



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Aurea Victoria Alarcón Elias

Ingeniero Biotecnólogo

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON *Zymomonas mobilis*

Dirigida por

Dr. Enrique Durán Páramo

México, D.F. 21 de Enero de 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

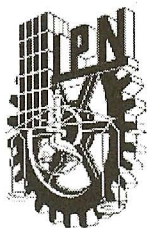
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 22 del mes de Enero del año 2010, el (la) que suscribe Alarcón Elias Aurea Victoria alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A070534, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Enrique Durán Páramo y cede los derechos del trabajo intitulado "Producción de bioetanol con *Zymomonas mobilis*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección aureav84@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Aurea Victoria Alarcón Elias

Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 15 del mes de enero del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON Zymomonas mobilis.

presentada por la alumna:

ALARCÓN
Apellido paterno

ELÍAS
materno

AUREA VICTORIA
nombre

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0 | 7 | 0 | 5 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante al grado de: Maestra en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO

DR. FABIAN ROBLES MARTÍNEZ

DRA. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR

DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Edgar Salgado Manjarrez.

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Resumen

El desarrollo de un proceso de fermentación usando fuentes de carbono económicas es de suma importancia para la producción de biocombustibles en una escala comercial. La rentabilidad del proceso de fermentación depende en gran parte del pre-tratamiento que se le dé a la materia prima. El almidón es, después de la celulosa, la principal sustancia glucídica sintetizada por los vegetales superiores a partir de la energía solar por el proceso de fotosíntesis. Las fuentes de almidón más importantes son los granos de cereal, los granos de leguminosas y los tubérculos. Existen varios métodos físicos, químicos y biológicos para hidrolizar los enlaces de las cadenas del almidón y de esta forma obtener azúcares fermentables. Mediante un estudio estadístico, un diseño factorial 2^3 y un diseño central 2^3 se estudiaron las mejores condiciones de hidrólisis del almidón para obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables. Se realizó el análisis de estudio de la varianza (ANOVA) y un diseño factorial de 2^3 se para estudiar tres factores importantes en la hidrólisis ácida: temperatura, concentración de H_2SO_4 y el tiempo. Se encontró, con un 95% de confianza, que las mejores condiciones para la hidrólisis del almidón de yuca y malanga fueron: 5% de H_2SO_4 , 5 horas y $95^\circ C$, los rendimientos de obtención de 0,47 g glu / g de harina de yuca y 0,52 g glu / g de harina de malanga. Se realizó un diseño experimental central y un análisis de superficie de respuesta con el fin de determinar las mejores condiciones para la hidrólisis enzimática de la harina de yuca y malanga usando a las enzimas α -amilasa y amiloglucosidase en sinéresis. Tres de los factores considerados importantes para la reacción fueron estudiados: temperatura, pH y tiempo de hidrólisis. El análisis de superficie de respuesta mostró que la respuesta fue mínima en los puntos centrales para ambos casos tubérculos y que, con un nivel de confianza del 95%, las mejores condiciones para la hidrólisis enzimática fueron: $73,6^\circ C$, pH 4,08 y 3 h, con un rendimiento de 0,27 g glu / g de harina de yuca y 0,16 g glu / g de harina de malanga.

Abstract

Development of a fermentation process using economic carbon sources is extremely important for commercial scale biofuel production. Profitability of the fermentation process depends mainly on the pretreatment given to the raw materials. Starch is, the principal glucidic substance synthesized by superior vegetables from solar energy through photosynthesis. There are many physical, chemical and biological methods to hydrolyze starch chain bonds and in this way to obtain fermentable sugars. In this work, the best acidic and enzymatic hydrolysis conditions for yucca and malanga starch were studied through a statistical study in order to obtain the highest yield of fermentable sugars. An analysis of variance study (ANOVA) and a 2^3 factorial design were performed to study three important factors in acidic hydrolysis: temperature, H_2SO_4 concentration and time. It was found, with a 95% of confidence, that the best hydrolysis conditions for the yucca and malanga starch were: 5% H_2SO_4 , 5 h and $95^\circ C$; obtaining yields of 0.47 g glu/g of yucca flour and 0.52 g glu/g of malanga flour. A 2^3 central design and a response surface analysis were performed in order to determine the best conditions for the enzymatic hydrolysis of yucca and malanga flour starch with α -amylase and amiloglucosidase in syneresis. Three of the factors considered important for the reaction were studied: temperature, pH and hydrolysis time. Response surface analyses showed that the response was minimal in the central points for both tubers and that, with a 95% confidence, the best conditions for the enzymatic hydrolysis were: $73.6^\circ C$, pH 4.08 and 3 h, with a yield of 0.27 g glu/g of yucca flour and 0.16 g glu/g of malanga flour.

Agradecimientos

Gracias a Dios

Por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

Gracias a mi esposo Rocs

Por tu apoyo, comprensión y amor que me permite sentir poder lograr lo que me proponga. Gracias por escucharme y por tus consejos . Gracias por ser parte de mi vida; eres lo mejor que me ha pasado.

Gracias a mi mamá Margarita

Gracias por comprender y respetar la carrera y profesión que elegí.

Gracias Dr. Enrique Durán Páramo

Por permitirme ser parte del grupo de trabajo. Tus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecho en mi participación dentro del proyecto de investigación.

Gracias a mis amigos del laboratorio

Gabicita, Abril, Kari, César, Jonás y Benja por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno. No voy a olvidar sus consejos, enseñanzas y ayuda durante el lapso de mi tesis.

Gracias a cada uno de los maestros

Que participaron en mi desarrollo durante la Maestría, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

Contenido

| | |
|---|--------------------------------------|
| INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL..... | i |
| Declaración de originalidad | ¡Error! Marcador no definido. |
| Resumen..... | i |
| Abstract | ii |
| Acta de revisión..... | iii |
| Contenido | v |
| Índice de Figuras..... | vii |
| Índice de Cuadros | ix |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1. Biocombustibles..... | 2 |
| 2.1.1. Biocombustibles líquidos | 4 |
| 2.1.2. Biocombustibles líquidos de primera generación | 4 |
| 2.1.3. Biocombustibles líquidos de segunda generación | 5 |
| 2.1.4. Biocombustibles líquidos de tercera generación | 5 |
| 2.2. Producción de Bioetanol..... | 6 |
| 2.2.1. Materia prima para la producción de Bioetanol..... | 6 |
| 2.2.2. Microorganismos utilizados en la producción de Bioetanol..... | 18 |
| 2.3. Factores técnicos, económicos y normativos de los biocombustibles..... | 21 |
| 2.4. Biocombustibles y medio ambiente | 23 |
| 3. Justificación..... | 25 |
| 4. Objetivos | 26 |
| 4.1. Generales | 26 |
| 4.2. Específicos | 26 |
| 5. Materiales y métodos | 27 |
| 5.1. Selección y pre-tratamiento de la materia prima | 27 |
| 5.1.1. Selección y determinación de la cantidad de almidón soluble en el agua de la materia prima | 27 |
| 5.1.2. Preparación de la harina de Yuca y Malanga..... | 27 |
| 5.1.3. Hidrólisis ácida de la harina de Yuca y Malanga..... | 28 |
| 5.1.4. Hidrólisis enzimática de la harina de Yuca y Malanga | 30 |
| 5.1.5. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca | 30 |
| 5.1.6. Cuantificación de los azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida y enzimática de la harina de yuca y malanga usando la técnica de HPLC. | 31 |
| 5.2. Formulación del medio de cultivo | 35 |
| 5.3. Selección y mantenimiento de las cepa de <i>Zymomonas mobilis</i> B-806..... | 35 |
| 5.4. Fermentación en matraz de los medios de cultivo M1, M2 y M3 con <i>Zymomonas mobilis</i> | 36 |
| 5.4.1. Estimación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la elaboración de la curva patrón de glucosa..... | 36 |
| 5.4.2. Estimación de la concentración de biomasa por peso seco..... | 36 |
| 5.4.3. Determinación de la cantidad de etanol mediante la oxidación del etanol con la enzima Alcohol Oxidasa..... | 36 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.4.4. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1, M2 y M3 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 38 |
| 5.5. | Fermentación en un Biorreactor de 2 L New Brunswick Scientific Bioflo 110, del medio de cultivo M3 con <i>Zymomonas mobilis</i> | 39 |
| 5.5.1. | Estimación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la elaboración de la curva patrón de glucosa. | 39 |
| 5.5.2. | Estimación de la concentración de biomasa por peso seco. | 39 |
| 5.5.3. | Determinación de la cantidad de etanol mediante la oxidación del etanol con la enzima Alcohol Oxidasa. | 39 |
| 5.5.4. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el M3 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 41 |
| 6. | Resultados y discusión. | 42 |
| 6.1. | Selección y pre-tratamiento de la materia prima. | 42 |
| 6.1.1. | Determinación de la cantidad de almidón, soluble al agua, contenido en las raíces de yuca, camote y malanga. | 42 |
| 6.2. | Hidrólisis ácida de la harina de malanga. | 43 |
| 6.3. | Hidrólisis ácida de la harina de yuca. | 48 |
| 6.4. | Hidrólisis enzimática de la harina de yuca y malanga. | 53 |
| 6.4.1. | Hidrólisis enzimática de la harina de malanga. | 53 |
| 6.4.2. | Hidrólisis enzimática de la harina de yuca. | 55 |
| 6.5. | Cinética enzimática de la harina de yuca y malanga. | 56 |
| 6.5.1. | Cinética enzimática de la harina de malanga. | 56 |
| 6.5.2. | Cinética enzimática de la harina de yuca. | 57 |
| 6.6. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1, M2 y M3 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 58 |
| 6.6.1. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 58 |
| 6.6.2. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio M2 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 60 |
| 6.6.3. | Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio M3 con la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> B-806. | 61 |
| 6.7. | Fermentación en un Biorreactor de 2 L New Brunswick Scientific Bioflo 110, del medio de cultivo M3 con <i>Zymomonas mobilis</i> | 62 |
| 6.7.1. | Fermentación en un Biorreactor de 2 L (intercambio de oxígeno) de los azúcares reductores contenidos en medio de cultivo M3 con <i>Zymomonas mobilis</i> | 62 |
| 6.7.2. | Fermentación en un Biorreactor de 2 L (sin intercambio de oxígeno) de los azúcares reductores contenidos en medio de cultivo M3 con <i>Zymomonas mobilis</i> | 63 |
| 7. | Conclusiones. | 66 |
| 8. | Referencias. | 67 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1. Biocombustibles: desde la materia prima hasta el uso final. Fuente: FAO, 2008.</i> | 3 |
| <i>Figura 2. Los biocombustibles líquidos, provenientes de múltiples fuentes de carbono, son una alternativa energética a los combustibles convencionales.</i> | 5 |
| <i>Figura 3. Conversión de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos. Fuente: FAO, 2008.</i> | 7 |
| <i>Figura 4. Raíz de la Yuca (Manihot esculenta). Fuente: SAGARPA, 2008.</i> | 10 |
| <i>Figura 5. Malanga (Colocasia esculenta Schott). Fuente: Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2006.</i> | 12 |
| <i>Figura 6. Segmento trisacárido de una porción no ramificada de una molécula de amilosa o amilopectina. Fuente: BeMiller y Whistler, 1996.</i> | 14 |
| <i>Figura 7. Representación de una porción de una molécula de amilopectina. Fuente: BeMiller y Whistler, 1996.</i> | 15 |
| <i>Figura 8. Células resuspendidas de Z. mobilis CP4 (5600x). Fuente: Electronic Journal of Biotechnology, 2008.</i> | 20 |
| <i>Figura 9. Sistema montado para la realización de la cinética enzimática de la harina de yuca.</i> | 31 |
| <i>Figura 10. Sistema de filtración Millipore. Fuente: Millipore™</i> | 31 |
| <i>Figura 11. Arriba: Yuca (Manihot esculenta). Abajo: Malanga (Colocasia esculenta).</i> | 43 |
| <i>Figura 12. Gráfica normal de los efectos estandarizados, que muestra la significancia de los efectos encontrados en el ensayo de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.</i> | 45 |
| <i>Figura 13. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, en donde se observan los efectos de los factores estudiados en la hidrólisis ácida de la harina de malanga.</i> | 45 |
| <i>Figura 14. Gráfica de los efectos principales, en donde se observa el efecto de los factores evaluados en la hidrólisis ácida de la harina de malanga.</i> | 46 |
| <i>Figura 15. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.</i> | 47 |
| <i>Figura 16. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.</i> | 47 |
| <i>Figura 17. Gráfica normal de los efectos estandarizados, que muestra la significancia de los efectos encontrados en el ensayo de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | 49 |
| <i>Figura 18. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, en donde se observan los efectos de los factores estudiados en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | 50 |
| <i>Figura 19. Gráfica de los efectos principales, en donde se observa el efecto de los factores evaluados en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | 50 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Figura 20. Gráfica de cubo, en donde se observan las medias de las respuestas obtenidas de cada ensayo evaluado en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | <i>51</i> |
| <i>Figura 21. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | <i>52</i> |
| <i>Figura 22. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.</i> | <i>52</i> |
| <i>Figura 23. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.</i> | <i>54</i> |
| <i>Figura 24. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.</i> | <i>55</i> |
| <i>Figura 25. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca. ...</i> | <i>55</i> |
| <i>Figura 26. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca. ...</i> | <i>56</i> |
| <i>Figura 27. Gráfica de la cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.</i> | <i>57</i> |
| <i>Figura 28. Gráfica de la cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.</i> | <i>58</i> |
| <i>Figura 29. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con Zymomonas mobilis B-806 y el medio 1.</i> | <i>59</i> |
| <i>Figura 30. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con Zymomonas mobilis B-806 y el medio 2.</i> | <i>60</i> |
| <i>Figura 31. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con Zymomonas mobilis B-806 y el medio 3.</i> | <i>61</i> |
| <i>Figura 32. Gráfica de la cinética de la producción de etanol en un biorreactor de 2 L con Zymomonas mobilis B-806 y el medio 3.</i> | <i>63</i> |
| <i>Figura 33. Gráfica de la cinética de la producción de etanol en un biorreactor de 2 L con Zymomonas mobilis B-806 y el medio 3.</i> | <i>65</i> |

Índice de Cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Producción de biocombustibles por países, 2007..... | 4 |
| Cuadro 2. Rendimiento de los biocombustibles con diferentes materias primas, a nivel mundial y por países. | 8 |
| Cuadro 3. Rendimiento potencial hipotético para el etanol procedente de los principales cultivos de cereales y de azúcar..... | 9 |
| Cuadro 4. Composición química de 100 gramos de yuca (base húmeda). | 11 |
| Cuadro 5. Patrones de uso mundial de yuca. | 11 |
| Cuadro 6. Composición bioquímica del camote..... | 12 |
| Cuadro 7. Composición química de 100 gramos de malanga (base húmeda). | 13 |
| Cuadro 8. Diluciones para la curva patrón de glucosa..... | 29 |
| Cuadro 9. Diluciones para la curva patrón de glucosa..... | 33 |
| Cuadro 10. Diluciones para la curva patrón de maltosa. | 34 |
| Cuadro 11. Diluciones para la curva patrón de etanol. | 37 |
| Cuadro 12. Diluciones para la curva patrón de etanol. | 40 |
| Cuadro 13. Concentración de almidón en 100 gramos de tubérculo en base húmeda | 42 |
| Cuadro 14. Diseño Experimental Factorial 2^3 de la hidrólisis ácida de la harina de malanga. .. | 44 |
| Cuadro 15. Diseño Experimental Factorial 2^3 de la hidrólisis ácida de la harina de yuca..... | 48 |
| Cuadro 16. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga | 56 |
| Cuadro 17. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca. | 57 |
| Cuadro 18. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 1. | 59 |
| Cuadro 19. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 2. | 60 |
| Cuadro 20. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3. | 61 |
| Cuadro 21. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3. | 62 |
| Cuadro 22. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3. | 64 |

1. INTRODUCCIÓN

Desde que la humanidad comenzó a poblar la tierra tuvo necesidades de distintos tipos, una de las más importantes es la de tipo energética, para proveerse de luz, fuego, comida, etc. Con el paso del tiempo estas poblaciones fueron creciendo convirtiéndose en grandes ciudades, por su tamaño e infraestructura comenzaron a demandar una mayor cantidad de energía. En la actualidad, estas urbes, dependen en gran parte de la energía obtenida de diferentes fuentes, como lo son las de origen: fósil, hídrica, geotérmica, desechos, carbon y biológico.

De acuerdo con la Agencia Internacional de Energía (IEA, por sus siglas en inglés) hasta el 2006 el suministro mundial de energía primaria era de 11741 Mtoe (Millones de toneladas equivalentes de petróleo), de esta cantidad sólo se consumieron 8084 Mtoe, de los cuales el 43.1 % corresponden a petróleo y 12.9% a combustibles renovables y desechos. Es clara la evidencia de que aún se tiene una gran dependencia de la energía de origen fósil. Sin embargo, los últimos años se ha ido demostrando que este tipo de energía contribuye en gran parte a la contaminación atmosférica, además de que algunos de los pozos petroleros están llegando a su máxima producción.

Debido a esta problemática la mayoría de los gobiernos del mundo, como el brasileño, buscan la independencia de este tipo de energía. Desde 1975 Brasil empezó a crear el programa ProAlcool, que proponía utilizar etanol, proveniente de la fermentación de azúcar de caña, como combustible para automóviles. A este gobierno le siguió Estados Unidos, que desde 1978 empezó a crear programas con el mismo objetivo.

Recientemente diferentes naciones, incluidas México, han mostrado interés por la creación de programas destinados a la producción de energía de tipo renovable, en específico de biocombustibles.

Aunque la industria de biocombustibles ha ido creciendo los últimos años, las cantidades producidas a partir de cultivos como la caña y el maíz no cubren la demanda mundial de energéticos, ni siquiera del sector de transporte. Es por esto que, a nivel internacional, se están buscando fuentes alternativas, de la cuales se puedan obtener biocombustibles.

En este trabajo se estudiaron dos posibles fuentes de carbono para la producción de bioetanol, su pretratamiento y la fermentación de los azúcares obtenidos con *Zymomonas mobilis*.

2. ANTECEDENTES

La bioenergía es definida por la FAO como la energía producida a partir de biomasa, como cultivos energéticos, residuos forestales y desechos orgánicos. Si esta materia prima se produce de forma sostenible, se puede considerar una fuente de energía renovable. La biomasa se puede utilizar para producir energía de forma directa (incinerándola), combustibles líquidos o gases, sin embargo, en la actualidad se ha prestado la mayor atención a la producción de biocombustibles líquidos, utilizados en su totalidad por el sector de los transportes.

En el ámbito económico, la demanda de biocombustibles podría beneficiar al sector agrícola permitiendo a los países en desarrollo, que dependen en gran parte de la agricultura para su sustento, la oportunidad de utilizar el crecimiento agrícola para aumentar el desarrollo rural y reducir la pobreza.

En los países de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), entre estos México, los biocombustibles han sido promovidos mediante políticas impulsadas por los objetivos de seguridad energética, mitigación del cambio climático mediante la reducción de las emisiones de gases efecto invernadero, interés de apoyar la agricultura y el desarrollo rural.

Mundialmente los biocombustibles producidos a mayor escala son el bioetanol y el biodiesel. Brasil y Norteamérica son las únicas regiones del mundo que producen grandes cantidades de etanol como combustible, a partir de azúcar de caña y maíz (Wheals *et al*, 1999). Mientras que, el principal productor de biodiesel es Europa, usando como fuente primaria el aceite de diversos tipos de semillas.

2.1. Biocombustibles

Por su origen, se podría decir que los biocombustibles son una fuente de energía renovable, ya que son una forma de energía solar transformada. Se pueden producir a partir de una amplia gama de fuentes de biomasa, como: alimentos, fibras y residuos de madera, cultivos energéticos, cultivos de rotación breve y desechos agrícolas.

Los biocombustibles se pueden clasificar según la fuente de la cual se derivan, como productos forestales, agrícolas y pesqueros o desechos municipales, así como de la industria alimentaria. Se clasifican según su tipo en sólidos, como la leña; en líquidos, como el etanol y biodiesel; o gaseosos, como el biogás.

También se pueden catalogar como biocombustibles primarios (sin elaborar) y secundarios (elaborados). En el primer grupo encontramos a la leña, astillas, etc. Su combustión es de forma directa y en general se usa para cocinar o generar calor. Los del segundo grupo, por ejemplo el etanol, biodiesel, biogás, carbón vegetal, gas de síntesis y el hidrógeno; pueden ocuparse en más aplicaciones, como los trasportes y los procesos industriales.

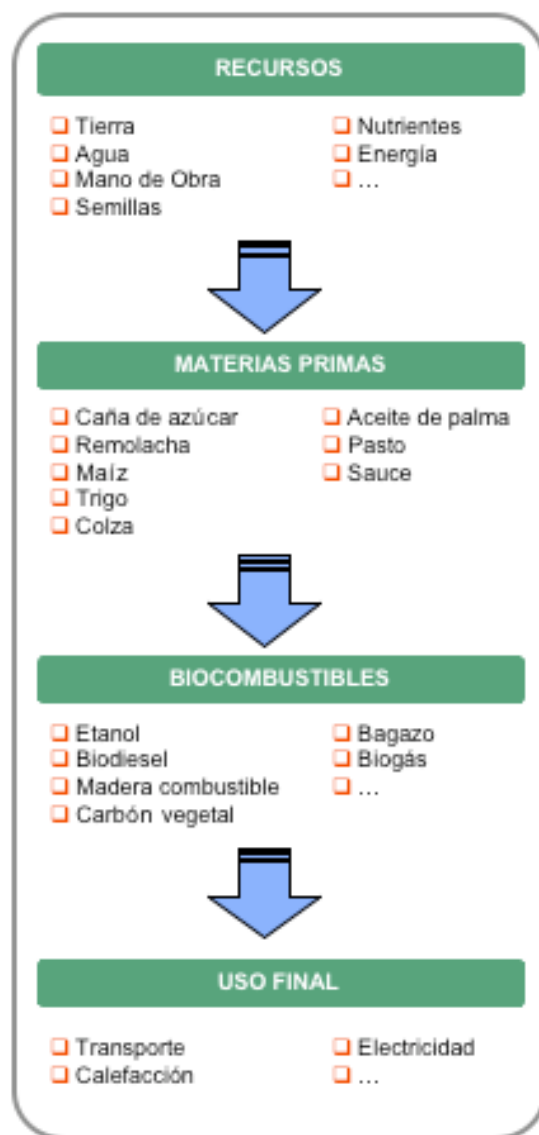


Figura 1. Biocombustibles: desde la materia prima hasta el uso final. Fuente: FAO, 2008.

2.1.1. Biocombustibles líquidos

Como se menciona anteriormente, los biocombustibles líquidos se utilizan principalmente en los transportes. Aunque su producción sólo cubre parte de la demanda mundial, se estima que a futuro su uso y producción aumenten en los siguientes años. Los más importantes, debido al crecimiento de su producción, son el bioetanol y el biodiesel.

