



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR-IPN-MICHOACÁN**



**"OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LAS  
FRUCTANAS PRESENTES EN LAS PENCAS DEL  
AGAVE TEQUILERO"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

P R E S E N T A:

**IBQ. JUAN CARLOS VICTORIA CAMPOS**

DIRECTORES DE TESIS:

**DR. JOSÉ LUIS MONTAÑEZ SOTO**

**M. en C. REBECA FLORES MAGALLÓN**

Jiquilpan, Michoacán, Abril de 2010

**Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Bromatología de Alimentos y en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán (CIIDIR-IPN-MICH), ubicado en la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán.**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich. siendo las 12:00 horas del día 08 del mes de marzo 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 CIIDIR-MICH. para examinar la tesis titulada:

**“ Obtención de *bioetanol* a partir de las *fructanas* presentes en las *pencas* del *agave tequilero*”**

Presentada por el alumno:

**VICTORIA**  
Apellido paterno

**CAMPOS**  
Apellido materno

**JUAN CARLOS**  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	7	1	1	9	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

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

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. José Luis Montañez Soto

M.C. Rebeca Flores Magallón

Dra. Fabiola Gabriela Zuno Floriano

Dr. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dr. José Venegas González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Carlos Víctor Muñoz



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
Instituto Politécnico Nacional  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR - IPN - U-MICH



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich., el día 22 del mes marzo del año 2010, el (la) que suscribe Juan Carlos Victoria Campos alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B071197 adscrito al CIIDIR-Unidad Michoacán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Luis Montañez Soto y M.C. Rebeca Flores Magallón y cede los derechos del trabajo intitulado **“Obtención de bioetanol a partir de las fructanas presentes en las pencas del agave tequilero”** 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 rbk\_fm@hotmail.com; montasoto@yahoo.com.mx, carvic2112@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

JUAN CARLOS VICTORIA CAMPOS

# AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO AL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL (IPN), AL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD MICHOACÁN (CIIDIR-IPN-MICH) Y AL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACION DE INVESTIGADORES (PIFI) DEL PROPIO INSTITUTO, POR LOS APOYOS ECONÓMICOS OTORGADOS CON LOS CUALES FUE POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

GRACIAS A TODOS LOS PROFESORES Y PERSONAL DEL LABORATORIO POR EL APOYO Y LOS CONOCIMIENTOS BRINDADOS DURANTE LA FORMACIÓN DE MI MAESTRIA.

A DIOS POR PERMITIRME LOGRAR OTRA META MÁS EN LA VIDA

A MI FAMILIA POR SU APOYO INCONDICIONAL.

A MIS AMIGOS POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO EN TODO MOMENTO.

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PÁGINA
1	Fuentes de energía renovables	3
2	Fuentes de energía no renovables	4
3	Pronostico del crecimiento mundial de la población	5
4	Emisión mundial de gases de efecto invernadero (2006-2030)	6
5	Origen de la energía primaria producida en México	7
6	Principales materias primas empleadas en la producción de bioetanol	9
7	Ubicación de los cultivos en la producción de biocombustibles	11
8	Fermentación alcohólica	12
9	Diagrama general del proceso de producción industrial de bioetanol	13
10	Estructura de una levadura	18
11	Glucolisis y Fermentación alcohólica	19
12	Morfología de <i>Zymomona mobilis</i>	20
13	Vía metabólica Entner-Doudoroff	21
14	Ciclo de vida de los biocombustibles	23
15	Precio de cultivos agrícolas en el periodo 1996-2017	26
16	Precio de productos ganaderos en el periodo 1996-2017	26
17	Planta de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul	28
18	Cultivo de <i>A. tequilana</i>	29
19	Cosecha del <i>A. tequilana</i>	29
20	Zona comprendida en la Denominación de Origen de Tequila para el cultivo de <i>A. tequilana</i>	32
21	Principales tipos de fructanas	34
22	Cotización de la piña de <i>A. tequilana</i>	35
23	Cultivo de <i>A. tequilana</i> abandonado y quemado	37

24	Curva tipo de fructosa para carbohidratos totales	43
25	Curva tipo de fructosa para determinar ARD y ART	45
26	Representación esquemática de la técnica de vaciado en placa	47
27	Esquema del ebullómetro Dujardin - Salleron	49
28	Acondicionamiento de la materia prima	52
29	Diagrama de flujo en el proceso de extracción de las fructanas de las harinas de las bases de las pencas	54
30	Proceso de extracción de fructanas de las pencas frescas	55
31	Diagrama de flujo del proceso fermentativo	57
32	Efecto de la temperatura y del tiempo de maceración en la extracción de las fructanas presentes en las bases de las hojas de <i>A. tequilana</i>	63
33	Efecto del tiempo de cocción a 100°C en la extracción de las fructanas presentes en las bases de azúcares por <i>Z. mobilis</i> y por <i>S. cerevisiae</i>	64
34	Consumo de azúcares por <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	65
35	Producción de etanol por <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	66
36	Crecimiento celular de <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	68

### INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	PÁGINA
1	Producción mundial de bioetanol en el 2008	10
2	Rendimiento de los cultivos en la producción de biocombustibles	11
3	Cantidad de plantas de <i>A. tequilana</i> por estado y año	36
4	Análisis químico porcentual de las harinas obtenidas a partir de las puntas y las bases de las hojas de <i>A. tequilana</i>	59
5	Parámetros cinéticos óptimos de la fermentación de los azúcares de <i>A. tequilana</i> por <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	69

## ABREVIATURAS

### Descripción

Acido 3,5 dinitrosalicilico	ác.3,5 DNS
Adenosin trifosfato	ATP
Azucares reductores directos	ARD
Azucares reductores totales	ART
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>
Etanol al 100%	E-100
Flexible Fuel Vehicle	FFV
Mezcla etanol gasolina (85% etanol, 15 % gasolina)	E-85
Mezcla etanol gasolina (10 %etanol, 90%gasolina)	E-10
Territorio con Denominación de Origen	TDO



## RESUMEN

El bioetanol es uno de los principales biocombustibles, que en estado puro o mezclado con gasolinas pueden ser usados por vehículos en países como Estados Unidos de América y Brasil. La producción de este biocombustible es a partir de maíz y caña de azúcar respectivamente, sin embargo, la utilización de estas materias primas compromete y encarece la producción de alimentos para el consumo humano y animal, presentan un balance energético poco atractivo e incluso contribuyen deteriorar el ambiente, mediante la deforestación, gasto de agua y erosión del suelo. Una alternativa que permite superar estos problemas sería la utilización de residuos agrícolas como lo son las pencas de *Agave tequilana* Weber.

Los resultados mostraron que las pencas de *A.tequilana* contienen carbohidratos que pueden ser empleados para la producción de bioetanol, siendo la sección de las bases de las pencas las que resultaron con mayor porcentaje ( $57.45 \pm 0.57$  %BS) que las puntas ( $27.27 \pm 0.61$ %BS).

Las condiciones óptimas para la extracción de las fructanas contenidas en las harinas obtenidas a partir de las bases de las hojas del *A. tequilana* fueron: relación sólidos-agua de 1:9, temperatura de 70° C y 30 minutos de tiempo de maceración. Sin embargo es necesario enfatizar que bajo estas condiciones no fue posible la asimilación de azúcares ni la fermentación de los microorganismos etanolgénicos, por lo que se empleó la extracción de fructanas de pencas frescas utilizando calor húmedo mediante es uso de autoclave a una temperatura de 100°C, siendo el tiempo óptimo de extracción de 4hrs alcanzando un porcentaje de 12 % de sólidos solubles y 20% ART.

Los parámetros cinéticos del proceso fermentativo muestran que la bacteria (*Zymomona mobilis* CDBB-B-603), presenta ventajas sobre la levadura (*Saccharomyce cereviciae* CDBB-L-331) como son: mayor rendimiento en la producción de etanol ( $64.5 \pm 1.8$  g/L), mayor eficiencia de conversión de azúcares en etanol ( $92.27 \pm 2.9$ ) mayor productividad volumétrica ( $0.76 \pm 0.01$ ) y una menor inhibición a altas concentraciones de etanol y de azúcares en el medio.

## ABSTRACT

Bioethanol is a leading biofuels, which in pure form or blended with gasoline can be used by vehicles in countries like USA and Brazil. The production of this biofuel is produced from maize and sugar cane respectively, however, the use of these expensive raw materials and will limit the production of food for human consumption and animal, haven't attractive energy balance and even contribute to deteriorate the environment through deforestation, water expenses and soil erosion. An alternative that overcomes these problems would be the use of agricultural residues as are the leaves of *Agave tequilana* Weber.

The results showed that the leaves of *A. tequilana* contain carbohydrates which that can be used for bioethanol production, being the section of the bases of the leaves which was the highest percentage ( $57.45 \pm 0.57$  % BS) than extremes ( $27.27 \pm 0.61$  % BS).

The optimum conditions for extraction of fructans contained in flours obtained from the leaf bases of *A.tequilana* were solid-water ratio of 1:9, temperature 70 °C and 30 minutes soaking time. Nevertheless, we must emphasize that under these conditions was not possible, the assimilation of sugars and fermentation of microorganisms. We employment fructans extraction of fresh leaves using the autoclave at temperature of 100 °C, being the optimal time of 4hrs extraction rate reaching 12% of soluble solids and 20% ART.

The kinetic parameters of the fermentation process showed that the bacteria (*Zymomona mobilis* CDBB-B-603), have advantages over the yeast (*Saccharomyces cereviciae* CDBB-L-331) such as: improved performance in ethanol production ( $64.5 \pm 1.8$  g / L), increased efficiency of conversion of sugars into ethanol ( $92.27 \pm 2.9$ ) increased productivity ratio ( $0.76 \pm 0.01$ ) and less inhibition at high concentrations of ethanol and sugars in the medium.

# CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Energía y Fuentes de obtención	2
1.2 Búsqueda de fuentes alternas de energía renovables	3
1.3 Biocombustibles	7
1.3.1 Clasificación de los biocombustibles	8
1.3.2 Producción mundial de bioetanol	9
1.3.3 Producción nacional de bioetanol	10
1.3.4 Rendimiento de los cultivos en la producción de biocombustibles	11
1.4 Proceso de producción de bioetanol a partir de diversas materias primas	12
1.4.1 Fermentación	12
1.4.2 Producción de bioetanol a partir de caña	14
1.4.3 Producción de bioetanol a partir de maíz	14
1.4.4 Producción de etanol a partir de material lignocelulósico	14
1.4.4.1 Hidrólisis acida de material lignocelulósico	15
1.4.4.2 Hidrólisis enzimática de material lignocelulósico	15
1.5 Desventajas técnicas y ambientales de las diversas materias primas utilizadas para producir bioetanol	16
1.5.1 Caña de azúcar	16
1.5.2 Almidón de maíz	16

1.5.3 Material lignocelulósico	17
1.6 Microorganismos etanolgénicos	17
1.6.1 Levadura <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	17
1.6.2 Bacteria <i>Zymomona mobilis</i>	19
1.6.3 Requerimientos nutrimentales y ambientales de los microorganismos	22
1.7 Importancia del desarrollo de biocombustibles	22
1.8 Biocombustibles y seguridad alimentaria	23
1.9 Agave tequilero	27
1.9.1 Descripción botánica y clasificación	27
1.9.2 Requerimientos de clima y suelo	29
1.9.3 Cosecha y rendimiento	30
1.9.4 Aspectos fisiológicos del cultivo	31
1.9.5 Distribución geográfica	32
1.9.6 Usos del <i>A.tequilana</i>	33
1.9.7 Hidratos de carbono del <i>A. tequilana</i>	33
1.9.8 Panorama económico del <i>A. tequilana</i>	35
1.10 JUSTIFICACIÓN	38
1.11 HIPÓTESIS	38
1.12 OBJETIVO GENERAL	38
1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>2.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
2.1 Materia prima	41
2.2 Reactivos	41
2.3 Equipo	41
2.4 Métodos	41
2.4.1 Métodos generales	42
2.4.2 Métodos específicos	42
2.4.2.1 Determinación de carbohidratos totales	42
2.4.2.2 Determinación de azúcares reductores directos	44
2.4.2.3 Determinación de azúcares reductores totales	46

2.4.2.4 Método recuento en placa(células viables)	46
2.4.2.5 Determinación de sólidos solubles(°Brix)	48
2.4.2.6 Cuantificación de alcohol por el método ebulloscópico	48
2.5 Análisis estadístico de los resultados	50
<b>3.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	51
3.1 Acondicionamiento de materia prima	52
3.2 Análisis químico porcentual de pencas de <i>A. tequilana</i>	53
3.3 Extracción de fructanas a partir de las harinas de las bases de las pencas	53
3.4 Extracción de fructanas a partir de de las bases de las pencas frescas	54
3.5 Proceso fermentativo	55
3.5.1 Microorganismos empleados	55
3.5.2 Preparación del preinoculo	56
3.5.3 Preparación del medio de fermentación	56
3.5.4 Inoculación	56
<b>4.0 RESULTADOS Y DISCUCIÓN</b>	58
4.1 Análisis químico porcentual	59
4.2 Extracción de las fructanas a partir de las harinas de las pencas	59
4.3 Extracción de fructanas a partir de las bases de pencas frescas	63
4.4 Proceso fermentativo	64
4.4.1 Consumo de azúcares	64
4.4.2 Producción de etanol	66
4.4.3 Crecimiento celular	68
<b>5.CONCLUSIONES</b>	72
<b>6.LITERATURA CITADA</b>	73

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Energía y fuentes de obtención

Casi todas las formas de energía que conocemos proceden directa o indirectamente de la energía solar. Los combustibles fósiles o hidrocarburos provienen de la energía transmitida por el sol y del proceso de fotosíntesis cuando se formaron y crecieron las formas vegetales ordinarias, hace millones de años. El uso de energía en la sociedad comenzó desde la prehistoria, cuando el hombre descubrió el fuego para calentarse y cocinar los alimentos, pasando por la Edad Media en la que se construyeron molinos de viento para moler el trigo, hasta la época moderna en la que se puede obtener energía eléctrica por fisión nuclear, el hombre ha buscado incesantemente fuentes de energía para realizar un determinado trabajo u obtener alguna utilidad (Colmenar y Castro, 2010).

Hoy en día, el término energía es comúnmente utilizado como sinónimo de fuerza, vigor o actividad; sin embargo, desde el punto de vista científico, el concepto es distinto. La energía es una propiedad asociada a los objetos y sustancias que se manifiesta en las transformaciones que ocurren en la naturaleza. La energía se manifiesta en los cambios físicos, por ejemplo, al elevar un objeto, transportarlo, deformarlo o calentarlo. La energía está presente también en los cambios químicos, como al quemar un trozo de madera o en la descomposición de agua mediante la corriente eléctrica, la obtención de alimento y su preparación, el funcionamiento de las fábricas, etc. Es por ello que el desarrollo de un pueblo va acompañado por un incremento en el consumo de energía (Biodisol, 2008).

De acuerdo a su disponibilidad en el tiempo, las fuentes de energía se clasifican en renovables y en no renovables. Las fuentes de energía renovable son aquellas fuentes naturales virtualmente inagotables, unas por la inmensa cantidad de energía que contienen, y otras porque son capaces de regenerarse por medios naturales. Entre las primeras tenemos: el Sol que proporciona la energía solar, el viento: que proporciona la energía eólica, los ríos y corrientes de agua dulce mediante los cuales se genera la energía eléctrica, los mares y océanos que nos proveen de energía

maremotriz, el calor de la Tierra que provee la energía geotérmica, las olas del mar que generan energía unimotriz y los biocombustibles (Merino, 2006) (Figura 1).

#### Figura1: Fuentes de energía renovable

Por su parte, las fuentes de energía no renovable son aquellas que se encuentran en la naturaleza en una cantidad limitada y que, una vez consumidas en su totalidad, no pueden sustituirse, ya que no existe una forma de producción o extracción viable, o la producción desde otras fuentes es demasiado pequeña como para resultar útil a corto plazo. Dentro de estas fuentes de energía no renovable tenemos a los combustibles fósiles y a los combustibles nucleares. El carbón, el petróleo y el gas natural, son combustibles fósiles que provienen de restos de seres vivos enterrados hace millones de años, los cuales se transformaron bajo condiciones adecuadas de presión y temperatura. Mientras que, los combustibles nucleares son aquellos elementos químicos capaces de producir energía por fisión nuclear, los más importantes son el uranio y el plutonio. La energía nuclear se utiliza para producir electricidad en las centrales nucleares (A.V.E.N. 2008) (Figura 2).



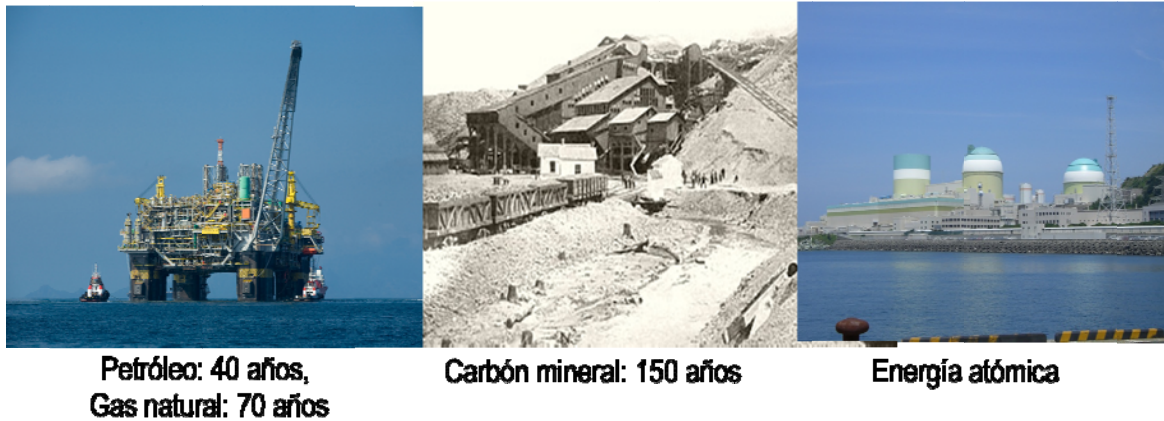


Figura 2: Fuentes de energía no renovables

## 1.2 Búsqueda de fuentes alternas de energía renovable

La búsqueda de fuentes alternas de energía renovable se ve impulsada por los siguientes factores:

**El incremento en el precio del petróleo y derivados:** Como consecuencia del incremento en su demanda y la disminución de las reservas mundiales de este combustible fósil, el precio mundial del petróleo constantemente tenderá a la alza, obedeciendo siempre la ley de oferta y demanda. Entre 2003 y 2008 los precios del petróleo aumentaron cada año, alcanzando su mayor cotización de 147 dólares por barril en julio de 2008, valor que disminuyó posteriormente a 65 dólares por barril en enero de 2010, contribuyendo así a la recuperación económica mundial. Se pronostica que los precios mundiales del petróleo se incrementen nuevamente alcanzando cotizaciones del orden de 110 dólares por barril en el 2015 y de 130 dólares por barril en el 2030 en términos reales (I.E.O. 2009).

**Crecimiento poblacional:** El incremento en la población mundial trae como consecuencia una mayor demanda de alimentos y servicios, lo que origina un aumento en la demanda energética que acelera el agotamiento del petróleo. En la actualidad, la población mundial asciende a 6,700 millones de habitantes y se estima que crecerá a una tasa promedio anualizada del 1% durante los próximos 40 años, lo que significa que para el año 2050 la población mundial será de 9,200 millones de personas (Figura 3). Se puede observar que los países menos desarrollados son los

que tendrán el mayor crecimiento poblacional, mientras que el crecimiento poblacional en los países desarrollados será mínimo (I.E.A. 2009).

