

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS



**OBTENCIÓN DE ETANOL MEDIANTE EL USO DE LEVADURAS
(*Saccharomyces Cerevisiae*) LIBRES E INMOVILIZADAS EN EL
SOPORTE NATURAL COYONOSTLE (*Opuntia joconostle*) A PARTIR
DE AGUAS RESIDUALES RICAS EN ALMIDÓN.**

Por:

NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el título de:

Ingeniero en Ciencia Y Tecnología de Alimentos

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

Obtención de etanol mediante el uso de levaduras (*Saccharomyces Cerevisiae*) libres e inmovilizadas en el soporte natural Coyonoxtle (*Opuntia joconostle*) a partir de aguas residuales ricas en almidón.

T E S I S

POR:

NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ

**Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA

**M.C. María Hernández González
Presidente**

**M.C. Felipa Morales Luna
Vocal**

**M.P. Francisco Hernández Centeno
Vocal**

**QFB. Maria del Carmen Julia García
Vocal suplente**

**ING. José Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de la División de Ciencia Animal.**

BUENAVISTA, SALTILLO, COAH. MÉXICO

NOVIEMBRE DEL 2007

“Si piensas que estás vencido, lo estás, si piensas que no te atreves, no ganarás; si piensas que te gustaría ganar pero no puedes, no lo lograrás; si piensas que perderás, ya has perdido.

Porque en el mundo encontrarás que el éxito empieza con la voluntad del hombre. Todo está en el estado mental, porque muchas carreras se han perdido sin haberse corrido y muchos cobardes han fracasado antes de haber su trabajo empezado. Piensa en grande y tus hechos crecerán; piensa en pequeño y quedarás atrás. Piensa que puedes, y podrás, todo está en el estado mental. Si piensas que estás aventajado, lo estás. Tienes que pensar bien para elevarte; tienes que estar seguro de ti mismo antes de intentar ganar un premio. La batalla de la vida no siempre la gana el hombre más fuerte, o el más ligero, porque tarde o temprano el hombre que gana es aquel que cree que puede hacerlo”.

Anónimo

DEDICATORIAS

A mi Dios Padre todopoderoso, quien me prestó la vida y el amor de mi familia, por ser la persona principal, quien me da su apoyo, compañía y las fuerzas necesarias para poder culminar una etapa más de mi vida. Todos los esfuerzos de este trabajo te los dedico a ti padre mío.

A mis padres: Pedro Gaytán Moreno.

Juanita de la Cruz Sánchez García.

Por ser los mejores papás del mundo, dándome su gran apoyo incondicional y confianza, por estar siempre pendiente de mi, dándome los mejores consejos y su gran amor.

*Por estar a mi lado, "Este trabajo logrado, también es de ustedes".
Los amo mucho.*

A mis hermanas: Lic. Xochitl Gpe. Gaytán Sánchez.

Lic. Rocío Betsaida Gaytán Sánchez.

Maria Cristal Gaytán Sánchez.

Por ser mis mejores amigas incondicionales, por todas las cosas que me han enseñado, por sus grandes consejos y por su compañía y unión en los momentos tristes y alegres, las quiero mucho hermanas.

A mi sobrinita, la niña mas hermosa y tierna que tengo, que hasta ahora es la única, esperando a más por supuesto. Cuando seas

grande y entiendas estas líneas comprenderás todo el amor que te tengo pequeña, te quiero mucho. Nunca dejes de sonreír.

A mi abuelito Papá Polo, por sus grandes valores y actitudes ante la vida, por ser el ejemplo de trabajo, vida y fortaleza. Por todo el amor y consejos que me has dado. Te quiero mucho.

A mi abuelita mamá Fide t, por tu gran compañía y amor, que nos diste a toda tu familia, aunque ya no estés físicamente entre nosotros, todos te llevamos en nuestros corazones. Por todo el cariño, ternura y las pláticas que tuvimos. Te extrañamos mucho.

A las primas, por su grata compañía, amistad y hermandad en todo momento. Por todos aquellos momentos tan bonitos que hemos vivido juntas.

A mi cuñado Manuel Cazares, por su sincera amistad, apoyo y por formar parte de la familia.

A toda la familia Sánchez, por el entusiasmo, ánimo, apoyo y amor que me han brindado en todo momento. Que la unión y el amor siga por siempre entre nosotros.

A el Ing. Emir I. González Ruiz, por ser una persona muy importante en mi vida, por tu gran apoyo, comprensión y amor que me has dado en cualquier circunstancia. Por todos los momentos en los que estas a mi lado. Gracias por enseñarme a ver la vida de otro color. Te quiero.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater, por abrirme las puertas a la superación; la oportunidad de una formación profesional y abrirme camino en esta vida. Gracias por darme momentos inolvidables.

A mis mejores amigos; Nuyen "yuya", Lupita, Ivón, Luz y Enoc, con quienes pase momentos inolvidables, por todas las ocasiones buenas y malas que nos brindamos una mano de apoyo, amistad y cariño.

A mis amigos y compañeros de generación: Paco, Beto "chucha", Mimi, Rene, Manuel, Liz, Lore, Rosy, Sara, Brez, Gaby, Perla, Gama, Polo, Roberto y Armando.

A las familias: González Ruiz, Escude Sánchez; Lourdes, a la abuela Minerva, a la tía Lupe, García Escude y Díaz Cortés, por su grata hospitalidad y sincera amistad mostrada en mi estancia.

A todos mis maestros:

MC. María de Lourdes Morales, MC. Xochitl Ruelas, MC. Oscar Reboloso, MC. Laura Fuentes y especialmente al Dr. Ramón García Castillo por su sincera amistad y apoyo durante la carrera.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por aportar sus conocimientos, por su colaboración e interés. Por todo su tiempo, paciencia y cariño, siempre apoyándome, por la amistad en todo momento. Gracias por todo Doc.

En especial a:

A la MC. Felipa Morales Luna, por su grandiosa colaboración e interés en la realización de esta investigación. Por la amistad manifestada.

A la QFB. Carmen Julia García, por su apoyo e interés en el presente trabajo y por toda la amistad y enseñanzas en el transcurso de la carrera.

Al MP. Francisco Hernández Centeno, por tu apoyo, amistad, cariño e interés en el transcurso de este trabajo. Eres una persona muy alegre nunca cambies.

A la MC. Maria Hernández González, por dirigir con paciencia e inteligencia este gran proyecto, porque nunca dejo de creer en mi y me apoyo en toda circunstancia, por su sincera amistad manifestada, por los consejos que a cada momento me da y por todas las enseñanzas durante toda mi preparación profesional. Es una persona muy linda nunca cambie. Gracias.

A Carlitos Arévalo, Diana y en especial a Mildred, por el apoyo, paciencia e interés brindado en la realización de este trabajo y por su sincera amistad.

INDICE GENERAL

DEDICATORIAS	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
INDICE GENERAL	VIII
INDICE DE CUADROS	XI
INDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN	3
HIPOTESIS.....	3
CAPITULO 1	4
OBJETIVOS	4
1. 1. OBJETIVO GENERAL	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPITULO 2	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1- AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	5
2.1.1- Niveles de producción de contaminación de aguas residuales	6
2.1.2- Residuos de la industria agroalimentaria.....	7
2.1.2.1- Características de las aguas residuales de la industria agroalimentaria:.....	8
2.2- IMPACTO DE LAS AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA.....	
ALIMENTARIA.....	11
2.2.1-Contaminación por materia orgánica y microorganismos.....	11
2.3- AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA DE LA PAPA	12
2.3.1-Cantidades y destinos	12
2.4- APROVECHAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES	13
2.4.1- Uso de los residuos orgánicos.....	14
2.4.1.1- Alimentación animal.....	14
2.4.1.2- Producción de composta	14
2.4.1.3- Obtención de productos de mayor valor añadido	15
2.4.1.4- Producción de metano.....	15
2.4.1.5- Obtención de bioalcohol	15
2.4.2- Características de fábrica de papas fritas y producción de metano por fermentación.	16
2.5- ALMIDON	16
2.5.1- Amilosa	17
2.5.2- Amilopectina	17
2.5.3- Productos derivados del almidón.....	18
2.5.4- Usos del almidón	18
2.5.5- Enzimas degradadoras del almidón	19
2.5.5.1- α -amilasa	19
2.5.5.2- Amiloglucosidasa	20
2.5.6- Inhibidores	20
2.5.6.1- La transglucosidación	20
2.5.7- Jarabes obtenidos por reacción enzimática	21
2.5.7.1- Jarabe de glucosa	21
2.5.7.2- Jarabes de maltosa	21

