



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA
SEMILLA DEL RAMÓN
(*Brosimum alicastrum* Sw.)**

Tesis que presenta

I.Q. en M. ZAIRA BARQUERA BIBIANO

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Enero del 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México.

Enero del 2014



Zaira Barquera Bibiano

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Obtención de bioetanol a partir de la semilla del ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.)" fue realizado por la estudiante Zaira Barquera Bibiano en el laboratorio de la Unidad de Energía Renovable, en el programa de Posgrado en Ciencias en Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección del Dr. Francisco Alfonso Larqué Saavedra y el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez.

Ate[n]tamente



Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Coordinación de Docencia.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada número 427747.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) y Unidad de Energía Renovable por la disposición de sus instalaciones y equipo.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra y Dr. Felipe Barahona Pérez, por la dirección y asesoría brindada en la realización de este trabajo, la confianza depositada, la oportunidad de trabajar y aprender de ellos a lo largo de estos dos años.

A mis tutores, Dra. Patricia Lappe Oliveras y Dra. Daisy Pérez Brito, por sus valiosas aportaciones.

A mis revisores, Dr. Raúl Tapia y Dr. Víctor Toledo por tomarse el tiempo y paciencia de atender este trabajo.

A la técnica Tanit Toledano por la capacitación en el manejo de microorganismos y apoyo técnico.

A la técnica Silvia Vergara por el apoyo administrativo y técnico durante la realización del proyecto.

A los técnicos Miguel Alonso Tzec Simá, Enrique Escobedo, Jorge Domínguez, por su apoyo en los laboratorios, facilitarme material y orientarme en el manejo de equipos de sus respectivas áreas; y por su ayuda administrativa a Julia González Montilla.

A mis profesores, por abrir mi percepción del panorama científico y motivarme a emprender nuevos retos.

A Dios por darme salud y permitirme estar aquí.

A mí madre por darme la vida, educación, en pocas palabras por ser mi columna vertebral, por brindarme todos los medios necesarios para poder concluir cada una de las etapas de mi vida, gracias por sus consejos y amor incondicional.

A mí familia por su amor, cariño y apoyo. A mis tíos, primos, sobrinos por siempre confiar en mí y motivarme a seguir adelante. A mi tío Adolfo y abuelita Dionisia que desde el cielo me guían.

A mis amigos por ser mi segunda familia, consejeros, confidentes, compañeros en los momentos felices y en los difíciles.

Por su amistad y alegría, a pesar del tiempo y la distancia gracias a Paco, Edith, Gloria, Salomón, Alf, Paulina, Erika, Sandra, Georgina, Wendy, Macías, Rodrigo por preocuparse siempre por mí.

En especial, a mis amigos de generación: Lupita, Marisol, Mintzirani, Diana, Paola, Pepe, Nancy, Javier, Rita, Jorge, Teresa, Flor, por hacer más amenos los momentos al estar lejos de casa y compartir sus conocimientos conmigo. A Zamaria, Laurita, Alfredo, Vincent, Irving, Joel, Laurita, Ana, Eduardo por todas las carcajadas y momentos divertidos que compartimos.

A mis colegas del laboratorio de la Unidad de Energía Renovable: Elda, Viviana, David, Harbey Eliud, Chucho, Arely, Madero, Isaura, Nancy, Roberto, Rosita, Harbey, Martín, Merly, Jovani, Paco, por su comprensión, amistad y apoyo.

Al equipo de Mandarinas, por demostrarme que trabajando en equipo y con pasión se puede llegar mucho más lejos.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Octaviano Bibiano Cabañas, por ser un gran padre, por brindarme su amor, ser mi guía, mi ejemplo a seguir, mi motivación y mi ideal, por enseñarme que no hay límites para conseguir lo que verdaderamente quieres. Por transmitirme la pasión de trabajar en pro del bienestar de México.

ÍNDICE

RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	5
ANTECEDENTES	5
1.1 Generalidades del árbol de ramón (<i>Brosimum alicastrum Sw.</i>).....	5
1.2 Composición de la semilla	9
1.3 Producción energética	10
1.4 Biocombustibles.....	10
1.5 Bioetanol	11
1.6 Principales países productores de bioetanol y materias primas utilizadas.....	12
1.7 Proceso de producción de bioetanol.....	14
1.7.1 Almidón	15
1.7.2 Pre-tratamiento.....	16
1.7.3 Hidrólisis.....	17
1.7.4 Fermentación	21
1.7.5 Destilación.....	25
1.7.6 Deshidratación	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO 2.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Reactivos	29
2.2 Material biológico	29

2.3	Estrategia experimental	31
2.4	Materia prima	32
2.4.1	Harina de semilla de ramón	32
2.4.2	Determinación de humedad de la semilla de ramón.....	32
2.5	Hidrólisis	33
2.5.1	Licuefacción	33
2.5.2	Sacarificación	35
2.6	Pre- tratamiento térmico	36
2.7	Cantidad de sustrato	37
2.8	Evaluación de la metodología empleada en la hidrólisis	38
2.9	Fermentación	39
2.9.1	Curva de crecimiento	39
2.9.2	Preparación del inóculo para la fermentación	39
2.9.3	Fermentación	40
2.10	Destilación	40
2.11	Análisis.....	41
2.11.1	Azúcares reductores directos (ARD).....	41
2.11.2	Determinación de sólidos solubles (°Brix) y del pH.....	42
2.11.3	Etanol	42
2.12	Cuantificación	43
2.12.1	Porcentaje de almidón hidrolizado	43
2.12.2	Producción de bioetanol.....	43
2.12.3	Eficiencia del proceso	44
2.13	Análisis estadístico	44
CAPÍTULO 3.....		45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		45
3.1	Hidrólisis	45
3.1.1	Licuefacción	45
3.1.2	Sacarificación	49
3.2	Pre-tratamiento térmico	52
3.3	Cantidad de sustrato.....	53

3.4	Evaluación del proceso de hidrólisis	55
3.5	Curva de crecimiento	56
3.6	Fermentación	57
3.7	Rendimiento de bioetanol producido a partir de harina de semilla de ramón	64
3.8	Estimación de la producción de bioetanol a partir de la semilla de ramón.	65
	CONCLUSIONES	67
	PERSPECTIVAS	68
	BIBLIOGRAFÍA.....	69
	ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición de macronutrientes de la harina de semilla de ramón (<i>B. alicastrum</i>).....	9
Tabla 1.2. Propiedades del bioetanol, gasolina y MTBE.....	12
Tabla 1.3. Principales países productores de bioetanol.....	13
Tabla 1.4. Producción y rendimientos de bioetanol de materias primas amiláceas.....	14
Tabla 2.1. Variables evaluadas para determinar las condiciones de actividad óptima de α -amilasa (de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>).....	35
Tabla 2.2. Condiciones empleadas en la licuefacción y sacarificación para evaluar la respuesta del pre-tratamiento térmico sobre estas etapas.	37
Tabla 2.3. Condiciones empleadas para la evaluación de la carga de sustrato y la evaluación de la metodología, durante la hidrólisis.....	38
Tabla 3.1. Efecto del pH durante la etapa de licuefacción.	47
Tabla 3.2. Hidrólisis del almidón de harina de ramón a diferentes temperaturas de la reacción de licuefacción.	48
Tabla 3.3. Variación de los ARD y el porcentaje de almidón hidrolizado de harina de ramón a diferentes tiempos de sacarificación.	51
Tabla 3.4. Rendimientos de etanol a partir de mostos con concentraciones iniciales de 67.5 y 128.5 g·L ⁻¹ de ARD.....	59
Tabla 3.5. Rendimiento de bioetanol y eficiencia fermentativa a diferentes tiempos sobre un hidrolizado de harina de semilla de ramón con un contenido inicial de 107.7 g·L ⁻¹ de ARD.....	63
Tabla A.4.1. Preparación de una solución amortiguadora de fosfato de sodio.....	80
Tabla A.4.2. Absorbancias de las muestras a 550 nm.....	82
Tabla A.4.3. Absorbancias de las muestras a 585 nm.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Brosimum alicastrum</i> Sw.	7
Figura 1.2. Distribución del árbol de ramón en México	8
Figura 1.3. Proceso de producción de bioetanol a partir de compuestos amiláceos.....	15
Figura 1.4. Segmentos de una molécula de amilosa y de amilopectina.	16
Figura 1.5. Representación aleatoria de los enlaces glucosídicos sobre los que la enzima α -amilasa realiza la hidrólisis.....	20
Figura 1.6. Representación de los extremos no reductores sobre los que la enzima amiloglucosidasa realiza la hidrólisis.....	21
Figura 1.7. Ruta metabólica realizada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fermentación alcohólica.....	23
Figura 2.1. Estrategia experimental para la producción de bioetanol a partir de la harina de ramón.	31
Figura 2.2. Harina de semilla de ramón.	32
Figura 3.1. Efecto de la cantidad de α -amilasa (de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) en la hidrólisis de la harina de semillas de ramón.....	45
Figura 3.2. Efecto del pH en la hidrólisis del almidón de la harina de ramón.....	46
Figura 3.3. Comportamiento de α -amilasa a diferentes temperaturas durante la licuefacción.....	48
Figura 3.4. Porcentaje de almidón hidrolizado por α -amilasa respecto al tiempo de licuefacción.....	49
Figura 3.5. Efecto de la cantidad de amiloglucosidasa AMG 300L (de <i>Aspergillus niger</i>) sobre almidón de harina de semilla de ramón.....	50
Figura 3.6. Efecto del tiempo de reacción de amiloglucosidasa AMG 300L en la sacarificación de las dextrinas de harina de ramón.	51
Figura 3.7. Efecto del tiempo de pre-tratamiento térmico en la hidrólisis del almidón de la harina de semilla de ramón.	52
Figura 3.8. Porcentajes producidos de almidón hidrolizado y ARD con respecto a la cantidad de sustrato empleada.	54

Figura 3.9. Porcentaje de almidón hidrolizado en suspensiones al 20 % p/v de harina de semilla de maíz y harina de semilla de ramón, sometidas a las mismas condiciones de hidrólisis.....	55
Figura 3.10. Curva de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (marca SAFOENO) sobre un hidrolizado enzimático de harina de semilla de ramón.....	57
Figura 3.11. Consumo de los ARD iniciales presentes en dos hidrolizados de harina de semilla de ramón durante la fermentación realizada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
Figura 3.12. Perfiles cinéticos durante la fermentación a 30 °C de 107.78 g·L ⁻¹ de ARD de un hidrolizado de harina de semilla de ramón.....	61
Figura 3.13. Eficiencia de la fermentación alcohólica realizada durante diferentes tiempos sobre un hidrolizado de harina de semilla de ramón con un contenido inicial de 107.7 g·L ⁻¹ de ARD.	62
Figura A.1. Superficie de la cámara de Neubauer	81
Figura A.2. Curva de calibración de azúcares reductores directos (ARD) a 550 nm.....	82
Figura A.3. Curva de calibración de etanol a 585 nm.	83

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (1.1) Reacción de la hidrólisis de almidón	17
Ecuación (1.2) Reacción de la producción de bioetanol	23
Ecuación (2.1) Viabilidad de la levadura	30
Ecuación (2.2) Concentración celular.....	30
Ecuación (2.3) Porcentaje de humedad	32
Ecuación (2.4) Porcentaje de almidón hidrolizado	43
Ecuación (2.5) Coeficiente de rendimiento de bioetanol	43
Ecuación (2.6) Eficiencia de la fermentación	43
Ecuación (2.7) Eficiencia de la metodología empleada en la producción de bioetanol.....	44

LISTADO DE ABREVIATURAS Y UNIDADES

ABREVIATURAS

GEI	Gases Efecto Invernadero
CO₂	Dióxido de carbono
CONAFOR	Comisión Nacional Forestal
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
ARD	Azúcares Reductores Directos

UNIDADES

MTep	Millones de toneladas equivalentes de petróleo
Pj	Peta joule
Msnm	metros sobre el nivel del mar

RESUMEN

La presente investigación muestra evidencias experimentales que la harina obtenida de las semillas de *Brosimum alicastrum* Sw. por su alto contenido en carbohidratos, tiene potencial para ser utilizada como materia prima en la producción de bioetanol. Se ha reportado que la harina esta conformada por un total de 72.25 % de carbohidratos y 61 % de almidón, en peso seco. El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar una metodología para producir bioetanol a partir del almidón contenido en la harina. La metodología propuesta constó de 3 etapas: un pre-tratamiento térmico, una hidrólisis enzimática y una fermentación.

El pre-tratamiento térmico se introdujo como parte de la metodología, ya que se observó que con un tratamiento a 100°C durante 5 min la hidrólisis enzimática incrementaba un 5.71%. La hidrólisis enzimática se realizó en 2 fases: 1) La licuefacción, donde el almidón se desdobló en dextrinas empleando una α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* y 2) la sacarificación, que hidrolizó las dextrinas a glucosa mediante una amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*; para ambas enzimas se establecieron las mejores condiciones de trabajo. El máximo porcentaje de hidrólisis del 61.3 ± 0.9 % se obtuvo cuando se empleó una suspensión al 20 % p/v de harina de semilla de *B. alicastrum*. La fermentación del hidrolizado se llevó a cabo con una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (SAFOENO), los mejores resultados se obtuvieron cuando se finalizó la fermentación a las 12 h, produciendo una cantidad máxima $32.7 \text{ g de etanol} \cdot \text{L}^{-1}$ de mosto, con una eficiencia fermentativa del 75.69%. La eficiencia global de la metodología empleada fue del 30.6 % y su estimación de producción de bioetanol de $132.7 \text{ L} \cdot \text{ton}^{-1}$ de harina.

ABSTRACT

This research provides experimental evidence that the high carbohydrate content of the flour obtained from *Brosimum alicastrum* Sw seeds could potentially be exploited as raw material for the production of bioethanol. The flour has been reported to have a total carbohydrate content of 72.25 % and a total starch content of 61 % in dry weight. The aim of this work was to develop a methodology for the production of bioethanol from the starch content in the flour. The methodology proposed herein comprises three stages: thermal pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation.

Thermal pre-treatment was included as part of the methodology as observations have shown that, a treatment at 100°C for 5 min, increased the enzymatic hydrolysis by 5.71%. Enzymatic hydrolysis was performed in 2 phases: 1) Liquefaction, in which the starch was dextrinized using an α -amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* and 2) saccharification which hydrolyzed the dextrans to glucose by means of an amyloglucosydase of *Aspergillus niger*; optimal work conditions were established for both enzymes. The maximum hydrolysis percentage of 61.3 ± 0.9 % was achieved with a suspension of 20 % w/v of *B. alicastrum* flour. Fermentation of the hydrolysis product was carried out with a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (SAFOENO) and the best results were obtained when fermentation was finished at 12 hours, producing a maximum of 32.7 g of ethanol·L⁻¹ of must, with a fermentation efficiency of 75.69 %. Overall efficiency of the methodology was 30.6 % and estimated bioethanol production was 132.7 L·ton⁻¹ of flour.

INTRODUCCIÓN

Las necesidades actuales del ser humano requieren una gran cantidad de energía, tan solo en el 2011 fueron indispensables 8676.6 MTep para satisfacer la demanda mundial [1]. Conforme crece la densidad poblacional aportarla proporcionalmente se vuelve un reto difícil y costoso, sobre todo, porque los recursos energéticos más empleados para proveerla son combustibles fósiles (principalmente: carbón, gas natural y petróleo) [2], recursos no renovables que presentan reservas limitadas que disminuyen continuamente. Además, su empleo ocasiona un impacto negativo sobre el medio ambiente, ya que durante su producción y uso se emiten gases de efecto invernadero (GEI) y otros contaminantes, que contribuyen al constante calentamiento global [3,4].

México sustenta su economía principalmente en un combustible fósil, el petróleo, que alcanzó su máxima producción en el 2003, presentando a partir de esta fecha una tendencia decreciente en sus índices productivos [5]. Sin embargo, el crecimiento de su población se comportó en forma inversa, ya que en el 2011 se incrementó en un 0.8 % con respecto al 2010 [1].

Sí sólo producimos un excedente de energía de 841.74 Pj a nivel nacional y nuestra población incrementa a razón anual de 0.8 millones de personas [1], se deben tomar acciones que garanticen la seguridad e independencia energética del país. Para poder conseguirlo es necesario implementar fuentes energéticas más sustentables que sean capaces de abastecer los servicios que demandan los principales consumidores.

El sector transporte es uno de los mayores consumidores de energía fósil a nivel mundial, en el 2010 demandó un 27.3 % de la energía total y generó cerca del 22 % del CO₂ [1,6]. En México, este sector demanda un 48 % de la energía y produce un 39.9% de las emisiones de CO₂ [1].

En la búsqueda por mitigar el impacto ambiental y económico ocasionado por este sector, se propone el empleo de biocombustibles, esperando funjan como medios transitorios mientras se desarrollan o encuentran fuentes energéticas completamente sustentables

[1,7,8]. Entre los biocombustibles, el bioetanol juega un papel importante para llevar a cabo tal transición, debido a que posee propiedades similares a la gasolina y es adaptable a la infraestructura de transporte existente en gran parte del mundo [9]. Es una opción prometedora, ya que puede ser usado como combustible o como oxigenante, reduciendo considerablemente las emisiones de monóxido de carbono, compuestos aromáticos y compuestos orgánicos volátiles emitidos a la atmósfera por los hidrocarburos convencionales [10]. El bioetanol es el principal producto derivado de la fermentación alcohólica de los compuestos orgánicos presentes en diversos sustratos naturales (biomasa), realizada por microorganismos bajo condiciones de anaerobiosis [2]. Por lo general, la biomasa es rica en: azúcares simples, complejos (almidón) o en compuestos lignocelulósicos [11].

Varios países invierten en buscar y obtener cultivos energéticos eficientes, que posean: menor demanda de insumos, mayor adaptabilidad, ciclos de producción cortos, y que no sean severos ambientalmente [11,12,13]. Entre más diversificadas y eficientes sean las materias primas, se propiciará más rápido la transición energética.

En la Península de Yucatán crece un árbol conocido regionalmente como árbol de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.), cuya harina obtenida a partir de su semilla tiene alto contenido de carbohidratos (hasta un 76% de su peso total) [14,15]. El 61 % del peso de la harina corresponde a almidón (ANEXO I), cantidad semejante a la presente en materias primas amiláceas empleadas tradicionalmente en la producción de bioetanol. Comercialmente, esta especie no es competitiva dentro del mercado estatal, por lo que este conjunto de características la postulan como materia prima potencial para la producción de bioetanol.

En forma directa e indirecta el empleo de la semilla de ramón representaría una forma de reducir la producción de GEI, proporcionaría un balance energético positivo respecto a otros cultivos, ya que el fruto de donde se obtiene la semilla no demanda grandes cantidades de insumos agropecuarios, por tratarse de una especie perenne [16]. Por lo tanto, si se pretende obtener un rendimiento eficiente de bioetanol a partir de la semilla de

ramón, el reto se encuentra en el desarrollo de una metodología adecuada para explotar al máximo sus propiedades fisicoquímicas.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para lograr dicho objetivo. Para ello, se realizaron estudios que evaluaron tres etapas de la producción: pre-tratamiento, hidrólisis, y fermentación; con el fin de obtener un producto competente energéticamente.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del árbol de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.)

Brosimum alicastrum Swartz de la familia Moraceae es conocido como árbol de ramón en la Península de Yucatán y designado con más de 50 nombres (ajusté, apomo, capire, verba, mojóte, huge, cupsap, hairri, oxotzin, ojoy, osh, jauri, xichxichcuy, breadnut, capomo, freguo, hichoso, masicarán, ojoche, ojote, ujushte, ox, pisba wainka, ramón blanco, ramón colorado, ramón de mico, ujuxte, etc.) a lo largo de las regiones donde crece [16,17,18,19]. El término *Brosimum* proviene del griego *Brosimos* que significa comestible [20,21]. Dos subespecies hasta el momento han sido identificadas *Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *alicastrum* y *Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *bolivarense*. Entre su sinonimia botánica lo podemos encontrar como: *Alicastrum brownei* Kuntze, *Brosimum bernadetteae* Woodson, *Brosimum bolivarense* (Pittier) Romero, *Brosimum gentlei* Lundell, *Brosimum laifolium* Standl, *Brosimum terrabanum* Pittier y *Helicostylis bolivarensis* Pittier, etc. En el Salvador se han identificado dos variedades el ujushte verde y ujushte amarillo [19].

El ramón es un árbol perenne, ecológicamente importante por su aporte energético a diferentes niveles tróficos [18]. En el estado de Yucatán posee una relevancia histórica, ya que dentro de la cultura maya tuvo una importancia económica y alimenticia [16,17,18,19].

Usos

El empleo que se da al ramón es variado, ya que se aprovechan casi todas las partes del árbol. Tiene usos artesanales, comestibles, de construcción, forrajeros, maderables, medicinales y recientemente industriales [17,22].

En Yucatán se emplean las hojas como forraje, ya que son un excelente alimento para el ganado principalmente en la época de sequía; y las semillas son usadas en menor proporción para producir harina comestible, la cual posee altos contenidos en triptófano (aminoácido esencial deficiente en dietas a base de maíz) [17,18].

También tiene una relevante importancia ecológica, ya que es un árbol con potencial para realizar reforestaciones en zonas degradadas, pues además de favorecer la regeneración de otras especies, contribuye a la conservación del suelo, al control de la erosión y contrarresta el efecto de vientos fuertes [17].

Actualmente, varias propiedades del árbol son estudiadas para brindarle mayores aplicaciones y dar un valor agregado a su cultivo [23].

Descripción del árbol

Forma: Es un árbol que alcanza alturas de hasta 45 m [24], con diámetros a la altura de pecho (de 1.3 m) de hasta 1.5 m [17,18] (figura 1.1a).

Copa: Es densa, abierta e irregular, con forma piramidal. Posee hojas alternas, láminas de 4 a 18 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho, con forma elíptica, su color es verde brillante [17,18].

Corteza: Externa lisa, parda grisácea, presenta lenticelas; interna de color crema amarillenta, con abundante exudado lechoso [17,18], su grosor es de 7 a 8 mm [17].

Flores: Son inflorescencias verdes o amarillas con cabezuelas globulares de alrededor de 1 cm de diámetro; se ha reportado que posee flores unisexuales [18], pero estudios recientes (Isabel Huchin Poot, comunicación personal) han identificado la existencia de flores hermafroditas.

Fruto: Posee una drupa de 2 a 3 cm de diámetro (figura 1.1b), con pericarpio carnoso, cuyo color varía de verde a anaranjado de acuerdo con su grado de maduración, de sabor y olor dulce, y contiene de 1 a 2 semillas por fruto [17].

Semilla: De forma semiesférica (figura 1.1c) sus dimensiones son de 3-9 x 16-20 mm, cubiertas por una testa papirácea color moreno claro; la semilla fresca contiene de 45 % a 50 % de humedad [17,18].

