



Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**ESTUDIO PARA OPTIMIZAR LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A
PARTIR DE HARINA DE SEMILLAS DE RAMÓN (*Brosimum
alicastrum Sw.*)**

Tesis que presenta

Ing. Edgar Olguin Maciel

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán AC y la Unidad de Energía Renovable, por aceptarme y permitir desarrollar esta investigación en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, número 297851, para la realización de los estudios de Maestría.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por la dirección y enseñanzas brindadas durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra, por aceptarme como parte de su equipo de trabajo y guiarme en la elección del tema de investigación.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras, por sus correcciones durante todo el desarrollo del documento así como su asesoría en la parte experimental y fermentación.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por sus valiosas aportaciones a este trabajo y su apoyo en el desarrollo experimental de la investigación.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por sugerencias y correcciones durante todo el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Sara Solís Pereira por las observaciones realizadas a este trabajo.

A la IQ. Tanit Toledano Thompson por todo el apoyo prestado a lo largo de este proyecto, en especial con el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

Al IQI. Alberto Cortez Velázquez, por su apoyo y consejos en el desarrollo de la parte experimental de este proyecto.

A la Lic. Silvia Vergara Yoisura y al MC. Israel García Sheseña por el apoyo y facilidades brindadas en la obtención de materia prima y literatura con respecto a este proyecto.

Al laboratorio de GeMBio del CICY, al laboratorio Microbiología y Biocombustibles de la UER y al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida.

Al Dr. Alejandro May Pat de la Unidad de Materiales Poliméricos y el MC. Luis Torres Tapia de la Unidad de Biotecnología, por facilitarme el equipo necesario para el desarrollo de los experimentos.

A la MC. Ángela Kú González por su disposición a colaborar en el proyecto.

A la Biol. Tania Islas Solís por compartir su conocimiento y experiencia en el manejo de técnicas de laboratorio.

A la MC. Rubí del Rosario Chablé Villacis y a la Biol. Emy Guadalupe Huchin Poot por sus aportaciones y su ayuda, sin la cual no hubiera sido posible la realización de la parte experimental de este trabajo.

A la MC. Teresita de Jesús Valencia Yah por su colaboración en la presentación y sus comentarios a este trabajo.

Al MC. Andrés Quijano Ramayo, Ing. Ángel Nexticapán Garcez y al Ing. Rodolfo Martín Mex por sus sugerencias y apoyo.

A la LAE. Arely Bertha Ramírez González por su apoyo con el formato electrónico del documento.

Al IBQ. Carlos Hernández Calderón por su apoyo en el uso del equipo de destilación y HPLC.

A mis compañeros de generación por sus enriquecedoras opiniones con respecto a este trabajo; Patricia, Marco, Silvano, Giovanni, Samantha, Harvey, Karen, Oscar, Pablo...

A mis compañeros de laboratorio Erik, Anuar, Isabel, Gamaliel, Abril, Sandy, Jaqueline Alberto, Erik, Diana, Fanny, Verónica, Gabriela...

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Horacio y María como una pequeña muestra de gratitud por su infinito cariño y apoyo.

A mis hermanos Carlos y Horacio, por su inconmensurable apoyo en todos los sentidos.

A mi esposa Fabiola por impulsarme en todo momento, gracias por tu apoyo y amor, esto es un logro compartido.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. <i>Brosimum alicastrum</i> Sw. (Ramón).	3
1.1.1. Usos.	6
1.1.2. Productividad.	6
1.1.3. Composición de la semilla de ramón.....	6
1.2. Uso de bioetanol como combustible.	7
1.2.1. El bioetanol en el mundo.....	7
1.3. Almidón como fuente de azúcares para biocombustible.	8
1.3.1. Estructura y composición.	9
1.3.1.1. Amilosa.	11
1.3.1.2. Amilopectina.....	11
1.3.2. Características del almidón de ramón	11
1.3.3. Fuentes de almidón usadas para producir bioetanol.	12
1.4. Pretratamientos.....	13

1.5.	Hidrólisis de almidón.....	16
1.6.	Fermentación.....	17
1.6.1.	Microorganismos productores de etanol.....	17
1.7.	Destilación y deshidratación.....	21
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		26
2.1.	Materia prima.....	26
2.2.	Cuantificación de azúcares reductores directos (ARD).	26
2.3.	Pretratamientos.....	26
2.3.1.	Pretratamientos físicos.....	26
2.3.1.1.	Presión y temperatura (T1).....	26
2.3.1.2.	Temperatura (T2).	26
2.3.1.3.	Ultrasonido (T3).....	27
2.3.2.	Biológicos.	27
2.4.	Hidrólisis.....	28
2.4.1.	Licuefacción.....	28
2.4.2.	Sacarificación.	28
2.5.	Análisis estadístico.....	28
2.6.	Fermentación.....	29
2.7.	Destilación.....	30
2.8.	Cuantificación de etanol.....	30

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. Efecto de los pretratamientos físicos sobre la estructura de la harina de semillas de ramón y rendimiento de ARD.	31
3.1.1. Harina sin pretratamiento (T0).	31
3.1.2. Pretratamiento de presión y temperatura (T1).....	33
3.1.3. Pretratamiento con temperatura (T2).	34
3.1.4. Pretratamiento con de ultrasonido (T3).	35
3.2. Hidrólisis.....	37
3.3. Efecto de los pretratamientos biológicos sobre la estructura de la harina de semillas de ramón y rendimiento de ARD	41
3.3.1. Pretratamiento con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....	42
3.3.2. Pretratamiento con <i>Aspergillus niger</i> RSH-2.	43
3.4. Fermentación.....	44
3.5. Rendimiento de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón	45
3.5.1. Pretratamiento físico (T2).....	45
3.5.2. Pretratamientos biológicos (<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y <i>Aspergillus niger</i> RSH-2)	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución del ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Sw) en México [17].	3
Figura 2. <i>Brosimum alicastrum</i> . Árbol (a), fruto (b), corteza (c) y semillas (d).	5
Figura 3. Estructura del almidón: amilosa (a) y amilopectina (b) [45].	10
Figura 4. Estructura del gránulo de almidón: a) gránulo; b) láminas; c) estructura de la lámina [46].	10
Figura 5. Ruta metabólica seguida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante la fermentación alcohólica. [15].	19
Figura 6. Condiciones adversas potenciales durante la fermentación alcohólica realizada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [76].	20
Figura 7. Estrategia experimental propuesta para la producción de etanol a partir de harina de semillas de ramón (<i>B. alicastrum</i>).	25
Figura 8. Harina de ramón de ramón. a) gránulos de almidón insertados en la matriz proteica (flechas rojas); b) diferentes formas de gránulos de almidón de ramón; c) tamaño y forma del granulo de almidón de ramón.	32
Figura 9. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón tratada con presión y temperatura (T1).	33
Figura 10. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón con temperatura (T2).	34
Figura 11. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón tratada con ultrasonido (T3).	36
Figura 12. Gránulos de almidón deformados por el tratamiento ultrasonido 70 W durante 60 minutos.	36

Figura 13. Concentración de ARD en la harina inicial (T0) y después de los pretratamientos T1 (presión+temperatura), T2 (temperatura) y T3 (ultrasonido).....	37
Figura 14. Dinámica de la hidrólisis de harina de ramón con dos pasos consecutivos licuefacción y sacarificación. T0 (harina sin pretratar); T1 (presión+temperatura); T2 (temperatura); T3 (ultrasonido).	38
Figura 15. Efecto de los pretratamientos en la liberación de ARD al final de la hidrólisis, Anova de una vía, Tukey $\alpha=0.05$	39
Figura 16. Liberación de ARD por la cepa <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 a partir de harina de semillas de ramón.....	41
Figura 17. Crecimiento del hongo en suspensión de harina al 12% p/v a) 2 días de crecimiento; b) 9 días de crecimiento.....	42
Figura 18. Efecto del hongo Bm-2 sobre la estructura de la harina de ramón.	42
Figura 19. Crecimiento de la cepa <i>Aspergillus niger</i> RSH-2 sobre la harina de ramón.....	43
Figura 20. Efecto de los pretratamientos biológicos sobre la estructura de la harina. Harina sin pretratar (a), pretratada con <i>Aspergillus niger</i> RSH-2 (b) y <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 (c).	44
Figura 21. Cálculo del rendimiento de etanol a partir del mosto del pretratamiento 2 por las levaduras evaluadas. Anova de un vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.	46
Figura 22. Cálculo de rendimientos de etanol obtenidos por las cepas <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y <i>Aspergillus niger</i> RHS-2, utilizadas en los pretratamientos biológicos. Anova de un vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de la semilla de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Sw.).....	7
Tabla 2. Principales países productores de bioetanol.	8
Tabla 3. Composición química y propiedades del almidón de ramón (<i>B. alicastrum</i>) en comparación con el maíz (<i>Zea mays</i> L.).	12
Tabla 4. Producción de bioetanol a partir de diferentes fuentes de almidón.....	13
Tabla 5. Especies de levaduras utilizadas en la producción de etanol y requerimientos de temperatura, pH, fuente de carbono, nitrógeno y tiempo de incubación.....	18
Tabla 6. Levaduras evaluadas fuentes y tolerancias a etanol y temperatura.	29
Tabla 7. Consumo de ARD por parte de las levaduras evaluadas durante la fermentación.	44

RESUMEN

La contaminación generada por el uso de combustibles fósiles, así como su agotamiento, han estimulado en el mundo, investigaciones sobre la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables. En la Península de Yucatán, se encuentra el árbol Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.), especie promisoría para la producción de bioetanol, ya que, sus semillas contienen 61% de almidón. El objetivo de este estudio fue optimizar la metodología para la producción de bioetanol a partir de la harina de Ramón, bajo la hipótesis de que la aplicación de pretratamientos físicos y biológicos modificarían la estructura de la misma, permitiendo una mayor actividad enzimática y con ello un mejor rendimiento de etanol. El pretratamiento (Temperatura, 90 °C, 30min.) mostró estadísticamente el mejor resultado, con un valor de 96 g·L⁻¹ de azúcares reductores, que al ser fermentado alcanzaron rendimientos de hasta 214 L·ton⁻¹, valor superior al reportado en trabajos anteriores para esta misma harina. Por otro lado, los pretratamientos biológicos con los hongos *Trametes hirsuta* (Bm-2) y *Aspergillus niger* (RSH-2) produjeron de manera directa 98 y 80 L·ton⁻¹ de etanol respectivamente. Estos resultados posicionan al ramón como una fuente renovable de biomasa para la producción de biocombustibles, tanto por medio de pretratamientos físicos con los que se alcanzó el 50% del rendimiento teórico como por tratamientos biológicos, donde se puede desarrollar un bioproceso consolidado que permita la producción sustentable del etanol a partir de harina de sus semillas.

ABSTRACT

Pollution generated by the use of fossil fuels as well as its depletion, have stimulated worldwide, research on the production of biofuels from renewable sources. In the Yucatan peninsula inhabits the Ramon tree (*Brosimum alicastrum* Sw.), a promising species for bioethanol production, since, its seeds contains 61% of starch. The aim of this study was to optimize the methodology for bioethanol production, under the hypothesis that the application of physical and biological pretreatments would modify the structure of flour, allowing greater enzyme activity and thus a higher yield of ethanol. Pretreatment 2 (Temperature of 90 °C during 30 min.) statistically showed the best results at the end of the hydrolysis, with a value of 96 g L⁻¹ of reducing sugars, that after being fermented, achieved yields up to 214 L ton⁻¹, this value is higher than the one reported in a previous work with the same flour. On the other hand, the biological pretreatments using *Trametes hirsuta* (Bm-2) and *Aspergillus niger* (RSH-2) fungi, directly produced 98 and 80 L ton⁻¹ respectively. These results positioned the Ramon tree as a renewable source of biomass for the production of biofuels, both by means of physical pretreatments, where 50% of theoretical throughput was reached, and biological pretreatments, where a consolidated bioprocess may be developed allowing sustainable bioethanol production from flour of Ramon's seeds.

INTRODUCCIÓN.

Desde el comienzo de la era industrial, la humanidad ha emitido grandes cantidades de gases de efecto invernadero (GEI) a la atmosfera [1], en particular el dióxido de carbono (CO₂) [2], del cual, en los últimos años, se han arrojado en promedio 32,000 millones de toneladas al año [3], siendo la principal fuente, la quema de combustibles fósiles [2]. Como consecuencia de estas emisiones y otras perturbaciones antropogénicas, la temperatura media global ha aumentado aproximadamente 0.8 °C en el último siglo y la concentración de CO₂ rebasa las 390 ppm en la atmósfera [1]. Aunado a esto, el rápido agotamiento de los combustibles fósiles, ha estimulado en todo el mundo, investigaciones con respecto a la generación de combustibles a partir de recursos renovables [4].

Los beneficios de los combustibles a partir de fuentes renovables, frente a los combustibles tradicionales incluyen: una mayor seguridad energética, la reducción de gases de efecto invernadero, captura de carbono, la disminución de la importación de energéticos y desarrollo agrícola [5]. La producción de etanol a partir de biomasa renovable o bioetanol, ha ganado popularidad recientemente por su viabilidad económica [4] y, en la actualidad es el biocombustible líquido más utilizado como aditivo/sustituto para los vehículos de motor [6]. En Brasil, el bioetanol se usa puro o en diferentes mezclas (E20, E25) y vehículos especialmente adaptados denominados *flexi fuel* (FFV) usan cualquier mezcla. En Estados Unidos, se usa la mezcla E10 y E85 para FFV, y en otros países la mezcla utilizada es la que se señala a continuación: Canadá E10 y E85, Suecia E5, India E5, Australia E10, Tailandia E10, China E10, Perú E10 y Paraguay E7. El uso de bioetanol a partir de biomasa, es una forma de reducir tanto el consumo de petróleo crudo como la contaminación del medio ambiente [7].

Según la fuente de glucosa que se use para obtener bioetanol, éste se puede clasificar como: de primera generación (azúcar y almidón), segunda generación (material lignocelulósico) y tercera generación (algas) [8,9]. La producción de bioetanol utiliza principalmente cultivos alimenticios; por ejemplo en el año 2013 la producción fue de 88,690 millones de litros, y de este total, cerca del 80% se obtuvo a partir de maíz y caña de azúcar en Estados Unidos y Brasil, respectivamente [10,11]. La limitada oferta de estos cultivos puede dar lugar a la competencia entre el uso para producción de bioetanol y el

suministro de alimentos, además, algunos estudios indican que la producción de bioetanol con estos cultivos no contribuye a la reducción de gases de efecto invernadero [11].

Es por lo anterior que se ha impulsado la búsqueda de otras fuentes de materias primas como: residuos agrícolas, forestales y domésticos, especies vegetales que no compitan con la alimentación y que tengan poca demanda de insumos. Pero debido a lo complejo de la estructura química de estos materiales, ocasionalmente se requerirá del desarrollo de tecnologías y tratamientos previos para hacerlos viables para la obtención de etanol por fermentación [12].

En la Península de Yucatán, se encuentra ampliamente distribuido un árbol conocido como ramón (*Brosimum alicastrum* Sw), especie sobre la cual se desarrolla el megaproyecto “Servicios Ambientales de Alto Impacto” que busca explotar de manera sustentable el uso del ramón en el ámbito de cambio climático, alimentación y energía, aprovechando que el árbol está bastante arraigado en los usos de la población desde épocas prehispánicas y se ha reportado que existen de 1 a 6 árboles en cada casa de las comunidades mayas [13]. Cada árbol de esta especie produce, en promedio, 95.5 kilogramos de semilla por año, con un contenido de 61% de almidón [14,15], lo que la convierte en una especie con potencial para la producción de bioetanol. En este caso, el reto consiste en obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir del almidón, los cuales puedan ser utilizados por microorganismos fermentadores.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. *Brosimum alicastrum* Sw. (Ramón).

Brosimum alicastrum Sw. (nombre común: Ramón), es una especie de la familia *Moraceae*, originaria de Mesoamérica y el Caribe [14,16]. Se extiende desde México a través de Centroamérica, hasta Colombia, Perú, Venezuela, y en las islas del Caribe: se halla en Cuba, Jamaica y en la isla Trinidad [17,18]. En México se encuentra distribuida en los Estados del Golfo de México y el mar Caribe, desde Tamaulipas hasta Quintana Roo; por la costa del Pacífico desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas y en el centro del país se localiza en los estados de San Luis Potosí, Durango, Estado de México, Morelos y Puebla (Figura 1) [18,19,20].



Figura 1 Distribución del ramón (*Brosimum alicastrum* Sw) en México [17].

Investigaciones antropológicas indican que *B. alicastrum* fue uno de los principales medios de soporte de los antiguos pueblos mayas, quienes lo cultivaron intensamente

[21], existiendo en la actualidad arboles de ramón en prácticamente todos los solares de las familias mayas [14]. La importancia cultural y ancestral del ramón se ha perdido, junto a las de otras plantas que provienen de la selva, pues el conocimiento de su uso ya no se transmite a las actuales generaciones [21]. Hoy en día la semilla es raramente usada para consumo humano entre la población de la Península de Yucatán [22].

En 1975, la academia de Ciencias de Estados Unidos incluyó al ramón en la lista de “plantas tropicales subexplotadas con promisorio valor económico”, pues a cada una de sus partes se le puede dar un uso práctico [16,21]. Por lo importante de esta especie en el estado de Yucatán, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) ha definido al ramón como una especie prioritaria para sus programas de conservación y restauración de ecosistemas forestales y desde el año 2008, se ha propuesto como objetivo a corto plazo la identificación, conservación y manejo sustentable de su germoplasma [23,24].

El árbol de ramón crece de manera silvestre en distintos tipos de vegetación. En la Península de Yucatán su altura máxima varía entre 15 y 22 m [14] (Figura 2). Posee una copa densa, abierta e irregular, hojas alternas de 4 a 18 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho de color verde brillante [18,24]. En la madurez del árbol, la corteza es áspera negruzca y frecuentemente presenta escamas grandes y cuadradas blancas. La corteza interna es de color crema amarillenta, con abundante exudado lechoso, pegajoso y rosado al contacto con el aire [18,25]. El sistema radical es fuerte, vertical y puede alcanzar hasta 20 metros de profundidad, por lo que soporta fuertes vientos, inundaciones o sequías, aunque algunas raíces son superficiales, está frecuentemente reforzado por contrafuertes [25]. Tradicionalmente se ha reportado que solo presenta flores unisexuales, pero estudios recientes mencionan la presencia de flores hermafroditas en algunos árboles [26]. El fruto es una drupa, desde 2 hasta 2.5 cm de diámetro, de sabor marcado y olor dulce, globosa, con pericarpio carnoso comestible, de color que va de verde a anaranjado o rojizo, conforme va madurando y contiene generalmente una sola semilla de 1 a 2 cm, cubierta con una testa papirácea amarillenta [17,18].



Figura 2. *Brosimum alicastrum*. Árbol (a), fruto (b), corteza (c) y semillas (d).

La especie presenta una etapa juvenil de 7 años, después de lo cual comienza a florear [14]. En la Península de Yucatán la floración ocurre de enero a junio [27].

1.1.1. Usos.

El nombre común de *Brosimum alicastrum* Sw. en Yucatán es ramón, que deriva de la palabra ramonear en referencia al consumo de sus hojas y semillas por el ganado y otros animales domésticos que lo encuentran altamente palatable [14,22].

Además de su buen sabor, la especie presenta altos contenidos de proteínas; 16% de proteína digestible en sus hojas y 18% en sus frutos. Las hojas, tallo joven, fruto y semillas constituyen un excelente forraje para el ganado bovino, caprino, equino y porcino. En algunos lugares, con una estación seca muy pronunciada, es la única pastura disponible [27].

Además de forraje, otros usos, en menor medida, del ramón son: cerca viva, barrera rompe vientos y es recomendado para la conservación del suelo, control de la erosión, así como para la recuperación de suelos degradados [27].