2.1.2. Biocombustibles líquidos de primera generación

La primera generación de biocombustibles se refieren a aquellos realizados utilizando cultivos básicos como: azúcar, almidones, aceites vegetales, grasa animal y tecnologías convencionales.

En la actualidad, aproximadamente el 85 % de la producción mundial de biocombustibles líquidos está representada por el etanol (Cuadro 1). Los principales productores de bioetanol, Brasil y Estados Unidos de América, aportan casi el 90 % de la producción mundial, el 10 % restante se divide entre Canadá, China, la Unión Europea y la India. La producción de biodiesel se concentra principalmente en la Unión Europea, aportando cerca del 60 % del total, entretanto los Estados Unidos de América contribuye con una fracción considerablemente menor.

Cuadro 1. Producción de biocombustibles por países, 2007.

| PAÍS/GRUPO DE PAÍSES | ETANOL | | BIODIÉSEL | | TOTAL | |
|----------------------------------|----------------------|--------------|----------------------|-------------|----------------------|--------------|
| | (Millones de litros) | (Mtoe) | (Millones de litros) | (Mtoe) | (Millones de litros) | (Mtoe) |
| Brasil | 19 000 | 10,44 | 227 | 0,17 | 19 227 | 10,60 |
| Canadá | 1 000 | 0,55 | 97 | 0,07 | 1 097 | 0,62 |
| China | 1 840 | 1,01 | 114 | 0,08 | 1 954 | 1,09 |
| India | 400 | 0,22 | 45 | 0,03 | 445 | 0,25 |
| Indonesia | 0 | 0,00 | 409 | 0,30 | 409 | 0,30 |
| Malasia | 0 | 0,00 | 330 | 0,24 | 330 | 0,24 |
| Estados Unidos de América | 26 500 | 14,55 | 1 688 | 1,25 | 28 188 | 15,80 |
| Unión Europea | 2 253 | 1,24 | 6 109 | 4,52 | 8 361 | 5,76 |
| Otros | 1 017 | 0,56 | 1 186 | 0,88 | 2 203 | 1,44 |
| Mundo | 52 009 | 28,57 | 10 204 | 7,56 | 62 213 | 36,12 |

Fuente: Datos provenientes de la base de datos OCDE-FAO AgLink-Cosimo.

El mayor contenido de oxígeno del biodiésel facilita la combustión y reduce así las emisiones de contaminantes del aire en partículas, monóxido de carbono e hidrocarburos.

El aceite para producir biodiésel, se puede obtener de casi cualquier cultivo oleaginoso, como el ricino, la palma, algodón, soja, girasol, colza y coco. También se puede utilizar grasa animal extraída del procesamiento del pescado y otros animales.

2.1.3. Biocombustibles líquidos de segunda generación

La segunda generación de biocombustibles, incluye aquellos realizados a partir de materia prima proveniente de biomasa lignocelulósica. Aunque este tipo de combustible todavía no se produce a escala industrial, se espera que los procesos para su producción sean viables en los próximos 10 años.

2.1.4. Biocombustibles líquidos de tercera generación

Esta tecnología consiste en la utilización de algas para producir biocombustibles. Las algas son organismos unicelulares procariontes y autotróficos que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica y acumulan glucógeno (azúcar) como la principal forma de carbono almacenado. El alga verdeazulada prolifera rápidamente y utiliza de manera eficiente la radiación solar, CO_2 y elementos inorgánicos, utilizan la fotosíntesis como medio para capturar de manera eficiente la energía del sol para convertirla en azúcar intracelularmente, lo que les proporciona la energía para crecer y reproducirse. Actualmente existen algas modificadas genéticamente para la producción directa de etanol.



Figura 2. Los biocombustibles líquidos, provenientes de múltiples fuentes de carbono, son una alternativa energética a los combustibles convencionales.

2.2. Producción de Bioetanol

El etanol es un excelente combustible, puede ser mezclado con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. Un litro de etanol contiene alrededor de el 66 % de la energía suministrada por un litro de petróleo, sin embargo posee un nivel más elevado de octano y, mezclado con gasolina para el transporte, mejora el rendimiento de esta última. En Estados Unidos y Brasil se mezcla del 10 al 22% de etanol en gasolina (Wyman, 1994 en Prasad *et al*, 2007). Esta mezcla da como resultado un combustible que contiene 35% de oxígeno lo que reduce las emisiones de dióxido de carbono y óxido de nitrógeno en la combustión (Wheals *et al*,1999). Si el etanol se usa directamente (95% etanol y 5% de agua) como combustible, podría proveer grandes beneficios ambientales debido a su baja presión y la reducción de emisiones en la atmósfera y así realizar una combustión más limpia, reduciendo las emisiones de dióxido de carbono, monóxido de carbono y ozono (Lynd *et al*, 1991 en Prasad *et al*, 2007). En comparación con la gasolina, el etanol contiene solo una cantidad mínima de azufre, por tanto, la combinación con gasolina reduce también las emisiones de óxido de azufre, componente de la lluvia ácida y carcinógeno.

El etanol se produce, principalmente, a partir de azúcar o almidón, la primera se obtiene de la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo azucarado; mientras que el segundo proviene del maíz, el trigo y la yuca.

A nivel internacional, Brasil es reconocido por ser el precursor en introducir el etanol como biocombustible. Actualmente, junto con Estados Unidos de América, sigue siendo uno de los mayores productores de etanol; sin embargo, debido a las políticas actuales muchos otros países están aumentando su producción rápidamente. Entre estos países se encuentran China, India, Tailandia y varios países africanos.

2.2.1. Materia prima para la producción de Bioetanol

Debido a la expansión y crecimiento de la industria de los bioenergéticos, el sector agropecuario a ido tomado un papel económico muy importante a nivel internacional, ya que es el principal proveedor de materia prima para la producción de biocombustibles líquidos para el transporte, en particular del etanol, producido a partir de cultivos de azúcar y almidón, o del biodiesel derivado de cultivos oleaginosos. En mayor proporción, la producción mundial de etanol proviene de la caña de azúcar y maíz, entre otros cultivos importantes se encuentra la yuca, el arroz, la remolacha azucarera y el trigo. En el caso del biodiésel, las materias primas de mayor uso son la colza en la Unión Europea, la soja en los Estados Unidos de América y Brasil y los aceites de palma y coco en los países tropicales y subtropicales.



Figura 3. Conversión de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos. Fuente: FAO, 2008.

Existen grandes diferencias entre los cultivos en relación a su rendimiento de biocombustible por hectárea, estas variaciones dependen principalmente de la materia prima, del sistema de producción y país donde se produce (Cuadro 2). Hasta hoy, la producción de etanol a partir de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera muestra los mayores rendimientos, siendo Brasil el primer lugar de los países que producen etanol en lo que se refiere a rendimiento de biocombustible por hectárea. Los rendimientos en el caso del maíz son por poco más bajos; sin embargo, lo que cuesta producir biocombustibles a partir de un determinado cultivo y país

puede seguir patrones muy diferentes. De acuerdo al *World Energy Outlook* (AIE, 2006), en una proyección al 2030, se pronostica un aumento de la proporción de la tierra cultivable a nivel mundial dedicada a cultivar biomasa para biocombustibles líquidos del 1 % en 2004 al 2,5 % en 2030. Conforme al “escenario de política alternativa”, para el 2030 esa proporción habrá aumentado el 3,8 %. En los dos casos, los pronósticos se basan en la hipótesis de que los biocombustibles líquidos se producirán a partir de cultivos convencionales. Por otra parte, en caso de que se encuentre una tecnología que permita la comercialización de biocombustibles líquidos de segunda generación antes del 2030, la AIE predice que la proporción mundial de biocombustibles de la demanda de transporte aumentará en 10 % en lugar del 3 %. Las necesidades del uso de la tierra se incrementarán sólo el 4,2 % de la tierra cultivable, debido a rendimientos más altos de energía por hectárea y al uso de biomasa para producir combustibles.

Cuadro 2. Rendimiento de los biocombustibles con diferentes materias primas, a nivel mundial y por países.

| CULTIVO | ESTIMACIÓN | BIOCOMBUSTIBLE | RENDIMIENTO DEL CULTIVO (Toneladas/ha) | EFICIENCIA DE LA CONVERSIÓN (Litros/tonelada) | RENDIMIENTO DE BIOCOMBUSTIBLE (Litros/ha) |
|---------------------|---------------------------|----------------|---|--|--|
| Remolacha azucarera | Mundial | Etanol | 46,0 | 110 | 5 060 |
| Caña de azúcar | Mundial | Etanol | 65,0 | 70 | 4 550 |
| Yuca | Mundial | Etanol | 12,0 | 180 | 2 070 |
| Maíz | Mundial | Etanol | 4,9 | 400 | 1 960 |
| Arroz | Mundial | Etanol | 4,2 | 430 | 1 806 |
| Trigo | Mundial | Etanol | 2,8 | 340 | 952 |
| Sorgo | Mundial | Etanol | 1,3 | 380 | 494 |
| Caña de azúcar | Brasil | Etanol | 73,5 | 74,5 | 5 476 |
| Caña de azúcar | India | Etanol | 60,7 | 74,5 | 4 522 |
| Palma de aceite | Malasia | Biodiésel | 20,6 | 230 | 4 736 |
| Palma de aceite | Indonesia | Biodiésel | 17,8 | 230 | 4 092 |
| Maíz | Estados Unidos de América | Etanol | 9,4 | 399 | 3 751 |
| Maíz | China | Etanol | 5,0 | 399 | 1 995 |
| Yuca | Brasil | Etanol | 13,6 | 137 | 1 863 |
| Yuca | Nigeria | Etanol | 10,8 | 137 | 1 480 |
| Soja | Estados Unidos de América | Biodiésel | 2,7 | 205 | 552 |
| Soja | Brasil | Biodiésel | 2,4 | 205 | 491 |

Fuente: Rajagopal *et al.*, 2007, datos mundiales; Naylor *et al.*, 2007, datos nacionales

Las perspectivas de que las actuales tecnologías de biocombustibles sustituyan a los combustibles fósiles se ilustran a través de un cálculo hipotético, mediante estimaciones teóricas de la producción mundial de etanol a partir de los principales cultivos de azúcar y cereales, sobre la base de los rendimientos medios a nivel mundial y la eficiencia en materia de conversión más comúnmente citada, en el Cuadro 3 se resumen los resultados de esas estimaciones (Rajagopal *et al.*,2007). Los cultivos de los que se hace alusión en el Cuadro 3 representan el 42 % de toda la tierra cultivable actualmente disponible. La conversión de toda la producción de cultivos en etanol correspondería al 57 % del consumo total de gasolina. Una teoría más realista, presupone que sólo el 25 % de cada uno de estos cultivos se destinaría a la producción de etanol y que sólo el 14 % de consumo de gasolina podría sustituirse por etanol.

Cuadro 3. Rendimiento potencial hipotético para el etanol procedente de los principales cultivos de cereales y de azúcar.

| CULTIVO | SUPERFICIE MUNDIAL | PRODUCCIÓN MUNDIAL | RENDIMIENTO MÁXIMO DEL BIOCOMBUSTIBLE | MÁXIMO DE ETANOL | EQUIVALENTE DE GASOLINA | SUMINISTRO COMO CUOTA DEL TOTAL MUNDIAL DE UTILIZACIÓN DE GASOLINA EN 2003 ¹ |
|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| | (Millones de ha) | (Millones de toneladas) | (Litros/ha) | (Miles de millones de litros) | (Miles de millones de litros) | (Porcentaje) |
| Trigo | 215 | 602 | 952 | 205 | 137 | 12 |
| Arroz | 150 | 630 | 1 806 | 271 | 182 | 16 |
| Maíz | 145 | 711 | 1 960 | 284 | 190 | 17 |
| Sorgo | 45 | 59 | 494 | 22 | 15 | 1 |
| Caña de azúcar | 20 | 1 300 | 4 550 | 91 | 61 | 6 |
| Yuca | 19 | 219 | 2 070 | 39 | 26 | 2 |
| Remolacha azucarera | 5,4 | 248 | 5 060 | 27 | 18 | 2 |
| Total | 599 | ... | ... | 940 | 630 | 57 |

Nota: ... = no aplicable.

¹ Utilización mundial de gasolina en 2003 = 1,1 billones de litros (Kim y Dale, 2004).

De acuerdo a estos datos, es de esperar que los biocombustibles sustituyan solo de manera limitada a los combustibles fósiles. Aun así, por limitada que sea su contribución al suministro total de energía, los biocombustibles podrían tener un impacto positivo para la agricultura y los mercados agrícolas.

En una simulación de tres proyectos en China, basados en la variabilidad de precios de diferentes materias primas (yuca, trigo y maíz) y de el petróleo; se calcularon, bajo una serie de hipótesis de precios, el VNA (valor neto actual) y la TIR (tasa interna de rentabilidad) de las inversiones; se demostró que el proyecto de la yuca tenía un VNA positivo y una TIR que superaba el 12 % en la mayoría de hipótesis y que, en efecto, era posible que fuera competitivo desde un punto de vista económico. Los proyectos del maíz y trigo, tenían VNA bajos o incluso negativos, por lo que no serían económicamente viables sin subsidios (Yu y Tao, 2008). La imposibilidad económica de los proyectos de maíz y trigo, se atribuyen a los altos costos de la materia prima, porque superaban en un 75 % los costos de producción.

2.2.1.1. Yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca (*Manihot esculenta*) es un tubérculo perteneciente a la familia Euphorbiacea y al género *Manihot*, siendo la del tipo *Manihot esculenta* Crant la que es comercialmente conocida, es un arbusto ramificado, de hasta 2.5 m de altura, con flores color amarillo verdoso, la raíz alcanza hasta 8 cm de diámetro y 90 cm de longitud y son comestibles. La Yuca presenta gran tolerancia a condiciones ambientales extremadamente duras, se adapta fácilmente a diferentes ecosistemas, soporta la sequía, es resistente a plagas, necesita pocos fertilizantes, plaguicidas y agua; y es de fácil almacenamiento bajo tierra (Westby, 2002).



Figura 4. Raíz de la Yuca (Manihot esculenta). Fuente: SAGARPA, 2008.

Para su cultivo se requiere suelo de preferencia suelto, profundo y con algo de materia orgánica. Sus raíces contienen una gran reserva de carbohidratos, la mayoría de estos son almidón (31% peso fresco). En el cuadro 4 se presenta la composición química de la raíz de la yuca.

Cuadro 4. Composición química de 100 gramos de yuca (base húmeda).

| COMPONENTE | RAÍZ |
|-----------------------------------|------|
| Humedad (g) | 62.8 |
| Proteína (g) | 0.53 |
| Grasa (g) | 0.17 |
| Carbohidratos (g) | 31.0 |
| Fibra (g) | 1.48 |
| Cenizas (g) | 0.84 |
| Calcio (mg) | 20.0 |
| Fósforo (mg) | 46.0 |
| Hierro (mg) | 0.23 |
| Energía (kJ 100 g ⁻¹) | 580 |

Fuente: Bradbury and Holloway, 1988.

Estadística mundial, nacional y estatal

El uso de la Yuca a nivel mundial para 1993 fue de 172 millones de toneladas y se espera que para el 2020 esta cifra se incremente hasta 275 millones de toneladas (International Food Policy Research Institute's, IFIPRI's). En otro estudio se predijo que la demanda y producción de la yuca aumentaría a 291 millones de toneladas en el 2020 (Scott *et al.*, 2000). En proyecciones de ambos estudios se determinó que Africa era el mayor consumidor de la yuca, su consumo equivale al 62% de la producción mundial. De acuerdo a Cock (1985), en el continente Americano el 33.4 % del uso total de yuca es para alimento de animales y sólo el 9.6 % se usa como almidón, ver cuadro 5.

Cuadro 5. Patrones de uso mundial de yuca¹.

| ÁREA | CONSUMO HUMANO-FRESCO | CONSUMO HUMANO-PROCESADO | ALIMENTO PARA ANIMALES | ALMIDÓN | EXPORTACIONES | DESECHOS |
|-------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|---------|---------------|----------|
| Mundo (%) | 30.8 | 33.8 | 11.5 | 5.5 | 7.0 | 10.0 |
| Africa (%) | 37.9 | 50.8 | 1.4 | < 1 | < 1 | 9.5 |
| América (%) | 18.5 | 23.9 | 33.4 | 9.6 | < 1 | 14.0 |
| Asia (%) | 33.6 | 21.7 | 2.9 | 8.6 | 23.0 | 6.3 |

Fuente: Cock, 1985.

¹ La cifras mostradas son porcentajes de la producción total en cada región.

2.2.1.2. Camote (*Ipomea batatas*)

El camote (*Ipomea batatas*) es el séptimo lugar, después del trigo, arroz, papa, cebada y yuca, de los cultivos más importantes del mundo (Ray y Ravi, 2005 en Panda *et al.*, 2007). El camote es rico en almidón (12-25%, peso fresco), puede servir como buen sustrato para la fermentación (Ray y Ward, 2006; Panda *et al.*, 2007) y del 40-55% de su composición en peso seco es almidón (Zhang y Oates 1999 en Ridley *et al.*, 2005). Las raíces del camote son ricas en almidón, azúcares, vitamina C, provitamina A, hierro y algunos minerales (Woolfe, 1992 en Panda *et al.*, 2007).

Cuadro 6. Composición bioquímica del camote.

| COMPONENTE (g/kg) | VALOR PROMEDIO ² |
|-------------------|-----------------------------|
| Húmedad | 755±39.2 |
| Proteína | 33.8±2.2 |
| Almidón | 148.0±35.4 |
| Azúcares totales | 23.5±3.4 |
| Fibra dietética | 18.9±2.9 |
| Ceniza | 9.2±1.8 |

Fuente: Panda *et al.*, 2007.

2.2.1.3. Malanga (*Colocasia esculenta* Schott)

La malanga, también conocida como Taro, Dashen o Ñame, es una planta que alcanza una altura de 1 a 3 metros, sin tallo aéreo. El tallo central es elipsoidal, conocido como corno y es rico en carbohidratos (18-30% en base fresca).

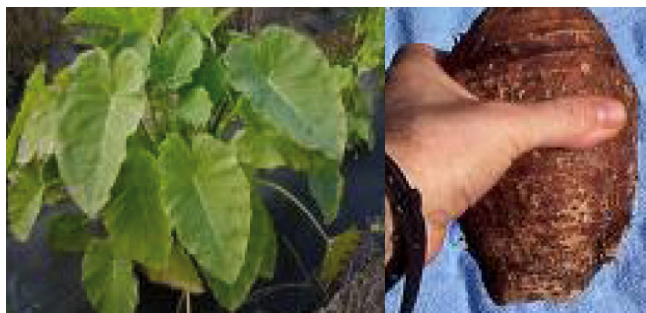


Figura 5. Malanga (*Colocasia esculenta* Schott). Fuente: Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2006 .

La malanga es una planta netamente tropical y para su desarrollo óptimo requiere de regimenes de lluvia altas, temperaturas promedio no inferiores a 20°C, siendo la óptima entre

² Datos obtenidos de el camote cosechado en Noviembre del 2005.

25-30°C; el mejor desarrollo se alcanza con periodos de 11-12 horas luz (Mendoza, 1989; en Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2006) . En cuanto al tipo de suelo, las plantas se adaptan más a aquéllos profundos, fértiles, con suficiente materia orgánica y bien drenada, el pH óptimo debe ser entre 5.5-6.5, aunque se adapta a espectros de 4.5 hasta 7.5 (Jiménez, 1988; en Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2006). En el Cuadro 6 se expone de forma detalla la composición química de la malanga.

Cuadro 7. Composición química de 100 gramos de malanga (base húmeda).

| COMPOSICIÓN | CRUDO |
|-----------------------------------|-------|
| Humedad (g) | 71 |
| Proteína (g) | 1.7 |
| Grasa (g) | 0.8 |
| Carbohidratos (g) | 23.8 |
| Fibra (g) | 0.6 |
| Cenizas (g) | 1.2 |
| Calcio (mg) | 22.0 |
| Fósforo (mg) | 72.0 |
| Hierro (mg) | 0.9 |
| Energía (kJ 100 g ⁻¹) | 355 |

Fuente: Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela, 1983 en Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2006 .

Estadística mundial, nacional y estatal

Los principales países productores de malanga son Nigeria, Ghana y Costa de Marfil. Nigeria es el mayor productor de este tubérculo ya que posee el 74% de la producción. Sin embargo dentro de los países exportadores de malanga se encuentran Brasil, Jamaica y Ghana. Los principales países importadores de malanga son Estados Unidos, China y Mali, teniendo el 85, 9 y 6% del total mundial, respectivamente.

En México, el único estado productor en los últimos años ha sido Veracruz con una producción de 380 toneladas de malanga en el 2004 y una superficie cosechada de 36 hectáreas, el precio nacional para ese mismo año fue de 5,500 pesos por tonelada. Para el 2006 se cosecharon 2.5 hectáreas con una producción de 100 toneladas (FAO, 2008).

2.2.1.4. Almidón

Como se mencionó antes las principales fuentes de carbono para la producción de bioetanol a nivel mundial son los azúcares obtenidos de la caña de azúcar y el almidón proveniente de los granos del maíz. El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas, este se diferencia de todos los demás carbohidratos en que en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas denominadas “gránulos”. Los gránulos de almidón son relativamente densos e insolubles, se hidratan muy mal en agua fría. La capacidad de formar soluciones viscosas es alcanzada sólo cuando la suspensión de los gránulos de almidón es sometida a la acción del calor. Otra propiedad única del almidón es que la mayoría de los gránulos están compuestos de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y otro muy ramificado llamado amilopectina. La mayor parte de la amilosa es una cadena lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1 \rightarrow 4), aunque también existen moléculas que poseen unas pocas ramificaciones en posición (1 \rightarrow 6), la mayoría de los almidones contiene alrededor de 25% de amilosa.

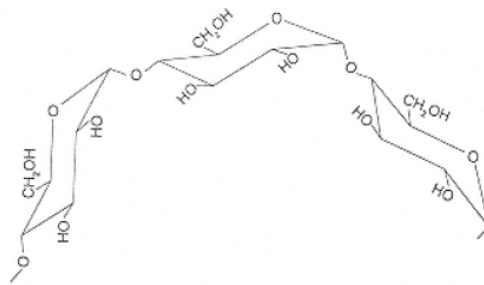


Figura 6. Segmento trisacárido de una porción no ramificada de una molécula de amilosa o amilopectina. Fuente: BeMiller y Whistler, 1996 .

La amilopectina está presente en todos los almidones, constituyendo alrededor del 75% de los almidones más comunes, es una molécula muy grande y altamente ramificada. Las ramas agrupadas en paralelo de la amilopectina se encuentran plegadas como dobles hélices y las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina (BeMiller y Whistler, 1996).

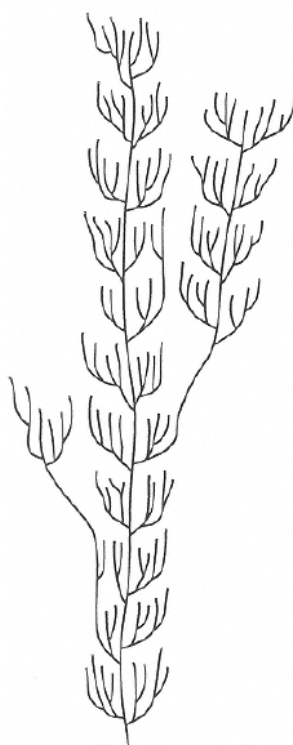


Figura 7. Representación de una porción de una molécula de amilopectina. Fuente: BeMiller y Whistler, 1996 .