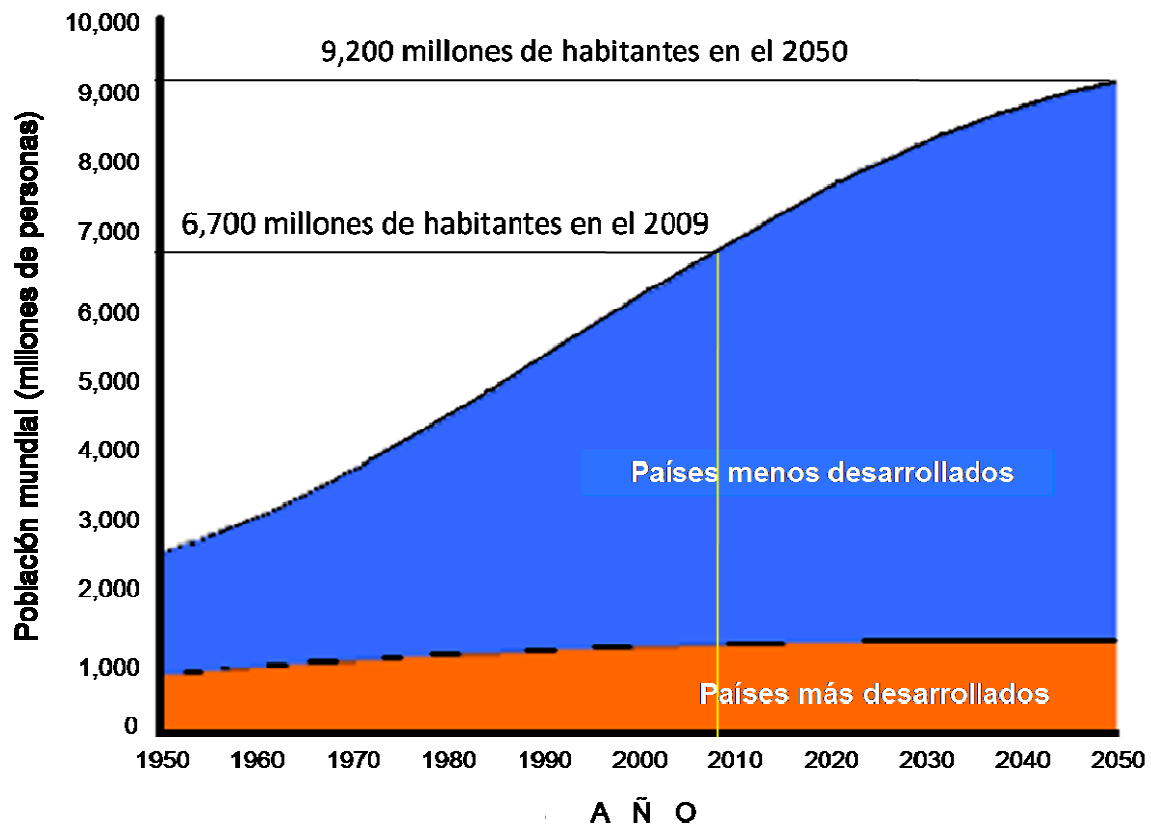


Figura 3: Pronóstico del crecimiento mundial de la población.

**Incremento de las emisiones mundiales de CO<sub>2</sub>.** El uso excesivo de combustibles fósiles genera la acumulación de gases de efecto invernadero, lo que ocasiona un incremento en la contaminación ambiental que trae como consecuencia el cambio climático mundial. Bajo este escenario, se pronostica que habrá una rápida acumulación de gases de efecto invernadero, principalmente emisiones de CO<sub>2</sub>. En el 2006 se proyectaron 29.0 billones de toneladas métricas de CO<sub>2</sub> y se estima que esa cifra se incrementará a 40.4 billones de toneladas métricas para el 2030, lo que implica un incremento del 39% durante el periodo previsto (Figura 4) (I.E.A. 2009).

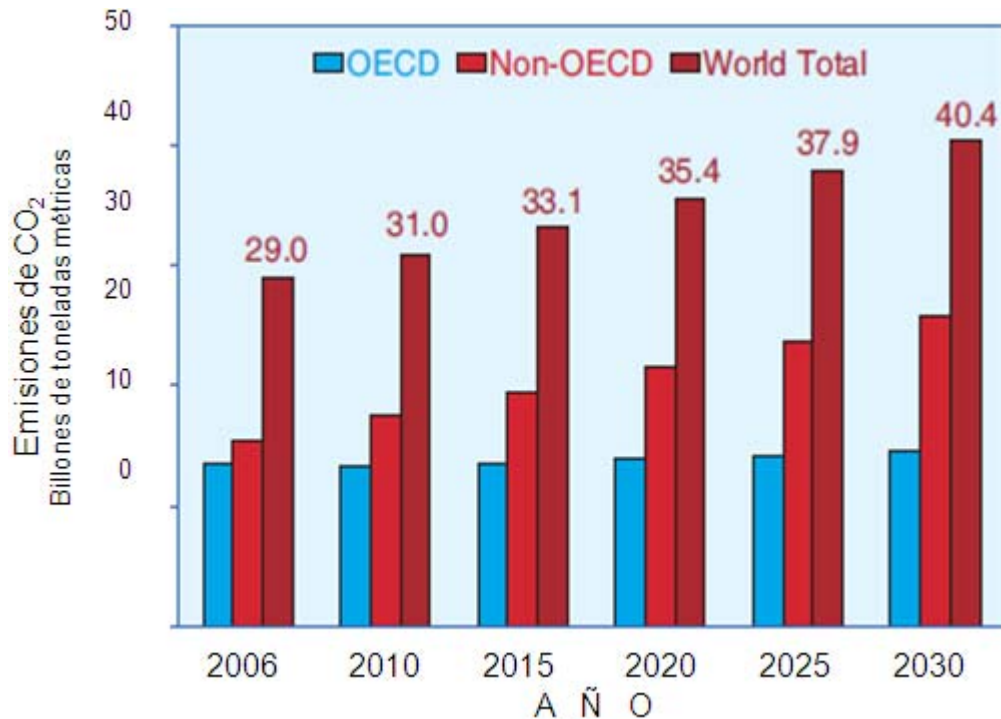


Figura 4: Emisión mundial de gases de efecto invernadero (2006-2030).

La disponibilidad del petróleo como la principal fuente actual de energía no renovable es cada vez menor y ya está dando señales de agotamiento, pues se estima que al ritmo de consumo y crecimiento actual, las reservas probadas de petróleo de los países miembros de la OPEP durarán 80 años, mientras que los demás productores como Rusia, Estados Unidos, China, podrán seguir extrayendo su petróleo sólo durante los próximos 20 años (John, 2007). Por su parte, nuestro país sólo cuenta con reservas probadas de petróleo para los próximos 10 años (Pemex, 2006).

Ante este escenario en el que la obtención de energía a partir de la quema de combustibles fósiles se ha convertido en el centro de un problema de carácter mundial, actualmente la mayoría de los países han adoptado medidas políticas y tecnológicas para emplear energías alternativas, tales como son las energías renovables. Recientemente está cobrando importancia el uso de la biomasa agrícola (materia orgánica que proviene de una fuente renovable y que puede ser convertida en energía) para la producción de biocombustibles. Esta forma de generar energía a

partir de biomasa agrícola, ha sido catalogada como la industria del futuro, dado que la biomasa es una fuente de energía renovable y limpia, y además, contribuye a la conservación del medio ambiente (Avinash, 2007; Torney *et al.*, 2007).

En la figura 5 se muestra la conformación de los diferentes tipos de energía primaria producida en nuestro país. Podemos observar la biomasa proporcionó el 3.2% del total de la energía generada y estuvo integrada por un 72% de leña y el 28% de bagazo de caña (SAGARPA, 2007).

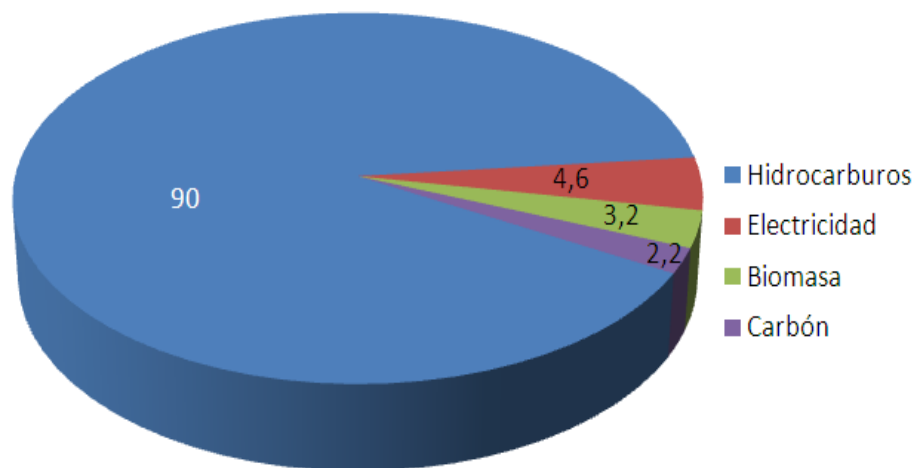


Figura 5: Origen de la energía primaria producida en México

### 1.3 Biocombustibles

El tema de los biocombustibles no es nuevo, antes de la era del petróleo los productos biológicos habían sido la principal fuente de energía. Nicolaus Otto, inventor del motor “Otto” en 1876 utilizó etanol en uno de sus motores, Henry Ford construyó su primer vehículo para el uso de etanol. Muchas de las tecnologías que existen hoy día para la producción de biocombustibles fueron desarrolladas hace tiempo, pero debido a los bajos precios del petróleo, no se tenían las condiciones adecuadas para el desarrollo tecnológico de los biocombustibles (Pfauman, 2007). Sin embargo, las crisis de 1980 y de 1990 a consecuencia de las guerra entre Irán e Irak y

la Guerra del Golfo respectivamente, incrementaron la preocupación por desarrollar combustibles alternativos (Zaldivar *et al.*, 2002; Hogerdal *et al.*, 2007).

El término biocombustible indica a todos aquellos combustibles de origen biológico que son obtenidos a partir de la biomasa agrícola o de restos orgánicos, mediante su procesamiento químico, térmico o biotecnológico de manera renovable. La madera constituye el ejemplo más antiguo de biocombustible renovable utilizado por el hombre (Aburto *et al.*, 2008).

### 1.3.1 Clasificación de los biocombustibles

Existen varios tipos de biocombustibles dentro de los cuales se encuentran:

**Biogás:** es obtenido por la acción de un determinado tipo de bacterias anaerobias sobre residuos biodegradables tales como residuos ganaderos, lodos de las estaciones depuradoras de aguas residuales, residuos biodegradables de instalaciones industriales por ejemplo, de industrias cervecera, azucarera entre otras que generan éste tipo de residuos. (A.V.E.N. 2008).

**Biohidrógeno:** se genera a partir de microorganismos como las algas verdes, bacterias sulfuradas fotoheterótrofas y bacterias *Rhodospirillaceae* (Ectropia, 2004).

**Biodiesel:** se obtiene a partir de aceites vegetales como los aceites de palma, soya, colza, canola, entre otros; o bien, a partir de grasas o aceites animales como el sebo de res; todos ellos pudiendo ser puros o usados (Claridades Agropecuarias, 2007a).

**Bioetanol:** se denomina bioetanol, al alcohol etílico deshidratado al 99.4% de pureza y se produce mediante la fermentación de los azúcares presentes en la caña de azúcar y del maíz, aunque también se puede obtener a partir del sorgo, la yuca, la remolacha entre otros (Figura 6). Este biocombustible puede ser utilizado en motores de ciclo Otto reemplazando parcial o totalmente a los combustibles fósiles como la gasolina (nafta). En varios países el bioetanol se mezcla con gasolina desde un 10%

hasta el 85% y se utiliza en los vehículos denominados FFV (Flexible Fuel Vehicle) o puede utilizarse el bioetanol como combustible único (E-100), pero requiere modificaciones en los motores. Estos vehículos están disponibles en países como Estados Unidos, Brasil o Suecia (Almeida, 2006).



Figura 6: Principales materias primas empleadas en la producción de bioetanol

De todos los biocombustibles, el biodiesel y el bioetanol constituyen los más desarrollados y utilizados a nivel mundial, siendo el bioetanol el biocombustible que presenta mayor potencial para facilitar la transición energética (Mesera, 2006).

### 1.3.2 Producción mundial de bioetanol

El bioetanol representa actualmente más del 90% del suministro mundial de biocombustibles líquidos. Los principales países productores de bioetanol en el mundo son Brasil y Estados Unidos de América, en el primero el bioetanol se produce mediante la fermentación de la sacarosa extraída de la caña de azúcar, mientras que en el segundo se obtiene por hidrólisis y posterior fermentación del almidón de maíz. La producción mundial de bioetanol en el año 2008 superó los 65,000 millones de litros de los cuales, Estados Unidos produjo 33,750 millones, lo que equivale al 51.92% de la producción mundial total, Brasil obtuvo el 37.33%, la Unión Europea el 4.23%, China 2.90% mientras que Canadá 1.37% de la producción mundial. Entre estos países la producción total mundial de bioetanol fue de 97.75%, el restante 2.25% lo produjeron los países que se muestran en la tabla 1 (R.F.A. 2008).

Tabla 1: Producción mundial de bioetanol en el 2008

País	Producción (Millones de litros)	%	País	Producción (Millones de litros)	%
USA	33,750	51.92	Colombia	297	0.46
Brasil	24,270	37.33	India	248	0.38
UE	2,751	4.23	Australia	99	0.15
China	1,882	2.90	Otros	482	0.74
Canadá	891	1.37			
Tailandia	337	0.52	TOTAL	65,007	100.00

Paralelamente se están desarrollando nuevas tecnologías para producir bioetanol a partir de materias primas lignocelulósicas (hierbas, madera, residuos forestales y de cultivos y desechos municipales), que son las que ofrecen en el futuro, un mayor potencial para la producción de bioetanol. Estas son las llamadas tecnologías de segunda generación, que en la actualidad resultan más costosas, pero se pronostica que pronto serán muy competitivas y estarán disponibles (Edward *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Producción nacional de bioetanol

La producción de etanol en México comenzó hace 9 años en los ingenios azucareros de la Gloria y San Nicolás, en Veracruz, sin embargo, por no contar con un marco legal, este biocombustible se canalizaba a la industria farmacéutica. Ahora con la aprobación de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Biocombustibles, el 2 de Febrero de 2008, se abre una gran oportunidad para que la industria azucarera se diversifique produciendo etanol y energía eléctrica (INIFAP, 2008).

En nuestro país se cultivan diversas materias primas que podrían utilizarse para la producción de etanol; entre ellas destacan la caña de azúcar, la remolacha azucarera el sorgo dulce y la yuca. La caña de azúcar es considerada la materia prima más factible debido a la posibilidad de co-ubicar las fabricas de producción de bioetanol con los ingenios azucareros existentes. En la Figura 7 se muestra la ubicación propuesta para las plantas de producción de bioetanol a partir de caña de azúcar así como las zonas productoras de dicha materia prima (SENER-BID-GTZ, 2008).



Figura 7: Ubicación propuesta para las plantas productoras de bioetanol y zonas productoras de caña de azúcar

### 1.3.4 Rendimiento de los cultivos en la producción de biocombustibles

La tabla 2 muestra los rendimientos de diversas materias primas para la producción de biocombustibles, en la que se aprecia que el rendimiento del maíz para la producción de bioetanol es de 0.40 litros de bioetanol por kilogramo de maíz. Por otra parte, la caña tiene el más bajo rendimiento de bioetanol por tonelada (85-90 Litros/ton), pero debido a que presenta el mayor rendimiento agrícola del cultivo (100 ton/ha), la caña de azúcar proporciona el mayor rendimiento en la producción de bioetanol (9000 L /ha x año) (Tabla 2) (Edward *et al.*, 2007; Johannes *et al.*, 2007).

Tabla 2: Rendimiento de los cultivos en la producción de biocombustibles.

CULTIVO	BIODIESEL Litros/ha/año	CULTIVO	BIOETANOL Litros/ha/año
Palma	5500	Caña de azúcar	9000
Cocotero	4200	Remolacha	5000
Higuerilla	2600	Yuca	4500
Aguacate	2460	Sorgo dulce	4400
Jatropha	1559	Maíz	3200
Colza	1100		
Soja	840		



## 1.4 Proceso de producción de bioetanol

### 1.4.1 Fermentación

La fermentación alcohólica, conocida también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica, es un proceso microbiológico anaeróbico, comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan una transformación de los azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, entre otros) o polisacáridos (almidón, celulosa, hemicelulosa) presentes en el medio. Los productos finales obtenidos son: dos moles de etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), dos moles de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas y dos moles de ATP (Adenosin trifosfato) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico; por cada mol de glucosa fermentada (Figura 8) (Madigan *et al.*, 2004).

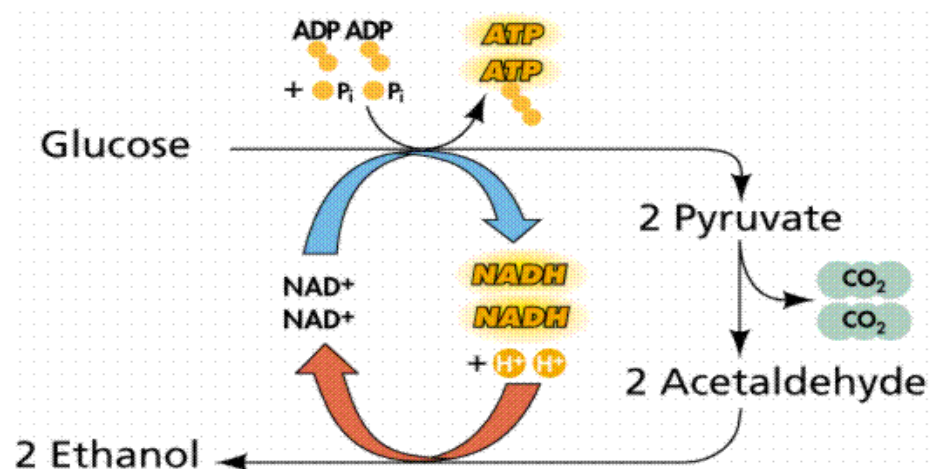


Figura 8: Fermentación alcohólica

Industrialmente el bioetanol es producido por fermentación de los hidratos de carbono presentes en las materias primas utilizadas en el proceso. De acuerdo a su contenido de hidratos de carbono, las materias primas se clasifican en: materias ricas en

sacarosa (caña de azúcar, remolacha y melaza); materias ricas en almidón: como los cereales (maíz, trigo, cebada, sorgo, etc.), tubérculos (yuca, camote, papa etc.); y materias ricas en celulosa como la madera y residuos agrícolas. En la figura 9 se muestra el diagrama general del proceso de obtención industrial de bioetanol a partir de las diversas materias primas utilizadas para tal efecto (AGROBIO, 2007).

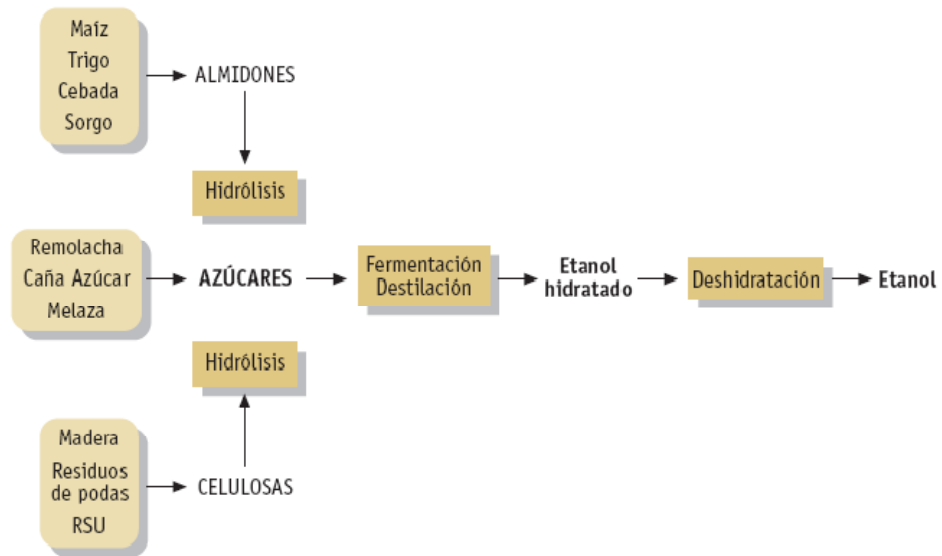


Figura 9: Diagrama general del proceso de producción industrial de bioetanol.

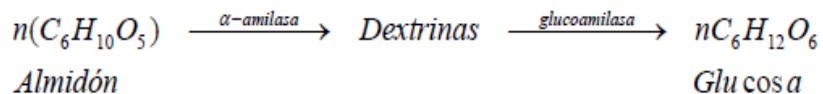
El primer paso en el proceso de obtención de bioetanol consiste en extraer y convertir en azúcares fermentables los hidratos de carbono presentes en las materias primas utilizadas. Posteriormente estos azúcares son fermentados a etanol y bióxido de carbono, mediante el empleo de microorganismos y enzimas específicas. Concluida la fermentación, el caldo ya fermentado se somete a etapas de clarificación para la eliminación de sólidos y finalmente el etanol es separado de la mezcla por destilación; de esta forma se obtiene etanol hidratado que finalmente es deshidratado para obtener el bioetanol con una pureza superior al 99% (García y García, 2006).

#### 1.4.2 Producción de bioetanol a partir de caña

La principal materia prima para la producción de etanol es la caña de azúcar, ya sea en forma de jugo de caña o como melazas, siendo esta última un subproducto de la industria azucarera. Se pueden obtener alrededor de 90 litros de etanol por tonelada de caña y 9 litros de etanol por tonelada de melaza grado C (Moreira y Goldemberg, 1999). El microorganismo más utilizado para este proceso es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por su capacidad de hidrolizar la sacarosa de la caña de azúcar hasta glucosa y fructosa, dos hexosas fácilmente fermentables (Sánchez y Cardona, 2005).