La madera se utiliza para elaborar artesanías, mangos de herramientas, cajas para empaques, muebles y construcción en general [27,28].

La pulpa se consume en fresco, o se utiliza en la preparación de mermelada. Las semillas se consumen asadas o hervidas, de igual forma se usa como harina en la elaboración de tortillas y panes, o las semillas tostadas como sustituto de café [27]. El látex que fluye del tronco se emplea para controlar el asma, bronquitis y tuberculosis, además es balsámico y antitusivo [27,28].

1.1.2. Productividad.

En un estudio realizado en Yucatán, se estimó la producción promedio de forraje en 163 kg/árbol/año, esto daría como resultado un total de 48.9 ton/ha/año en una plantación comercial de 300 árboles/ha. Para el caso de producción de semillas se obtuvo una productividad de 28.6 ton/semillas/año, con un promedio de 95.5 kg/árbol/año [14].

1.1.3. Composición de la semilla de ramón.

Diversos estudios coinciden, en que la cantidad de carbohidratos presentes en la semilla de ramón es elevada, rondando el 75% del peso total de la semilla seca (Tabla 1). Al igual

que los carbohidratos, destaca la gran cantidad de proteínas que contiene la semilla, además de calcio, potasio, vitaminas A, E, C y B (B6) [29].

Tabla 1. Principales componentes de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.).

Componente	Contenido en 100 g de semilla seca			
Carbohidratos	72.25 ^a	--	77.27 ^c	72.80 ^d
Proteína cruda	12.24 ^a	12.8 ^b	10.87 ^c	10.52 ^d
Fibra	4.96 ^a	4.6 ^b	5.99 ^c	3.4 ^d
Lípidos	1.10 ^a	--	--	--
Energía	347.86 ^a kcal	361 ^b kcal	--	--
Humedad	5.88 ^a	--	--	8.33 ^d

Fuentes: a [15], b [30], c [31], d [32].

1.2. Uso de bioetanol como combustible.

El etanol, o alcohol etílico, es una sustancia con fórmula molecular C_2H_6O , que puede ser utilizado como combustible en motores de combustión interna con ignición a chispa de dos maneras; 1) en mezclas de gasolina y etanol anhidro; o 2) como etanol puro, generalmente hidratado [33]. Las mezclas más comunes son E5 y E10, es decir 5 y 10% de bioetanol y 95 y 90% de gasolina; él bioetanol se emplean para oxigenar las gasolinas, reemplazando a un oxigenante llamado éter metil ter-butílico (MTBE), que es altamente contaminante del suelo y del agua subterránea [34].

La producción y utilización del bioetanol como una alternativa al combustible fósil, ha recibido mucha atención dentro de los esfuerzos de prevenir el calentamiento global y extender las reservas energéticas [35].

1.2.1. El bioetanol en el mundo.

A nivel mundial el etanol es el biocombustible más usado, en el año 2013, se tuvo una producción de más de 88,000 millones de litros. Más del 80% de la producción proviene de dos países y dos cultivos; Estados Unidos con maíz y Brasil con caña de azúcar [11]. En Europa se usa principalmente remolacha azucarera y en China y Tailandia se emplea la yuca como principal fuente [36] Los países que participan de manera importante en la producción de bioetanol, se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Principales países productores de bioetanol.

País	Producción de bioetanol 2014 (Millones de litros).
1. Estados Unidos de América	54,131
2. Brasil	23,431
3. China	2,403
4. Canadá	1,930
5. Tailandia	1,173

Fuente: [37]

El etanol ha sido usado como combustible desde el comienzo del uso del automóvil. Con la crisis del petróleo en la década de 1970, el etanol ha sido considerado como un combustible alternativo en varios países [7].

Brasil fue pionero produciendo alcohol para automóviles desde 1927, sin embargo fue hasta la década de los 70s cuando, por la crisis global del petróleo y el bajo precio del azúcar debido a la sobreproducción, que se creó el Programa Nacional de Alcohol (ProAlcool). Este programa basaba la producción de etanol a gran escala en la caña de azúcar como materia prima. Con una fuerte intervención del gobierno, por medio de exenciones fiscales, la industria de alcohol prosperó y años después se abrió paso a la inversión privada. La flota brasileña de automóviles tiene casi 2.3 millones de vehículos especialmente adaptados para funcionar con bioetanol, en cualquier mezcla incluso puro (FFV) y 16 millones de vehículos que utilizan una mezcla de bioetanol–gasolina [10,34].

De una forma similar a la de Brasil, Estados Unidos inició desde 1980 la investigación sobre la producción de etanol, como una alternativa para reducir su dependencia del petróleo. Por medio de subsidios, el gobierno norteamericano interviene en: el precio de garantía de la materia prima, exención de impuestos para la producción, investigación y desarrollo de biocombustibles [10].

1.3. Almidón como fuente de azúcares para biocombustible.

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas, se encuentra principalmente en semillas, raíces, tubérculos, tallos, hojas y frutos. El almidón

es sintetizado en amiloplastos en forma de gránulos, los cuales varían en diámetro, forma y composición según su origen botánico [38,39,40].

El almidón proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos, tiene distintas aplicaciones en la industria alimenticia, textil, como adhesivo y recientemente en la elaboración de biopolímeros [22,38].

Para obtener etanol a partir de almidón, es necesario romper las cadenas de este polisacárido para obtener jarabe de glucosa, el cual se puede convertir en bioetanol por acción de diversos microorganismos fermentadores, como bacterias y levaduras. Es por ello, que durante la producción de bioetanol, se debe de incluir una etapa adicional de hidrólisis, durante la cual se rompen o degradan los enlaces del polisacárido. De cada 100g de almidón se pueden obtener teóricamente 111g de glucosa, lo que implica una relación estequiométrica de 9:10 [41,8].

1.3.1. Estructura y composición.

Todos los almidones tienen fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. El factor n tiene por lo menos un valor igual a 4; llegándose a encontrar fórmulas con 100 a más átomos de carbono [42].

El almidón está constituido por dos polímeros de moléculas de D-glucosa: amilosa, una cadena esencialmente lineal con enlaces $\alpha(1-4)$ y amilopectina que posee una estructura ramificada con enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ (Figura 3) [43]. Generalmente la cantidad de amilosa y amilopectina se encuentra en una proporción 20-30 y 70-80% respectivamente, y representan del 98 al 99% del total del peso de gránulo. El resto está constituido por lípidos (fosfolípidos), minerales y proteínas [43]. Diferencias en la proporción de amilosa y amilopectina y la forma en que están organizadas dentro del gránulo, dan una considerable variedad en el tamaño, forma y propiedades funcionales del almidón. Los gránulos de almidón varían de tamaño en un rango que va desde 1 a 100 micras de diámetro y la forma puede ser poligonal, esférica o lenticular [44].

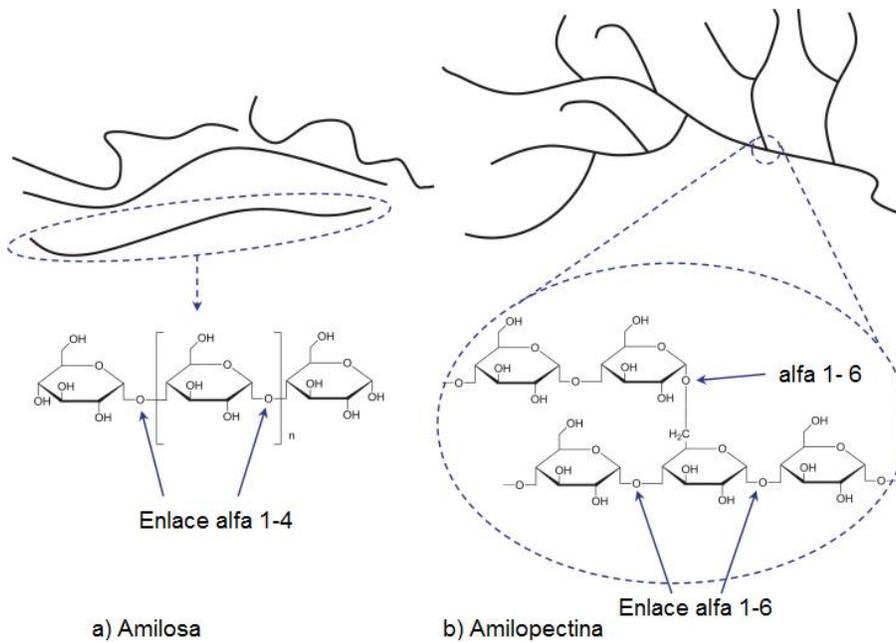


Figura 3. Estructura del almidón: amilosa (a) y amilopectina (b) [45].

Se considera que los gránulos de almidón tienen un núcleo amorfo, compuesto mayormente por amilosa y restos de amilopectina, denominado *hilum*, el cual está rodeado por un patrón concéntrico de anillos de crecimiento, alternando zonas cristalinas y amorfas. Estos anillos generalmente tienen un espesor de 120-400 nm. El gránulo de almidón está densamente empaquetado con una densidad de 1.5 g/cm^3 (Figura 4) [43].

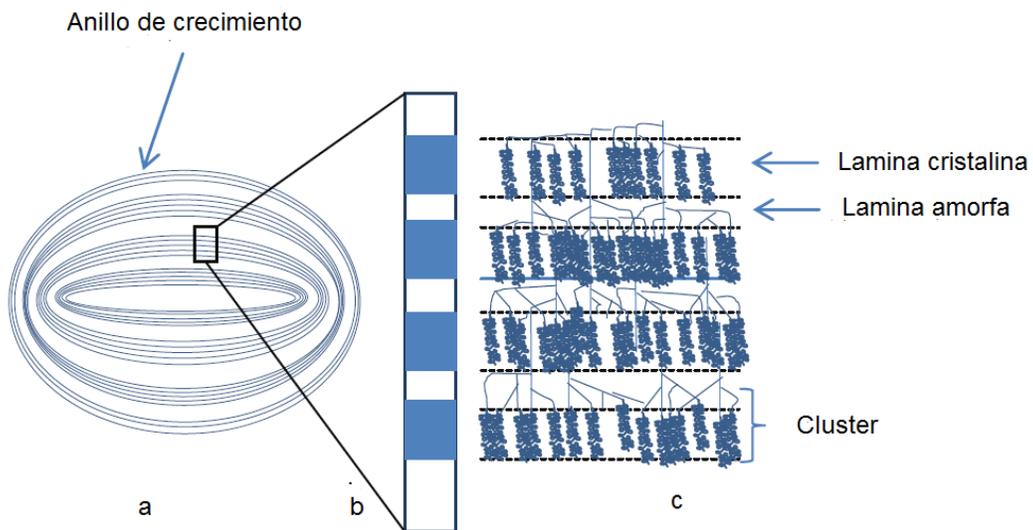


Figura 4. Estructura del gránulo de almidón: a) gránulo; b) láminas; c) estructura de la lámina [46].

1.3.1.1. Amilosa.

La amilosa está compuesta por 200 a 20,000 unidades de glucosa, unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$, en cadenas no ramificadas. Presentan algunos enlaces $\alpha(1-6)$. Esta molécula no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal, que le permite formar películas y fibras fuertes y retrae fácilmente [47,48].

1.3.1.2. Amilopectina.

La amilopectina es un polímero ramificado de moléculas unidas en un 94-96% por enlaces $\alpha(1-4)$ y en un 4-6% $\alpha(1-6)$. Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa. Las ramificaciones de las cadenas de amilopectina son relativamente cortas comparadas con la amilosa. Están formadas aproximadamente por entre 18 y 25 unidades de glucosa. La molécula es parcialmente soluble en agua caliente [42,48,49].

1.3.2. Características del almidón de ramón

En la búsqueda de alternativas que no compitan con la alimentación, existen algunos reportes con respecto a *B. alicastrum*, como una opción para usarse como base de biopolímeros. En estos trabajos se hizo un estudio de las características físicas y químicas del almidón de ramón y se compararon con las del almidón de maíz, que es la fuente de almidón más usada en la actualidad, estas características se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Composición química y propiedades del almidón de ramón (*B. alicastrum*) en comparación con el maíz (*Zea mays* L.).

	Ramón	Maíz
Humedad (%)	7.49	8.14
Cenizas (%)	0.47	0.02
Grasas (%)	0.47	0.49
Proteína (%)	0.12	0.03
Amilosa (%)	25.36	27.33
Amilopectina (%)	74.64	72.67
Relación amilosa/amilopectina	1:2.94	1:2.65
Ph	9.1	5.92
Almidón total (%)	92.57	8.86
Temperatura inicial de gelatinización (°C)	82.72	72
Poder de absorción	17.64 g agua/g almidón	11.04 g agua/g almidón

Fuentes: [22,50].

1.3.3. Fuentes de almidón usadas para producir bioetanol.

Maíz. Es la principal materia prima utilizada en Estados Unidos, China y Canadá para obtener el 95%, 90 y 85% de su producción total anual de bioetanol, respectivamente [51,52].

Trigo. De este cultivo se obtiene el 46% de la producción total de bioetanol en Europa, convirtiéndose en la principal fuente de almidón en ese continente. En Australia y Canadá esta materia prima aporta el 15% de la producción total de bioetanol [51,53].

Sorgo. Es otra alternativa como materia prima para la producción de etanol. Su contenido de almidón es similar a la del maíz. Después de Estados Unidos, Nigeria e India son los mayores productores de bioetanol a partir de sorgo. Una de las ventajas del sorgo, es que es muy resistente a la sequía y al calor, por lo que es posible cultivarlo en regiones de África y sur de Asia. [51].

Otras materias primas utilizadas en la producción de bioetanol son: avena, arroz, yuca, camote y papa. Las cuales se presentan junto con las principales fuentes y su rendimiento de etanol en la tabla 4 [7,51].

Tabla 4. Producción de bioetanol a partir de diferentes fuentes de almidón.

Fuente de almidón	Producción potencial de bioetanol (L·ton ⁻¹)
Maíz	360 ^a -500 ^b
Sorgo	480 ^b
Trigo	340 ^a
Cebada	250 ^a
Yuca	180 ^a
Papa	110 ^a

Fuente: a. [7], b. [54].

1.4. Pretratamientos.

Son tecnologías que han sido desarrolladas para incrementar la tasa de conversión de material amiláceo a etanol, incluyen métodos mecánicos como: reducción de tamaño por medio de molido, extrusión; métodos físicos como: radiación de vapor, sonicación, temperaturas; métodos químicos como: hidrólisis ácida y/o básica; métodos biológicos como: el uso de microorganismos y degradación enzimática; y también se puede usar la combinación de dos o más de estos pretratamientos para mejorar la conversión del almidón a azúcares fermentables [55].

Trituración mecánica: Este tratamiento consiste en la molienda de la biomasa para lograr la reducción de las partículas a un tamaño de malla inferior a 40 µm. Tiene un efecto mínimo en los rendimientos de la hidrólisis, así como en la tasa de hidrólisis de la biomasa [56].

Extrusión: Es un proceso novedoso que es utilizado como pretratamiento para la conversión de biomasa en etanol. En este método, la materia prima es calentada, mezclada y cizallada, lo que da como resultado una serie de cambios físicos y químicos, durante el paso de la materia prima a través del extrusor. La velocidad del tornillo del extrusor y la temperatura del barril de salida causan distintos grados de daños, incrementando la accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos [57].

Ultrasonido: Una técnica con crecientes aplicaciones es el ultrasonido, y consiste en la aplicación de ondas acústicas cuya frecuencia está por encima del espectro auditivo del oído humano y sirve para homogenizar, emulsificar, mezclar, extraer y desorganizar

células. Es considerado un método atractivo por consumir poca energía y tener cortos tiempos de proceso. El movimiento de la energía ultrasónica en el medio, produce fluctuaciones muy altas en la presión, resultando en una rápida generación de pequeñas burbujas (cavitación), las cuales se expanden por acción de la presión negativa, y colapsan rápidamente por acción de la presión positiva, resultando altas fuerzas de cizalladura, presión y temperatura. La energía del ultrasonido es capaz de romper grandes cadenas de polímeros como el almidón. [58,59].

El efecto del ultrasonido en gránulos de almidón depende de factores como: potencia y frecuencia de la sonicación, temperatura y tiempo del tratamiento, propiedades del almidón, concentración y fuente botánica [60].

Descamación con vapor: Es un proceso en el que, la materia prima es acondicionada con un 20% de humedad aproximadamente, y es calentada con vapor durante 15 a 30 minutos a presión atmosférica y luego el material es pregelatinizado e inmediatamente es sometido a agitación brusca. El material baja su densidad aparente. La descamación con vapor desordena la matriz de proteína-almidón en el endospermo de los cereales, gelatiniza parcialmente el almidón e incrementa el área disponible para la hidrólisis enzimática [55].

Alta presión: La alta presión ha mostrado que causa gelatinización en el almidón similar a la causada por el pretratamiento con calor. Algunos estudios establecen que en el almidón de trigo, la gelatinización ocurre en el rango de 300-600 MPa (Megapascuales). Aunque los efectos sobre las propiedades del almidón son menores que los obtenidos por la temperatura alta, este tratamiento también muestra efecto sobre la estructura y funcionalidad de las proteínas, además de que permite una mayor actividad enzimática sobre la degradación de almidón de trigo y cebada, entre los 400-600 MPa, decayendo la actividad a valores mayores a 600 MPa [61].

Alta presión hidrostática (HHP). La muestra se somete a una alta presión de agua, por medio de un pistón que aumenta la presión, y debido a esta reducción de volumen, y según el principio de Le Chatelier, se ven afectados enlaces no covalentes y algunos enlaces covalentes. La presión va acompañada de un aumento de la temperatura de 2 ó 3 °C por cada incremento de 100 MPa de presión [62]. El grado de gelatinización

alcanzado por el tratamiento de HHP, está relacionado con el tipo de almidón, contenido de humedad, niveles de presión, temperatura y tiempo de residencia. Como ejemplo, tenemos que la gelatinización de almidón de trigo comienza por debajo de los 300 MPa y gelatiniza totalmente a los 600 MPa, mientras que la solución de almidón de papa gelatiniza completamente cuando es tratada a 700-1200 MPa a 40 °C por 60 minutos [63].

Pretratamientos biológicos. Estos pretratamientos han sido explorados previamente para degradar material lignocelulósico. Recientemente, este enfoque amigable con el ambiente, ha llamado la atención para ser usado como pretratamiento para mejorar la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, en el proceso de producción de etanol. Entre los microorganismos utilizados destacan los hongos basidiomicetos que ocasionan la pudrición blanca y café, y que degradan material lignocelulósico [64] [65].

Estudios realizados en paja de trigo, encontraron que *Pleurotus ostreatus* convirtió un 35% del material en azúcares reductores en 5 semanas, conversión similar a la obtenida por *Phanerochaete sordida* y *Pycnoporus cinnabarinus* en 4 semanas. Otros hongos de este tipo, que han sido probados en diferentes tipos de biomasa mostrando alta deslignificación son: *Phanerochaetes chrysosporium* (*Phanerochaete chrysosporium*), *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, y *Pleurotus ostreatus*. La degradación de la lignina ocurre por medio de la acción de la batería enzimática producida por estos organismos, destacándose las enzimas peroxidasa y lacasa [64].

Es precisamente esta batería enzimática, la que ha impulsado el uso de este tipo de hongos en material amiláceo, ya presenta baja especificidad de sustrato, pudiendo usar una amplia gama de fuentes de carbono, incluido el almidón, al cual hidroliza produciendo moléculas de glucosa, que son usadas por los microorganismos para producir biomasa y metabolitos [66,67].

Los pretratamientos biológicos son más seguros, amigables con el ambiente y requieren menos energía comparados con otros pretratamientos. Sin embargo, la velocidad de la reacción hidrolítica es muy baja y aún se requiere de investigación para que puedan ser aplicables comercialmente [57] .