2.2.1.5. Hidrólisis del almidón

La hidrólisis del almidón, tanto con ácido como con enzimas, produce maltodextrinas. Las moléculas de almidón se despolimerizan por acción de la solución ácida caliente, la hidrólisis de los enlaces glicosídicos se lleva a cabo al azar, para producir inicialmente fragmentos de gran tamaño. La modificación más intensa utilizando ácidos da lugar a la formación de dextrinas. En la Universidad de Georgia, Atenas, se realizó un estudio para establecer las condiciones óptimas de la hidrólisis ácida del almidón de camote (Kim y Hamdy, 1985), los investigadores utilizaron dos tipos de cultivos de camote y encontraron que la cantidad de almidón en las raíces era de $21.1 \pm 0.6\%$ y $27.5 \pm 1.6\%$ (base húmeda) respectivamente. Además, observaron que: la velocidad de hidrólisis dependía de la concentración del ácido (HCl), temperatura y tiempo; con elevadas concentraciones de ácido y altas temperaturas había una rápida formación de azúcares reductores, pero estos se destruían de la misma forma. El más alto porcentaje de conversión de almidón en azúcares reductores fue de 84.2% (base húmeda). En la actualidad muchos países europeos, Canadá y Australia utilizan el almidón proveniente de los desechos de algunas industrias para producir etanol, antes de utilizarlos para la fermentación el almidón es hidrolizado con ácidos (Zaldivar *et al*, 2005). De acuerdo al procedimiento (Magee y Kosaric, 1985) los efluentes se calientan a 98°C y se

adiciona ácido sulfúrico al 2% (w/v) y se mantiene a la misma temperatura durante 2 horas. Otro desecho agroindustrial que se está investigando para la producción de etanol es el bagacillo de caña de azúcar; un estudio realizado para optimizar la producción de azúcares reductores a partir de la hidrólisis ácida de este desecho mostró que la mayor producción de azúcares reductores (16.76 ± 1.71 g/L) se obtuvo en la hidrólisis con ácido sulfúrico al 6% y 4 horas de reacción, partiendo de una solución de bagacillo de caña 3.33% (w/v) se obtuvo un rendimiento del 50.3%, esto es por cada gramo de bagacillo de caña se obtienen 0.5 gramos de azúcares reductores; también se observó que en general la concentración de azúcares reductores aumentó con la concentración del ácido, hasta llegar a una concentración óptima (Ferrer *et al*, 2002) . Estos resultados concuerdan con las observaciones establecidas por diferentes investigadores, en las que un aumento de la concentración del ácido produjo un incremento de la velocidad de hidrólisis y también de la degradación de los azúcares producidos (Carrizales *et al*, 1986), (Ullal *et al*, 1984) y (Urbaneja *et al*, 1997).

Para la hidrólisis enzimática industrial del almidón a D-glucosa se utilizan tres o cuatro enzimas diferentes (BeMiller y Wisthler, 1996). En general estas enzimas hidrolizan cadenas de oligosacáridos y polisacáridos, es por esto que dentro del grupo de las hidrolasas las amilasas tienen una gran importancia a nivel industrial. Hay tres etapas en la conversión de almidón a azúcares reductores (Mera *et al*, 2003):

- Gelatinización, implica la disolución de los gránulos del almidón para formar una suspensión viscosa.
- Licuefacción, implicando la hidrólisis parcial del almidón.
- Sacarificación, implicando la producción de la glucosa y de la maltosa por hidrólisis adicional.

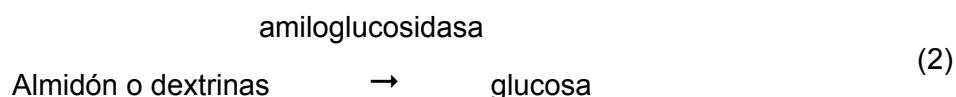
La α -amilasa (EC 3. 2. 1. 1) hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 en el interior de la molécula de almidón para dar lugar a la formación progresiva de pequeñas cadenas formadas por varias unidades de glucosa, entre estos polímeros están incluidas las dextrinas (Gupta *et al.*, 2003).

La reacción es resumida de la siguiente manera (Kerr, 1950):



La amiloglucosidasa (EC 3. 2. 1. 3) se utiliza comercialmente, en combinación con la α -amilasa, para producir jarabes de D-glucosa y D-glucosa cristalina. La amiloglucosidasa reacciona sobre el almidón completamente gelatinizado como un exoenzima, liberando de forma secuencial unidades sencillas D- glicosilo a partir de los extremos no reductores de la

moléculas de amilosa y amilopectina, incluso aquellos que están unidos por enlaces (1→6), en consecuencia esta enzima puede hidrolizar el almidón por completo, para dar sólo moléculas de D-glucosa, pero se usa en general el almidón que es previamente despolimerizado con α -amilasa para generar más extremos no reductores (BeMiller y Wisthler, 1996), la reacción se presenta en la ecuación (2) (Bernfeld, 1950).



Las otras dos enzimas restantes son la β -amilasa (EC 3. 2. 1. 2) y la isoamilasa (ciclodextrín glucanotransferasa), la primera libera unidades disacárido maltosa, su reacción se muestra en la ecuación (3) (Myrbäck y Neumüller, 1950). Las dextrinas forman unidades de maltosa a partir de las dextrinas (Meyer y Gibbons, 1951).



En los últimos años se ha reportado el uso de almidón, proveniente de varios cultivos como el maíz, trigo, arroz, sorgo y papas; en la producción de etanol a nivel industrial (Nigam y Singh, 1995). El método convencional de la hidrólisis de almidón con ácido ha sido sustituido por el uso de enzimas en el proceso de liquefacción y sacarificación.

Por este motivo se han realizado muchas investigaciones relacionadas con la optimización en la producción de azúcares a partir de almidón, hasta la fecha se han estudiado diversos factores que afectan la hidrólisis del almidón con las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa.

Kunamneni y Singh (2005), realizaron la optimización de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz con el fin de obtener una alta producción de glucosa; en este trabajo se estudió el efecto de: la concentración de α -amilasa durante de gelatinización y después de la gelatinización, la concentración de amiloglucosidasa, la concentración de sólidos (almidón), el tiempo de gelatinización, pH, adición de metales (Mg^{2+} y Ca^{2+}) y la temperatura de sacarificación. Observaron que los factores que afectan principalmente al proceso de hidrólisis de almidón de maíz son la concentración de α -amilasa, amiloglucosidasa y la temperatura de sacarificación, ya que tiene una relación directa con la eficiencia de conversión. De acuerdo con esto, encontraron que las concentraciones donde obtenían la mayor eficiencia de conversión (96.25%) eran de: α -amilasa 2.243 U/mg sólido en el proceso de gelatinización, α -amilasa 3.383 U/mg sólido en el proceso de liquefacción y de la enzima amiloglucosidasa 0.0763 U/mg sólido en el proceso de sacarificación; además de que la temperatura de sacarificación debía ser de

55.1°C. El tiempo es otro factor que influye en la eficiencia de conversión de almidón a azúcares reuctores, en un estudio donde caracterizaron a la α -amilasa y a la amiloglicosidasa encontraron que las condiciones óptimas de dichas enzimas fuerona un pH de 6.0 y 5.5, temepraturas de 70°C y 60°C, concentración de enzima de 0.1% y 0.25% y tiempo de reacción de 90 minutos y 4.5 h respectivamente; observaron que el tiempo de cinética empleado para la glucoamilasa presentó rendimientos bajos, lo que indica que la hidrólisis se debe someter a un tiempo más prolongado (Mera *et al*, 2003).

2.2.2. Microorganismos utilizados en la producción de Bioetanol

Hasta hace algunos años la forma tradicional de producir etanol era mediante la fermentación de azúcares con *Saccharomyces cerevisiae*, levadura que mediante la ruta metabólica de Embden- Meyerof- Parnas o EMP a través de la cual una molécula de glucosa produce dos moléculas de piruvato (Madigan *et al*, 2000). Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es aún más reducido a etanol con la liberación de CO₂. En teoría, el rendimiento es de 0.511 para el etanol (Bai *et al*, 2008). En las últimas décadas *Zymomonas mobilis* ha sido intensamente estudiada, ya que de acuerdo a varios investigadores esta especie posee características superiores a las de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2.1. *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram negativa, esto quiere decir que presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano. Es una bacteria anaerobia tolerante al oxígeno. Este microorganismo fue descubierto originalmente en el pulque mexicano y en el vino de palma africano (Swings y De Ley, 1977). En condiciones anaeróbicas produce etanol a partir de glucosa mediante la ruta metabólica de Entner-Doudoroff (ED), debido a esto *Z. mobilis* produce menos biomasa (comparada con otros microorganismos que utilizan la ruta metabólica de EMP) y más carbono es canalizado para la producción de etanol, obteniendo rendimientos y productividades de etanol por arriba de 1.9 mol etanol/ mol glucosa (Torres y Baratti, 1988; Yanase *et al*, 2002), esto representa aproximadamente el 97% de la eficiencia de conversión teórica. Como consecuencia de una menor producción de ATP, *Z. mobilis* mantiene un mayor flujo metabólico de la glucosa, lo que garantiza una mayor productividad de etanol (Sprenger, 1996) y tolerancia a altas concentraciones de azúcares y etanol (Rogers *et al*, 1982). A diferencia de *S. Cerevisiae*, *Z. mobilis* sólo utiliza sacarosa, glucosa y fructosa para producir etanol, aún así sólo utiliza como vía única la de ED para metabolizar la glucosa, esto quiere decir que *Z. mobilis* tiene la capacidad de producir enzimas que hidrolizan polisacáridos para producir moléculas de glucosa y fructosa, la producción de estas enzimas depende de los factores ambientales y

composición del medio de cultivo al que se someta dicha bacteria (Doelle *et al*, 1993). Se ha reportado que la glucosa no muestra efectos de inhibición en el crecimiento y metabolismo de *Z. mobilis*, debido a que se establece un completo balance de la presión osmótica, ya que dentro y fuera de la célula se establece un equilibrio de las concentraciones de glucosa (Doelle y Doelle, 1989; en Doelle *et al*, 1993). Sin embargo, en un estudio sobre el efecto de la concentración de glucosa en la producción de etanol por *Z. mobilis* inmovilizada, se mostraron resultados en los que por arriba de 140 g glucosa/ L la producción de etanol disminuía (Pramod y Margaritis, 1985). Por otro lado, se observó la inhibición en la producción de etanol con la cepa de *Z. mobilis* NRRL-806 usando una solución de glucosa al 20% (w/v) (McGhee *et al*, 1982). Aún así esta concentración es muy alta y se puede considerar que la fermentación de azúcares con *Z. mobilis* no está limitada por la concentración de sustrato; ya que *Z. mobilis* tiene la capacidad de facilitar el transporte de azúcares en el proceso de difusión en la membrana celular (DiMarco y Romano, 1985).

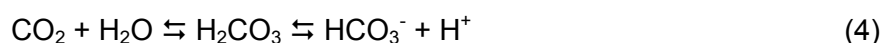
Para la producción de etanol con *Z. mobilis* la fuente de carbono más usada es la sacarosa extraída de la caña de azúcar, sin embargo durante años se ha estudiado el rendimiento en la producción de etanol con diversas fuentes de carbono provenientes de otros agro cultivos.

En un estudio de la fermentación del jugo de caña azucarera y de melazas (producto secundario de la refinación del azúcar) con *Z. mobilis*, a nivel planta piloto y en un fermentador de 1200 L, se lograron eficiencias de conversión de hasta 94% en menos de 24 h, observando concentraciones de etanol del 10% al 11% (v/v) (Doelle *et al*, 1991). Park y Baratti (1991) usaron cuatro sustratos diferentes, subproductos de la refinación de azúcar a partir de remolacha, para la fermentación con *Z. mobilis* y observaron que después de hidrolizar la sacarosa con la enzima invertasa las eficiencias de conversión eran de entre 88.8% y 91.4%.

El pH también es un factor del cual depende la producción de etanol, un pH de 6.5 es óptimo para el crecimiento de las células de *Z. mobilis* mientras que un pH de 4.0 es óptimo para la producción de etanol (Jones y Doelle, 1991).

Con respecto a los productos de inhibición se podría decir que *Z. mobilis* produce dos, etanol y dióxido de carbono. Aunque la teoría más común es la de inhibición por etanol, se ha reportado el crecimiento de colonias de *Z. mobilis* en placas con agar y etanol al 15% (v/v), en fermentadores se ha observado que la pérdida de la viabilidad empieza a partir de una concentración de etanol de 13% o del 16% (v/v) (Rogers *et al*, 1982) (Supanwong *et al*, 1983). Se ha afirmado que para este microorganismo el efecto Pasteur está ausente (Belaich y Senez, 1965); razón por la cual se considera que el producto de inhibición no es el etanol sino el

dióxido de carbono (CO₂); porque *Z. mobilis* cuenta con una membrana celular de composición única (Timoshin *et al*, 1989), lo cual impide que el etanol se acumule dentro de la célula (DeFranca y Leite, 1989). La mayor cantidad de CO₂ producido en una fermentación se encuentra disuelto en el caldo de cultivo, la solubilidad del CO₂ en el medio acuoso depende de la concentración de especies iónicas y no polares, como el etanol. Aunque, también existen otros compuestos que están en equilibrio con el CO₂, esto se explica con mayor precisión en la ecuación (4) .



El CO₂ tiene la facilidad de reaccionar con los grupos amino de la proteínas y el H₂CO₃ de asociarse con grupos de carga positiva en proteínas, en consecuencia la cantidad total de CO₂ en la solución acuosa puede aumentar significativamente causando la supersaturación del medio; el efecto del incremento de las concentraciones de HCO₃⁻ y CO₂; se ven reflejadas en la inhibición del uso del sustrato. Esto sucede porque el bicarbonato puede ser el responsable de la desestabilización de la membrana celular y posiblemente también de la carga de los fosfolípidos o lipopolisacáridos de la misma, mientras que el CO₂ podría afectar la fluídica de la membrana (Jones y Greenfield, 1982).

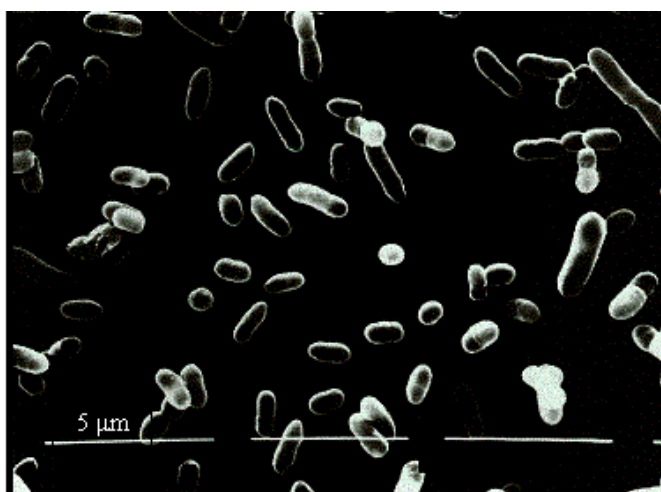


Figura 8. Células resuspendidas de *Z. mobilis* CP4 (5600x). Fuente: *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008 .

Existen también diferencias notables en la cinéticas de producción de etanol entre diferentes cepas de *Z. mobilis*; por ejemplo: *Z. mobilis* NRRL-806 en una fermentación continua (inmovilizada en alginato de calcio) obtiene la máxima producción de etanol a los 4 días (McGhee *et al*, 1982); mientras que *Z. mobilis* NBRC-13758 (Nacional Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center), en una fermentación donde simultáneamente se

lleva a cabo la sacarificación de almidón, alcanza la máxima producción de etanol a las 12 horas (Neves et al, 2007). En otro estudio se comparó la producción de etanol de cuatro cepas de *Z. mobilis* (NRRL-14023, NRRL-14022, NRRL-4286 y NRRL-806), a partir de hidrolizados de almidón de yuca; la cepa NRRL-4286 fue la que mostró la eficiencia de conversión más alta (80 g etanol/ L a partir de 171 g azúcar/ L) a las 36 horas, mientras que las otras cepas alcanzaron sus máximos rendimientos de las 40 a las 48 horas (Nellaiah, 1988). *Z. mobilis* ATCC-31821 puede metabolizar 80g glucosa/ L en 9 horas, produciendo 39 g etanol/ L (Davis et al, 2006).

Cazetta *et al* (2007) estudiaron el efecto de la temperatura, concentración de azúcares reductores en melazas, agitación y tiempo en la producción de etanol con *Z. mobilis* ATCC-29191; observaron que el tiempo, en el proceso de fermentación es un factor importante, en donde más del 60% de la producción de etanol aumenta entre las 24 y 48 horas. Se mantuvo constante el pH del medio de cultivo de 5.6-6.0 y se observó que a este pH no existen efectos negativos en la producción de etanol. Aunque el pH es un factor con efectos notables en el proceso de fermentación, *Z. mobilis* cuenta con una alta tolerancia a variaciones de pH que van desde 3.5 a 7.5, con un rango óptimo de pH de 5.0-7.0 (Falcao de Morales *et al*, 1981). Cazetta *et al* (2007) observaron que las mejores condiciones para la producción de etanol fue con una concentración de 200 g azúcares reductores/ L (melazas), temperatura de 30°C, sin agitación y un tiempo de 48 h, obteniendo una producción de 55.8 g etanol/ L.

Otro factor de suma importancia en la fermentación de azúcares con *Z. mobilis* es la preparación del pre-inóculo e inóculo, esto quiere decir que para obtener rendimientos altos de etanol se debe utilizar un inóculo adaptado a el medio de cultivo y a las condiciones de temperatura, pH y agitación a las que se llevará a cabo la fermentación (Doelle y Doelle, 1991 en Doelle *et al*, 1993).

2.3. Factores técnicos, económicos y normativos de los biocombustibles

Como se mencionó anteriormente, una de las principales fuerzas que promueve el desarrollo de biocombustibles es la seguridad energética. La contribución de cada biocombustible al suministro de energía depende tanto del contenido energético del combustible como de la energía que se gasta al producirlo; es decir la energía que se requiere para transportar, cultivar y cosechar la materia prima, convertirla en biocombustible y trasladarlo en diferentes fases de su producción. Una forma de expresar la proporción entre la energía contenida en el biocombustible y la energía fósil empleada en su producción es mediante balances de energía fósil, por ejemplo un balance de energía fósil de 1,0 significa que se necesita tanta energía

para producir un litro de biocombustible como energía tenga esté, esto quiere decir que el biocombustible en cuestión no evidencia ni ganancias ni pérdidas. Pero, si se tiene un balance de energía de 2,0, significa que el biocombustible contiene el doble de energía que se necesita para producirlo (FAO, 2008).

La gasolina y el diésel convencionales tienen balances de energía entre 0,8 y 0,9, por que una parte de la energía se consume en refinar el crudo para transformarlo en combustible útil. Los balances estimados de combustible fósil del biodiésel oscilan entre 1 y 4 para la colza y soja, alrededor de 9 para el aceite de palma; en el caso del etanol elaborado a partir de cultivos, los balances oscilan entre 2,0, en el caso de la caña de azúcar es de 8,0 y para el maíz es de 2,0 (Instituto de Vigilancia Mundial, 2006). Una vez superadas las barreras técnicas, se debe estudiar qué porcentaje de la bioenergía disponible sería económicamente viable, el potencial económico a largo plazo depende en gran parte de los costos de la energía fósil, el desarrollo de las materias primas agrícolas y el perfeccionamiento de las tecnologías de cosecha, conversión y uso de biocombustibles.

La principal discusión acerca de la economía de los biocombustibles líquidos parte de la asignación de recursos entre los sectores de la energía y la agricultura; ya que en muchos lugares los costos para producir cultivos y convertirlos en etanol o biodiésel son muy altos como para competir en el mercado contra combustibles fósiles sin ayuda del gobierno para fomentar su desarrollo y subvencionar su uso. Por otra parte, muchos países están impulsando la industria de los biocombustibles por varias razones, dentro de las más importantes se encuentran:

- *Intereses estratégicos con respecto a la seguridad energética y los precios de la energía.* Como el acceso seguro a los suministros de energía, reducción de la vulnerabilidad ante la alza de precios y a la interrupción de los suministros de energía, independencia de fuentes energéticas importadas.
- *Cambio climático.* Adoptar a la bioenergía como un elemento importante para reducir las emisiones de gases efecto invernadero, disminuir la contaminación de aire en zonas urbanas, utilización de residuos y desechos para generar bioenergía.
- *Apoyo a la agricultura.* Las ayudas al sector agrícola y a las rentas de los agricultores han sido uno de los factores principales para impulsar las políticas relativas a los biocombustibles.

Muchas de las políticas actuales que influyen en el desarrollo, negocio e inversión de los biocombustibles, fueron creadas en base a la consideración de los puntos anteriores.

En general, las políticas que actualmente apoyan el crecimiento de los biocombustibles son:

- *Políticas agrícolas.* Estas políticas han tenido importantes consecuencias para el comercio agrícola y en un futuro tendrán repercusiones en la producción de materias primas destinadas a los biocombustibles.
- *Combinación de mandatos.* Hace referencia a los requisitos de mezcla de carácter voluntario y obligatorio, para los biocombustibles líquidos en los países del G8+5³.
- *Subsidios y ayudas.* Constituyen las ayudas a la distribución y fomento en el uso de biocombustibles.
- *Aranceles.* Los aranceles aplicados a los biocombustibles se usan generalmente para proteger la agricultura y las industrias de biocombustibles locales, sostener los precios locales de los biocombustibles y proporcionar un incentivo para la producción nacional.
- *Incentivos fiscales.* Representan un medio para estimular la demanda de biocombustibles
- *Investigación y desarrollo.* Gran parte de los países productores de biocombustibles realizan y financian proyectos de investigación y desarrollo.

Las políticas expuestas anteriormente están ordenando la economía agrícola mundial, porque tienen importantes efectos en la producción y las rentas agrícolas, los precios de los productos básicos, el empleo rural y los mercados energéticos.

2.4. Biocombustibles y medio ambiente

Aunque la producción y consumo de los biocombustibles siguen siendo reducidas en comparación de la demanda total de energía, deben estudiarse las posibles implicaciones medioambientales y sociales de su acelerado crecimiento.

Los biocultivos pueden reducir o compensar las emisiones de gases de efecto invernadero a través de la eliminación directa de dióxido de carbono del aire a medida que crecen y lo almacenan en la biomasa y el suelo. Con muchos de estos cultivos además de producir biocombustibles, se pueden generar productos complementarios como piensos para la alimentación animal, y de esta forma se ahorra la energía para elaborarlos de otra forma.