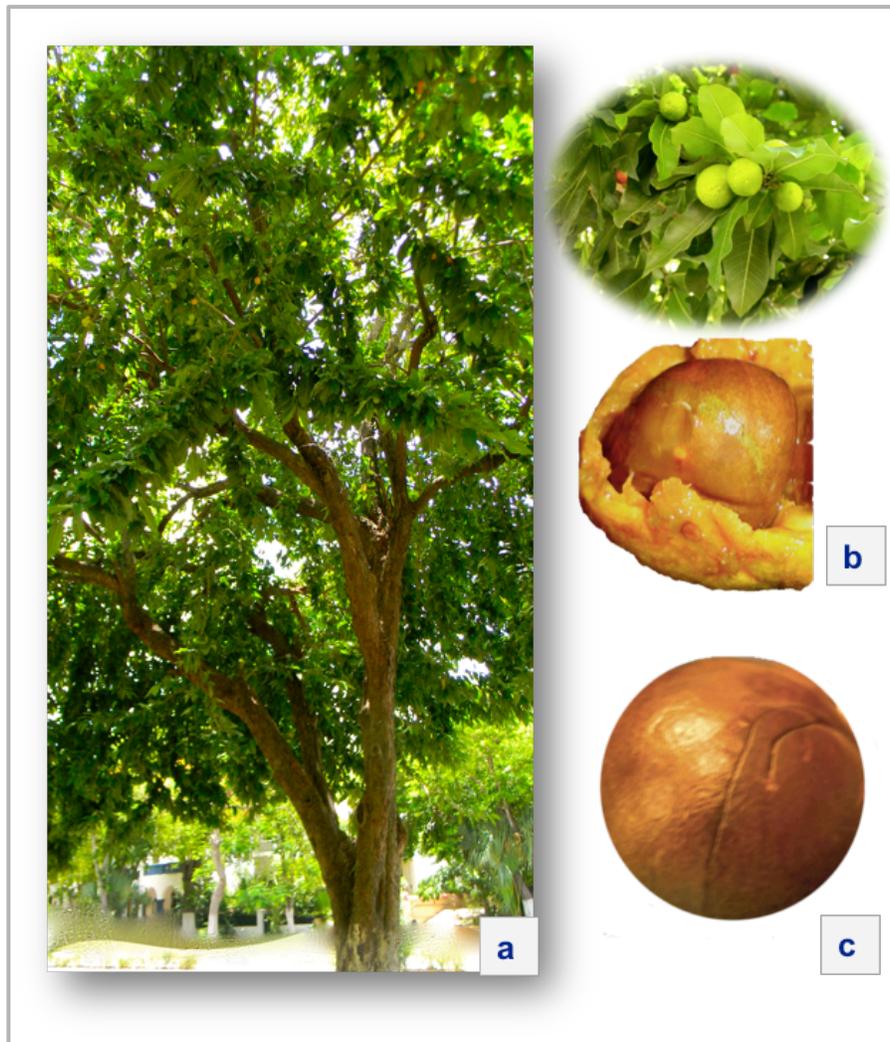


Figura 1.1. *Brosimum alicastrum* Sw. Árbol (a), fruto (b) y semillas (c).

Hábitat

El ramón es originario de bosques húmedos, adaptable a varios climas, tolerante a la sequía, pero se desarrolla mejor en llanos fértiles [19,21]. Sus condiciones ambientales de desarrollo oscilan entre temperaturas medias de 18 a 27 °C, con precipitaciones anuales de 600 a 1000 mm [21]; crece en suelos con pH de 6.8 a 8.2, someros, pedregosos, con drenaje rápido o muy rápido, a una altitud media de 221.3 msnm [16,17,19,25]. En Yucatán el árbol forma parte de la selva baja y mediana subcaducifolia [18].

Distribución

El árbol de ramón es originario de América tropical, es abundante en las selvas tropicales y subtropicales [24]; su extensión abarca varios estados de la República Mexicana, desde el sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo y desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas, pero predomina en los estados del sur del país (figura 1.2) [17]; se extiende por Centroamérica hasta Colombia, Perú y Venezuela, abarcando también varias islas del Caribe como: Trinidad y Tobago, Cuba y Jamaica [17].



Figura 1.2. Distribución del árbol de ramón en México [26].

Fenología

La polinización del ramón es anemófila. La floración y fructificación es variable, dependiendo de la región donde se localiza; pueden llegar a presentarse hasta dos períodos de fructificación anuales [17].

Producción del fruto y semilla

Los árboles llegan a alcanzar su etapa productiva a los 5 años [17,27]. Un árbol puede producir de 50 a 75 kg de fruto al año, de los que se pueden obtener de 16 a 29 kg de semilla seca, y en cada kilogramo encontrar de 300 a 350 semillas [17,19,24,27].

Tejada *et al.* [24] reportaron períodos de fructificación y floración del ramón en diversos estados de México. En el estado de Yucatán, Ortiz *et al.* [18] y Rosario Loria (comunicación personal) informan que la floración se presenta entre los meses de noviembre y febrero; la fructificación la mayor parte del año, siendo más abundante en los meses de enero, abril, mayo, junio y septiembre.

1.2 Composición de la semilla

Estudios realizados por la FAO [15], Peters *et al.* [27] y el Mayan Nut Institute [28] reportan que la semilla del ramón presenta aproximadamente un 75 % de carbohidratos, entre un 11 y 20 % de proteína, y alrededor de 1 % de grasa [15,27,28]. En la tabla 1.1 se muestra el contenido de macronutrientes reportado para 100 g de semilla seca.

Tabla 1.1. Composición de macronutrientes de la harina de semilla de ramón (*B. alicastrum*).

Nutrientes	Fuente			
	FAO ^a (1993)	Peters <i>et al.</i> ^b (1982)	Maya Nut Institute ^c (2007)	ANEXO I (2011)
Carbohidratos*	76.1	--	76.2	72.25
Fibra cruda*	6.2	4.6	18.94	4.96
Proteína*	11.4	12.8	9.28	12.24
Lípidos*	1.6	--	0.44	1.10
Energía**	363	361	345.9	347.86
Humedad (%)	6.5	40-50	10.95	5.88

*g en 100 g de muestra **kcal en 100g de muestra

Fuentes: ^a[15], ^b[27], ^c[28]

La proporción de los macro-nutrientes presentes en la semilla de ramón es similar a la de las gramíneas empleadas para la elaboración de bioetanol, como el maíz [29].

1.3 Producción energética

El 78.2 % de la energía mundial es producida a través de combustibles fósiles y tan solo un 19 % por fuentes de energía renovable [30].

El empleo excesivo de los combustibles fósiles, sus limitadas reservas y los daños ambientales que producen, son las principales razones por las que se debe disminuir su uso [11,31,32]. Para poder lograrlo se necesita ir sustituyendo las fuentes de energía de los principales sectores consumidores.

A nivel mundial uno de los sectores más demandantes de energía es el transporte, al cual se le destina el 44.8 % de la energía total producida [6]. En México la distribución energética es similar, ya que de un 85 % de energía fósil producida se le asigna el 48 % [5,31]. Para llevar a cabo una transición energética hacia fuentes de energía más sustentables para este sector, actualmente se emplean los biocombustibles.

1.4 Biocombustibles

Los biocombustibles son propuestos como una fuente alternativa para mitigar los efectos causados por los hidrocarburos derivados del petróleo. Son productos energéticos variados obtenidos a partir de la biomasa [33,34]. Los biocombustibles pueden ser clasificados de acuerdo a su uso (los empleados naturalmente y los procesados), origen (derivados de agricultura, forestales, pesqueros y residuos municipales) y estado físico (líquidos, sólidos y gaseosos) [31].

Las aplicaciones que poseen son diversas, los empleados y producidos actualmente para el sector transporte son: el bioetanol y el biodiesel [35]. Estos poseen propiedades físico-químicas similares a los hidrocarburos y se adaptan a la infraestructura que estos emplean. Son recursos renovables, biodegradables y la calidad de sus gases de emisión

es menos severa con el medio ambiente [31]; son considerados combustibles de carbono neutral y su producción puede impulsar el desarrollo del sector agrícola [31,36,37].

En el 2008 la producción de biocombustibles contribuyó un 2 % a la demanda mundial de combustibles para el transporte terrestre, y en el 2009 incrementó a un 3 % [32]. Para impulsar su crecimiento aún más, es necesario ampliar la gama de materias primas para su producción, desarrollar procesos productivos eficientes, rentables y sustentables.

1.5 Bioetanol

El bioetanol (alcohol etílico, ETOH) es un biocombustible que puede ser obtenido mediante procesos biológicos a partir de diversas materias primas, principalmente aquellas con altas concentraciones en azúcares o almidón [11]. Cuando su obtención es a partir de azúcares y almidones comestibles se le denomina de primera generación; de segunda generación los derivados de vegetales no comestibles como materiales celulósicos o lignocelulósicos; de tercera generación aquellos producidos a partir de cultivos energéticos como micro algas y pastos perennes [11,31,33,34,36].

El bioetanol atrae la atención del sector automotriz, por sus propiedades y ventajas como fuente energética renovable [11]. Puede ser empleado directamente como combustible o como oxigenante con la gasolina, en los motores de combustión interna. Como combustible, tiene un alto octanaje, alto calor de vaporización, amplios límites y altas velocidades de flamabilidad; estas características benefician al motor de combustión interna principalmente por proporcionarle velocidades de compresión altas, cortos tiempos de quemado y por lo tanto un motor de combustión ágil. Usado como oxigenante, el 35 % de oxígeno que contiene le brinda un razonable valor antidetonante, haciendo más eficiente la combustión y reduciendo considerablemente la emisión de partículas de CO y óxidos de nitrógeno [11].

El bioetanol ya había fungido como carburante para automoción. Desde finales del Siglo XIX en 1896 Henry Ford lo utilizó como combustible en el primer automóvil que diseñó, el "Quadricycle" [34]. Actualmente se emplean mezclas de etanol-gasolina en los principales

países productores de bioetanol, entre las más utilizadas se encuentran las mezclas: E25, E20, E10, E5 (el número indica el porcentaje de etanol presente en la mezcla) y la E85, usada sólo en automóviles modificados (Flex-Fuel) [11,34,38]. Como oxigenante se emplea sólo en proporciones del 5 al 10 % [11,34,38].

En la tabla 1.2 se muestran propiedades importantes del bioetanol como combustible, en comparación con la gasolina y oxidantes químicos como el metil terbutil éter (MTBE).

Tabla 1.2. Propiedades del bioetanol, gasolina y MTBE.

PROPIEDADES	Etanol	Gasolina	MTBE
Número de cetanos	<15	<15	-
Número de octanos	109	91-100	102-118
Temperatura de ignición (°C)	423	370	-
Calor latente de vaporización (kJ·kg ⁻¹)	920	380	-

Fuente:[11,35,38,39]

1.6 Principales países productores de bioetanol y materias primas utilizadas.

Entre los principales países productores de bioetanol se encuentran Estados Unidos, Brasil y China. En la tabla 1.3 se muestra como se ha incrementado su producción en los últimos años, y cuáles son los países considerados los mayores productores. Actualmente, las materias primas más demandadas en estos países para la producción de bioetanol son caña de azúcar, maíz y trigo [11].

Tabla 1.3. Principales países productores de bioetanol.

País	Miles de millones de galones producidos				
	2004	2005	2006	2011	2012
USA	3.54 ^c	4.26 ^c	4.85 ^c	14.4 ^a	13.76 ^a
Brasil	3.99 ^c	4.23 ^c	4.49 ^c	5.57 ^a	5.57 ^a
China	0.96 ^c	1.00 ^c	1.02 ^c	0.55 ^a	0.5 ^a
India	0.46 ^c	0.45 ^c	0.50 ^c	0.14 ^b	N/R
Francia	0.22 ^c	0.24 ^c	0.25 ^c	0.31 ^b	N/R
Alemania	0.07 ^c	0.11 ^c	0.20 ^c	0.20 ^b	N/R
Rusia	0.2 ^c	0.20 ^c	0.17 ^c	N/R	N/R
Canadá	0.06 ^c	0.06 ^c	0.15 ^c	0.46 ^b	0.44 ^a
Sudáfrica	0.11 ^c	0.10 ^c	0.10 ^c	0.38 ^b	0.42 ^a
Tailandia	0.07 ^c	0.08 ^c	0.09 ^c	0.13 ^b	N/R
N/R no reportado			Fuente: ^a [40], ^b [41], ^c [11]		

Para los fines de esta investigación, en la tabla 1.4 se reporta la producción potencial de las materias primas amiláceas empleadas en la producción de bioetanol, señalando su contenido de carbohidratos, rendimiento por hectárea, así como su producción y rendimiento de bioetanol.

Tabla 1.4. Producción y rendimientos de bioetanol a partir de materias primas amiláceas.

Materia prima	Rendimiento del cultivo (ton·ha ⁻¹)	Contenido de carbohidratos (%)	Producción potencial de bioetanol (L·ton ⁻¹)	Rendimiento de bioetanol (Kg·ha ⁻¹ ·año ⁻¹)
Papa	45 ^a	80-90 ^c	110 ^a	3880 ^a
Yuca	40 ^a	22-31 ^b	180 ^a	6000 ^a
Maíz	5 ^a	72 ^c	360 ^a	2050 ^a
Arroz	5 ^d	75 ^a	450 ^d	2250 ^d
Trigo	4 ^a	80-90 ^c	340 ^a	1560 ^a

Fuente: [11]^a, [42]^b, [2]^c, [43]^d

1.7 Proceso de producción de bioetanol

La producción de bioetanol a partir de compuestos amiláceos comprende etapas determinantes para lograr desdoblar completamente el almidón en azúcares simples, que puedan ser fermentados por el microorganismo productor de alcohol [11,36]. Las principales etapas para obtener bioetanol anhidro, apto para ser utilizado como biocombustible, a partir de sustratos amiláceos son: hidrólisis, fermentación, destilación y deshidratación (figura 1.3) [31].



Figura 1.3. Proceso de producción de bioetanol a partir de compuestos amiláceos.

1.7.1 Almidón

El almidón es el principal polisacárido de reserva energética de la mayoría de los vegetales; se le puede encontrar en gramíneas, leguminosas y tubérculos [44]. Está constituido por dos polímeros de glucosa de alto peso molecular, la amilosa y la amilopectina que juntas forman gránulos insolubles (figura 1.4) [45,46]. La proporción de cada uno de los polímeros varían de acuerdo con su fuente vegetal de procedencia [46,47]; sin embargo, por lo general la amilopectina constituye hasta un 75 % de la composición del gránulo [48].

Ambos polímeros tienen como monómero a la α -D-glucosa unida por enlaces glucosídicos. La amilosa enlaza sus monómeros mediante los enlaces $\alpha(1, 4)$ formando una molécula lineal, mientras que la amilopectina entrelaza sus monómeros con enlaces lineales $\alpha(1, 4)$ y enlaces $\alpha(1, 6)$, dando origen a una estructura ramificada [46].

La amilopectina tiene un alto grado de organización estructural; cuando se alternan zonas densamente ramificadas y zonas vacías, permiten el acceso de cadenas lineales (amilosa) que se ordenan en paralelo formando dobles hélices [12]. Esta conformación es la responsable de la naturaleza semi-cristalina del almidón.

Existen dos tipos de estructura cristalina para el almidón, la tipo A y la B, las cuales difieren en la simetría y la longitud de las cadenas [12]. La tipo A está generalmente presente en cereales y la B en plantas que producen tubérculos [49]. La composición y conformación estructural del almidón es determinante en su transformación a compuestos más simples, ya que influye sobre la manera en que se debe realizar el proceso.

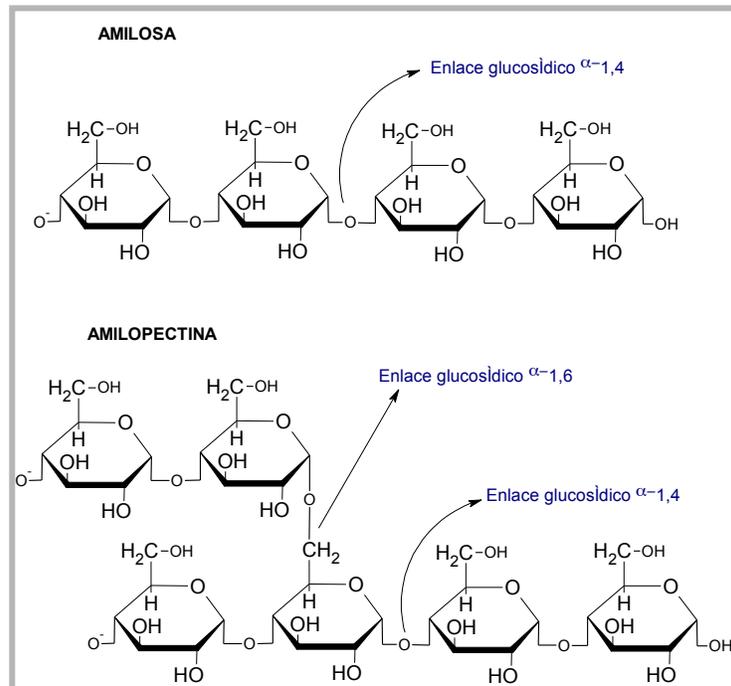


Figura 1.4. Segmentos de una molécula de amilosa y de amilopectina.

1.7.2 Pre-tratamiento

El pre-tratamiento es empleado para modificar la estructura de carbohidratos complejos usados en la producción de bioetanol, y facilitar su transformación a compuestos más simples. En materias amiláceas tiene como objetivo favorecer la hidrólisis enzimática del almidón.

Dependiendo de la naturaleza del almidón, solo en ocasiones es necesario llevar a cabo un pre-tratamiento. Cuando se emplea, se busca disminuir el tamaño de grano y la

cristalinidad del almidón [49], para incrementar el área de contacto entre la enzima y el sustrato [50].

Actualmente existen diversas metodologías para realizar el pre-tratamiento de carbohidratos complejos como tratamientos ultrasónicos [51], explosión de vapor [52], con amonio [53], hasta térmicos [35,50,54]. El más empleado a nivel industrial para materias amiláceas es el tratamiento térmico, que consiste en someter una suspensión de harina a temperaturas mayores a los 100 °C, con tiempos de residencia no mayores a diez minutos, bajo presión y fuerzas de cizallamiento, lo que genera una dispersión de los gránulos de almidón y una disminución de su viscosidad [35,55]. Comparado con los tratamientos anteriormente mencionados la demanda de energía y recursos es menor.

1.7.3 Hidrólisis

Es la reacción entre una molécula de agua y una molécula orgánica o inorgánica, donde la disociación del agua produce moléculas más simples.

En la hidrólisis, los carbohidratos complejos como el almidón, en presencia de agua, son transformados a moléculas más cortas o azúcares fermentables [36], tal como se muestra en la ecuación 1.1:



La hidrólisis del almidón generalmente se realiza por vía ácida o enzimática.

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es el método más empleado para transformar el almidón en glucosa, maltosa, isomaltosa o su transformación parcial a dextrinas [56]. Consiste en el uso de ácidos fuertes como HCl y H₂SO₄ (pH 1-2), bajo temperaturas y presiones elevadas (150 a 230 °C y 1 a 4 atm) [57]; el nivel de degradación depende de estos factores. Los ácidos

causan un rompimiento de los enlaces glucosídicos $\alpha(1, 4)$, $\alpha(1, 6)$ y enlaces internos de la α -D-glucosa, alterando de esta forma la estructura y propiedades del almidón.

Hidrólisis enzimática

Se realiza con ayuda de biocatalizadores de naturaleza proteica (compuestos de origen biológico) llamados enzimas, que tienen la propiedad de acelerar las reacciones químicas. La actividad de las enzimas es muy específica sobre determinados sustratos, debido a que los sitios activos que poseen son muy selectivos y presentan su mayor actividad sólo bajo determinadas condiciones fisicoquímicas. Por ello, para obtener los mejores resultados en la hidrólisis, es necesario seleccionar la enzima más adecuada dependiendo del tipo de sustrato y trabajar bajo condiciones óptimas [58].

A continuación, se mencionan algunos factores que tienen una influencia relevante sobre la actividad enzimática y, por consiguiente, en el control y manipulación de los subproductos [59]:

pH: Es uno de los parámetros importantes que se debe considerar al momento de llevar a cabo una hidrólisis enzimática, sobre todo porque puede llegar a alterar la estructura molecular y la participación de los grupos iónicos involucrados en la actividad catalítica y la estabilización de la enzima. Cada enzima posee un pH óptimo bajo el cual realiza su máxima actividad y que está influenciado por el sustrato sobre el cual actúa [60].

Temperatura de actividad: La actividad catalítica de la enzima depende de su naturaleza y se incrementa conforme alcanza su temperatura óptima de actividad. Sin embargo, después de sobrepasar esta temperatura hasta un ligero incremento puede causar su desnaturalización, ya que ocasiona cambios intermoleculares que modifican los sitios activos [61].

Tiempo de reacción: El tiempo de reacción determina la calidad y cantidad de los productos y varía proporcionalmente con la cantidad de enzima empleada [59].

Carga de sustrato: Es uno de los factores más importantes que afectan la actividad catalítica de la enzima, a lo largo de la reacción. Cuando a una cantidad fija de enzima se añade sustrato, la velocidad de la reacción incrementa exponencialmente, ya que existen más moléculas de sustrato y es más probable una reacción con la enzima; sin embargo, cuando hay un excedente de sustrato, la enzima se satura y ya no es capaz de hidrolizar el excedente de sustrato [59]. Por lo tanto, es necesario tener una concentración adecuada de sustrato para asegurar su interacción con la enzima y traducirla en una hidrólisis eficiente [59].

La hidrólisis enzimática presenta grandes ventajas con respecto a la ácida, debido a que proporciona productos de mayor calidad, se controla la formación de subproductos no deseados y tiene una mayor eficiencia [62,63].

La hidrólisis del almidón por vía enzimática se efectúa en dos etapas: licuefacción y sacarificación. A continuación se describe cada etapa:

a) Licuefacción

Es una hidrólisis parcial en la que se emplea α -amilasa, que es una endo-enzima que se obtiene principalmente de bacterias termo resistentes como *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* [11,36]; la reacción se realiza a temperaturas de 90 a 110 °C, a 1 atm de presión y a un pH de 6 a 8 [57]. Esta enzima realiza cortes internos aleatoriamente sobre los enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$ de las moléculas de almidón, como se muestra en la figura 1.5 [64,65]. La viscosidad de la solución de almidón disminuye rápidamente [57], el producto principal derivado de la reacción de licuefacción es una solución amilácea que contiene dextrinas y pequeñas cantidades de glucosa [36]. Para cada tipo de sustrato que se desee hidrolizar, se debe evaluar el tipo de enzima que se va a utilizar; y controlar la actividad y las condiciones óptimas (temperatura, pH, concentración) de la reacción [11].