1.5. Hidrólisis de almidón.

El almidón es una materia prima con altos rendimientos en la producción de etanol, pero requiere de su hidrólisis para producir alcohol por fermentación [68]. La hidrólisis es una reacción de almidón con agua, la cual es normalmente usada para descomponer el almidón en azúcares fermentables [7]. Tradicionalmente la hidrólisis se realizaba con la adición de ácidos, pero las desventajas ecológicas que presenta este método, comparado con la hidrólisis enzimática, ha hecho que en la actualidad habitualmente se usen enzimas para realizar este proceso [68].

La despolimerización del almidón es llevada a cabo por la enzima α -amilasa, la cual actúa sobre los enlaces glucosídicos α -[1-4], y la enzima amiloglicosidasa, la cual rompe enlaces α -[1-6]. La velocidad y la extensión de la hidrólisis varían de acuerdo con el origen botánico del almidón. De igual forma en el grado de susceptibilidad a la enzima amilasa, debe considerarse el tamaño del gránulo, cristalinidad, superficie expuesta, relación amilosa-amilopectina, porosidad, estructura y grado de integridad. Las enzimas atacan más fácilmente las regiones amorfas que las láminas cristalinas. Los almidones gelatinizados son hidrolizados más rápidamente que los almidones nativos y retrogradados [43].

El proceso de hidrólisis en la producción industrial de etanol a partir de almidón, comúnmente envuelve dos etapas: licuefacción y sacarificación.

Licuefacción: Es un proceso de dispersión de almidón insoluble en solución acuosa, seguido de una hidrólisis parcial usando enzimas amilasas termoestables, obtenidas generalmente de bacterias del género *Bacillus* [69]. La mayoría de estas enzimas son metaloenzimas, por lo cual requieren iones de calcio (Ca^{2+}) para su actividad, integridad estructural y estabilidad. Otros dos parámetros indispensables para llevar a cabo el proceso de licuefacción son: la temperatura (90-110 °C) y el pH (6-6.5) [70,71].

Sacarificación: Esta reacción es llevada a cabo por la enzima amiloglicosidasa, obtenidas principalmente de *Aspergillus niger* o *Rhizopus* sp., a temperaturas de entre 60 y 70 °C, en rangos de pH de 3.5 a 4.4. [68,72]. La enzima actúa con gran afinidad sobre los enlaces (1-4), pero tiene la capacidad de actuar también sobre los enlaces (1-6), lo

que provoca una degradación casi completa del almidón, quedando otras moléculas como maltosas, maltotriosas y algunos oligómeros [73].

En la 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 sobre el sustrato depende del tipo de productos formados en la etapa de licuefacción [15].

1.6. Fermentación

La fermentación es el proceso biológico en el cual los azúcares son convertidos a etanol y dióxido de carbono (CO₂) por una variedad de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Este proceso ocurre bajo condiciones anaeróbicas y permite a los microorganismos obtener energía para su crecimiento [74,75].

1.6.1. Microorganismos productores de etanol.

Los microorganismos más comúnmente usados en el proceso de fermentación son las levaduras (las más comunes se resumen en la tabla 5), entre ellas, *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más ampliamente utilizada, aunque pueden emplearse diferentes cepas de la misma especie. Las características que hacen a esta levadura el principal organismo fermentador son: alta resistencia a etanol, consumir grandes cantidades de sustrato en condiciones adversas y tener gran resistencia a inhibidores presentes en el medio, además de que su manipulación genética se ha desarrollado robustamente. Desafortunadamente, debido a la ausencia de genes adecuados, esta especie no puede metabolizar azúcares de cinco carbonos (pentosas). Esta desventaja ha provocado la búsqueda de otros organismos para fermentación, destacando desde hace tres décadas la bacteria *Zymomonas mobilis*, que ha sido estudiada intensamente por presentar ventajas sobre *S. cerevisiae* y se presenta como un organismo bastante adecuado para la fermentación alcohólica [74,76].

Tabla 5. Especies de levaduras utilizadas en la producción de etanol y requerimientos de temperatura, pH, fuente de carbono, nitrógeno y tiempo de incubación

Espece/cepa	T ¹ °C	pH	Fuente de C y concentración (g·L ⁻¹)	Fuente de N y concentración (g·L ⁻¹)	TI ² (h)
<i>S. cerevisiae</i> 27817	30	5.5	Glucosa (50-100)	Peptona (2) sulfato de amonio (4)	18-94
<i>S. cerevisiae</i> L-041	30-35	-	Sacarosa (100)	Urea (1) sulfato de amonio (1-2)	24
<i>S. cerevisiae</i> 181	27	6	Glucosa (10)	Peptona (5)	40-160
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24860	30	4.5	Melazas (1.6-5.0)	Sulfato de amonio (0.7-2)	24
<i>S. cerevisiae</i> Fiso	30	5.0	Galactosa (20-150)	Peptona, sulfato de amonio (10)	60
<i>S. cerevisiae</i> A3	30	5.0	Galactosa	Peptona Sulfato de amonio (10)	60
<i>S. cerevisiae</i> GCB-K5	30	6.0	Sacarosa (30)	Peptona (5)	72
<i>S. cerevisiae</i> 2.399	30	5.5	Glucosa (31.6)	Urea (6.4)	30
<i>K. fragilis</i> 2.7774	30	5.5	Glucosa (20-120)	Peptona (2) sulfato de amonio (4)	18-94
<i>K. fragilis</i> * 30017	30	5.5	Glucosa (20-120)	Peptona (2) sulfato de amonio (4)	18-94
<i>K. marxianus</i> 30016	30	5.5	Glucosa (100)	Peptona (2) sulfato de amonio (4)	18-94
<i>Candida utilis</i> ** 30091	30	5.5	Glucosa (100)	Peptona (2) sulfato de amonio (4)	18-94
<i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC-32691	30	4.5	Glucosa (0-25) y xilosa (0-25)	Peptona (3.6) sulfato de amonio (3)	100

Fuente: [75].

1. Temperatura.

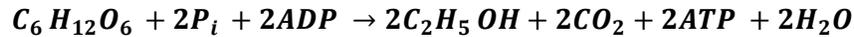
2. Tiempo de incubación.

* Syn. *K. marxianus*.

** Syn. *Cyberlindnera jadinii*.

Saccharomyces cerevisiae. Es el organismo universal para la producción de bioetanol usando azúcar y almidón como materia prima. Los azúcares fermentados por este organismo incluyen glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa y maltotriosa. La producción de etanol es llevada a cabo por vía de la glucólisis; (conocida como Embden-Myerhorf-Parnas o vía EMP) [51]. (Figura 5).

En una forma simple, la producción de etanol a partir de glucosa se puede expresar de la siguiente manera:



A partir de esta ecuación, se puede calcular que el rendimiento teórico de etanol, es de 0.511 g por cada gramo de glucosa consumida. Este rendimiento nunca es alcanzado en la práctica, ya que no toda la glucosa es convertida a etanol, porque parte de ella se utiliza para sintetizar biomasa y otros metabolitos. Bajo condiciones ideales se alcanza entre un 90 y 95% del rendimiento teórico [7,51].

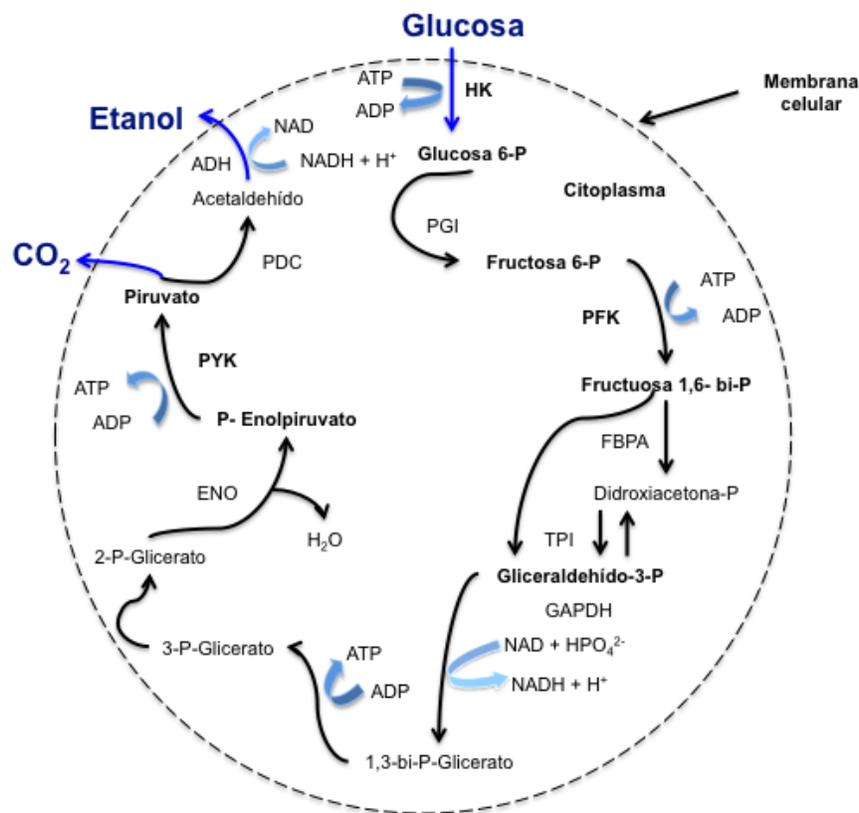


Figura 5. Ruta metabólica seguida por *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. [15].

Durante la fermentación la levadura está sometida a diferentes condiciones adversas, algunas ambientales como: deficiencia de nutrientes, alta temperatura y otras inherentes

al metabolismo de la levadura, como la acumulación de etanol, que inhibe el crecimiento celular o acumulación de ácidos, que están asociados al nivel de pH. En la figura 6, se resumen algunas de las condiciones adversas que afectan el crecimiento de *S. cerevisiae* [76].

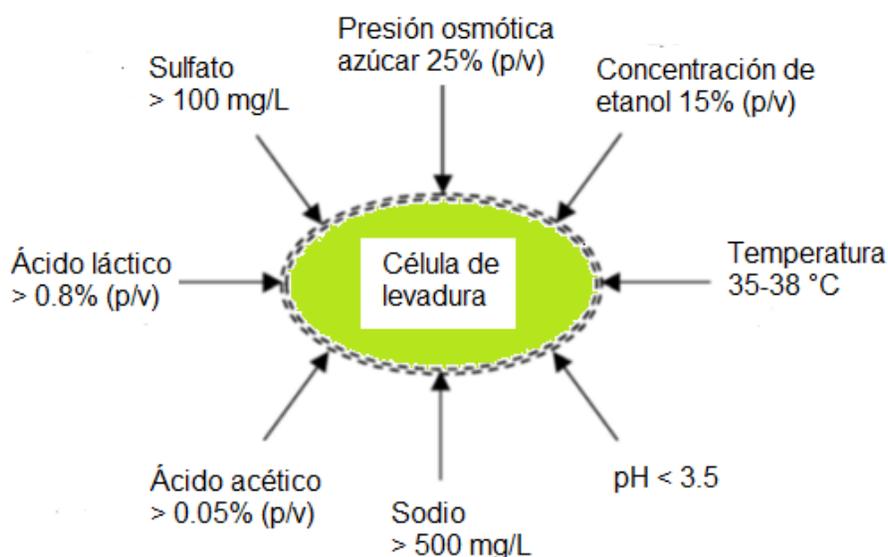


Figura 6. Condiciones adversas potenciales durante la fermentación alcohólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae* [76].

Zymomonas mobilis. Es una bacteria gram-negativa anaeróbica, la cual produce etanol a partir de glucosa por la vía Entner-Doudoroff (ED) en conjunto con las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. Este microorganismo fue descubierto en pulque, bebida fermentada alcohólica mexicana que se obtiene por fermentación del aguamiel o savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros (*Agave salmiana*, *Agave mapisaga* y *Agave america*); y fue descrita como una especie nueva por Lindner en 1924 [77]

Aunque actualmente no es usada a nivel comercial, *Z. mobilis* es considerado el organismo más efectivo para la producción de etanol. Puede producir este alcohol más rápido que *S. cerevisiae* y es altamente resistente a altas concentraciones de etanol. Produce únicamente una molécula de ATP por molécula de glucosa, por lo cual produce menos biomasa y más átomos de carbono son destinados a etanol. Esta característica ha permitido que alcance rendimientos cercanos al 97% del teórico [51,76]. Pese a estas ventajas, no es adecuada para la producción comercial de etanol, ya que actúa sobre tres

substratos específicos: D-glucosa, D-fructosa y sacarosa, y al crecer en sacarosa forma oligómeros de fructosa y sorbitol, con lo cual decae su producción de etanol, lo que la hace inadecuada para la producción de etanol a partir de melazas. Otra desventaja, es que a pesar de ser considerada segura, su biomasa no es comúnmente aceptada para ser usada como alimento animal, lo cual genera un problema para su desecho [76].

La biotransformación de celulosa a etanol puede ser llevada a cabo por bacterias termófilas anaeróbicas como *Clostridium thermocellum*, así como hongos filamentosos como *Monilia* sp., *Neurospora crassa*, *Aspergillus* sp., y *Trichoderma viride*. Sin embargo, estudios de fermentación con estos microorganismos muestran un proceso fermentativo muy lento (3-12 días) con un pobre rendimiento de etanol [75].

Tradicionalmente el almidón debe hidrolizarse a dextrinas de bajo peso molecular, para poder ser fermentado, por medio del uso de ácidos o enzimas. Existen algunos reportes acerca de levaduras que pueden producir extracelularmente las enzimas α -amilasa y glucoamilasa, con lo cual tienen la capacidad de hidrolizar y fermentar el almidón. Dentro de este grupo encontramos a *Candida tdukubaensis* (Syn. *Pseudozyma tsukubaensis*), *Filobasisium capsuligenum*, *Lipomyces kononenkoae*, *Lypomyces starkeyi*, *Saccharomycopsis bispora* (Syn. *Wickerhamomyces bisporus*), *Saccharomycopsis capsularis*, *Schwanniomyces castelli* y *Trichosporon pullulans* [75].

1.7. Destilación y deshidratación.

La destilación es el proceso de separación del etanol de los sólidos y el agua en la mezcla. El alcohol vaporiza a 78 °C y el agua a 100 °C (a nivel de mar). Esta diferencia permite separar agua de etanol por temperatura en una columna de destilación. La destilación/rectificación convencional, puede producir etanol con un 95% de pureza. En este punto el agua y el alcohol forman un azeótropo, el cual ya no puede ser separado por calor. Para poder ser mezclado con gasolina, el 5% de agua restante debe ser removida por otros métodos. En la producción actual de etanol se usan los tamices moleculares, para producir alcohol al 99.9% conocido como etanol anhidro, que ya puede ser usado como biocombustible [15,77].

JUSTIFICACIÓN.

El uso de combustibles fósiles, está asociado al problema del calentamiento global, aunado a esto, las reservas petroleras no aumentan al ritmo de la creciente demanda y la extracción del petróleo restante se encarece. Es por ello, que en los últimos años se ha impulsado la búsqueda de fuentes alternas de energía; dos ejemplos de estas alternativas a gran escala son: el etanol obtenido en Estados Unidos a partir de harina de maíz y el obtenido de caña de azúcar en Brasil. En México, no se tiene la capacidad de producción para generar excedentes suficientes, para la generación de bioetanol a partir de estas dos fuentes, además de esto, uno de los requisitos que debe cumplir la biomasa para producción de biocombustibles, es la de no competir con la alimentación humana, como ocurre en estos dos casos.

La especie *Brosimum alicastrum* Sw., conocida con más de cincuenta nombres locales, debido, a su presencia en más de dieciocho estados del territorio mexicano, no compite directamente con la alimentación y brinda diversos servicios ambientales como: forraje, leña, sombra, etc., además puede usarse en un programa de captura o venta de bonos de carbono. Esta especie tiene potencial para ser usada como fuente de biomasa renovable, ya que, en estudios recientes se ha encontrado en sus semillas poseen un 70% de carbohidratos de los cuales 61% es almidón, y cada árbol produce aproximadamente 95 kilogramos de semilla por planta por año, con lo cual, tenemos en el ramón una fuente bastante promisoría para la producción de etanol.

Por lo expuesto, el presente trabajo está encaminado a evaluar diferentes pretratamientos a la harina de ramón, que permitan liberar una cantidad suficiente de azúcares fermentables para alcanzar altos rendimientos de bioetanol.

HIPÓTESIS

La aplicación de pretratamientos a la harina de semillas de ramón modificarán la estructura de la harina y del almidón, facilitando la acción enzimática en las fases de licuefacción y sacarificación; de esta manera incrementará la liberación de azúcares fermentables y por consiguiente la producción de etanol.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum Sw*).

Objetivos específicos.

- ✓ Aplicar pretratamientos físicos y biológicos a la harina de ramón.
- ✓ Caracterizar la estructura del almidón presente en la harina de semillas de ramón por medio de microscopía electrónica de barrido, antes y después de los pretratamientos.
- ✓ Evaluar estadísticamente la eficiencia de los pretratamientos, cuantificando la cantidad de azúcares reductores directos, antes y después de la hidrólisis enzimática y biológica.
- ✓ Realizar la fermentación con el mejor pretratamiento.
- ✓ Estimar el rendimiento de bioetanol de la harina de ramón.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados, se realizó la siguiente estrategia experimental.

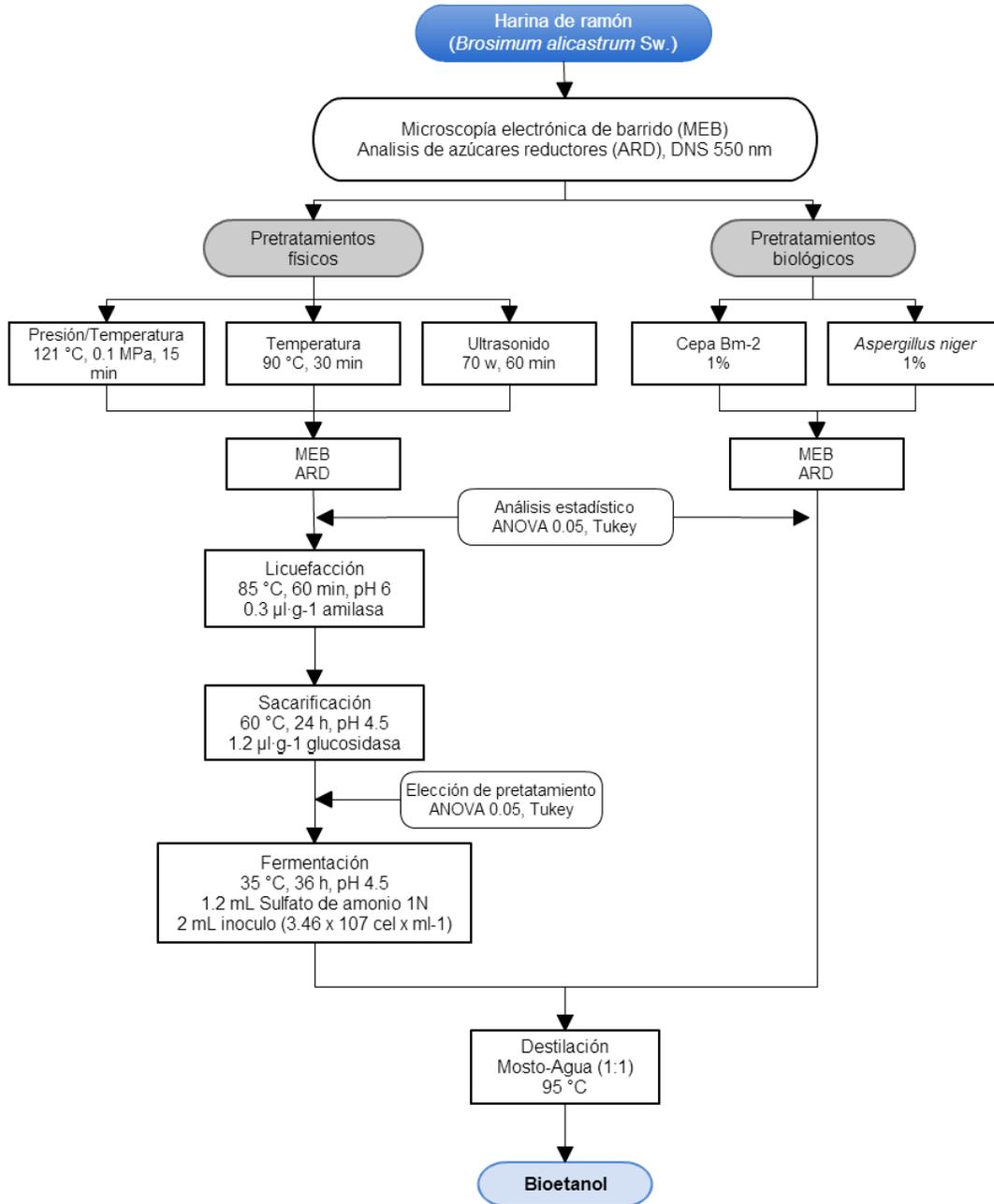


Figura 7. Estrategia experimental propuesta para la producción de etanol a partir de harina de semillas de ramón (*B. alicastrum*).