2.5.7.3- Dextrosa	21
2.6 – IMPORTANCIA DE LOS BIONERGÉTICOS.....	22
2.6.1- Los biocombustibles	22
2.6.1.1- Propiedades de los biocombustibles	22
2.7 - MICROORGANISMO FERMENTADOR USADO EN LA INDUSTRIA	23
2.7.1- Características de las levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).	23
2.7.1.1- Factores de crecimiento.	25
2.7.1.1.1- Oxígeno:	25
2.7.1.1.2- Temperatura:	25
2.7.1.1.3- Concentración de iones de hidrogeno:	25
2.7.1.2- Producción de alcohol convencional.	26
2.8- INMOVILIZACION	28
2.8.1- Aspectos generales sobre la inmovilización	29
2.8.1.1- Métodos de inmovilización por retención física	29
2.8.1.2- Métodos de inmovilización por unión química	31
2.8.1.3- Tipo de soportes para la inmovilización.....	34
2.8.1.3.1- Tipo de soportes orgánicos e inorgánicos	34
2.8.1.4– <i>Opuntia joconostle</i> como soporte natural para la inmovilización.	35
2.8.1.4.1- Genero <i>Opuntia</i>	35
2.8.1.4.2- <i>Opuntia joconostle</i> (<i>Coyonoxtle</i> , <i>Coyonoxтли</i> , etc.)	35
CAPITULO 3	36
MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1 APARATOS Y MATERIALES.....	36
3.2 REACTIVOS.....	37
3.3 METODOLOGÍA.....	37
3.3.1 Etapa 1: Degradación de las aguas almidonosas a jarabe glucosado	37
3.3.1.1 Obtención de las aguas almidonosas de la papa	37
3.3.1.2 Degradación del almidón	38
3.3.1.2.1 Licuefacción	38
3.3.1.2.2 Degradación amilolítica	38
3.3.1.2.2.1Uso de la enzima α -amilasa.....	38
3.3.1.2.2.2Uso de la enzima Glucosidasa.....	39
3.3.2 Etapa2: Fermentación.....	39
3.3.2.1 Fermentación Libre	39
3.3.2.2 Fermentación Inmovilizada	40
3.3.2.2.1 Inmovilización.....	40
3.3.2.2.2 Fermentación	40
3.3.3. Análisis Estadístico.....	41
CAPITULO 4	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
4.1 RESULTADOS.....	42
4.1 ETAPA 1: DEGRADACIÓN DE LAS AGUAS ALMIDONOSAS A JARABE GLUCOSADO	42
4.1.1 Obtención de las aguas almidonosas de la papa	42
4.1.2 Etapa: Degradación del almidón	42
4.1.2.1 Licuefacción	42
4.1.2.3 Degradación amilolítica	43
4.1.2.3.1 Con enzima α -amilasa	43
4.1.2.2.2- Con enzima glucosidasa.....	45
4.2 ETAPA 2: FERMENTACIONES	47
4.2.1 Fermentación Libre e inmovilizada	47

4.2.1.1 Comportamiento del consumo de sustrato para la fermentación libre e inmovilizada	48
4.2.1.2 Comportamiento del ph para la fermentación libre e inmovilizada	49
4.2.1.3 Comportamiento de la formación de producto para la fermentación libre e inmovilizada	49
CAPITULO 5	51
CONCLUSIONES	51
CAPITULO 6	52
LITERATURA CITADA	52
CAPITULO 7	58
ANEXOS.....	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro no. 1. Análisis bromatológico de la papa (<i>solanum tuberosum</i>).....	1
Cuadro no. 2. Carga contaminante por sectores en la industria agroalimentaria.....	10
Cuadro no. 3. DBO producida en algunos tipos de industrias envasadoras.	13
Cuadro no. 4. Características de diferentes almidones.....	18
Cuadro no. 5. Clasificación taxonómica de la levadura.....	24
Cuadro no. 6. Rendimientos de crecimiento de organismos fermentadores calculados mediante la glucosa fermentada o del ATP producido.....	28
Cuadro no. 7. Tipos de soporte de inmovilización.....	34
Cuadro no. 8. Concentraciones de almidón y azúcares en mg/lit, presentes en el sistema.	42
Cuadro no. 9. Actividad enzimática medida por velocidades.	43
Cuadro no. 10. Concentración de almidón total y azúcares reductores.	43
Cuadro no. 11. Concentración de almidón presente en la muestra y con aplicación de tratamiento enzimático con glucosidasa.	45

INDICE DE FIGURAS

Figura no. 1. Granulo de almidones nativos; yuca (A) y papa (B), imágenes obtenidas por microscopia óptica a 20x.	17
Ffigura no. 2. Formula del etanol.	22
Figura no. 3. Levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , imágenes obtenidas por microscopia de contraste de fases a 580 aumentos.....	24
Figura no. 4. Ruta de fermentación de glucosa por <i>saccharomyces cerevisiae</i>	27
Figura no. 5. Crecimiento de <i>saccharomyces cerevisiae</i> en agar glucosado durante 2 días a 25° c.	27
Figura no. 6. Métodos de inmovilización mediante retención física..	30
Figura no. 7. Métodos de inmovilización mediante unión química.	32
Figura no. 8. <i>Opuntia joconostle</i> , como soporte natural para la inmovilización.....	35
Figura no.9. Concentración de almidón total presente en la muestra.	44
Figura no. 10. Concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.....	44
Figura no. 11. Degradación del almidón presente en la muestra, con tratamiento enzimático con glucosidasa.	46
Figura no.12. Producción de glucosa, presente con tratamiento enzimático con glucosidasa.	46
Figura no.13. Soporte natural <i>opuntia joconostle</i>	47
Figura no.14. Formación de la biopelícula en el soporte natural coyonoxtle.....	47
Figura no.15. Comportamiento de ° brix para la fermentación libre ee inmovilizada. .	48
Figura no.16. Comportamiento de ph para la fermentación libre e inmovilizada.....	49
Figura no.17. Concentración de alcohol mediante la fermentación con células libres e inmovilizadas.	50

RESUMEN

El alto consumo de frituras como botana o alimento, han provocado que la producción aumente con el objetivo de cubrir las necesidades del consumidor. Últimamente la producción de papa frita oscila entre las 45,261 toneladas anuales. La alta producción de papa frita es provocada por el mercado mexicano, ya que es el consumidor potencial de las industrias de la papa frita.

Las industrias de la papa frita en México usan la papa variedad Atlantic por ser baja en azúcares caramelizables, responsables de coloraciones indeseables por reacción de Maillard, también se pueden usar otro tipo como la Alpha y Gigant.

Para la eliminación del exceso de carbohidratos, la papa debe ser sometida a un eschado con agua a presión. El proceso anterior origina una alta producción de aguas y residuos orgánicos lo cual, sin ningún tratamiento, son vertidos al drenaje contribuyendo así a la contaminación del medio ambiente.

En el presente trabajo de investigación se obtuvieron las aguas residuales ricas en almidón con la molienda de papas variedad Atlantic, que posteriormente fueron tratadas con sistemas enzimáticos para la obtención de jarabe glucosado. En esta investigación se planteó la alternativa de poder usar el jarabe glucosado, obtenido de las aguas almidonosas, para la producción de etanol por medio de microorganismos fermentadores inmovilizados.

Para la producción de etanol, primero el microorganismo fermentador (*Saccharomyces Cerevisiae*) se inmovilizó en el soporte natural Coyonoxtle (*Opuntia joconostle*) que, por sus características físicas (poroso), es apto para la retención del microorganismo y para el trabajo continuo, sin tener que desechar el microorganismo fermentador, solo alimentando el medio y obteniendo el producto (etanol). El etanol podría ser aprovechado en cualquiera de los sectores que lo requieran. Se pudo obtener una concentración más alta de etanol en un periodo

corto de tiempo (48 horas) en el sistema inmovilizado a comparación con el sistema libre y también se obtuvo una considerable concentración de ácido acético a los tiempos posteriores.