#### 1.4.3 Producción de bioetanol a partir de maíz

Para el proceso de producción de etanol a partir de maíz, es necesario hidrolizar las cadenas de amilosa y amilopectina presentes en el almidón en azúcares apropiados para la fermentación. La hidrólisis se puede resumir en la siguiente ecuación (Cardona *et al.*, 2005):



#### 1.4.4 Proceso producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico

Los materiales lignocelulósicos que más se han utilizado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierbas, frutas, paja, etc.), así como residuos sólidos urbanos (Berg, 2001). La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de

gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables (Oliva, 2003).

#### **1.4.4.1 Hidrólisis ácida de material lignocelulósico**

La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso conocido desde 1819 (Larsson, 2000); consiste en la utilización de ácidos minerales para transformar las cadenas de polisacáridos que conforman la biomasa y (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Entre los principales ácidos inorgánicos utilizados en este proceso se encuentran el ácido sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico; sin embargo, sólo el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico han sido empleados a escala industrial (Galbe y Zacchi, 2002).

#### **1.4.4.2 Hidrólisis enzimática de material lignocelulósico**

La hidrólisis enzimática es un proceso que se lleva a cabo por un grupo de enzimas denominadas genéricamente como enzimas celulasas. La mayoría de las enzimas celulasas comerciales son producidas industrialmente a partir del hongo *Trichoderma reesei*, del cual se obtienen básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas (Lynd *et al.*, 2002). Una vez concluida la hidrólisis enzimática se obtiene una solución de azúcares fermentables constituida principalmente por glucosa y algunas pentosas. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol y bióxido de carbono mediante la acción de microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado hidrolizado (Oliva, 2003).

## **1.5 Desventajas técnicas y ambientales de las diversas materias primas utilizadas para producir bioetanol**

### **1.5.1 Caña de azúcar (CEPAL, 2006):**

- El cultivo de la caña de azúcar requiere alto consumo de agua, razón por la que sólo se siembra en territorios específicos.
- Solo opera en periodo de Zafra; si se requiere producir etanol en meses fuera de este periodo se requiere de mayores costos tanto de inversión como de operación y mantenimiento, relacionados principalmente con el suministro de energía y vapor (gasto doble a los estimados para los días de zafra).
- Deforestación de selvas como en Brasil y erosión del suelo.

### **1.5.2 Almidón de maíz (Webber, 2008):**

- Requiere elevado consumo de energía fósil, para la fabricación de insumos tales como fertilizantes, herbicidas y pesticidas; calor para la fermentación, con frecuencia obtenido de gas natural o carbón, además requiere de gasolina o diesel para la cosecha, producción, almacenamiento y transporte.
- Consume vasta cantidad de agua (4-6 gal agua/gal etanol procesado; arriba de 1000 gal de agua para irrigación/gal etanol).
- Contribuye a la deforestación de selvas y bosques y a la erosión del suelo

### **1.5.3 Material lignocelulósico (Keller, 1996):**

- Se emplea gran cantidad de ácidos concentrados y la recuperación de estos, unido a los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que obliga a altas inversiones en los equipamientos, hace que el proceso no sea rentable.
- Durante el proceso es necesario una etapa costosa de neutralización antes de la fermentación.
- Se requiere altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa
- Alto costo de las enzimas hidrolíticas.

## 1.6 Microorganismos etanolgénicos

A pesar de que varios microorganismos, incluyendo *Clostridium sp.*, han sido considerados como los microbios etanolgénicos, la levadura *Saccharomyce cerevisiae* y la bacteria facultativa *Zymomona mobilis* son los mejores candidatos para la producción de alcohol industrial. Las levaduras *S. cerevisiae* se encuentran entre los microorganismos más utilizados industrialmente en la producción de etanol por fermentación, sin embargo, dadas sus características específicas y su capacidad para producir etanol, actualmente algunas bacterias como *Z. mobilis* están cobrando gran importancia para ser utilizadas en este proceso (Claassen *et al.*, 1999).

### 1.6.1 Levadura *Saccharomyce cerevisiae*

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. Las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que ha sido explotado desde hace muchos años en la producción de pan, vino y otras bebidas alcohólicas. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye la levadura más estudiada. Como microorganismo eucarionte, esta levadura posee un núcleo diferenciado y organelos subcelulares como el retículo endoplasmático y mitocondrias; se encuentran generalmente en forma de células únicas y se reproducen mediante gemación. La pared celular de la levadura incluye membrana citoplasmática, espacio periplasmático y una pared celular rígida, permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza de comprensión y tensión estando constituida principalmente por polisacáridos y una cantidad péptidos (Figura 10) (Costa *et al.*, 1986).

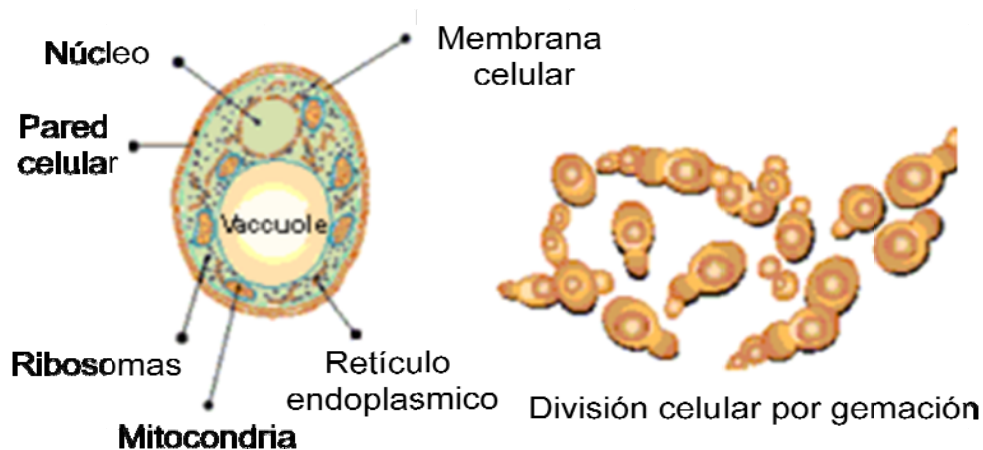


Figura 10: Estructura de una célula de levadura (DeLaval, 2006)

Cuando las levaduras toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof. El término glucólisis viene del griego *glycos*: azúcar y *lysis*: ruptura. Es una secuencia compleja de reacciones que se realizan en el citosol de la célula microbiana. El mecanismo está catalizado por 11 enzimas (González y Raisman, 2004). En la primera fase de la glucólisis, se forma el gliceraldehido 3-fosfato (Figura 11, 1ª fase). En la segunda fase ocurre una reacción de oxido-reducción, se producen enlaces fosfato de alta energía en forma de ATP y se forman 2 moléculas de piruvato (Figura 11, 2ª fase). En la tercera fase se presenta otra reacción de óxido reducción y se forman el etanol y CO<sub>2</sub> (Figura 11, 3ª fase) (Madigan *et al.*, 2004).

En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación. Desde el punto de vista científico, este microorganismo se ha empleado como modelo simple de la célula eucariota, lo cual se debe a su facilidad de cultivo y su velocidad de división celular (aproximadamente dos horas)(González y Valenzuela, 2000).

Figura 11: Glucólisis (1ª y 2ª fase) y Fermentación alcohólica (3ª fase)

### 1.6.2 Bacteria *Zymomonas mobilis*

Entre el grupo de bacterias fermentadoras, la más promisoría es la *Z. mobilis*, aunque actualmente su explotación a nivel industrial es mínima. *Z. mobilis* es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo o diplobacilo (Figura 12), corto y con extremos redondeados, con movilidad mediante flagelos lotróficos, sin cápsula ni esporas, heterótrofo, anaerobio facultativo que durante la evolución se ha especializado para crecer en plantas de savia con alto contenido de azúcares. Este microorganismo se encuentra asociado a levaduras en fuentes naturales como frutos vegetales. Es la principal bacteria tolerante al alto contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en el vino de palma, así como en el jugo de la caña (Viikari, 1988).



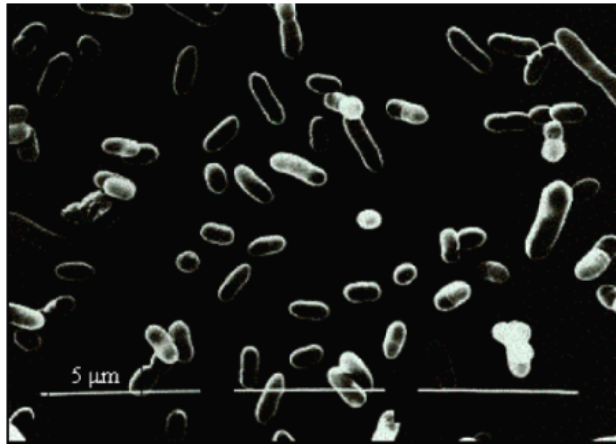


Figura 12: Morfología de *Z. mobilis* (Lima et al., 2002)

*Z. mobilis* fermenta la glucosa, fructosa y sacarosa a etanol y bióxido de carbono por la vía de Entner-Doudoroff (Figura 13). Sus condiciones óptimas de crecimiento son pH de 5.0 y temperatura de 30°C. No produce oxidasa, indol, ni reduce nitratos, no hidroliza la urea ni la gelatina, pero si produce catalasa y ácido sulfhídrico (Kerster y De Ley, 1968).

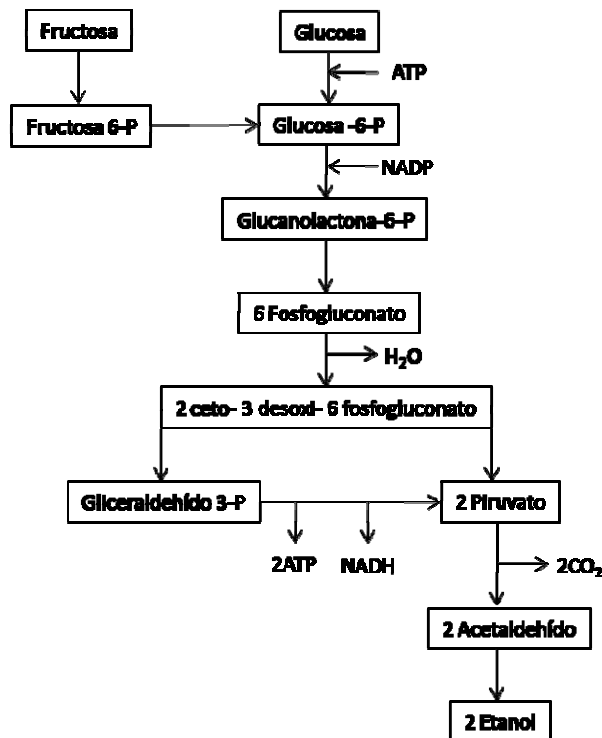


Figura 13: Vía metabólica de Entner-Doudoroff (García y Rivas, 2003)

El sistema de transporte de azúcares en esta bacteria es por difusión facilitada y está acoplado a una alta expresión de los genes de las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasas I y II, enzimas que convierten rápida y eficientemente la glucosa a etanol (Ingram *et al.*, 1989).

Debido al alto rendimiento, productividad y tolerancia al etanol, *Z.mobilis* presenta atractivas ventajas sobre *S. cerevisiae*. Entre sus ventajas se encuentran (Swings y De Ley, 1977; Dien, 2003):

- Convierte la glucosa casi estequiométricamente a etanol y CO<sub>2</sub>, crece más rápidamente que las levaduras y demuestra mayor productividad durante la fermentación continua. En cultivo continuo tolera concentraciones de etanol de 70-80 g/L y más de 120 g/L en cultivo por lote.
- Produce hasta 1.8 mol de etanol y 1.9 moles de bióxido de carbono por mol de glucosa fermentada, lo cual supera al rendimiento de la *S. cerevisiae*, la cual a partir de glucosa sintetiza el 49% a etanol.
- Genera una elevada producción de etanol y una baja producción en biomasa, en comparación con las levaduras.
- Según la composición del medio, *Z.mobilis* es un microorganismo homo o heterofermentador, utiliza una mínima parte del azúcar como fuente de carbono y fermenta el 98%, mientras que sólo emplea el 2% en su crecimiento, pero exclusivamente en anaerobiosis. En aerobiosis genera un mol de etanol por mol de glucosa fermentada.
- Los cultivos de *Z.mobilis* crecen anaeróbicamente, y a diferencia de las levaduras, no requieren la adición controlada de oxígeno para mantener la viabilidad celular en cultivos continuos.
- *Z. mobilis* produce menos subproductos durante la fermentación.
- La manipulación genética de *Z. mobilis* es más simple que para las levaduras, lo cual da la oportunidad de ampliar el espectro de materias primas utilizables tales como celulosa, hemicelulosa y almidón, para la producción de etanol.

### 1.6.3 Requerimientos nutricionales y ambientales de los microorganismos

Los microorganismos necesitan de una serie de condiciones ambientales y elementos nutritivos para su desarrollo, entre los más importantes para las levaduras se encuentran los siguientes (Banwart, 1981; Trevan *et al.*, 1990):

**Nutrientes:** hidratos de carbono que son metabolizados para producir la energía necesaria para las actividades vitales de las células, así como para la producción de etanol y otros metabolitos. También requieren en algunos casos de proteínas, vitaminas y sales minerales.

**pH:** las levaduras en general se desarrollan en un pH óptimo de 4.5 a 6.5, pero algunas otras también sobreviven en un pH mínimo de 1.5 y un máximo de 8.5.

**Temperatura:** en general las levaduras crecen a una temperatura óptima entre 21°C y 32 °C; mientras que la *S.cerevisiae* se desarrolla en un rango óptimo de 20 a 30 °C.

**Oxígeno:** son microorganismos anaeróbicos facultativos, es decir, pueden desarrollarse a bajas concentraciones de oxígeno, o en anaerobiosis total.

Por otro lado, las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria *Z. mobilis* son las siguientes: requiere de azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa, es anaerobio facultativo, pH óptimo de 5 y temperatura óptima de 30° C (Swings y De Ley, 1977).

### 1.7 Importancia del desarrollo de biocombustibles

La importancia del desarrollo de biocombustibles a nivel mundial surge a partir de varias necesidades, principalmente energéticas, ambientales y sociales. En este ámbito, la sustitución de combustibles basados en petróleo por biocombustibles aumentará la seguridad energética, disminuirá la dependencia frente a la volatilidad de los precios del petróleo, además de minimizar los costos de importaciones de combustibles. (Pfauman, 2007).

En el aspecto ambiental el uso de los biocombustibles reducirán la emisión de gases de efecto invernadero, pues el uso de bioetanol como combustible no genera una emisión neta de CO<sub>2</sub> sobre el ambiente, debido a que el CO<sub>2</sub> producido en los motores durante la combustión y durante el proceso de obtención del bioetanol, es nuevamente fijado por la biomasa mediante el proceso de fotosíntesis (Figura 14). Además no contienen azufre, uno de los principales causantes de la lluvia ácida. Por ultimo el desarrollo de biocombustibles beneficiara a la sociedad mediante el desarrollo agrícola | contribuyendo a mejorar los ingresos de los agricultores a través de la creación de diversas fuentes de empleos (Cardona *et al.*, 2005).



Figura 14. Ciclo de vida de los biocombustibles U.S Department of Energy (2007).

## 1.8 Biocombustibles y seguridad alimentaria

Actualmente los biocombustibles se producen a base de cultivos agrícolas que también son utilizados para la alimentación y los piensos, por lo que su producción a gran escala tendría repercusiones directas en la seguridad alimentaria a través de sus efectos del aumento dramático de los precios de los alimentos. La disponibilidad de cultivos alimentarios podría verse amenazada por la producción de cultivos bioenergéticos. En la actualidad se utilizan alrededor de 14 millones de hectáreas de tierra para la producción de biocombustible líquido, que equivalen a cerca del 1% de la tierra cultivable del mundo, proporción que podrá alcanzar del 2.5 % al 3.8 % para 2030 (Claridades Agropecuarias, 2007b).

La utilización del suelo agrícola para cultivar materias primas destinadas a la producción de biocombustibles, en lugar del uso exclusivo de restos agrícolas de otros cultivos, ha traído como consecuencia una competencia entre la producción de alimentos y la de biocombustibles, lo cual ha tenido a su vez repercusiones económicas y en la disponibilidad de alimentos de la sociedad (Claridades Agropecuarias, 2010).

Este efecto de vio reflejado durante el primer trimestre del 2008, cuando los precios nominales internacionales de los principales productos alimentarios alcanzaron los niveles máximos de los últimos 50 años. El precio del maíz se incremento un 35 %, 74% el Arroz, el de la soya aumentó 87% y el del trigo se incrementó hasta un 130%, mientras que las proyecciones futuras indican que probablemente los precios de los alimentos continuarán elevándose durante los próximos años, lo que prevé que afectará los mercados de la mayor parte de los países en desarrollo (FAO Food Outlook, 2007).

Sin embargo, en varios países un gran número de productores de granos prefieren exportar sus cultivos en lugar de abastecer el mercado interno, lo que hace pensar que los consumidores seguirán sufriendo para poder consumir alimentos baratos, e incluso en algunos países no podrán conseguirlos ya ni a precios altos, simplemente

porque se ha registrando una escasez y especulación en su mercado interno. Ejemplo de ello se presento en Argentina, cuando las tiendas no contaban con alimentos para ofrecer a los consumidores, a pesar de ser uno de los productores a nivel mundial de granos y oleaginosas, esto sucedió debido a que las tierras destinadas para alimentos forrajeros comenzó a utilizarse para cultivar materias primas para producir biocombustibles, lo que ocasionó un aumento del 100 y hasta del 200% en el precio en la carne. Otro caso muy comentado es el de Egipto y España donde el pan, producto básico en la dieta de la población, ha escaseado y se comercializa en un precio mayor (Claridades Agropecuarias, 2008).

Otro ejemplo fue lo sucedido en México durante el primer trimestre del 2008, debido a que nuestro país es importador de bienes agrícolas. La consecuencia de ello se reflejó en las compras de trigo del exterior que aumentaron un 136% en valor respecto del año anterior, sumando 543.2 millones de dólares de arroz que le costaron al gobierno (cinco veces más que en 2007). Pese al subsidio oficial a granos, cereales y oleaginosas al final del año el costo de la canasta básica aumentó entre un 40-45% en promedio. El kilogramo de arroz costaba 9 pesos en enero y ahora oscila en 20 pesos en el mismo periodo, mientras que la pieza de pan blanco aumento de 2 a 3 pesos. Los efectos del alza del precio del maíz se vio reflejado en la reducción de las exportaciones de Estados Unidos a nuestro país debido a la mayor demanda interna de maíz para la producción de bioetanol, que pasó de 25 millones de toneladas en el 2003, a 54 millones de toneladas para el 2007. Estos efectos llegaron a una inflación real del país del 6.04% que se tradujo a efectos negativos, especialmente en los mexicanos de bajos recursos, ya que la tortilla de maíz, es la base de su alimentación (Gómez, 2008).

Son muchos los factores que se atribuyen a este fenómeno tales como las malas condiciones climáticas, la baja en los niveles de reserva de combustibles fósiles, el aumento del costo de los combustibles y su efecto directo en los insumos agrícolas y el aumento de la demanda de materias primas para la producción de biocombustibles (Farías, 2008). El aumento del precio de los cultivos y el costo asociado de los

alimentos, conducen a mayores precios de productos ganaderos. Haciendo una comparación de los precios del periodo de 1998-2007 con los precios proyectados para los años 2008-2017. El precio promedio para la carne de bovino y de cerdo aumentará alrededor del 20%, un 30% para el azúcar crudo y refinado, de 40 a 60% para trigo, maíz y leche en polvo descremada, un 60% más alto en la mantequilla y las semillas oleaginosas, y 80% en los aceites vegetales (Figuras 15 y 16) (Agricultural Outlook, 2008).