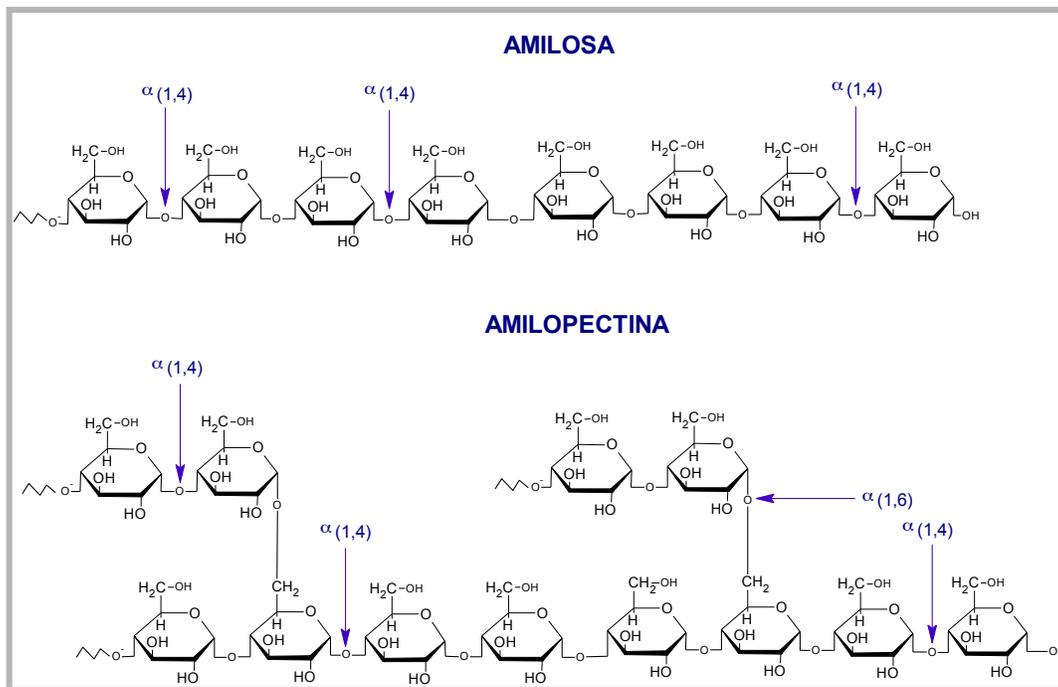


Figura 1.5. Representación aleatoria de los enlaces glucosídicos sobre los que la enzima α -amilasa realiza la hidrólisis.

a) Sacarificación

Es una hidrólisis adicional a la licuefacción donde se produce principalmente maltosa, maltotriosa, glucosa y algunos oligómeros [66]. Esta reacción se lleva a cabo a temperaturas menores que las de la licuefacción (60-70 °C), utilizando amiloglicosidasas, que son exo-amilasas obtenidas principalmente de *Aspergillus niger* o *Rhizopus sp.* [36], cuya función es catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$, obteniendo en forma escalonada y sucesiva la glucosa de los extremos no reductores de los oligosacáridos (figura 1.6) [67]. Las amiloglicosidasas hidrolizan 20 a 30 veces más rápido los enlaces $\alpha(1,4)$ que los $\alpha(1,6)$ [46].

En la etapa de sacarificación, el tiempo de incubación es el parámetro más fluctuante entre las diversas materias primas amiláceas, ya que la respuesta de afinidad que presenta la enzima amiloglicosidasa sobre el sustrato depende de los productos formados durante la etapa de licuefacción [67,68].

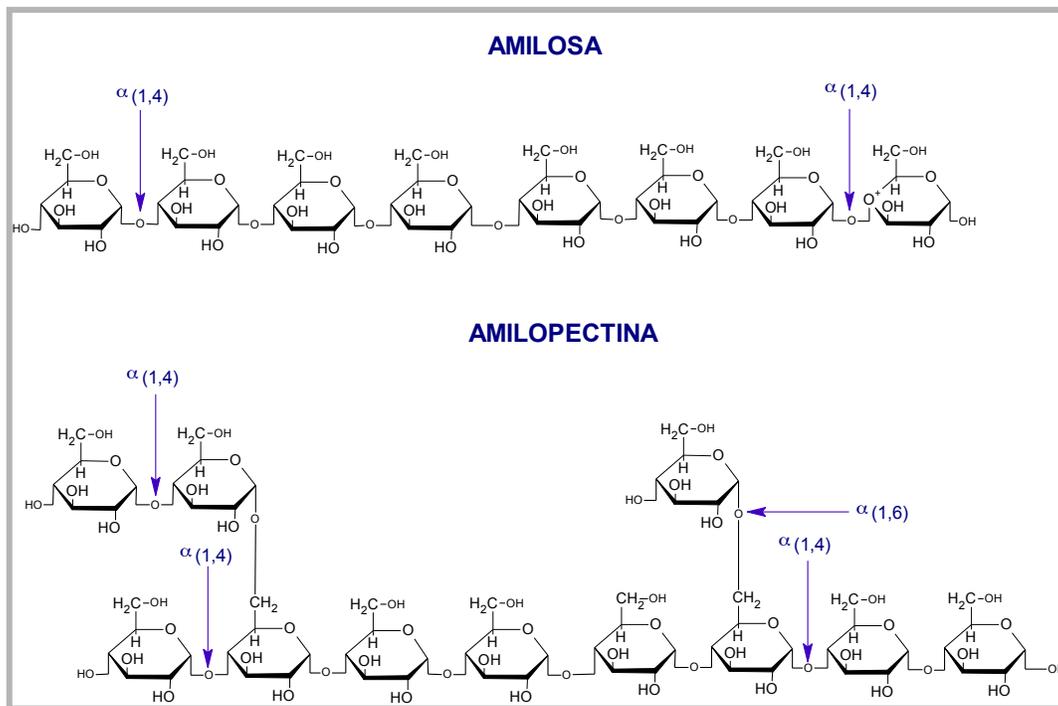


Figura 1.6. Representación de los extremos no reductores sobre los que la enzima amiloglucosidasa realiza la hidrólisis.

1.7.4 Fermentación

La fermentación es el proceso anaerobio por el cual los sustratos son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. La conversión de carbohidratos a bioetanol por la acción de ciertos microorganismos es llamada fermentación alcohólica [66]. Grupos microbianos como bacterias (*Zymomonas mobilis*, *Zymobacter palmae*, *Escherichia coli*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*) son empleados en los procesos de fermentación alcohólica [2].

Las rutas metabólicas usadas por cada grupo difieren, y su eficiencia fermentativa está influenciada por diversos parámetros como: la naturaleza del microorganismo fermentador, la concentración del inóculo, su viabilidad y estabilidad genética, su velocidad de crecimiento, su resistencia a etanol y tolerancia a inhibidores; la temperatura de fermentación y el pH [69,70,71].

- **Levaduras**

Las levaduras son los microorganismos más empleados para llevar a cabo la fermentación alcohólica, entre ellas históricamente *Saccharomyces cerevisiae* es la más utilizada.

Las levaduras son hongos predominantemente unicelulares, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se clasifican en los *Phyla Ascomycota* y *Basidiomycota* del reino *Fungi*. Su reproducción vegetativa se realiza por gemación o fisión, y no forman su estado sexual dentro de un cuerpo fructífero [70,72,73]. El crecimiento de las levaduras se presenta tanto en condiciones anaerobias como aerobias y presenta cinco fases de crecimiento: la fase lag que es un período de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse; la fase logarítmica en la que las células alcanzan su máxima capacidad de duplicación y presentan un metabolismo fermentativo; el cambio diáuxico, en el cual debido a las bajas concentraciones de glucosa la célula detiene momentáneamente su división y cambia su metabolismo fermentativo a uno respiratorio; la fase postdiáuxica, donde cambia su fuente de carbono por el alcohol producido en la fase logarítmica y comienzan a incrementar su resistencia al estrés gradualmente; y por último la fase estacionaria donde los nutrientes son escasos y no hay más división celular, en esta fase la levadura acumula diversos carbohidratos de reserva (trehalosa y glucógeno), alcanza su máxima resistencia al estrés y su pared se vuelve más gruesa y resistente [74].

Saccharomyces cerevisiae posee un complejo sistema de transporte de azúcares, contiene hasta 20 genes que controlan el transporte de hexosas, y alcanza velocidades de transporte de 10^7 moléculas de glucosa/célula/segundo [2]. *S. cerevisiae* metaboliza principalmente mono y disacáridos entre ellos, D-glucosa, D-fructosa y D-manosa; aunque algunas cepas también fermentan sacarosa, melibiosa, rafinosas, maltosa y D-galactosa [75,76,77].

La glucólisis o vía Embden-Myerhof-Parnas (EMP) es la principal ruta metabólica utilizada por *S. cerevisiae* para oxidar una molécula de glucosa y producir dos moléculas de

piruvato que en condiciones anaerobias se reduce a etanol y CO₂, tal como se muestra en la figura 1.7 [70].

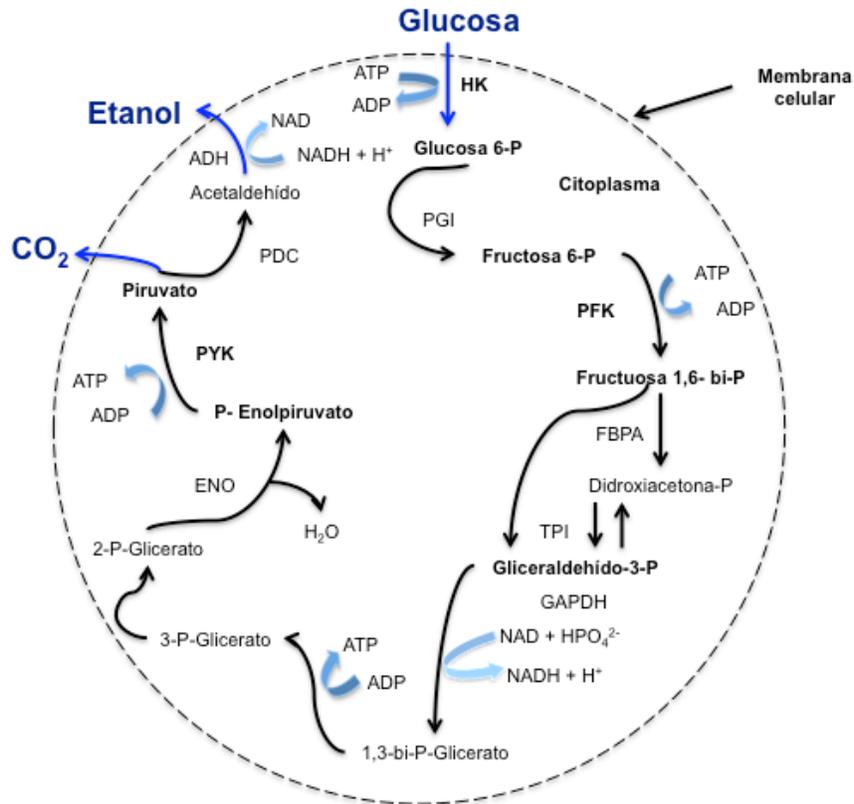
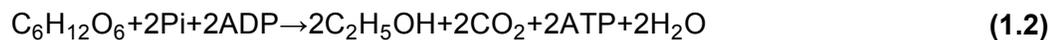


Figura 1.7. Ruta metabólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica. HK:hexoquinasa, PGI: fosfoglucoisomerasa, PFK: fosfofructoquinasa, FBPA: fructosa di-fosfato aldosa, TPI: triosa fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfogliceratoquinasa, PGM: fosfogliceromutasa, ENO: enolasa, PYK: piruvatoquinasa, PDC: piruvato descarboxilasa, ADH: alcohol deshidrogenasa [72].

Los rendimientos teóricos por gramo de glucosa son de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ [71]. La producción de etanol es expresada mediante la Ec. 1.2 [75]:



Durante la fermentación se producen dos moléculas de ATP (por sus siglas en Inglés: adenosine triphosphate), junto con varios subproductos como: ésteres, aldehídos, glicerol,

ácidos orgánicos y alcoholes superiores [78]. El glicerol es producido a razón de 1% (w/v) en la mayoría de las fermentaciones alcohólicas. La producción de estos subproductos disminuyen el rendimiento de etanol [72].

En las fermentaciones también queda cierta cantidad de azúcar residual que no es metabolizada por el microorganismo, la cual está presente en concentraciones de 2 a 5 g·L⁻¹ [72].

Las condiciones de cultivo de *S. cerevisiae* varían de acuerdo con las características peculiares de la cepa y los sustratos utilizados en la fermentación. Por ello para obtener una alta eficiencia en la producción de bioetanol es necesario conocer los parámetros óptimos para el desarrollo y actividad de cada cepa. Así, de acuerdo con la bibliografía especializada en el tema, la temperatura óptima de crecimiento debe oscilar entre 30-35 °C [79,80]; el pH del sustrato debe encontrarse alrededor de 4.5 [81]; como fuente de nitrógeno debe suministrarse sulfato de amonio o urea en concentraciones de 0.8-1.5 g L⁻¹ [82]; el tiempo de fermentación varía entre 48 y 72 h [81], lo que depende de los anteriores factores abióticos mencionados [36,69,83]; y su tolerancia a concentraciones de etanol oscilan entre el 10 y 15 % v/v [75,84].

La viabilidad de la levadura es determinada por la cantidad de células vivas en un determinado volumen. El método más empleado para evaluar la viabilidad es la tinción con azul de metileno, el cual es un colorante vital que no es reducido por las células muertas, por lo que se tiñen de color azul. Al observar en una cámara de Neubauer levaduras tratadas previamente con dicho colorante, se pueden cuantificar fácilmente las células muertas y vivas, y determinar el porcentaje de viabilidad. Una viabilidad del 90 % es aceptable para comenzar el proceso de fermentación [82,85].

- **Producción del inóculo**

La finalidad de producir el inóculo es tener una cantidad suficiente de células en estado activo previo al inicio de la fermentación. Para producir el inóculo, se le brindan a la levadura los nutrientes y las condiciones óptimas para su crecimiento y reproducción con

el fin de incrementar su biomasa. En ocasiones con el fin de disminuir la fase de adaptación de la levadura se emplea el mismo medio o sustrato que se fermentará. El inóculo generalmente representa el 10 % del volumen total a fermentar y su adición se realiza cuando la levadura está en la fase exponencial de crecimiento [46].

1.7.5 Destilación

La destilación es un proceso de separación mediante evaporación y condensación. En la producción de bioetanol se busca separar el azeótropo bioetanol-agua del caldo de fermentación, mediante el suministro de calor, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de los compuestos. La temperatura debe ser lo más cercana al punto de ebullición de la sustancia de interés, una vez alcanzada esta temperatura, se prosigue a condensar el vapor producido para obtener la sustancia en forma líquida [11]. El etanol posee una temperatura de ebullición de 78 °C [83] y el agua una de 100 °C [75], su azeótropo tiene una temperatura de vaporización alrededor de 78.15 °C, a la cual se debe llevar a cabo la destilación.

1.7.6 Deshidratación

Es un método de rectificación de la destilación, que produce bioetanol puro al 99%. Consiste en separar el azeótropo formado por el bioetanol-agua. Actualmente, se emplean tamices moleculares para producir bioetanol absoluto [75].

El procedimiento consiste en pasar la mezcla etanol-agua, a través de un equipo generalmente cilíndrico, que contiene un lecho de material adsorbente. La diferencia de afinidad de las moléculas de bioetanol y agua con respecto al adsorbente, permite que esta última quede atrapada en el lecho a través de fenómenos de transporte superficial, mientras el bioetanol pasa a través del mismo, aumentando su concentración en la corriente de salida del aparato [84].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial es necesario revisar la producción energética, ya que cubrir la demanda de energía respecto al crecimiento poblacional a partir de fuentes fósiles, se vuelve un reto cada vez más difícil; esto debido a que mientras las reservas de estos decrecen, sus costos se elevan. Por otro lado, su utilización provoca un impacto ambiental negativo, al aportar GEI que contribuyen al calentamiento global.

El transporte se encuentra dentro de los principales sectores consumidores de energía fósil, por lo que buscando una transición hacia fuentes renovables que satisfagan su demanda energética, se propone el uso de biocombustibles, entre ellos el bioetanol ya que no incrementa emisiones globales de CO₂ y su producción es más económica que la de los hidrocarburos.

JUSTIFICACIÓN

Por lo señalado en el párrafo anterior, en México y específicamente en el estado de Yucatán crece un árbol conocido como ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.), es perenne, adaptable a climas cálidos y húmedos, con amplia distribución en el resto del país [26]. Es un árbol que se emplea principalmente como forraje [24,86]. *Brosimum alicastrum* Sw. produce semillas con un contenido de carbohidratos mayor al 70% (ANEXO I), siendo éste semejante al que presentan gramíneas como sorgo o maíz empleadas en la producción de bioetanol.

A partir de estas características y tomando en cuenta que actualmente la semilla carece de un valor comercial, la presente investigación propone el desarrollo de una metodología que permita evaluar su potencial como materia prima para la producción de bioetanol.

HIPÓTESIS

La semilla de ramón es una materia prima que por su alto contenido en carbohidratos tiene potencial para ser utilizada en la producción de bioetanol.

OBJETIVO GENERAL

Establecer una metodología para la obtención de bioetanol a partir de la harina de semilla de ramón (*B. alicastrum* Sw.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los azúcares reductores directos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de la harina de semillas del ramón, usando α -amilasa y amiloglucosidasa comerciales.
- Crecer la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* (marca SAFOENO) en el hidrolizado enzimático de la harina de semillas de ramón.
- Cuantificar el consumo de azúcares reductores y su conversión a bioetanol realizado por la cepa comercial de *S. cerevisiae* (marca SAFOENO) durante el proceso de fermentación.
- Cuantificar el contenido de bioetanol presente en los destilados obtenidos a partir de los mostos fermentados de la harina de ramón.
- Estimar la producción de bioetanol a partir de la harina de semilla de ramón.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Todos los reactivos que se emplearon fueron grado analítico. Ácido sulfúrico (97 %, J. T. Baker, México), cloruro de calcio (99 %, Sigma-Aldrich, Japón), sulfato de amonio (99.6 %, J. T. Baker, E.U.A), fosfato de sodio monobásico (99 %, Sigma-Aldrich, Alemania), fosfato de sodio di-básico (99 %, Sigma-Aldrich, Alemania), tartrato de sodio y potasio (J. T. Baker, México), metabisulfito de sodio (98%, J. T. Baker, México), hidróxido de sodio (J. T. Baker, México), ácido 3,5-dinitrosalicílico (99 %, Sigma-Aldrich, India), Fenol (Fermont, México), dicromato de potasio (Fermont, México), Dextrosa (J. T. Baker, México), extracto de levadura (MCD LAB, México), Peptona bacteriológica (MCD LAB, México), agar bacteriológico (BD Bioxon, México).

Enzimas: α -amilasa (*Bacillus amyloliquefaciens*, $\geq 250 \text{ KNU}\cdot\text{mL}^{-1}$, Novozymes Corp., Dinamarca) y amilogucosidasa AMG 300L (*Aspergillus niger*, $300 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, Novozymes Corp., E.U.A).

2.2 Material biológico

En la preparación del inóculo para la fermentación se utilizó la levadura comercial de vinificación *Saccharomyces cerevisiae* marca Safoeno (Safmex S. A de C. V., México).

La levadura se reactivó mediante cultivo en placas de medio GELPA: Glucosa ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extracto de levadura ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), que fueron incubadas en obscuridad a $30\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 días, para obtener una viabilidad mayor al 99% antes de ser empleadas para la preparación del inóculo. Los cultivos fueron conservados en suspensión acuosa en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

La viabilidad se determinó por medio de la tinción de azul de metileno [82,85] y la concentración celular se cuantificó en una cámara de Neubauer, ambas se determinaron después de reactivar la levadura mediante su cultivo en placas de GELPA; a cada placa se agregaron 6 ml de agua destilada, para obtener una suspensión de levaduras en agua. Un mililitro de la suspensión se diluyó con agua destilada hasta obtener una dilución 1:100. Posteriormente, en un vial se mezcló 1 mL de la dilución 1:100 con 1 mL de una solución de azul de metileno [82,85], la suspensión se agitó y una alícuota de 100 μL se transfirió a una cámara de Neubauer, la que se observó en un microscopio a 40X; se cuantificaron las levaduras vivas y muertas presentes en un volumen 0.8 μL (ANEXO III) y se prosiguió a realizar los cálculos correspondientes de acuerdo a la ecuación 2.1 y ecuación 2.2.

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(\frac{\text{células totales} - \text{células teñidas}}{\text{células totales}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

$$\text{Conc. celular (cel} \cdot \text{mL}^{-1}) = \left(\frac{\text{células totales}}{0.8 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right) (\text{factor de dilución}) \quad (2.2)$$

2.3 Estrategia experimental

Para lograr los objetivos del presente trabajo se siguió la siguiente estrategia experimental:

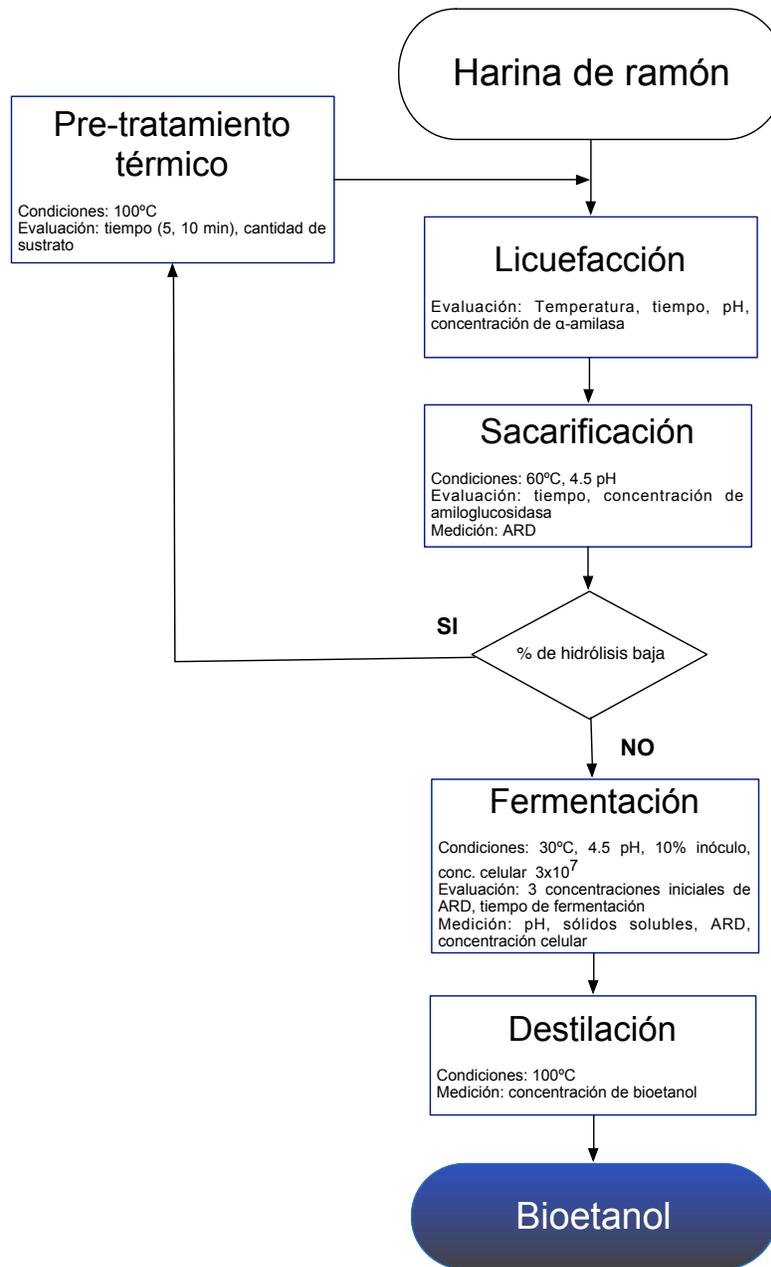


Figura 2.1. Estrategia experimental para la producción de bioetanol a partir de la harina de ramón.