A pesar de estos beneficios, algunos estudios muestran que las compensaciones de gases de efecto invernadero varían en gran medida de acuerdo con cada biocombustible en

³ Los países del G8+5 incluye a los países del G8: Alemania, Canadá, EUA, Francia, Italia, Japón, el Reino Unido y la Federación Rusa; más Brasil, China, India, México y Sudáfrica (consideradas las cinco principales economías emergentes).

comparación con el petróleo; por ejemplo, mientras que la producción de etanol con maíz puede generar un ahorro de gases de efecto invernadero de unas 1,8 toneladas de dióxido de carbono por hectárea al año, el pasto varilla (posible cultivo de segunda generación) puede ahorrar unas 8,6 toneladas por hectárea al año. Los balances anteriores, se obtuvieron mediante un análisis del ciclo vital, lo que se hace con instrumento analítico es comparar todas las emisiones de gases de efecto invernadero en todas las fases de producción y de uso de un biocombustible y todos los gases de efecto invernadero emitidos en la producción y uso de una cantidad equivalente de energía del combustible fósil correspondiente (FAO, 2008).

La mayor parte de los estudios realizados han puesto de manifiesto que la producción de biocombustibles de primera generación a partir de materias primas actuales resulta en una disminución de las emisiones del orden del 20 % al 60 % en comparación con los combustibles fósiles, siempre que se empleen los sistemas más eficientes. Si bien los biocombustibles de segunda generación siguen resultando ineficientes a nivel comercial, suelen ofrecer reducciones del orden del 70 % al 90 % en comparación con el diésel fósil y el petróleo.

Por otra parte se habla mucho sobre la repercusión de la industria de los biocombustibles sobre la biodiversidad silvestre y agrícola. Sin embargo, existen cultivos para biocombustibles que pueden tolerar condiciones ambientales en las que cultivos para la alimentación no sobrevivirían; de esta forma se pueden emplear productivamente las tierras que en la actualidad generan escasos beneficios económicos. Algunos de estos cultivos son la yuca, el ricino, el sorgo azucarado y la jatrofa, al igual que los cultivos arbóreos, como el eucalipto.

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy, uno de los más importantes retos del hombre, es satisfacer la demanda energética a nivel mundial. Por varias décadas y hasta la fecha se sigue cubriendo gran parte de esta demanda con combustibles de origen fósil; sin embargo, en los últimos años se ha alcanzado la máxima producción de petróleo, de este punto en adelante se ha observado que la producción en los pozos petroleros comienza a disminuir.

Con la creación y uso de diferentes tipos de bioenergía se podrían diversificar las fuentes de suministro de energía y de esta forma reducir la dependencia de un pequeño número de exportadores, creando de esta forma una seguridad energética a nivel nacional.

De las diversas formas de bioenergía, los biocombustibles líquidos representan la principal fuente alternativa que a futuro podría abastecer al sector del transporte, dependiente en su totalidad del petróleo. Además, los biocombustibles podrían sustituir a la gasolina sin cambios más radicales en las actuales tecnologías y políticas de transporte.

Otro factor importante que impulsa la investigación de los biocombustibles es la preocupación acerca del cambio climático, ya que se cree que este es inducido por la acción humana, específicamente por el uso (combustión) de combustibles fósiles como: gasolina, diésel, gas L.P, etc.

Por otra parte se impulsaría la economía nacional debido al desarrollo del sector agropecuario, ya que los biocombustibles líquidos, en específico los de primera generación, se producen a partir de agrocultivos.

4. OBJETIVOS

4.1. Generales

Producción de etanol con células libres de *Zymomonas mobilis*, usando como principal fuente de carbono azúcares reductores, provenientes de la hidrólisis del almidón de la harina de tubérculos.

4.2. Específicos

Selección y evaluación del contenido de almidón de la materia prima (Yuca, Camote y Malanga) que servirá como fuente de carbono en el medio de cultivo.

Desarrollo y comparación de los procesos de pre-tratamiento para la hidrólisis del almidón de Yuca, Malanga o Camote.

Formulación de un medio de cultivo simple y compuesto, utilizando como fuente de carbono el almidón hidrolizado de la harina de Yuca, Malanga o Camote para la producción de etanol con células libres de *Zymomonas mobilis*.

Evaluación de la producción de etanol en matraz con células libres de *Zymomonas mobilis*, usando tres diferentes medios de cultivo.

Producción de etanol en un biorreactor agitado de 2 L con células libres de *Zymomonas mobilis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Selección y pre-tratamiento de la materia prima

Se desarrolló una metodología que facilitó la biodisponibilidad del almidón contenido en el sustrato. La metodología incluye: métodos mecánicos, térmicos, fisicoquímicos y enzimáticos.

5.1.1. Selección y determinación de la cantidad de almidón soluble en el agua de la materia prima

De acuerdo a la bibliografía consultada se seleccionaron tres diferentes tubérculos: yuca (*Manihot esculenta* Crant) , camote (*Ipomea batata*) y malanga (*Colocasia esculente* Schott). Se evaluó la cantidad de almidón soluble al agua de esos tres tubérculos, para determinar cuales se iban a utilizar en la siguiente etapa del pre-tratamiento.

De acuerdo a Liu (1997) en Liu (2003) se extrajo el almidón de los tubérculos siguiendo la siguiente metodología: se lavaron, pelaron y cortaron los tubérculos en cubos de aproximadamente 2 cm. Los cubos se sumergieron en bisulfito de sodio 20 mM y ácido cítrico 10 mM en agua destilada, durante 2 horas. Después los cubos se homogenizaron en un homogenizador Osterizer Super de Luxe. La pulpa se filtro con gasa y posteriormente el filtrado se suspendió en agua destilada. Esta solución (lechosa) se dejó sedimentar durante 30 minutos, pasado este tiempo se decantó el sobrenadante y se recuperó el sedimento (almidón) y este se lavo hasta tres veces con agua destilada. El almidón recuperado se seco en un horno a 40°C durante 24 horas y finalmente se pesó en una balanza analítica para determinar el rendimiento de almidón en cada tubérculo.

La cáscara de cada tubérculo se pesó en base húmeda, después se secó en un horno a 40°C por 24 horas y finalmente se peso para determinar el peso de la cáscara y poder determinar el rendimiento de almidón en cada tubérculo.

5.1.2. Preparación de la harina de Yuca y Malanga

Se preparó harina de Yuca y Malanga para su uso en los tratamientos de hidrólisis. Los tubérculos se lavaron, pelaron y cortaron en cubos de aproximadamente 2 cm. Se secaron en un horno a 40°C durante 24 horas. Después los cubos de tubérculos se homogenizaron en un homogenizador Osterizer Super de Luxe y se tamizaron a un diámetro de 100µm. Finalmente se embasó en un recipiente de plástico y se guardo en refrigeración a -37°C hasta su uso.

5.1.3. Hidrólisis ácida de la harina de Yuca y Malanga

Se realizó el diseño experimental factorial 2^3 con el fin de encontrar las condiciones en las que se obtenga un mayor rendimiento en la hidrólisis ácida de harina de yuca y harina de malanga. Se estudiaron tres factores a dos niveles: temperaturas de 60°C y 95°C, concentraciones de ácido sulfúrico al 1 % y 5 %, y tiempos de 1 h y 5 h.

Se preparo una solución de ácido sulfúrico diluido al 1 % y 5 % (v/v), se tomo una alícuota de 50 mL y se virtió en un matraz de 100 mL, se puso en incubadora a la temperatura deseada (60°C o 95°C) durante 15 minutos, posteriormente se adicionaron 1.66 g de harina de yuca o harina de malanga, concnetración de 3.33%, se dejó en la incubadora el tiempo deseado (1 h y 5 h), se agitó cada 30 minutos. La hidrólisis se detuvo enfriando los matraces subitamente, porteriormente el hidrolizado se filtro con papel whatman no. 1, se ajustó el pH de 4 a 6 y se determinaron los azúcares reductores mediante el método de DNS.

5.1.3.1. Cuantificación de azúcares reductores

Se determinó la concentración de azúcares reductores por el método del Ácido 3, 5 – Dinitrosalicílico (DNS).

Preparación del ácido 3,5-dinitrosalicílico

Se disolvieron 30.0 g de tartrato de sodio y potasio en agua destilada, después se agregaron 1.6 g de NaOH (previamente disuelto en agua destilada) y 1.0 g de DNS (disuelto en agua destilada), esta solución se aforó a 100 mL con agua destilada, se protegió de los rayos de luz almacenándolo en un frasco color ámbar, antes de usar dejar reposar por 15 minutos, finalmente determinar su absorbancia a 540 nm contra un blanco.

Determinación de la concentración de azúcares reductores

Se colocaron 0.5 mL del reactivo de DNS y 0.5 mL de muestra en un tubo de ensaye de 10mL, después se homogenizó la solución en el vórtex y se calentó en un baño de agua a ebullición (100°C) durante 5 minutos. Inmediatamente de que se cumpla el tiempo indicado, se colocó la solución en un baño de agua fría durante 10 minutos, posteriormente se añadieron 5 mL de agua destilada y se volvió a homogenizar con el vórtex. Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm contra un blanco (el blanco contenía 0.5 mL de agua destilada en vez de la muestra y se trató de la misma forma que la muestra del caldo de cultivo).

Curva patrón de glucosa

Se prepararon 25 mL de una solución de glucosa 0.2% (2 g/L), posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo al cuadro 8 (por duplicado) y tratarlas según la técnica de determinación de azúcares reductores con el reactivo DNS.

Cuadro 8. Diluciones para la curva patrón de glucosa.

| MUESTRA (POR DUPLICADO) | [GLUCOSA EN LA MUESTRA] (g/L) | VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE GLUCOSA DE 2 g/L (mL) | VOLUMEN DE AGUA DESTILADA (mL) |
|-------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 (blanco) | 0.0 | 0.00 | 1.00 |
| 2 | 0.20 | 0.10 | 0.90 |
| 3 | 0.40 | 0.20 | 0.80 |
| 4 | 0.60 | 0.30 | 0.70 |
| 5 | 0.80 | 0.40 | 0.60 |
| 6 | 1.00 | 0.50 | 0.50 |
| 7 | 1.20 | 0.60 | 0.40 |
| 8 | 1.40 | 0.70 | 0.30 |
| 9 | 1.60 | 0.80 | 0.20 |
| 10 | 1.80 | 0.90 | 0.10 |
| 11 | 2.00 | 1.00 | 0.00 |

Se elaboró la curva patrón en donde se graficó en el eje de las abscisas (eje "x") el promedio de la absorbancia determinada a 540 nm y en el eje de las ordenadas (eje "y") el promedio de la concentración de glucosa determinada en g/L. Se determinó la ecuación de la línea recta que relaciona a los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde "y" representa la absorbancia que se determinó a 540 nm, "x" representa la concentración de glucosa que se determinó en g/L, "m" representa la pendiente de la línea recta y "b" es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = \text{pendiente (absorbancia a 540 nm)} + b$$

5.1.4. Hidrólisis enzimática de la harina de Yuca y Malanga

Se realizó un diseño factorial central 2^3 con la finalidad de obtener las mejores condiciones de temperatura, pH y tiempo para obtener altos rendimientos de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de la harina de yuca o harina de malanga con α -amilasa y amiloglucosidasa.

5.1.4.1. Preparación de la solución de harina de yuca y malanga

Para una solución reguladora de citratos 20 mM, primero se prepararon una solución 0.1 M de ácido cítrico y una solución 0.1 M de citrato de sodio dihidratado; ambas soluciones se diluyeron cinco veces. Después en un vaso de precipitados se mezclaron ambas soluciones hasta obtener el pH deseado (4.08, 4.8, 5.85, 6.9 y 7.6). Con el regulador de citratos se prepararon las soluciones al 1 % de harina de yuca y malanga con los cinco diferentes pH.

5.1.4.2. Hidrólisis enzimática de la harina de yuca y malanga

En un tubo de plástico de 1.5 mL se adicionó 1 mL de una solución de harina de yuca o malanga (1%), esta solución se incubó durante 10 minutos en un thermomixer *comfort* (Eppendorf 1.5 mL) a la temperatura propuesta en el diseño (6.3, 20, 40, 60 y 73.4°C). Enseguida se adicionaron 3 U de la enzima α -amilasa por mg de harina de yuca o malanga y 0.025 U de la enzima amiloglucosidasa, a partir de la adición de las enzimas se empezó a medir el tiempo de reacción (0.36, 1, 3, 5 y 6.36 horas). La hidrólisis se detuvo enfriando subitamente las muestras al completarse los diferentes tiempos; se determinó la cantidad de azúcares reductores de cada muestra mediante el método de DNS descrito en el punto anterior.

5.1.5. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el diseño experimental del punto 5.1.5, se monitoreó la hidrólisis enzimática de la harina de yuca. Se puso en un célula de Lewis (50 mL de capacidad) 30 mL una de la solución de almidón 1 % en regulador de citratos 20 mM, pH 4.08 y se inubó a 73.4 °C durante 15 minutos (se agitó vigorosamente con una barra magnética mediante de una placa de agitación Barnstead Thermolyne) el sistema que se montó se observa en la Figura 9. Se agregaron 3 U de la enzima α -amilasa por cada mg de harina de yuca y 0.025 U de la enzima amiloglucosidasa por mg de harina de malanga. Se tomó inmediatamente 0.5 mL de la mezcla de reacción y se adicionó a un tubo conteniendo 0.5 mL del reactivo DNS (éste fue el blanco para la determinación de la absorbancia).

Se desarrolló la reacción hasta que se completaran 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas, en cada uno de estos tiempos se tomaron 0.5 mL y se fueron adicionando a tubos que

contenían 0.5 mL del reactivo DNS. Se trataron todos los tubos al mismo tiempo según la técnica del DNS. La reacción se realizó por triplicado.

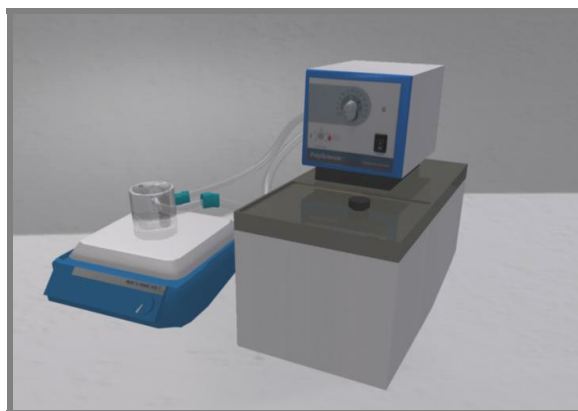


Figura 9. Sistema montado para la realización de la cinética enzimática de la harina de yuca.

5.1.6. Cuantificación de los azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida y enzimática de la harina de yuca y malanga usando la técnica de HPLC.

Se analizaron las muestras de los hidrolizados de harina de yuca y malanga, con la finalidad de analizar que tipo de azúcares se obtenían en la hidrólisis ácida y enzimática de la harina de yuca y malanga, y también para obtener sus concentraciones.

5.1.6.1. Preparación de la fase móvil.

Se filtró H₂O grado HPLC a través de un sistema de filtración Millipore como el que se muestra en la figura 9, se utilizó una membrana Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. El agua se dejó al vacío durante 30 minutos y posteriormente se sonicó durante 40 minutos para eliminar las burbujas contenidas en el líquido.



Figura 10. Sistema de filtración Millipore. Fuente: Millipore™.

5.1.6.2. Preparación de las muestras (hidrolizados de harina de yuca y malanga).

En un microtubo (1.5 mL capacidad) se agregaron 50 μ L de la muestra a valorar, previamente diluida con la fase móvil (H₂O grado HPLC); posteriormente esta solución se filtro a través de un portafiltros swinnex y una membrana (MF- Millipore membrane, 0.22 μ m). La solución filtrada se virtió en un vial (screw top vial, 4.6 mm y 6.0 mm with septa) estéril de 2 mL de capacidad. El vial se colocó en el muestreador automatico (508 Autosampler Beckman).

5.1.6.3. Calibración de la columna (SUPELCOGEL™ Ca) para la determinación de carbohidratos.

Antes de instalar la columna en el equipo de HPLC, se purgaron la líneas del sistema con la fase móvil (H₂O grado HPLC). Después se instaló la columna (SUPELCOGEL™ Ca) de acuerdo a las indicaciones proporcionadas por el distribuidor. Una vez instalada la columna se equilibró durante 12 horas (hasta que se mantuvo estable la lectura IR en el detector IR Jasco RI-1530) con la fase móvil (H₂O grado HPLC) con un flujo de 0.2 mL/min a temperatura ambiente.

5.1.6.4. Determinación de carbohidratos mediante cromatografía de líquidos de alta definición (HPLC).

Una vez preparadas las muestras de acuerdo al punto 5.1.7.2 y calibrada la columna de acuerdo al punto 5.1.7.3 de esta metodología, se determinó la cantidad y tipo de carbohidratos contenidos en la muestra. Se automatizó el proceso utilizando el software “32 Karat” versión 7.0 y un automuestreador “ 508 Autosampler” en el equipo de HPLC, las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo la cormatografía de líquidos fueron: Flujo de 0.8 mL/min, temperatura de 40 °C y finalmente un tiempo de 15 minutos.

Curva patrón de glucosa

Se prepararon 25 mL de una solución de glucosa 0.3% (3 g/L), posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo al cuadro 9 (por duplicado), posteriormente las muestras se prepararon y trataron de acuerdo a los puntos 5.1.7.2. y 5.1.7.4 descritos en esta metodología.

Cuadro 9. Diluciones para la curva patrón de glucosa.

| MUESTRA (POR DUPLICADO) | [GLUCOSA EN LA MUESTRA] (g/L) | VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE GLUCOSA DE 3 g/L (mL) | VOLUMEN DE AGUA DESTILADA (mL) |
|-------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 (blanco) | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| 2 | 0.30 | 0.10 | 0.90 |
| 3 | 0.60 | 0.20 | 0.80 |
| 4 | 0.90 | 0.30 | 0.70 |
| 5 | 1.20 | 0.40 | 0.60 |
| 6 | 1.50 | 0.50 | 0.50 |
| 7 | 1.80 | 0.60 | 0.40 |
| 8 | 2.10 | 0.70 | 0.30 |
| 9 | 2.40 | 0.80 | 0.20 |
| 10 | 2.70 | 0.90 | 0.10 |
| 11 | 3.00 | 1.00 | 0.00 |

Se elaboró la curva patrón en donde se graficó en el eje de las abscisas (eje "x") el promedio de la concentración de glucosa determinada en g/L y en el eje de las ordenadas (eje "y") el promedio del área del pico obtenido en los cromatogramas. Se determinó la ecuación de la línea recta que relaciona a los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde "y" representa el área bajo la curva (del pico obtenido del cromatograma), "x" representa la concentración de glucosa que se determinó en g/L, "m" representa la pendiente de la línea recta y "b" es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = \text{pendiente (área del pico obtenido)} + b$$

Curva patrón de maltosa

Se prepararon 25 mL de una solución de maltosa 0.3% (3 g/L), posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo al cuadro 9 (por duplicado), posteriormente las muestras se prepararon y trataron de acuerdo a los puntos 5.1.7.2. y 5.1.7.4 descritos en esta metodología.

Cuadro 10. Diluciones para la curva patrón de maltosa.

| MUESTRA (POR DUPLICADO) | [GLUCOSA EN LA MUESTRA] (g/L) | VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE MALTOSA DE 3 g/L (mL) | VOLUMEN DE AGUA DESTILADA (mL) |
|-------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 (blanco) | 0.00 | 0.00 | 1.00 |
| 2 | 0.30 | 0.10 | 0.90 |
| 3 | 0.60 | 0.20 | 0.80 |
| 4 | 0.90 | 0.30 | 0.70 |
| 5 | 1.20 | 0.40 | 0.60 |
| 6 | 1.50 | 0.50 | 0.50 |
| 7 | 1.80 | 0.60 | 0.40 |
| 8 | 2.10 | 0.70 | 0.30 |
| 9 | 2.40 | 0.80 | 0.20 |
| 10 | 2.70 | 0.90 | 0.10 |
| 11 | 3.00 | 1.00 | 0.00 |

Se elaboró la curva patrón en donde se graficó en el eje de las abscisas (eje "x") el promedio de la concentración de glucosa determinada en g/L y en el eje de las ordenadas (eje "y") el promedio del área del pico obtenido en los cromatogramas. Se determinó la ecuación de la línea recta que relaciona a los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde "y" representa el área bajo la curva (del pico obtenido del cromatograma), "x" representa la concentración de glucosa que se determinó en g/L, "m" representa la pendiente de la línea recta y "b" es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = \text{pendiente (área del pico obtenido)} + b$$

5.2. Formulación del medio de cultivo

Se realizó la formulación del medio de cultivo utilizando como principal fuente de carbono los azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca. Primero se determinó que tipo de azúcares reductores y la cantidad de estos en el hidrolizado de la harina de yuca, antes y después de realizar un tratamiento térmico (esterilización) mediante la técnica de HPLC y posteriormente se hizo la dilución del hidrolizado hasta obtener aproximadamente 20 g/L de azúcares reductores en la solución y finalmente se filtro tres veces con gasa de algodón. De la solución obtenida se formularon tres diferentes medios de cultivo. El primer medio de cultivo (M1) sólo contenía la solución de azúcares reductores 20 g/L y pH 6.8 ± 0.2 , producto de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca; el segundo medio de cultivo (M2) estaba compuesto de la solución de azúcares reductores 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 2 g/L y pH 6.8 ± 0.2 ; finalmente el tercer medio de cultivo (M3) se integró con la solución de azúcares reductores 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 10 g/L, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 2 g/L y pH 6.8 ± 0.2 . Los medio de cultivo M1, M2 y M3 se esterilizaron con las siguientes condiciones: 1.5 Kg/cm^2 , $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 15 minutos.

5.3. Selección y mantenimiento de las cepa de *Zymomonas mobilis* B-806

La cepa de *Zymomonas mobilis* B-806 fue proporcionada por la Agricultural Research Service Culture Collection (también conocida como NRRL). La cepa de *Zymomonas mobilis* B-806 se activó inoculando el pellet liofilizado proporcionado por la NRRL, bajo condiciones de esterilidad, en 10 mL del medio YP (Yeast Peptone): Peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L, NaCl 3 g/L, NaHPO_4 ; por cada litro de agua destilada preparado, se ajustó el pH a 7.2. y se esterilizó a 1.5 Kg/cm^2 , $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 15 minutos. Después de inoculado, el medio de cultivo se incubó a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Con el caldo de cultivo obtenido se inocularon placas y tubos de ensaye que contenían medio YP (Peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L, NaCl 3 g/L, NaHPO_4 , agar 2 %; por cada litro de agua destilada preparado, se ajustó el pH a 7.2.) y se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Las placas y tubos se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Mensualmente se realizaron resiembras siguiendo la misma metodología.

Con la finalidad de almacenar la cepa de *Zymomonas mobilis* B-806 durante más tiempo (6 meses a un año) se tomó una de las colonias que crecieron en las placas con medio YP y se inocularon 25 mL de medio YP líquido, se incubo a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas con agitación de 100 rpm, se puso una alícuota del caldo de cultivo de 1 mL en un microtubo de 1.5 mL conteniendo $200 \text{ } \mu\text{L}$ de glicerol estéril y guardar a una temperatura de $-37 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4. Fermentación en matraz de los medios de cultivo M1, M2 y M3 con *Zymomonas mobilis*.