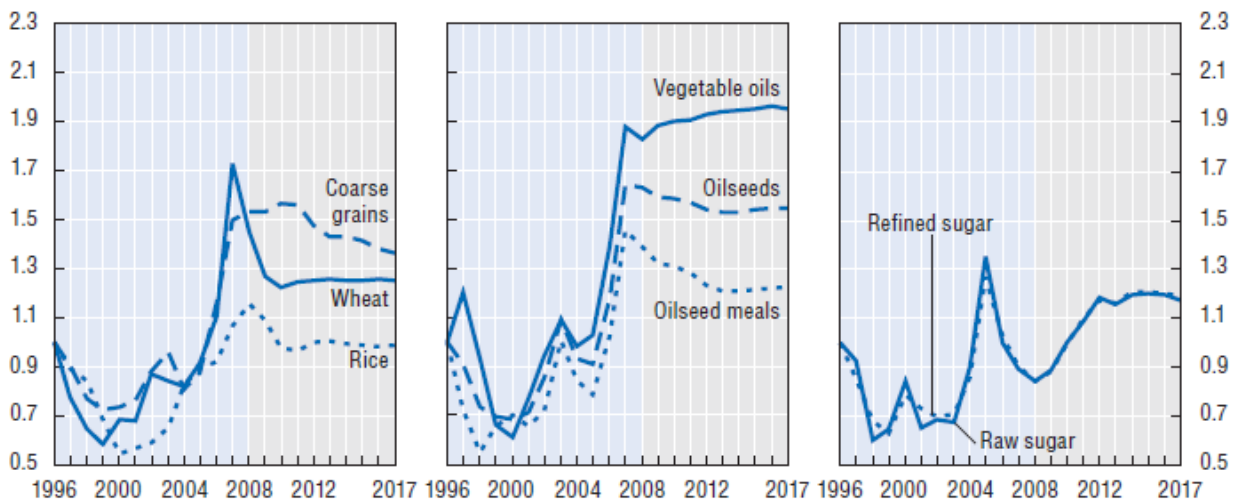


Figura 15: Precio de cultivos agrícolas en el periodo 1996 – 2017 (Agricultural Outlook, 2008)

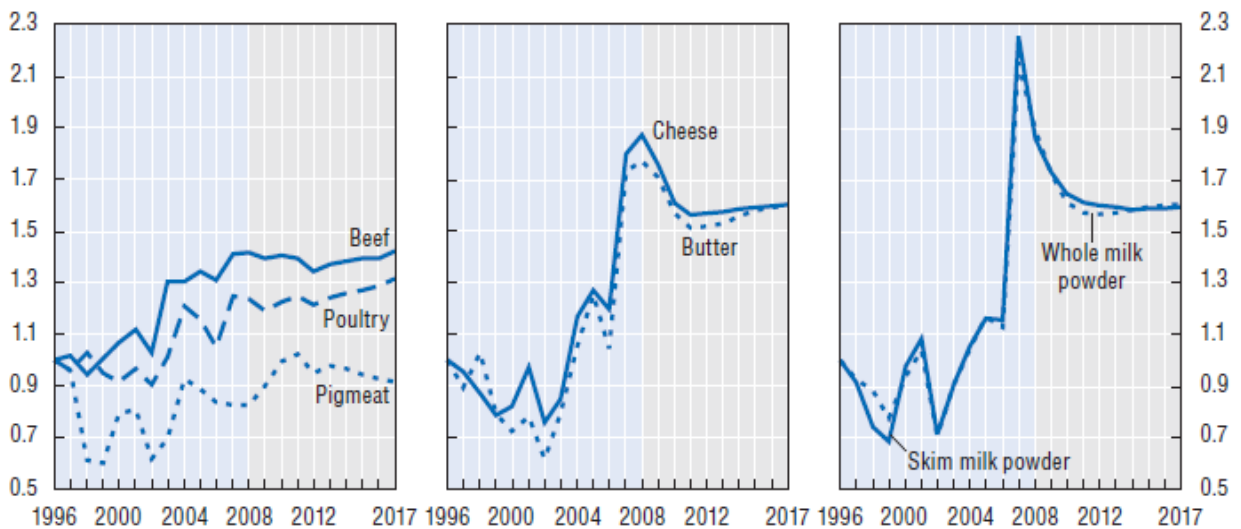


Figura 16: Precio de productos ganaderos en el periodo 1996-2017 (Agricultural Outlook, 2008).

El aumento en los precios de los alimentos está provocando grandes privaciones y sufrimientos para una gran parte de los 800 millones de personas que ya padecen hambre crónica, el encarecimiento de los alimentos puede resultar devastador. A ellos se han unido ya otros muchos millones de personas que ahora no pueden comprar la comida que sus familias necesitan para llevar a cabo una vida sana. No resulta sorprendente que esta situación esté provocando malestar social en todo el mundo en desarrollo. En un futuro inmediato, es probable que los hogares de las ciudades y las zonas rurales, incluidos los hogares rurales más pobres que son de forma dominante compradores netos de alimentos, que dedican una parte importante de sus ingresos a los alimentos, serán quienes más perjudicados resulten (Claridades Agropecuarias, 2009).

Ante este panorama, y aunado al hecho de que nuestro país es deficitario en la producción de granos y oleaginosas, es necesario investigar otros tipos de cultivos para la producción de biocombustibles como el bioetanol, de manera que no se vea afectada la cadena agroalimentaria. Por sus características agronómicas y por su alto contenido de hidratos de carbono, las hojas o pencas del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. azul) convierten a este cultivo en una prometedora materia prima para la producción industrial de bioetanol.

## **1.9 Agave tequilero**

### **1.9.1 Descripción botánica y clasificación**

El agave tequilero forma parte de la familia Agavaceae, que es endémica de América y se distribuye desde el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica e islas del Caribe. Se tiene la certeza de que el origen del agave es México debido a que es aquí donde se encuentra la mayor riqueza y diversidad de agaváceas; pues de las 273 especies que se distribuyen en el continente americano, 205 se encuentran representadas en nuestro país (Gentry, 1982). González (1978) opina que esta planta



contribuyó de manera significativa al desarrollo de la agricultura en América del Norte y afirma que los plantíos de estas especies fueron los inicios de la agricultura de los amerindios, pues las plantas proporcionaban alimento, fibras, bebida, abrigo y productos misceláneos a las tribus cazadoras y recolectoras de Mesoamérica. Kolendo (1996) menciona que después del maíz, el agave representó la planta más importante de la agricultura indígena y que el destilado de esta planta, el tequila, constituyó el primer producto de exportación del occidente de México.

De acuerdo a la clasificación taxonómica realizada por Nobel (1988); la planta de agave tequilero pertenece al reino Plantae, división Antophyta, clase Angiospermas, subclase Monocotiledoneas, orden Liliales, familia *Agavaceae*, genero *Agave*, subgénero *Agave*, grupo *Rigidae*, especie *tequilana* Weber, variedad Azul; de aquí que su nombre botánico sea *Agave tequilana* Weber Azul. Estructuralmente el *A. tequilana*, es una planta que se extiende radialmente de 1.2 a 1.8 metros de altura (Figura 17).



Figura 17: Planta de *Agave tequilana* Weber var. Azul

El tamaño de sus hojas oscila entre los 90 y 120 centímetros, son de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales. Su tallo es grueso, corto, alcanza de 30 a 50 cm de altura al madurar. Sus necesidades de agua son moderadas una vez que está establecida en el campo y requiere de exposición plena al sol. Su reproducción comúnmente se hace por rizomas o hijuelos, ya que el tamaño de éstos proporciona una ganancia importante en tiempo de cultivo con respecto a otras formas de reproducción, que pueden ser por semillas o por bulbillos (Valenzuela, 1997).

### 1.9.2 Requerimientos de clima y suelo

La planta del *A.tequilana* requiere de 7 a 10 años para su desarrollo y sus ciclos de cultivo se ven afectados por las condiciones ambientales, manejo y diferencias genéticas de las plantaciones. Se desarrolla en sitios que no se encuentran expuestos a cambios bruscos de temperatura, con una temperatura media cercana a los 20°C. Las lluvias deben ser de aproximadamente un metro anual, con nublados entre 65 a 100 días por año. La falta de agua provoca que la planta tarde más tiempo en madurar y, por el contrario, el exceso de lluvia reduce el contenido de azúcares. La altitud media es cercana a los 1500 msnm; con variaciones que van de los 700 hasta los 2900 msnm. Los mejores suelos son los arcillosos, permeables, abundantes en elementos derivados del basalto, ricos en hierro (Figura 18) (Morales, 1997).



Figura 18: Cultivo de *A. tequilana*

### 1.9.3 Cosecha y rendimiento del cultivo

El sistema de cultivo del agave depende de la zona y de las condiciones del terreno; puede ser con densidades de población que van de las 3000 a las 4000 plantas por hectárea, lo cual repercute en el desarrollo de la planta individual y en el rendimiento agrícola del cultivo. El agave llega a su madurez en el mejor de los casos a los 7 años después de su plantación, aunque puede llegar a tardar hasta 12 años. Las plantaciones no maduran en forma homogénea, razón por la que se van cosechando las plantas más maduras, ya que son las más adecuadas para la industria. Durante el proceso de madurez se concentran en la cabeza de la planta reservas de humedad y azúcares que están destinadas a la floración. A simple vista, la madurez de la planta se detecta por el henchimiento de la base de las hojas, con amarillamientos y manchas rojizas. Estos cambios de color sólo aparecen en plantas que fueron desquitadas o en plantas enfermas. A la cosecha del agave se le conoce como *jima*, y consiste en cortar la planta desde su base y eliminar sus hojas para dar forma a un cuerpo ovoide conocido como “cabeza o piña” (Figura 19) (Claridades Agropecuarias, 2000).



Figura 19: Cosecha del *A.tequilana*

El periodo de cosecha tarda cuatro años en promedio, generalmente comienza al séptimo año de haberse iniciado la plantación del cultivo. Durante el primer año se extrae entre el 15 al 20% de la plantación en condiciones de madurez, etapa que se conoce como “entresaque”. En el segundo y tercer año se cosecha el 65% de la plantación y durante el cuarto año se cosecha del 15 a 20% restante. A esta última etapa de la cosecha del agave se le conoce como “arrastre” y en ella se cosechan las plantas más viejas y de menor calidad. Las cabezas o piñas del agave alcanzan pesos promedio entre los 30 y los 70 kg., aunque se han obtenido cultivos de agave cuyas cabezas han llegado a pesar entre los 80 y 120 kg., y dentro de estos, cabezas de hasta 150 kg. Obviamente estos altos desarrollos de las cabezas se presentan en cultivos con bajas densidades de población y cuyo cultivo se ha realizado sobre terrenos muy planos, con poco relieve, sin piedras y bien abonados. Durante la década pasada, el rendimiento agrícola del cultivo del agave osciló entre 103 y 153 ton/ha, con un rendimiento medio de 124 ton/ha. Si consideramos en 100 ton/ha el rendimiento agrícola del cultivo; la cosecha total de agave durante los cuatro años serían de 400 ton/ha, que al repartirlas entre los diez años que tarda en promedio el cultivo del agave, nos da un rendimiento promedio de 40 ton/ha/año. Esto sin contar el 50 a 55 % de biomasa constituida por las hojas o pencas que se abandonan en el campo para que se sequen y posteriormente se queman para preparar el terreno para el siguiente ciclo de cultivo (Granados, 1993; Iñiguez *et al.*, 2001).

#### **1.9.4 Aspectos fisiológicos**

El *A. tequilana* es una planta suculenta y presenta metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (por sus siglas en ingles) (Nobel *et al.*, 1998). Este metabolismo se caracteriza por que las estomas se mantienen abiertas durante la noche para absorber bióxido de carbono, en tanto que en el día las estomas permanecen cerradas para evitar la pérdida de humedad. Los agaves, al igual que otras plantas CAM, almacenan el bióxido de carbono que fijan durante el periodo de oscuridad en forma de ácidos orgánicos, por lo cual tienden a incrementar la acidez por las noches (Pimienta *et al.*, 2000)

El metabolismo CAM es un mecanismo de adaptación de las plantas de zonas áridas para facilitar la fotosíntesis y ahorrar agua (Nobel y Hartsock 1976). Por tal motivo las plantas de agave pueden crecer en regiones donde otros cultivos tradicionales anuales no pueden hacerlo. Esta característica proporciona al agave la capacidad de tolerar ambientes extremos debido a que puede tomar dióxido de carbono durante la noche (Gobeille *et al.*, 2006).

### 1.9.5 Distribución geográfica

El metabolismo de estas plantas ha facilitado su adaptación a la sequía de la zona ecológica más extensa del país: la árida y la semiárida, la cual cuenta con una superficie de 84 millones de hectáreas o sea el 45.3% del territorio nacional (Toledo *et al.*, 1989). Sin embargo el *A.tequilana* sólo se cultiva en regiones restringidas comprendidas dentro de la denominación de origen del tequila (TDO). Estos territorios incluyen el estado de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (CRT, 2007) (Figura 20).



Figura 20: Zona comprendida en la Denominación de Origen para el cultivo del *A.tequilana* (CRT, 2008)

### **1.9.6 Usos del *A.tequilana***

El género de Agave tiene una relación milenaria con la historia de México, dado su amplio abanico de aplicaciones, tanto alimentarias como medicinales, religiosas, textiles, construcción y ornamentales (Granados, 1993). Específicamente, las hojas de agave se han usado como alimento para animales (Martínez *et al.*, 2005), como fuente de fibras naturales que usan para tejer costales, tapetes morrales, ceñidores, redes de pesca y cordeles (Ramírez, 1995). Así también se emplean las pencas como fuente de saponinas y otros componentes químicos que tienen aplicaciones en la industria del papel, manufactura, cosméticos, actualmente ha cobrado importancia el uso de la piña del agave como materia prima para la producción industrial de sustancias nutraceuticas como la inulina entre otros (Narváez y Sánchez, 2009).

La parte comercial del agave es la piña, se utiliza como principal materia prima en el proceso de elaboración de tequila. Dicho proceso involucra los siguientes pasos: una vez que las piñas son cortadas, se llevan a un horno donde se realiza la operación de cocimiento para hidrolizar los azúcares complejos en azúcares simples para que puedan ser utilizados por la levadura en la operación de fermentación, posteriormente las piñas son molidas para extraer el jugo que es acondicionado e inoculado con un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* responsable de la fermentación de los azúcares presentes en el jugo para la producción de etanol. Después el fermentado se destila, para obtener etanol (Bautista *et al.*, 2001).

### **1.9.7 Hidratos de carbono del *A. tequilana***

Las fructanas son polímeros de fructosa que constituyen los principales carbohidratos de reserva de las plantas como el agave. Comprende toda una familia de carbohidratos cuyos miembros presentan diferente grado de polimerización, peso molecular, estructura, y por lo tanto, diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales. Todas ellas contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula y se distinguen de acuerdo al tipo de unión entre las unidades de fructosa y

la posición de la molécula de glucosa en la estructura (Susuki y Chatterton, 1996) (Figura 21).

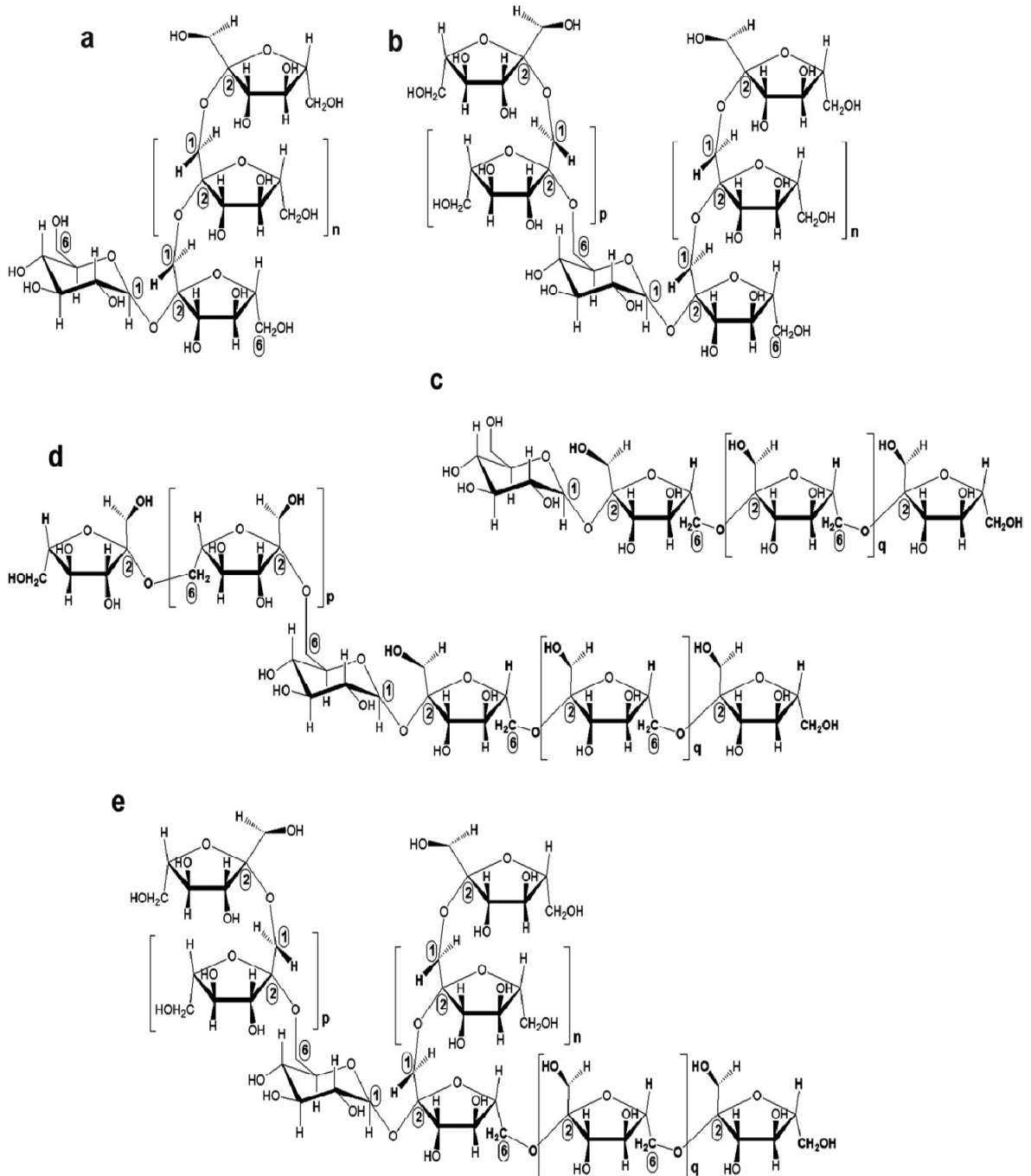


Figura 21. Principales tipos de fructanas: (a) Inulina. (b) Inulina neoserie (c) Levanos (d) levanos neoseries (e) Mezcla de fructanas con uniones ( $\beta$ -(2-1) y  $\beta$ -(2-6)) entre fracciones de la fructosa (Ritsema y Smeekens, 2003).

### 1.9.8 Panorama económico del *A.tequilana*

El precio del agave, al igual que para otros cultivos, se rige por la ley de la oferta y la demanda, de tal manera que cuando hay poco agave, se incrementa su precio y cuando hay excedentes, su precio disminuye y desalienta a los productores a seguir cultivándolo, trayendo como consecuencia una crisis posterior por falta de agave en el mercado y el ciclo se vuelve repetitivo. Por tal motivo la industria tequilera tiene una gran repercusión en la economía nacional y se refleja en que si el precio del agave se desploma, el hecho afecta a la sociedad y surgen problemas políticos, económicos y sociales graves en la región (González, 2000). Este efecto se vio reflejado por el desabasto que se generó principios del año 2000, debido a la reducida producción de agave, y falta de plantas maduras para cubrir las necesidades de la industria, la falta de materia prima generó un incremento en el precio del agave, habiendo pasado de \$ 0.79 a \$14.00 por Kg. lo cual motivó la siembra de agave a gran escala (Claridades Agropecuarias, 2000) (Figura 22).

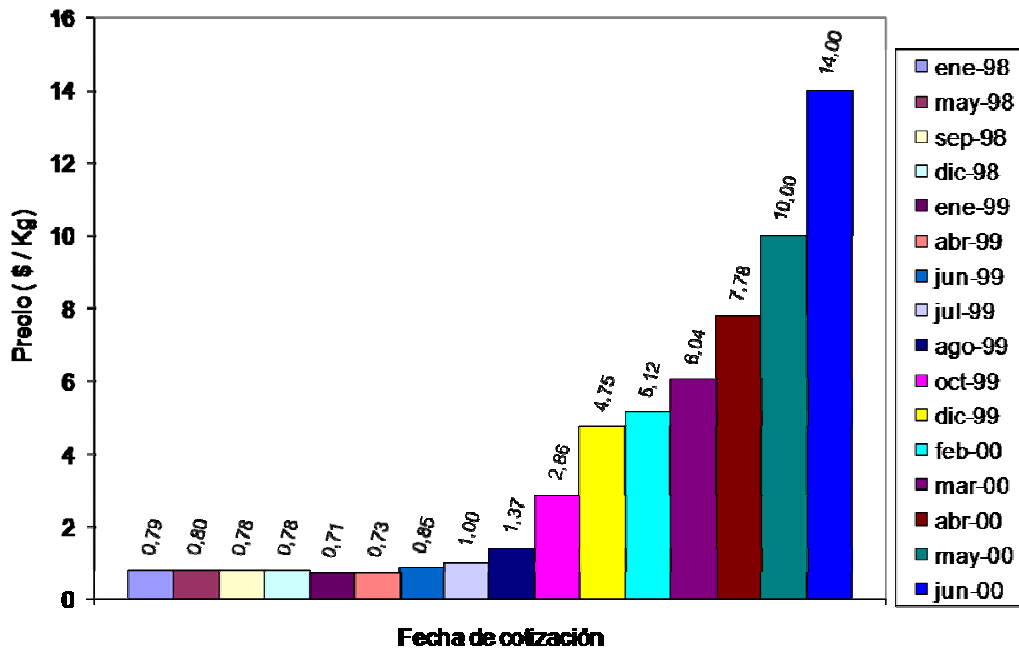


Figura 22: Cotización de la piña de *A.tequilana* de Enero de 1998 a Junio del 2000 (Claridades Agropecuarias, 2000).