2.4 Materia prima

2.4.1 Harina de semilla de ramón

La harina de ramón fue proporcionada por el Dr. Alfonso Larqué Saavedra. En la figura 2.2 se muestra la harina empleada en el presente estudio.



Figura 2.2. Harina de semilla de ramón.

2.4.2 Determinación de humedad de la semilla de ramón.

La determinación de humedad se realizó con el fin de emplear este dato en la estimación de producción potencial de la semilla de ramón.

Para determinar el contenido de humedad de las semillas, éstas se pesaron y posteriormente se secaron a 70 °C en un horno ED series 115 (BINDER, Colombia), hasta alcanzar un peso constante. El porcentaje de humedad se calculó con la ecuación 2.3.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso de la semilla húmeda (g)}}{\text{peso de la semilla seca (g)}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.5 Hidrólisis

La hidrólisis del almidón contenido en la harina de semillas de ramón se realizó en dos etapas: la licuefacción y la sacarificación. Para cada etapa se determinaron las mejores condiciones de trabajo.

2.5.1 Licuefacción

Debido a que los parámetros de trabajo de α -amilasa proporcionados por el proveedor fueron limitados, fue necesario determinarlos experimentalmente.

2.5.1.1 Efecto de la concentración de la enzima α -amilasa

Con el fin de conocer la cantidad mínima de enzima necesaria para hidrolizar 1 g de almidón, se probaron nueve concentraciones de enzima α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (0, 0.001, 0.01, 0.02, 0.05, 0.15, 0.3, 0.6 y 6 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón) que fueron adicionadas de forma individual en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían una suspensión al 10 % p/v de fécula de maíz (empleado como estándar de almidón) con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M ajustada a pH 6 (ANEXO II) en la que se disolvieron 60 ppm de Ca^{2+} . Los matraces se colocaron en baño María a 85 °C, con agitación durante 1 h.

Los ARD producidos en cada uno de los tratamientos se cuantificaron después de realizar la sacarificación, debido a que la técnica de DNS solo identifica azúcares con extremo reductor y las dextrinas formadas en esta etapa carecen de éste. En la sacarificación el pH de la suspensión fue regulado a 4.5 con ayuda de una solución al 5 % v/v de H_2SO_4 , después se colocó en cada uno de los matraces una cantidad excesiva de amiloglucosidasa de 12 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón y fueron incubados a 60 °C durante 24 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.5.1.2 Determinación de las variables para obtener la actividad óptima de α -amilasa en harina de semilla de ramón.

En baño María se colocaron matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían una suspensión al 25 % p/v de harina de ramón en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M (ANEXO II) en la que se disolvieron 60 ppm de Ca^{2+} .

Las variables determinadas en forma secuencial fueron: pH, temperatura y tiempo de reacción. Se evaluaron dos valores de pH: 6 y 7, por ser los óptimos sobre los cuales la α -amilasa desempeña una mejor hidrólisis, según lo reportado por Gupta *et al.* (2003) [87]. Las temperaturas de reacción sobre las que se cuantificó la actividad de α -amilasa fueron: 70, 80 y 85 °C [87,88]; y también se determinaron diferentes tiempos de reacción de 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 h [29].

En la tabla 2.1 se muestran en forma concisa y ordenada las diversas variables evaluadas. Primero se determinó el pH bajo los parámetros mostrados en la columna 1 [29], una vez obtenido el pH óptimo, éste se utilizó y se prosiguió a determinar la temperatura óptima de la reacción (columna 2) y por último el tiempo óptimo de la reacción (columna 3).

El efecto de los parámetros evaluados, se determinó por la cantidad de ARD producidos después de la etapa de sacarificación que se mantuvo constante para todos los tratamientos bajo las condiciones mencionadas en la columna 4 de la tabla 2.1. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Tabla 2.1. Variables evaluadas para determinar las condiciones de actividad óptima de α -amilasa (de *Bacillus amyloliquefaciens*).

Etapa de hidrólisis	LICUEFACCIÓN			SACARIFICACIÓN
	Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4
Parámetros	Evaluación del pH	Evaluación de la temperatura	Evaluación del tiempo de reacción	Condiciones constantes
pH	6, 7	6	6	4.5*
Temperatura (°C)	85	70, 80, 85	85	60*
Tiempo (h)	4	4	0.25, 0.5, 1, 1.5, 2	52
α -amilasa ($\mu\text{L g}^{-1}$ de almidón)	0.3**	0.3**	0.3**	N/A
amiloglucosidasa ($\mu\text{L g}^{-1}$ de almidón)	N/A	N/A	N/A	1.57

* De acuerdo a recomendaciones del fabricante de la enzima [89].

** Cantidad de enzima determinada en la sección 2.5.1.1

N/A no aplica

2.5.2 Sacarificación

2.5.2.1 Efecto de la concentración de la amiloglucosidasa

Se utilizaron suspensiones de harina de ramón al 25 % p/v previamente hidrolizadas con 0.3 μL de α -amilasa $\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón bajo condiciones óptimas obtenidas en la sección 2.5.1 (60 ppm de Ca^{2+} , pH 6, a 85°C, durante 1 h). De acuerdo con las especificaciones del

fabricante primero se ajustó el pH de cada una de las muestras a 4.5 con una solución al 5 % v/v de H₂SO₄ [89]; en seguida fueron adicionadas en forma individual seis diferentes cantidades de amiloglucosidasa (0, 0.6, 0.9, 1.2, 2, 2.4, 8.2 μL·g⁻¹ de almidón) e incubadas a 60 °C [89], por 52 h para garantizar la sacarificación completa de las dextrinas, sin embargo el tiempo óptimo de la reacción fue evaluado posteriormente.

Al finalizar la reacción se midieron los ARD producidos. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.5.2.2 Tiempo de reacción

En la sacarificación se evaluaron tres tiempos de reacción: 4, 24 y 52 h; sobre una suspensión de harina de ramón previamente hidrolizada, de la misma forma como se describe en el inciso 2.5.2.1. La concentración de amiloglucosidasa empleada fue de 1.2 μL·g⁻¹ de almidón, ya que a esta concentración se obtuvieron los mejores resultados; fue incubada a 60 °C y pH 4.5.

Al finalizar la reacción se midieron los ARD producidos. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.6 Pre- tratamiento térmico

La evaluación del pre-tratamiento térmico se llevó a cabo después de haber encontrado las condiciones óptimas de trabajo de las etapas de licuefacción y sacarificación descritas en la sección 2.5, para determinar si con su empleo se incrementaba la hidrólisis final del almidón de la harina de semilla de ramón, tal como ocurre en almidón de harina de maíz [90].

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se preparó una suspensión al 25% p/v de harina de semilla de ramón con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M ajustada a pH 6 (ANEXO II) en el que se disolvieron 60 ppm de Ca²⁺ en forma de CaCl₂·2H₂O empleado

como estabilizador térmico para α -amilasa [29,87]. La suspensión se colocó en baño María a 100 °C, durante 5 y 10 min [91]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La eficiencia del pre-tratamiento se determinó por la cantidad de ARD liberados una vez concluidas las etapas de licuefacción y sacarificación, las cuales se realizaron bajo las condiciones especificadas en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones empleadas en la licuefacción y sacarificación para evaluar la respuesta del pre-tratamiento térmico sobre estas etapas.

Parámetros	LICUEFACCIÓN	SACARIFICACIÓN
pH	6*	4.5**
Temperatura (°C)	85*	60**
Tiempo (h)	1*	24*
α -amilasa ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón)	0.3*	N/A
Amiloglucosidasa ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón)	N/A	1.2*

* De acuerdo a lo determinado en el presente estudio

** De acuerdo a recomendaciones del fabricante de la enzima [89].

N/A no aplica

2.7 Cantidad de sustrato

Una vez establecidas las condiciones óptimas del pre-tratamiento térmico, licuefacción y sacarificación, se evaluó la cantidad de sustrato. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 20 g de harina de ramón y se varió el volumen de solución amortiguadora de fosfatos, para obtener suspensiones de 15, 20, 25 y 30 % p/v que fueron sometidas a las condiciones de trabajo especificadas en la tabla 2.3. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Se cuantificaron los ARD obtenidos después de la sacarificación de cada tratamiento, y de acuerdo con estos resultados se eligió la suspensión con mayor cantidad de almidón hidrolizado y cuyas concentraciones de ARD propiciarán una mejor fermentación.

Tabla 2.3. Condiciones empleadas para la evaluación de la carga de sustrato y la evaluación de la metodología, durante la hidrólisis.

Parámetros	PRE- TRATAMIENTO	LICUEFACCIÓN	SACARIFICACIÓN
pH	6*	6*	4.5**
Temperatura (°C)	100*	85*	60**
Tiempo	5 min*	1 h*	24 h*
α -amilasa ($\mu\text{L g}^{-1}$ de almidón)	N/A	0.3*	N/A
amiloglucosidasa ($\mu\text{L g}^{-1}$ de almidón)	N/A	N/A	1.2*

* De acuerdo a lo determinado en el presente estudio

** De acuerdo a recomendaciones del fabricante de la enzima [89].

N/A no aplica

2.8 Evaluación de la metodología empleada en la hidrólisis

Para realizar la evaluación de la etapa de hidrólisis usada en la presente investigación, se compararon los resultados al ser aplicada, en las mismas condiciones, en harina de maíz y harina de semilla de ramón (tabla 2.3). Para ambas harinas se empleó una suspensión 20 % p/v de harina-solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (ANEXO II) en la que se disolvieron 60 ppm de Ca^{2+} . Los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.9 Fermentación

2.9.1 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la levadura se realizó utilizando como medio de cultivo el hidrolizado obtenido después del pre-tratamiento térmico, licuefacción y sacarificación (bajo condiciones óptimas reportadas en la tabla 2.3) de la harina de semillas de ramón.

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 150 mL que contenían 50 mL del mosto hidrolizado que fue centrifugado después de concluida la hidrólisis y ajustado a una concentración de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD. Se empleó como fuente de nitrógeno sulfato de amonio a razón de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [92]. La concentración celular utilizada proveniente de un cultivo activo de la levadura en placa GELPA fue de $3 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ [93], los matraces se taparon con una torunda de algodón para permitir el intercambio gaseoso, y posteriormente se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, en agitación (150 rpm), por 48 h. Para determinar la cinética de crecimiento de la levadura se tomaron alícuotas de 2 mL al tiempo cero y cada 6 h, hasta completar las 48 h.

La concentración celular en cada tiempo de muestreo se calculó empleando la ecuación 2.2, se realizó diversas diluciones conforme aumentaba el tiempo de crecimiento, a un mililitro de la dilución realizada se le agregó 1 mL de azul de metileno y se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.2.

2.9.2 Preparación del inóculo para la fermentación

El inóculo para la fermentación se preparó con el mosto obtenido de la hidrólisis enzimática ajustado a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD y 4.5 pH. El volumen de inóculo usado correspondió al 10% del volumen total a fermentar, se le adicionó $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, y se inoculó con una solución acuosa de *S. cerevisiae* proveniente de un cultivo activo de la levadura en placa GELPA, que permitió obtener una concentración inicial de $3 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ [93]. El matraz se incubó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ con una

velocidad de agitación de 150 rpm, durante el tiempo determinado por la curva de crecimiento.

2.9.3 Fermentación

En la fermentación se evaluó la producción de bioetanol a tres diferentes concentraciones iniciales de ARD ($67.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $107.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). El volumen de inóculo utilizado fue de 4 mL, la concentración celular inicial fue de $8.26 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las fermentaciones se realizaron con un volumen total (incluyendo el inóculo) de 40 mL de mosto hidrolizado (obtenido bajo las condiciones óptimas establecidas en el presente estudio) en matraces Erlenmeyer de 50 mL, a los que fue adicionado como fuente de nitrógeno sulfato de amonio a razón de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [92]. Posteriormente se incubaron a 30°C , pH 4.5 y la fermentación fue llevada a cabo sin agitación.

Las concentraciones de $67.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD se fermentaron durante 42 h. Cada 6 h se tomaron alícuotas de 2 mL, para analizar el consumo de ARD a través de la fermentación. La muestra correspondiente a las 48 h se destiló, y posteriormente se determinó la concentración de etanol.

La concentración de $107.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD fue obtenida de una suspensión al 20% p/v de harina de ramón-solución amortiguadora de fosfatos sometida a las mejores condiciones encontradas en el presente trabajo para las etapas de pre-tratamiento térmico, licuefacción y sacarificación, resumidas en la tabla 2.3. Con esta concentración inicial de ARD se fermentaron matraces durante 12, 24, 48, 72 y 120 h. Al finalizar la fermentación se muestrearon alícuotas de 5 mL para realizar la determinación de ARD, °Brix, pH y concentración celular. Posteriormente, se destilaron todas las muestras y se determinó la concentración de etanol. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.10 Destilación

En matraces de bola de 100 mL se mezclaron 25 mL de mosto fermentado con 25 mL de agua destilada, la mezcla se destiló a 100°C hasta obtener un volumen final de 25 mL. Al

destilado se le determinó la concentración de bioetanol por medio del método de dicromato de potasio.

2.11 Análisis

2.11.1 Azúcares reductores directos (ARD)

Los ARD fueron empleados para cuantificar la presencia de monosacáridos y disacáridos al finalizar la hidrólisis, y para evaluar el consumo de estos azúcares durante la fermentación, su determinación se llevó a cabo por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [82,94,95].

Preparación de la solución de DNS: se disolvieron en 600 mL de agua destilada los siguientes reactivos: 200 g·L⁻¹ tartrato de sodio y potasio, 2 g·L⁻¹ fenol, 0.5 g·L⁻¹ metabisulfito de sodio, 10 g·L⁻¹ hidróxido de sodio y 10 g·L⁻¹ DNS, hasta lograr una completa disolución y se aforó a un litro.

Determinación: se añadieron 1.5 mL de la solución de DNS a 0.5 mL de la solución problema, el tubo se agitó y se colocó en baño María a punto de ebullición durante 15 min, se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 8 mL de agua destilada. Posteriormente, la solución se agitó y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. La medición se realizó por triplicado.

La cantidad de azúcares reductores se determinó al comparar el promedio de la absorbancia obtenida respecto a la curva de calibración (ANEXO IV). La curva de calibración de dextrosa se realizó graficando la concentración de diversas soluciones de dextrosa, de 0.1 a 1.0 g·L⁻¹, contra la absorbancia obtenida al leerlas en un espectrofotómetro.

2.11.2 Determinación de sólidos solubles (°Brix) y del pH.

Los sólidos solubles y el pH fueron monitoreados durante la fermentación. Los sólidos solubles se cuantificaron en °Brix con un refractómetro portátil modelo FG 103/113 (Cole-Parmer, E.U.A). La medición del pH se realizó con un potenciómetro modelo pH211 (marca Hanna Instruments, E.U.A) debidamente calibrado con soluciones reguladoras de pH 4 y 7.

2.11.3 Etanol

La determinación de etanol se realizó por el método de dicromato de potasio [96]:

Reactivos: Se requirieron $36.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de dicromato de potasio y 325 mL de ácido sulfúrico.

Preparación del reactivo: Se disolvió el ácido sulfúrico en 400 mL de agua destilada, se esperó a que enfriara y en seguida se le agregó el dicromato de potasio previamente diluido en 200 mL de agua destilada, se aforó a un litro.

Curva de calibración: La curva de calibración de etanol (ANEXO V) se obtuvo al graficar la absorbancia contra la concentración de las soluciones de etanol anhidro, se empleó un rango de concentración de 2 a $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Determinación: A 1mL de destilado de etanol se le agregaron 2 mL de solución de dicromato de potasio, la solución se agitó y se dejó reposar por 10 min, posteriormente se le agregaron 5 mL de agua destilada, nuevamente se agitó y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 585 nm. La medición se realizó por triplicado. La cantidad de etanol se obtuvo al comparar el promedio de la absorbancia respecto a una curva de calibración.

2.12 Cuantificación

2.12.1 Porcentaje de almidón hidrolizado

El porcentaje de almidón hidrolizado fue determinado mediante la ecuación 2.4 al finalizar la etapa de sacarificación para todos los tratamientos.

$$\% \text{ Almidón hidrolizado} = \frac{\text{ARD obtenidos de la hidrólisis(g)}}{\text{Almidón presente en la harina de semilla de ramón(g)}} \times 100 \quad (2.4)$$

2.12.2 Producción de bioetanol

Se determinó el coeficiente de rendimiento de bioetanol (ecuación 2.5) y el porcentaje de eficiencia de la fermentación (ecuación 2.6) de todos los destilados.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (2.5)$$

donde:

$Y_{P/S}$ = Coeficiente de rendimiento

P_f = Concentración final de bioetanol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

P_i = Concentración inicial de bioetanol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

S_i = Concentración inicial de ARD del sustrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

S_f = Concentración de ARD final del sustrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Por lo tanto, si el valor de 0.511 es la eficiencia máxima alcanzada en una fermentación, la eficiencia real de la fermentación se puede determinar mediante la ecuación 2.6:

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{Y_{p/s}}{0.511} \times 100 \quad (2.6)$$

2.12.3 Eficiencia del proceso

La eficiencia de la metodología para la producción de bioetanol se calculó mediante la ecuación 2.7:

$$\% \text{ Eficiencia metodológica} = \frac{\text{Bioetanol producido (L)}}{\text{Bioetanol teórico (L)}} \times 100 \quad (2.7)$$

El bioetanol teórico producido a partir de semilla de harina de ramón se calculó considerando que el 61% del peso de la harina estaba conformado de almidón, por un gramo de almidón se produce 1.1 g de glucosa y cada gramo de glucosa produce 0.51 g de etanol [2]. Por lo tanto, si consideramos que partimos de un kilogramo de harina de semilla de ramón, el rendimiento teórico de bioetanol es de 0.434 L ($\rho=0.789 \text{ Kg/L}$).

2.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los experimentos se realizó con el programa Statistics versión 8. (StatSoft®, Oklahoma, USA).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Hidrólisis

3.1.1 Licuefacción

3.1.1.1 Efecto de la concentración de α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En la figura 3.1 se puede observar que 0.3 μL de enzima α -amilasa (de *Bacillus amyloliquefaciens*, 530 KNU¹/g) fueron necesarios para licuar 1 g de almidón en una hora, y que cantidades superiores de α -amilasa no fueron capaces de producir una mayor cantidad de dextrinas en el mismo tiempo de licuefacción, lo cual se puede observar en los tres últimos puntos del gráfico.

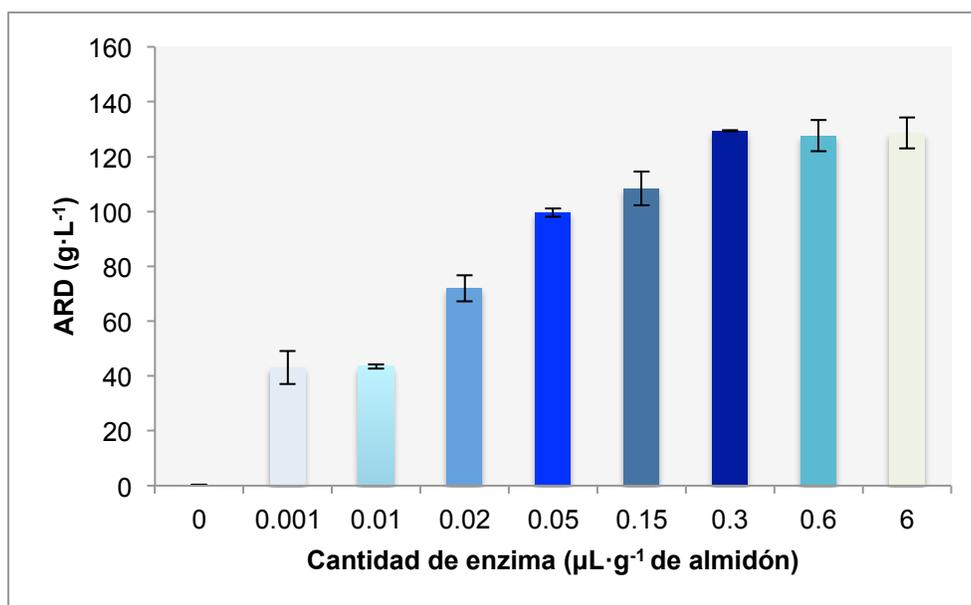


Figura 3.1. Efecto de la cantidad de α -amilasa (de *Bacillus amyloliquefaciens*) en la hidrólisis de la harina de semillas de ramón. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F_{(8,18)} = 356.57$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HDS).

¹ KNU (Kilo Novo Unidad): una unidad transforma a dextrinas 5.26 g de almidón por hora.

3.1.1.2 Determinación de pH

A pH 6 la enzima α -amilasa realizó una hidrólisis más eficiente sobre la harina de semilla de ramón, como se puede observar en la figura 3.2; a dicho pH se hidrolizó un 62.02 ± 2.8 % del almidón (en 20 g de harina de ramón se dispone sólo de 12.2 g de almidón, ANEXO I). A un pH 7 la hidrólisis fue menor, ya que el porcentaje de almidón hidrolizado fue de 47.06 ± 5.5 %.