Con la finalidad de evaluar los rendimientos de etanol de la cepa *Zymomonas mobilis* B-806 se probaron los tres medios M1, M2 y M3 formulados en el punto 5.1.10.

5.4.1. Estimación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la elaboración de la curva patrón de glucosa.

Se estimó el consumo de los azúcares reductores por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico de acuerdo a lo establecido en el punto 5.1.4. de la presente metodología.

5.4.2. Estimación de la concentración de biomasa por peso seco.

Para la biomasa libre en el caldo de fermentación se pusieron 10 mL de muestra (caldo de cultivo) en un tubo Falcon de 30 mL de volumen y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante, después se mezcló la biomasa precipitada en el tubo Falcon con 1 mL de agua salina (solución estéril de cloruro de sodio al 0.9%) y se homogenizó utilizando el vórtex. Posteriormente se virió la suspensión celular en una charola de aluminio de peso conocido y se metió la charola conteniendo la suspensión celular dentro del horno a 70 °C y durante 24 horas o hasta peso constante. Se determinó el peso de la biomasa seca por diferencia de pesos. El peso de la muestra seca y de la charola, menos el peso de la charola sola, resulta en el peso seco de la biomasa contenida en los 10 mL de muestra.

5.4.3. Determinación de la cantidad de etanol mediante la oxidación del etanol con la enzima Alcohol Oxidasa.

Se determinó la cantidad de etanol producido por *Zymomonas mobilis* B-806 en las muestras de las cinéticas realizadas con cada uno de los medios de cultivo formulados (M1, M2 y M3). Para realizar esta valoración se usó un kit comercial (Ethanol assay kit, Biovision), este se conformaba de cinco elementos, descritos a continuación:

- Regulador de pH (Ethanol Assay Buffer, 25 mL)
- Compuesto de reacción (Ethanol Probe, lyophilized, 1 vial)
- Dimetilsulfoxido (DMSO) (Dimethylsulfoxide, 0.4 mL)
- Enzimas (Ethanol Enzyme Mix, lyophilized, 1 vial)
- Etanol estándar (Ethanol Standard, 0.5 mL)

5.4.3.1. Preparación de reactivos

Se preparó el compuesto colorimétrico disolviendo el contenido del vial denominado "Ethanol Probe" con 220 μ L de DMSO, esta solución se preservó a -20 °C y se usó en un período no

mayor a dos meses. También se preparó la solución enzimática, adicionando 220 μL del regulador de pH al vial denominado "Ethanol Enzyme Mix", el cual contenía a las enzimas, se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se usó en un período que no excediera dos meses. La mezcla de reacción se preparó en el momento en que se realizaron los ensayos para determinar la concentración de etanol; por cada muestra de etanol se prepararon 50 μL de la mezcla de reacción, la cual estaba compuesta por: Regulador de pH (46 μL), compuesto colorimétrico (2 μL) y solución enzimática (2 μL). Se preparó la cantidad de mezcla de reacción de acuerdo al número de ensayos realizados.

5.4.3.2. Determinación de la concentración de etanol

En un microtubo (1.5 mL capacidad) se agregaron 50 μL de la muestra a valorar, previamente diluida en regulador de pH; posteriormente se adicionaron 50 μL de la mezcla de reacción. La reacción se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro Beckman a una longitud de onda de 570 nm contra un blanco (el blanco contenía 50 μL del regulador de pH en vez de la muestra y se trató de la misma forma que la muestras).

5.4.3.3. Curva patrón de etanol

Se preparó una curva tipo de etanol siguiendo el siguiente protocolo: se adicionaron en un microtubo 11.7 μL de etanol estándar y 988.3 μL del regulador de pH, se mezclaron vigorosamente con un vórtex. De esta mezcla se tomaron 10 μL y se disolvieron nuevamente con 990 μL de regulador de pH, obteniendo una concentración de 2 nmol/ μL de etanol. Posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo al cuadro 9 (por duplicado) y se trataron de acuerdo la técnica de la determinación de la concentración de etanol descrita anteriormente.

Cuadro 11. Diluciones para la curva patrón de etanol.

| MUESTRA (POR DUPLICADO) | [ETANOL EN LA MUESTRA] (mg/L) | VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE 2 nmol/ μL (μL) | VOLUMEN DEL REGULADOR DE pH (μL) |
|-------------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|
| 1 (blanco) | 0.0 | 0.00 | 50.00 |
| 2 | 0.7 | 4.00 | 46.00 |
| 3 | 2.2 | 12.00 | 38.00 |
| 4 | 3.0 | 16.00 | 34.00 |
| 5 | 3.6 | 20.00 | 30.00 |

Se elaboró la curva patrón en donde se graficó en el eje de las abscisas (eje "x") el promedio de la concentración de etanol determinada en mg/L y en el eje de las ordenadas (eje "y") el promedio de la absorbancia determinada a 570 nm. Se determinó la ecuación de la línea recta que relaciona a los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde "y" representa la absorbancia que se determinó a 570 nm, "x" representa la concentración de etanol que se determinó en mg/L, "m" representa la pendiente de la línea recta y "b" es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la siguiente ecuación:

Concentración de etanol (mg/L) = pendiente (absorbancia a 570 nm) + b

5.4.4. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1, M2 y M3 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806.

Para realizar la cinética se usaron matraces de 500 mL de capacidad, en cada matraz se vertieron 200 mL de los medios M1, M2 y M3. Los matraces conteniendo el medio correspondiente, se inocularon con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806 a una concentración del 15% (v/v), bajo condiciones de esterilidad. Los matraces se incubaron a una temperatura de 28°C y con agitación de 100 rpm. Inmediatamente después de inocular se tomó una muestra de 10 mL del caldo de cultivo y se adicionó a un tubo falcon de 50 mL, esta muestra se consideró como el tiempo cero de la cinética. La fermentación se desarrolló a las 6, 12, 18, 24, 36, 42, 48, 54, 60, 66 y 72 horas. Las muestras tomadas se trataron al mismo tiempo según las técnicas descritas en los puntos 5.1.12.1., 5.1.12.2 y 5.1.12.3. La cinéticas de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1, M2 y M3 se desarrollaron por triplicado.

5.5. Fermentación en un Biorreactor de 2 L New Brunswick Scientific Bioflo 110, del medio de cultivo M3 con *Zymomonas mobilis*.

Con el fin de evaluar la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* B-806, se llevó a cabo la fermentación en un Biorreactor de 2 L de los azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

5.5.1. Estimación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la elaboración de la curva patrón de glucosa.

Se estimó el consumo de los azúcares reductores por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico de acuerdo a lo establecido en el punto 5.1.4. de la presente metodología.

5.5.2. Estimación de la concentración de biomasa por peso seco.

Para la biomasa libre en el caldo de fermentación se pusieron 10 mL de muestra (caldo de cultivo) en un tubo Falcon de 30 mL de volumen y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante, después se mezcló la biomasa precipitada en el tubo Falcon con 1 mL de agua salina (solución estéril de cloruro de sodio al 0.9%) y se homogenizó utilizando el vórtex. Posteriormente se virió la suspensión celular en una charola de aluminio de peso conocido y se metió la charola conteniendo la suspensión celular dentro del horno a 70 °C y durante 24 horas o hasta peso constante. Se determinó el peso de la biomasa seca por diferencia de pesos. El peso de la muestra seca y de la charola, menos el peso de la charola sola, resulta en el peso seco de la biomasa contenida en los 10 mL de muestra.

5.5.3. Determinación de la cantidad de etanol mediante la oxidación del etanol con la enzima Alcohol Oxidasa.

Se determinó la cantidad de etanol producido por *Zymomonas mobilis* B-806 en las muestras de las cinéticas realizadas con cada uno de los medios de cultivo formulados (M1, M2 y M3). Para realizar esta valoración se usó un kit comercial (Ethanol assay kit, Biovision), este se conformaba de cinco elementos, descritos a continuación:

- Regulador de pH (Ethanol Assay Buffer, 25 mL)
- Compuesto de reacción (Ethanol Probe, liophilized, 1 vial)
- Dimetilsulfoxido (DMSO) (Dimethylsulfoxide, 0.4 mL)
- Enzimas (Ethanol Enzyme Mix, liophilized, 1 vial)
- Etanol estándar (Ethanol Standard, 0.5 mL)

5.5.3.1. Preparación de reactivos

Se preparó el compuesto colorimétrico disolviendo el contenido del vial denominado “Ethanol Probe” con 220 μL de DMSO, esta solución se preservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se usó en un período no mayor a dos meses. También se preparó la solución enzimática, adicionando 220 μL del regulador de pH al vial denominado “Ethanol Enzyme Mix”, el cual contenía a las enzimas, se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se usó en un período que no excediera dos meses. La mezcla de reacción se preparó en el momento en que se realizaron los ensayos para determinar la concentración de etanol; por cada muestra de etanol se prepararon 50 μL de la mezcla de reacción, la cual estaba compuesta por: Regulador de pH (46 μL), compuesto colorimétrico (2 μL) y solución enzimática (2 μL). Se preparó la cantidad de mezcla de reacción de acuerdo al número de ensayos realizados.

5.5.3.2. Determinación de la concentración de etanol

En un microtubo (1.5 mL capacidad) se agregaron 50 μL de la muestra a valorar, previamente diluida en regulador de pH; posteriormente se adicionaron 50 μL de la mezcla de reacción. La reacción se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro Beckman a una longitud de onda de 570 nm contra un blanco (el blanco contenía 50 μL del regulador de pH en vez de la muestra y se trató de la misma forma que la muestras).

5.5.3.3. Curva patrón de etanol

Se preparó una curva tipo de etanol siguiendo el siguiente protocolo: se adicionaron en un microtubo 11.7 μL de etanol estándar y 988.3 μL del regulador de pH, se mezclaron vigorosamente con un vórtex. De esta mezcla se tomaron 10 μL y se disolvieron nuevamente con 990 μL de regulador de pH, obteniendo una concentración de 2 nmol/ μL de etanol. Posteriormente se realizaron las diluciones de acuerdo al cuadro 9 (por duplicado) y se trataron de acuerdo la técnica de la determinación de la concentración de etanol descrita anteriormente.

Cuadro 12. Diluciones para la curva patrón de etanol.

| MUESTRA (POR DUPLICADO) | [ETANOL EN LA MUESTRA] (mg/L) | VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE 2 nmol/ μL (DE μL) | VOLUMEN DEL REGULADOR DE pH (DE μL) |
|-------------------------|-------------------------------|---|---|
| 1 (blanco) | 0.0 | 0.00 | 50.00 |
| 2 | 0.7 | 4.00 | 46.00 |
| 3 | 2.2 | 12.00 | 38.00 |
| 4 | 3.0 | 16.00 | 34.00 |
| 5 | 3.6 | 20.00 | 30.00 |

Se elaboró la curva patrón en donde se graficó en el eje de las abscisas (eje "x") el promedio de la concentración de etanol determinada en mg/L y en el eje de las ordenadas (eje "y") el promedio de la absorbancia determinada a 570 nm. Se determinó la ecuación de la línea recta que relaciona a los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde "y" representa la absorbancia que se determinó a 570 nm, "x" representa la concentración de etanol que se determinó en mg/L, "m" representa la pendiente de la línea recta y "b" es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de etanol (mg/L)} = \text{pendiente (absorbancia a 570 nm)} + b$$

5.5.4. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el M3 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806.

En un Biorreactor New Brunswick Scientific Bioflo 110 se vertieron 1.2 L del medio M3. El biorreactor con todo y su contenido se metió a la autoclave y se esterilizó con las siguientes condiciones: 1.5 Kg/cm² y 121 °C durante 15 minutos. Después de que se terminó el proceso de esterilización se abrió la puerta del autoclave y con la ayuda de guantes de asbesto se sacó el biorreactor esterilizado. Posteriormente el biorreactor se conectó al módulo de control en donde se automatizó la fermentación para controlar la temperatura (28 °C), pH (6.8) y agitación (100 rpm). Una vez alcanzados estos parámetros se inoculó en biorreactor con la bacteria de *Zymomonas mobilis* B-806 a una concentración 15% (v/v), bajo condiciones estériles.

Inmediatamente después de que se inoculó el biorreactor se tomó una muestra de 10 mL del caldo de cultivo y se adicionó a un tubo falcon de 50 mL, esta muestra se consideró como el tiempo cero de la cinética. La fermentación se desarrolló a las 12, 18, 24, 36, 42, 48, 60, 66, 72, 84, 90, 96 y 108 horas. Las muestras tomadas se trataron al mismo tiempo según las técnicas descritas en los puntos 5.1.13.1., 5.1.13.2 y 5.1.13.3. La cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el M3 se desarrollará por duplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección y pre-tratamiento de la materia prima.

Se seleccionaron tres tubérculos (raíces): yuca (*Manihot esculenta* Crant), camote (*Ipomea batata*) y malanga (*Colocasia esculenta* Schott), como posible materia prima para la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* B-806. Estos tubérculos se seleccionaron debido a que son cultivados en México y no son una fuente de alimento importante para la población mexicana.

6.1.1. Determinación de la cantidad de almidón, soluble al agua, contenido en las raíces de yuca, camote y malanga.

Se determinó la cantidad de almidón soluble al agua en cada una de los tubérculos elegidos, ver Cuadro 13. En el caso del camote se obtuvo una concentración del 7.25 ± 0.43 % de almidón, de acuerdo a los estudios de Panda *et al* (2007) la composición de almidón en el camote (*Ipomea batata*) es de 14.8 ± 3.5 %. Comparado con este dato, podemos observar que la cantidad de almidón determinado en nuestra muestra es casi la mitad de la reportada en la bibliografía, esta diferencia se puede explicar debido a la diferencia de las variedades de camotes utilizadas en ambos ensayos; ya que sólo en México existen, de forma generalizada, tres variedades: la blanca, la amarilla y la morada. Mientras que es más común encontrar las variedades blanca y amarilla durante todo el año, la variedad morada (más dulce) sólo es temporal. En nuestro caso utilizamos la variedad amarilla, que de acuerdo a Linares, E. *et al* (2008) contiene 11.8 % de almidón y 74% de humedad, valores que se acercan más a los obtenidos en nuestro experimento.

Cuadro 13. Concentración de almidón en 100 gramos de tubérculo en base húmeda .

| MUESTRA TUBÉRCULO | RENDIMIENTO DE ALMIDÓN BASE HÚMEDA (%) | HÚMEDAD (%) |
|-------------------|--|-------------|
| CAMOTE | 7.25 ± 0.43 | 78.00 |
| MALANGA | 20.91 ± 0.38 | 68.40 |
| YUCA | 27.35 ± 0.42 | 62.00 |

En el caso de la malanga se obtuvo una concentración de almidón cercana a la reportada por la Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria en el 2006 (Cuadro 7) y el porcentaje de humedad calculado en el balance de materia es similar al reportado en la misma referencia. Con la concentración de almidón obtenida de la yuca es por poco, menor a la concentración reportada por Bradbury y Holbway (1988) y el porcentaje de humedad es casi igual al reportado por los mismos autores (Cuadro 5).

Tomando en cuenta el rendimiento de almidón obtenido en cada tubérculo, se eligieron a la malanga y la yuca para continuar con el proceso del pre-tratamiento; otra característica por la cual se descartó el uso de camote en el trabajo, fue que este tubérculo resultó difícil de manipular en el momento de preparar la harina.



Figura 11. Arriba: Yuca (Manihot esculenta). Abajo: Malanga (Colocasia esculenta).

6.2. Hidrólisis ácida de la harina de malanga.

Con ayuda del software Minitab se realizó el Diseño Experimental Factorial 2^3 de la hidrólisis ácida de la harina de malanga, en este se estudiaron tres factores considerados importantes en la reacción. Estos factores fueron: Temperatura, concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y Tiempo, los cuales se estudiaron a dos niveles, uno bajo y otro alto. Con este diseño se buscaba encontrar las condiciones de hidrólisis ácida a la cuales se obtuvieran altos rendimientos de azúcares reductores.

El Diseño Experimental Factorial 2^3 propuesto por el software (Minitab) y llevado a cabo de forma experimental, se componía de 8 ensayos o combinaciones y se realizó por triplicado. En el Cuadro 14 se observa el diseño del experimento y la respuesta obtenida en cada ensayo. A simple vista podemos ver que las condiciones experimentales del ensayo 8 son las más favorables para la reacción. Por otra parte se realizó el ANOVA (análisis de varianza) para poder determinar si la hipótesis nula H_0 es aceptada o rechazada, se quiere comprobar si alguno de los efectos evaluados tiene efectos significativos en la respuesta.

Cuadro 14. Diseño Experimental Factorial 2³ de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

| EXPERIMENTO (POR TRIPLICADO) | TEMPERATURA (°C) | [ÁCIDO SULFÚRICO] (%) | TIEMPO (h) | RENDIMIENTO (g g DE GLUCOSA/HARINA MALANGA) |
|------------------------------|------------------|-----------------------|------------|---|
| 1 | 60 | 1 | 1 | 0.057 |
| 2 | 95 | 1 | 1 | 0.089 |
| 3 | 60 | 5 | 1 | 0.030 |
| 4 | 95 | 5 | 1 | 0.352 |
| 5 | 60 | 1 | 5 | 0.086 |
| 6 | 95 | 1 | 5 | 0.260 |
| 7 | 60 | 5 | 5 | 0.143 |
| 8 | 95 | 5 | 5 | 0.795 |

Considerando que A (concentración de H₂SO₄), B (Temperatura) y C (Tiempo) y usando un nivel de confianza del 95%, $\alpha=0.05$.

Para la respuesta, rendimiento de azúcares reductores, la tabla del análisis de varianza (ANOVA) mostró los siguiente:

La hipótesis nula de que el factor A no afecta el rendimiento de azúcares reductores se rechaza, ya que la concentración de H₂SO₄ sí tiene efectos significativos en la reacción de hidrólisis ácida de la harina malanga. La hipótesis nula de que el factor B no afecta el rendimiento de azúcares reductores se rechaza, ya que la temperatura sí tiene efectos significativos en la reacción de hidrólisis ácida de la harina malanga. La hipótesis nula de que el factor C no afecta el rendimiento de azúcares reductores se rechaza, ya que el tiempo de reacción sí afecta el rendimiento de los azúcares reductores en la reacción de hidrólisis. También, la hipótesis nula de que el efecto de la temperatura es el mismo con ambas concentraciones de ácido se rechaza, los efectos de la interacción AB son significativos en la respuesta.

Para hacer un poco más gráfico todo lo que se mencionó con anterioridad se usó una Gráfica Normal de Efectos Estandarizados (Figura 12) para comparar la magnitud relativa y la significación estadística de los efectos principales y su interacción. En la Figura 12 se observa una gráfica con una línea que atraviesa el gráfico, en esta línea es donde se espera que caigan todos los puntos, si el efecto fuera cero. Por lo general, si los puntos no están cerca de esta línea es una señal de que su efecto es significativo en la respuesta y mientras más se alejen de esta su efecto será mayor.

En el caso de la Figura 12, se observa que los 3 factores estudiados en la hidrólisis ácida tiene efectos significativos en la respuesta. El factor que tiene un mayor efecto en la hidrólisis ácida de la harina de malanga es la concentración del ácido, seguido por la interacción AB, esto significa que el efecto de la temperatura no es el mismo utilizando diferentes concentraciones de ácido.

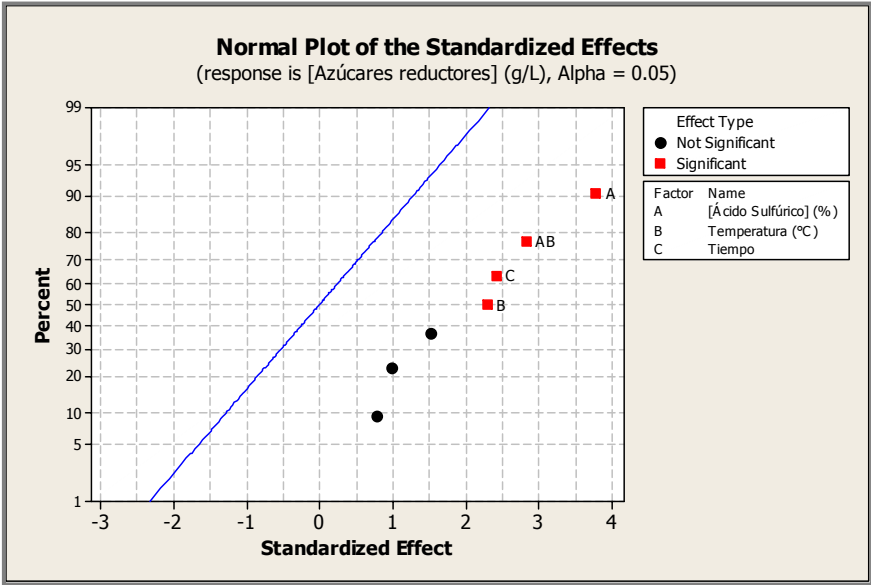


Figura 12. Gráfica normal de los efectos estandarizados, que muestra la significancia de los efectos encontrados en el ensayo de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

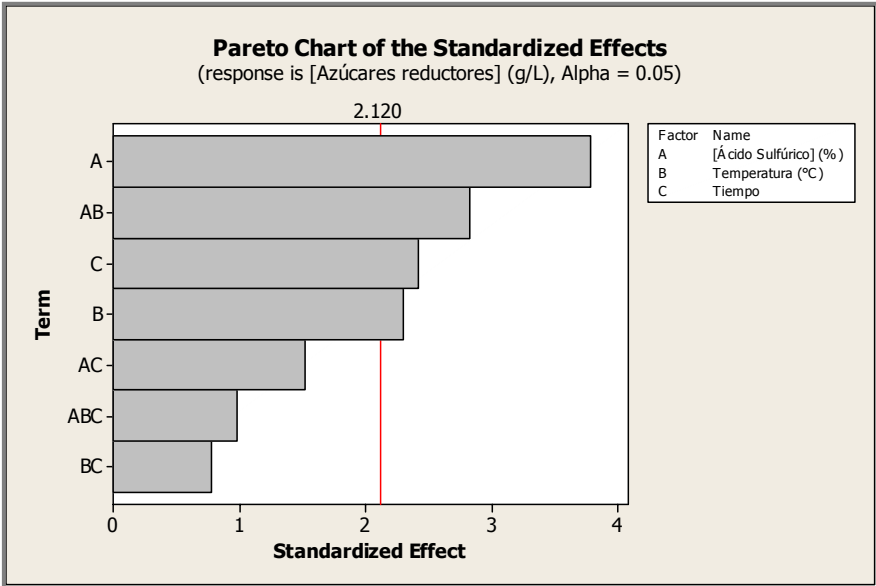


Figura 13. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, en donde se observan los efectos de los factores estudiados en la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

Esta misma información nos la proporciona un Diagrama de Pareto, Figura 13, en donde se grafica de forma descendente los factores y el grado de significancia de los mismos, esta significancia esta dada por la línea que atraviesa el gráfico y nos muestra que sólo los factores que atraviesan esa línea tienen efectos significativos en la respuesta.

