasse to Enzymatic Saccharification. Biotechnology and Bioengineering. 29(733-741).
- Puri, V.P., Pearce G. R. (1986). Alkali-Explosion Pretreatment of Straw and Bagasse for Enzymic Hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, 23(480-485).
- Sánchez J., Revel-Chión L., Ramirez M., Carrizales V., Alvarez M. (1989). II Informe Técnico sobre el Análisis de las Materias Primas. Proyecto "Degradación Enzimática de Residuos Agroindustriales" CONICIT-ONUDI, Caracas, Venezuela.
- Tilley J. Terry R. (1963). J. Br. Grassl. Soc. 18(104-111).
- Ulmer D.C., Tengerdy R., Murphy V. (1981). Solid State Fermentation of Steam-Treated Feedlot Waste Fiber with Chaeto-

ium cellulolyticum. Biotechnology and Bioengineering Symp.
N°11, 449- 461.

ACTIVIDAD 12.05

En esta actividad se contempló enviar dos técnicos venezolanos a Chile con el propósito de recibir adiestramiento y compartir experiencias en relación con el diseño de equipos, normalización de técnicas analíticas y pretratamiento biológico de organismos lignolíticos. En tal sentido, el Coordinador del proyecto consideró no oportuno enviar los técnicos a Chile por las razones siguientes:

- El grupo de trabajo de la Universidad de Los Andes, de acuerdo a criterios del Dr. Sánchez Crispin, manejaba con experticia las técnicas analíticas previstas para el análisis de la materia prima, por lo tanto no tenía sentido para nosotros usar el presupuesto asignado en la mencionada misión.
- Se consideró igualmente no enviar el otro técnico a Chile para recibir adiestramiento en la evaluación de una metodología para evaluar microorganismos lignocelulósicos por cuanto el Dr. Andrés Illanes nos informó verbalmente que el principal investigador responsable de esa actividad en la Universidad de Chile se había desincorporado de esta Universidad.
- En relación con el punto de diseño, planteado en el inciso a de la actividad 12.05, se dejó abierta para el momento más oportuno que coincidiría con el inicio del segundo año de ejecución del presente proyecto. Además, por razones de atraso de presentación de informes fue imposible solicitar los recursos para llevar a cabo la visita a Chile por parte de un investigador venezolano. En tal sentido, toda vez que se logre la actualización de nuestro proyecto por parte del grupo de Venezuela, se podrá disponer de los fondos para cumplir con esta actividad. En todo caso se tiene previsto un viaje para el Dr. Lucas Alvarez, quién está incorporado al grupo de la Universidad de Oriente y comparte las tareas de diseño de reactores biológicos para cultivos semi-sólidos.

ACTIVIDAD 12.06

En esta actividad se contempla la preparación de reportes técnicos trimestrales, los cuales en el caso del grupo de Venezuela, éstos no pudieron presentarse en la debida oportunidad. En realidad parte del retraso se ha debido a situaciones ajenas al proyecto que tuvieron que ver con diversos hechos como conflictos estudiantiles y profesoriales en la Universidad de Oriente; acondicionamiento de un Laboratorio de Fermentación Industrial en el Centro de Investigaciones Tecnológicas de Oriente (CITO), sede actual de nuestro proyecto por parte del grupo de la Universidad de Oriente. Asimismo, ha resultado infructuoso reunir los tres grupos venezolanos que hicieron compromiso con el presente proyecto. Las reuniones entre el grupo de la Universidad Simón Bolívar y la de Oriente ha sido muy estrecha, no así con la Universidad de Los Andes. Parte de este alejamiento se ha debido principalmente a que este último grupo sólo tenía contemplado participar en las dos primeras actividades del programa, tal como fue planteado en los términos de referencia del proyecto.

En relación con el plan de trabajo para el segundo año fue presentado y discutido entre los grupos de la USB y de Oriente. Este mismo plan ya ha sido discutido a nivel de países (Chile, Perú y Venezuela). En tal sentido, que sólo se está esperando de la aprobación por parte del Director del proyecto, Dr. Rodolfo Quintero, a fin de dar inicio a las actividades contempladas para el segundo año.