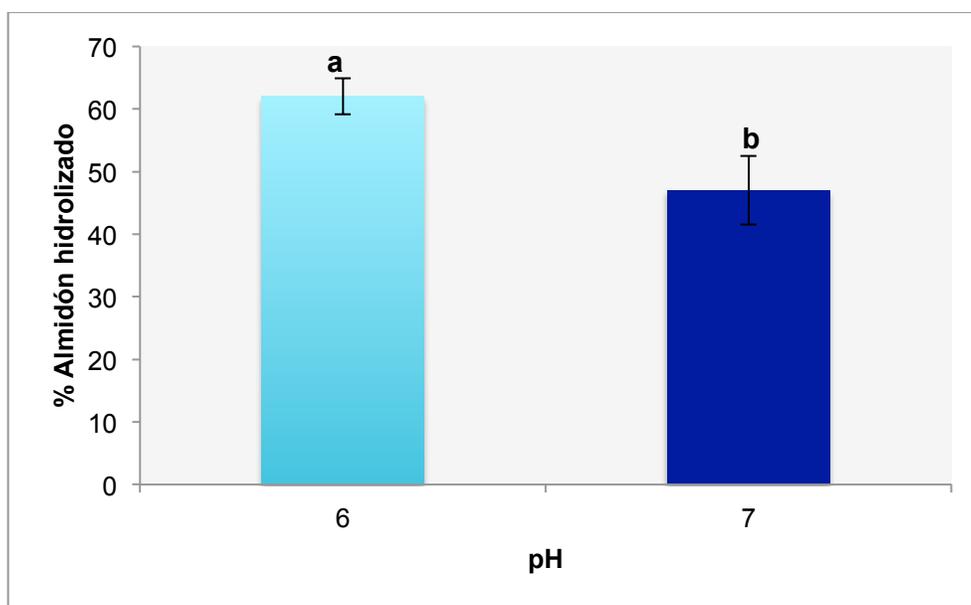


Figura 3.2. Efecto del pH en la hidrólisis del almidón de la harina de ramón. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. Las letras indican diferencia significativa (ANOVA de una vía $F_{(1,4)} = 17.515$, $p < 0.05$).

En la tabla 3.1 podemos observar que a ambos valores de pH se produjo una concentración promedio de ARD de alrededor de $171 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; sin embargo, los porcentajes de hidrólisis de almidón difieren porque no se obtuvo la misma cantidad de hidrolizado, esto pudo deberse a que a pH 7 existió una modificación del sitio activo o alteración de la estructura molecular de la enzima, que provocó una menor licuefacción y por lo tanto un menor volumen al finalizar la sacarificación [97]. Dincbas *et al.* [98] reportaron como

variaba la actividad de la α -amilasa (de *Bacillus amyloliquefaciens*) sobre diversos sustratos cuando se les sometía a diferentes pH, y registraron para los sustratos de maíz y arroz la actividad máxima a pH 6, sucediendo lo mismo que en el presente trabajo.

Tabla 3.1. Efecto del pH durante la etapa de licuefacción.

pH	ARD(g·L ⁻¹)	% Almidón hidrolizado
7	173.85±2	47.06±5.5
6	170.91±4.6	62.02±2.8

3.1.1.3 Determinación de la temperatura óptima

De tres temperaturas de licuefacción evaluadas en el rango de 70-90 °C sugerido por el fabricante (Novozymes), 85 °C fue la temperatura a la que se logró obtener el mayor porcentaje de almidón hidrolizado.

Como se muestra en la figura 3.3, el porcentaje de almidón hidrolizado aumentó conforme se incrementó la temperatura a la cual se realizó la licuefacción. A 90 °C se observó una desnaturalización de la enzima, quedando el sustrato como una pasta sin hidrolizar. A 85°C se alcanzó una hidrólisis del 62.02 % del almidón contenido en la harina de ramón y la mayor cantidad de ARD, tal como se muestra en la tabla 3.2.

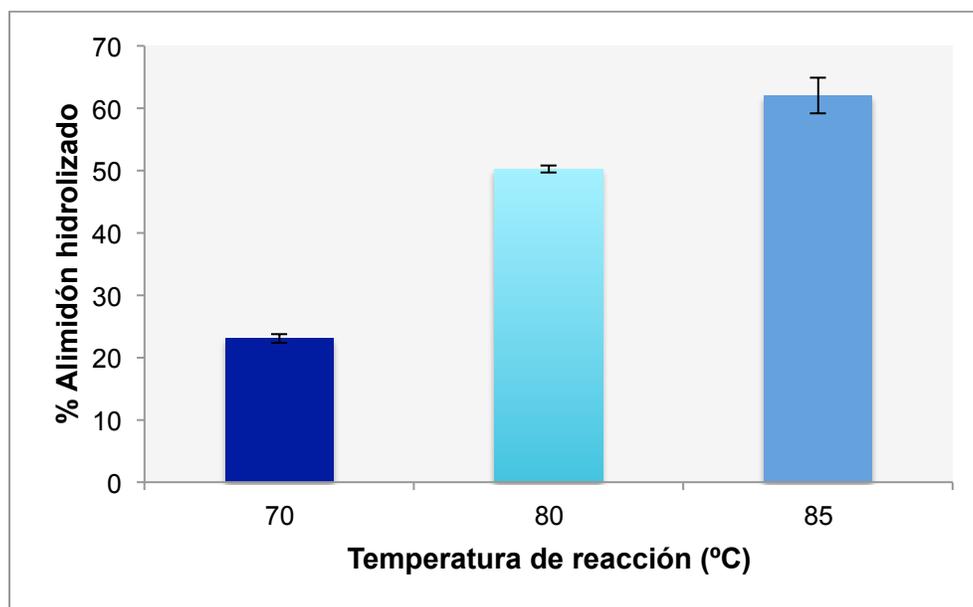


Figura 3.3. Comportamiento de α -amilasa a diferentes temperaturas durante la licuefacción. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F_{(2,6)} = 401.59$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HSD).

Una temperatura óptima de 85 °C también fue empleada por Mojović *et al.* [29] en la producción de bioetanol a partir de harina de maíz utilizando la enzima α -amilasa de *B. licheniformis*.

Tabla 3.2. Hidrólisis del almidón de harina de ramón a diferentes temperaturas de la reacción de licuefacción.

Temperatura	ARD (g·L ⁻¹)	% Almidón hidrolizado
85	170.91±4.6	62.02±2.9
80	120.2±1.3	50.23±0.54
70	62.6±1.9	23.08±0.71

3.1.1.4 Tiempo de licuefacción

El tiempo mínimo óptimo de licuefacción en el cual la enzima α -amilasa propició la formación de la mayor cantidad de ARD y el mayor porcentaje de almidón hidrolizado, fue de 1 h.

En la figura 3.4 se observa el porcentaje de almidón hidrolizado a diferentes tiempos de licuefacción. El promedio de almidón hidrolizado en 1 h de licuefacción fue de $69.03 \pm 3.6\%$. Este tiempo es similar a los reportados para varias amilasas sobre diversos sustratos [87]. Un tiempo de licuefacción mayor no mostró incrementos significativos en el porcentaje de almidón hidrolizado, ni en la concentración de ARD.

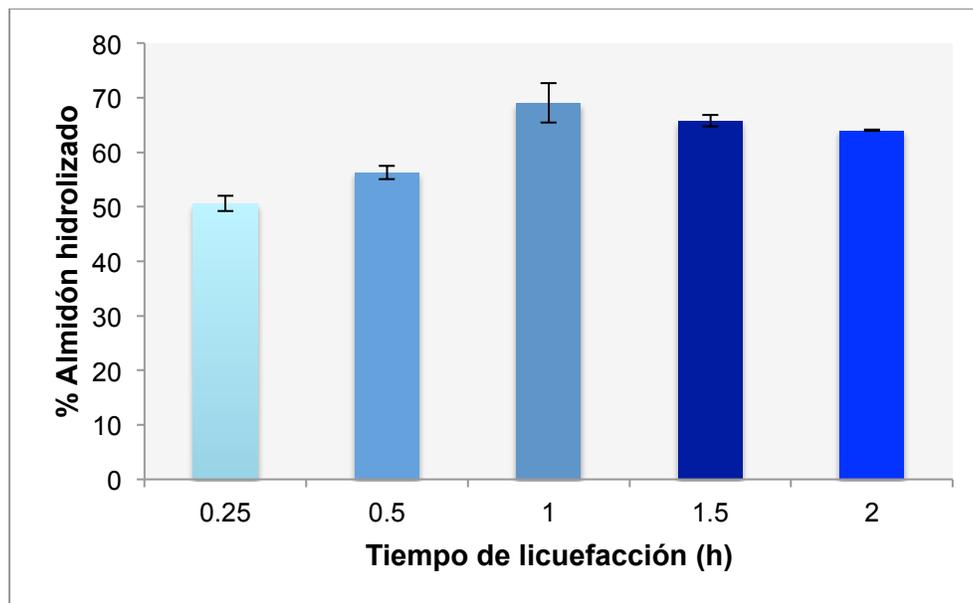


Figura 3.4. Porcentaje de almidón hidrolizado por α -amilasa respecto al tiempo de licuefacción. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F(4,10)=48.401$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HDS).

3.1.2 Sacarificación

3.1.2.1 Concentración de amilogucosidasa AMG 300L

En la figura 3.5 se observa la cantidad de ARD producidos después de la sacarificación del hidrolizado de harina de semilla de ramón (previamente pre-tratado y licuado) al añadir

distintas relaciones de amiloglucosidasa con respecto a la cantidad de almidón inicial de la harina de semilla de ramón. El análisis estadístico de los resultados graficados nos permitió determinar que la adición de 1.2 μL de amiloglucosidasa $\cdot\text{g}^{-1}$ de almidón a una suspensión al 25 % p/v de harina de ramón-solución amortiguadora de fosfatos, produjo la máxima concentración de ARD. Relaciones superiores de enzima no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto 1.2 μL de amiloglucosidasa por 1 g de harina de ramón fue la concentración óptima para sacarificar las dextrinas producidas en la licuefacción.

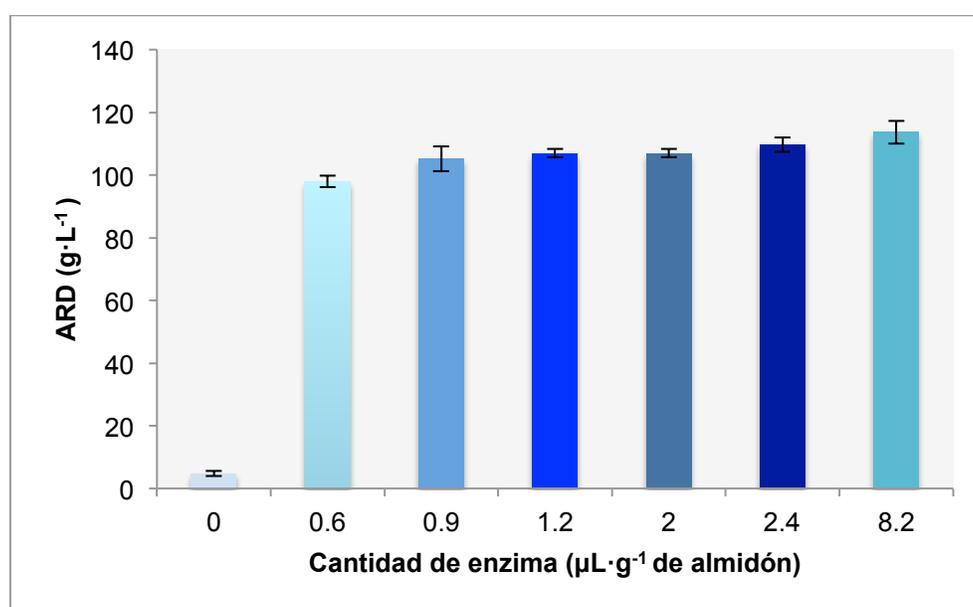


Figura 3.5. Efecto de la cantidad de amiloglucosidasa AMG 300L (de *Aspergillus niger*) sobre almidón de harina de semilla de ramón. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F_{(6,14)} = 758.20$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HDS).

3.1.2.2 Tiempo de sacarificación.

Un porcentaje de almidón hidrolizado de 62.49 ± 2.5 % fue obtenido a las 24 horas de sacarificación, tal como se muestra en la figura 3.6. Tiempos de sacarificación mayores a 24 h no mostraron diferencias significativas.

En la tabla 3.3 se puede observar que después de las 24 h la concentración de ARD tampoco varió y se mantuvo alrededor de $170 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

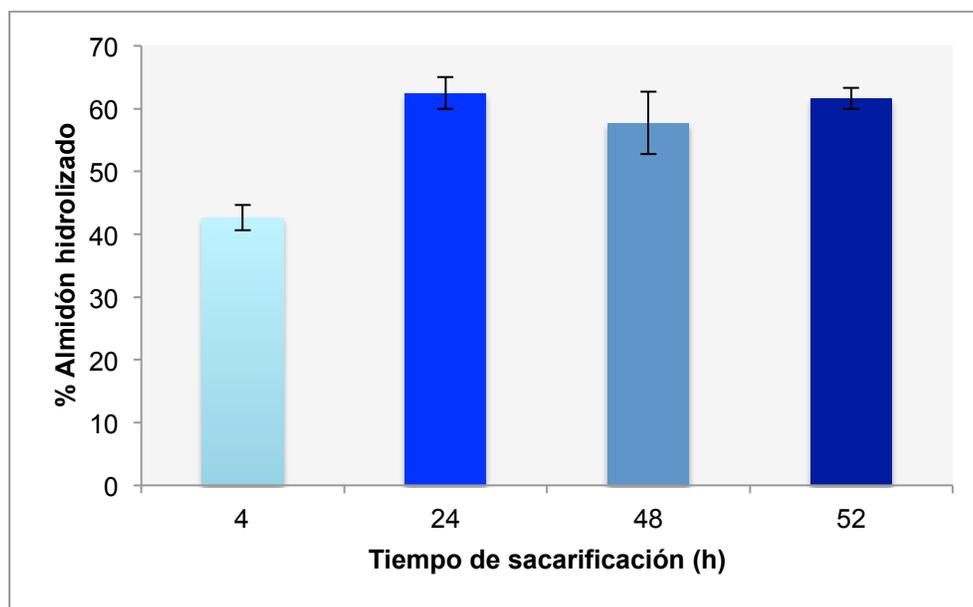


Figura 3.6. Efecto del tiempo de reacción de amiloglucosidasa AMG 300L en la sacarificación de las dextrinas de harina de ramón. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm E.E. (ANOVA de una vía $F_{(3,8)}=26.796$, $p<0.05$, prueba de Tukey HDS).

Tabla 3.3. Variación de los ARD y el porcentaje de almidón hidrolizado de harina de ramón a diferentes tiempos de sacarificación.

Tiempo (h)	ARD (g·L ⁻¹)	% Almidón hidrolizado
4	118.22 \pm 5.5	42.63 \pm 1.9
24	170.91 \pm 4.6	62.49 \pm 2.5
48	155.3 \pm 6	57.77 \pm 4.9
52	170.92 \pm 4.6	61.64 \pm 1.6

El tiempo de sacarificación de materias amiláceas como: maíz [99], trigo [100,101], cebada [102] y papa [103] varía según la cantidad de enzima empleada, su naturaleza y las dextrinas disponibles en el medio. Labeille *et al.* [100] reportan que un tiempo de 22 h es suficiente para sacarificar completamente las dextrinas generadas en una suspensión

al 35 % p/v de harina de trigo-agua destilada hidrolizada con la misma amiloglicosidasa empleada en este trabajo.

3.2 Pre-tratamiento térmico

La evaluación del pre-tratamiento térmico se llevó a cabo después de determinar que bajo condiciones óptimas de trabajo de las etapas de licuefacción y sacarificación no se obtenía una elevada hidrólisis de la harina de semilla de ramón. En la figura 3.7 se puede observar el efecto del tiempo de pre-tratamiento térmico en la hidrólisis de la harina de semilla de ramón. Como testigo se empleó harina sin pre-tratar que después de la licuefacción y sacarificación sólo mostró una hidrólisis del 62.02 ± 2.9 % del almidón.

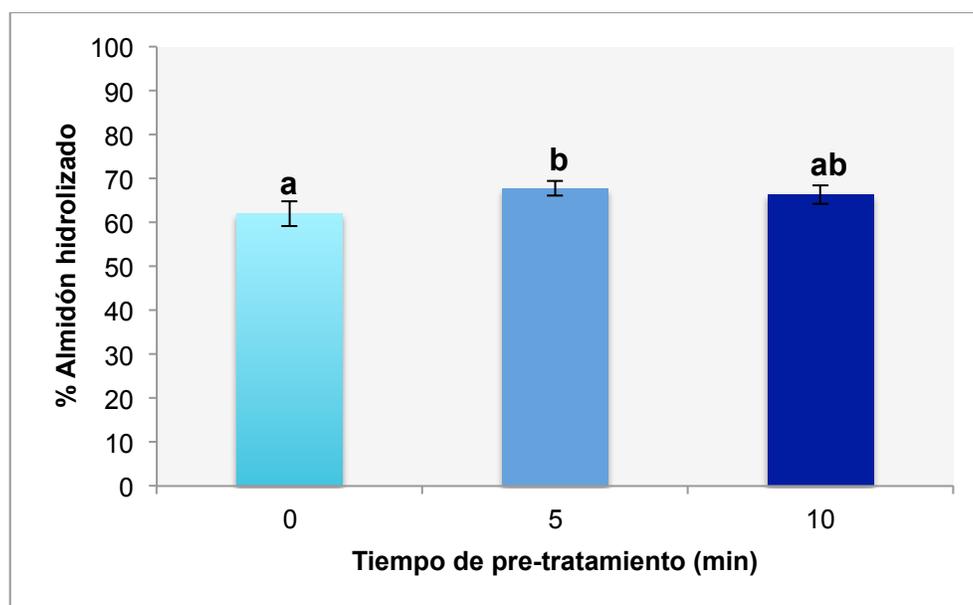


Figura 3.7. Efecto del tiempo de pre-tratamiento térmico en la hidrólisis del almidón de la harina de semilla de ramón. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. Las letras indican diferencia significativa (ANOVA de una vía $F_{(2,6)} = 5.1935$, $p < 0.05$, Tukey HDS).

El pre-tratamiento de 5 min a 100°C propició un incremento del 5.71 % con respecto al testigo, alcanzando una hidrólisis de almidón del 67.73 ± 1.7 %. Esto puede deberse a que el pre-tratamiento térmico ocasionó el hinchamiento de los gránulos de almidón

incrementando su área superficial, lo que favoreció el acceso de las enzimas a los sitios reactivos, ocasionando una mejor hidrólisis, tal como observaron Ferng *et al.* (2011) [90] al someter harina de maíz a un calentamiento similar.

El análisis estadístico indicó que el pre-tratamiento por 5 min no propició un aumento significativo en la hidrólisis de la harina de semilla de ramón, contrariamente a lo observado en el caso de harina de semillas de maíz, en el cual se obtuvo una hidrólisis del $95.35 \pm 0.2\%$. La diferencia puede estar relacionada a la conformación estructural o composición que tiene el almidón en las diferentes harinas (relación amilosa-amilopectina) [90]. El pre-tratamiento térmico con duración de 10 min no presentó un incremento significativo en la cantidad de almidón hidrolizado.

Se debe probar si tiempos intermedios o más prolongados benefician la hidrólisis del almidón. Para fines de este trabajo se decidió continuar con el pre-tratamiento térmico por 5 minutos, pero en caso de un escalamiento del proceso, habría que realizar un balance energético para determinar si el aumento en la hidrólisis del almidón compensa la energía que se tiene que aplicar al sistema.

3.3 Cantidad de sustrato

En la figura 3.8 se puede observar que conforme aumenta la cantidad de sustrato se obtiene una mayor concentración ARD, sin embargo también se demostró que disminuye la eficiencia del sistema, ya que se obtiene un menor porcentaje de almidón hidrolizado. Por lo anterior, se puede inferir que la actividad catalítica de las enzimas disminuye con el aumento del sustrato, ya que al incrementar la densidad del medio se saturan los sitios de reacción de la enzima por lo que inhibe su actividad.

Los criterios empleados para elegir la cantidad óptima de sustrato fueron: obtención de una elevada concentración de ARD para ser utilizados en la fermentación y una mayor hidrólisis del almidón para aprovechar al máximo la materia prima.

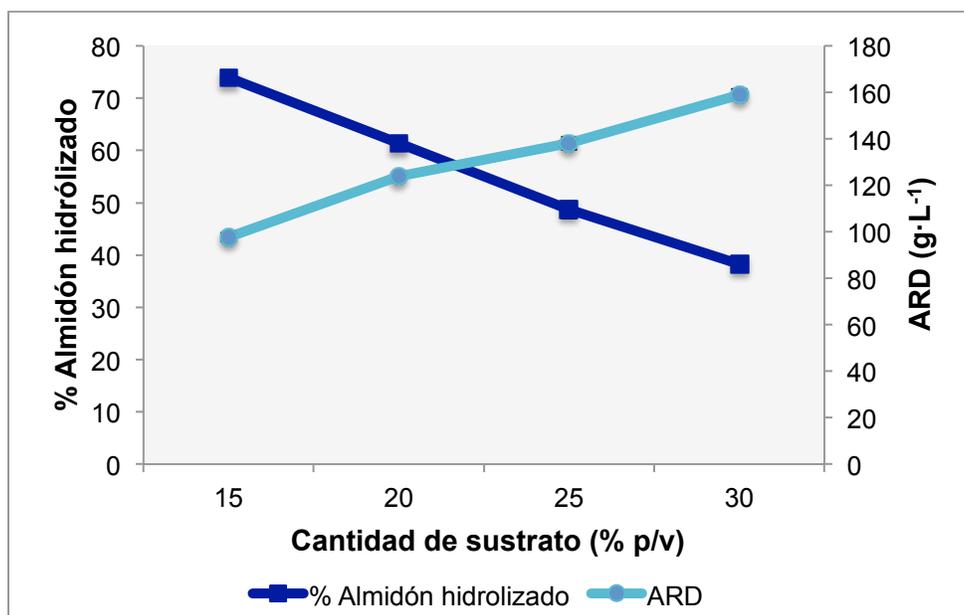


Figura 3.8. Porcentajes producidos de almidón hidrolizado y ARD con respecto a la cantidad de sustrato empleada. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F_{(3,8)}=544.31$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HDS).

Con base en los resultados, se eligió emplear una suspensión al 20 % p/v de harina de semilla de ramón-solución amortiguadora de fosfatos, ya que a esta concentración se obtuvo una eficiencia de la hidrólisis del almidón del 61.38 % con una concentración de $123.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD. Esta cantidad de sustrato utilizada es igual a la reportada por Fernández *et al.* [104] en la producción de bioetanol a partir de harina de papa. Sin embargo, es un 10 % menor comparada con las suspensiones empleadas comercialmente para la producción de bioetanol a partir de sustratos de harina de maíz [29,105], harina de trigo [106] y harina de sorgo [99,107].

Una suspensión al 30 % p/v de harina de semilla de ramón no fue utilizada debido a que confiere a la mezcla una alta viscosidad, que no permite su manipulación. Los rendimientos son bajos cuando la viscosidad de la suspensión es elevada, ya que impide que las enzimas lleguen a los sitios sobre los que realizan la hidrólisis [107].