Los altos precios de cotización del agave provocaron una siembra de la planta a gran escala, pues en tan sólo tres años, la cantidad de plantas de agave prácticamente se duplicó, pasando de 56 millones en el 2000, a 95.7 millones en el 2002 (Tabla 3). Las consecuencias de esta siembra desmedida de agave ya se han empezado a sentir desde hace tres años, debido a que han provocado una nueva sobreoferta de Agave, con la consecuente baja en el precio de la planta. Actualmente la cotización de la piña de agave oscila alrededor de los \$ 0.60 por kilogramo; prácticamente el mismo precio que imperaba en enero de 1998 (Figura 22).

Tabla 3: Cantidad de plantas de *A. tequilana* por Estado y año (Consejo Regulador del Tequila, 2008).

AÑO	Guanajuato	Jalisco	Michoacán	Nayarit	Tamaulipas	Total
2000	260,474	47,245,371	357,011	7,948,478	240,753	56,052,087
2001	321,734	65,006,162	805,485	4,356,236	588,357	71,077,974
2002	2,120,339	82,312,172	3,087,441	6,000,007	2,200,310	95,720,269
2003	2,483,307	75,689,687	4,751,931	4,930,559	4,000,746	91,856,230
2004	1,701,857	40,199,212	2,669,495	1,480,622	1,123,958	47,175,144
2005	652,226	28,037,508	735,801	3,057,497	0	32,483,032
2006	354,169	18,445,397	90,763	2,480,115	0	21,370,444
2007	11,823,084	430,056,503	15,638,403	34,209.23	12,110.083	503,837,31

Dado que el agave tarda entre 8-10 años en alcanzar su estado de madurez y por lo tanto, en llegar a su edad comercial, las consecuencias de los excedentes de plantaciones de agave que se realizaron durante el periodo del 2000-2005 ya se están dejando sentir y serán perceptibles aún hasta mediados de la siguiente década. Los bajos precios de cotización de la planta obligan a los productores a abandonar los cultivos de agave (Figura 23-A) o bien, a recurrir a su quema (Figura 23-B) para limpiar los campos y prepararlos para cultivar otros productos más rentables como el maíz (Sánchez, 2008). Tan sólo en algunos municipios del estado de Michoacán, se estima que existen 3 mil 500 toneladas de agave maduro que corren el riesgo de

perderse en el campo; y en el próximo año podría haber entre 15 mil y 20 mil toneladas de agave maduro en busca de mercado (Elizalde, 2006).

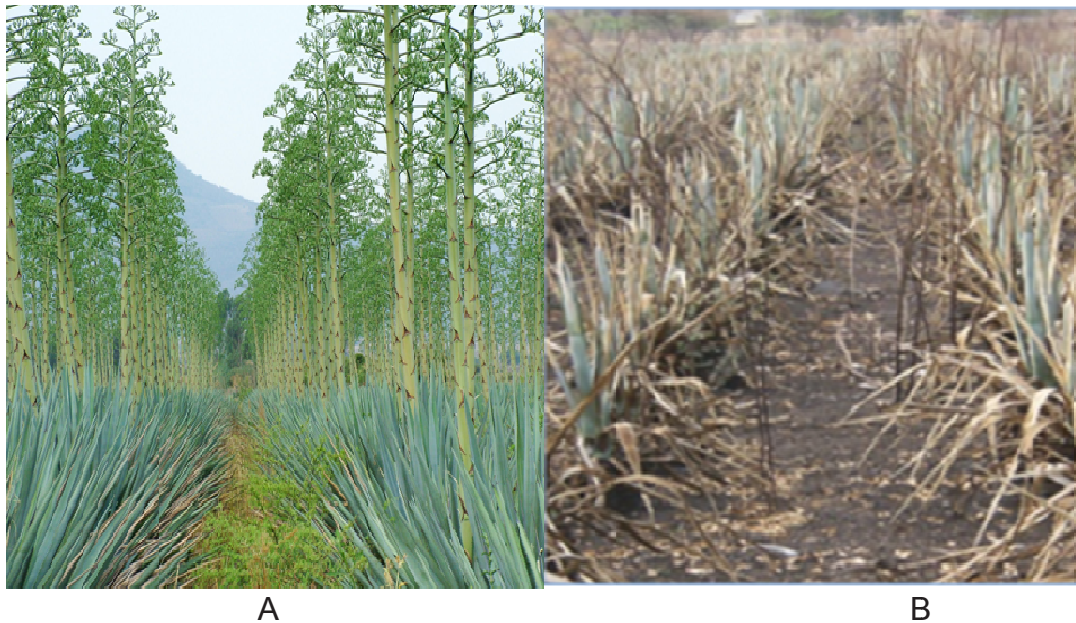


Figura 23: (A)-Cultivo de *A. tequilana* abandonado (Jocotepec Jal). (B)- Cultivo de *A. tequilana* quemado (Jiquilpan Mich).

Se han realizado varios estudios con el objeto de diversificar los usos del cultivo del *A. tequilana*, entre ellos destacan la producción de miel de agave y la obtención de la inulina a partir de la piña del agave. Investigadores del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo señalan que no es viable ni rentable producir miel de agave ni inulina con el agave tequilero, debido a que la idea de comercializar miel de agave e inulina no surge de una necesidad de mercado, sino que surge a partir de un exceso de oferta de materia prima (Flores, 2006).

## **1.10 JUSTIFICACIÓN**

Considerando la importancia económica, social y cultural que tiene el cultivo del *A.tequilana*, el cual se cultiva de manera intensiva en nuestro país, es necesario desarrollar alternativas para el aprovechamiento integral tanto de las cabezas que no son captadas por la industria tequilera, como de las hojas o pencas que constituyen los residuos agrícolas del cultivo. Una de estas alternativas sería la producción de bioetanol como fuente alterna de energía renovable, el cual actualmente se produce a partir de materias primas básicas para nuestra alimentación como lo es el maíz y la caña de azúcar, lo cual, debido al incremento en su demanda, ha derivado en el incremento en los precios de estos productos y en general de los alimentos, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria mundial. Es por ello que el propósito del presente proyecto consistió en desarrollar un proceso biotecnológico para la producción de bioetanol, a partir de los excedentes de piñas y los residuos agrícolas del cultivo del *A.tequilana*, los cuales ascienden a más de un millón de toneladas anuales. De esta forma estaremos produciendo un biocombustible como el bioetanol, a partir de materias primas que no entran en competencia con los alimentos, contribuyendo así a la diversificación de los usos de este cultivo y al mantenimiento de la seguridad alimentaria mundial. Por otro lado, la elaboración eficiente y competitiva de este producto, será un elemento importante en el desarrollo del país, mejorando el desarrollo rural y la calidad ambiental.

## **1.11 HIPÓTESIS**

Las fructanas contenidas en las hojas o pencas del *A.tequilana*, pueden ser utilizadas como fuente de carbono por diversos microorganismos para producir bioetanol.

## **1.12 OBJETIVO GENERAL**

Aprovechar las fructanas presentes en las hojas o pencas del *A. tequilana* para producir bioetanol.

### 1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición química proximal de las pencas del *A. tequilana*
- Determinar las condiciones óptimas de extracción de las fructanas contenidas en las hojas del *A. tequilana*.
- Formular un medio de cultivo para *S. cerevisiae* y otro para *Z. mobilis*, empleando las fructanas del agave como fuente de carbono.
- Determinar las condiciones óptimas del proceso de fermentación de cada uno de los microorganismos etanolgénicos utilizados.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Materia prima

20 plantas de *A.tequilana* de 8 años de edad fueron recolectadas de un cultivo de aproximadamente 1 hectárea, localizado en el municipio de Venustiano Carranza, Michoacán.

## 2.2 Reactivos

- D (-)Fructosa(Catálogo F0127,Sigma-USA)
- Acido 3,5 dinitro-salicílico(Catálogo D-0550,Sigma-USA)
- Todos los demás reactivos fueron grado analítico.

## 2.3 Equipo

- Balanza Analítica (Mettler H80,USA)
- Balanza granataria (Brainweight™ B500, USA)
- Baño María (Cole Parmer Instrument CO., USA)
- Centrífuga (Damon/IEC Division, USA)
- Equipo de digestión Kjeldahl (Labcon, USA)
- Equipo Soxhlet
- Espectrofotómetro de luz UV-Visible (Perkin Elmer, Lambda 2; Alemania)
- Estufa de vacío (Blue M, USA)
- Molino de Martillos(Thomas-Wiley,USA)
- Mufla (Thermolyne 1500 Fumare, USA)
- Potenciómetro(Condustronic pH20, México)
- Refractómetro manual, 0-32% brix, (American Optical Co.,USA)
- Incubadora
- Contador de colonias
- Refrigerador
- Ebulómetro (Dujardin-Salleron<sup>R</sup>. Laboratories, Paris, no. 08085)
- Secador de charolas (MAPISA, México).

## **2.4 Métodos**

### **2.4.1 Métodos Generales**

- A. Determinación de Humedad: Método 14.003(AOAC, 1995).
- B. Determinación de Cenizas: Método 14.006(AOAC, 1995).
- C. Determinación de Grasas: Método 7.062(AOAC, 1995).
- D. Determinación de Proteína: Método 42.014(AOAC,1995)
- E. Determinación de Fibra Cruda: Método de Van de Kamer, (1952).
- F. Determinación de pH: Método potenciométrico

### **2.4.2 Métodos Específicos**

#### **2.4.2.1 Determinación de carbohidratos totales**

Los carbohidratos totales se determinaron de acuerdo al método del fenol-sulfúrico (Dubois, 1956). Este método se basa en que los azúcares se deshidratan con el ácido sulfúrico concentrado, formando furfurales o alguno de sus derivados, los cuales a su vez se condensan con los fenoles presentes en la mezcla de reacción, dando origen a la formación de compuestos de coloración amarillo naranja, cuya intensidad de color es medida en un espectrofotómetro a 490 nm y es proporcional a la concentración de azúcares presentes en la muestra.

#### **Desarrollo:**

Se preparara una solución estándar de fructosa a una concentración de 100 µg/mL. En una serie de tubos numerados del 1 al 6, se adicionan 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL de la solución estándar de fructosa, respectivamente. A cada uno de los tubos se le adiciona la cantidad de agua destilada necesaria para llevar a un volumen total de 1.0 mL. La gradilla con los tubos se coloca en un recipiente con hielo y a cada uno de los tubos se le añade 1.0 mL de solución de fenol al 5% e inmediatamente después, también se adicionan 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, teniendo la precaución de que el ácido deslice por las paredes del tubo. La mezcla de reacción se homogeneiza y los tubos se mantienen en reposo durante 10 minutos con objeto de que la reacción se

verifique. Transcurrido este tiempo, el color desarrollado es leído en un espectrofotómetro de luz UV-Visible (Perkin Elmer, Lambda 2; Alemania) a 490 nm.. Dado que la curva tipo se hace por triplicado, se obtienen los valores de absorbancia promedio para cada concentración de fructosa y se hace la representación gráfica de la absorbancia contra la concentración de fructosa ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 24). Finalmente se determina la ecuación y el coeficiente de determinación por el método de mínimos cuadrados.

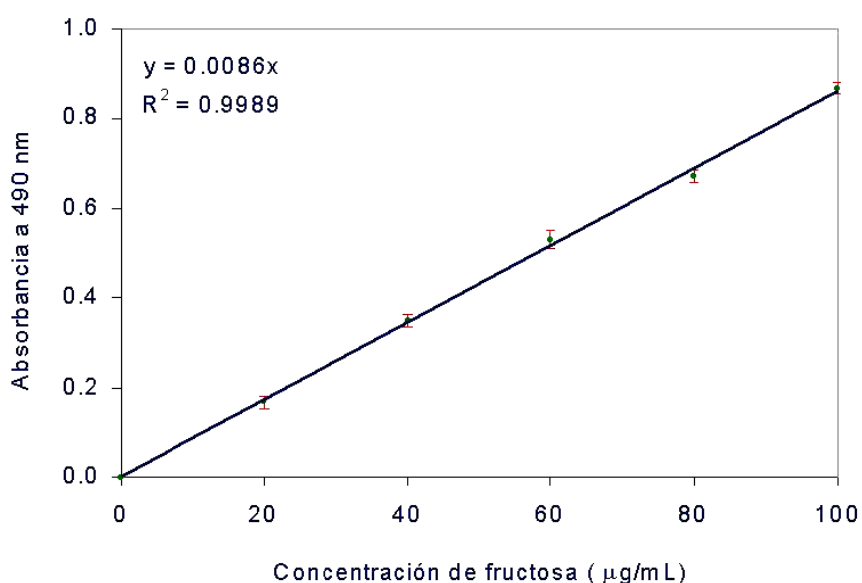


Figura 24: Curva tipo de fructosa para carbohidratos totales (Dubois, 1956)

Para determinar el contenido de carbohidratos totales en una muestra problema, en un tubo de ensaye se pesan directamente de 5 a 10 mg de muestra (dependiendo del contenido de azúcares presentes en la muestra), se añade 1 mL de agua destilada y se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente para la curva tipo de fructosa. El contenido de azúcares totales presentes en la muestra se determina interpolando la absorbancia del tubo problema en la curva tipo de fructosa.



#### **2.4.2.2. Determinación de azúcares reductores directos**

Los azúcares reductores presentes en una muestra pueden ser de dos tipos, aquellos que se encuentran en estado “libre” en forma de monosacáridos y, aquellos que forman parte de carbohidratos más complejos como son los oligosacáridos y los polisacáridos. Los primeros se cuantifican directamente en las muestras que los contienen; es decir, no se requiere hidrolizar previamente las muestras para su cuantificación, de aquí que estos azúcares sean conocidos como azúcares reductores directos (ARD). Todos los azúcares reductores presentan un grupo aldehído o cetona libre, los cuales actúan como agentes reductores frente a reactivos oxidantes como el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Como producto de la reacción entre los azúcares reductores presentes en la mezcla de reacción y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, se forma un compuesto de color rojo marrón, (ácido 3-amino-5-nitro salicílico), el cual presenta su máxima absorbancia a 575 nm y es estable por dos horas. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes en la mezcla de reacción (Miller, 1959).

#### **Desarrollo:**

**Curva tipo de fructosa:** Se prepara una solución patrón de fructosa a una concentración de 1000 µg/mL. En una serie de tubos numerados del 1 al 8, se adicionan 0.0, 0.05, 0.10, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL de la solución patrón de fructosa, respectivamente. Se agrega a cada tubo la cantidad de agua necesaria para llevar a un volumen de 1.0 mL la mezcla de reacción. Posteriormente se adiciona 1.0 mL de ácido 3,5-DNS a cada uno de los tubos y se agitan vigorosamente para homogeneizar la mezcla de reacción. Enseguida los tubos se colocan en un baño maría a ebullición durante 5 minutos con objeto de desarrollar color e inmediatamente después se enfrían a chorro de agua y se adicionan 4 mL de agua destilada a cada uno de ellos. Se homogeniza la mezcla de reacción y el color desarrollado es leído en el espectrofotómetro de luz UV-Visible (Perkin Elmer, Lambda 2; Alemania) a 575 nm. Dado que la curva tipo se hace por triplicado, para cada concentración de fructosa se obtiene el valor de absorbancia promedio y se hace la representación gráfica de

absorbancia contra concentración de fructosa y se determina la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (Figura 25).

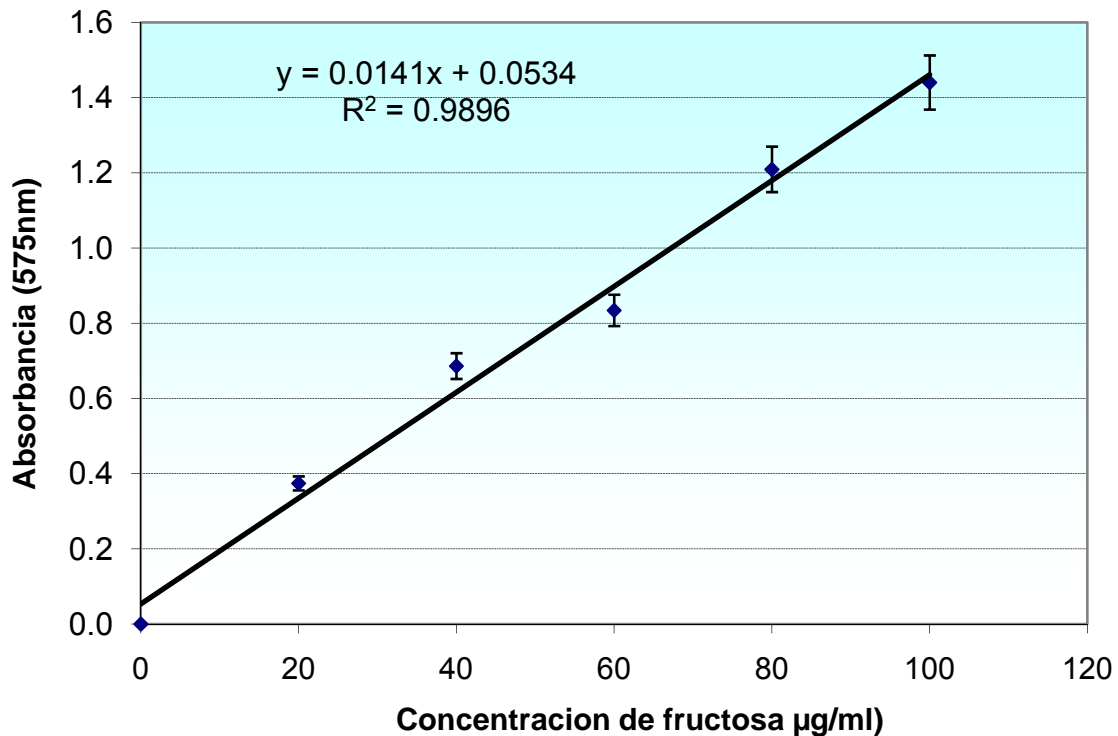


Figura 25: Curva tipo de fructosa para determinar ARD y ART (Miller, 1959)

Para determinar los ARD en una muestra problema, en un tubo de ensaye se pesan de 50 a 100 mg de muestra (dependiendo de su contenido de azúcares reductores), se añade 1 mL de agua destilada y se sigue el mismo procedimiento descrito para la curva tipo de fructosa. El contenido de azúcares reductores directos se determina interpolando la absorbancia del tubo problema en la curva tipo de fructosa o bien, utilizando la ecuación de la recta obtenida.

### **2.4.2.3 Determinación de azúcares reductores totales (ART)**

Su cuantificación se realiza de igual forma que para los azúcares reductores directos, sólo que en este caso, la muestra es sometida a una hidrólisis previa con HCl 2N y a una temperatura de 70°C con objeto de liberar los azúcares reductores que constituyen los oligoscáridos y los polisacáridos. Después de la hidrólisis las muestras son neutralizadas con NaOH 2N y llevadas a un volumen determinado con agua destilada y finalmente, los azúcares reductores totales son cuantificados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959).

### **2.4.2.4 Método recuento en placa(células viables)**

Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia. Este método se basa en la hipótesis de que las células microbianas que contiene una muestra mezclada con un medio de agar, forman, colonias visibles y separadas. Para ello se mezclan diluciones decimales de la muestra a analizar previamente homogeneizada. Después de incubar las placas a 30°C durante 24 hrs, se calcula el número de colonias por gramo o por mL de la muestra, basándose en el número de colonias que aparecen en las cajas petri elegidas con diluciones que den resultados significativos (FAO,1981).

#### **Desarrollo:**

- a) *Preparación de diluciones:* La muestra de jugo de agave fermentada (muestra madre) se homogeneiza y se realizan las respectivas diluciones. Se toma 1 mL de esta con una pipeta y se vierte a un tubo que contiene 9 mL de solución reguladora de peptona (diluyente) y se agita cuidadosamente (dilución 1). Con la misma pipeta, se toma 1 mL de la primera dilución y se adiciona en el tubo de la segunda dilución, que contiene 9 mL de diluyente, se mezcla ésta con una pipeta nueva y se repite la operación con un tercero, cuarto o más tubos hasta hacer el número requerido de diluciones.

- b) *Versión en placa:* Con la misma pipeta usada en las diluciones se adiciona 1 mL de las muestras diluidas en cada una de las cajas petri debidamente identificadas y duplicadas. Después se agrega, en cada caja petri, aproximadamente 15 mL del agar correspondiente para el cómputo de microorganismos (agar YPG para la *Z.mobilis* y agar YM para la *S.cereviciae*), este agar se mantiene previamente en baño de agua a  $45 \pm 1$  °C. La muestra diluida con el agar se mezcla bien y uniformemente, y se deja solidificar.
- c) Incubación: Las cajas petri preparadas se incuban invertidas durante 24 horas a una temperatura de 30°C.
- d) Cómputo de colonias: después de la incubación se cuentan todas las colonias de las cajas petri que contienen entre 30-300 colonias y se anotan los resultados por cada dilución contada (Figura 26).