INTRODUCCIÓN

En la producción de un alimento se generan residuos orgánicos, tanto sólidos como líquidos, que en algunos casos pueden ser aprovechados para la elaboración de otros como: alimento para animales, elaboración de composta, producción de metano, obtención de alcohol, etc.

El porcentaje de residuos orgánicos que son aprovechados son muy bajos en comparación de los que van directo al drenaje y contribuyen a la contaminación ambiental.

En el proceso de elaboración de papa frita generalmente se utiliza la papa variedad Atlantic, por sus características. El cuadro No. 1 permite apreciar la composición proximal de la papa.

Cuadro No. 1. Análisis bromatológico de la papa (*Solanum tuberosum*).

Determinación	Porcentajes (%)
Humedad	70.00
Materia seca	30.00
Cenizas	0.90
Grasa	0.10
Proteína	2.72
Fibra cruda	1.80
Carbohidratos Totales	24.54
Del cual:	
- almidón	14.72
- Otros Azúcares	9.82

(González, 2003)

Del cuadro No.1 es posible apreciar que el 70% del peso de la papa en fresco es humedad, y solo el 24.54% corresponde a carbohidratos totales, de los cuales el almidón representa el 14.72% y el restante 9.82% son azúcares.

La papa variedad Atlantic es generalmente utilizada por la industria de la fritura debido a su bajo contenido de azúcares caramelizables, responsables de

coloraciones indeseables por reacción de Maillard. Otro tipo de variedades óptimas para este proceso pueden ser la Alpha o Gigant.

El exceso de carbohidratos caramelizables es un problema que enfrenta la industria de la papa frita ya que esto genera la apariencia de un hojuela oscura (quemada), la cual deja un resabio amargo y por lo cual se opta por realizar un proceso de eschado a la papa previamente pelada y rebanada antes de entrar al freidor, a fin de lograr un color amarillo dorado altamente apreciado por el consumidor.

El proceso de eschado se lleva a cabo lavando con agua a una presión de 40 psi durante 40 s, el anterior lavado genera un residuo de agua rica en carbohidratos simples y complejos, lo que obviamente genera una baja en el rendimiento del producto terminado, el cual es de aproximadamente 20%; no obstante, es preferible esta pérdida a los bajos atributos de calidad generados al tener una hojuela con apariencia indeseable, por lo cual grandes empresas como Frito Lay operan bajo estas condiciones, generando grandes volúmenes de aguas ricas en carbohidratos simples y compuestos, las cuales son vertidas al drenaje público generando un fuerte proceso de contaminación.

El punto central de esta investigación es darle uso a los vertidos antes mencionados. Para poder obtener aguas similares a las generadas por la industria de la papa frita, se tuvo que moler y filtrar la papa variedad Atlantic. (Esta aseveración se hace debido a comparativos realizados en estudios previos a esta, operadas al interior de la línea de investigación).

Es de esperar que al procesar 1 tonelada de papa se tenga aproximadamente 245.4 kg de carbohidratos, de los cuales 147.2kg son almidón, 98.2kg son azúcares simples y el 20% (29.44 kg y 19.64 kg respectivamente) están siendo vertido al drenaje público.

Al hidrolizar el almidón se obtiene un jarabe glucosado, el cual es usado en la fermentación con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema libre e inmovilizado.

En el presente trabajo de investigación se utilizó como soporte el tallo del coyonoxtle (*O. joconostle*) por su característica porosa, que permite la fijación del microorganismo, lo cual se refleja en la formación de biopelícula en dicho soporte y limita su movimiento, aunque su metabolismo sí tiene fluidez.

JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales ricas en almidón provenientes de la industria de la papa frita generan un gran impacto al medio ambiente.

El uso de microorganismos inmovilizados capaces de metabolizar el azúcar obtenida de la degradación de este polímero presentan una forma más eficiente de obtener alcohol altamente apreciado por la industria farmacéutica, de biocombustibles y vinícola. La materia prima (glucosa) es utilizada íntegramente en la producción del metabolito y no de biomasa, y su separación es fácil al encontrarse fijo en el soporte del tallo de coyonoxtle (*O. joconostle*).

HIPOTESIS

Es posible obtener etanol a partir de aguas residuales ricas en almidón mediante tratamiento enzimático y posteriores procesos fermentativos con células libres y células inmovilizadas.

CAPITULO 1

OBJETIVOS

1. 1. Objetivo general

- Obtener etanol a partir de aguas residuales de la industria de la papa, comparando procesos mediados por microorganismos libres e inmovilizados.

1.2. Objetivos específicos

- Obtener jarabes glucosados a partir de aguas residuales de la industria de la papa mediante tratamientos enzimáticos.
- Inmovilizar microorganismos fermentadores productores de etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) en un soporte natural de Coyonostle (*O. joconostle*).
- Realizar y medir las cinéticas de fermentación mediadas por microorganismos libres e inmovilizados.
- Análisis estadístico de los datos y selección del proceso más efectivo.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1- AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Desde el punto de vista de la producción las aguas residuales generadas por la industria alimentaria se han incrementado. Este aumento de la producción es debido a algunos cambios socioeconómicos (poder adquisitivo, aumento demográfico, demanda de productos transformados, etc.) y también por que son bienes de primera necesidad cuya demanda es relativamente constante, por ejemplo: los transformados de frutas y verduras aumentó el 24.3 % de las ventas netas de productos transformados del año 1995 al 1998.

La mayor parte de las materias primas obtenidas de la naturaleza (sector agrícola o ganadero) deben ser tratadas en las industrias agroalimentarias mediante una serie de procesos tecnológicos industriales. La finalidad última de este proceso es la producción de un artículo alimenticio preparado para su salida inmediata al mercado y listo para su consumo. Los procedimientos empleados son numerosos y varían en función del tipo de industria alimentaria, de las características de la materia prima y, por supuesto, del producto final que se desea obtener. También pueden clasificarse según la naturaleza de su acción en procesos químicos, físicos o mecánicos, biológicos, etc.

El tratamiento de las materias primas esta directamente determinado por los requisitos exigidos al producto final y estos procesos, más sencillos o más complicados, son muy diversos: simple manipulación de la materia prima, (selección y clasificación según su calidad, tamaño, color, etc.), acondicionar la materia prima para su consumo, transformación total de la materia prima para obtener productos diferentes, conservación de la materia prima para formar nuevos productos, separación o extracción de alguno de los constituyentes de la materia prima, etc. El estudio de los distintos procesos empleados en la industria agroalimentaria es importante desde el punto de vista medioambiental, pues los residuos que genera cada uno de ellos son diversos. Aunque las aguas residuales de las industrias

agroalimentarias presentan ciertas peculiaridades que las diferencian de los vertidos de otras industrias, como son los fuertes volúmenes de agua o su elevada carga orgánica y a veces mineral, estas aguas residuales suelen ser especializadas (tipo de materias primas, naturaleza del proceso de tratamiento aplicado, etc.).

2.1.1- Niveles de producción de contaminación de aguas residuales

A nivel de las capas freáticas:

Esta situación es peligrosa, ya que en muchos países se consume más agua de la que se aporta, la cual es extraída de los mantos acuíferos. Por otra parte, la población en general se ha acostumbrado a consumir agua limpia para hacer cualquier cosa y el consumo va siempre en aumento, por ejemplo, en Estados Unidos actualmente es de 2.500 m³/hab/año.

A nivel de los cursos y masas de agua:

Esta contaminación es más visible y esta vinculada a la actividad humana, concentraciones urbanas, industria y abonos de las actividades agrícolas, y tiene efectos inmediatos, provocando el enriquecimiento de las aguas con nutrientes inorgánicos y sales minerales responsables del desarrollo de algas consumidoras de oxígeno, y de esta forma se llega a un desequilibrio biológico en el que los salmónidos (peces carnívoros y fuertes) dejan su lugar a los ciprínidos (peces sin dientes, poco exigentes de la calidad del agua) y en ciertos casos se llega incluso a la desaparición de los peces.

A nivel de las aguas marinas:

Además de la contaminación por hidrocarburos, los desechos orgánicos que se aportan constantemente llegan a modificar sensiblemente el ambiente marino y causan perturbaciones en la pesca.