3.4 Evaluación del proceso de hidrólisis

Debido a la baja eficiencia obtenida en la hidrólisis enzimática de la harina de semilla de ramón, se decidió evaluar la metodología establecida con un sustrato comercial. El sustrato elegido fue harina de maíz, por tratarse de una de las principales materias primas empleadas en la producción de bioetanol. Ambos sustratos se sometieron a las mismas condiciones.

En la figura 3.9 se presenta el nivel de respuesta que produjeron ambos sustratos. Podemos observar que la metodología diseñada proporciona un comportamiento más eficiente cuando se emplea harina de semillas de maíz, hidrolizando hasta un 95.35 ± 0.2 % su contenido total de almidón. Este porcentaje similar al reportado por Mojovic *et al.* [29] quienes logran una hidrólisis del 76-96 % del almidón de harina de maíz, sin emplear un pre-tratamiento térmico.

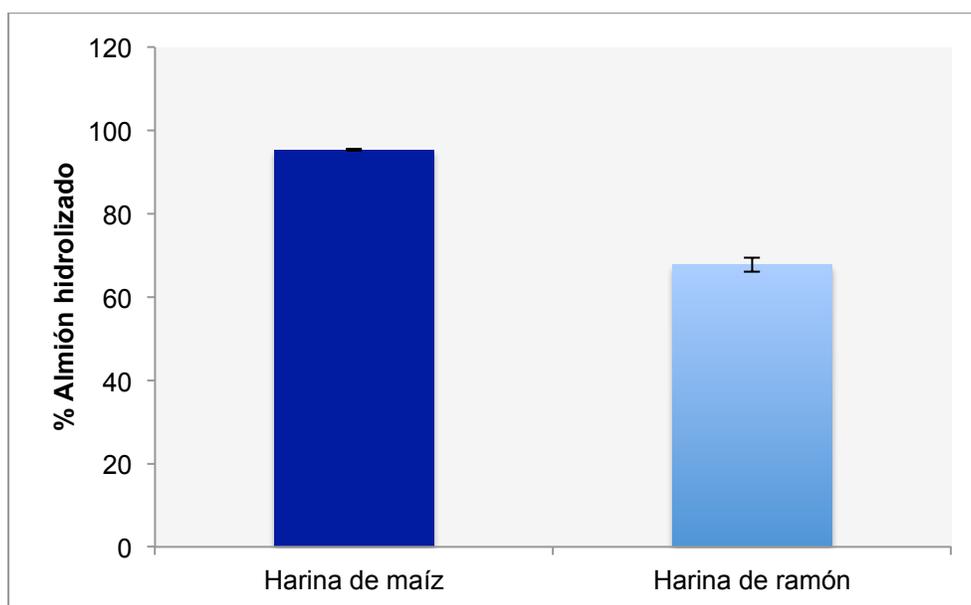


Figura 3.9. Porcentaje de almidón hidrolizado en suspensiones al 20 % p/v de harina de semilla de maíz y harina de semilla de ramón, sometidas a las mismas condiciones de hidrólisis. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. (ANOVA de una vía $F_{(1,4)}=816.55$, $p < 0.05$).

Para harina de ramón se obtuvo una eficiencia menor, cerca del 67.72 ± 1.7 %, lo que pudo deberse a varios factores: Tester *et al.* [49] reportaron que al trabajar con almidones

nativos se suelen tener mayores desafíos, debido a las características particulares del almidón, como son: tamaño del gránulo (gránulos grandes proporcionan menor área superficial), estructura cristalina (enlaces de doble hélice son más fuertes y menos digeribles) y composición química (la relación amilosa-amilopectina, la cantidad de amilosa está inversamente relacionada a la hidrólisis, debido a que propicia la formación de dobles hélices, los que dificultan el acceso de las enzimas a los sitios de reacción. Además, Carrillo *et al.* [108] atribuyen una hidrólisis incompleta a la influencia de los componentes no-amiláceos presentes en la harina (la harina de semilla de ramón posee un 39% de compuestos no-amiláceos respecto a su peso total) o a cantidades de almidón enlazadas fuertemente a las proteínas que conforman el endospermo del gránulo. Todos estos factores pueden afectar la hidrólisis enzimática, por lo que es necesario determinar con exactitud la composición de la harina de semillas de ramón, con el fin de desarrollar una tecnología de hidrólisis más eficiente.

3.5 Curva de crecimiento

En la figura 3.10 se observa el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en el hidrolizado de harina de semilla ramón previamente pre-tratado, licuado y sacarificado, el cual se ajustó a una concentración de 20 g·L⁻¹ de ARD.

La cinética de crecimiento de la levadura observada en la figura 3.10 muestra que durante las primeras 6 h se presentó una rápida adaptación al medio, y un crecimiento exponencial acelerado que concluye a las 8 h. A éste tiempo la levadura *S. cerevisiae* tiene una actividad metabólica intensa, adecuada para iniciar una fermentación activa. Después de las 12 h la levadura no presenta un incremento significativo en la concentración celular, por lo que podemos definir que a esta hora inició su fase estacionaria.

Con base en los resultados anteriores, la preparación del inóculo para iniciar la fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones: 8 h de crecimiento, con una concentración inicial de 3x10⁷ cel·mL⁻¹, 30 °C, 150 rpm y 1.5 g·L⁻¹ de sulfato de amonio.

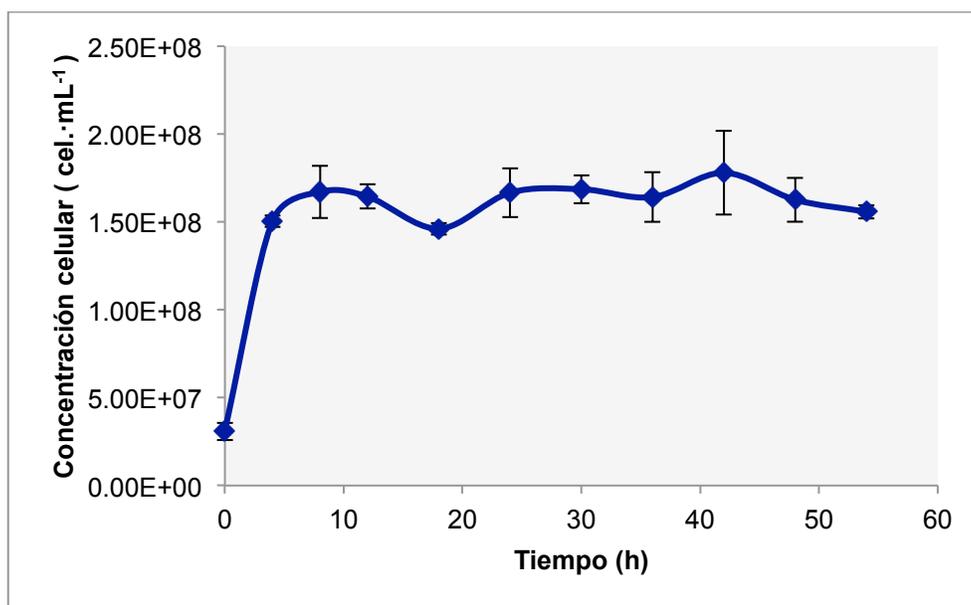


Figura 3.10. Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (marca SAFOENO) sobre un hidrolizado enzimático de harina de semilla de ramón ajustado a 20 g·L⁻¹ de ARD, incubado a 30 °C y agitación constante (150 rpm). Los resultados son el promedio de tres repeticiones ± σ . (ANOVA de una vía $F_{(10,22)}=36.279$, $p < 0.05$, prueba de Tukey HDS).

3.6 Fermentación

Se llevaron a cabo dos fermentaciones por separado. Los resultados presentados se realizaron bajo las siguientes condiciones de trabajo: anaerobiosis, temperatura de 30 °C, 1.5 g·L⁻¹ de sulfato de amonio, con 10 % v/v de inóculo (crecido previamente en un hidrolizado de harina de semilla de ramón ajustado a 20 g·L⁻¹ de ARD) y con una concentración inicial de 8.26×10^7 cel·mL⁻¹.

La primera fermentación se realizó en hidrolizado de semilla de ramón con dos concentraciones de ARD: 67.5 y 128.5 g·L⁻¹, con la finalidad de determinar si había inhibición de la levadura *S. cerevisiae* por la concentración del sustrato y su eficiencia fermentativa.

En la figura 3.11 se observa que la levadura consume los azúcares procedentes de la hidrólisis enzimática en forma similar para ambas concentraciones, durante las primeras 12 h.

Después de 18 h se cuantificaron $2.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD para la concentración inicial de $67.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD para la de $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, esto nos permitió identificar que la levadura fue capaz de metabolizar altas concentraciones de azúcares provenientes de la hidrólisis de harina de semilla de ramón y que la concentración de $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no provocó un estrés osmótico, ya que esta concentración de azúcar no supera el 30 % de glucosa límite que generalmente resiste *Saccharomyces cerevisiae* [74]; sin embargo su metabolismo fermentativo se comportó diferente como se muestra en la tabla 3.4.

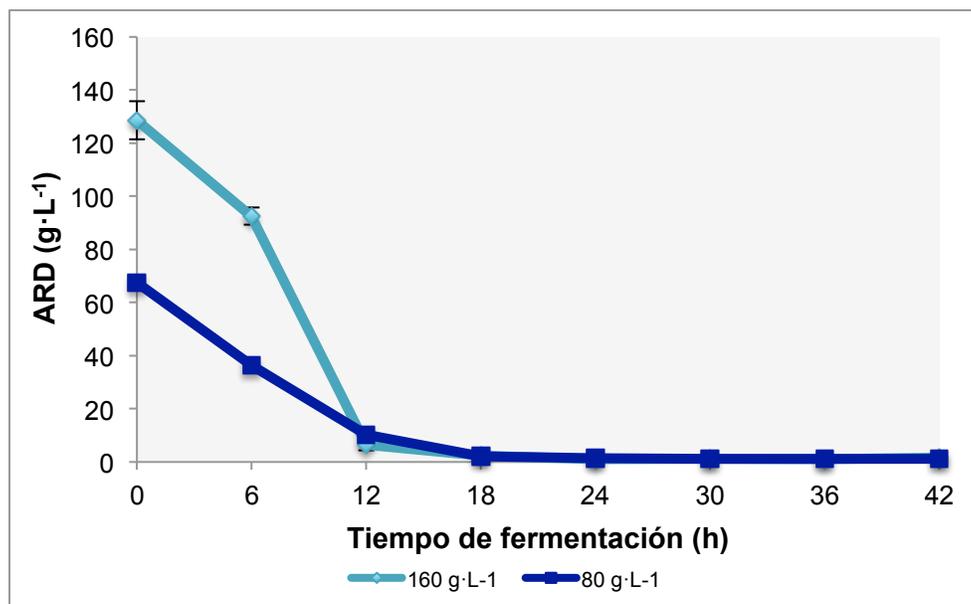


Figura 3.11. Consumo de los ARD iniciales presentes en dos hidrolizados de harina de semilla de ramón durante la fermentación realizada con *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$.

La tabla 3.4 muestra las cantidades de etanol producidas durante un tiempo de fermentación de 42 h, para las dos concentraciones iniciales de ARD. Como era de esperarse, se obtuvo menor cantidad de etanol a una concentración de $67.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD, sin embargo cuando se compara la eficiencia de la fermentación en ambas

concentraciones, en $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD la levadura *S. cerevisiae* incrementa su eficiencia fermentativa un 9%.

El mismo comportamiento fue reportado por Nikolić *et al.* quienes observaron la producción de bioetanol a diferentes concentraciones iniciales de glucosa obtenida a partir de harina de maíz, y obtuvieron a las 50 h de fermentación la máxima cantidad de bioetanol, cuando iniciaban la fermentación a una concentración de $176 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD y la menor con una concentración inicial de $125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD.

Tabla 3.4. Rendimientos de etanol a partir de mostos con concentraciones iniciales de 67.5 y $128.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD.

Concentración de ARD ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Bioetanol producido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Eficiencia de la fermentación (%)
67.5	17.13 ± 0.9	50.62 ± 2.6
128.5	38.69 ± 1.3	59.69 ± 2.0

Con base en los resultados obtenidos podemos inferir que entre mayor sea la concentración de ARD al iniciar la fermentación (sin exceder los límites tolerados por *S. cerevisiae*), obtendremos mejores rendimientos de bioetanol. Sánchez *et al.* [36] reportan que otro de los beneficios al trabajar bajo estas condiciones es la reducción del consumo de recursos hídricos, lo que disminuye el costo de producción.

La segunda fermentación se realizó con una concentración de $123.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD, obtenidos de una suspensión de harina de semilla de ramón al 20 % p/v (elegida como la óptima según los criterios mencionados en la sección 3.2.1), cuya concentración inicial después de adicionado el inoculó fue de $107.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD (figura 3.12).

En base a los datos obtenidos y representados en la figura 3.12, la fermentación del hidrolizado de harina de semilla de ramón se concluyó a las 12 h, cuando el 78.7% de los ARD habían sido metabolizados por la levadura *S. cerevisiae*. El resto de los ARD fue consumido durante las siguientes horas, y a partir de las 24 h se obtuvo una concentración de ARD residual de $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La máxima producción de bioetanol obtenida se registró a partir de las 12 h, la concentración de etanol producida fue de $32.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con un $Y_{p/s}$ de 0.386 y una eficiencia fermentativa del 75.69 %.

Con el fin de monitorear el metabolismo de la levadura en la fermentación, y explicar los bajos valores de $Y_{p/s}$, se evaluaron: sólidos solubles, pH y densidad celular.

En la figura 3.12 podemos apreciar que la cantidad de sólidos solubles disminuyó de 12 °Brix a un valor mínimo de 4.2 °Brix a las 24 h, en 12 h de fermentación registró un valor de 7 °Brix y después se mantuvieron a 6 °Brix hasta finalizar la fermentación. Los 6 °Brix remanentes pueden corresponder a otros sólidos solubles no fermentables o compuestos que no son metabolizados por la levadura para la producción de bioetanol, como por ejemplo: aminoácidos, proteínas, vitaminas y ácidos grasos [109]. El valor mínimo de °Brix pudo deberse a que como bajo el pH se lograron solubilizar algunos sólidos.

La fermentación se inició con pH 4.5, el valor mínimo se registró a las 24 h en pH 4.15, y después se mantuvo a pH 4.3 hasta un tiempo de fermentación de 120 h. La disminución de pH puede asociarse a la producción de ácidos durante la fermentación (ácido láctico, ácido acético, etc.), y el incremento a la liberación de aminoácidos al medio y producción de bioetanol [110]. Con valores de pH bajos en medios de fermentación generalmente se inhibe el crecimiento de la levadura y el intercambio de nutrimentos entre las células y el medio, propiciando la fermentación y no el crecimiento celular [69], siempre y cuando no disminuya hasta pH 2.25 donde el pH produce daños intracelulares [111], provocando la muerte de la levadura, por lo tanto en esta investigación se considera que el pH no está asociado a las bajas eficiencias de fermentación, ya que se mantiene dentro de un valor óptimo para la producción de bioetanol de 3.5 -4.5 pH [81,112].

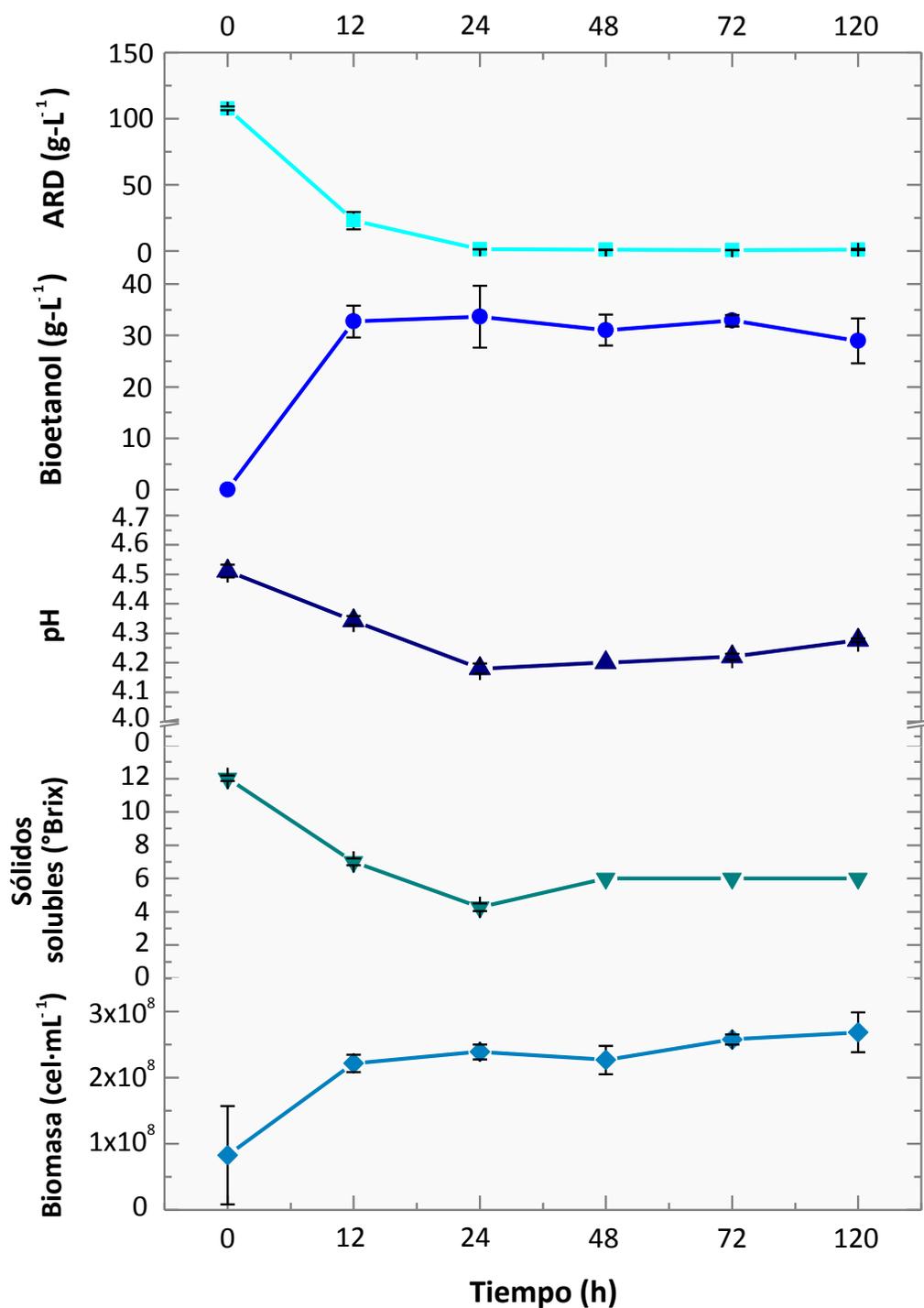


Figura 3.12. Perfiles cinéticos durante la fermentación a 30 °C de 107.78 g·L⁻¹ de ARD de un hidrolizado de harina de semilla de ramón. ARD (■), bioetanol (●), pH(▲), sólidos solubles (▼) y biomasa (◆). Los resultados son el promedio de tres repeticiones ± σ .

La densidad celular inicial de la fermentación fue de $8.26 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, sin embargo a una temperatura de 30°C , en condiciones estáticas de fermentación se registro un crecimiento exponencial durante las primeras 12 h alcanzando una concentración de $2.22 \times 10^8 \pm 1.34 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, durante las siguientes horas no se presentó un crecimiento significativo, esto puede deberse a que los azúcares restantes fueron direccionados hacia otra ruta metabólica de *S. cerevisiae*.

Con la figura 3.13 corroboramos la actividad fermentativa de *S. cerevisiae* sobre el hidrolizado de harina de semilla de ramón de $107.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARD. Las eficiencias de fermentación fueron estadísticamente iguales hasta las 120 h de fermentación. A las 12 h se registró una eficiencia del $75.69 \pm 12.8 \%$.

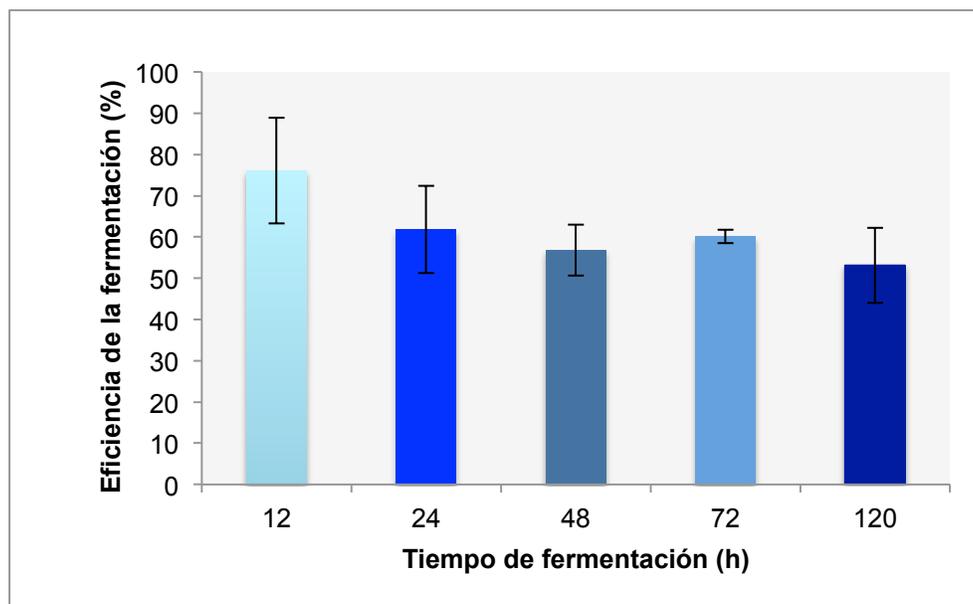


Figura 3.13. Eficiencia de la fermentación alcohólica realizada durante diferentes tiempos sobre un hidrolizado de harina de semilla de ramón con un contenido inicial de $107.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARD. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm \sigma$. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos (ANOVA de una vía $F(4,10)=2.8779$, $p > 0.05$).

En la tabla 3.5 se observa que a partir de las 12 h la concentración de bioetanol no varió significativamente conforme transcurrió el tiempo de fermentación, por lo que se definió finalizar la fermentación del hidrolizado de harina de semilla de ramón a las 12 h.

La eficiencia del 75.69 ± 12.8 % estuvo asociada a que aún existían azúcares no metabolizados por *S. cerevisiae*, los cuales a las 24 h fueron consumidos pero no destinados a la producción de bioetanol, por lo que las eficiencias fermentativas no variaron a partir de este tiempo. Mediante el comportamiento del pH representado en la figura 3.12 se pudo inferir que parte de estos azúcares consumidos entre las 12 y 24 h se destinaron a la generación de subproductos, principalmente ácidos.

La producción de ácidos puede asociarse entre otras cosas a una contaminación del medio como lo reporta Narendranath *et al.* [93].