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima.

Para la realización de este estudio se utilizó como materia prima la harina de semillas de ramón, previamente elaborada según la metodología descrita por Larqué [78], con un rango de tamaños de partículas entre 0.5-0.7 mm y humedad del 12%.

2.2. Cuantificación de azúcares reductores directos (ARD).

Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de Miller [79]. Se adicionó 0.1 ml de muestra en 1.4 ml de agua destilada y 3 ml de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS). La mezcla se hirvió durante 5 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se aforó a 15 ml. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm y la concentración se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de glucosa (Anexo 1).

2.3. Pretratamientos.

2.3.1. Pretratamientos físicos.

2.3.1.1. Presión y temperatura (T1).

Se preparó una suspensión de 100 ml al 20% (p/v) de harina de ramón en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M ajustada a pH 6 (Anexo 2) y se calentó a 121 ± 2 °C durante 15 minutos, a una presión constante de 0.1 MPa en un equipo de esterilización marca Yamato Sterilizer ® USA, modelo SM510. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C). Las pruebas se realizaron por triplicado y se tomaron muestras para ARD y microscopía electrónica de barrido (MEB), que se guardaron a 4 °C para su posterior análisis.

2.3.1.2. Temperatura (T2).

Se preparó una solución de 100 ml al 20% (p/v) de harina de ramón en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M y se calentó a 90 ± 2 °C durante 30 minutos en

un baño recirculador marca Polyscience®, modelo 9505, EUA, y se usó un equipo diseñado especialmente para este trabajo (Departamento de instrumentación, CICY, Anexo 3) para mantener la suspensión en movimiento a 20 rpm, homogenizando la temperatura. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C). Las pruebas se realizaron por triplicado y se tomaron muestras para ARD y MEB que se guardaron a 4 °C para su posterior análisis.

2.3.1.3. Ultrasonido (T3).

Se preparó una suspensión de 100 ml al 20% (p/v) de harina de ramón en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M, ajustada a pH 6 y se transfirió la suspensión a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que se colocó en un baño ultrasónico (Fisher scientific, E.U.A) donde se le aplicaron 70 Watts de potencia durante una hora. Terminado el proceso, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C). Las pruebas se realizaron por triplicado y se tomaron muestras para ARD y MEB que se guardaron a 4 °C para su posterior análisis.

2.3.2. Biológicos.

Los tratamientos biológicos se llevaron a cabo con las cepas de los hongos: *Trametes hirsuta* (Bm-2) (GQ280373), la cual se cultivó en medio basal líquido Kirk [80] y *Aspergillus niger* (RSH-2), aislada del fruto del árbol de ramón (*B. alicastrum*), que se creció en medio líquido NBY. Ambas cepas fueron caracterizadas previamente en el laboratorio del Grupo de estudios moleculares aplicados a la biología (GeMBio) del CICY.

Evaluación del tiempo para la producción de ARD. Con el objetivo de determinar el tiempo en el cual se alcanzan las mayores concentraciones de ARD, se prepararon 50 ml de suspensión de harina de ramón con agua al 20% (p/v), en matraces Erlen-meyer de 125 ml los cuales se esterilizaron (121 °C, 15 min. y 0.1 MPa) y luego fueron inoculadas con 1 ml de una suspensión de la cepa Bm-2, se incubaron a 33 ± 2 °C y se tomaron muestras para determinar los ARD a los días 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 9.

Concentración de sustrato. De acuerdo a estudios previos las concentraciones de harina óptimas para el medio deben estar entre 12 y 20% (p/v), por ellos se probaron dichas concentraciones de harina de semilla de ramón con el fin de establecer la

concentración adecuada para el crecimiento de las cepas, observando el desarrollo del micelio sobre el sustrato.

Concentración de inóculo. Se probaron dos concentraciones de inóculo, 1 y 2%, (v/v) y se determinó la concentración de ARD al final del periodo de incubación.

Una vez determinadas estas variables en la cepa Bm-2, fueron extrapoladas a *Aspergillus niger* (RSH-2), evaluando ambas con los mismos parámetros. Realizando las pruebas por triplicado.

2.4. Hidrólisis.

La hidrólisis de las muestras, que constó de dos pasos consecutivos, licuefacción y sacarificación.

2.4.1. Licuefacción.

Las muestras pretratadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), se ajustó el pH a un valor de 6 con hidróxido de potasio (KOH) 1N, se agregaron 60 ppm de Ca^{+2} en forma de cloruro de calcio y 3.6 μl de enzima α -amilasa (A-7595 Sigma-Aldrich®), lo que equivale a aplicar 0.075 unidades de la enzima (U) por gramo de almidón presente en la harina. Se homogenizó la mezcla y se colocó en el equipo Polyscience®, modelo 9505, EUA donde se incubó a $85 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora [15], con agitación constante de 25 rpm.

2.4.2. Sacarificación.

La suspensión obtenida de la licuefacción se ajustó a pH 4.5 con ácido clorhídrico 1N. Se adicionaron 14.4 μl (0.36 U/g) de la enzima amiloglucosidasa (A-7095, Sigma-Aldrich®); y se incubó a $60 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h [15], con una agitación constante de 100 rpm en un equipo de agitación MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shaker, Thermo Scientific, EUA.

2.5. Análisis estadístico.

Concluida la hidrólisis de los pretratamientos físicos y biológicos, se realizaron análisis de ARD a cada una de las muestras y se determinó qué tratamiento fue el mejor, mediante

un análisis de varianza de una vía y prueba de medias de Tukey $\alpha=0.05$, utilizando el software SPSS 16 © SPSS Inc.

2.6. Fermentación.

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 150 ml, que contenían 40 ml del mostro hidrolizado, a los cuales se le agregaron 10 ml de agua, para disminuir la viscosidad del mosto, dando una concentración inicial de $77.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ARD. Se adicionaron 1.2 ml de una solución 1N de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. A cada muestra se le agregaron 2 ml (4% v/v) de suspensión de inóculo con una concentración de $3.46 \times 10^7 \text{ cel} \times \text{ml}^{-1}$ y se incubaron a $35 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ por 36 h, en una cámara de secado marca Binder, modelo Fed 115 ® Alemania, pH 4.5, el proceso se llevó a cabo sin agitación. Los matraces se taparon con torundas de algodón y gasa, para permitir el intercambio gaseoso. El producto de la fermentación se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. y se colectó el sobrenadante para su destilación.

Preparación del inóculo. Se preparó medio GELP (Glucosa, extracto de malta y peptona) y se esterilizó ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min. 0.1 MPa). Una vez que estuvo a temperatura ambiente, se dispensaron 8 ml en tubos de ensayo y se inocularon con 4.5 ml de inóculo de las levaduras evaluadas. Para su reactivación se pusieron en agitación a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 horas y posteriormente se realizó el conteo celular en una cámara Neubauer.

Cepas utilizadas. Se evaluaron cuatro cepas en este experimento, las cuales se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Levaduras evaluadas fuentes y tolerancias a etanol y temperatura.

Especie	Clave	Fuente	TE ¹ %	TT ² °C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HC51	Fermentación de mosto de henequén	12	42
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Safoeno	Safmex S. A. de C. V.	-	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	M14SA10/M	Fermentación de mezcal	11	48
<i>Candida tropicalis</i>	PL1	Ramón	-	-

¹ Tolerancia a etanol.

² Tolerancia a temperatura.

2.7. Destilación.

Para el proceso de destilación se tomaron 25 ml del sobrenadante del fermentado y se mezclaron con 25 ml de agua destilada (1:1), esta mezcla se transfirió a un matraz bola de 100 ml y se agregaron 8 perlas de ebullición y se destiló a 95 ± 2 °C hasta recuperar un volumen de 25 ml [12] (Anexo 4).

2.8. Cuantificación de etanol.

La concentración de etanol fue determinada mediante cromatografía de gases (equipo CLARUS500, marca Perkin Elmer, EUA), usando una columna EC-WAX, 30x0.53 mm x 1.2 µl, temperatura límite de la columna 250 °C, Marca Alltech.

Las condiciones del equipo fueron: 50 °C durante un minuto, rampas de calentamientos de 35 °C por minuto, hasta 70 °C durante 10 minutos, y segunda de 35 °C por minuto hasta 100 °C durante 7 minutos. Flujo 0.7 psi, inyector 150 °C, detector 200 °C y la muestra de 1 µl.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de los pretratamientos físicos sobre la estructura de la harina de semillas de ramón y rendimiento de ARD.

3.1.1. Harina sin pretratamiento (T0).

El análisis de los ARD en la harina de ramón dio como resultado un contenido promedio de $1.4153 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta baja concentración de azúcar se relaciona a pequeñas porciones de pericarpio que se adhieren a la semilla durante el proceso de secado, y que ya no se pueden retirar al momento de quitar la testa de la semilla, por encontrarse fuertemente unidas a la misma. Otra fuente son los daños mecánicos infringidos a los gránulos durante el proceso de molienda.

En la figura 8 a, podemos ver la disposición de los gránulos de almidón que están empaquetados dentro de una matriz, de acuerdo con Altan [81], ésta es una matriz proteica, la cual según Warren y col. [82], actúa como una barrera física para las enzimas, lo que disminuye el porcentaje de amilolisis. De igual forma se observó que los gránulos en su mayoría estaban intactos lo que también influye en la disminución de la velocidad de la actividad enzimática.

Aunado a lo anterior los mismos gránulos de almidón ofrecieron cierta resistencia para la actividad enzimática, de acuerdo a lo mencionado por Martin [83], respecto a que los gránulos de almidón se encuentran altamente empaquetados, por medio de enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares, formando un estado policristalino que los hace frecuentemente resistentes a los tratamientos enzimáticos.

En la figura 8 b se pueden apreciar las diferentes formas (esféricas, elípticas y truncadas) que tienen los gránulos de almidón, estos resultados coinciden con los reportados para los gránulos almidón de diferentes fuentes como papa, yuca y castaña [84,85].

En la figura 8 c, se aprecia la forma esférica del gránulo de almidón con dimensiones de $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$, lo que coincide con lo reportado por Pérez-Pacheco y col. [22], quienes

señalaron que los gránulos de almidón, extraídos de la harina de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw), tienen forma oval a esférica con diámetros que oscilan entre 6 a 15 μm .

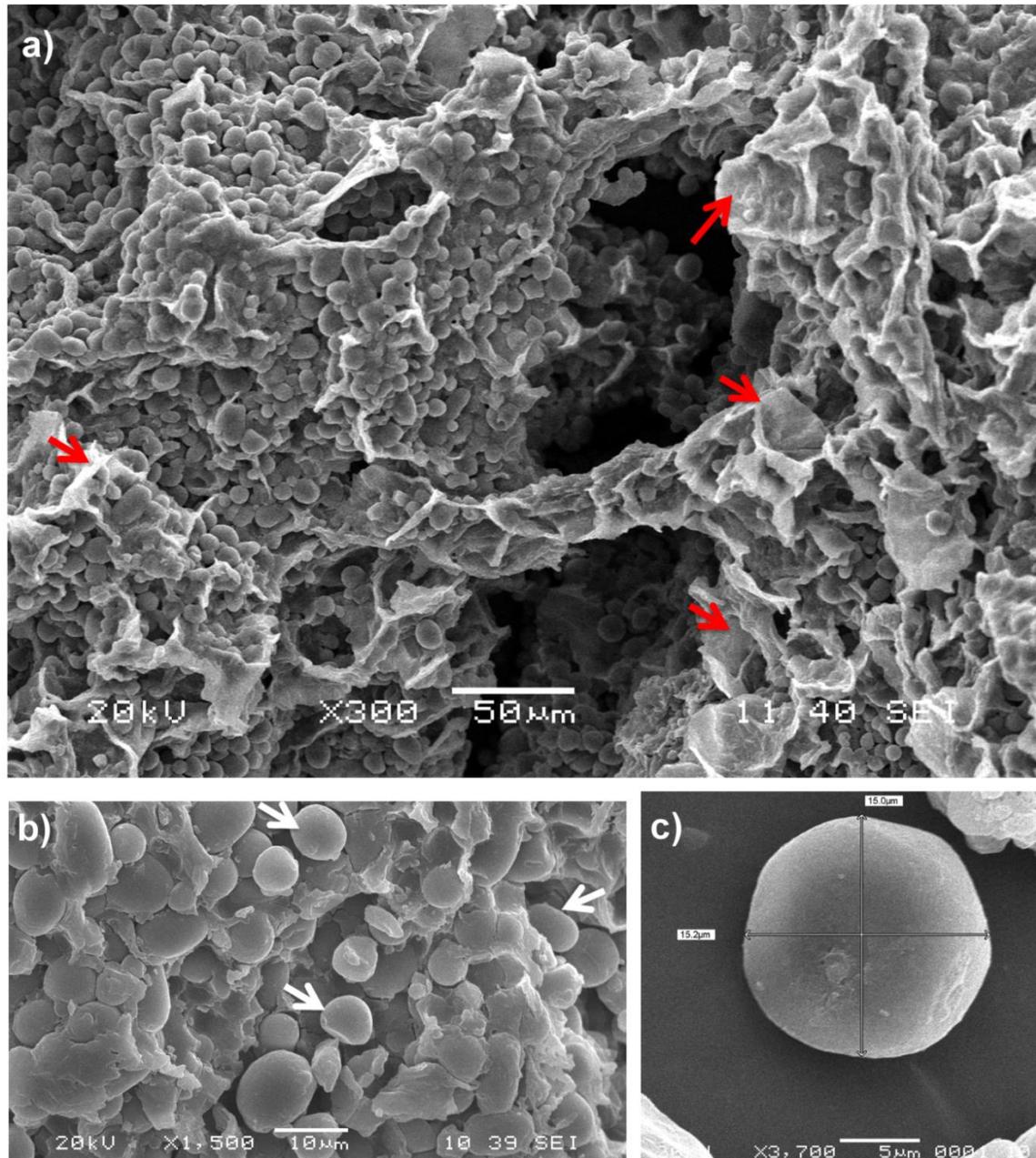


Figura 8. Harina de ramón de ramón. a) gránulos de almidón insertados en la matriz proteica (flechas rojas); b) diferentes formas de gránulos de almidón de ramón; c) tamaño y forma del gránulo de almidón de ramón.

3.1.2. Pretratamiento de presión y temperatura (T1).

En la figura 9 se puede apreciar el efecto de la combinación de la temperatura y presión sobre la estructura de la harina de ramón respecto al control (T0). La micrografía (figura 9 b) muestra como la estructura proteica se pierde casi totalmente, de igual manera la mayoría de gránulos de almidón pierden su forma y su superficie lisa, observándose solo pequeñas formas difusas en una solución continua de almidón, matriz proteica y demás componentes de la harina. Este efecto esta dado debido a que se alcanza y rebasa la temperatura de gelatinización (83.5 °C) del almidón presente en la harina de ramón [22]. Pérez-Pacheco y col. demostraron que en el rango de 60 a 70 °C, el almidón de ramón comienza a absorber agua de manera irreversible, debido a la ruptura de puentes de hidrógeno, a este proceso se le conoce como gelatinización [44,61,83], el cual trae consigo la pérdida de cristalinidad, birefringencia y aumento de la viscosidad, ya que los gránulos hinchados se fragmentan parcialmente y se dispersan en la fase acuosa [43].

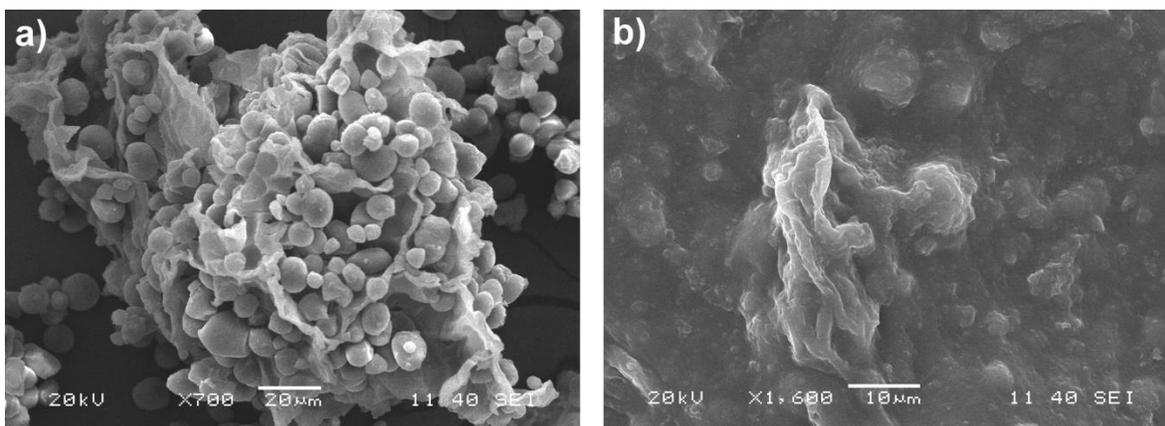


Figura 9. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón tratada con presión y temperatura (T1).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Vallons y col. [61], quienes encontraron una desintegración completa de la estructura granular del almidón con temperaturas superiores al pico de gelatinización. Por otro lado, la presión ejercida en este tratamiento (0.1 MPa) combinada con la temperatura, permitió la modificación de la matriz proteica, a diferencia de lo reportado por los mismos autores, quienes utilizaron de manera separada la presión y temperatura, y concluyeron que son necesarias presiones superiores a 600 MPa, para realizar modificaciones fuertes al gluten contenido en la harina de trigo [61], aunque lo mismos autores señalaron también que hacen falta más

estudios para determinar las combinaciones de valores de presión y temperatura que permitan mayores modificaciones.

La concentración de azúcares reductores obtenidos en este tratamiento fue $3.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, superior a la concentración inicial ($1.41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pero son valores bajos comparado con las modificaciones estructurales producidas en el almidón.

3.1.3. Pretratamiento con temperatura (T2).

En la figura 3.4 podemos observar el efecto del pretratamiento sobre la estructura de la harina, que, a diferencia del pretratamiento de presión y temperatura (T1) se observó que las estructuras proteicas no se modificaron totalmente (Figura 10) y los gránulos de almidón mantuvieron su estructura, lo cual concuerda con lo obtenido por Chen y col. [86], quienes reportaron que el tratamiento hidrotermal a $62 \text{ }^\circ\text{C}$, induce cambios en las propiedades fisicoquímicas del almidón de maíz, sin destruir la estructura del gránulo. Los cambios fisicoquímicos mencionados en dicho estudio, suponen la salida de pequeñas cantidades de dextrinas y moléculas de glucosa a la solución, lo que coincide con el estudio actual, ya que se pasó de un valor inicial de ARD de $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a una concentración de $5.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 13).