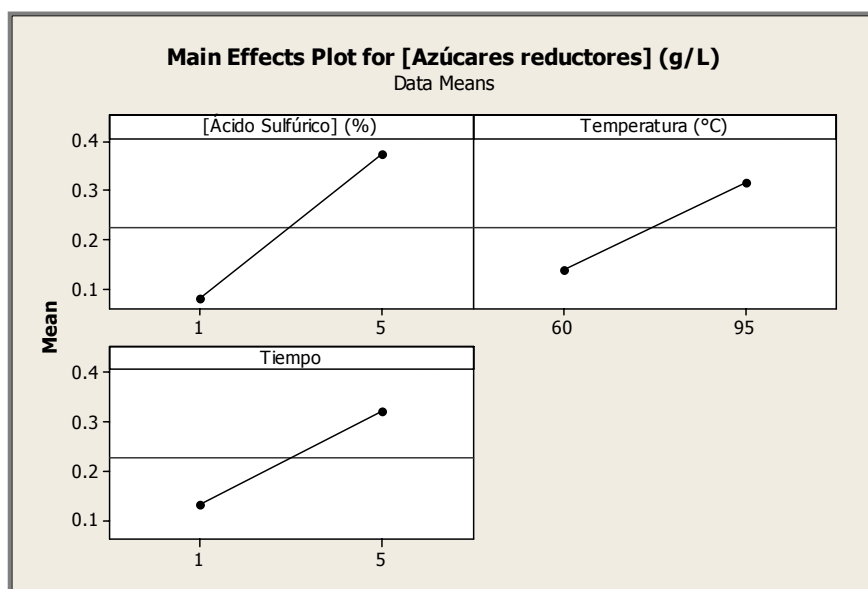


Figura 14. Gráfica de los efectos principales, en donde se observa el efecto de los factores evaluados en la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

Para saber de una forma más detallada el efecto de los factores en la respuesta, se obtuvo la Gráfica de los principales efectos sobre la respuesta, que en este caso es el rendimiento de los azúcares reductores. En la figura 14 podemos observar que en el caso de los tres factores su nivel más alto es el que produce más altos rendimientos de azúcares reductores, esto quiere decir que para la hidrólisis enzimática las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos son con una concentración de H₂SO₄ del 5%, temperatura de 95 °C y con un tiempo de 5 horas. Esta información se puede corroborar con la Gráfica de contornos mostrada en la Figura 15, en este tipo de gráfica podemos observar que en la región coloreada de verde encontramos el rendimiento de azúcares reductores más alto de este experimento, esta región se encuentra en la parte del gráfico donde se intercepta el tiempo a las 5 horas y la concentración de ácido del 5%.

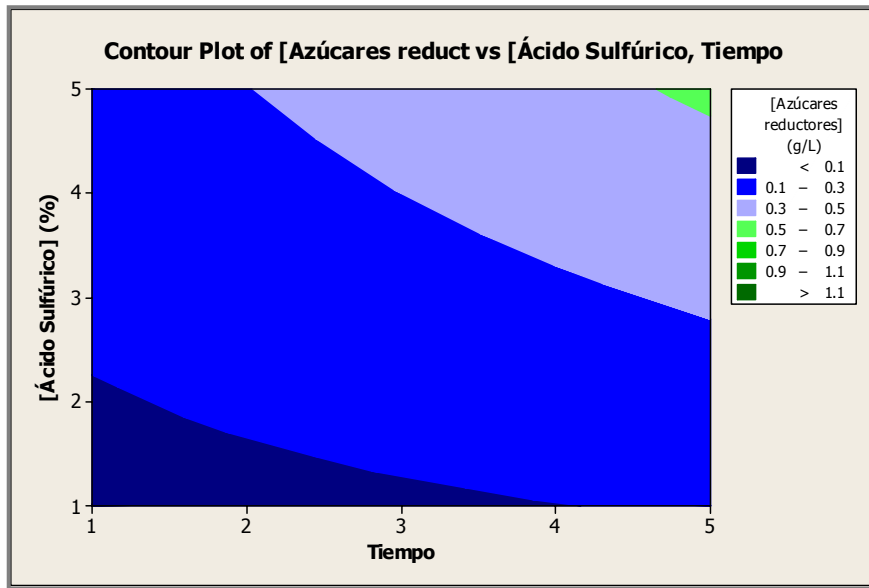


Figura 15. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

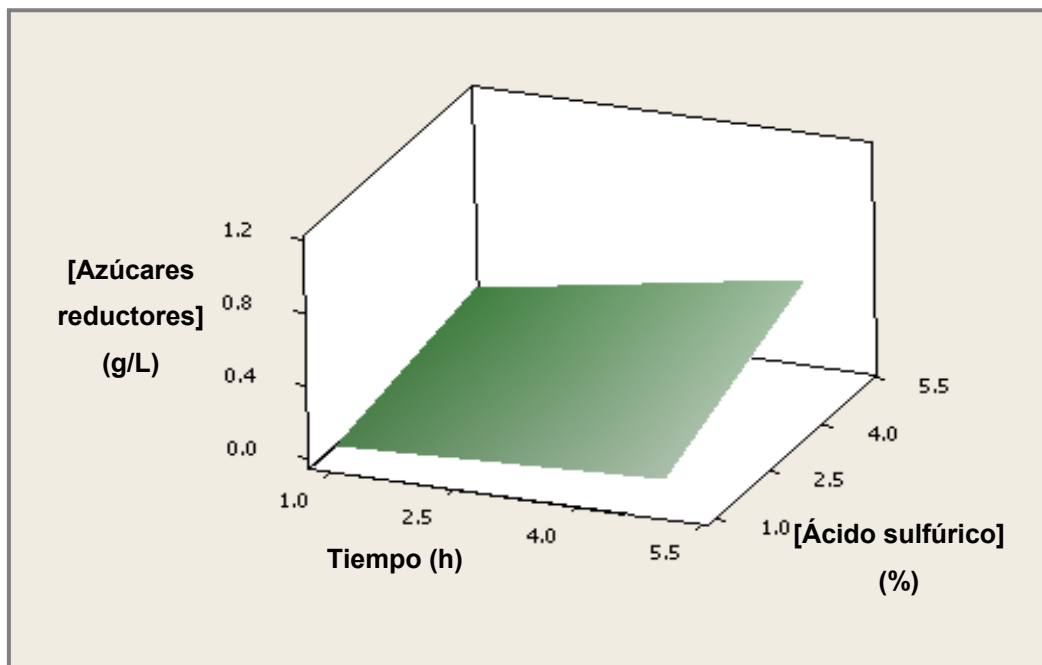


Figura 16. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de malanga.

En la Figura 16 se muestra la superficie de respuesta de la hidrólisis ácida de la malanga, en donde podemos observar de una forma más gráfica el efecto del tiempo y la concentración del ácido sobre el rendimiento de los azúcares reductores.

6.3. Hidrólisis ácida de la harina de yuca

Con ayuda del software Minitab se realizó el Diseño Experimental Factorial 2^3 de la hidrólisis ácida de la harina de yuca, en este se estudiaron tres factores considerados importantes en la reacción. Estos factores fueron: Temperatura, concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y Tiempo, los cuales se estudiaron a dos niveles, uno bajo y otro alto. Con este diseño se buscaba encontrar las condiciones de hidrólisis ácida a la cuales se obtuvieran altos rendimientos de azúcares reductores.

El Diseño Experimental Factorial 2^3 propuesto por el software (Minitab) y llevado a cabo de forma experimental, se componía de 8 ensayos o combinaciones y se realizó por triplicado. En el Cuadro 15 se observa el diseño del experimento y la respuesta obtenida en cada ensayo. A simple vista podemos ver que las condiciones experimentales del ensayo 8 son las más favorables para la reacción. Por otra parte se realizó el ANOVA (análisis de varianza) para poder determinar si la hipótesis nula H_0 es aceptada o rechazada, se quiere comprobar si alguno de los efectos evaluados tiene efectos significativos en la respuesta.

Cuadro 15. Diseño Experimental Factorial 2^3 de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

| EXPERIMENTO (POR TRIPLICADO) | TEMPERATURA (°C) | [ÁCIDO SULFÚRICO] (%) | TIEMPO (h) | RENDIMIENTO (g GLUCOSA/ HARINA DE YUCA) |
|------------------------------------|------------------|-----------------------------|------------|---|
| 1 | 60 | 1 | 1 | 0.036 |
| 2 | 95 | 1 | 1 | 0.144 |
| 3 | 60 | 5 | 1 | 0.047 |
| 4 | 95 | 5 | 1 | 0.379 |
| 5 | 60 | 1 | 5 | 0.163 |
| 6 | 95 | 1 | 5 | 0.491 |
| 7 | 60 | 5 | 5 | 0.179 |
| 8 | 95 | 5 | 5 | 0.526 |

Considerando que A (concentración de H₂SO₄), B (Temperatura) y C (Tiempo) y usando un nivel de confianza del 95%, $\alpha=0.05$. Para la respuesta, rendimiento de azúcares reductores, la tabla del análisis de varianza (ANOVA) mostró los siguiente:

La hipótesis nula de que el factor A no afecta el rendimiento de azúcares reductores se rechaza, ya que la concentración de H₂SO₄ sí tiene efectos significativos en la reacción de hidrólisis ácida de la harina malanga. La hipótesis nula de que el factor C no afecta el rendimiento de azúcares reductores se rechaza, ya que el tiempo de reacción sí afecta el rendimiento de los azúcares reductores en la reacción de hidrólisis.

Se usó una Gráfica Normal de Efectos Estandarizados (Figura 17) para comparar la magnitud relativa y la significación estadística de los efectos principales y su interacción. En la Figura 17 se observa una gráfica con una línea que atraviesa el gráfico, en esta línea es donde se espera que caigan todos los puntos, si el efecto fuera cero. Por lo general, si los puntos no están cerca de esta línea es una señal de que su efecto es significativo en la respuesta y mientras más se alejen de esta su efecto será mayor. Para el caso de la hidrólisis ácida de la harina de yuca se observa que sólo A y C tienen efectos significativos en la respuesta. El factor que tiene un mayor efecto en la hidrólisis ácida de la harina de yuca es la concentración del ácido, seguido por el tiempo de la reacción.

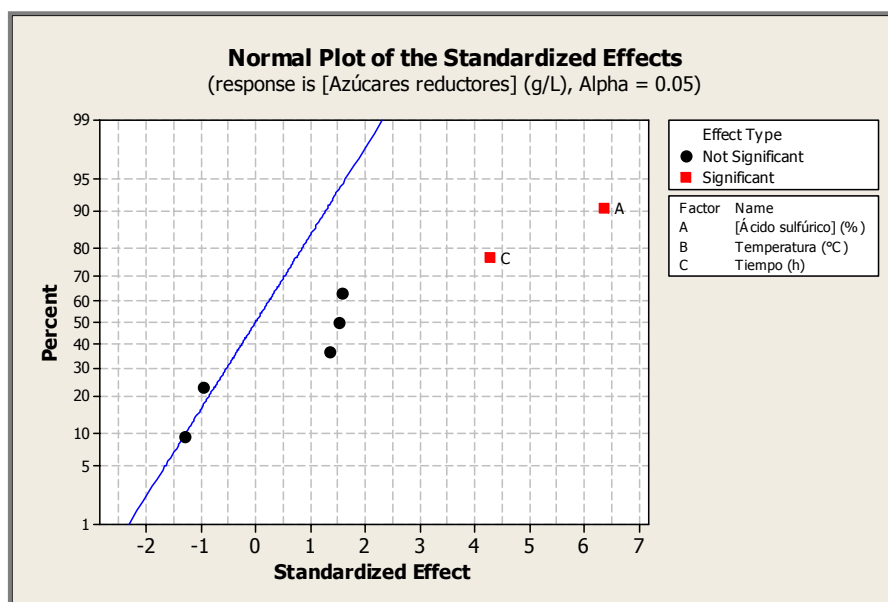


Figura 17. Gráfica normal de los efectos estandarizados, que muestra la significancia de los efectos encontrados en el ensayo de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

En el diagrama de Pareto se observa que son precisamente la concentración de ácido (H_2SO_4) y el tiempo, los factores que tienen efectos significativos en el rendimiento de los azúcares reductores producidos en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

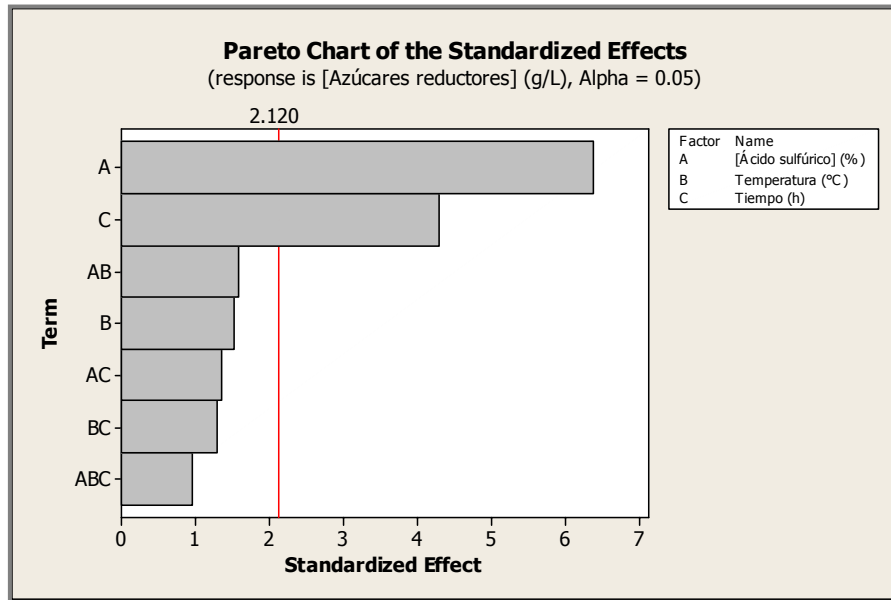


Figura 18. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, en donde se observan los efectos de los factores estudiados en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

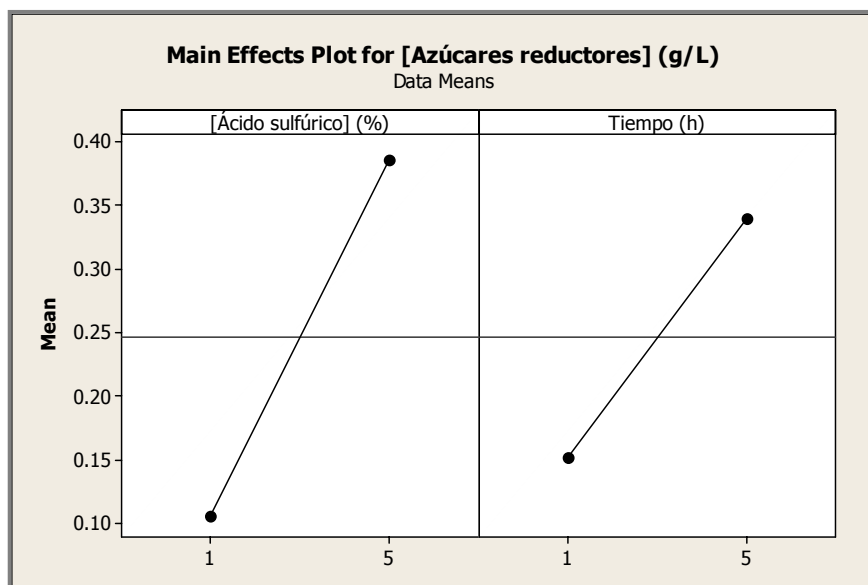


Figura 19. Gráfica de los efectos principales, en donde se observa el efecto de los factores evaluados en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

Para saber el efecto de cada factor en la respuesta, se obtuvo la Gráfica de los principales efectos sobre la respuesta, que en este caso es el rendimiento de los azúcares reductores. En la figura 19 podemos observar que con ambos factores en nivel más alto es el que produce más altos rendimientos de azúcares reductores, esto quiere decir que para la hidrólisis enzimática las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos son con una concentración de H₂SO₄ del 5% y con un tiempo de 5 horas. Esta información se puede corroborar con las Gráficas de cubo y contornos mostradas en las Figuras 20 y 21 respectivamente, en la primera gráfica podemos observar que la respuesta con el rendimiento más alto de azúcares reductores fue con una concentración de H₂SO₄ del 5%, temperatura de 95 °C y con un tiempo de 5 horas. Mientras que en la Gráfica de contornos en la región coloreada de verde encontramos el rendimiento de azúcares reductores más alto de este experimento, esta región se encuentra en la parte del gráfico donde se intercepta el tiempo a las 5 horas y la concentración de ácido del 5%.

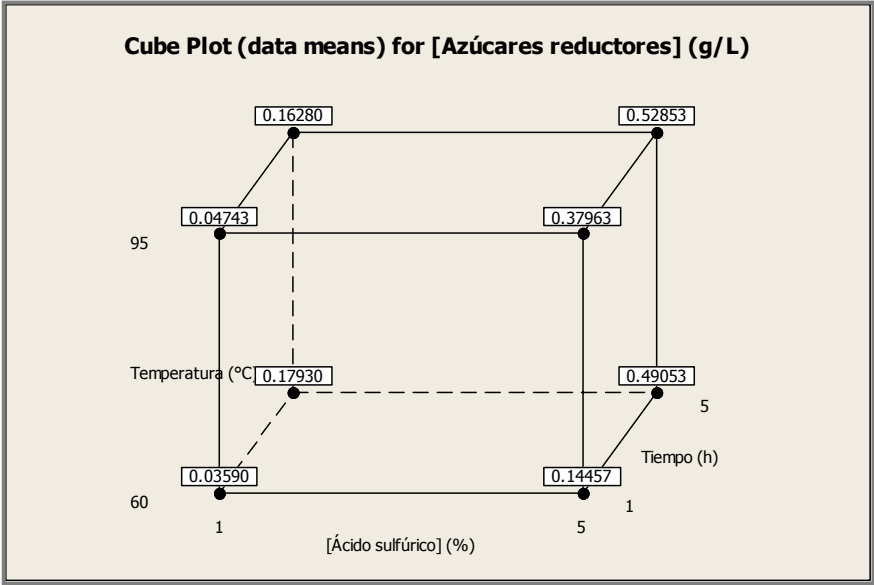


Figura 20. Gráfica de cubo, en donde se observan las medias de las respuestas obtenidas de cada ensayo evaluado en la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

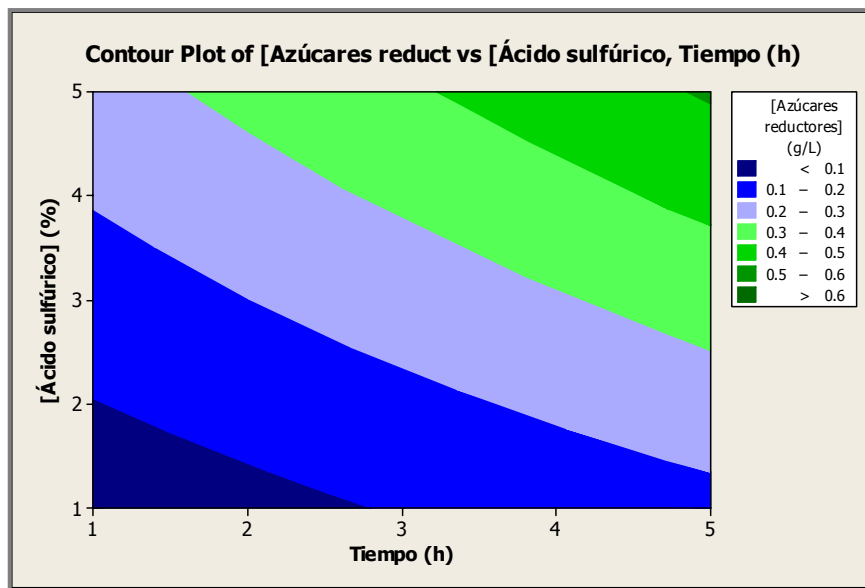


Figura 21. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

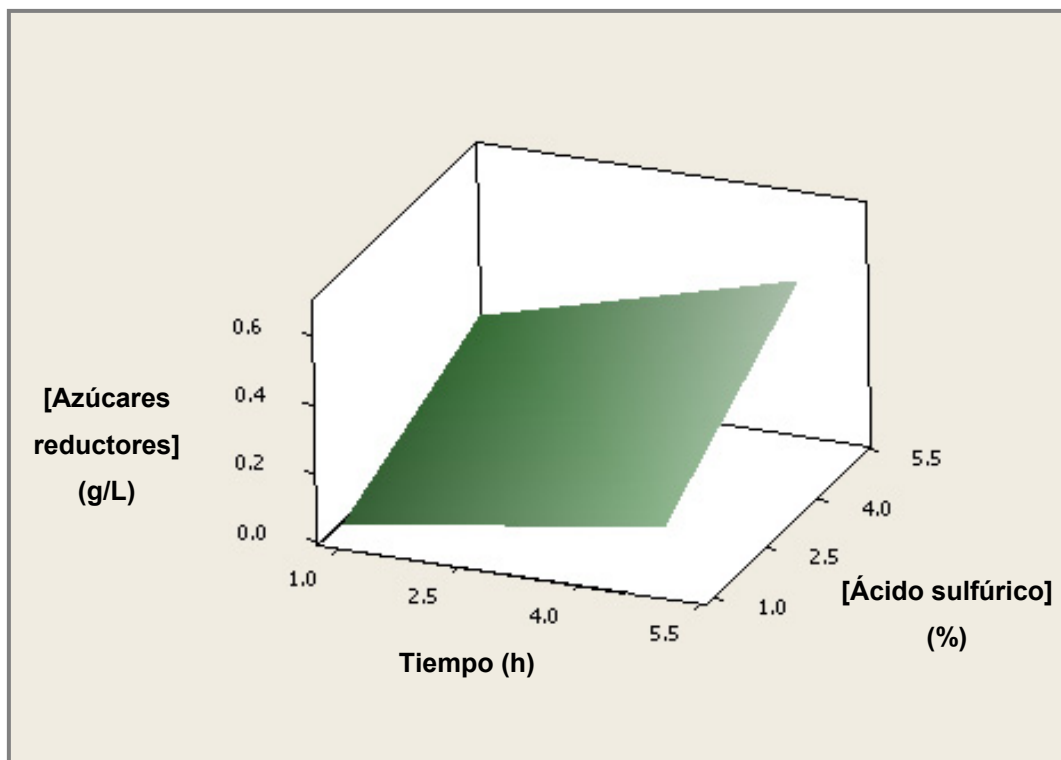


Figura 22. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis ácida de la harina de yuca.

En la Figura 22 se muestra la superficie de respuesta de la hidrólisis ácida de la yuca, en donde podemos observar de una forma más gráfica el efecto del tiempo y la concentración del ácido sobre el rendimiento de los azúcares reductores.