Maiorella *et al.* [113] encuentran que determinados sub-productos actúan como mecanismo de inhibición para la producción de bioetanol, por tal motivo es necesario evaluar la composición del mosto conforme transcurre la fermentación, para verificar e identificar si del 21.3 % de ARD que no fueron destinados a la producción de bioetanol se genera algún sub-producto en una cantidad significativa.

Tabla 3.5. Rendimiento de bioetanol y eficiencia fermentativa a diferentes tiempos sobre un hidrolizado de harina de semilla de ramón con un contenido inicial de $107.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD.

Tiempo (h)	Etanol (g/L)	Eficiencia (%)
12	32.71 ± 3.5	75.69 ± 12.8
24	33.64 ± 5.8	61.89 ± 10.5
48	31.04 ± 3.39	57.10 ± 6.2
72	32.88 ± 0.89	60.10 ± 1.73
120	28.93 ± 5	53.18 ± 9.11

Generalmente, las fermentaciones tienen un consumo gradual de los azúcares y registran su máxima producción de bioetanol después de las 24 h [99,105,114]. *S. cerevisiae*

metabolizó los ARD presentes en el hidrolizado de la harina de semilla de ramón en un corto periodo de tiempo, comparado con el de otras materias amiláceas.

En harina de maíz, Wang *et al.* [115] (azúcares de una suspensión 24.5 % p/v; levadura seca, marca Fenton; anaerobio, 30 °C, pH 4, 0.5 g (NH₄)₂SO₄, conc. del inóculo 1.8 x10⁷ cel·mL⁻¹) y Nikolic *et al.* [105] (azúcares de una suspensión al 33 % p/v, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, anaerobio, 30 °C, pH 5, inóculo 5 %v/v y 2 x10⁶ cel·mL⁻¹, 100 rpm) observaron el consumo total de la glucosa entre las 30-38 h de fermentación. Hernández *et al.* [99] (levadura seca, marca Safmex; anaerobio, 30 °C, 150 mg de amonio /L, 1.3 x10⁷ cel·mL⁻¹, 150 rpm, 13 °Brix) para harina de sorgo y maíz reportaron que el consumo total de azúcares se registró a las 30 h. El tiempo de fermentación reportado por estos estudios para maíz y sorgo, difieren del obtenido para harina de ramón, a pesar de que ambas fermentaciones se realizaron a la misma temperatura, varían en el tipo de cepa empleada, la concentración del inóculo y volumen utilizado, tipo y concentración de fuente de nitrógeno y carbono, y las propiedades fisicoquímicas del hidrolizado.

La rápida fermentación a las 12 h puede asociarse entre otras cosas, a la concentración celular con la que se inició la fermentación, la cual fue mayor a la empleada por Wang *et al.* [115], Nikolic *et al.* [105] y Hernández *et al.* [99] ; y a la cantidad elevada de fuente de nitrógeno que se empleó, tal como lo reportaron Moreno *et al.* [116] y Ping Wang [117] en la fermentación de vino tinto, la elevada cantidad de fuente de nitrógeno puede propiciar una rápida producción de biomasa y metabolitos no deseados.

3.7 Rendimiento de bioetanol producido a partir de harina de semilla de ramón

La cantidad de bioetanol obtenido por medio de la metodología propuesta en la presente investigación, fue de 0.1327 L por cada kilogramo de harina de semilla de ramón (ANEXO VI). Ésta es inferior a las cantidades reportadas por Kim *et al.* [118] para diversas materias primas amiláceas comerciales, donde son producidos por kilogramo de materia seca: 0.41 L de bioetanol para cebada, 0.46 L para maíz, 0.44 L para sorgo y 0.40 L para trigo. La

diferencia se asocia a la baja eficiencia metodológica obtenida en el presente trabajo, y entre otros factores a las propiedades físico-químicas de cada sustrato.

La eficiencia global del sistema fue del 30.6 % (ANEXO VI), este resultado se puede atribuir a que no se logró hidrolizar totalmente el almidón disponible en la harina de ramón. Se sabe que los principales factores que afectan la hidrólisis de materiales amiláceos pueden relacionarse a un pre-tratamiento inadecuado, una inhibición de la enzima por constituyentes no-amiláceos presentes en la harina o a la microestructura (cristalinidad) propia del almidón [49,90,108]. Por lo que es necesario realizar estudios específicos sobre estos factores para la harina de semillas de ramón. También es necesario realizar más estudios de fermentación para que los azúcares consumidos sean transformados a bioetanol y poder mejorar la eficiencia global del sistema.

3.8 Estimación de la producción de bioetanol a partir de la semilla de ramón.

Se realizó una estimación teórica de la cantidad de bioetanol que podría ser producida con los rendimientos obtenidos en la presente investigación. De acuerdo con Larqué (comunicación personal, 2012), un árbol de ramón durante su edad adulta llega a producir 95.5 Kg de semilla·año⁻¹, y se pueden sembrar alrededor de 300 árboles·ha⁻¹, por lo tanto la productividad de la semilla de *B. alicastrum* es de 28.65 ton de semilla·ha⁻¹·año⁻¹.

Sin embargo, la semilla posee un porcentaje de humedad del 57.9%, consecuentemente sólo se obtienen 12.06 ton de semilla seca·año⁻¹·ha⁻¹, de las cuales se puede producir la misma cantidad de harina (las pérdidas por molienda son mínimas).

Con base en la metodología propuesta en el presente trabajo, se logran rendimientos de 0.1327 L de bioetanol·Kg⁻¹ de harina de semilla de ramón, mediante estos valores se estima una productividad de 1600.6 L de bioetanol·ha⁻¹·año⁻¹.

A pesar de que la metodología empleada tuvo una eficiencia del 30.6%; cuando se considera la producción de la semilla de *B. alicastrum* (ton de semilla·ha⁻¹·año⁻¹) el rendimiento de bioetanol teórico llega a ser similar a el reportado por Balat *et al.* [11] de 1977.2 L de bioetanol· ha⁻¹ ·año⁻¹ para harina de trigo; pero es 1.6 veces menor, cuando se le compara con harina de maíz (tabla 1.5) principal materia prima empleada a nivel mundial en la producción de bioetanol.

CONCLUSIONES

Un pre-tratamiento térmico (100°C, durante 5 minutos) no favoreció en un elevado porcentaje el incremento en la hidrólisis del almidón de la harina de semilla de ramón.

Las condiciones óptimas de trabajo para las enzimas amilolíticas empleadas fueron establecidas, y permitieron hidrolizar el 61.3 % del almidón presente en la harina de la semilla de ramón pre-tratada. Una suspensión de harina al 20 % (p/v), produjo un mejor aprovechamiento de la materia prima y una concentración de ARD de $123.76 \pm 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

La levadura *S. cerevisiae* (marca SAFOENO) metabolizó el 98.8 % de los ARD presentes a las 24 h de fermentación.

La fermentación se concluyó a las 12 h donde se logró la máxima eficiencia de fermentación del $75.69 \pm 12.8 \%$ y se produjo una concentración máxima de 32.7 g de bioetanol·L⁻¹ de mosto.

La harina de semilla de ramón tiene potencial para ser empleada como materia prima en la producción de bioetanol. Con la metodología propuesta en la presente investigación no se alcanzaron los rendimientos esperados, y sólo se logró aprovechar el 30.6 % de su potencial teórico y obtener 0.1327 L de bioetanol·Kg⁻¹ de harina de semilla de ramón.

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos se puede mejorar la metodología para la producción de bioetanol a partir de la semilla de ramón, ya que tiene el potencial de alcanzar producciones de bioetanol equiparables e incluso superiores, a las obtenidas con las materias primas actualmente comercializadas.

En base en la investigación elaborada, se propone hacer hincapié en los siguientes puntos, con el fin de obtener mejores rendimientos de bioetanol a partir de la harina de ramón:

- Extraer el almidón presente en la semilla de ramón, para evitar la interferencia de compuestos no amiláceos sobre la hidrólisis enzimática.
- En caso de trabajar con todos los constituyentes de la harina, aplicar un pre-tratamiento térmico más severo que fraccione más el gránulo de almidón, usando presiones y temperaturas elevadas, con diferentes tiempos de reacción.
- Realizar un estudio químico de la composición del almidón con el fin de determinar la relación de amilosa-amilopectina y hacer una mejor elección de las enzimas para realizar la hidrólisis.
- Realizar un estudio químico del hidrolizado de la harina, para verificar que los azúcares presentes son capaces de ser fermentados por la levadura *S. cerevisiae*.
- Variar las condiciones de fermentación con la levadura *S. cerevisiae* con el fin de lograr una mejor fermentación de los azúcares reductores.
- Evaluar diversas cepas de *S. cerevisiae* (una cepa de panificación, una cepa autóctona aislada de la semilla o fruto del ramón, etc.) para llevar a cabo la fermentación, con el fin de que el microorganismo tenga una mejor adaptación al medio, que se traduzca en una alta producción de bioetanol.

BIBLIOGRAFÍA

1. SENER. 2012. Balance Nacional de Energía, México.
2. M. C. Drapcho; N. P. Nhuan; H. W. Terry, *Biofuels Engineering Process Technology*, Mc Graw Hill, USA, 2008, 105-111.
3. S. Solomon; D. Qin; M. Manning; Z. Chen; M. Marquis; K. B. Averyt; M. Tignor; H. L. Miller, *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* Cambridge University Press, USA, 2007
4. B. H. Hagerdal; M. Galbe; M. F. G. Grauslund; G. Lidén; G. Zacchi, Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today, *Trends Biotechnol.*, 24, 549-556, 2006.
5. J. F. Valdez, *Panorama energético de México*, Consejo Consultivo de Ciencias y Presidencia de la Republica, México, 2011, 19-451.
6. IEA. 2012. CO2 Emissions from fuel combustion, France.
7. A. Demirbas, Progress and recent trends in biofuels, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 33, 1-18, 2007.
8. J. Stratta, Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental, 2000. Consultado el: 21 de noviembre del 2011, del sitio web: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd52/biocom.pdf>
9. BNDES-CGEE, *Bioetanol de caña de azúcar : energía para el desarrollo sostenible*, Rio de Janeiro, BNDES, 2008
10. C. A. Cardona; O. J. Sánchez; M. I. Montoy; J. A. Quintero, Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz, *Redalyc*, 28, 187-192, 2005.
11. H. Balat; C. Öz, Progress in bioethanol processing, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 34, 551-573, 2008.
12. M. J. Groom; E. M. Gray; P. A. Townsend, Biofuels and biodiversity: principles for creating better policies for biofuel production, *Conserv. Biol.*, 22, 602-609, 2008.
13. V. Skoulou; N. Mariolis; G. Zanakis; A. Zabaniotou, Sustainable management of energy crops for integrated biofuels and green energy production in Greece, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 15, 1928-1936, 2011.
14. A. N. Rocas, *Tropical Tree Seed Manual: Species Descriptions*, University of Wisconsin Press, U.S.A, 2004

15. FAO. 1993. Frutales: Valor nutritivo y usos en la alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica, Chile.
16. A. Ayala; S. M. Sandoval, Establecimiento y producción temprana de forraje de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en plantaciones a altas densidades en el norte de Yucatán, *Agroforestería en las Américas*, 7, 10-16, 1995.
17. C. C. Berg, *Brosimum alicastrum* Sw., CONABIO, 1972. Consultado el: 27 de noviembre del 2011, del sitio web: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies
18. E. R. M. Ortiz; L. G. Herrera, *Ramón (Brosimum alicastrum Swartz.)*, *Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje*, 2009, CONAFOR: México.
19. J. Cordero; F. Mesén; M. Montero; J. Stewart; D. Boshier; J. Chamberlain; T. Pennington; M. Hands; C. Hughes; G. Detlefsen, Descripción de especies de árboles nativos de América Central (*Brosimum alicastrum* Sw.), OFI-CATIE, 2003. Consultado el: 29-11-2011, del sitio web: http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/brosimum_alic astrum.pdf
20. A. I. A. Salguero, Respuesta glicémica de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) en mujeres de 16 a 25 años de edad, residentes de la ciudad capital, Guatemala, Licenciada, Universidad Rafael Landívar, Guatemala, 2010.
21. M. Meiners; C. S. Garduño; S. D. Blois, Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación, *Biodiversitas*, 87, 7-10, 2009.
22. A. R. Gillespie; D. M. Bocanegra-Ferguson; J. J. Jimenez-Osornio, The propagation of ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae) in mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico, *New Forests*, 27, 25-38, 2004.
23. E. R. Jaimes, El árbol de ramón, una alternativa alimentaria. *El Economista*, 23 de Octubre del 2013, 23 de Octubre del 2013, Consultado el: 29 de Octubre del 2013, del sitio web: <http://eleconomista.com.mx/entretenimiento/2013/10/23/arbol-ramon-alternativa-alimentaria>
24. E. P. Tejada; C. S. Muñoz, *Brosimum alicastrum (Ramón, Capomo, Ojite, Ojoche)* Instituto Nacional de Investigaciones sobre los Recursos Bióticos, México, 1980, 1-31.
25. CONABIO-CONAFOR, *Brosimum alicastrum Swartz*. 2003, SIRE-Paquetes tecnológicos: México. p. 1-6.
26. T. Pennington; J. Sarukhán, *Brosimum alicastrum*. Distribución potencial, escala 1:4000000., CONABIO, 2005. Consultado el: 14 de Octubre del 2013, del sitio web: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/dis_b_alicgw
27. C. M. Peters; E. Pardo-Tejada, *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and Potential in Mexico, *Econ. Bot.*, 36, 166-175, 1982.

-
28. Mayan Nut Institute, *Ramón seed (Brosimum alicastrum Sw.) and ramón seed-derived ingredients for use in traditional foods*. 2007: Guatemala. p. 15.
 29. L. Mojović; S. Nikolić; M. Rakin; M. Vukasinović, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates, *Fuel*, 85, 1750-1755, 2006.
 30. REN21, *Renewables 2013 Global Status Report*, 2013, Paris. 19.
 31. P. S. Nigam; A. Singh, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 37, 52-68, 2011.
 32. IPCC. 2011. Fuentes de energía renovables y mitigación del cambio climático, Cambridge University Press.
 33. E. S. Callejas; V. G. Quezada, Los biocombustibles, *El cotidiano*, 75-82, 2009.
 34. C. Á. Maciel, Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional, *Economía informa*, 63-87, 2009.
 35. M. Kayhanian; G. Tchobanoglous; R. C. Brown, *Handbook of Energy Efficiency and Renewable Energy: Biomass Conversion Processes For Energy Recovery*, F. Kreith; Y. Goswami, Ed; CRC Press USA, U.S.A, 2007, 25.51-25.58.
 36. J. O. Sánchez; C. A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.*, 99, 5270-5295, 2008.
 37. T. Abbasi, Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 919-937, 2010.
 38. S. O. Marcos, Buscando combustibles alternativos: el bioetanol, *An. mec. electr.*, 80, 46-53, 2003.
 39. H. C. Otiz, Elaboración de gasolina en PEMEX refinación. *Octanaje*, 1999, Consultado el: 21 de mayo del 2011, del sitio web: <http://www.ref.pemex.com/octanaje/26gas.htm>
 40. RenewableFuelsAssociation, World fuel ethanol production, 2013. Consultado el: 11-07-2013, del sitio web: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>
 41. F. O. Lichts, World ethanol and biofuels report. 2012, Consultado el: 11-07-2013, del sitio web: http://www.earth-policy.org/datacenter/pdf/book_fpep_ch4_all.pdf
 42. A. V. A. Elias, Producción de Bioetanol con *Zymomonas mobilis*, Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México, 2010.
 43. W. Wang, *Cassava production for industrial utilization in China present and future perspective* R. H. Howeler, Ed; CIAT, Japan, 2002, 33-38.

-
44. F. Alarcón; D. Dufour, *Almidón agrario de yuca en Colombia*, CIAT, Colombia, 2002
45. G. R. Avilés, Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca, *Ingeniería y Ciencia*, 2, 5-28, 2006.
46. M. C. Flickinger; S. W. Drew, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, John Wiley & Sons, USA, 1999, 1104-1113.
47. O. I. Contreras; J. E. P. Perilla; N. A. A. Enciso, Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos, *Ingeniería e Investigación*, 28, 47-52, 2008.
48. S. C. Zeeman; J. Kossmann; A. M. Smith, Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 209-234, 2010.
49. R. F. Tester; X. Qi; J. Karkalas, Hydrolysis of native starches with amylases, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 130, 39-54, 2006.
50. S. O'Brien; Y.-J. Wang, Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase, *Carbohydr. Polym.*, 72, 597-607, 2008.
51. S. Nikolić; L. Mojović; M. Rakin; D. Pejin; J. Pejin, Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal, *Food Chem.*, 122, 216-222, 2010.
52. F. Kobayashi; T. Sawada; Y. Nakamura; M. Ohnaga; M. Godliving; T. Ushiyama, Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of steam-exploded potato, *Appl Biochem Biotechnol*, 69, 177-189, 1998.
53. Y. Sun; J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11, 2002.
54. G. H. Robertson; D. W. S. Wong; C. C. Lee; K. Wagschal; M. R. Smith; W. J. Orts, Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain, *J. Agr. Food Chem.*, 54, 353-365, 2005.
55. I. Thorn; C. O. Au, *Applications of Wet-End paper Chemistry*, Springer, U.S.A, 2009, 174-176.
56. S. Mali; M. V. E. Grossmann; M. A. Garcia; M. N. Martino; N. E. Zaritzky, Microstructural characterization of yam starch films, *Carbohydr. Polym.*, 50, 379-386, 2002.
57. T. Kolusheva; A. Marinova, A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -amylase, *J. Chem. Technol. Metall.*, 42, 93-96, 2007.
58. M. Pauly; S. Hake, *Cell Wall Saccharification*, CPL press science publishers, USA, 2006, 9-15.

-
59. A. Pandey; C. Webb; C. R. Soccol; C. Larroche, *Enzyme Technology*, Springer, U.S.A, 2008, 19-20.
60. H. Bisswanger, *pH and Temperature Dependence of Enzymes*, in *Enzyme Kinetics*. Wiley-VCH Germany, 2005, 139- 142.
61. S. Shanmugam; T. Sathishkumar, *Enzyme Technology*, I. K. International Publish House Pvt. Ltd., India, 2009, 73-77.
62. I. Mera; J. C. Cataño, Obtención de almidón a partir de almidón de Yuca *Manihot sculenta*, *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3, 54-63, 2005.
63. J. Koolman; K. H. Röhm; J. Wirth, *Bioquímica: texto y atlas*, Panamericana, España, 2004, 88.
64. V. Sharma, *Factors affecting starch conversion to ethanol in dry grind corn process*, UMI, U.S.A, 2008, 7-9.
65. B. Saha; B. Dien; R. Bothast, Fuel ethanol production from corn fiber current status and technical prospects, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70-72, 115-125, 1998.
66. T. Baks; M. E. Bruins; A. M. Matser; A. E. M. Janssen; R. M. Boom, Effect of Gelatinization and Hydrolysis Conditions on the Selectivity of Starch Hydrolysis with α -Amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 488-495, 2008.
67. A. Kimura; J. F. Robyt, Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase, *Carbohyd. Res.*, 277, 87-107, 1995.
68. F. C. Pavezzi; E. Gomes; R. d. Silva, Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources, *Braz. J. Microbiol.*, 39, 108-114, 2008.
69. F. Shen; R. Liu; T. Wang, Effects of Temperature, pH, Agitation and Particles Stuffing Rate on Fermentation of Sorghum Stalk Juice to Ethanol, *Energ. Source. Part. A*, 31, 646-656, 2009.
70. C. Pina; J. António; T. Hogg, Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation, *Biotechnol. Lett.*, 26, 1521-1527, 2004.
71. A. Pandey; C. Larroche; S. Ricke; C.-G. Dussap; E. Gnansounou, *Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Elsevier, U.S.A, 2011, 260-261.
72. F. W. Bai; W. A. Anderson; M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.*, 26, 89-105, 2008.
73. C. P. Kurtzman; J. W. Fell, *The Yeasts* Elsevier, Amsterdam, 1998, 3-5.

-
74. J. L. F. Mallol; A. G. Arroyo; F. Lledías; A. A. C. Robles, La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 46, 24-46, 2004.
75. R. J. Bothast; M. A. Schlicher, Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 19-25, 2005.
76. R. K. Robinson, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, USA, 2000, 1918-1924.
77. A. A. Maris; D. Abbott; E. Bellissimi; J. Brink; M. Kuyper; M. H. Luttik; H. W. Wisselink; W. A. Scheffers; J. Dijken; J. Pronk, Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status, *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 391-418, 2006.
78. G. M. Walker, *Yeast Metabolism*, John Wiley & Sons, Escocia, 2000, 5.
79. J. Slaa; M. Gnode; H. Else, Yeast and fermentation: the optimal temperature, *J. Org. Chem: Chem. Dut. Aspects*, 134, a-c, 2009.
80. J. P. M. Moreno, Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial, Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2011.
81. Y. Lin; S. Tanaka, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 627-642, 2006.
82. M. C. Farfán; P. Lappe; A. L. Saavedra; A. M. Méndez; L. B. Pérez, Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes Lem.*) juice and molasses by a mixture of two yeasts, *Bioresour. Technol.*, 99, 9036-9039, 2008.
83. W. S. Adney; J. D. McMillan; J. R. Mielenz; K. T. Klasson, *Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Eighth Symposium*, Humana Press USA, 2007, 145
84. J. A. Quintero; M. I. Montoya; O. J. Sánchez; C. A. Cardona, Evaluation of fuel ethanol dehydration through process simulation, *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 5, 72-83, 2007.
85. S. S. Lee; F. M. Robinson; H. Y. Wang, Rapid determination of yeast viability, *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 641-649, 1981.
86. A. L. Saavedrá, Propuesta de un sistema forestal productor de semillas para reducir la importación de granos, *Crónica*, 6 de abril de 2011.
87. R. Gupta; P. Gigras; H. Mohapatra; V. K. Goswami; B. Chauhan, Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochem.*, 38, 1599-1616, 2003.
88. M. Asgher; M. J. Asad; S. U. Rahman; R. L. Legge, A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing, *J. Food Eng.*, 79, 950-955, 2007.