Figura 26: Representación esquemática de la técnica de vaciado en placa.

#### **2.4.2.4 Determinación de sólidos solubles (°Brix).**

El contenido de sólidos solubles expresado en °Brix en las muestras, se determinó haciendo uso de un Refractómetro manual con escala de 0 – 32°Brix (American Optical Co. USA) y a una temperatura de 25°C. El refractómetro fue ajustado previamente a 0°Brix con agua destilada, desionizada y atemperada a 25°C. Posteriormente la muestra ya atemperada a 25°C fue colocada en la cámara del refractómetro y de esta forma se determinó su contenido de sólidos solubles (°Brix). Se hicieron tres determinaciones en cada muestra y los resultados que se presentan corresponden a la media aritmética de dichos valores.

#### **2.4.2.5 Cuantificación de alcohol por el método ebulloscópico**

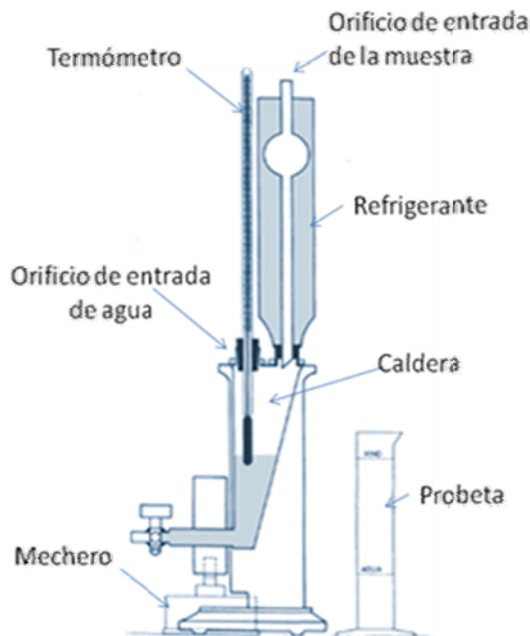
El método ebulloscópico se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol. En condiciones normales (760 mm Hg/cm<sup>2</sup>) el punto de ebullición del agua es 100° C y el del alcohol 78.5° C. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga y viceversa. Por lo tanto es lógico que se pueda llegar a fijar la composición alcohólica de una mezcla atendiendo a las relaciones que podamos establecer entre el porcentaje de alcohol y la temperatura de ebullición (García *et al.*, 1990).

#### **Desarrollo:**

- a) Se lava el equipo (Ebullómetro: N°08085. Laboratories Dujardin-Salleron, Francia) con agua destilada.
- b) Se determina el punto de ebullición del agua. Para ello se adicionan 15 ml de agua medidos con la probeta incluida en el equipo y se vierte en el orificio de la entrada de agua. Se inserta el termómetro en dicho orificio y se enciende el mechero de alcohol y se posiciona este como se muestra la Figura 27-A. Se observa la marcha ascendente de la columna de mercurio del termómetro, una

vez que ésta permanece constante, se anota la temperatura de ebullición del agua ( $T_1$ ).

- c) En el disco graduado de cálculo (Figura 27-B) que acompaña al aparato se hace coincidir la parte central móvil hasta que la cifra de la temperatura de ebullición del agua coincida con el cero del grado alcohólico y se fija la escala que queda así preparada para las determinaciones de las muestras alcohólicas mientras se mantenga constante la presión atmosférica.
- d) Se vacía la caldera, se lava con algunas porciones de la muestra fermentada a analizar, se deja escurrir bien y se pone en ella unos 50 ml de muestra que se vierte en el orificio de entrada correspondiente. Se procede como antes, pero trabajando ahora con el refrigerante lleno de agua y el bulbo del termómetro dentro del líquido. Cuando se estabiliza la temperatura del termómetro se obtiene la temperatura  $T_2$  y se lee en la escala exterior del disco graduado (Figura 27-B), los grados alcohólicos de la muestra que coincide con el punto de ebullición de la muestra.



**A**



**B**

Figura 27:(A) Esquema del ebullómetro Dujardin -Salleron (B) Foto del ebullómetro en la que se observa el disco graduado para el cálculo del porcentaje de alcohol.

## 2.5 Análisis estadístico de los resultados

Los datos reportados para los análisis químicos proximales se analizaron aplicando la estadística básica, que consiste en la determinación de la media aritmética y desviación estándar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los datos correspondientes a la extracción de fructanas y al proceso fermentativo se organizaron en un arreglo factorial con distribución completamente al azar. Para el primer proceso se evaluó la variable de respuesta (%ART) con dos variables independientes: el tiempo (10, 20, 30, 60, 70, 80, 90 min) y la temperatura de maceración (30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 °C). Así el diseño de tratamiento consta de 49 combinaciones, formadas al combinar los 7 tiempos con las 7 diversas temperaturas.

El proceso fermentativo se organizó aplicando un diseño completamente al azar para cada microorganismo (*S.cereviciae* y *Z.mobilis*), se probaron las variables independientes: 4 concentraciones de azúcar (10, 15, 20, 25 % de ART) y 10 tiempos de fermentación (12, 14, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 horas). Como variable de respuesta se midió la concentración de etanol producido, así como el contenido de ART residuales y la concentración de microorganismos.

A los datos derivados del experimento se les practicó un análisis de varianza utilizando el software Statgraphics plus versión 5.1. Copyright 1994-2001 por Statistical Graphics Corp.

## **3. DESARROLLO EXPERIMENTAL**



### 3.1 Acondicionamiento de la materia prima

De un cultivo de *Agave tequilana* Weber Azul de 8 años de edad localizado en el municipio de Venustiano Carranza, Mich., se eligieron 20 plantas de agave en forma aleatoria. Sus hojas fueron cortadas y acondicionadas de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura 28.

Figura 28. Acondicionamiento de la materia prima

Las hojas o pencas de dichas plantas fueron separadas y cortadas por su mitad longitudinal, obteniéndose así dos fracciones: las bases y las puntas. Las bases corresponden a la porción de la hoja que va unida al tallo (cabeza o piña) de la planta. Después se redujo el tamaño tanto de las bases como de las puntas de hoja en trozos de 5 cm de largo aproximadamente y determinado el peso de cada fracción. Una vez troceadas y pesadas tanto las bases como las puntas de hojas fueron deshidratadas en un secador de charolas a una temperatura de 60°C. Concluido el proceso de secado, se determinó nuevamente el peso de cada fracción y se estimó su contenido de humedad. Inmediatamente después las fracciones ya deshidratadas fueron molidas en un molino de martillos. El material obtenido fue tamizado a través de una

malla N°60 (250 micras de tamaño de abertura) y las harinas obtenidas se envasaron en recipientes de vidrio con tapa hermética, se identificaron y almacenaron en un lugar fresco y seco para su posterior utilización (Figura 27).

### **3.2 Análisis Químico Proximal de pencas de *A.tequilana***

Se realizó el análisis químico proximal tanto de las bases como de las puntas de las hojas del *A.tequilana*. Dichos análisis incluyeron la determinación de humedad, cenizas, proteína, grasa, fibra cruda y carbohidratos totales; de acuerdo a la metodología descrita por la A.O.A.C. (1995).

### **3.3 Extracción de fructanas a partir de las harinas de las bases de las pencas**

La extracción de las fructanas contenidas en las diferentes fracciones de las pencas de agave se basó en su solubilidad en agua caliente. Previamente se determinó la relación sólidos agua a utilizar en el proceso de extracción para lo cual, inicialmente la maceración de las harinas se realizó ensayando tres diferentes relaciones sólidos-agua que fueron: 1:3, 1:6 y 1:9. Desde el punto de vista de capacidad de hidratación, facilidad de agitación y manejo de la dispersión, el proceso de maceración de las diferentes harinas resultó más conveniente cuando éste se lleva a cabo utilizando una relación sólidos-agua de 1:6, ya que por abajo de esta relación, la cantidad de agua es insuficiente para la hidratación de los sólidos, mientras que por arriba de la misma, se producen dispersiones muy diluidas que denotan el exceso de agua que afectaría posteriormente en la etapa de concentración de los extractos. Una vez conocida la relación sólidos-agua que resulta más adecuada para la maceración de las harinas, en el proceso de extracción de las fructanas se ensayaron diversos tiempos (10, 20, 30, 60, 70, 80, 90 min) y temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 °C) de maceración. Los carbohidratos extraídos fueron cuantificados como azúcares reductores totales (Miller, 1959) y bajo este esquema, se determinó la temperatura y el tiempo de maceración óptimos, así como los ciclos necesarios para extraer los azúcares reductores totales contenidos en cada fracción (Figura 29).

Figura 29: Diagrama de flujo en el proceso de extracción de las fructanas

### **3.3 Extracción de las fructanas a partir de las bases de las pencas frescas**

La extracción de las fructanas presentes en las hojas frescas del agave se basó en el siguiente procedimiento (Figura 30). Las bases de las hojas del agave fueron lavadas, troceadas, pesadas y cocidas en autoclave a una temperatura de 100°C y a diferentes tiempos de cocción (1, 2, 3, 4 y 6 hrs) con la finalidad de ablandar el tejido vegetal para facilitar la extracción del jugo e hidrolizar las fructanas. Después de la cocción las bases de las pencas fueron pesadas y su jugo fue extraído mediante un trapiche. Posteriormente el jugo extraído fue filtrado a través de papel filtro Watman N° 3. Se midió el volumen total de jugo extraído para cada tiempo de cocción y se determinó el % de sólidos solubles (°Brix) y su contenido de ART (Miller, 1959).

Figura 30: Proceso de extracción de fructanas de las pencas frescas.

### **3.5 Proceso fermentativo**

#### **3.5.1 Microorganismos empleados**

Se utilizó una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*-CDBB-L-331) y una cepa bacteriana (*Zymomonas mobilis*-CDBB-B-603), las cuales fueron obtenidas de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINESTAV-IPN México. Ambos microorganismos se resembraron mensualmente. La levadura se resembró en placas de agar YM cuya formulación es: glucosa 10(g/l); extracto de levadura 3(g/l); extracto de malta 3(g/l); peptona 5(g/l); agar 20(g/l); agua destilada 1000ml. La bacteria se resembró en placas con medio YPG, cuya formulación es: glucosa 20(g/l); peptona 10(g/l); extracto de levadura 3(g/l) y agua destilada 1000ml. El pH de ambos medios de cultivo fue ajustado a 5 con HCl 0.1N. Una vez realizada la resiembra, se incubaron a 30°C durante 24 hrs, posteriormente los cultivos se almacenaron en refrigeración a 5°C con objeto de conservar su viabilidad y evitar futura contaminación.

### **3.5.2 Preparación del preinóculo.**

En dos matraces Erlenmeyer se adicionaron 500 ml de extracto de agave con 14% de ART, extracto de levadura 1.5 g, extracto de malta 1.5 g y peptona 2.5 g; el pH del medio fue ajustado a 5 con HCl 0.1M. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave (121°C/15min). Al matraz donde se cultivó la *Z.mobilis* también se le adicionó 0.1 g/l de ciclohexamida. Cada matraz fue inoculado con dos asadas del microorganismo correspondiente y posteriormente incubados a 30°C/24 hrs. Al término de la incubación se determinó la concentración de microorganismos por el método de vaciado en placa. Se repitió el procedimiento anterior incrementando el número de asadas de cada microorganismo hasta alcanzar una concentración celular de  $2 \times 10^6$  UFC/ml (Figura 31).

### **3.5.3 Preparación del medio de fermentación**

A partir del jugo de agave concentrado a 25% de ART, se prepararon 10 litros de jugo de agave con 10, 15, 20, 25% de ART. A cada solución se le adicionó 1g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y su pH se ajustó a 5.0 con HCl 0.1M. Posteriormente se prepararon dos series de matraces Erlenmeyer de 250 ml, en los que se adicionaron 150 ml de jugo de agave de las distintas concentraciones. Los matraces se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave a 121°C/15 min (Figura 31).

### **3.5.4 Inoculación**

Una serie se inoculó con la levadura *S. cerevisiae* y la otra con la bacteria *Z. mobilis*; a esta última también se le adicionó 0.1 g/l de ciclohexamida. La cantidad de inóculo adicionado en ambos casos fue de 5%<sub>v/v</sub>. Después de la inoculación, los matraces fueron incubados a 30°C durante 120 horas en la obscuridad y agitados manualmente cada 12 horas (Figura 31).

Al término de la incubación, en el caldo de fermentación se determinó la concentración de microorganismos por el método de vaciado en placa y después el caldo fermentado fue filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 micras de diámetro y en el líquido filtrado se determinó el contenido de ART (Miller, 1959), etanol (ebulloscopía) y pH (potenciometría) (Figura 36). Se siguió el mismo procedimiento anterior para tiempos de fermentación de 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 horas. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Figura 31. Diagrama de flujo del proceso fermentativo

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1 Análisis químico porcentual.

El análisis químico porcentual tanto en las bases como en las puntas del *A. tequilana* se realizó a partir de las harinas respectivamente, que se obtuvieron con la finalidad de alargar la vida de anaquel mediante la deshidratación del material vegetal e inactivar las enzimas endógenas de las hojas, conservando así los componentes químicos de interés. Los resultados obtenidos del análisis químico porcentual de las puntas y las bases de las hojas del *A. tequilana* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Análisis químico porcentual de las harinas obtenidas a partir de las puntas y las bases de las hojas del *A. tequilana*

ANALISIS	F R A C C I Ó N	
	Bases de hojas	Puntas de hojas
Proporción	16.40 ± 1.25	32.15 ± 1.85
Humedad (%BH)	78.65 ± 1.55	80.25 ± 1.45
Cenizas (%BS)	8.53 ± 0.01	14.18 ± 0.06
Grasa (%BS)	1.25 ± 0.01	1.72 ± 0.04
Proteína (%BS)	3.49 ± 0.01	5.49 ± 0.20
Fibra cruda (%BS)	29.28 ± 0.17	51.34 ± 0.31
Hidratos de carbono (%BS)	57.45 ± 0.57	27.27 ± 0.61

%BH: Por ciento en base húmeda; %B.S.: Por ciento en base seca

Las hojas o pencas constituyen los residuos agrícolas del cultivo de *A. tequilana* y representan del 45 al 50 % de la biomasa total del cultivo, lo que entre otros factores depende de las condiciones agronómicas y la edad del cultivo (Méndez, 1999). En este caso, las hojas o pencas conformaron el 48.55% de la biomasa total del cultivo, lo que significa que el restante 51.45% lo conforma la cabeza o piña de las plantas. Las bases de las hojas o pencas constituyen el 32.15 ± 1.85% de la biomasa total del cultivo, mientras que las puntas de las hojas sólo alcanzan un 16.40 ± 1.25% de dicha biomasa. El principal constituyente de ambas fracciones es su contenido de humedad, el cual fue ligeramente superior en las puntas de las hojas (80.25 ± 1.45%), lo que significa que el contenido de sólidos totales en las puntas y en las bases de las hojas del agave es de 19.75% y de 21.35%, respectivamente. El contenido de cenizas,



grasa, proteínas y fibra cruda es menor en las bases de las hojas, mientras que los hidratos de carbono representan el principal constituyente de esta fracción ( $57.45 \pm 0.57$ ). La concentración de azúcar encontrada en las bases de las hojas del *Agave tequilana* Weber Azul resultó muy similar al que contienen ( $62.94\%$ ) las hojas o pencas del *Agave atrovirens* Karw (Martínez y Morales, 2007).

Por otra parte, la fibra cruda representa el principal constituyente de las puntas de hojas y en orden de importancia le siguen los hidratos de carbono, cuyos contenidos fueron de  $51.34 \pm 0.31\%$  y de  $27.27 \pm 0.61\%$ , respectivamente. El relativo bajo contenido de hidratos de carbono en las puntas de las hojas del agave, fue la razón por la que esta fracción se eliminó de este estudio, el cual fue realizado utilizando exclusivamente los hidratos de carbono presentes en la fracción que denominamos “bases de hojas”.

La fibra cruda está conformada por polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son insolubles en agua (Flamm, 2001). Estos carbohidratos complejos que integran la fibra cruda podrían utilizarse como materia prima para la producción de etanol; siempre y cuando se disponga de las enzimas “celulasas” necesarias para hidrolizar estos polímeros hasta sus monómeros más simples como la glucosa, a partir de la cual se obtendría el bioetanol por fermentación; logrando de esta forma un aprovechamiento integral de las hojas o pencas que constituyen los residuos agrícolas del cultivo del *A. tequilana*. Esta operación actualmente resulta incosteable llevarla a cabo, dado que por un lado, el costo de las enzimas requeridas en el proceso resulta demasiado elevado y por el otro, si pensamos en un proceso de hidrólisis química de estos polímeros; dicho proceso resulta incosteable hoy en día (Keller, 1996).

Se ha encontrado que el contenido de hidratos de carbono en la piña del *Agave tequilana* Weber Azul oscila entre el  $75-85\%$  (Méndez, 1999); lo cual es atribuible a la edad de la planta y a las condiciones agronómicas del cultivo. Comparando este resultado con los obtenidos en nuestro estudio, en donde el contenido de hidratos de carbono fue menor en las puntas y mayor en las bases de las hojas, cuyos valores se

atribuyen a que la piña funciona como órgano de reserva energética de la planta, ya que es aquí donde se acumula la mayor cantidad de hidratos de carbono.

#### 4.2 Extracción de las fructanas a partir de las harinas de pencas de *A.tequilana*

Para la extracción de los carbohidratos presentes en las harinas de las bases de las hojas de *A.tequilana*, el pH de las dispersiones fue ajustado a 6.0 con NaOH 0.1 N para evitar la depolimerización parcial de las fructanas (Chen, 1991). Las mejores condiciones de extracción de las fructanas se obtuvieron cuando el proceso de maceración se lleva a cabo a una relación sólidos-agua de 1:9, temperatura de 70°C y por un tiempo de 30 minutos (Figura 32).

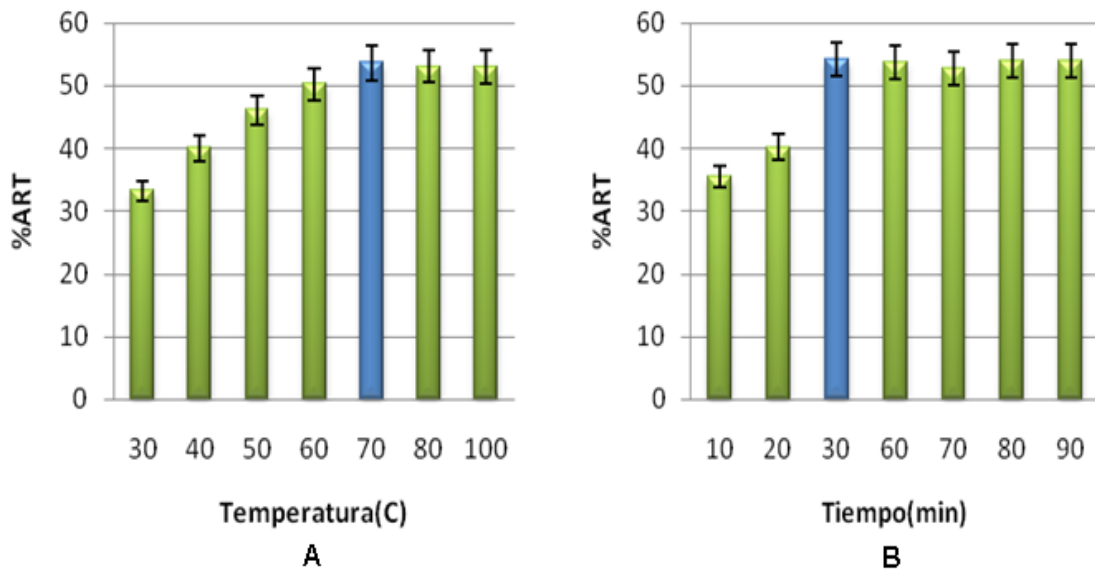


Figura 32: Efecto de la temperatura (A) y del tiempo (B) de maceración en la extracción de las fructanas (%ART) presentes en las bases de las hojas del *A.tequilana*.