2.1.2- Residuos de la industria agroalimentaria

Los residuos de la industria agroalimentaria son por lo general bastante contaminantes, siendo el problema básico el de los efluentes líquidos. Las aguas residuales de la industria agroalimentaria son de composición tan variada como los productos fabricados y por lo tanto son difíciles de caracterizar tanto en calidad como en cantidad. (Seoáñez, et al., 2003).

En la elaboración de un alimento, en particular los transformados vegetales, se generan las mayores cantidades de residuos orgánicos, ya sean sólidos, fragmentos sólidos orgánicos junto con el agua empleada y, en las fases iniciales de lavado y limpieza de materia prima, parte de los residuos son inorgánicos (principalmente tierras).

El porcentaje de residuos generado en la elaboración de productos vegetales es muy variable ya que está determinado por: el tipo de materia prima a procesar, tamaño, forma o partes aprovechables, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos en cada caso. (Hermida, 1993; Lázaro y Arauzo, 1994; Ostolaza, 1998).

Además, es importante tener en cuenta que dentro de cada producto elaborado existen otras variables que influyen en la producción de residuos como:

- Calidad de la materia prima (frutos dañados, podridos, madurez excesiva o insuficiente), que a su vez dependerá de la climatología, variedad, sistema de recolección.
- Calidad deseable en el producto final: la obtención de calidades óptimas de producto final requiere selecciones de materia prima más rigurosas que aumentan el porcentaje de residuos orgánicos.
- Tecnología de fabricación empleada. (Viniegra, et al., 2002).

2.1.2.1- Características de las aguas residuales de la industria agroalimentaria:

- Normalmente al grado de contaminación es más elevado que en las aguas residuales de origen urbano.
- El parámetro de estas aguas residuales suelen ser accesibles a los sentidos (turbidez, olor, sabor, color, temperaturas altas, etc.).
- Suelen tener una presencia importante de materias en suspensión, y en menor grado de materia coloidal.
- Casi siempre arrastra un elevado contenido en materia orgánica.
- Es muy frecuente la presencia de sustancias químicas orgánicas: aceites, grasas, etc.
- Es detectable con frecuencia la presencia de sustancias químicas inorgánicas variadas (acidez, alcalinidad, sulfatos, cloruros, amoníaco, fósforo, etc.), dependiendo del tipo de industria agroalimentaria.

En general estas aguas residuales son esencialmente orgánicas con una demanda de oxígeno importante, y por lo tanto necesitan en su mayoría tanto tratamientos biológicos como físico-químicos.

La industria agroalimentaria consume cantidades enormes de agua, así como también desecha grandes cantidades de la misma. El agua tiene, en esta industria, varios fines: para el transporte, como materia prima (al formar parte de la fabricación de productos como los zumos de frutas, jugos, etc.), como vehículo térmico (al transformarse en vapor) y para actuar sobre las materias primas en los procesos de fabricación. En este último aspecto se utiliza para lavar, pelar, escaldar, etc., y también en la limpieza de la maquinaria industrial. Para todo esto se emplea demasiado volumen de agua, cuya naturaleza suele ser fuertemente contaminante, una vez utilizada, por ejemplo: Conservas vegetales: 10 - 35 m³ de agua/Tm de materia prima. La anterior circunstancia obliga a las industrias agrícolas a intentar reutilizar el agua que usan y esto lo hacen en proporciones considerables.

Los residuos contaminantes que aparecen en los efluentes de las industrias agrícolas pueden ser de muy diferente naturaleza, agrupándose en tres clases:

- a) Los que contaminan por sus efectos físicos, por ejemplo: el calor, pues las altas temperaturas impide la vida animal y vegetal en los ríos, los olores y sabores extraños.
- b) Los contaminantes de naturaleza química inorgánica como la acidez, alcalinidad, amoniacos, residuos de cloruros y fosfatos, etc.
- c) Los que producen sus efectos mediante productos químicos orgánicos, por ejemplo los aceites y grasas, que producen la asfixia y la muerte de la fauna y flora de los cursos de agua.

Las industrias agroalimentarias usan materias primas de origen orgánico por lo que los efluentes presentan como característica principal un elevado contenido de materia orgánica. Por razones similares es frecuente la aparición de grasas y aceites, y como consecuencia de los diversos tratamientos llevados a cabo durante la preparación y el procesado de las materias primas, suelen tener gran cantidad de sólidos en suspensión.

Por otra parte, la mayoría de las industrias agroalimentarias incorporan a sus productos alimenticios una serie de aditivos para mejorar sus cualidades y potenciar su conservación (antioxidantes, colorantes, antiapelmazantes, conservantes, estabilizantes, potenciadores de sabor, etc.). Dichos aditivos, normalmente sustancias químicas, aparecerán con mayor o menor frecuencia como componentes de las aguas residuales.

El cuadro No. 2 permite apreciar la carga contaminante expresada por la demanda bioquímica (DBO) de oxígeno con unidades de toneladas por año, y por sectores de la industria agroalimentaria y la población equivalente.

Cuadro No. 2. Carga contaminante por sectores en la industria agroalimentaria.

Sector Industrial	DBO (Tm/año)	Población equivalente
Industria cárnica	30,320	1,277,976
Industria cervecera	27,900	1,175,974
Industria láctica	26,210	1,104,746
Procesado de papa	11,285	475,658
Industria del pescado	4,466	188,240
Almacenes de malta	1,960	82,613

(Seoanez, et al., 2003).

Las materias en suspensión en las aguas residuales son partículas terrosas sólidas del lavado a la entrada de la fábrica, o bien desechos vegetales residuales de los diferentes tratamientos por los que ha pasado el producto en el curso de su fabricación. Así, la masa de materias en suspensión es más importante en las legumbres, en las raíces peladas y en las frutas que son sometidas al mondado.

La carga contaminante varía también según el estado de fabricación. El lavado a la entrada de la fábrica es el que más agua exige (31 al 55%) y el que provee más abundante materia en suspensión.

Los tipos de contaminantes que aparecen en estos efluentes son sólidos y líquidos. Los primeros están constituidos por recortes y pieles de frutos, huesos, partículas de tierra y restos no aprovechables. Los residuos sólidos deben ser tratados separadamente y no diluidos en agua, ya que así se reduce el problema de la contaminación y se consigue la máxima economía en la depuración. Los residuos líquidos se componen de agua, sólidos en suspensión y sólidos en disolución. Generalmente se trata de suciedad adherida a los productos y desprendida por lavado, así como una gran concentración de materia orgánica originada en las operaciones de blanqueo, donde el agua se enriquece con grandes cantidades de azúcares, almidones y productos solubles del fruto.

Excepcionalmente, cuando se emplea el sistema de pelado químico aparecerán las disoluciones cáusticas típicas de este método, como el hidróxido sódico concentrado, lo que comunica a los efluentes un elevado grado de alcalinidad y valores altos de pH. (Seoáñez, et al., 2003).

2.2- IMPACTO DE LAS AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

2.2.1-Contaminación por materia orgánica y microorganismos

La mayoría de la materia orgánica que contamina el agua procede de desechos de alimentos, de aguas negras domésticas y de fábricas, que es descompuesta por bacterias, protozoarios y diversos organismos mayores. Ese proceso de descomposición ocurre tanto en el agua como en la tierra y se lleva a cabo mediante reacciones químicas que requieren oxígeno para transformar sustancias ricas en energía en sustancias pobres en energía. El oxígeno disuelto en el agua puede ser consumido por la fauna acuática a una velocidad mayor a la que es reemplazado desde la atmósfera, lo que ocasiona que los organismos acuáticos compitan por el oxígeno y en consecuencia se vea afectada la distribución de la vida acuática.

Una medida cuantitativa de la contaminación del agua por materia orgánica (sirve como nutriente y requiere oxígeno para su descomposición) es la determinación de la rapidez con que la materia orgánica nutritiva consume oxígeno por la descomposición bacteriana y se le denomina Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO). La DBO es afectada por la temperatura del medio, clases de microorganismos presentes, cantidad y tipo de elementos nutritivos presentes. Si estos factores son constantes, la velocidad de oxidación de la materia orgánica se puede expresar en términos del tiempo de vida media (tiempo en que descompone la mitad de la cantidad inicial de materia orgánica) del elemento nutritivo. (Anónimo. 1, 2007).