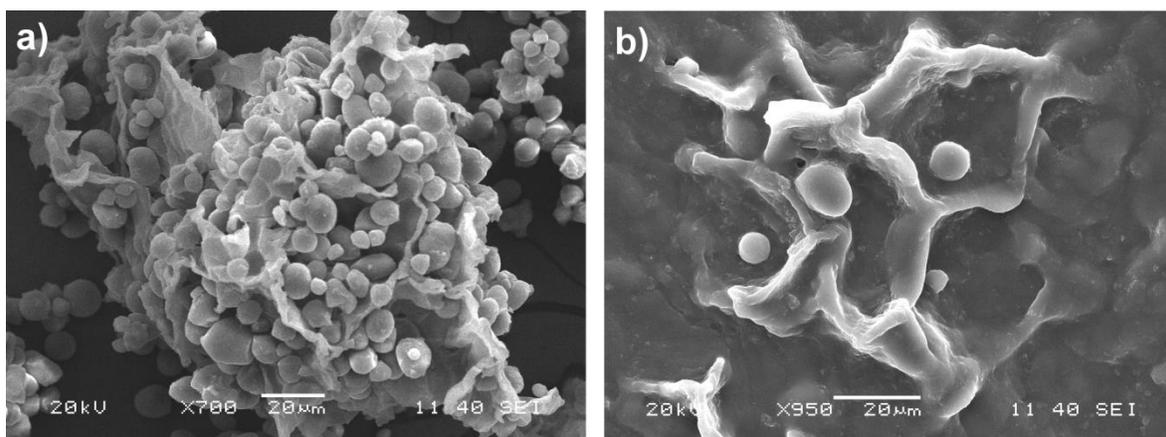


Figura 10. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón con temperatura (T2).

La deformación de la matriz proteica alcanzada en el T1, fue ocasionada por la combinación de la presión y temperatura, ya que en este pretratamiento donde la temperatura fue de $90 \text{ }^\circ\text{C}$, superior al pico de gelatinización del almidón de ramón que es de 83.5 [22], no se alcanzó la total gelatinización, esto probablemente se debió, a que en

este estudio se usó la harina con todos sus componentes, aunado a ello la temperatura de gelatinización del ramón (83.5 °C), se encuentra por encima del rango de 60-80 °C, en el cual ocurre la gelatinización de la mayoría de almidones [43], lo que indica el alto grado de compactación de la harina y almidón del ramón.

Por otro lado, el tiempo de residencia de la harina bajo el pretratamiento, pudiera no ser factor determinante, ya que, estudios realizados por Sakinah, [87], indicaron que un aumento en el tiempo de residencia, podría no ser significativo, puesto que al aumentar el tiempo de exposición, pasando de 1, a 2 y 3 horas, no observó diferencias significativas en el comportamiento del tratamiento a base de temperatura, en harina de yuca.

3.1.4. Pretratamiento con de ultrasonido (T3).

En la figura 11 b, podemos apreciar que los gránulos de almidón no presentan cambios en su forma ni en el tamaño, esto concuerda con lo obtenido por Luo y col. [88], quienes en tratamientos de 100 W por 30 minutos, no observaron cambios en los gránulos de almidón. Sin embargo, estos mismos autores indicaron que al observar a mayor aumento, vieron claramente poros y fisuras en la superficie de los gránulos de almidón, esto mismo obtuvieron Sujka y col. [60], quienes encontraron en almidón tratado a 170 W por 30 minutos, fisuras y depresiones en la superficie del almidón. Teniendo esto en consideración, se realizaron micrografías más detalladas, y se encontraron ciertas deformaciones en los gránulos como las señaladas en la figura 12, donde se ve la pérdida de la forma del gránulo de almidón de ramón. Lo cual podría explicar la liberación de azúcares reductores a la solución, que alcanzó valores de 5.8 g·L⁻¹. Otra posible causa de la liberación de ARD, sería la temperatura usada en el sonicador, pero como reportaron Karimi y col. [46], el calor generado durante el proceso de sonicación no tiene un efecto en la liberación de ARD, a menos que la temperatura alcance el punto de gelatinización, que para el caso del ramón es de 83.5 °C, muy por encima de los 60 °C alcanzados en el equipo utilizado.

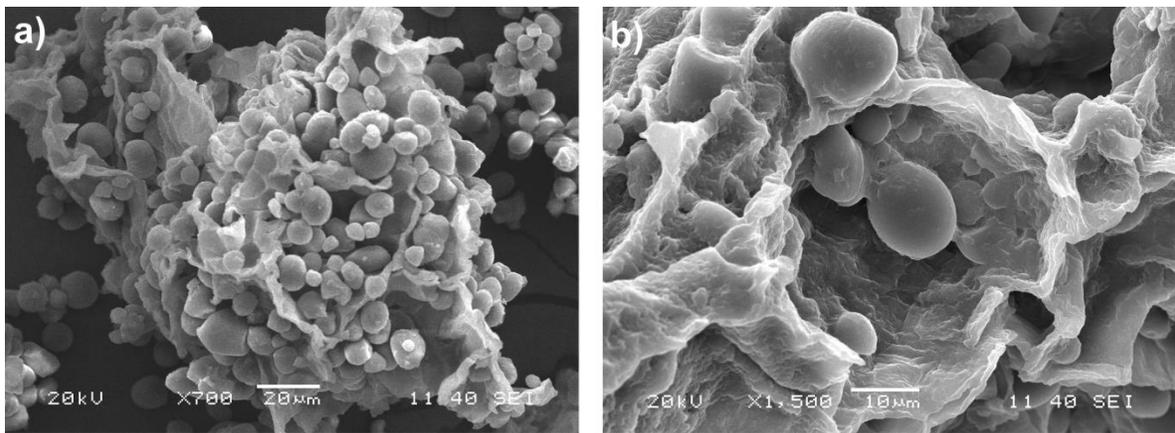


Figura 11. Micrografía de la estructura de la harina de ramón. a) sin tratar (T0); b) harina de ramón tratada con ultrasonido (T3).

Aunque la potencia del ultrasonido usada en este estudio (70 W), es menor a las usadas en los dos estudios comparativos (100 y 170 W), sí se observaron cambios en la estructura proteica (Figura 11 b), la cual perdió forma y permitió la liberación de los gránulos de almidón y en menor medida también se observan cambios en la estructura del almidón. Estos resultados señalan que el efecto del ultrasonido depende de muchos factores, tales como potencia, frecuencia, temperatura y tiempo de pretratamiento, así como la concentración y la fuente botánica de almidón [60], que para este caso es *B. alicastrum* y en los estudios de referencia son maíz, papa, trigo y arroz.

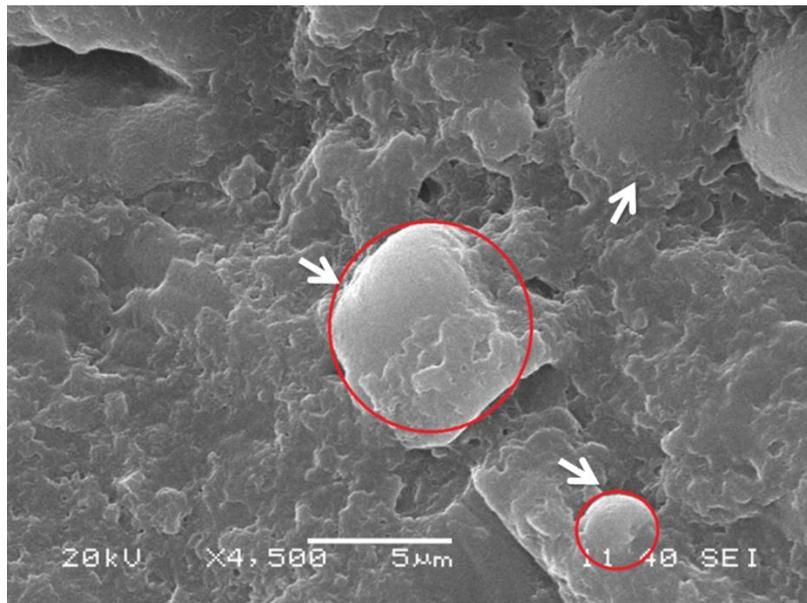


Figura 12. Gránulos de almidón deformados por el tratamiento ultrasonido 70 W durante 60 minutos.

Como se observa en la figura 13 los tres pretratamientos aplicados, elevaron la disponibilidad de ARD, pasando del valor inicial de $1.453 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, hasta $5.9519 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el pretratamiento 2. De igual manera, los tratamientos 1 y 3 aumentaron la disponibilidad de ARD con valores de 3.79 y $5.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Como ya se mencionó, el aumento de ARD, está dado por el desarreglo provocado dentro del gránulo de almidón por los pretratamientos, tanto la temperatura+presión, temperatura y el ultrasonido, modifican en mayor o menor medida la forma y estructura del almidón, y permiten el ingreso del agua al gránulo provocando hinchamiento y rompiendo los enlaces en las cadenas de amilosa y amilopectina, permitiendo la salida de algunas moléculas de glucosa y maltosa a la solución de harina.

Aunque los pretratamientos incrementaron la disponibilidad de ARD, el efecto de los pretratamientos se evaluó después de la hidrólisis.

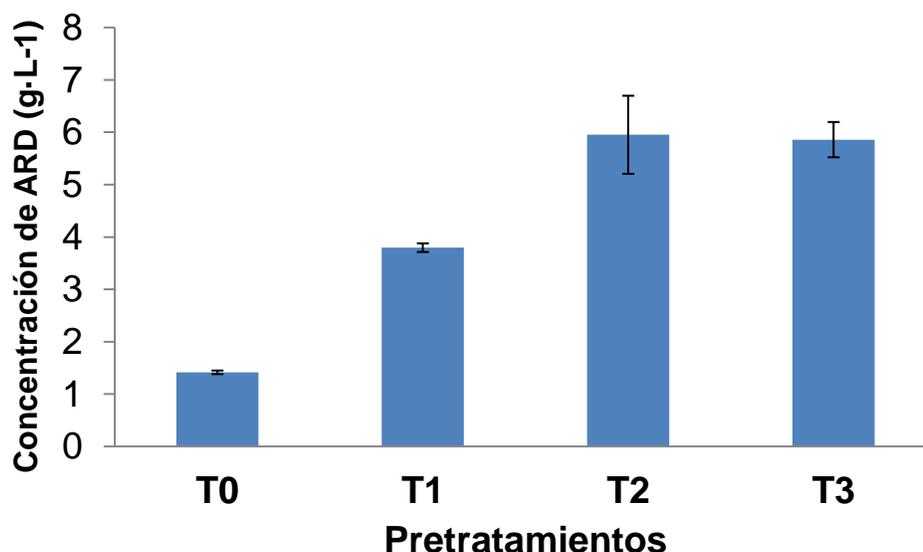


Figura 13. Concentración de ARD en la harina inicial (T0) y después de los pretratamientos T1 (presión+temperatura), T2 (temperatura) y T3 (ultrasonido).

3.2. Hidrólisis.

La hidrólisis enzimática constó de dos pasos consecutivos: licuefacción y sacarificación, al término de cada proceso se evaluó la liberación de ARD, para establecer una dinámica de liberación de azúcares de los procesos, la cual se observa en la figura 14.

En la etapa de licuefacción, se obtuvieron valores de 36.50 (T2), 24.5 (T3), 24.02 (T1) y 23.29 g·L⁻¹ en el T0, y al término del proceso de sacarificación los valores alcanzados fueron de 96.87 (T2), 75.85 (T1), 67.50 (T3) y 64.91 g·L⁻¹ (T0), estos valores coinciden con los mencionados por Baks y col. [89], quienes describieron que durante la licuefacción la viscosidad de la mezcla es reducida, y el almidón gelatinizado es parcialmente hidrolizado, formando productos con un equivalente de dextrosa, en un rango de 15 a 30 g·L⁻¹ y durante la sacarificación estos productos son reducidos a glucosa, maltosa y algunos oligómeros. La dextrosa equivalente varía entre 40 y 98 g·L⁻¹ dependiendo del tipo de enzima usado.

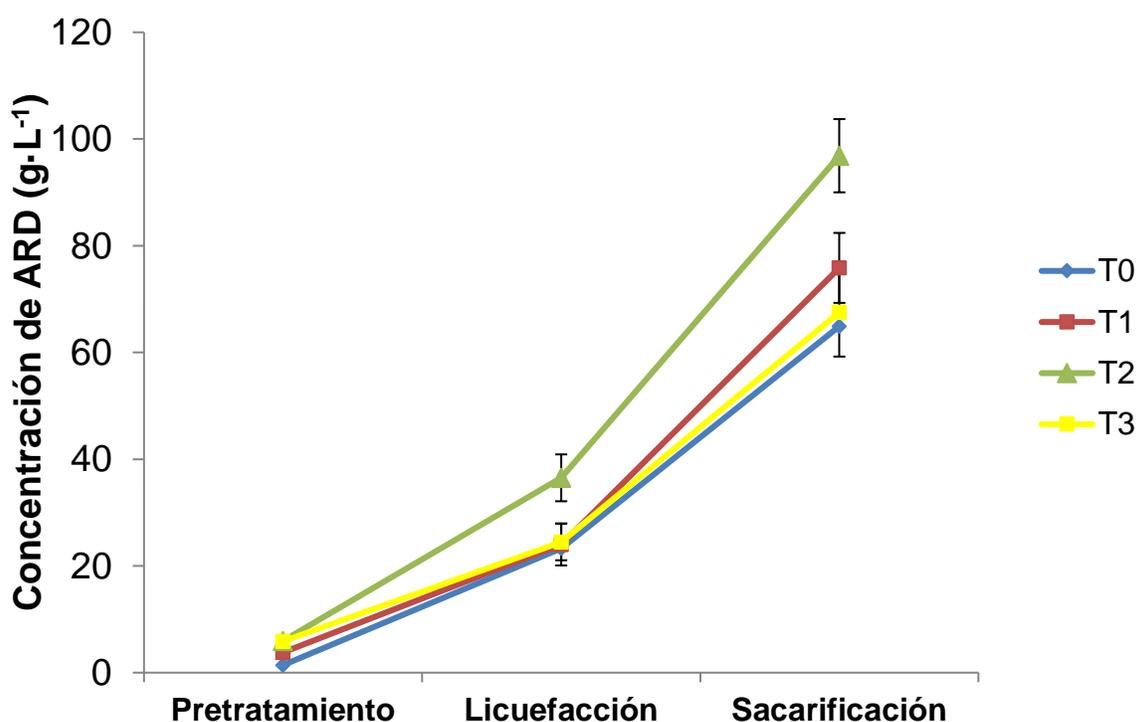


Figura 14. Dinámica de la hidrólisis de harina de ramón con dos pasos consecutivos licuefacción y sacarificación. T0 (harina sin pretratar); T1 (presión+temperatura); T2 (temperatura); T3 (ultrasonido).

En la figura 15 se presentan los resultados al final de la hidrólisis enzimática y después del análisis estadístico, se estableció que el tratamiento dos (T2), es en el que se mostró, el mejor resultado, diferenciándose de los otros que estadísticamente se comportaron igual entre ellos. De esta manera fue el tratamiento 2 (T2) con el cual se llevó a cabo el proceso de fermentación y destilación.

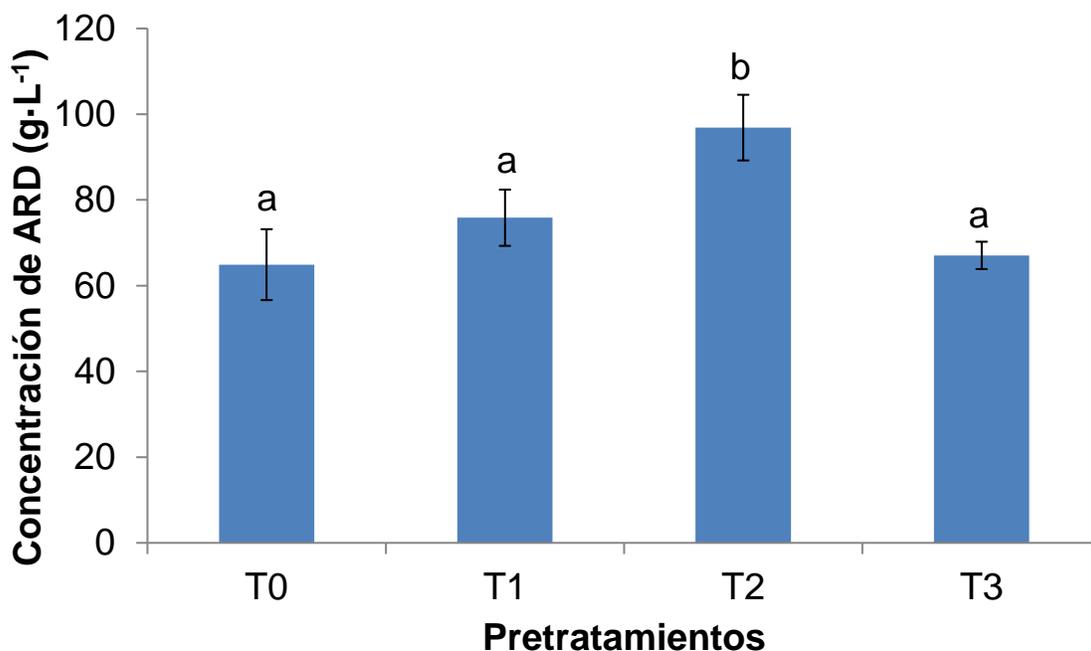


Figura 15. Efecto de los pretratamientos en la liberación de ARD al final de la hidrólisis, Anova de una vía, Tukey $\alpha=0.05$.

El efecto del pretratamiento dos (T2) es notorio, ya que, aún sin modificar totalmente la matriz proteica, los gránulos de almidón fueron liberados y con ello se obtuvo una mayor superficie para la actividad de las enzimas, este resultado concuerda con Martín y col. [83], Pepe y col. [90] y Dhital y col. [82], quienes mencionaron que el calentamiento del almidón en suspensión acuosa, aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática. En el calentamiento de la suspensión de almidón, el agua entra primero en las regiones amorfas, específicamente en las regiones del *hilum*, las cuales se expanden y transmiten la fuerza disruptiva al interior de regiones cristalinas. Estos cambios están acompañados del hinchamiento de los gránulos, los cuales bajo condiciones de agitación incrementan la viscosidad y eventualmente colapsan y pasan a formar una pasta [44], al ocurrir esto, las moléculas de α -amilasa pueden digerir progresivamente los gránulos de almidón conforme se vayan gelatinizando [49]. A diferencia de lo anterior, en los almidones no modificados la actividad de las enzimas se ve interrumpida por varios factores, como los ya mencionados: fuente botánica, relación amilosa-amilopectina, interacción con componentes proteicos y lípidos. Entre otros autores, Wang y col. [44], mencionaron que el almidón no modificado es digerido lentamente por las enzimas, debido al alto orden molecular en los gránulos intactos, y que procesos como el cocimiento, irrumpen en la

estructura ordenada, resultando en el incremento de la susceptibilidad a la digestión enzimática.