Cuando el proceso de maceración se llevó a cabo a una relación sólidos agua de 1:9, se obtuvo la mayor capacidad de hidratación, facilidad de agitación y manejo de la dispersión, ya que a menores relaciones de sólidos-agua (1:3 y 1:6), el agua utilizada en el proceso resultaba insuficiente para la hidratación de las harinas. Estas condiciones óptimas de extracción de las fructanas fueron similares a las reportadas por Blanco (1979); sin embargo nuestros resultados difieren a los reportados por

Salazar *et al.*, (2008), quienes indican que las condiciones óptimas de extracción de fructanas de la piña de *A. tequilana* fueron: relación sólido agua 1:8, temperatura de 80°C y tiempo de extracción de 60 min.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que la solubilidad de las fructanas fue directamente proporcional a la temperatura de maceración aplicada, es decir, la solubilidad aumenta al aumentar la temperatura hasta un máximo de 70°C y un tiempo de maceración de 30 minutos; lo cual está de acuerdo a lo reportado por Sánchez (1979), quien menciona que la solubilidad de los carbohidratos poliméricos tiene una relación directa con la temperatura y con la longitud de cadena. Bajo estas condiciones se requieren tres ciclos de extracción consecutivos para obtener arriba del 95 % de los ART presentes en la harina de las bases de las hojas del *A. tequilana*.

A un nivel de confianza del 95%, no hubo una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de carbohidratos que son extraídos de las harinas obtenidas a partir de las bases de las hojas del agave, a tiempos de maceración superiores a 30 minutos y a temperaturas superiores a 70°C.

Es importante señalar que cuando dichos extractos se utilizaron como fuente de carbono para la obtención de bioetanol, ninguno de los microorganismos utilizados creció en dichos medios, lo cual se atribuye a que las temperaturas aplicadas en el proceso de maceración de las harinas fueron insuficientes para hidrolizar las fructanas hasta unidades de fructosa, forma que sí es utilizada como fuente de carbono por ambos microorganismos. Por lo anterior, para realizar la extracción e hidrólisis de las fructanas contenidas en las bases de las hojas del *A. tequilana*, se optó por realizar la maceración y extracción de fructanas tal como se realiza en la industria tequilera, en donde las piñas son previamente cocidas en autoclave y después sus carbohidratos son extraídos por presión y filtración, previo a su fermentación.

### 4.3 Extracción de fructanas a partir de las bases de las pencas frescas.

Se aplicó un método alterno para extraer los azúcares mediante el cocimiento de las pencas de agave frescas, aplicando calor húmedo por medio de autoclave a nivel laboratorio. Este proceso tiene la ventaja de que el autoclave permite un buen control de la presión, el tiempo y la temperatura; haciendo más homogéneo el proceso de extracción de ART y, por otra parte, dado que no se ajusta el pH en las bases de las hojas, durante el proceso de calentamiento se lleva a cabo la hidrólisis de las fructanas y por ende, la generación de azúcares libres (fructosa más glucosa, principalmente) necesarios para el proceso de fermentación por los microorganismos etanolgénicos utilizados.

La Figura 33 muestra la relación entre los sólidos solubles y los azúcares reductores totales que son extraídos en función del tiempo de cocimiento de las bases de las hojas del *A. tequilana*, a una temperatura de 100°C. Podemos observar que la máxima cantidad de azúcares extraídos se obtuvo cuando las bases de las hojas del agave se someten a una temperatura de cocción de 100°C y por un tiempo mínimo de 4 horas; expresados ya sea como sólidos solubles (°Brix) (Figura 33-A), o como azúcares reductores totales (ART) (Figura 33-B). A un nivel de confianza del 95% no hubo una diferencia estadística significativa entre los ART que son extraídos a tiempos de cocimiento mayores de 4 horas.

Este tiempo óptimo de cocimiento de las pencas del agave para la extracción de carbohidratos coincide con el valor reportado por Téllez (1998) quien además agrega que después de 4 hrs existe una pérdida en la cantidad de azúcares reductores totales extraídos, debido a que dichos azúcares participan en las reacciones de Maillard, lo cual da el color caramelo a los extractos. De acuerdo con Pinal y Gschadier (1998), la disminución del porcentaje de extracción de azúcares reductores totales (ART) cuando se incrementa el tiempo de cocción, se debe a la generación de compuestos como el furfural, el hidroximetil-furfural y otros más que se producen por la acción del calor sobre los azúcares.

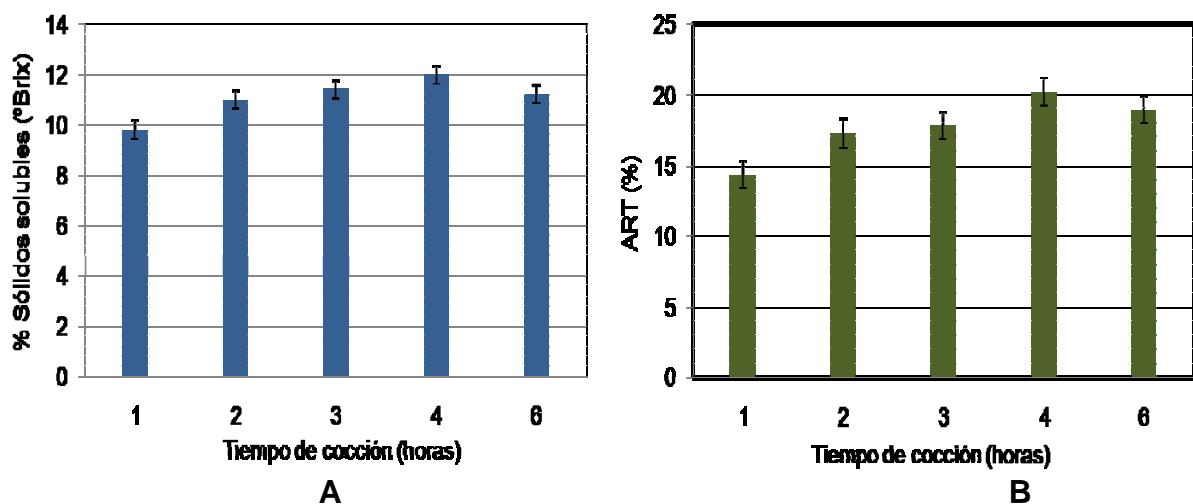


Figura 33: Efecto del tiempo de cocción a 100°C en la extracción de las fructanas presentes en las bases de las hojas del *A. tequilana*. (A)%Brix y (B) %ART

#### 4.4 Proceso fermentativo

##### 4.4.1 Consumo de azúcares

Bajo las condiciones de estudio preestablecidas, la evolución del consumo de azúcares extraídos de las bases de las hojas del *A. tequilana* fue diferente para cada microorganismo como se demuestra en la (Figura 34). Se puede observar que el máximo consumo de ART se alcanzó dentro de las primeras 72 hrs durante el proceso de fermentación, y el consumo fue mayor cuando la fermentación se llevó a cabo con la bacteria *Z. mobilis*. También se observa que en altas concentraciones de ART se inhibe el crecimiento de ambos microorganismos, especialmente de *S. cerevisiae* donde la inhibición se manifestó a concentraciones mayores de 15% de ART.

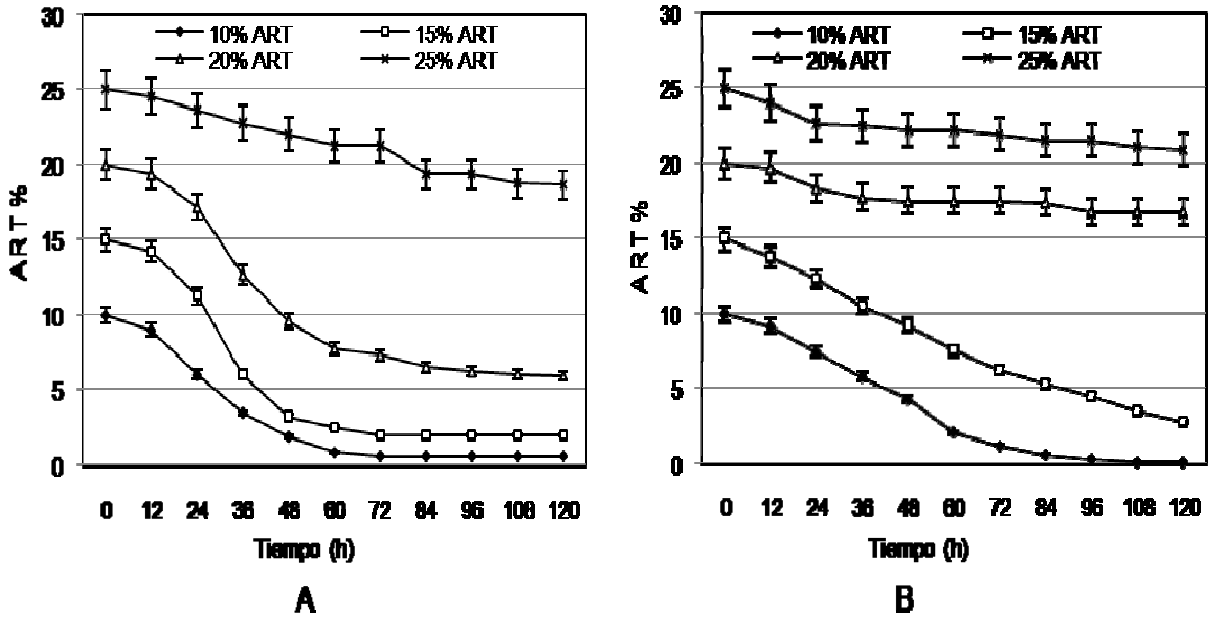


Figura 34: Consumo de azúcares por *Z. mobilis* (A) y *S. cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de azúcares reductores totales (ART), pH= 5.0 y T=30°C

De acuerdo con Scopes y Griffiths (1986), la mayor tolerancia y adaptabilidad de la bacteria *Z. mobilis* a las altas concentraciones de azúcares se debe a que las enzimas de la ruta metabólica que sigue este microorganismo para obtener energía a partir de carbohidratos como glucosa o fructosa; la cual es conocida como ruta metabólica de Entner-Doudoroff, no son inhibidas por estas altas concentraciones de azúcares debido a que los mismos son rápidamente convertidos a etanol en este microorganismo. Por el contrario, se ha demostrado que la levadura *S. cerevisiae* es poco osmotolerante y fermenta mejor a bajas concentraciones de azúcares, que en este caso fue de 10% de ART, resultado que concuerda con el reportado por Alfenore *et al.*, (2002).

La alta concentración azúcares residuales que quedan en el medio nos muestra que la fermentación fue incompleta, especialmente cuando se utiliza la levadura *S. cerevisiae*, lo cual nos indica una posible inhibición del crecimiento celular que puede ser atribuible a la falta de elementos esenciales en el medio como el nitrógeno y fósforo, aminoácidos y vitaminas como el meso-inositol, ácido pantoténico y biotina

(Winter, 1989). Se ha demostrado también que el jugo de agave contiene saponinas; sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos como *S. cerevisiae* (Arellano *et al.*, 2000). Además, durante el tratamiento térmico aplicado a las bases de las hojas del agave para extraer, hidrolizar y concentrar el jugo, se degradan vitaminas termolábiles y nitrógeno asimilable a causa de las reacciones de Maillard, generándose compuestos como el furfural y el hidróxi-metil-furfural, entre otros, los cuales, a las concentraciones en que se encuentran, se ha demostrado que resultan tóxicos para las levaduras (Mancilla y López, 2002).

#### 4.4.2 Producción de etanol

En la Figura 35 se muestra la producción de etanol por ambos microorganismos etanolgénicos en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de ART en el medio de fermentación.

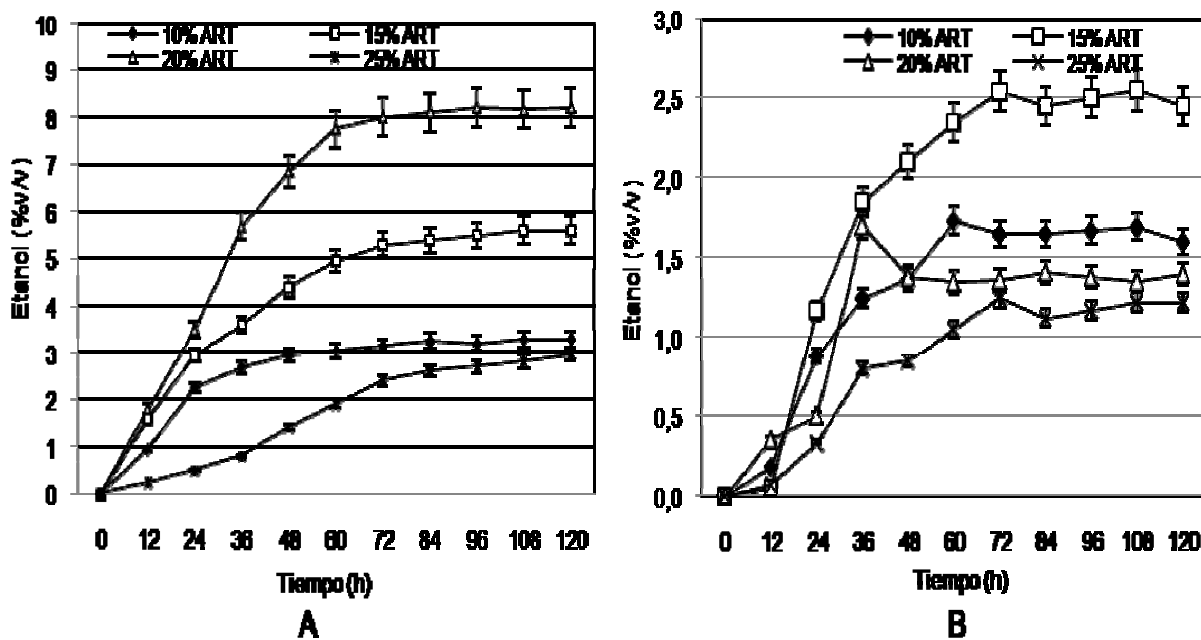


Figura 35. Producción de etanol por *Z. mobilis* (A) y por *S. cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de azúcares reductores totales (ART), pH= 5.0 y T=30°C.

La máxima producción de etanol (8.2%<sub>v/v</sub>) se obtuvo dentro de las primeras 84 horas del proceso, a una concentración de ART del 20% y cuando la fermentación se llevó a cabo con la bacteria *Z.mobilis*; distinto a lo sucedido con *S.cereviciae*, donde la máxima producción de etanol (2.54±0.48%<sub>v/v</sub>) se obtuvo en un tiempo de fermentación de 36 horas y a una concentración de ART del 15%.

Se ha visto que a bajas concentraciones de azúcares (8.6 %), la cinética de la fermentación es similar entre la bacteria *Z. mobilis* y la levadura *S. cereviciae*, pero a mayores concentraciones (15-25%), la producción de etanol y la utilización de azúcar es mayor cuando la fermentación se lleva a cabo por *Z.mobilis*; es decir, el alcohol en el medio inhibe en menor grado a la bacteria *Z.mobilis* (Nowak, 2001). La baja producción de etanol por *S.cereviciae* se atribuye al efecto tóxico que tiene el etanol sobre la membrana celular, el cual modifica la membrana lipídica, reduce la actividad metabólica e induce respuestas al estrés de la levadura (Cardoso y Leao, 1992; Casey e Ingledew, 1985).

En contraste, la bacteria *Z.mobilis* tolera mayores concentraciones de azúcares reductores totales y de etanol en el medio de fermentación, debido a que este microorganismo presenta tanto un sistema de difusión facilitada mediante el cual se logra un rápido equilibrio entre las concentraciones celulares internas y externas de estos azúcares (Struch *et al.*, 1991), así como un sistema enzimático que resulta más resistente a las altas concentraciones de etanol en el medio de fermentación, lo que posibilita alcanzar concentraciones de etanol hasta de un 15% p/v (Algar y Scopes, 1985). Entre las enzimas que integran dicho sistema enzimático se encuentran la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa II, dentro de las cuales ésta última aparentemente es la responsable de producir una alta concentración de etanol (DiMarco y Romano, 1985).

Otros estudios indican que la mayor tolerancia y producción de etanol por *Z. mobilis* se debe a la composición de ácidos grasos (ácido graso cis-vaccénico y hoponoides) que conforman la membrana celular de este microorganismo; dichos ácidos grasos



contrarrestan los efectos adversos del etanol sobre la membrana celular (Buchholz *et al.*, 1987).

### 4.3.3 Crecimiento celular

Bajo las condiciones de estudio, la levadura *S.cerevisiae* presentó un mayor crecimiento celular en comparación con la bacteria *Z.mobilis* y en ambos casos, el máximo crecimiento celular se obtuvo en un tiempo de fermentación de 72 hrs. La máxima concentración celular alcanzada por la bacteria *Z. mobilis* fue de  $6.8 \pm 0.54 \times 10^7$  UFC/mL y se obtuvo a una concentración de 20% de ART, mientras que la levadura *S. cerevisiae* alcanzó su máxima concentración celular de  $3.52 \pm 0.24 \times 10^8$  UFC/mL, a una concentración óptima de 15% de ART (Figura 36). Se han hecho estudios en los que se ha comprobado que el menor crecimiento celular de la bacteria se debe a que en anaerobiosis, este microorganismo solo convierte el 2% de carbono en biomasa y fermenta el 98 % restante (Rogers *et al.*,1982).

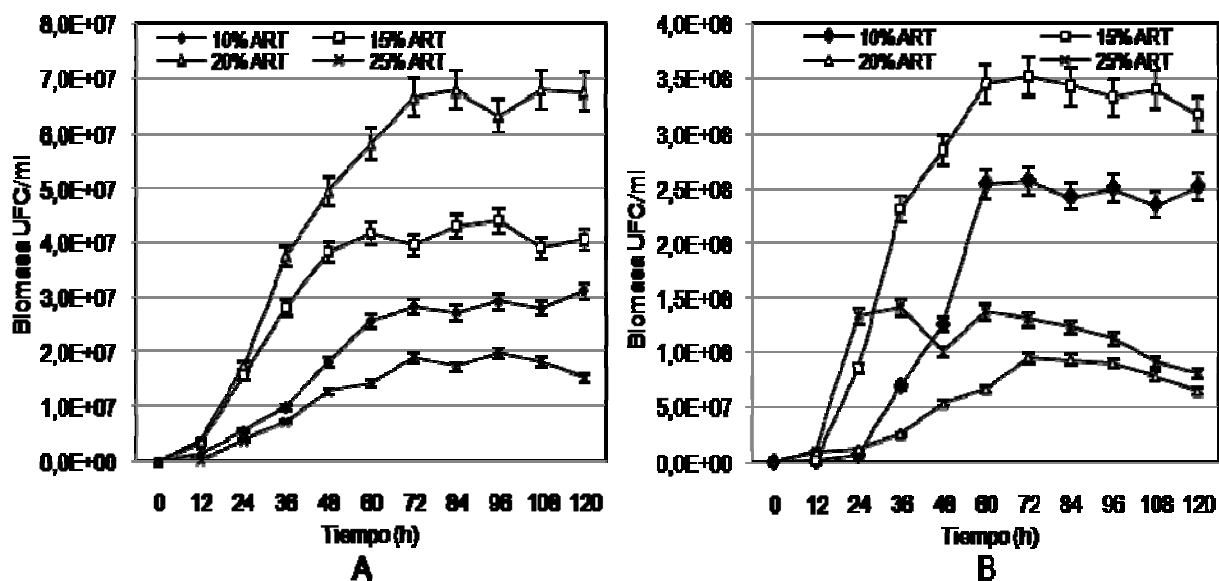


Figura 36. Crecimiento celular de *Z. mobilis* (A) y de *S. cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de ART, pH= 5.0 y T= 30°C.

En la tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos fermentativos bajo las condiciones óptimas de ambos microorganismos. Se puede observar que la bacteria *Z. mobilis* presentó un mayor consumo de azúcares reductores ( $136.8 \pm 3.5$  g/L) y también

produjo la mayor cantidad de etanol ( $64.5 \pm 1.8$  g/L) en comparación con la levadura *S. cerevisiae*, la cual tuvo un consumo de  $89.8 \pm 3.8$  g/L de ART y sólo produjo  $20 \pm 1.1$  g/L de etanol. También se observa que, bajo las condiciones de estudio, *Z. mobilis* presentó un mayor rendimiento en la producción de etanol ( $0.47 \pm 0.02$  gramos de etanol producido / gramo de ART consumido), así como una mayor eficiencia en el proceso de conversión de azúcar a etanol ( $92.27 \pm 2.9$  gramos de etanol obtenido / gramo de azúcar metabolizado) y una mayor productividad volumétrica ( $0.9 \pm 0.01$  gramos de etanol producido /L x h).