Otros tipos de contaminación son:

- Contaminación térmica: El vertido sale a mayor temperatura que la del receptor, aproximación al nivel térmico máximo de ciertas especies y disminuye el oxígeno, y esto provoca menor auto depuración.
- Si el efluente contiene sales y se vierte sobre el suelo; disminuye la producción vegetal y puede anularse totalmente los vegetales y no germinar los mismos.
- Modificación general en los ecosistemas acuáticos.
- Cambios en la composición de las biocenosis.
- Reproducción de gérmenes patógenos.
- Toxicidad de los animales por consumo de forraje alto en nitrógeno.
- Se vierten en las aguas sales minerales que provocan el desarrollo de algas consumidoras de oxígeno, y en ciertos casos se llega incluso a la desaparición de los peces.
- Los desechos orgánicos que se aportan constantemente llegan a modificar sensiblemente el ambiente marino y causan perturbaciones en la pesca. (Seoáñez, et al., 2003).

2.3- AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA DE LA PAPA

2.3.1-Cantidades y destinos

Los vertidos producidos suelen tener una composición rica en glúcidos, y casi siempre la salinidad es bastante elevada.

Una parte importante de los residuos que se generan en la industria de transformados vegetales está constituida por la fracción orgánica sólida derivada del tratamiento previo de las materias primas vegetales. En la actualidad esta fracción de sólidos orgánicos se emplea en parte como alimentación animal, una pequeña proporción se destina a otras aplicaciones (combustible) y el resto de la materia no empleada constituye un residuo destinado a vertedero.

El envío de esta materia orgánica a vertedero supone una pérdida de recursos y una gran contaminación ambiental, puesto que puede ser un subproducto aprovechable en otros procesos como son: compostaje, alimentación animal, etc. (Viniegra, et al., 2002).

El agua residual del proceso de la papa puede ser reutilizado en la etapa de lavado de la papa, lo que representaría un ahorro del 17% del agua utilizada en el proceso. (Alarcón y Dufour, 1998).

En el cuadro No. 3, se muestra la demanda bioquímica de oxígeno que producen ciertas materias primas que son envasadas, siendo la remolacha el producto que más contaminación origina, mientras que la industria de la papa se encuentra en nivel intermedio.

Cuadro No. 3. DBO Producida en algunos tipos de industrias envasadoras.

Producto	DBO (mg/l)
Manzanas	1,680-5,530
Remolacha	1,580-7,600
Papa	1,500-5,600
Judías	1,030-2,500

(Seoáñez, et al., 2003).

2.4- APROVECHAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales se deben considerar como una materia prima que contiene una serie de productos útiles, tales como el agua, la materia orgánica y algunas sales, y otros productos perjudiciales. (Seoáñez, et al., 2003).

Puede volver a usarse en un proceso previo, como en el lavado externo de las papas para eliminar la tierra existente. (Costa, et al., 1991).

2.4.1- Uso de los residuos orgánicos

Los residuos restantes que quedan tras el máximo aprovechamiento en la industria transformadora también se utilizan con otros fines: alimentación animal, fertilizante, obtención de productos comercializables, etc. (Lázaro y Arauzo, 1994; Hermida, 1993). Como se ha indicado anteriormente la mayor parte de los residuos generados en la transformación de vegetales se destina a alimentación para ganado. (Ostolaza, 1998).

Se puede considerar subproducto a todo producto no principal obtenido en un determinado proceso y que tiene o puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto para otra puede constituir la materia prima, obteniendo a su vez un producto principal y otro nuevo subproducto. (Hermida, 1993).

Actualmente, en la industria de transformados vegetales los principales destinos de los residuos sólidos orgánicos generados en sus procesos son:

2.4.1.1- Alimentación animal

Gran parte de los residuos orgánicos vegetales sólidos se destinan para alimentación animal, especialmente para bovino y ovino. Se utiliza principalmente para vacas, animales jóvenes y ganadería brava. (Fonollá y Boza, 1993).

2.4.1.2- Producción de composta

La composta es el producto final obtenido mediante un proceso de descomposición biológica de la materia orgánica, en condiciones controladas de humedad y temperatura, que oscila entre 50 y 70° C, provocando así la destrucción de elementos patógenos y por tanto la total inocuidad del producto.

La materia orgánica mejora la estabilidad del suelo, aumentando su porosidad y capacidad de retención hídrica, favoreciendo así el intercambio de gases y agua. Asimismo favoreciendo la fijación de nutrientes, aumenta el estado de agregación

del suelo y el desarrollo de su flora microbiana, por todo esto es una de las vías más importantes de regeneración de suelos. (Costa, et al., 1991; Antón, 1992).

2.4.1.3- Obtención de productos de mayor valor añadido

Existe una gran variedad de procesos aerobios y anaerobios de interés industrial en los que se tratan diferentes sustratos con diversas especies de microorganismos, tanto en cultivos puros como poblaciones mezcladas. Entre ellos destacan la digestión anaerobia para la producción de biogás y la fermentación alcohólica para obtener bioalcohol. (Jiménez, et al., 1989).

2.4.1.4- Producción de metano

La fracción de residuos de transformados vegetales que se deposita en vertedero es susceptible de someterse a tratamiento con el resto de residuos urbanos para la obtención de metano, que es el proceso de fermentación anaeróbica de los componentes orgánicos de los residuos sólidos. La fermentación es producida por bacterias que se desarrollan en ambientes carentes de oxígeno. Estas producen "biogás", el cual se compone fundamentalmente de metano (CH₄) y de dióxido de carbono (CO₂). El metano se puede utilizar en la producción de energía eléctrica y de energía térmica. (Mata, 1998).

2.4.1.5- Obtención de bioalcohol

La obtención de etanol por fermentación alcohólica ha cobrado interés debido a la posibilidad de utilizar alcohol como combustible. La fermentación alcohólica se lleva a cabo por microorganismos anaerobios o aerobios facultativos a partir de azúcares. Estos azúcares se pueden encontrar en forma de polímeros: almidón y celulosa. (Jiménez, et al., 1989).

Los residuos producidos por la industria de conservas vegetales, por su contenido en celulosa, pueden utilizarse como fuente de energía renovable, evitando así su acumulación. La fracción celulósica de los residuos se transforma mediante

hidrólisis en glucosa, que por fermentación se convierte en combustible (etanol). (Lázaro y Arauzo, 1994).

2.4.2- Características de fábrica de papas fritas y producción de metano por fermentación.

- Población equivalente a la fábrica: 350.000 hab.
- Aguas residuales con 9.000mg/ml de DQO.
- Digestión anaerobia: 8 días
- Producción de metano: 1.500 m³/día.
- Resultados: 88% de reducción de la DQO.

2.5- ALMIDON

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia de las plantas, y proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos. Es el polisacárido más abundante e importante después de la celulosa desde el punto de vista comercial. Se encuentra en cereales (maíz, trigo, arroz), tubérculos (papa, tapioca) y en algunas frutas (plátano) como polisacárido de reserva energética, y su concentración varía dependiendo de la madurez.

El almidón se diferencia de los demás carbohidratos por presentarse como complejas partículas discretas (gránulos). Los gránulos de almidón son relativamente densos e insolubles, (figura 1). En el almidón de la papa los gránulos de almidón se encuentran libres en el interior de la célula, de tal modo que su aislamiento es un proceso sencillo.

El almidón esta compuesto de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal llamado amilasa y otro muy ramificado llamado amilopectina, ordenados de forma radial. Contienen aproximadamente 20 - 30% de amilasa y entre un 70 – 80% de amilopectina. Ambas son largas cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4; sin embargo, la amilasa es una cadena lineal y la amilopectina tiene ramificaciones. Cada 15-30 restos de glucosa

hay una ramificación, unida a la cadena principal por una unión glicosídica α -1,6. Las ramificaciones hacen a la amilopectina menos soluble en agua que la amilosa. (Vaclavik, et al., 2002).