6.4. Hidrólisis enzimática de la harina de yuca y malanga.

6.4.1. Hidrólisis enzimática de la harina de malanga

Con ayuda de la herramienta estadística Minitab se realizó el Diseño Experimental Factorial Central 2^3 de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga, en este se estudiaron tres factores (considerados importantes en la reacción) a dos niveles. Estos factores fueron: Temperatura (), pH y Tiempo, los cuales se estudiaron a dos niveles, uno bajo y otro alto. Con este diseño se buscaba encontrar las condiciones de hidrólisis ácida a la cuales se obtuvieran altos rendimientos de azúcares reductores.

El Diseño Experimental Factorial 2^3 propuesto por el software (Minitab) y llevado a cabo de forma experimental, se componía de 8 ensayos o combinaciones y se realizó por triplicado. En el Cuadro 14 se observa el diseño del experimento y la respuesta obtenida en cada ensayo. A simple vista podemos ver que las condiciones experimentales del ensayo 8 son las más favorables para la reacción. Por otra parte se realizó el ANOVA (análisis de varianza) para poder determinar si la hipótesis nula H_0 es aceptada o rechazada, se quiere comprobar si alguno de los efectos evaluados tiene efectos significativos en la respuesta.

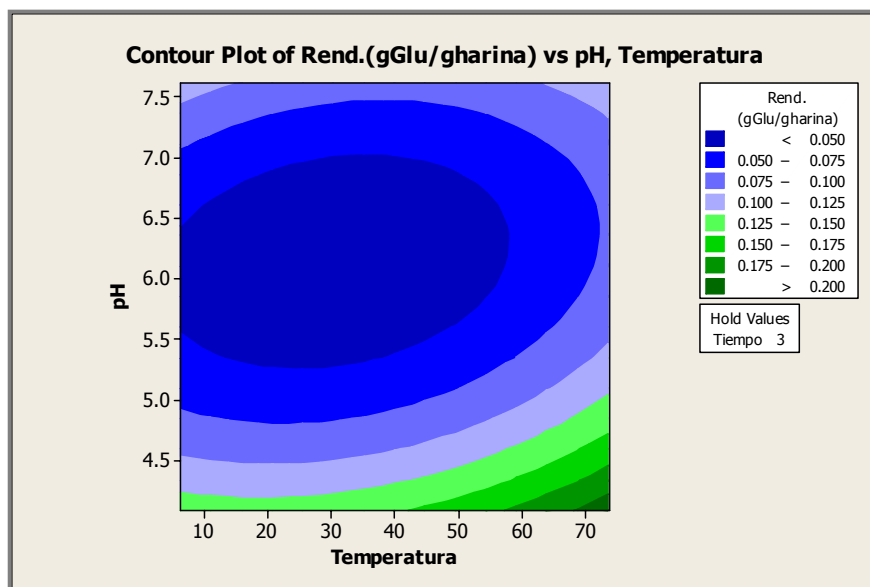


Figura 23. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.

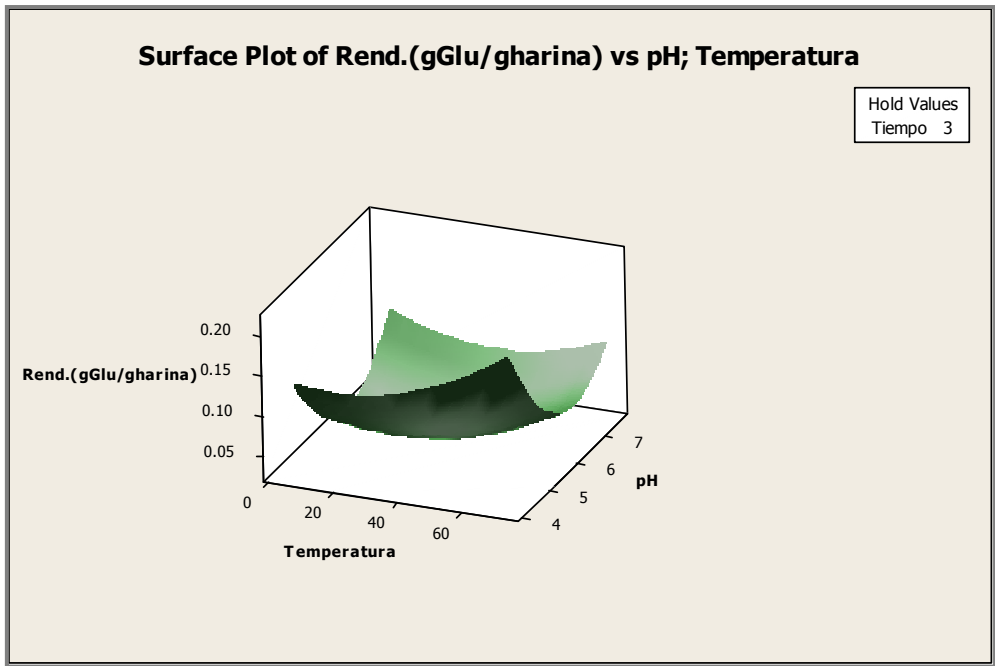


Figura 24. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.

6.4.2. Hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

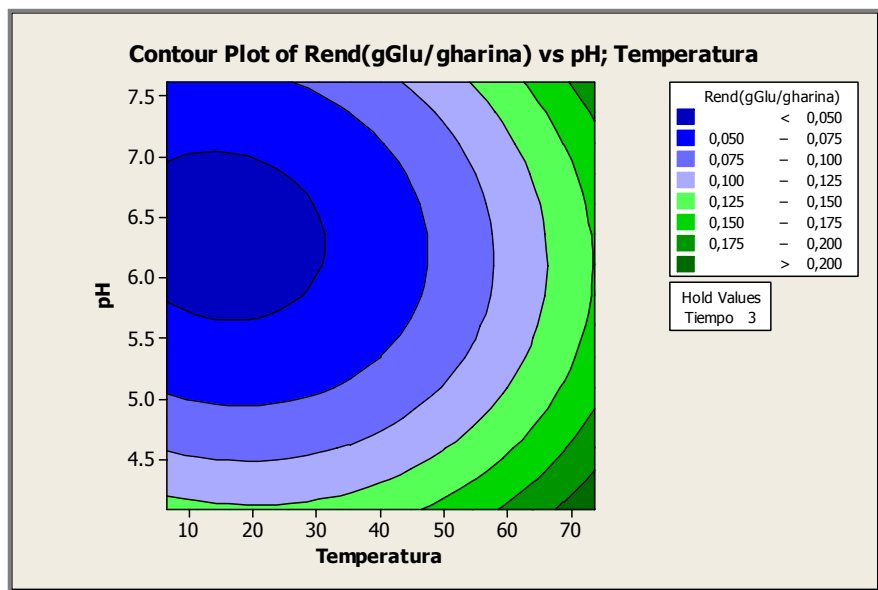


Figura 25. Gráfica de contornos, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

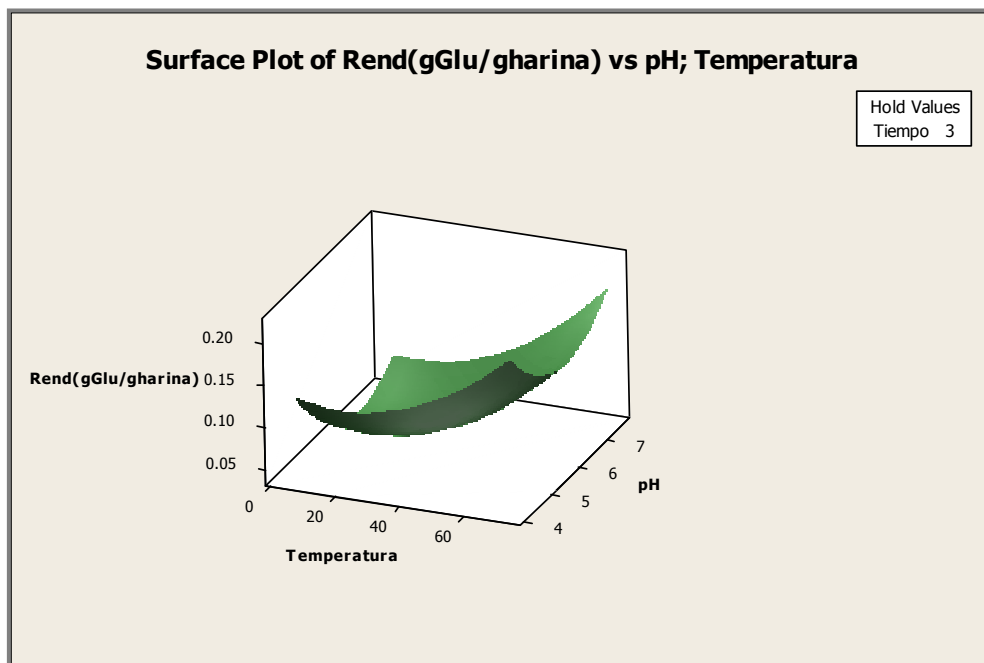


Figura 26. Superficie de respuesta, en donde se observan las condiciones en las cuales se obtienen los rendimientos más altos de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

6.5. Cinética enzimática de la harina de yuca y malanga

6.5.1. Cinética enzimática de la harina de malanga

Cuadro 16. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga .

| | TIEMPO (h) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) |
|----|------------|--------------------------------|
| T0 | 0 | 0.00 |
| T1 | 2 | 0.46 |
| T2 | 4 | 0.80 |
| T3 | 6 | 0.93 |
| T4 | 8 | 1.47 |
| T5 | 10 | 1.29 |
| T6 | 12 | 1.34 |

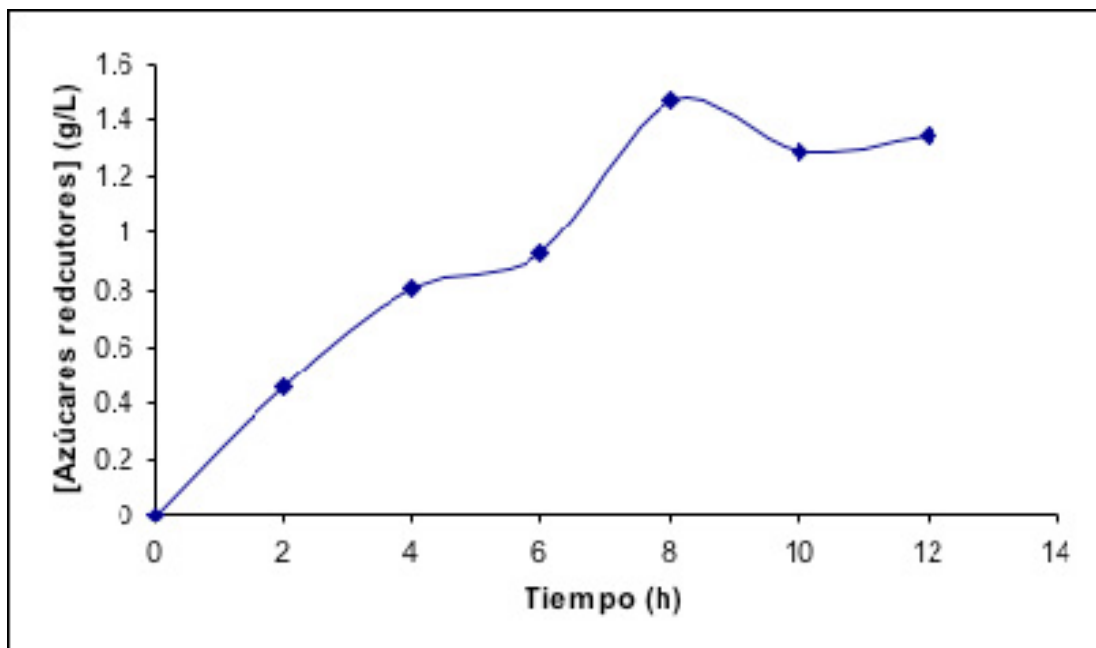


Figura 27. Gráfica de la cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de malanga.

6.5.2. Cinética enzimática de la harina de yuca

Cuadro 17. Cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

| | TIEMPO (h) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) |
|----|------------|--------------------------------|
| T0 | 0 | 0.00 |
| T1 | 2 | 1.56 |
| T2 | 4 | 2.06 |
| T3 | 6 | 2.36 |
| T4 | 8 | 2.45 |
| T5 | 10 | 2.85 |
| T6 | 12 | 2.92 |

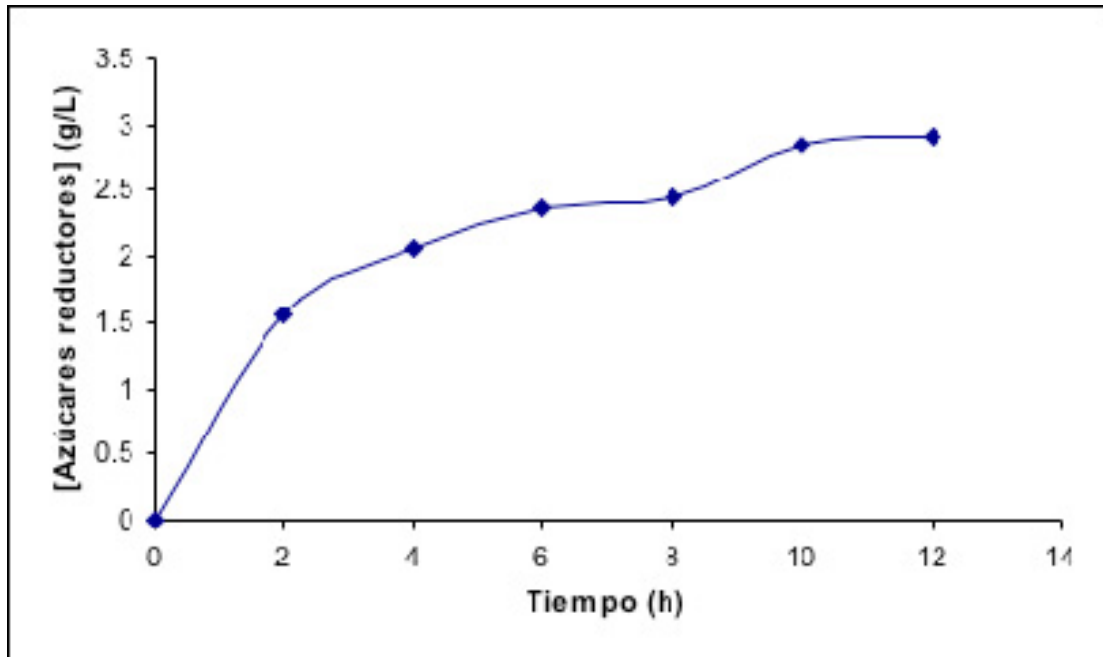


Figura 28. Gráfica de la cinética de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca.

6.6. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1, M2 y M3 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806

6.6.1. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en los medios M1 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806

Cuadro 18. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 1.

| | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/L) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) | ETANOL (g/L) |
|-----|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| T0 | 0 | 1.64 | 19.71 | 0.00 |
| T1 | 6 | 1.56 | 15.20 | 0.10 |
| T2 | 12 | 1.56 | 14.92 | 0.10 |
| T3 | 18 | 2.10 | 14.54 | 0.09 |
| T4 | 24 | 2.67 | 14.53 | 0.08 |
| T5 | 36 | 2.68 | 14.77 | 0.09 |
| T6 | 42 | 2.93 | 14.13 | 0.72 |
| T7 | 48 | 2.81 | 13.41 | 1.01 |
| T8 | 54 | 3.06 | 13.37 | 1.63 |
| T9 | 60 | 3.10 | 12.42 | 1.91 |
| T10 | 66 | 3.25 | 8.07 | 4.66 |
| T11 | 72 | 2.84 | 8.36 | 5.52 |

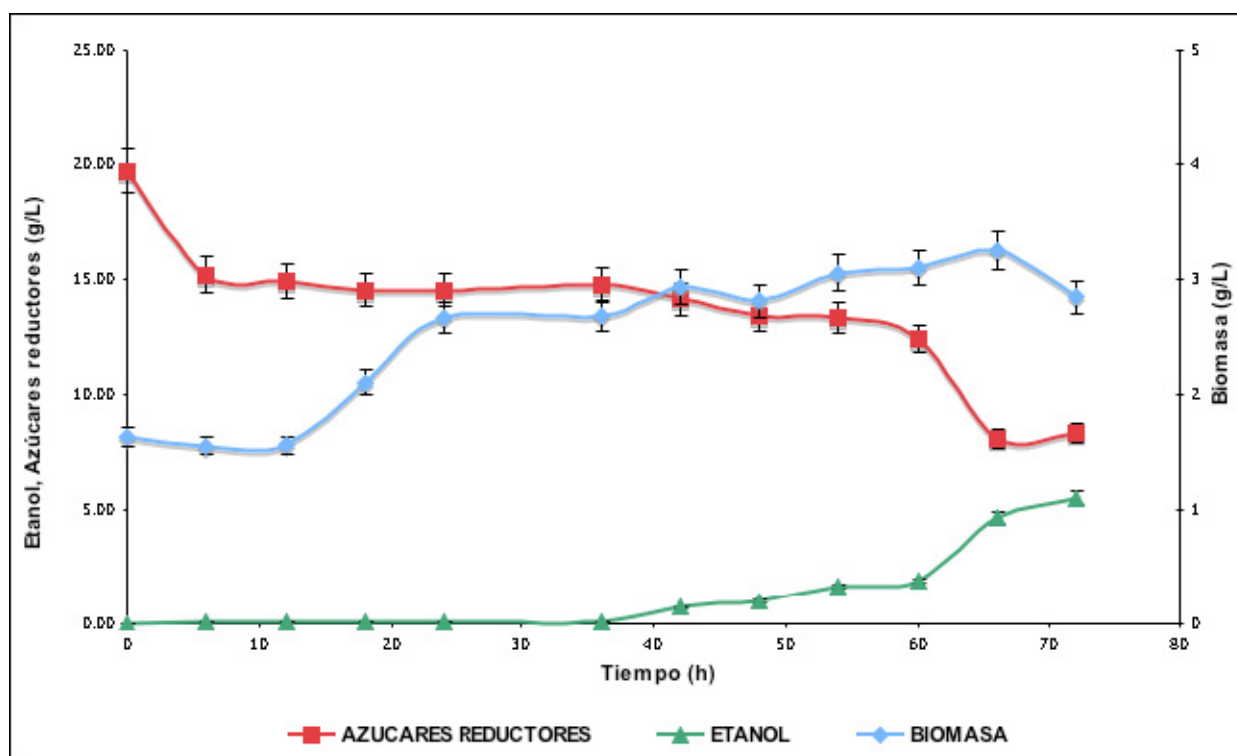


Figura 29. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* B-806 y el medio 1.

6.6.2. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio M2 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806

Cuadro 19. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 2.

| | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/L) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) | ETANOL (g/L) |
|-----|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| T0 | 0 | 1.34 | 19.33 | 0.00 |
| T1 | 6 | 1.37 | 14.06 | 0.05 |
| T2 | 12 | 2.07 | 13.67 | 0.05 |
| T3 | 18 | 2.45 | 13.08 | 0.04 |
| T4 | 24 | 2.73 | 12.22 | 0.05 |
| T5 | 36 | 3.14 | 11.67 | 0.05 |
| T6 | 42 | 3.36 | 11.30 | 1.79 |
| T7 | 48 | 3.37 | 10.18 | 2.77 |
| T8 | 54 | 3.82 | 9.44 | 3.13 |
| T9 | 60 | 3.61 | 8.68 | 5.60 |
| T10 | 66 | 3.81 | 6.64 | 9.25 |
| T11 | 72 | 4.12 | 6.40 | 9.47 |

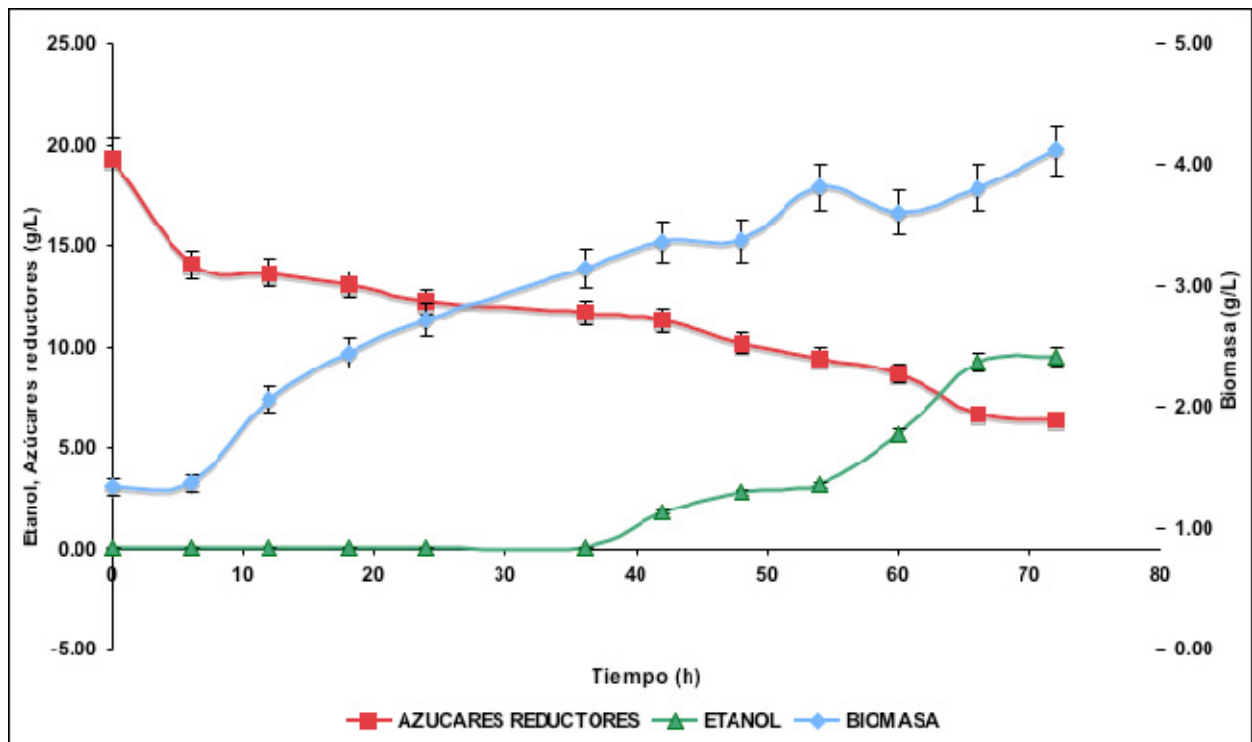


Figura 30. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* B-806 y el medio 2.