En el pretratamiento T1, a pesar de la alta eficiencia para modificar la estructura de la harina, el rendimiento de ARD, no se diferenció estadísticamente de la harina sin pretratar. Como se observa en la figura 9, la harina de ramón se convirtió en una superficie continua de almidón y demás componentes de la harina, reduciendo la superficie expuesta. Aunque el almidón fue completamente gelatinizado, la eficiencia enzimática no fue la adecuada. Por otro lado al haber gelatinizados la mayoría de los gránulos de almidón, se pierden los poros naturales encontrados en la superficie del gránulo, que es una vía de entrada para las moléculas de las enzimas, tal como lo mencionaron Al-Rabadi y col. [91]. Aunado a ello, siguiendo el protocolo establecido en este trabajo, las muestras obtenidas de los pretratamientos se dejaron enfriar, permitiendo de alguna manera a las moléculas o cadenas de glucosa reordenarse y/o reagruparse, debido a su cercanía y afinidad electroquímica, formando micelas en un proceso llamado retrogradación [92], dicho proceso disminuye la susceptibilidad enzimática tal y como se ve reflejado en este estudio, esto concuerda con lo reportado por Konsula y col. [93], quienes gelatinizaron almidón de avena y castaña y observaron que no mejoró la digestibilidad enzimática, atribuyendo este fenómeno a que el almidón pudo haber formado complejos con lípidos y a la retrogradación, en el mismo sentido Dhital y col. [82], afirmaron que el tratamiento hidrotermal de almidones, más allá de la temperatura de gelatinización, causa una completa destrucción de su estructura, y la dispersión en la solución acuosa puede causar el proceso de retrogradación.

Por último el pretratamiento de ultrasonido (T3), tampoco se diferenció del T0, debido a que la potencia utilizada no fue la suficiente y aunque Karimí y col. [46], concluyeron, que aún un periodo corto de sonicación, es efectivo para la liberación de glucosa, existen estudios que señalan que depende del origen botánico del almidón, si bien es cierto, que como vimos hubo gránulos parcialmente gelatinizados (figura 11), la mayor parte de los gránulos quedaron intactos, lo que disminuyó la actividad enzimática, permitiendo apenas superar la liberación de ARD del T0, aunque estadísticamente fueron iguales.

3.3. Efecto de los pretratamientos biológicos sobre la estructura de la harina de semillas de ramón y rendimiento de ARD

Determinación del período de incubación. El periodo de incubación fue establecido en 9 días, ya que como se observa en la figura 16, la cepa Bm-2, empezó a liberar ARD, de manera ascendente en los primeros días, hasta el día 6 y se mantuvo un valor similar en el día 8 (17.1 y 16.05 g·L⁻¹), mientras que el día 9 decayó hasta cerca de un 35%.

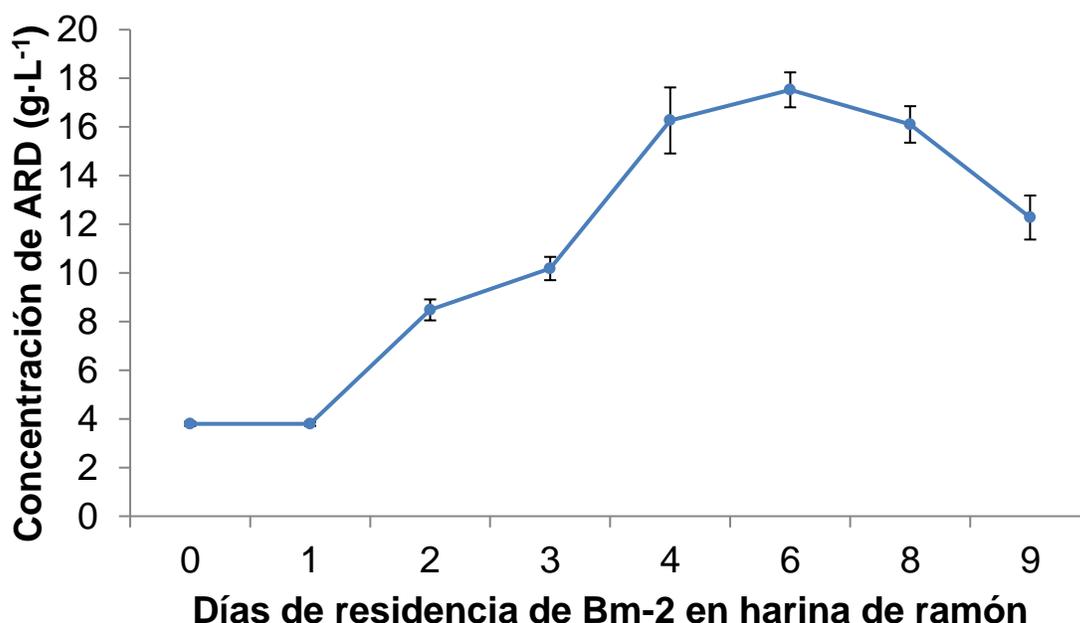


Figura 16. Liberación de ARD por la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 a partir de harina de semillas de ramón.

Concentración de sustrato e inóculo. Las concentraciones de la harina (20 y 12%) no influyeron en la capacidad de colonización de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 ni de *A. niger* RSH-2. Ya que al inocular con 1 y 2 % de la cepa Bm-2 en suspensiones del 12 y 20% de harina de semillas de ramón (p/v), crecieron de manera similar (figura 17). Sin embargo, a la concentración del 12%, la colonización del medio por el micelio de los hongos fue más rápida y al final del periodo de incubación presentó menos sólidos en comparación con la solución al 20%, lo que indica que se requieren más días para su total digestión.

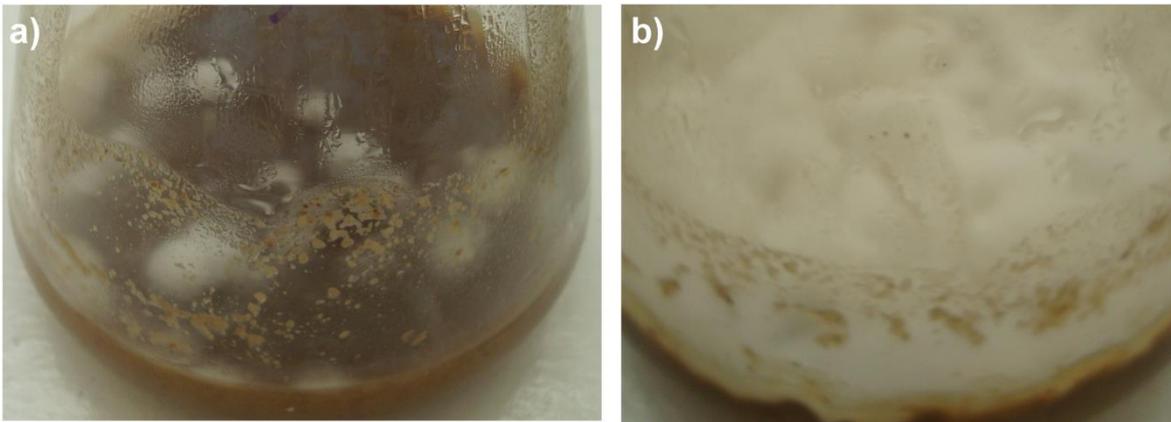


Figura 17. Crecimiento del hongo en suspensión de harina al 12% p/v a) 2 días de crecimiento; b) 9 días de crecimiento.

3.3.1. Pretratamiento con *Trametes hirsuta* Bm-2.

Como se puede observar en las micrografías 18 y 20 c y d, esta cepa tuvo un buen crecimiento sobre la superficie de la harina, también se aprecia que las estructuras proteicas están degradadas, y se ven mínimas cantidades de gránulos de almidón, los cuales han perdido su esfericidad y textura de la superficie, comparados con la estructura original (Figura 18). Este efecto, causado en la harina, explica la liberación de ARD hasta niveles de $17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día 6 del pretratamiento. La cepa Bm-2 (*Trametes hirsuta*), pertenece al grupo de hongos Basidiomicetos, los cuales son reconocidos productores de una batería extracelular de enzimas, con la capacidad de hidrolizar diferentes sustratos complejos incluido el almidón [94].

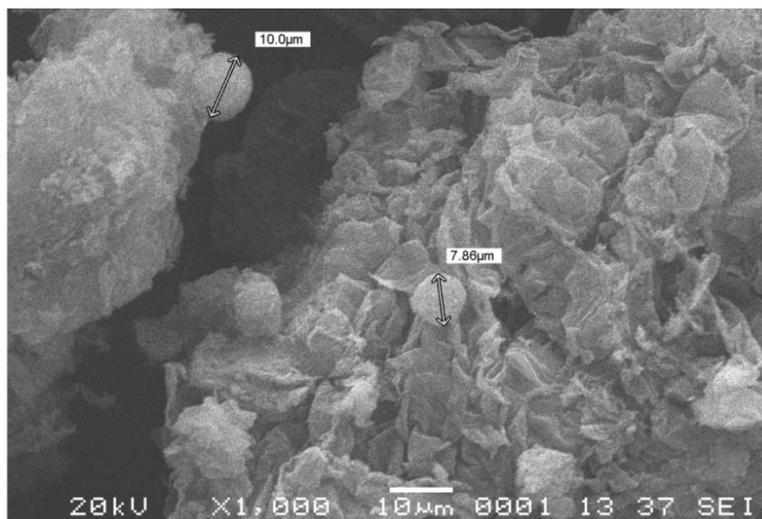


Figura 18. Efecto del hongo Bm-2 sobre la estructura de la harina de ramón.

3.3.2. Pretratamiento con *Aspergillus niger* RSH-2.

En la figura 19 se muestra el crecimiento masivo de *A. niger*. Y en la figura 20 b se observaron gránulos de almidón con gran deformación y numerosas grietas y de igual forma que Bm-2 la cepa *A. niger* actuó sobre la matriz proteica, probablemente por las enzimas proteolíticas que produce *A. niger*, que según lo publicado por Soares [95] este hongo es una de las fuentes más importantes de proteasas fúngicas.



Figura 19. Crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* RSH-2 sobre la harina de ramón.

Al detener el proceso a los 9 días, la concentración de ARD fue de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ valor que se encuentra en el promedio obtenido en los pretratamientos físicos después de la licuefacción lo que se respalda en el hecho de que esta especie tiene la conocida capacidad de producir amilasas utilizadas en la industria para la licuefacción y sacarificación del almidón [96,97].

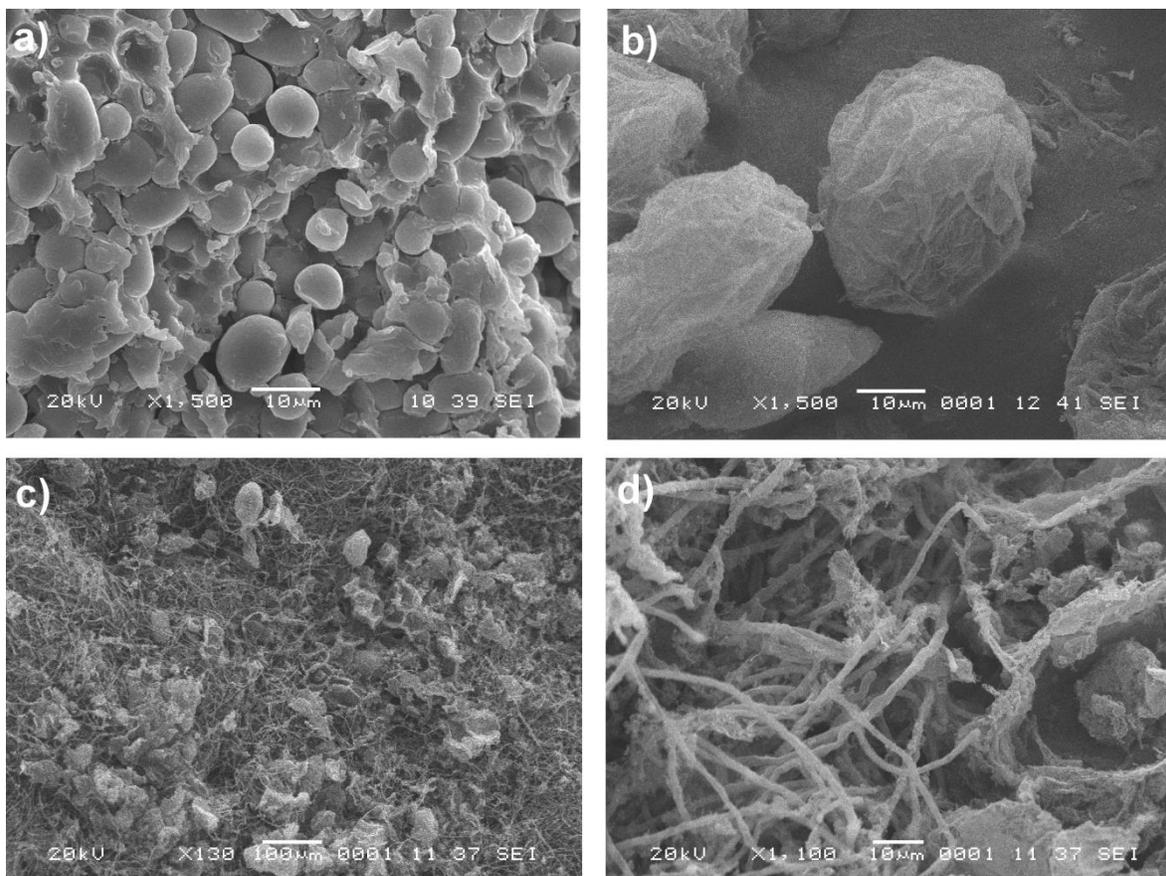


Figura 20. Efecto de los pretratamientos biológicos sobre la estructura de la harina. Harina sin pretratar (a), pretratada con *Aspergillus niger* RSH-2 (b) y *Trametes hirsuta* Bm-2 (c y d).

3.4. Fermentación.

Al término de la fermentación (36 h) los azúcares reductores fueron consumidos casi totalmente, quedando los valores de la siguiente manera:

Tabla 7. Consumo de ARD por parte de las levaduras evaluadas durante la fermentación.

Cepa	ARD inicial	ARD final
PL1		1.86 g·L ⁻¹
Safoeno	77.18 g·L ⁻¹	2.16 g·L ⁻¹
HC51		2.50 g·L ⁻¹
M14SA10/M		2.62 g·L ⁻¹

3.5. Rendimiento de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón

3.5.1. Pretratamiento físico (T2)

La cromatografía de gases, permitió establecer con precisión la concentración que se obtuvo etanol a partir de la harina de semillas de ramón (*B. alicastrum*) fermentada con las levaduras utilizadas en este trabajo. Los destilados de las cuatro levaduras obtuvieron picos que coincidieron con los estándares para etanol y metanol, aunque los picos de este último fueron muy pequeños. Los tiempos de retención de: *S. cerevisiae* HC51, 10.24; *S. cerevisiae* Safoeno, 10.24; PL1 *Candida tropicalis*, 10.27 y *K. marxianus* M14SA10/M, 10.25 min., valores que coinciden con el tiempo de retención preestablecido para el estándar de etanol (10.3 min.) y que se muestran en los cromatogramas para cada levadura en el anexo 4.

La levadura Safoeno® (*S. cerevisiae*), produjo una concentración de etanol de 0.030 mg/ml estimando una producción de 147 L·ton⁻¹, valor superior al obtenido por Barquera (2013) [15] que fue de 132.7 L·ton⁻¹. Dado que se usaron las mismas condiciones de trabajo en la hidrólisis, probablemente, esta mejoría en el rendimiento esté dada por una mayor eficiencia en el pretratamiento térmico, que para este estudio fue de 30 min. a 90 °C, mientras que para el trabajo de Barquera, se utilizaron 5 y 10 min a 100 °C, valores que de acuerdo con la misma autora, no favorecen un elevado porcentaje en de la hidrólisis del almidón de la harina de ramón. De igual forma, con el aislado HC51 que también es *S. cerevisiae* presentó rendimientos más elevados que con la levadura Safoeno, con un estimado de producción de 194 L·ton⁻¹. Actualmente existe la tendencia de utilizar cepas aisladas de las fermentaciones espontáneas, ya que se presupone que estarán adaptadas al sistema y no requerirán de una fase previa de adaptación al mismo, o que ésta será muy corta [12]. Cuando se evaluó la cepa PL1 (*Candida tropicalis*) presentó un rendimiento de 165 L·ton⁻¹, (Figura 21), esta levadura fue la tercera en rendimiento, a pesar de que *Candida tropicalis* produce etanol a partir de almidón, por acción de las glucoamilasas, se conoce que esto ocurre a muy bajas tasas [98]. El mejor desempeño de HC51 (superior a PL1) se puede deber a que las condiciones utilizadas en este experimento fueron más apegadas a los requerimientos de la especie *S. cerevisiae*, por lo cual se considera la necesidad de realizar más estudios para establecer las mejores condiciones para esta cepa.

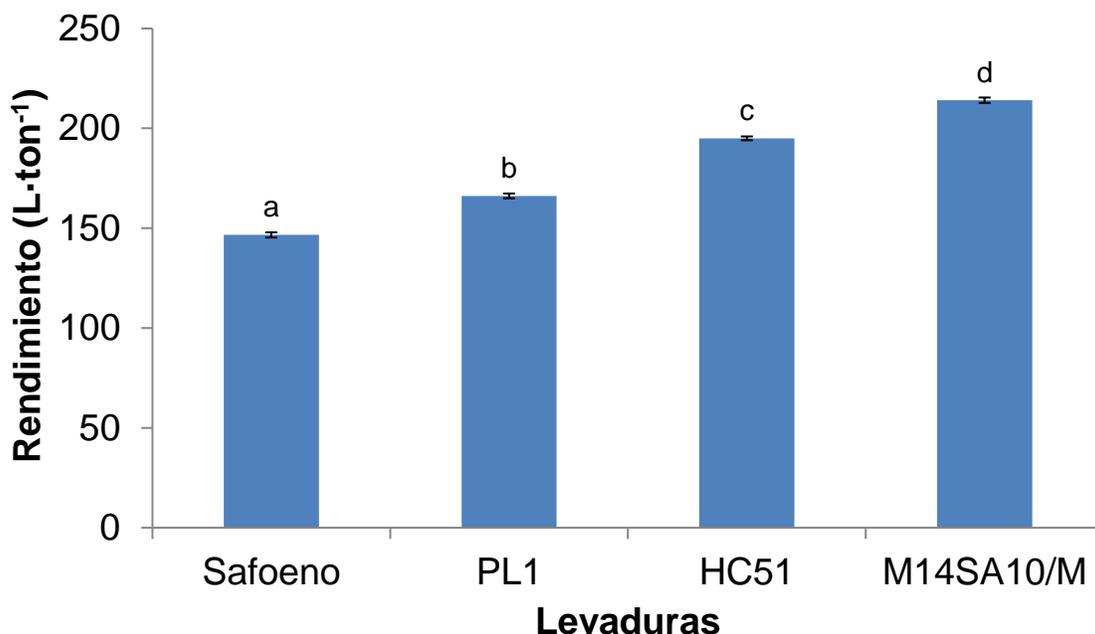


Figura 21. Cálculo del rendimiento de etanol a partir del mosto del pretratamiento 2 por las levaduras evaluadas. Anova de un vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

De acuerdo al análisis estadístico la cepa M14SA10/M (*Zygosaccharomyces rouxxi*) obtuvo el rendimiento más alto con 213 L·ton⁻¹, lo que representa aproximadamente el 50% de la producción máxima teórica usando harina de ramón como sustrato, esto a pesar de que *Z. rouxxi* tiene la capacidad de biotransformar celulosa a etanol, aunque en un proceso fermentativo muy lento y poco efectivo [75]. De igual manera con la cepa PL1, se necesitan encontrar las condiciones donde ésta levadura pueda desarrollar todo su potencial.

Aunque en este trabajo sólo se alcanzó el 50% de la producción máximo teórica, encontramos que pese a esto se obtiene niveles de producción por tonelada de sustrato, mayores que los obtenidos con yuca (*Manihot sculentum*), papa (*Solanun tuberosum*) y cercano a cebada (*Hordeum vulgare*), con la ventaja de que el ramón no compite directamente con la alimentación humana, a diferencia de estos cultivos. Esto posiciona al ramón como una alternativa como fuente renovable de almidón para biocombustible en la Península de Yucatán.