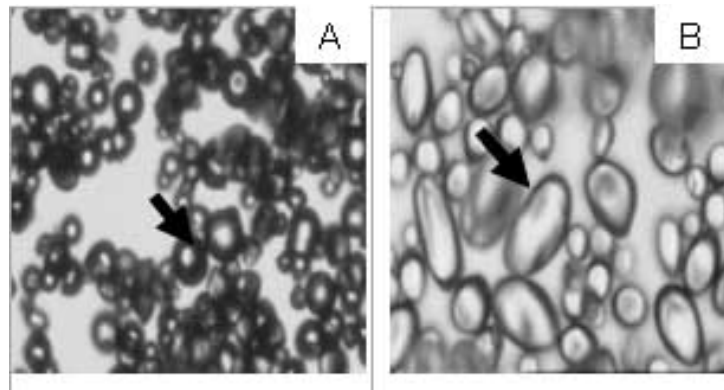


Figura No. 1. Granulo de almidones nativos; yuca (A) y papa (B), imágenes obtenidas por microscopia óptica a 20x. (Badui, 1999).

2.5.1- Amilosa

Es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glicosídicos α -1,4 que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares de hasta un millón; es decir, la amilosa es una α -D-1,4 glucana, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Adquiere la forma tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice tiene 6 moléculas de glucosa. Los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa.

2.5.2- Amilopectina

La amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada. Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se representan como dobles hélices. Tienen enlaces α -D-1,6, localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa. El contenido de amilopectina en los almidones es de cerca del 75%.

La amilopectina de la papa es la única que posee en su molécula grupos éster fosfato. Estos grupos se presentan cada 215-560 unidades de α -D-glucopiranosilo. La mayor contribución a la estructura cristalina de los gránulos de almidón proviene de la amilopectina. Ésta, por calentamiento en agua, proporciona soluciones claras y de alta viscosidad que son además filamentosas y cohesivas. Al contrario de la amilosa no forma geles, aunque la concentración sea muy alta.

La viscosidad decrece sin embargo en medio ácido, en tratamientos en autoclave o por agitación mecánica. (Badui, 1999; Fennema, 2000). El cuadro No. 4 permite observar algunas características de almidones usados en la industria alimenticia.

Cuadro No. 4. Características de diferentes almidones.

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	Temperatura de Gelatinización (° C)	Tamaño del granulo (micras)
Arroz	83	17	62-78	2-5
Maíz	73	27	62-72	5-25
Papa	78	22	58-67	5-100
Trigo	76	24	58-64	11-41

(Badui, 1999).

2.5.3- Productos derivados del almidón

A partir del almidón se obtienen distintos derivados:

- Glucosa: se obtiene por hidrólisis completa del almidón, con ácidos y enzimas amilolíticas.
- Dextrinas: se obtiene por hidrólisis parcial del almidón empleando ácidos y calor.
- Almidones modificados: se obtienen por gelatinización, fluidización por ácidos, eterificación, esterificación, enlaces cruzados y oxidación.

Los anteriores productos son usados ampliamente en la elaboración de muchos alimentos y también se usan en industrias de productos no comestibles. (Wurzburg, 1972).

2.5.4- Usos del almidón

- Para embeber agua y formar fluidos o pastas viscosas, o geles, para crear texturas deseadas.
- En cereales extruído, snacks de aperitivos y en mezclas en polvo para sopas y postres.
- Como aglutinante y espesante en alimentos infantiles, panadería, pastelerías y mayonesas.
- La amilosa es útil para recubrimiento de frutas (dátiles e higos) y frutas desecadas o glaseadas, ya que evita la adhesividad.
- Se usan películas de amilosa para un mejor envasado de cafés y té instantáneos.
- La amilopectina se usa como espesante, estabilizante y adhesivo. (Badui, 1999; Fennema, 2000).

2.5.5- Enzimas degradadoras del almidón

El almidón debe solubilizarse antes de llevar a cabo su hidrólisis generalizada; calentando la pasta de almidón hasta que los gránulos estallan, el almidón se dispersa y se gelatiniza y las proteínas asociadas coagulan.

Puede ser hidrolizado por las enzimas α -amilasa, β -amilasa y β -glucoamilasa. Las endoenzimas como la α -amilasa actúan en cualquier punto de la cadena y los granos de almidón no dañados para degradarlos. Los productos de la hidrólisis de la α -amilasa son glucosa, maltosa y dextrinas, dependiendo de la intensidad con la que se produzca la hidrólisis. La α -amilasa y la glucoamilasa (amiloglucosidasa) son las

enzimas más usadas en la industria del almidón, siendo además relativamente baratas.

2.5.5.1- α -amilasa

La α -amilasa hidroliza el enlace glucosídico interno α -1-4 al azar en la amilosa y amilopectina, dando lugar a productos de bajo peso molecular, solubles y menos viscosos, cuya ruptura está limitada por la presencia de los enlaces glucosídicos α -1-6 en los puntos de ramificación de la molécula del almidón nativo (amilopectina). Los productos de hidrólisis tienen configuración α en la glucosa del extremo reductor.

Las α -amilasas obtenidas de *Bacillus subtilis* variedad *amyloliquefaciens* son estables al calentamiento. La enzima α -amilasa tiene un pH óptimo de 6 y peso molecular de 10 a 20,000. (Wiseman, 1985; Wurzburg, 1972). La acción de la α -amilasa en la porción de amilosa es en dos etapas: la primera con una rápida degradación y resultando maltosa y maltotriosa, pues ataca al azar. La segunda etapa es más lenta, hay hidrólisis lenta de los oligosacáridos formando glucosa y maltosa. (Zaborsky, 1973). La hidrólisis de la amilopectina produce glucosa, maltosa, dextrinas límite y oligosacáridos conteniendo enlaces α -1,6 glucosídicos.

2.5.5.2- Amiloglucosidasa

Las amiloglucosidasas (glucoamilasa o α -1-4 glucohidrolasa) catalizan la etapa de hidrólisis de los enlaces α -1-4 del almidón y los oligosacáridos, liberando moléculas de β -glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena.

Los enlaces ramificados α -1-6 también se hidrolizan, pero mucho más lentamente formando un jarabe de glucosa del 95-97%, maltosa y dextrinas. La enzima también hidroliza enlaces α -1-3. La glucosa formada se utiliza como jarabe o se cristaliza para obtener glucosa pura sólida. La glucoamilasa es una enzima

extracelular producida por *Aspergillus* o *Rhizopus*. La enzima tiene un peso molecular de 60-100,000 y un pH óptimo de 4.3-4.5, temperatura óptima de 55-60° C en tiempos de más de 24 horas. (Wiseman, 1985).

2.5.6- Inhibidores

2.5.6.1- La transglucosidación

Esta reacción la realizan tres tipos de enzimas (fosforilasas, nucleótido difosfato glicosidasas y transglucosidasas). Pertenecen al grupo de las transferasas, éstas transfieren unidades de monosacáridos. Están relacionadas con la biosíntesis del almidón y glucógeno.

Las transglucosilasas forman maltosa, manosa y altos oligosacáridos a partir de la glucosa y maltosa. Éste fenómeno reduce la producción de dextrosa para formar los altos oligosacáridos. Las enzimas transglucosilasas se destruyen a un pH de 9. (Greenwood, 1970; Radley, 1968; Whistler y Paschall, 1985).

2.5.7- Jarabes obtenidos por reacción enzimática

2.5.7.1- Jarabe de glucosa

El jarabe de glucosa es cristalino y viscoso, contiene 66% altos sacáridos, 18% dextrosa y 16% maltosa. Tiene un poder edulcorante del 60% base azúcar, y como contiene un alto ED (equivalente dextrosa) se puede cristalizar rápidamente y se puede hacer polvo o en grano, como la dextrosa monohidratada (que es glucosa pura), otro menos purificado es el azúcar total.

Se usa en algunos productos alimenticios por el poder anticristalizante, higroscopicidad, cuerpo, textura, etc. En algunos casos se combina con la sacarosa para los caramelos, dulce de leche, dulces y mermeladas, helados, productos lácteos, panificación y en galletas.

2.5.7.2- Jarabes de maltosa

Se producen dos tipos fundamentales de jarabes de maltosa: uno de ellos tiene un contenido de 30-50% de maltosa y el 6-19% de glucosa, un ED de 42-49 y se utiliza en mermeladas y pastelería por su resistencia a la aparición de color, no ser higroscópico y no cristalizar tan fácilmente como los jarabes de glucosa. El otro contiene del 30 al 40% de maltosa, 30-50% de glucosa y un ED de 60-70. El contenido de azúcares fermentables es alto y se mantiene estable durante el almacenamiento. (Maeda y Tsao, 1979).