6.6.3. Cinética de la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio M3 con la bacteria *Zymomonas mobilis* B-806

Cuadro 20. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3.

| | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/L) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) | ETANOL (g/L) |
|-----|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| T0 | 0 | 1.52 | 19.74 | 0.00 |
| T1 | 6 | 1.87 | 14.14 | 0.04 |
| T2 | 12 | 2.55 | 13.16 | 0.04 |
| T3 | 18 | 2.78 | 12.77 | 0.04 |
| T4 | 24 | 2.99 | 11.64 | 0.04 |
| T5 | 36 | 3.18 | 10.56 | 0.05 |
| T6 | 42 | 3.56 | 9.23 | 2.10 |
| T7 | 48 | 3.63 | 8.36 | 7.10 |
| T8 | 54 | 3.32 | 7.99 | 8.98 |
| T9 | 60 | 3.80 | 7.37 | 8.56 |
| T10 | 66 | 4.23 | 6.29 | 10.26 |
| T11 | 72 | 4.39 | 6.35 | 13.25 |

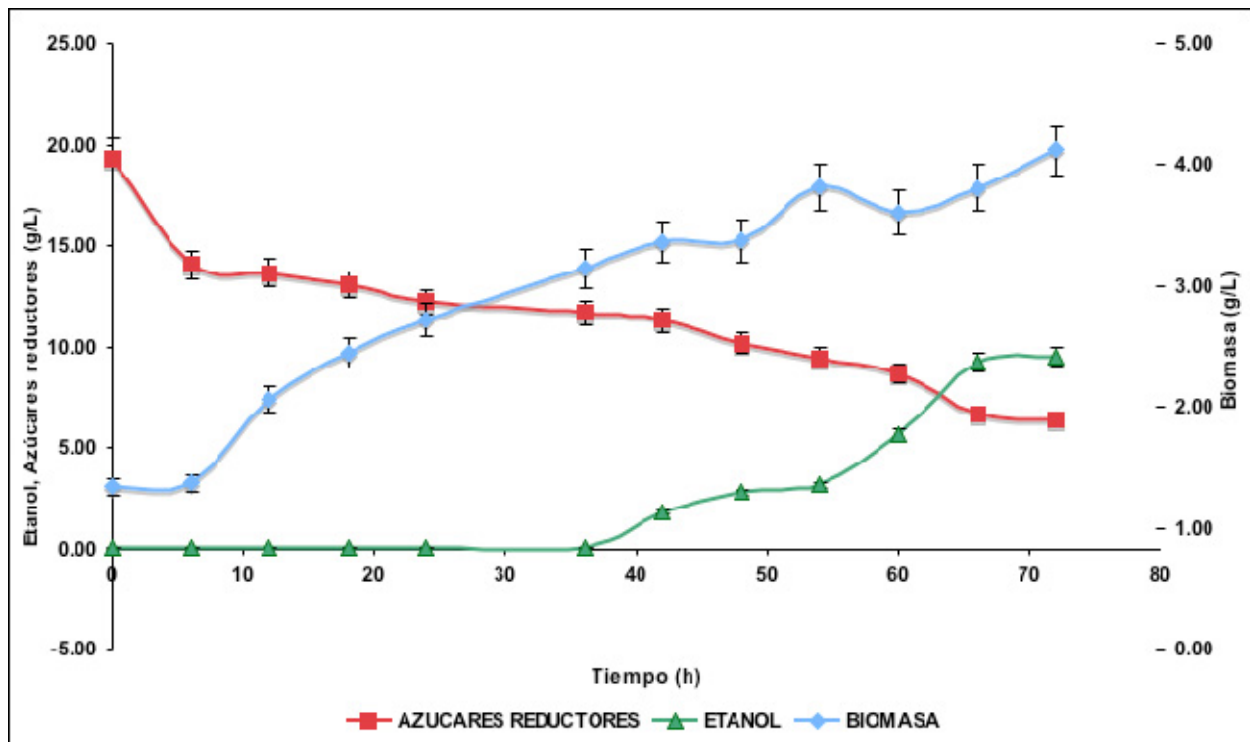


Figura 31. Gráfica de la cinética de la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* B-806 y el medio 3.

6.7. Fermentación en un Biorreactor de 2 L New Brunswick Scientific Bioflo 110, del medio de cultivo M3 con *Zymomonas mobilis*.

6.7.1. Fermentación en un Biorreactor de 2 L (intercambio de oxígeno) de los azúcares reductores contenidos en medio de cultivo M3 con *Zymomonas mobilis*.

Cuadro 21. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3.

| | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/L) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) | ETANOL (g/L) |
|-----|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| T0 | 0 | 1.47 | 24.88 | 0.35 |
| T1 | 12 | 1.67 | 22.86 | 1.05 |
| T2 | 18 | 1.81 | 23.41 | 1.10 |
| T3 | 24 | 1.93 | 22.60 | 2.18 |
| T4 | 36 | 1.96 | 20.52 | 4.70 |
| T5 | 42 | 1.92 | 18.39 | 6.19 |
| T6 | 48 | 1.93 | 19.57 | 6.93 |
| T7 | 60 | 2.04 | 14.86 | 8.97 |
| T8 | 66 | 2.18 | 16.22 | 9.04 |
| T9 | 72 | 2.44 | 13.39 | 11.01 |
| T10 | 84 | 2.57 | 9.85 | 11.02 |
| T11 | 90 | 2.71 | 7.40 | 11.08 |
| T12 | 96 | 2.73 | 5.38 | 11.06 |
| T13 | 108 | 2.70 | 4.06 | 11.03 |

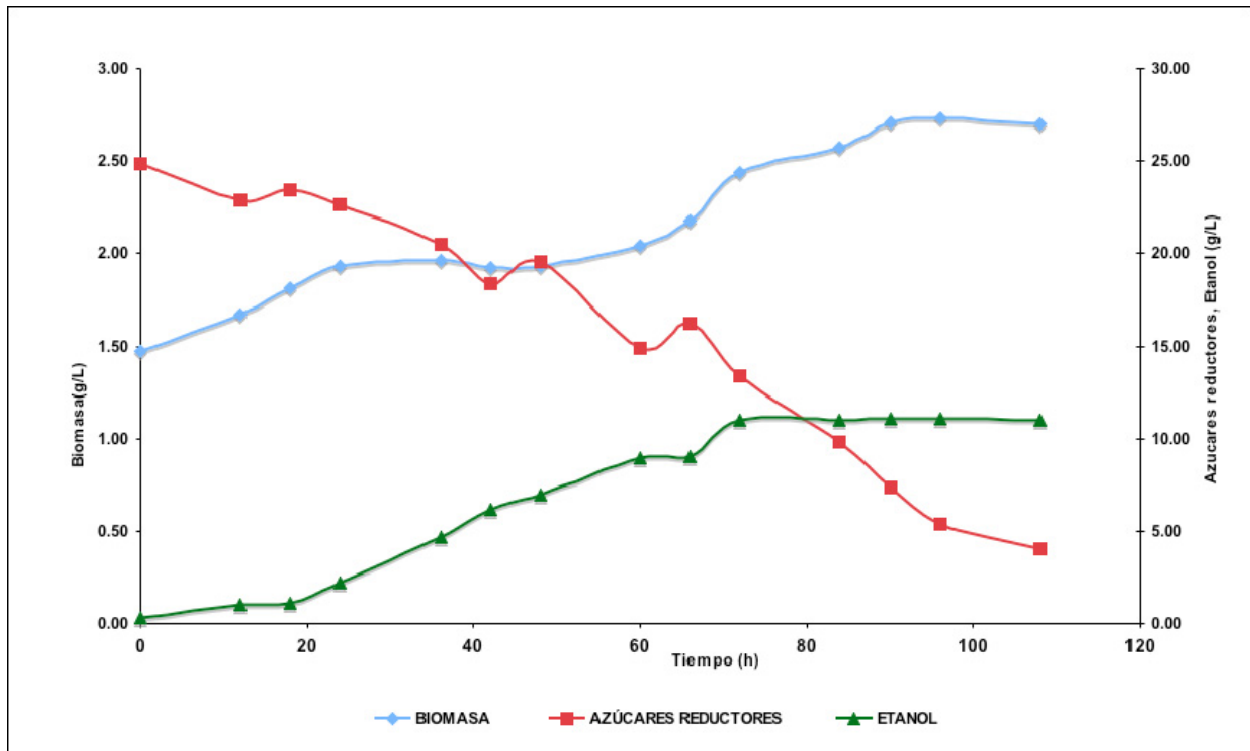


Figura 32. Gráfica de la cinética de la producción de etanol en un biorreactor de 2 L con *Zymomonas mobilis* B-806 y el medio 3.

6.7.2. Fermentación en un Biorreactor de 2 L (sin intercambio de oxígeno) de los azúcares reductores contenidos en medio de cultivo M3 con *Zymomonas mobilis*.

Cuadro 22. Cinética de la producción de etanol mediante la fermentación de los azúcares reductores contenidos en el medio 3.

| | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/L) | [AZÚCARES REDUCTORES] (g/L) | ETANOL (g/L) |
|-----|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| T0 | 0 | 1.71 | 23.06 | 0.36 |
| T1 | 12 | 1.76 | 21.31 | 0.53 |
| T2 | 18 | 1.90 | 20.84 | 0.92 |
| T3 | 24 | 2.07 | 21.99 | 1.70 |
| T4 | 36 | 2.34 | 20.20 | 1.99 |
| T5 | 42 | 2.31 | 18.62 | 3.89 |
| T6 | 48 | 2.40 | 19.87 | 4.47 |
| T7 | 60 | 2.41 | 15.37 | 4.83 |
| T8 | 66 | 2.76 | 15.37 | 6.96 |
| T9 | 72 | 2.77 | 15.10 | 7.88 |
| T10 | 84 | 2.75 | 11.55 | 9.05 |
| T11 | 90 | 2.78 | 11.09 | 9.20 |
| T12 | 96 | 2.85 | 6.95 | 9.91 |
| T13 | 108 | 2.84 | 5.55 | 9.99 |

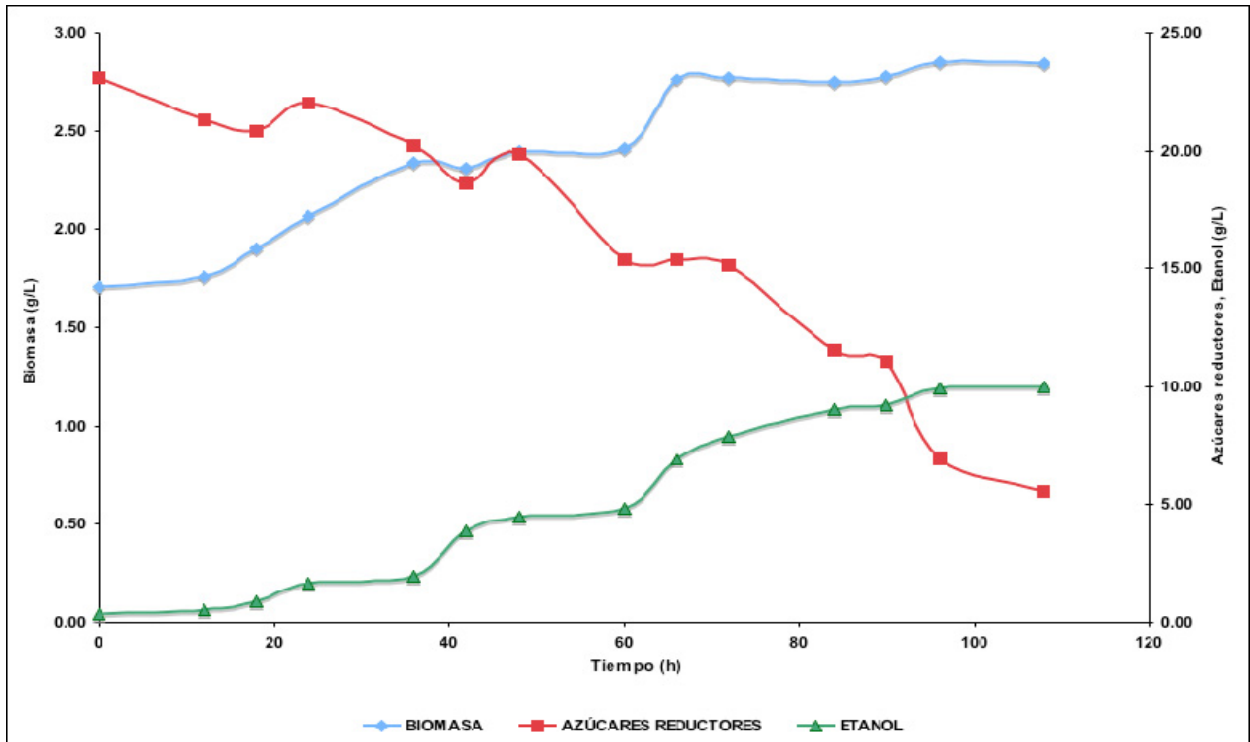


Figura 33. Gráfica de la cinética de la producción de etanol en un biorreactor de 2 L con *Zymomonas mobilis* B-806 y el medio 3.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron azúcares reductores de la hidrólisis ácida y enzimática del almidón de yuca y malanga.

Las condiciones de hidrólisis ácida del almidón de yuca y malanga, con mayores concentraciones de azúcares reductores son a 95°C, 5% de H₂SO₄ y con un tiempo de 5 horas.

Las mejores condiciones para que en la hidrólisis enzimática trabajen en sinéresis la α -amilasa y la amiloglucosidasa son a 73.6 °C y pH 4.08.

Se observó que después del proceso de esterilización no se ve afectada la cantidad de azúcares reductores presentes en la solución de almidón hidrolizado previamente.

El medio de cultivo del cual se obtuvo la mayor concentración final de etanol fue el que contenía la solución de almidón hidrolizada, KH₂PO₄ y extracto de levadura.

8. REFERENCIAS

1. Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M., Amorim, H. V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Elsevier Science*. Volumen(17): 482-487.
2. AIE (Agencia Internacional de Energía). 2008. Key World Energy Statistics. 9 rue de la Fédération, 75739 París Cedex 15, France. Disponible desde www.iea.org.
3. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación). 2008. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Viale delle Terme di Caracalla 00153 Roma, Italia. Disponible desde www.fao.org. ISSN 0251-1371.
4. Petrobras. 2007. Biocombustibles. Comunicación Institucional. Brasil.
5. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), INE (Instituto Nacional de Ecología). 2008. Análisis integrado de las tecnologías, el ciclo de la vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México. México. Disponible desde www.semarnat.gob.mx.
6. Maser Cerutti, O., *et al.* 2005. LA BIOENERGIA EN MEXICO. Un catalizador del desarrollo sustentable. REMBIO. México. 119 p.
7. AIE (Agencia Internacional de Energía). 2006. World Energy Outlook. 9 rue de la Fédération, 75739 París Cedex 15, France. Disponible desde www.iea.org.
8. AIE (Agencia Internacional de Energía). 2007. World Energy Outlook. 9 rue de la Fédération, 75739 París Cedex 15, France. Disponible desde www.iea.org.
9. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2008. Monografías. Disponible desde www.sagarpa.gob.mx.
10. Westby, A. 2002. Cassava Utilization, Storage and Small-scale Processing. CAB Internacional. **Cassava: Biology, Production and Utilization**. University of Greenwich, UK. 281-300.
11. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. 2006. Malanga: Perfil del Producto. Gobierno del Estado de Veracruz. México.
12. Doelle, H. W., *et al.* 1993. *Zymomonas mobilis* – Science and Industrial Application. Critical Reviews in Biotechnology. Australia. Volumen(1): 57-98.
13. BeMiller, J. N., Whistler, R. L. 1996. Carbohydrates. 157-224. En: Fennema, O. R. **Food Chemistry**. Tercera Edición. New York: Marcel Dekker Inc. 191-203.
14. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Elsevier Science*. Volumen(38): 1599-1616. Disponible desde www.sciencedirect.com.

15. Kim, K., Hamdy, M. K. 1985. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 27(3): 316-320. Disponible desde www3.interscience.wiley.com.
16. Zaldivar, J., Roca, C., Le Foll, C., Hahn-Hägerdal, B., Olsson, L. 2005. Ethanol fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Elsevier Science*. 96: 1670-1676. Disponible desde www.sciencedirect.com.
17. Magee, R. J., Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicelluloses. *Adv. Biochem. Eng.* 32: 61-93.
18. Ferrer, J. R., Páez, L. Moreno, A., Chandker, C., Mármol, Z., Sandoval L. 2002. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron.* 19: 23-33.
19. Carrizales, V., Sáenz, D. 1986. Enriquecimiento proteínico del bagacillo de caña mediante cultivo semi-sólido de *Chaetomium cellulolyticum*. *Ac. Cient. Vzlana*. 37: 580-586.
20. Ullal, V., Mutharasan, R., Grossmann, E. 1984. New insights into high solids acid hydrolysis of biomass. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 14: 69-93.
21. Urbaneja, G., Ferrer, J. R., Páez, G., Arenas de Moreno, L., Colina, G., Sandoval, L. 1997. Hidrólisis y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. *Rev. Fac. Agron.* 14: 265-275.
22. Underkofler, L. A., Barton, R. R., Rennert, S. S. 1958. Production of Microbial Enzymes and their Applications. *Microbiological Process Report*. 6: 212-275.
23. Kerr, R. W. 1950. **Chemistry and industry of starch**. Segunda edición. New York: Academic Press, Inc. 472.
24. Myrbäck, K., Neumüller, G. 1950. Amylases and the hydrolysis of starch and glycogen. 653-724. En: Sumner, J. B., Myrbäck, K. **The enzymes**. Primera edición. New York: Academic Press, Inc.
25. Meyer, K. H., Gibbons, G. C. 1951. The present status of starch chemistry. *Advances in Enzymol.* 12: 341-378.
26. Berrnfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzymol.* 12: 379-428.
27. Kunamneni, A., Singh, S. 2005. Response surface of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucosa production. *Biochemical Engineering Journal*. 27: 179-190. Disponible desde www.elsevier.com.
28. Nigam, P., Singh, D. 1995. Enzyme and microbial system involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 770-778.

29. Mera, I., Hoyos, J. L., Carrera, J., Forero, C. L., Velasco, R. 2003. Caracterización enzimática de alfa-amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta*). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1 (1): 83-88.
30. Nellaiah, H., Karunakaran, T. J., Gunasekaran, P. 1988. Etanol Fermentation of Cassava Starch by *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286. *Biomass*. 15: 201-207.
31. Bai, F. W., Anderson, W. A., Moo-Young, M. 2008. Etanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 26: 89-105. Disponible desde www.elsevier.com.
32. Swings, J., De Ley, J. 1977. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. 41 (1): 1-46. Disponible desde mibr.asm.org.
33. Sprenger, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett*. 145 (1): 301-307.
34. McGhee, J. E., Julian, G. S., Detroy, R. W., Bothast, R. J. 1982. Etanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 24: 1155- 1163.
35. Doelle, M. B., Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., Toh H. 1993. *Zymomonas mobilis*-science and industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 13 (1): 57- 98.
36. Pramod, K. B., Margaritis, A., Kirk, L. 1985. Kinetics of etanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis* at varying D-glucose concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 462- 464.
37. Doelle, H. W., Kenedy, L. D., Doelle, M. B. 1991. Scale-up of etanol production from sugar cane using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Letts*. 13: 131.
38. Park, C. S., Baratti, J. 1991. Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng*. 38: 304.
39. Park, C. S., Baratti, J. 1991. Comparison of etanol production by *Zymomonas mobilis* on sugar beet substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 35: 283.
40. DiMarco, A. A., Romano, A. H. 1985. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol*. 49: 151.
41. Jones, C. W., Doelle, H. W. 1991. Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 35: 4-9.
42. Rogers, P. L., Lee, K. J., Lee, J. H., Skotnicki, M. L. 1982. Etanol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 23: 37.
43. Supanwong, K., Ohta, K., Hayashida, S. 1983. Environmental effects of etanol tolerante of *Zymomonas mobilis*. *Microbial Utilization of Renewable Resources*. 3: 122.
44. Timoshin, A. A., Rapoport, A. I., Beker, M. E. 1989. Effect of temperatura on the state of lipids in the external membrane of *Zymomonas mobilis* during growth. *Mikrobiologiya*. 58: 576.

45. DeFranca, F. P., Leite, S. G. F. 1989. Intracellular ethanol and cell viability of *Zymomonas mobilis* during fed-batch alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 43.
46. Jones, R. P., Greenfield, P. F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 4: 210.
47. Belaich, I. P., Senez, J. C. 1965. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 89: 1195.
48. Prasad, S., Singh, A., Joshi, H. C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling.* 50: 1-39.
49. Rajagopal, D., Sexton, S. E., Roland-Host, D., Zilberman, D. 2007. Challenge of biofuel: filling the tank without emptying the stomach?. *Environmental Research Letters.* 2: 30.
50. Naylor, R., Liske, A. J., Burke, M. B., Falcon, W. P., Gaskell, J. C., Rozelle, S. D., Cassman, K. G. 2007. The ripple effect: biofuels, food security, and the environment. *Environment.* 49 (9): 31-43.
51. Kim, S., Dale, B. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomasa Bioenergy.* 26940: 361-375.
52. Instituto de la Vigilancia Mundial. 2006. Biofuels for transportation: global potential and implications for sustainable agriculture and energy in the 21st century. Washington, DC.
53. Yu, S., Tao, J. 2008. Life cycle simulation-based economic and risk assessment of biomass-based fuel ethanol (BFE) projects in different feedstock planning areas. *Energy.* 33: 375-384.
54. Bradbury, J. H., Holloway, W. D. 1988. Chemistry of tropical root crops: Significance for nutrition and agriculture in the Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
55. Cock, J. H. 1985. Cassava, new potential for a neglected crop . *Westview Press.* Disponible desde www.ejbiotechnology.info. Consultado el 03 de Julio del 2009.
56. Neves, M. A., Shimizu, N., Kimura, T., Shiiba, K. 2007. Kinetics of bioethanol production from wheat milling by-products. *Journal of Food Process Engineering.* 30: 338-356.
57. Torres, E. F., Baratti, J. 1988. Ethanol production from wheat flour by *Zymomonas mobilis* . *J. Ferment. Technol.* 66: 167-172.
58. Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. 2002. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572.
59. Davis, L., Rogers, P., Pearce, J., Peiris, P. 2006. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass & Bioenergy.* 30: 809-814.

60. Cazetta, M. L., Celligoi, J. B., Buzato, J. B., Scarmino, I. S. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperatura and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. 98: 2824-2828.
61. Falcao de Morales, J. O., Araújo, J. M., Rios. 1981. Fermentação alcoólica de mosto de melado em escala semi industrial por *Zymomonas mobilis*. *Rev. Instit. Antibiot*. 20: 3-10.
62. Panda, S., Parmanick, M., Ray R. C. 2007. Lactic acid fermentation of sweet potato (*Ipomea batatas*) into pickles. *Journal of Food Processing and Presrvation*. 31: 83-101.
63. Ridley, S. C., Lim, M., Heenan S., Bremen, P. 2005. Evaluation of sweet potato cultivars and heating methods for control of maltose production, viscosity and sensory quality. *Journal of Food Quality*. 28: 191-204.
64. Liu, Q., Weber, E., Currie V., Yada, R. 2003. Physicochemiical properties of starches during potato growth. *Carbohydrate Polymers*. 51: 213-221. Disponible desde www.elsevier.com.
65. Linares, E., R. Bye, D. Rosa-Ramírez y R. Pereda-Miranda. 2008. *El camote*. CONABIO. Biodiversitas. 81: 11-15.