3.5.2. Pretratamientos biológicos (*Trametes hirsuta* Bm-2 y *Aspergillus niger* RSH-2)

Al término del proceso biológico, se detectaron numerosos aromas en ambos tratamientos, entre los cuales sobresalió un aroma alcohólico. Suponiendo la existencia de alcohol y con base a la literatura, donde reportan a estas especies como productoras directas de etanol [66,67] se procedió a destilar, encontrando en el cromatógrafo de gases picos que coincidieron para los estándares de etanol y en alturas muy pequeñas picos de metanol (Anexo 5).

En la figura 3.13 se puede observar los estimados de rendimientos de 98 y 80 L·ton⁻¹ respectivamente, estos son bajos si los comparamos con los obtenidos en el pretratamiento físico, sin embargo, en este método se suprimen los pasos de licuefacción, sacarificación y fermentación, lo que lo convierte en un método promisorio para la producción de bioetanol a partir de harina de ramón. Actualmente, se investigan los bioprocesos consolidados, como una alternativa económicamente viable para la producción de etanol a partir de biomasa, encontrando en hongos del género *Aspergillus* y *Trametes*, candidatos con la capacidad de producir alcohol de manera directa a partir de almidón [66,67].

En este trabajo se usó harina de semillas de ramón con todos sus componentes y se logró la producción de etanol, a diferencia de Okamoto y col. (2011 y 2014), quienes lograron el desdoblamiento de almidón aislado y la conversión de pentosas y hexosas a etanol, utilizando carbohidratos comerciales de alta disponibilidad, lo que hace que este estudio cobre relevancia y lo coloque a la vanguardia de la producción directa de etanol a partir de harina de semillas de ramón.

Al final del pretratamiento con *A. niger*, se encontraron aproximadamente 30 g·L⁻¹ de ARD, lo que es una cantidad considerable con potencial de convertirse en alcohol. En base a este resultado una alternativa es el cocultivo de esta especie con alguna levadura (*S. cerevisiae*) [96] o seguir investigando las mejores condiciones de trabajo para esta cepa.

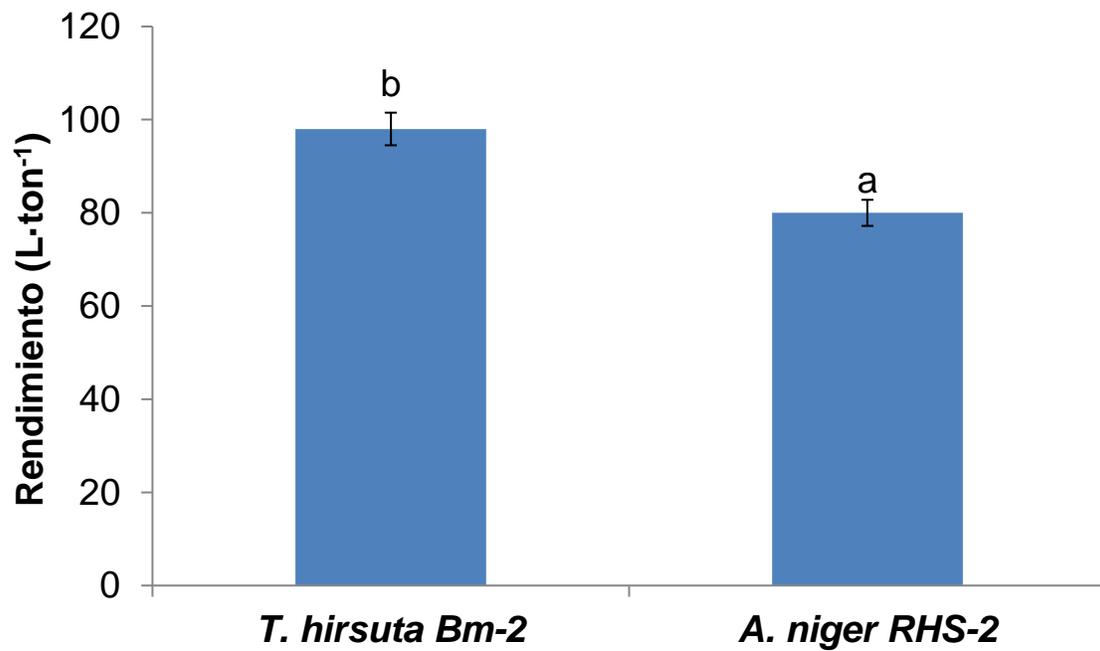


Figura 22. Cálculo de rendimientos de etanol obtenidos por las cepas *Trametes hirsuta* Bm-2 y *Aspergillus niger* RHS-2, utilizadas en los pretratamientos biológicos. Anova de un vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

En ambos casos se presenta la opción de realizar un bioproceso consolidado a partir de harina de ramón como una alternativa viable para la producción de etanol en la Península de Yucatán.

CONCLUSIONES

1. Con los tres pretratamientos físicos se alcanzaron concentraciones de ARD en el rango de 67 a 97 g·L⁻¹. De ellos, el mejor pretratamiento fue el de Temperatura (T2) a 90 °C por 30 minutos.
2. Con el proceso de sacarificación y fermentación, utilizando cepas nativas de levaduras, a partir del pretratamiento de temperatura (T2), se alcanzó un rendimiento promedio de 190 L de etanol por tonelada de harina de ramón.
3. Se logró la producción directa de bioetanol, a partir de harina de ramón, utilizando las cepas de *Trametes hirsuta* (Bm-2) y *Aspergillus niger* (RSH-2).
4. En el bioproceso consolidado utilizando la cepa *T. hirsuta* (Bm-2) se obtuvo un rendimiento de 98 L de etanol por tonelada de harina de ramón.
5. La cepa nativa PL1 (*Candida tropicalis*) aislada de semillas de ramón superó en un 24% de rendimiento a la cepa comercial Safoeno utilizada en estudios previos.

PERSPECTIVAS

1. Los resultados de este estudio sientan las bases para escalar un bioproceso consolidado, a fin de obtener de manera directa bioetanol, a partir de la harina de semillas de ramón.
2. Evaluar la posibilidad de co-cultivo entre las cepas *Trametes hirsuta* Bm-2 y la levadura PL1 (*Candida tropicalis*) aislada de ramón a fin de incrementar los rendimientos en el bioproceso consolidado.
3. Estudiar los mecanismos de acción del hongo *Trametes hirsuta* Bm-2 en la degradación del almidón para identificar los genes involucrados y poder clonarlos en microorganismos eficientes en procesos fermentativos.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] L. Chiari; A. Zecca, Constraints of fossil fuels depletion on global warming projections, *Energy policy*. 39, 5026-5034, 2011.
- [2] M. Höök; X. Tang, Depletion of fossil fuel and anthropogenic climatic change-A review, *Energy policy*. 52, 797-809, 2013.
- [3] U.S. energy information administration. [Online]. www.eia.gov. [Último acceso 15 de Septiembre 2015].
- [4] B. Maiti; A. Rathore; S. Srivastava; M. Shekhawat; P. Srivastava, Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zimomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 385-395, 2011.
- [5] A. Dermibas, Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review, *Applied energy*. 86, 108-117, 2009.
- [6] N. Sarkar; S. Kumar G.; S., Bannerjee; Kaustav Aikat, Bioethanol production from agricultural wastes: An overview, *Ren. Energy*. 37, 19-27, 2012.
- [7] M. Balat; H. Balat; C. Öz, Progress in bioethanol processing, *Prog. Ener. Combust.* 34, 551-573, 2008.
- [8] M. Vohra; J. Manwar; R. Manmode; S. Padilwar, Bioethanol production: Feedstock and current technologies, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2, 573-584, 2014.
- [9] C. Sheng G.; K. Teong L, A visionary and conceptual macroalgae-based third generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as underlay for renewable and sustainable development, *Renew. Sustainable Energy Rev.* 14, 2,842-848, 2010.
- [10] S. I. Mussato; G. Dragone; P. M. R. Guimaraes; J. P. A. Silva; L. M. Carneiro; I. C. Roberto; A. Vicente; L. Domingues; J. A. Teixeira, Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production, *Biotechnol. Adv.* 28, 6, 817-830, 2010.

- [11] M. J. Stolarski; M. Krzzaniak; M. Luczynki; D. Zaluski; S. Szczukowski; J. Tworkowski; J. Golaszewski, Lignocellulosic biomass from short rotation woody crops as a feedstock for second-generation bioethanol production, *Ind. Crop. Prod.* 10, 66-77, 2015.
- [12] P. A. Villegas S, Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. México, 2011.
- [13] C. I. Torres, El árbol de ramón reduciría importación de granos y mejoraría la seguridad alimentaria, *Cronica*, Octubre 2012.
- [14] O. Hernandez-Gonzalez; S. Vergara-Yoisura; A. Larque-Saavedra, Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula, *Bothalia Journal.* 44, 6, 70-81, 2014.
- [15] Z Barquera B., Obtención de bioetanol a partir de semillas de ramon (*Brosimum alicastrum* Sw), Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. México, 2013.
- [16] A. Cabalero R.; M. A. Velázquez M.; C. Orantes G., Aprovechamiento del árbol *Brosimum alicastrum* Swartz (Moraceae) en la selva Zoque Chiapas, México, *Lacandonia.* 6, 1, 71-82, 2012.
- [17] T. D. Pennington; J. Sarukhan, *Arboles Tropicales de Mexico. Manual para la identificacion de las principales especies*, Tercera ed. Mexico, D. F.: Editorial Fondo de Cultura Economica, 2005.
- [18] C. C. Berg. (1972) Conabio. [Online]. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/47-morac1m.pdf. [Último acceso 10 de Enero de 2015].
- [19] (2010) Flora de la península de Yucatán. [Online]. http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1835. [Último acceso 11 de Enero de 2015].

- [20] A. Vega L.; J. I. Valdez H.; V. M. Cetina A., Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. en las costas del pacífico mexicano, *Maderas y bosques*. 9, 1, 27-53, 2003.
- [21] M. Meiners; C. Sánchez G.; S. De Blois, El ramon: fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación, *Conabio. biodiversitas*. 87, 7-10, 2009.
- [22] E. Perez-Pacheco; V.M. Moo-Huchin; R.J. Estrada-León; A. Ortiz-Fernández; L.H. May-Hernández; C.R. Ríos-Soberanis; D. Betancur-Ancona, Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swarts seeds, *Carbohyd. polym.* 101, 920-927, 2014.
- [23] A. R. Gillespie; D. M. Bocanegra-Ferguson; J. J. Jimenez-Osornio, The propagation of ramon (*Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae) in mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico, *New Forest*. 27, 25-38, 2004.
- [24] E. R. Morales; L. G. Herrera. Comisión Nacional Forestal. [Online]. [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1301RAMON%20\(Brosimum%20alicastrum%20Swartz.\)%20Yucat%C3%A1n.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1301RAMON%20(Brosimum%20alicastrum%20Swartz.)%20Yucat%C3%A1n.pdf) [Último acceso 15 de Mayo de 2015]
- [25] X. Romero C.; J. A. Moreno P.; W. J. M Estrada. (2011) Guía técnica del ojushte (*Brosimum alicastrum*): "Una alternativa ante el cambio climático". [Online]. [http://biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Castellano et al Guia Tecnica.pdf](http://biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Castellano%20et%20al%20Guia%20Tecnica.pdf). [Último acceso 15 de Enero 2015].
- [26] R. I. Huchin Poot, Estudio preliminar de la floración, la formación del fruto y la germinación de *Brosimum alicastrum*, Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal, México, 2013.
- [27] H. J. Muñoz F.; J. T. Saenz R.; A. Rueda S., Especies promisorias de clima tropical para plantaciones comerciales en Michoacán. Uruapan, Michoacán: INIFAP, 2011.
- [28] Guía de especies forestales de Nicaragua. [Online]. <http://www.maqfor.gob.ni/descargas/estudios/Gu%C3%ADa%20de%20Especies%20Forestales.pdf>. [Último acceso 15 de Enero de 2015].

- [29] H. K. Tokpunar, Chemical composition and antioxidant properties of Maya nut (*Brosimum alicastrum*). MSc. Thesis, Clemson University, USA, 2010.
- [30] E. Pardo-Tejeda C.; M. Peters, *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and Potential in Mexico, *Econ. Bot.* 36, 2, 166-175, 1982.
- [31] O. Lozano; A. S. Shimada; E. Avila, Valor alimenticio de la semilla del ramon (*Brosimum alicastrum*) para el pollo y el cerdo, *Tec. Pec. Mex.* 34, 100-104, 1978.
- [32] A. I. Arevalo S.; R. Bressani, Respuesta glicémica de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) en mujeres de 16 a 25 años de edad, residentes de la ciudad capital Guatemala, *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala.* 25, 66-71, 2013.
- [33] BNDES and CGEE, *Bioetanol de caña de azúcar energía para el desarrollo sostenible*. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- [34] Bioenergeticos.com.mx. [Online]. <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioetanol.html>. [Último acceso 20 de enero de 2015].
- [35] A. Endo; T. Nakamura; A. Ando; K. Tokuyasu; J. Shima, Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for biofuels.* 1, 2008.
- [36] A. P. Moshi; J. P. Nyandele; H. P. Ndossi; S. M. Eva; K. M. Hosea, Feasibility of Bioethanol Production from Tubers of *Dioscorea sansibarensis* and *Pyrenacantha kaurabassana*, *Bioresour. technol.* 2015.
- [37] Renewable fuels association. ethanol rfa org. [Online]. <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. [Último acceso 15 de Septiembre de 2015].
- [38] Y. Ai; J. Jane, Gelatinization and rheological properties of starch, *Starch.* 67, 213-224, 2015.
- [39] A. C. Bertolini, *Starches, characterization, properties and applications*, Taylor & Francis group, Boca Raton, Fl., 2010.

- [40] J. Prieto M.; C. U. Rubio H.; A. D. Román G.; M. A. Méndez M.; C. A. González R.; F. Prieto G., Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* J.). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos, *Multiciencias*. 9, 2 115-125, 2009.
- [41] O. J. Sánchez; C. A. Cardona, Produccion biotecnologica del alcohol carburante I: Obtencion a partir de diferentes materias primas, *Interciencia*. 11, 671-678, 2005.
- [42] P. Landazabal, Obtención de etanol a partir de yuca variedad chile, en un proceso de 2 etapas: Hidrólisis (*Aspergillus niger*)-fermentación (*Zymomonas mobilis*), Tesis de Licenciatura, Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2004.
- [43] L. Copeland; J. Blazek, H. Salman; M. Chiming. T., Form and functionality of starch, *Food Hydrocolloid*. 23, 1527–1534, 2009.
- [44] S. Wang; L. Copeland, Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review, *Food & Function*. 4, 1564–1580, 2013.
- [45] F. Xie; E. Pollet; P. J. Halley; L. Avérous, Starch-based nano-biocomposites, *Prog. polym. Sci.* 38, 1590-1628, 2013.
- [46] M. Karimi; B. Jenkins; P. Stroeve, Ultrasound irradiation in the production of ethanol from biomass, *Renew. Sustainable Energy Rev.* 40, 400-421, 2014.
- [47] G. Ruiz A., Obtención y caracterización de un polimero biodegradable a partir de almidón de yuca, *Ingeniería y Ciencia*. 2, 4, 5-28, 2006.
- [48] M. Hernández-Medina; J. G. Torruco-Uco; L. Chel-Guerrero; D. Betancur-Ancona, Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 28, 3, 718-726, 2008.
- [49] R. F. Tester; J. Karkalas; X. Qi, Starch-composition, fine structure and architecture, *J. Cereal Sci.* 39, 151-165, 2004.
- [50] V. M. Moo-Huchin; M. J. Cabrera-Sierra; R. J. Estrada-Leon; C. R. Ríos-Soberanis; D. Betancur-Ancona; L. Chel-Guerrero; A. Ortiz-Fernandez; I. A. Estrada-Mota; E. Pérez-Pacheco, Determination of some physicochemical and rheological characteristics of

- starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz seeds, *Food hydrocolloid*. 45, 48-54, 2015.
- [51] C. M. Drapcho; N. P. Nhuan; T. H. Walker, *Biofuels engineering process technology*, McGrawHill, USA, 2008.
- [52] P. Bajpai, *Advances in bioethanol*. Springer, 2013.
- [53] Innovacion y Ciencia Agencia Andaluza de la Energia. Consejeria de economía. Estudio basico sobre el sector de los biocarburantes. [Online]. https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/sites/default/files/estudio_basico_sobre_el_sector_de_los_biocarburantes.pdf. [Último acceso 2 de Febrero de 2015].
- [54] FAO. (2009) Agribusiness handbook. [Online]. <http://www.fao.org/docrep/012/al376e/al376e.pdf>. [Último acceso 3 de Febrero de 2015].
- [55] C. Chuck-Hernandez; E. Perez-Carrillo; S.O. Serna-Saldivar, Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize, *J. Cereal Sci.* 50, 131-137, 2009.
- [56] A. M Sanchez R.; A. I. Gutierrez; J. A. Muñoz; C. A. Rivera, Produccion de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulosicos, *Tumbaga*. 5, 61-91, 2010.
- [57] P. Alvira; E. Tomás-Pejó; M. ballesteros; M.J. Negro, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour. Technol.* 101, 4851-4861, 2010.
- [58] M. Majzoobi; N. Seifzadeh; A. Farahnaky; G. Mesbahi, Effects of sonication on physical properties of native and cross-linkend wheat starches, *J. Texture Stud.* 46, 2, 105-112, 2015.
- [59] M. T. Montalbo-Lomboy, Ultrasonic pretreatment for enhanced saccharification and fermentation of ethanol production from corn, Graduate Thesis, Iowa Estate University, EUA, 2008.
- [60] M. Sujka; J. Jamroz, Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour, *Food hydrocolloid*. 31, 413-419, 2013.

- [61] K J. R. Vallons; E. K. Arendt, Effects of high pressure and temperature on the structural and rheological properties of sorghum starch, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 449-456, 2009.
- [62] B. Anika R, Impact of high hydrostatic pressure on wheat, tapioca, and potato starches, Phd. Thesis, Berlin University, Germany, 2005.
- [63] W. Li; F. Zhang; P. Liu; Y. Bai; L. Gao; Q. Shen, Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical, thermal and morphological properties of mung bean (*Vigna radiata* L.) starch, *J. Food Eng.* 103, 388-393, 2011.
- [64] Y. Sun; J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83, 1-11, 2002.
- [65] F. Talebnia; D. Karakashev; I. Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, *Bioresour. Technology.* 101, 4744-4573, 2010.
- [66] K. Okamoto; K. Imashiro; Y. Akizawa; A. Onimura; M. Yoneda; Y. Nitta; N. Maekawa; H. Yanase; Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*, *Biotechnol. Lett.* 32, 909-913, 2010.
- [67] K. Okamoto; Y. Nitta; N. Maekawa; H. Yanase, Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*, *Enzyme Microb. Tech.* 48, 273-277, 2011.
- [68] O. J. Sánchez; C. A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* 99, 5270-5295, 2008.
- [69] P. V. Aiyer, Amylases and their applications, *Afr. J. Biotechnol.* 4, 13, 1525-152, 2005.
- [70] S. Sivaramakrishnan; D. Gangadharan; K. Madhavan N.; C. R. Soccol; A. Pandey, α -Amylases from microbial source - an overview on recent developments, *Food Technol. Biotechnol.* 2, 44, 173-184, 2006.
- [71] T. Kolusheva; A. Marinova, A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -amylases, *J. Chem. Technol. Metall.* 42, 93-96, 207.