-
89. Novozymes, Efficient and quick saccharification. *Beverage Alcohol Application Sheet*, 2004, 1-3. Consultado el: 17 de mayo del 2012, del sitio web: <http://www.mountainmoonshine.com/images/Saccharification.pdf>
90. L. H. Ferng; S. H. Chen; Y. A. Lin, Effect of steam jet cooking on the destruction of corn starches, *Procedia Food Sci.*, 1, 1295-1300, 2011.
91. H. S. Olsen, *Enzymatic production of glucose syrups*, Kearsley, M. W.; Dziejcz, S. Z., Ed; Springer USA, 1995, 26-64.
92. G. Yue; J. Yu; X. Zhang; T. Tan, The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice, *Biomass and Bioenergy*, 39, 48-52, 2012.
93. N. Narendranath; R. Power, Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash, *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL*, 31, 581-584, 2004.
94. G. L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426-428, 1959.
95. P. R. Silva, Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Sacharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem). Maestro en Ciencias en Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México, 2011.
96. M. B. Williams; H. D. Reese, Colorimetric determination of ethyl alcohol, *Anal. Chem.*, 22, 1556-1561, 1950.
97. A. Peña, *Bioquímica*, Limusa, México, 1988, 220-221.
98. S. Dinçbas; E. Deemirkan, Comparison of Hydrolysis Abilities onto Soluble and Commercial Raw Starches of Immobilized and Free *B. amyloliquefaciens* α -amylase, *J. Biol. Environ. Sci.*, 4, 87-95, 2010.
99. C. C. Hernández; E. P. Carrillo; S. S. Saldivar, Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize, *J. Cereal Sci.*, 50, 131-137, 2009.
100. P. Labeille; J. L. Baret; Y. Beaux; F. Duchiron, Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations, *Ind. Crop. Prod.*, 6, 291-295, 1997.
101. P. Rani; S. Sharma; F. C. Garg; K. Raj; L. Wati, Ethanol production from potato flour by *Saccharomyces cerevisiae*, *Indian J. Sci. Technol.*, 3, 733-736, 2010.
102. P. Linko; S. Hakulin; Y. Y. Linko, Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol, *J. Cereal Sci.*, 1, 275-284, 1983.

-
103. M. Polakovič; J. Bryjak, Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase, *Biochem. Eng. J.*, 18, 57-63, 2004.
104. J. G. Fernández; M. M. Córdoba, Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para laproducción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*), *Ingeniería* 16, 1409-2441, 2006.
105. S. Nikolić; L. Mojović; D. Pejin; M. Rakin; M. Vukašinović, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus, *Biomass Bioenergy*, 34, 1449-1456, 2010.
106. D. Pejin; L. J. Mojović; V. Vučurović; J. Pejin; S. Denčić; M. Rakin, Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study, *Fuel*, 88, 1625-1628, 2009.
107. D. Wang; S. Bean; J. McLaren; P. Seib; R. Madl; M. Tuinstra; Y. Shi; M. Lenz; X. Wu; R. Zhao, Grain sorghum is a viable feedstock for ethanol production, *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL*, 35, 313-320, 2008.
108. E. P. Carrillo; S. O. S. Saldívar; C. C. Hernández; M. L. C. Callejas, Addition of protease during starch liquefaction affects free amino nitrogen, fusel alcohols and ethanol production of fermented maize and whole and decorticated sorghum mashes, *Biochem. Eng. J.*, 67, 1-9, 2012.
109. J. T. Martínez; F. P. Barahona; P. O. Lappe; P. G. Colunga; A. M. Méndez; S. Y. Vergara; A. S. Larqué, Ethanol production from two varieties of henequen (*Agave fourcroydes* Lem), *GCB Bioenergy*, 3, 37-42, 2011.
110. K. M. Dombek; L. O. Ingram, Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1286-1291, 1987.
111. F. N. Arroyo-López; S. Orlić; A. Querol; E. Barrio, Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid, *Int. J. Food Microbiol.*, 131, 120-127, 2009.
112. K. M. Dombek; L. O. Ingram, Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1286-1291, 1987.
113. B. Maiorella; H. W. Blanch; C. R. Wilke, By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 103-121, 1983.
114. S. Shanavas; G. Padmaja; S. N. Moorthy; M. S. Sajeev; J. T. Sheriff, Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes, *Biomass and Bioenergy*, 35, 901-909, 2011.

115. P. Wang; V. Singh; L. Xu; D. B. Johnston; K. D. Rausch; M. E. Tumbleson, Comparison of Enzymatic (E-Mill) and Conventional Dry-Grind Corn Processes Using a Granular Starch Hydrolyzing Enzyme, *Cereal Chem.*, 82, 734-738, 2005.
116. R. M. Moreno; P. Morales; R. Gonzalez; A. Mas; G. Beltran, Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source, *FEMS Yeast Research*, 12, 477-485, 2012.
117. P. Wang, *Granular starch hydrolysis for fuel ethanol production*, UMI, USA, 1987, 40.
118. S. Kim; B. E. Dale, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and Bioenergy*, 26, 361-375, 2004.
119. V. Singh; C. J. Batie; G. W. Aux; K. D. Rausch; C. Miller, Dry-Grind Processing of Corn with Endogenous Liquefaction Enzymes, *Cereal Chem.*, 83, 317-320, 2006.

ANEXOS

ANEXO I



CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES, S.A. DE C.V.

PUEBLA N° 282, COL. ROMA, C.P. 06700 MÉXICO, D.F. TELS: (55) 5514-3391 c/8 LÍNEAS 5525-4010, 5207-6495
(55) 5207-6617, 5208-0123 FAX: (55) 5207-9150

www.cencon.com.mx

ALIMENTOS · BEBIDAS · MEDICAMENTOS · COSMÉTICOS · AGROINDUSTRIA
DESARROLLO DE PRODUCTOS · INDUSTRIA QUÍMICA EN GENERAL

FORMATO MPA-F-027A-01-0

INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYOS

REF: 3495-11
30 Junio 2011
O. T. B101548
Muestra 1/1.
Página 1 de 2.

ANÁLISIS:

Microbiología:

Cuenta Bacilenana
Grupo Coliforme
Salmonella
Estafilococos
Estreptococos
E. coli
Hongos
Levaduras
V. cholerae
Anaerobios
Otros

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
CIENTIFICACIÓN DE YUCATÁN, A.C.
CALLE 43 No. 130
COL. CHUBURNA DE HIDALGO
C.P. 97200 MÉRIDA, YUCATÁN.

ATN: SR. ARTURO SÁNCHEZ RIVERA.

Muy señores nuestros:

A continuación se servirá encontrar el informe de resultados obtenidos de una muestra enviada a este Centro de Control el día 17 de Junio de 2011 para su estudio, identificada por ustedes como se reporta:

Fisicoquímicos:

Bromatológicos
Minerales
Vitaminas
Aditivos
Aflatoxinas
Materia Extraña
Otros

FQ.1928

HARINA CON SEMILLAS.

Instrumentales:

Cromatografía de Gases
Cromatografía de Líquidos
Absorción Atómica
Espectrofotometría
Infrarrojo
Aminogramas
Otros

NOMBRE DEL ENSAYO

RESULTADOS

Humedad (pérdida al secado)	5,88	g/100g
Cenizas	3,57	g/100g
Grasa (Soxhlet)	1,10	g/100g
Proteína (Nx6,25)	12,24	g/100g
Fibra cruda	4,96	g/100g
Hidratos de Carbono (por diferencia)	72,25	g/100g
Aporte calórico	347,86	kcal/100g (1 447,03 kJ/100g)

Referencia Bibliográfica:

Humedad	Método Gravimétrico NOM-116-SSA1-1994
Cenizas	Método Gravimétrico NMX-F-607-NORMEX-2002
Grasa	Método Gravimétrico NOM-086-SSA1-1994 Apéndice Normativo C.1.3.
Proteína	Método Kjeldahl NMX-F-808-NORMEX-2002
Fibra cruda	Método Gravimétrico NMX-F-613-NORMEX-2003

Agua:

Bacteriológicos
Fisicoquímicos
Agua Residual

Asesorías en:

Control de Calidad
Inspecciones Sanitarias
Auditorías de Calidad
Desarrollo de Productos
Investigación Aplicada
Estudios Especiales
FDA Registrar
Unidades de Verificación

Esperando que los resultados obtenidos les sean de utilidad nos reiteramos a sus órdenes.

ATENTAMENTE
CENTRO DE CONTROL

Ing. José Carlos Álvarez Rivero
Representante Legal
L. Q. Antonio Paz Paredes
Director Técnico

eva * cctc

Los efectos de los resultados se relacionan únicamente a los elementos ensayados. El informe de ensayo no puede ser reproducido excepto en su totalidad. En caso de reproducción parcial, empleo con fines legales o publicitarios, debe contarse previamente con la aprobación por escrito emitida por Centro de Control Total de Calidades, S.A. De C.V.



CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES, S.A. DE C.V.

PUEBLA N° 282, COL. ROMA, C.P. 06700 MÉXICO, D.F. TELS: (55) 5514-3391 c/8 LÍNEAS 5525-4010, 5207-6496
(55) 5207-6617, 5208-0123 FAX: (55) 5207-9150

www.cencon.com.mx

ALIMENTOS · BEBIDAS · MEDICAMENTOS · COSMÉTICOS · AGROINDUSTRIA
DESARROLLO DE PRODUCTOS · INDUSTRIA QUÍMICA EN GENERAL

FORMATO MPA-F-027A-01-0

INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYOS

REF: 3495-11
30 Junio 2011
O. T. B101548
Muestra 1/1.
Página 2 de 2.

ANÁLISIS:

Microbiología:

Cuenta Bacteriana
Grupo Coliforme
Salmonella
Estafilococos
Estreptococos
E. coli
Hongos
Levaduras
✓ cholerae
Anaerobios
Otros

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
CIENTIFICACIÓN DE YUCATÁN, A.C.
CALLE 43 No. 130
COL. CHUBURNA DE HIDALGO
C.P. 97200 MÉRIDA, YUCATÁN.

AT'N: SR. ARTURO SÁNCHEZ RIVERA.

Muy señores nuestros:

A continuación se servirá encontrar el informe de resultados obtenidos de una muestra enviada a este Centro de Control el día 17 de Junio de 2011 para su estudio, identificada por ustedes como se reporta:

Fisicoquímicos:

Bromatológicos
Minerales
Vitaminas
Aditivos
Mflatoxinas
Materia Extraña
Otros

FQ.1928
HARINA CON SEMILLAS.

Instrumentales:

Cromatografía de Gases
Cromatografía de Líquidos
Absorción Atómica
Espectrofotometría
Infrarrojo
Cromatogramas
Otros

NOMBRE DEL ENSAYO	RESULTADOS
Almidón (cualitativo)	Positivo
Almidón (cuantitativo)	61,00 g/100g
Referencia Bibliográfica Almidón cualitativo y cuantitativo	NMX-F-321-S-1978.

Agua:

Bacteriológicos
Fisicoquímicos
Agua Residual

Esperando que los resultados obtenidos les sean de utilidad nos reiteramos a sus órdenes.

ATENTAMENTE
CENTRO DE CONTROL

Ing. José Carlos Álvarez Rivero
Representante Legal
L. Q. Antonio Paz Paredes
Director Técnico

eva * cctc

Los efectos de los resultados se relacionan únicamente a los elementos ensayados. El informe de ensayo no puede ser reproducido excepto en su totalidad. En caso de reproducción parcial, empleo con fines legales o publicitarios, debe contarse previamente con la aprobación por escrito emitida por Centro de Control Total de Calidades, S.A. De C.V.

ANEXO II

Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M [119].

Para obtener un litro de una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, se mezclan soluciones madre 0.1 M de NaH_2PO_4 (monobásico) y 0.1 M Na_2HPO_4 (dibásico), en las relaciones mencionadas en siguiente tabla según el pH al que se desee obtener la solución amortiguadora. Para preparar las soluciones madre se colocan en diferentes matraces aforados con capacidad de 1 L, 12 g NaH_2PO_4 y 14.2 g Na_2HPO_4 ; posteriormente se aforan con agua destilada.

Tabla A.4.1. Preparación de una solución amortiguadora de fosfato de sodio

pH de la solución amortiguadora de fosfato de sodio	0.1 M NaH_2PO_4 (mL)	0.1 M Na_2HPO_4 (mL)
6.0	877	123
6.1	850	150
6.2	815	185
6.3	775	225
6.4	735	255
6.5	685	315
6.6	625	375
6.8	510	490
6.9	450	550
7.0	390	610
7.1	330	670
7.2	280	720

ANEXO III

Los cuadros azules enmarcan los 5 cuadrantes (con área de 0.16 mm^2 cada uno y con una profundidad es de 0.1 mm .) de la cámara de Neubauer en los que se realizó el conteo de levaduras.

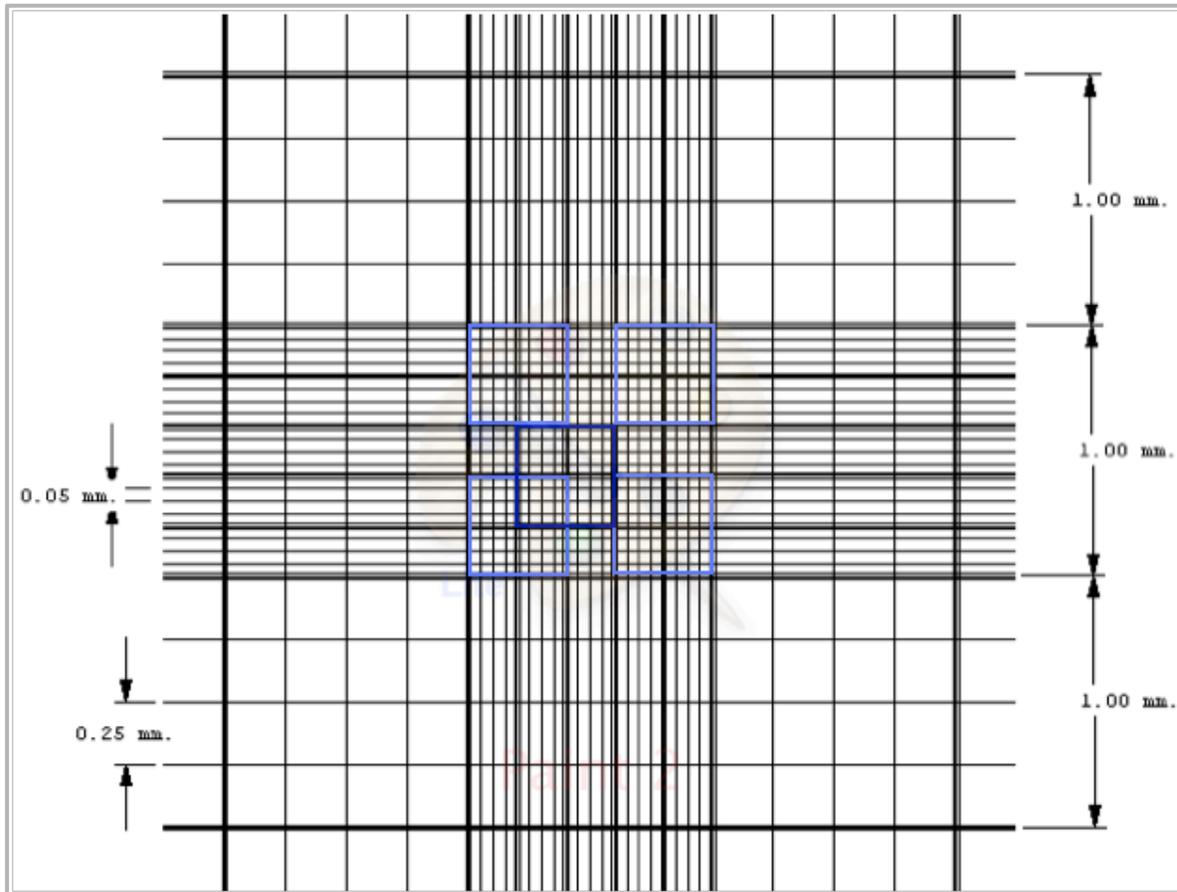


Figura A.1. Superficie de la cámara de Neubauer

ANEXO IV

Curva de calibración de ARD

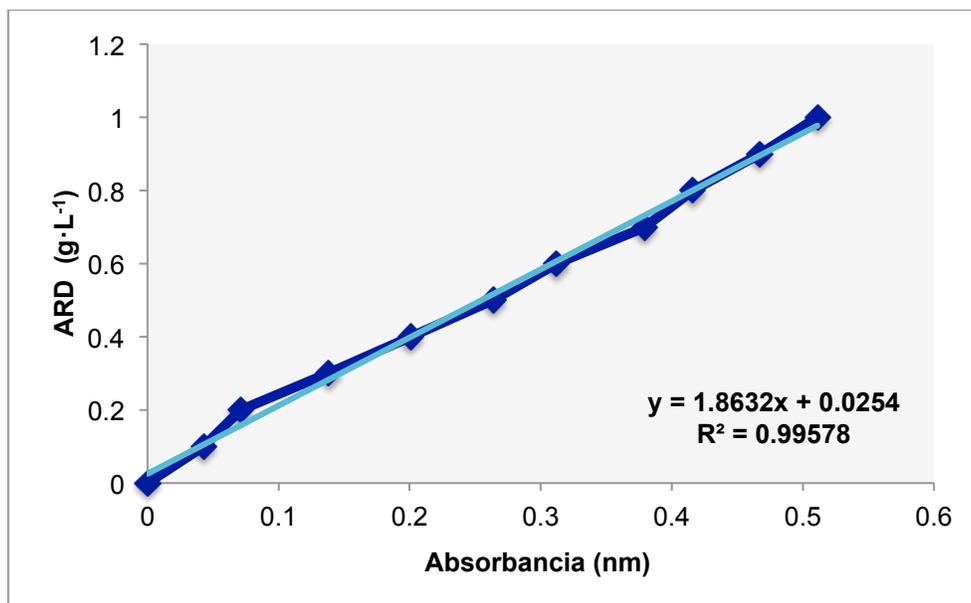


Figura A.2. Curva de calibración de azúcares reductores directos (ARD) a 550 nm.

Tabla A.4.2. Absorbancias de las muestras a 550 nm

ARD (g·L ⁻¹)	M1	M2	M3	PROMEDIO
0	0	0	0	0
0.1	0.031	0.041	0.058	0.043
0.2	0.069	0.078	0.066	0.071
0.3	0.134	0.143	0.137	0.138
0.4	0.21	0.195	0.198	0.201
0.5	0.263	0.266	0.264	0.264
0.6	0.307	0.319	0.311	0.312
0.7	0.375	0.382	0.379	0.379
0.8	0.398	0.416	0.435	0.416
0.9	0.465	0.468	0.469	0.467
1	0.502	0.511	0.519	0.511

ANEXO V

Curva de calibración de etanol a 585 nm

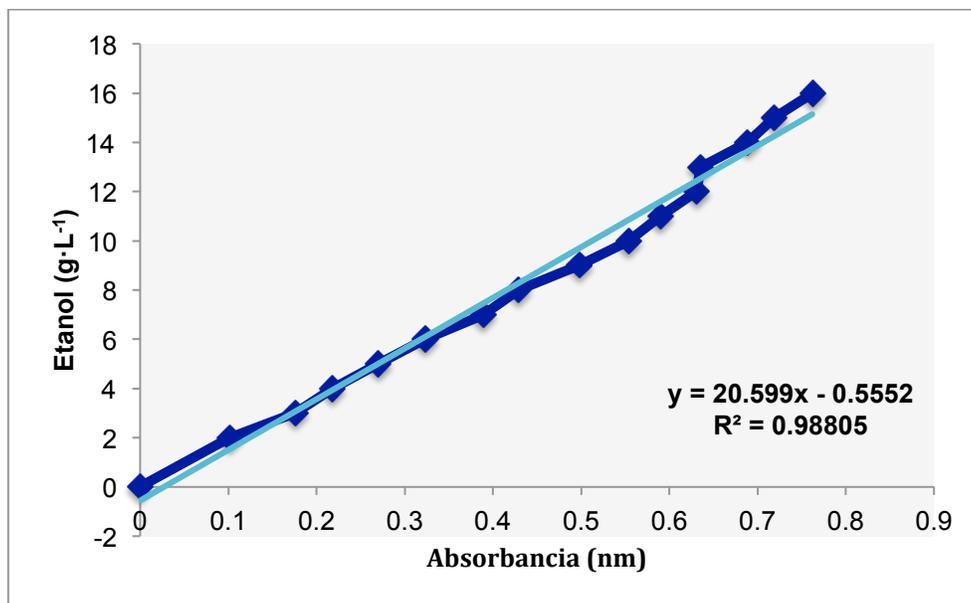


Figura A.3. Curva de calibración de etanol a 585 nm.

Tabla A.4.3. Absorbancias de las muestras a 585 nm

Concentración de etanol (g·L ⁻¹)	M1	M2	M3	PROMEDIO
2	0.104	0.1	0.101	0.102
3	0.175	0.17	0.183	0.176
4	0.213	0.22	0.221	0.218
5	0.271	0.275	0.263	0.27
6	0.333	0.316	0.319	0.323
7	0.397	0.39	0.379	0.389
8	0.424	0.437	0.427	0.429
9	0.498	0.49	0.505	0.498
10	0.542	0.555	0.565	0.554
11	0.582	0.586	0.601	0.59
12	0.637	0.629	0.628	0.631
13	0.64	0.627	0.637	0.635
14	0.673	0.683	0.712	0.689
16	0.76	0.765	0.762	0.762

ANEXO VI

Un kilogramo de harina de semilla de ramón, está constituido por 610 g de almidón, de acuerdo a la metodología propuesta solo se pudo hidrolizar el 61.3% de éstos, porcentaje que representa un total de 374 g empleados en la producción de etanol.

En el presente trabajo, por cada 20 g de harina de semilla de ramón empleados se obtuvo un volumen de 0.064 L de hidrolizado, a una concentración de 123.76 g·L⁻¹ de ARD. Debido a la dilución causada por el inóculo sólo se introdujeron a fermentar 107.78 g·L⁻¹ de ARD, de los cuales 84.82 g·L⁻¹ de ARD se consumieron a las 12 h y se obtuvo una concentración de 32.71 g de bioetanol·L⁻¹ de mosto.

Para generar un litro de hidrolizado a partir de harina de semilla de ramón, los gramos necesarios deben ser:

$$\text{g de harina de semilla de ramón} = (1 \text{ L de hidrolizado}) \left(\frac{20 \text{ g de harina de semilla de ramón}}{0.064 \text{ L}} \right)$$

$$\text{g de harina de semilla de ramón} = 312.5$$

Por lo tanto, con 312.5 g de harina de semilla de ramón se deben obtener 32.71 g de bioetanol, si la densidad del etanol es de 0.789 g·mL⁻¹ se obtiene un volumen de:

$$V = \frac{32.71 \text{ g}}{0.789 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}} = 41.45 \text{ mL de bioetanol}$$

Así, por cada kilogramo de harina de semilla de ramón nosotros producimos mediante la metodología desarrollada:

$$\text{mL de bioetanol} = (1000 \text{ g}) \left(\frac{41.45 \text{ mL de bioetanol}}{312.5 \text{ g de harina de semilla de ramón}} \right) = 132.7$$

$$132.7 \text{ mL de bioetanol} = 0.1327 \text{ L de bioetanol}$$

Sí los litros de bioetanol teóricos producidos por un kilogramo de harina de semilla de ramón es de 0.434 L, la eficiencia global de la metodología obtenida fue del 30.6%.