2.5.7.3- Dextrosa

Se usa principalmente en el área de la farmacéutica, refrescos y jugos, productos lácteos, etc. Tiene un poder edulcorante del 60-70% base azúcar. (Rentshler, 1962).

2.6 – IMPORTANCIA DE LOS BIONERGÉTICOS

El mundo se enfrenta al agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayormente en combustibles no renovables procedentes de fósiles y, al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez más crecientes derivando una enorme cantidad de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera. Este tipo de contaminación ha causado cambios en el clima del planeta que preocupan a los gobiernos y a la sociedad.

Una de las formas de hacer frente a este tipo de problemas es mediante recursos energéticos renovables. (FNB, 2004).

2.6.1- Los biocombustibles

El biocombustible mas importante es el etanol (Fig. 2), el cual puede ser usado como oxigenante de la gasolina elevando su contenido de O₂, lo que permite

una mayor combustión, disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente.

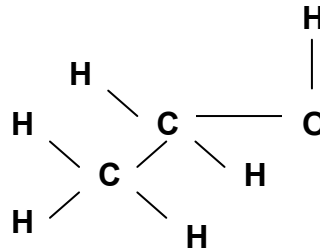


Figura No. 2. Formula del etanol.

El etanol puede ser obtenido de materiales lignocelulósicos como residuos agrícolas, forestales, sólidos urbanos y residuos agroindustriales. La materia prima principal para la obtención del etanol en los EEUU es el almidón. (Madson y Monceaux, 1995).

2.6.1.1- Propiedades de los biocombustibles

- El ciclo biológico en la producción y uso de biodiesel reduce aproximadamente en 80% las emisiones de anhídrido carbónico, y casi 100% las de dióxido de azufre. La combustión disminuye en 90% la cantidad de hidrocarburos totales no quemados, y entre 75-90% en los hidrocarburos aromáticos. Además, proporciona significativas reducciones en la emanación de partículas y de monóxido de carbono. Según el tipo de motor, puede producir un decremento en emisión de óxidos nitrosos.
- En el balance final no hay aumento de emisiones de dióxido de carbono, ya que las reducidas emisiones en comparación con el petrodiesel, se compensan con la absorción de CO₂ por parte de los cultivos oleaginosos.
- Reduce en un alto porcentaje los riesgos de contraer cáncer.
- Es seguro de manipular y transportar, es biodegradable, varias veces menos tóxico que la sal de mesa, y tiene un punto de inflamación de aproximadamente 150° C, mientras que el petrodiesel alcanza los 50° C.
- Los olores de la combustión en los motores diesel por parte del diesel de petróleo son reemplazados por el aroma de frituras (papas fritas, palomitas de maíz). (Stratta, 2000).

2.7 - MICROORGANISMO FERMENTADOR USADO EN LA INDUSTRIA.

2.7.1- Características de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

El microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* es mejor llamado como levadura de cerveza. Las levaduras y otros microorganismos viven libres e independientes en la naturaleza, se encuentran en las frutas, los granos y otras materias nutritivas que contienen azúcares y en el suelo (especialmente en los viñedos y en los huertos, en el aire, en la piel y en el intestino de los animales).

Se diseminan a través de portadores y por el viento, por lo general son organismos unicelulares y se presentan en formas muy variadas desde los esféricos, ovoides y elipsoidales, (figura 3).

Las levaduras son los microorganismos de más abundancia y antigüedad que el hombre a usado con fines utilitarios, se usan en la industria de alcohol, vino, cerveza, en todo tipo de licores y en múltiples procesos que exigen fermentación o inversión de azúcares.

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos. (Palacio, 1956).

Algunas especies capaces de producir fermentación alcohólica son las levaduras *Torulopsis*, *Cándida*, ciertas especies *Mucor* y algunas bacterias, sin embargo, la más importante es la *Saccharomyces*.

Es una levadura unicelular, se divide por gemación y puede tener una reproducción asexual cuando se encuentra en su forma haploide, y de manera sexual cuando a partir de un cigoto se forma un asca que contiene cuatro ascosporas haploides. En el cuadro No. 5, permite observar la clasificación taxonómica de la levadura.



Figura No. 3. Levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases a 580 aumentos. (Kretzchmarh, 1980).

Cuadro No. 5. Clasificación taxonómica de la levadura.

Clasificación taxonómica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Hemiascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Genero	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

(Lewin, 2001)

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación. (Lewin, 2001).

2.7.1.1- Factores de crecimiento.

2.7.1.1.1- Oxígeno:

Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos, aunque se ha probado que en escasa proporción son capaces de desarrollarse bajo condiciones

anaerobias por completo. En presencia de oxígeno, el crecimiento de la levadura es mucho más vigoroso que en cultivos bajo condiciones en que no es posible el acceso de oxígeno.

2.7.1.1.2- Temperatura:

La temperatura óptima para la máxima producción de levadura se encuentra a 36° C. El coeficiente de crecimiento (r = gramos de levadura producidos por hora por gramo de levadura presente), a 20° C es 0.49, a 30° C será 0.311 y a 36° C 0.342, con lo cual disminuye al aumentar la temperatura. (Kretschmarh, 1980).

En la mayoría de las levaduras el máximo de temperatura para el crecimiento se halla entre 34 – 47° C. La temperatura determina además la actividad de las distintas enzimas de la misma, y también en este aspecto las diversas especies reaccionan de forma diferente.

2.7.1.1.3- Concentración de iones de hidrogeno:

El crecimiento y la fermentación de la levadura dependen en alto grado de la composición del medio nutritivo. El pH óptimo para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es entre 4.4 – 4.8. En las alcoholeras se trabaja alrededor de un pH de 4.2 para evitar contaminaciones en el medio de microorganismos indeseables.

2.7.1.2- Producción de alcohol convencional.

En el proceso de obtención de alcohol, usando tecnología convencional, consta de varias etapas: desde un desarrollo de una cepa pura a escala de laboratorio, hasta llegar a obtener la población requerida en el fermentador con el objetivo de producir el alcohol. En este proceso nos encontramos con distintos parámetros, los cuales hay que controlar, como son: temperatura, °Bx, pH y nutrientes. El pH se regula mediante la adición de ácido sulfúrico al medio, mientras que para los nutrientes se añade la cantidad requerida de sulfato de amonio y fosfato de amonio para asegurar los mismos. (Prescott, 1962). En la figura No. 4, se

observa la ruta de fermentación que realizan las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones óptimas.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (figura 5), fermenta la glucosa dando alcohol etílico a través de la ruta de Embden-Meyerhof, produciendo 2 mol de ATP por mol de glucosa, además de 2 mol de etanol. Este microorganismo también es capaz de convertir hexosas en CO₂ aeróbicamente, por lo que en dependencia de las concentraciones de O₂ en el medio y de la fuente de carbono se puede favorecer uno de los dos procesos (Cuadro No. 6). Las levaduras tiene la ventaja de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol (hasta 150g*L⁻¹). (Claassen et al., 1999).