- [72] L. A. Underkofler L; J. Denault. (1963) Conversion of starch by microbial enzymes for production of syrups and sugars. [Online]. http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1963/Documents/chem40_618.pdf. [Último acceso 3 de Marzo de 2015].
- [73] M. Polakovic; J. Bryjak, Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase, *Biochem. Eng. J.* 18, 57-63, 2004.
- [74] L. Canilha; A. K. Chandel; T. S. dos Santos M.; F. A. Fernandes A.; W. L. da Costa F.; M. G. Almeida F.; S. S. da Silva, Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation, *J. Biomed. Biotechnol.* 19, 1-15, 2012.
- [75] Y. Lin; S. Tanaka, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627-642, 2006.
- [76] F. W. Bai; W. A. anderson; M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstock, *Biotechnol. Adv.* 26, 89-105, 2008.
- [77] M. Alameda; K. Bumila; I. Carino; G. McIninch, Removing water from azeotropic ethanol-water mixture through adsorption. [on line] https://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042915-103006/unrestricted/MQP_Report_Final.pdf.
- [78] A. Larqué S. (2014) Sistema silvopastoril productor de semilla para reducir la importación de granos. [Online]. <http://asam.centrogeo.org.mx/index.php/resultado-3?showall=1&limitstart=> [Último acceso 18 de Septiembre de 2015].
- [79] G. L. Miller, Use of Dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31, 426-428, 1959.
- [80] T. K. Kirk; S. Croan; M. Tien; K. E. Murtagh; R. L. Farrell, Production of multiple ligninases by *Phanerochaetes chrysosporium*, *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27-32, 1986.
- [81] A. Altan, Effects of pretreatments and moisture on microestructure and physical properties of microwave expanded hull-less barley, *Food Res. Int.* 56, 126-135, 2014.

- [82] S. Dhital; F. J. Warren; P. J. Butterworth; P. R. Ellis; M. J. Gidley, Mechanism of starch digestion by amylase-structural basis for kinetic properties, *Food Sci. Nutr.* DOI: 10.1080/10408398.2014.922043.
- [83] J. C. Martín; E. López, Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa, *Revista Colombiana de Química.* 38, 3, 395-408, 2009.
- [84] A. M. Rincón; L. Bou R.; L. E. Aragoza; F. Padilla, Efecto de la acetilación y oxidación sobre algunas propiedades del almidón de semillas de Fruto de pan (*Artocarpus altilis*)," *ALAN.* 57, 3, 287-294, 2007.
- [85] J. A. Medina; J. C. Salas, Caracterización morfológica del gránulo de almidón nativo: Apariencia, forma, tamaño y su distribución, *Revista de ingeniería.* 27, 56-62, 2008.
- [86] X. Chen; X. He; Q. Huang, Effects of hydrothermal pretreatment on subsequent octenysuccinic anhydride (OSA) modification of cornstarch, *Carbohydr. Polym.* 101, 493-498, 2014.
- [87] A. M. M. Sakinah; A.F. Ismailb; O. Hassand; A.W. Zularisamb; R. M. Illiasa, Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes, *Desalination.* 239, 317–333, 2009.
- [88] Z. Luo; X. Fu; X. He; F. Luo; Q. Gao; S. Yu, Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties of maize starches differing in amylose content, *Starch.* 60, 646-653, 2008.
- [89] 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 amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Agric. Food Chem.* 56, 488-495, 2008.
- [90] L. S. Pepe; J. Moraes; K. M. Albano; V. R. N. Telis; C. M. L Franco, Effect of heat-moisture treatment on the structural, physicochemical, and rheological characteristics of arrowroot starch, *Food Sci. Technol. Int.* 2015.
- [91] G. J. Al-Rabadi, Microscopic analysis of in vitro digested milled barley grains: influence of particle size heterogeneity, *Jordan J. Biol. Sci.* 7, 3, 199-203, 2014.

- [92] S. Wang; C. Li; L. Copeland; Q. Niu; S. Wang, Starch retrogradation: A comprehensive review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 0, 1-18, 2015.
- [93] Z. Konsula; M. Liakopoulos-Kyriades, Hydrolysis of starches by the action of an amylase from *Bacillus subtilis*, *Process Biochem.* 39, 1745-1749, 2004.
- [94] E. Kachlishvili; V. Elisashvili, Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes, *J. Biotechnol.* 144, 37-42, 2009.
- [95] R. J. Soares; A. Ohara; T. G Nishide; J. R. Mangabeira. A.; M. Herculano S.; H. Harumi S., A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 2, 199-207, 2015.
- [96] A. Kumar S., H. Masih, Y. Kumar, J. Kiran P., P. Singh S. Rath, Bioethanol production from waste potatoes as an environmental waste management and sustainable energy by using cocultures *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Advanced Research.* 2, 4, 553-563, 2014.
- [97] Z. Rodríguez; R. Boucourt; J. Rodríguez; N. Albelo; O. Nuñez; F. R. Herrera, Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón, *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 40, 3, 349-354, 2006.
- [98] L. Jamai; K. Ettayebi; J. El Yamami; M. Ettayebi, Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of amylase, *Bioresou. Technol.* 98, 2765-2770, 2007.
- [99] T. Banks; M. E. Bruins; A. M. Master; A. E. M. Janssen; R. M. Boom, Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selective of starch hydrolysis with amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Agr. Food Chem.* 56, 488-495, 2008.

ANEXOS

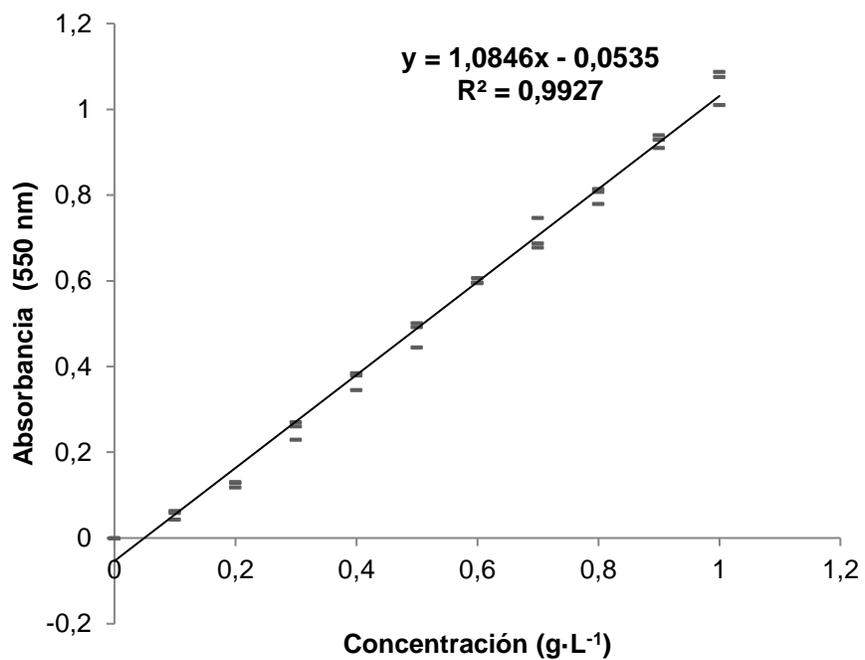
Anexo 1

Curva de calibración de ARD (Método DNS)

Absorbancias de las muestras a 550 nm

ARD (g·L ⁻¹)	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0.000
0.1	0.059	0.044	0.064	0.056
0.2	0.131	0.129	0.119	0.126
0.3	0.23	0.261	0.271	0.254
0.4	0.38	0.346	0.385	0.370
0.5	0.502	0.445	0.493	0.480
0.6	0.607	0.597	0.595	0.600
0.7	0.688	0.678	0.747	0.704
0.8	0.815	0.808	0.78	0.801
0.9	0.93	0.94	0.911	0.927
1	1.011	1.076	1.088	1.058

Curva de calibración azúcares reductores directos



Anexo 2

Solución amortiguadora de fosfatos

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.

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 3



Equipo diseñado (Departamento de instrumentación, CICY), para mantener la temperatura homogénea en la suspensión de harina durante su calentamiento.

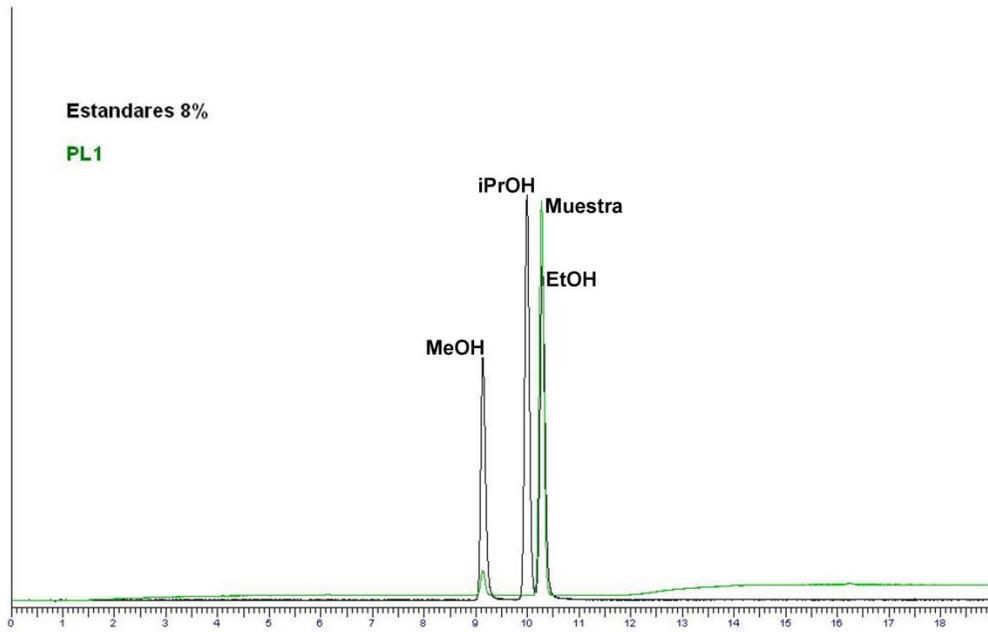
Anexo 4.



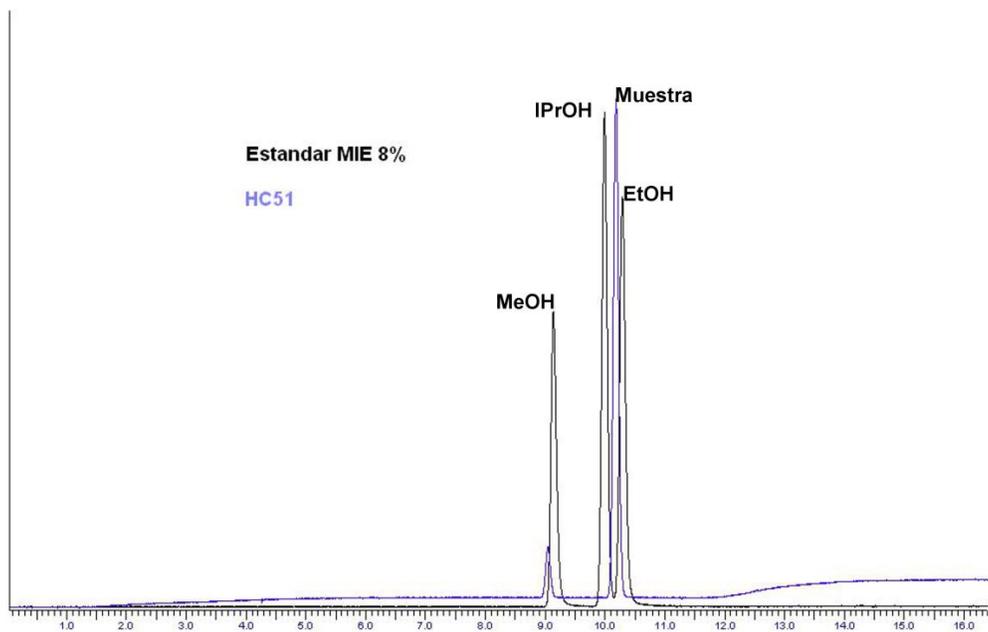
Equipo de microdestilación.

Anexo 5.

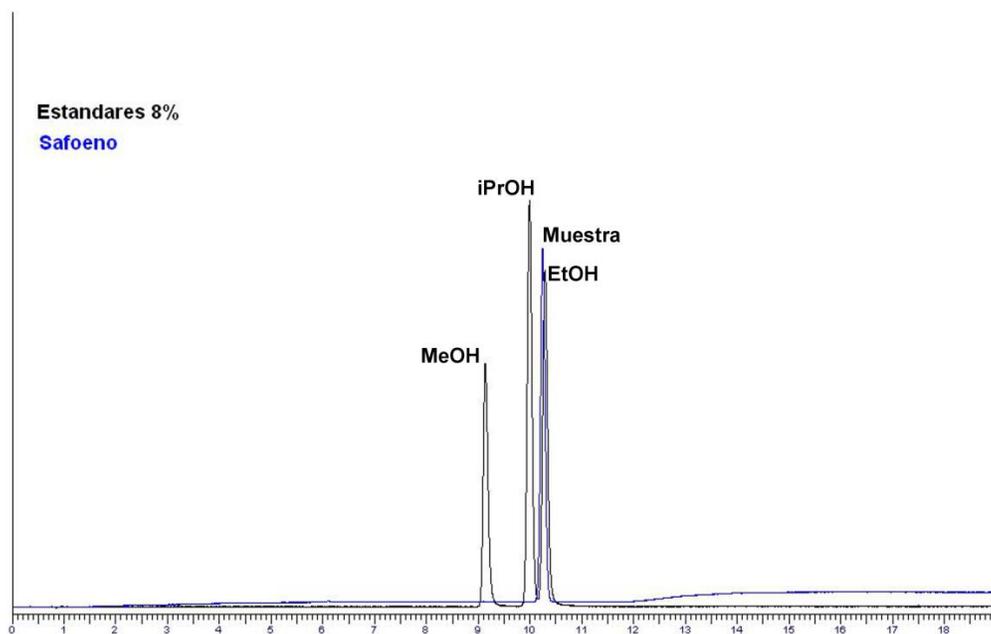
Cromatogramas del producto de la fermentación con diferentes levaduras



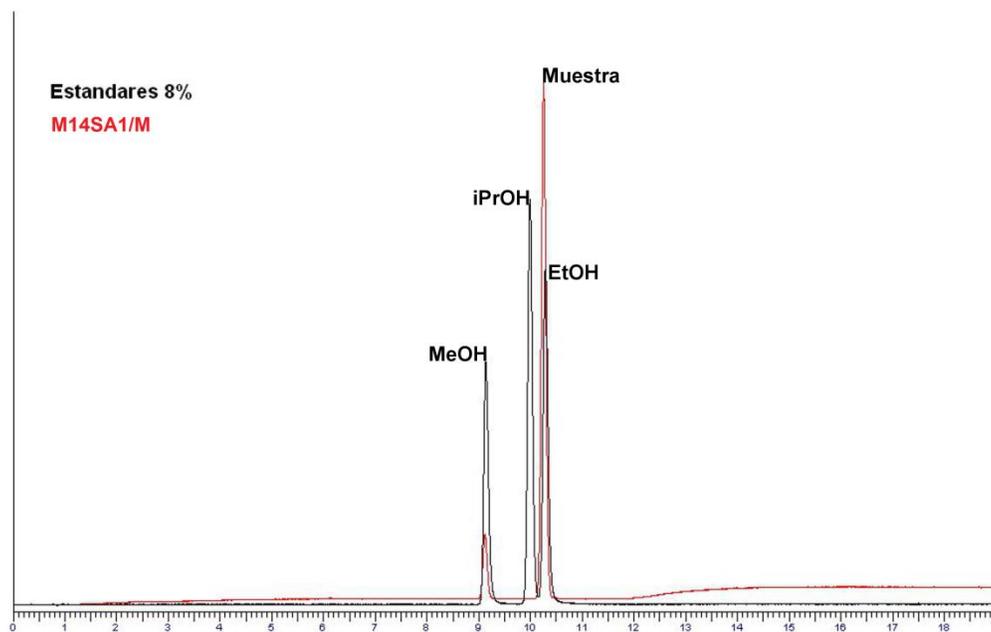
Cepa PL1, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).



Cepa HC51, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).

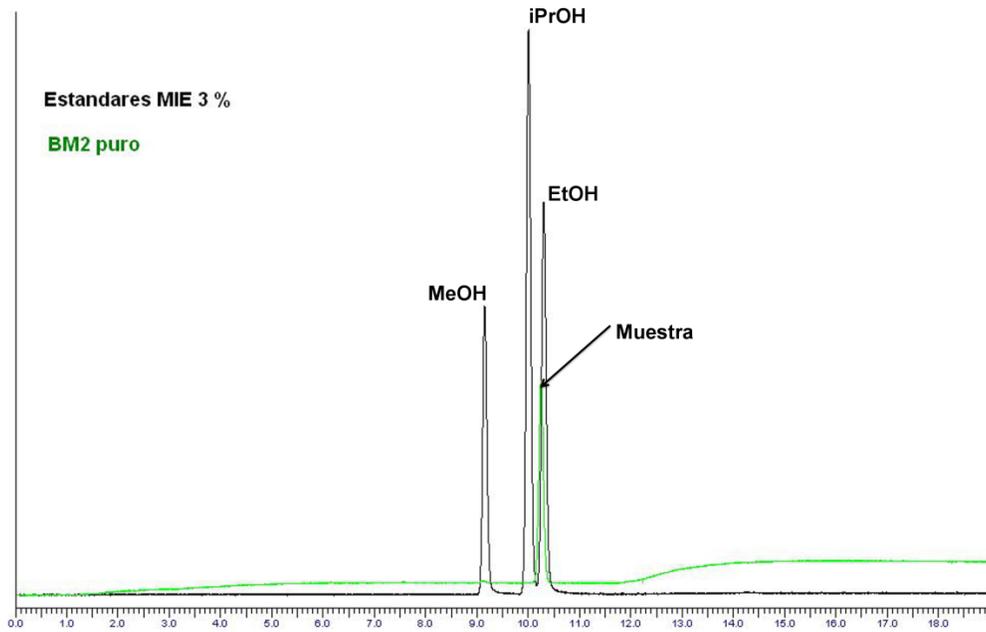


Cepa HC51, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).

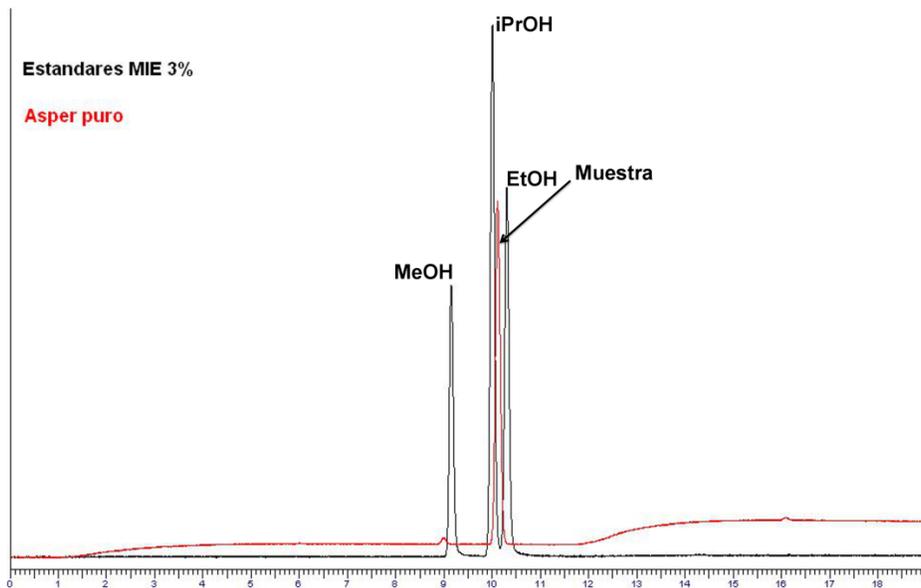


Cepa M14SA1/M, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).

Anexo 6.
Cromatogramas obtenidos de la fermentación directa con hongos



Cepa *Trametes hirsuta* Bm-2, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).



Cepa *Aspergillus niger* RSH-2, con estándares de metanol (MeOH), isopropanol (iPrOH) y etanol (EtOH).