Tabla 5: Parámetros cinéticos óptimos de la fermentación de los azúcares del *A.tequilana* por *Z. mobilis* y por *S. cerevisiae* a pH=5 y T=30°C

Parámetro	<i>Zymomona mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Concentración inicial de ART (g/L)	$200 \pm 2.3$	$150 \pm 3.1$
Concentración final de ART (g/L)	$60.5 \pm 3.1$	$60.2 \pm 2.9$
Consumo de ART (g/L)	$136.8 \pm 3.5$	$89.8 \pm 3.8$
Tiempo optimo (h)	72	60
Crecimiento celular (UFC/mL)	$6.8 \pm 0.54 \times 10^7$	$3.52 \pm 0.24 \times 10^8$
Producción de Etanol (g/L)	$64.5 \pm 1.8$	$20 \pm 1.1$
Rendimiento de etanol <sup>a</sup>	$0.47 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.01$
Eficiencia de conversión <sup>b</sup>	$92.27 \pm 2.9$	$47.9 \pm 1.8$
Productividad volumétrica <sup>c</sup>	$0.76 \pm 0.01$	$0.55 \pm 0.005$

a: gramos de etanol producido /gramos de ART consumidos

b: gramos de etanol producido x 100 / 0.511 x gramo de ART consumidos

c: gramos de etanol producido / tiempo optimo de fermentación

Cáceres *et al.*, (2008) utilizaron la levadura *S. cerevisiae* para fermentar el jugo de las hojas de henequén (*Agave foucroydes* Lem.) y obtuvieron una producción máxima de etanol de  $5.22 \pm 1.09\%$ v/v, cantidad inferior a la producida por la bacteria *Z. mobilis* en este estudio. Otro estudio similar fue realizado por Canseco *et al.*, (2008), quienes utilizaron los residuos agroindustriales del cultivo de la papaya (*Caricae papaya*) como fuente de carbono y obtuvieron una producción máxima de etanol del  $8.9 \%$ v/v, resultado similar al obtenido en este estudio.

Los resultados aquí obtenidos tales como la producción de etanol, rendimiento, consumo y asimilación de altas concentraciones de azúcar y menor crecimiento celular de *Z. mobilis* con respecto a la *S. cerevisiae*, coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Toran *et al.*, 1985; Rhee *et al.*, 1986).

## **5. CONCLUSIONES**

Los resultados generados en el presente trabajo de investigación, demuestran que las bases de las hojas del *A. tequilana* contienen una importante cantidad de carbohidratos entre los que destacan los azúcares reductores totales.

Se demostró que ambos microorganismos fermentan los azúcares extraídos de las bases de las pencas sin embargo comparando los parámetros fermentativos mostraron que la bacteria *Z. mobilis* presenta ventajas sobre la levadura *S. cerevisiae* tales como: mayor rendimiento en la producción de etanol, mayor eficiencia de conversión de azúcares en etanol, mayor productividad volumétrica y una menor inhibición a altas concentraciones de etanol y de azúcares en el medio.

Considerando estos resultados, se concluye que las bases de las pencas podrían ser empleados para la producción de bioetanol, contribuyendo al aprovechamiento integral del cultivo de *A. tequilana*, sin afectar la seguridad alimentaria. Aunque se requieren realizar mayores análisis tales como estudios de rendimiento, factibilidad, balance hídrico, balance energético impacto ambiental y características de calidad del bioetanol obtenido y compararlo con respecto a otras materias primas.

## **6. LITERATURA CITADA**

1. A.O.A.C. (1995). Official Methods of Analysis Fourteenth edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, U.S.A. 131- 858 pp.
2. A.V.E.N. (2008) Agencia Valenciana de la Energía. Energías no renovables. Obtenido de la Web: [http://www.aven.es/energia/no\\_renovables.html](http://www.aven.es/energia/no_renovables.html)
3. Aburto J; Martínez T; Murrieta F. (2008). Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Rev. Tecnología, Ciencia, Educación.* (23):23-30.
4. Agricultural Outlook (OECD-FAO) (2008). Highligths.1-72pp. Obtenido de la web: [www.oecd.org/dataoecd/54/15/40715381.pdf](http://www.oecd.org/dataoecd/54/15/40715381.pdf)
5. AGROBIO MEXICO, A.C. (2007).Perspectiva del uso de maíz para la producción de bioetanol. En: Biocombustibles ¿La fórmula mágica para las economías rurales de América Latina y el Caribe? Claridades Agropecuarias, SAGARPA (164):23.
6. Alfenore S; Benbadis L; Bideux C; y Goma G. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cereviciae* by a vitamin feeding strategy during fed batch process. *Appl, Microbial Biotechnol* (60):67-72
7. Algar E; Scopes R. (1985). Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol.* (2):275-87.
8. Almeida C; Esteves B. (2006). Nouveaux Defis pour les biocarburants bresiliens. *Revista Biofutur.* (269):32-36.
9. Arellano PM; Herrera LE; Pinal ZL; Nuñez VL (2000). Asistencia técnica a las empresas IPIÑA y Laguna seca, San Luis Potosí. CIATEJ.1-4 pp.
10. Avinash K A (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science.* (33): 233-271.
11. Banwart G. J. (1981) Basic Food Microbiology Abridget textbook Edition. AVI Publishing Company Inc.3-44 pp.
12. Bautista J.M; García O.L; Salcedo H.R; Parra N. (2001). Azúcares en Agaves (*Agave Tequilana* Weber) cultivados en el estados de Guanajuato. *Acta Universitaria* (1):33-38.
13. Berg C. (2001).World fuel ethanol. Analysis and Outlook. Obtenido de la web: [www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html](http://www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html)
14. Biodisol (2008) La Energía: ¿Qué es la energía? Fuentes y tipos de energía. Obtenido de la web:[www.biodisol.com/biocombustibles/la-energia-que-es-la-energia-fuentes-de-energia-tipos-de-energias-energias-renovables-energias-contaminantes/](http://www.biodisol.com/biocombustibles/la-energia-que-es-la-energia-fuentes-de-energia-tipos-de-energias-energias-renovables-energias-contaminantes/)
15. Blanco S.G (1979). Obtención de fructosa a partir de la hidrólisis de inulina de agave por diversos métodos. Tesis.2-52 pp.
16. Buchholz S, E; Dooley M.M; y Eveleigh D.E (1987). Cactus and succulent *J Trends. Biotechnol.* (4):177-188. Cambridge University Press.
17. Cáceres F; Lappe P; Larque S; Magdub M; Barahona P(2008). Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses mixture by a mixture of two yeasts. *Biosource Technology* (99):9036-9039.
18. Canseco M; Couder B; Pérez Y; Álvarez P; Saldaña T. (2008) Producción de etanol a partir de desechos agroindustriales. Universidad Politécnica de

- Chiapas. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco Guerrero México.
19. Cardona C.A; Sánchez J.O; Montoya I.M; Quintero A.J (2005). Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. *Scientia et Technica* (28):187-192.
  20. Cardoso H y Leao C (1992) Sequential inactivation of ammonium and glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *FEMS Microbiol Lett* (73):155-159.
  21. Casey GP; Ingledew WM (1985). High-gravity brewing: nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. *Biotechnol Lett* (5):429-434
  22. CEPAL (2006). Análisis económico de precios del bioetanol para mezclas con gasolinas. Naciones Unidas Comisión Económica para América Latina y El Caribe. 11-59 pp.
  23. Chen, J.C (1991) Purificación del jugo: I Reacciones de clarificación y control En: Manual del Azúcar de caña. Limusa México. 157-179 pp.
  24. Claassen PM; Van Iier JB; López Contreras AM; van Niel EW; Sijtsma L; Starms AJ; de Vries SS; Weusthuis RA (1999). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *App. Microbiolol. Bioitechnol.* (52):741-755.
  25. Claridades Agropecuarias (2000). Agave tequilero y arroz. SAGARPA (87):3-30
  26. Claridades Agropecuarias (2007). Biodiesel: combustible del futuro. SAGARPA. (163):3.
  27. Claridades Agropecuarias (2007a). Biocombustibles ¿La fórmula mágica para las economías rurales de América Latina y el Caribe? SAGARPA (164):6
  28. Claridades Agropecuarias (2007b). Los Bioenergéticos, una visión integral. SAGARPA. (169):5
  29. Claridades Agropecuarias (2008). Informe sobre el desarrollo mundial 2008: Agricultura para el desarrollo. SAGARPA. (176):33-37
  30. Claridades Agropecuarias (2009). Los precios agrícolas: Análisis y perspectivas. SAGARPA (186):6-46
  31. Claridades Agropecuarias (2010). El papel del ambiente para evitar futuras crisis alimentarias. SAGARPA. (194):3-14
  32. Colmenar A; Castro M (2010). Breve historia del uso mundial de energía. SECVITEL Obtenido de la Web: [http://secvitel.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=58:breve-historia-del-uso-mundial-de-energia&catid=47:articulos&Itemid=58](http://secvitel.com/index.php?option=com_content&view=article&id=58:breve-historia-del-uso-mundial-de-energia&catid=47:articulos&Itemid=58)
  33. Costa CV; Mirelles D.F; Rocha LM. (1986) Production of glucose-grow glycogen-rich cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letter* (8):57-62.
  34. CRT. Consejo Regulador de Tequila A.C. (2008) Geografía. Obtenido de la Web: [http://crtnew.crt.org.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=16&Itemid=83](http://crtnew.crt.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=16&Itemid=83)
  35. De Ley J, Swings J (1977). The Biology of *Zymomonas*. Laboratory of microbiology and Microbial Genetics, Faculty of Sciences, State University, B-9000 Gent, Belgium. *Bacteriological Reviews*. 1-41pp.



36. DeLaval(2006).Levaduras. Obtenido de la web: [www. http://www.delaval.es/Dairy\\_Knowledge/EfficientCooling/Why\\_Cool\\_Milk.htm](http://www.delaval.es/Dairy_Knowledge/EfficientCooling/Why_Cool_Milk.htm)
37. Di Marco AA; Romano A; (1985).D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol*; (49):151-7.
38. Dien, B.S. (2003). Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status. *Applied Microbiology Biotechnology*. (63):258-266
39. Dubois; Gills KA; Hamilton JK; Rebers PA; Smith F(1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* (28):350-356.
40. Ecotropia (2004). Biohidrógeno ¿una alternativa para el futuro? Edit. Rubes. obtenido de la web: <http://www.ecotropia.com/n3020204.htm>
41. Edward A. Raphael L. and Michael E. (2007). The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology* (8):237-245.
42. Elizalde A.A. (2006). El Estado sin proyecto del cultivo de agave. En: El Cambio de Michoacán. obtenido de la web:[www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=4475](http://www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=4475)
43. FAO (1981). Manuales para el control de calidad de los alimentos. Análisis microbiológico.D-1 pp.
44. FAO, Food Outlook (2007). Global Market Analysis. Obtenido de la web: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah876e/ah876e00.pdf>
45. Farías L.C (2008) Commodities agrícolas: ¿Quién subió los precios? En: *Tierra Fértil*. La revista del campo (59): 6.
46. Flamm G; Glinzmann W; Kritchevsky D; Prosky L; Roberfroid M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.(5): 353-362.
47. Flores E.M (2006).Fundación produce Michoacán. El Cambio de Michoacán. Obtenido de la web:[www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=44751](http://www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=44751)
48. Galbe, M and Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (59): 618–628.
49. García C.J; Xirau V. M y Azorin R.R (1990).Técnicas Usuales de Análisis en Enología. Panreac Química S.A.1-10 pp.
50. García O.M; Rivas P.E (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner.Doudoroff.(C.I.C.E.S.E.) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.).(20):85-94.
51. García, J.M. y García, J. A (2006).Biocarburantes Líquidos: Biodiesel y Bioetanol. Informe de Vigilancia Tecnológica. Obtenido de la web: [www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/vt4\\_Biocarburantes\\_liquidos\\_biodiesel\\_y\\_bioetanol.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/vt4_Biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf)
52. Gobielle A; Yavitt J; Stalcup P; Valenzuela A. (2006). Effects of soli management practices on soil fertility measurements on agave tequilana plantations in Western Central Mexico. *Soil y tillage Research* (87):80-88.
53. Gómez S.G (2008). Alza de alimentos empuja inflación. *Tierra Fértil. La revista del campo* (5):4

54. González A.M; Raisman J.S. (2004) Hipertextos del área de biología. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. obtenido de la web: [www.biologia.edu.ar](http://www.biologia.edu.ar)
55. González A; Valenzuela L (2000) *Saccharomyces cerevisiae*. UNAM1-12pp. Obtenido de la web: [www.microbiologia.org.mx](http://www.microbiologia.org.mx).
56. González V (2000). "Talón de Aquiles del Tequila". *Gaceta universitaria*. Universidad de Guadalajara.5 pp.
57. González, Q. L. (1978). Origen de la domesticación de los vegetales en México. *Historia de México*. Editorial Salvat. México. (1): 77-92.
58. Granados, SD (1993). Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo.102- 113 pp.
59. Hagerdal B; Karhumaq K; Fonseca C; Spencer M.I; Gorwa G.M.F(2007). Towards industrial pentose fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. (5):937-53.
60. I.E.A. (2009) International Energy Agency. Resumen Ejecutivo. Obtenido de la web: [www.iea.org/Textbase/about/copyright.asp](http://www.iea.org/Textbase/about/copyright.asp)
61. I.E.O. International Energy Outlook (2009). Energy information Administration U.S. Department of Energy.1-13pp.
62. Ingram LO, Eddy CK, Mackenzie KF, Conway T, Alterthum F. (1989) Genetics of *Zymomonas mobilis* and ethanol production. *Dev Ind Microbiol* (30):53-69.
63. INIFAP (2008), Cosechando energía verde. Insumos para biocombustibles, congreso 7 y 8 Mayo, 2008. Guadalajara, Jalisco, México.
64. Iñiguez G; Diaz R; Sanjuan R; Anzaldo J; Roger M. (2001). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber Azul leaves. *Bioresurce Technology* (77):101-108.
65. Johannes RJ; Lise C. D; Bernd W (2007). Prospects of whole grain crops of wheat, rye and triticale under different fertilizer regimes for energy production. *Biomass and Bioenergy*, (31):308-317.
66. John Mathews (2007). Seven steps to curb global warming. *Energy Policy*, (8):4247-4259.
67. Keller F. A. (1996) Integrated bioprocess development for bioethanol production. *In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Bristol.* 351-357 pp.
68. Kesters, K; y De Ley J (1968). The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. serol.* (34):393-408.
69. Kolendo, J. R. (1996). The agave: a plant and its story. Obtenido de la internet en la página: [www.users.globalnet.co.uk/jankol/articles/articles.html](http://www.users.globalnet.co.uk/jankol/articles/articles.html).
70. Larsson S. (2000) Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral.10-45 pp.
71. Lima M.A; Perez F.P; Edison L.C; Pereira N (2002).The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica de Valparaiso (5):272-278. [www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/7/7.pdf](http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/7/7.pdf)

72. Lynd LR, Weimer PJ; van Z WH; Pretorius IS. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol.Mol.Biol.R.* (66):505-577.
73. Madigan M; Martinko J.M; Parker J. (2004). Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Ed. Pearson. 879 pp.
74. Mancilla M; López G.M (2002). Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* weber azul. *Journal of Agric. Food chemical.*(50):806-812.
75. Martinez SM; Valdez CR; Arias HR; Beltran M.L; Murillo AB; Troyo DE; Ortega RA (2005). Distribution and density of maguey plants in the arid Zacatecas Plateau. *J of Arid Enviroments*; (61):525-534.
76. Martínez TR; Morales DU (2007). Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovians* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructooligosacaridos. Alfa Editores Técnicos ENCB-IPN.11-19 pp.
77. Méndez R.D (1999). Acumulación de fructanas en *Agave tequilana* Weber azul cultivado en el campo. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.3-24 pp.
78. Merino L (2006). Las energías renovables. Edit. Iberdrola.1-3 pp. Obtenido de la web.[www.energiasrenovables.com/Productos/pdf/cuaderno\\_GENERAL.pdf](http://www.energiasrenovables.com/Productos/pdf/cuaderno_GENERAL.pdf)
79. Mesera C.O. (2006). La bioenergía en México. Un catalizador del desarrollo sustentable. CONAFOR. ANES. Red Mexicana de Bioenergía. Ed. Mundiprensa.119 pp.
80. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* (31): 426-428.
81. Morales MO (1997). Caracterización general del Proceso de Producción de la Tequilera Corralejo S.A de C.V., Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Chapingo 5-22 pp.
82. Moreira J; Goldemberg J (1999). The alcohol program. *Energy policy* (27):229-245.
83. Narvaez J; Sánchez TF (2009). Agaves as a Raw material, Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology.* (3):3
84. Nobel PS. (1988) Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. 270 pp.
85. Nobel PS; Castañeda M; North G; Pimienta BE; Ruiz A(1998) Temperature influences on leaf CO<sub>2</sub> exchange, cell viability and cultivation range for *Agave tequilana* *J. Arid Environ*, (39) 1-9.
86. Nobel PS; y Hartsock T.L (1976) Watering converts a CAM plants to daytime CO<sub>2</sub> uptake. *Nature.* (262): 574-576.
87. Nowak J (2001). Comparison of polish industrial distillery yeast with ethanol producing bacteria *Zymomona mobilis*. *Food Science and Technol.* (4):2-6
88. Oliva JM (2003).Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.1-25pp.
89. Pemex (2006) Exploración y Producción. obtenido de la web: [www.pep.Pemex.com](http://www.pep.Pemex.com).
90. Pfaumann P. (2007). Biocombustibles ¿La fórmula mágica para las economías rurales de América Latina y el Caribe? Banco Interamericano de Desarrollo. En: Claridades Agropecuarias (2007) (164):3.

91. Pimienta B E; Zañudo J E. Yopez E. Pimienta Barrios; Nobel PS. (2000). Seasonal variation of net CO<sub>2</sub> uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semi-arid environment. *Journal of Arid. Enviroments* (44): 73-83
92. Pinal Z; Gschadier L.A (1998). La etapa de fermentación y la generación de compuestos organolépticos. *Bebidas Mexicanas*. 7(1):10-13.
93. R.F.A. Renewable Fuels Association (2008). Obtenido de la Web: [www.ethanolrfa.org/industry/statistics/#E](http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics/#E)
94. Ramírez J. (1995) Los magueyes, plantas de infinitos usos. CONABIO. *Biodiversitas* (3):1-7. Obtenido de la web: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv3art1.pdf>
95. Rhee S; Lee G; Kim C; Abidin Z; Han M (1986). Simultaneous sago starch hydrolysis and ethanol production by *Z.mobilis* and glucoamylase. *Biotechnol.Biong.Symp* (17):681-493.
96. Ritsema T. y Smeekens S (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*. (6):223-230.
97. Rogers, P.L; Lee K.L; Skotinish M.L; Tribe D.E; (1982). Ethanol production by *Z.mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* (23):27-84.
98. SAGARPA (2007). Estrategia intersecretarial y programas de producción sustentable de insumos e introducción de bioenergéticos en México.
99. Salazar L.J; Gonzales FA; Osuna RS; Osuna RI (2008). Determinación de las condiciones óptimas de extracción de inulina a partir de agave Azul (*tequilana* Weber). Universidad Politécnica de Sinaloa 2-17pp.
100. Sánchez J.M (2008). Producción de etanol por *Zymomonas spp.* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 1-6 pp.
101. Sánchez M. A. (1979). Los agaves de México en la industria alimentaria. Ed. CEESTEM. 1-78 pp.
102. Sánchez O, J y Cardona A.C (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia* (30):671-678.
103. Scopes R; Griffiths S. (1986). Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. *Biotechnol. Lett.* (8):653-656.
104. SENER- BID- GTZ (2007), Potenciales y Vialidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México, Resumen ejecutivo. 1-60 pp.
105. Struch T; Neuss B; Bringer M. (1991). Osmotic adjustment of – *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (23): 201-211.
106. Suzuki.M, y Chatterton, N.J (1996). Science and thechnology of fructans. CRC Press. USA. 2-14 pp.
107. Swings J; De Ley J, (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Review* (41):1-46
108. Tellez MP (1998). El cocimiento una etapa importante en la producción de tequila. *Bebidas Mexicanas* (7): 19-20.
109. Toledo V. M; Carabias J; Toledo C; González PC. (1989). La producción rural en México: Alternativas ecológicas. Prensas de Ciencias. Fundación Universo Veintiuno. 402 pp.

110. Toran D; Jain V; Allais J y Baratti J (1985). Effect of acid or enzymatic hydrolysis on ethanol production by *Zymomona mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. *Biotech Lett.* (7):527-530
111. Torney F; Moeller L; Scarpa L y Wang K (2007). Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current opinion in Biotechnology.* (3): 193-199.
112. Trevan M.D; Boffey K.H; Goulding y Stanbori P (1990). Biotecnología: principios biológicos. Ed.Acribia S.A. Zaragoza España.34 pp.
113. U.S Department of Energy (2007). Energy Efficiency & Renewable Energy. Life cycle biofuels. Obtenido de la web: <http://www1.eere.energy.gov/biomass/>
114. Valenzuela, Z. A. G. (1997). El agave tequilero: su cultivo e industria. 2ª Edición, Litteris Editores. 1-26 pp.
115. Viikari L. (1988) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *Crit Rev Biotechnol.* (7):237-61.
116. Webber E.M (2008). Sustainable Biofuels.1er.Congreso Internacional de Biocombustibles. Guadalajara Jal.
117. Winter J; Loret M; y Uribe Larrea J. (1989). Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* (18):247-252.
118. Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. (2001). Fuel ethanol production from lignocelluloses: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol.* (56):17-34.