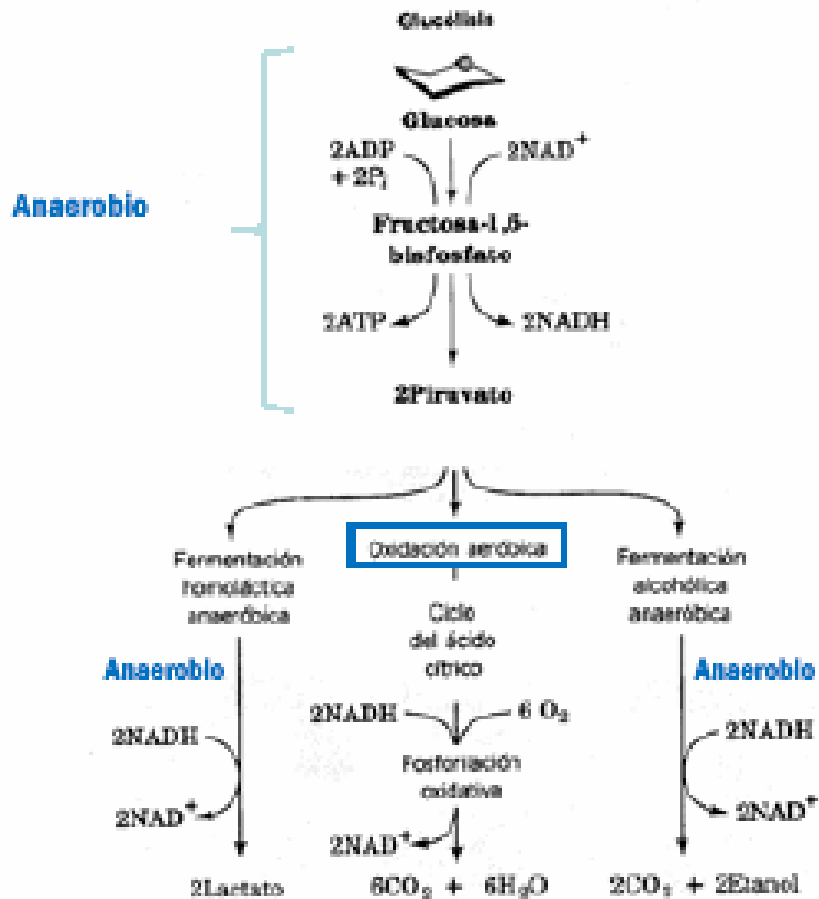


Figura No. 4. Ruta de fermentación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae*. (Stanier, et al., 1996).



Figura No. 5. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en agar glucosado durante 2 días a 25° C.

Cuadro No. 6. Rendimientos de crecimiento de organismos fermentadores calculados mediante la glucosa fermentada o del ATP producido.

Organismo	Fermentación y Ruta	Mol de ATP formado y mol de glucosa fermentada	Rendimiento molar, expresado en gr. de materia celular por mol de:	
			Glucosa fermentada	ATP producido
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura)	Alcohólica; Embden Meyerhof	2	21	10.5
<i>Streptococcus faecalis</i>	Homoláctica; Embden Meyerhof	2	22	11.0
<i>Lactobacillus del bruckii</i>	Homoláctica; Embden Meyerhof	2	21	10.5
<i>Zymomonas mobilis</i>	Alcohólica; Entner Doudoroff	1	8.6	8.6

(Stanier, et al., 1996).

2.8- INMOVILIZACION

En la fermentación se aprecia el uso continuó de células y microorganismos libres, en suspensión, la biomasa microbiana suele utilizarse una única vez y se debe desechar provocando contaminación al ambiente y elevando el costo del proceso. Al final del proceso de fermentación el aislamiento del producto deseado del medio es difícil y caro.

Los microorganismos y células inmobilizadas son más fáciles de manejar, menos susceptibles a la contaminación microbiana y más fácil de separar del producto. Para poder inmobilizar esporas, microorganismos, células, enzimas, etc., pueden utilizarse métodos de atrapamiento iónico, covalente y físico (algunos microorganismos se pueden inmobilizar en la pared interior de tubos finos). (Prescott, et al., 2004; Venkatasubramanian, et al., 1978).

La inmobilización de microorganismos, células y enzimas, en soportes adecuados presenta grandes ventajas en cuanto a control y eficacia del sistema en procesos industriales, aplicaciones médicas, farmacéuticas, alimentos, aplicaciones ambientales (tratamiento de residuos) y otras muchas aplicaciones. (Anónimo. 2, 2005).

2.8.1- Aspectos generales sobre la inmobilización

Es el proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de microorganismos, enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte, para ser utilizadas repetidamente en distintos procesos. (Taylor, 1991).

Como ventajas del empleo de células inmobilizadas podemos destacar:

1. El aumento de la estabilidad.
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la célula inmobilizada. (Hartmeier, 1985).

En general, los métodos de inmobilización (Kennedy y Cabral, 1983; Wiseman, 1985), se suelen clasificar en dos grandes categorías:

- a) **Retención física (Figura 6).**
- b) **Unión química (Figura 7).**

2.8.1.1- Métodos de inmovilización por retención física

a) Atrapamiento

Consiste en la retención física del microorganismo, célula o enzima, en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa de forma que se evite la liberación de la célula sin impedir la penetración del substrato, la matriz puede estar constituida generalmente por pre-polímeros foto-entre-cruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la célula en una solución del monómero. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, estas últimas suelen ser más resistentes que los geles.

1) *Atrapamiento en geles*

Este método se basa en la localización de la célula dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua. La amplia distribución de tamaños de los poros del gel da lugar inevitablemente a pérdidas de las células atrapadas incluso después de un lavado inicial prolongado. (Bernfeld y Wan, 1963).

2) *Atrapamiento en fibras*

Se desarrolló un método de inmovilización por atrapado en micro cavidades de las fibras sintéticas, de forma que las moléculas de las células pudieran quedar atrapadas en fibras producidas continuamente mediante técnicas convencionales de hilado en húmedo en fibras sintéticas usadas en la industria textil. (Dinelli, 1972; Dinelli et al., 1978).

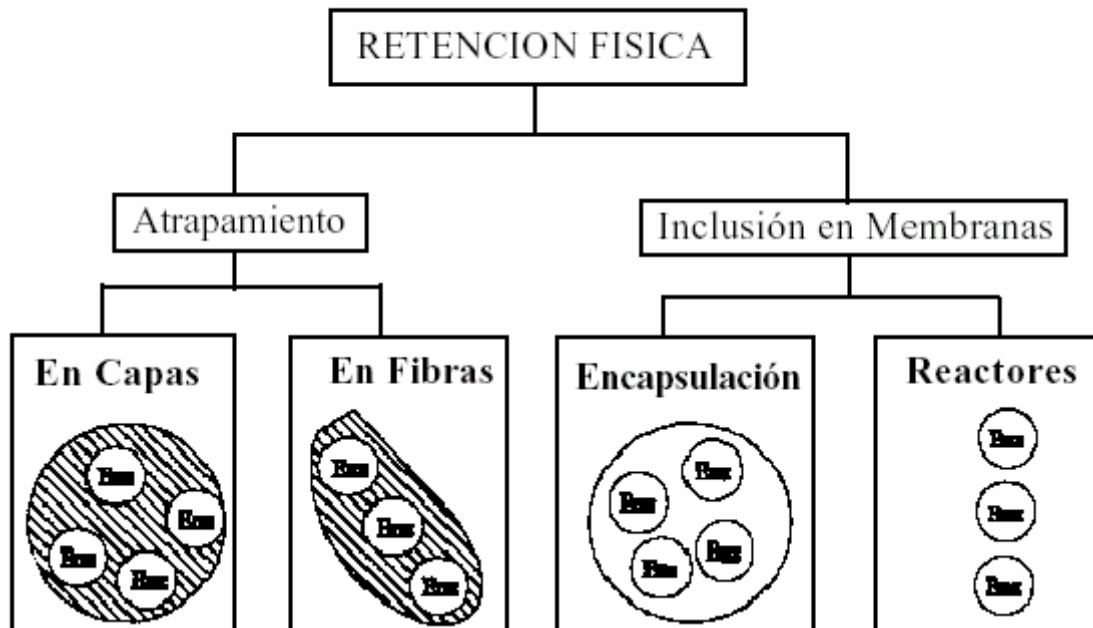


Figura No. 6. Métodos de inmovilización mediante retención física. (Kennedy y Cabral, 1983).

b) Inclusión en membranas:

Dividida en dos tipos:

1) *Microencapsulación*

En esta técnica, las células están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de reactivo (células). Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas "micelas reversas"). Las micro cápsulas son de forma esférica, de tamaños entre 1 y 100 μm de diámetro. Por éste método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de microorganismos, enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos. (Klei, et al., 1985).

2) Reactores de membranas

Se emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la célula de trabajo. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

Se debe de proceder a la adsorción de la célula de trabajo sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

1. mediante el paso de una solución taponada de célula a través de la membrana.
2. por contacto continuo de una solución de célula con la membrana.

2.8.1.2- Métodos de inmovilización por unión química

a) Unión a soportes

Son los métodos mas usados y hay mayor información de los mismos. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica y se separe fácilmente del medio líquido para ser reutilizado.

Se han usado distintos soportes para la inmovilización de muchas células, ya que éstos difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras, maderas, ramas y más corrientemente en forma de esferas.

Las células se pueden unir a los soportes mediante adsorción física, iónica o por unión metálica o covalente, figura 7.

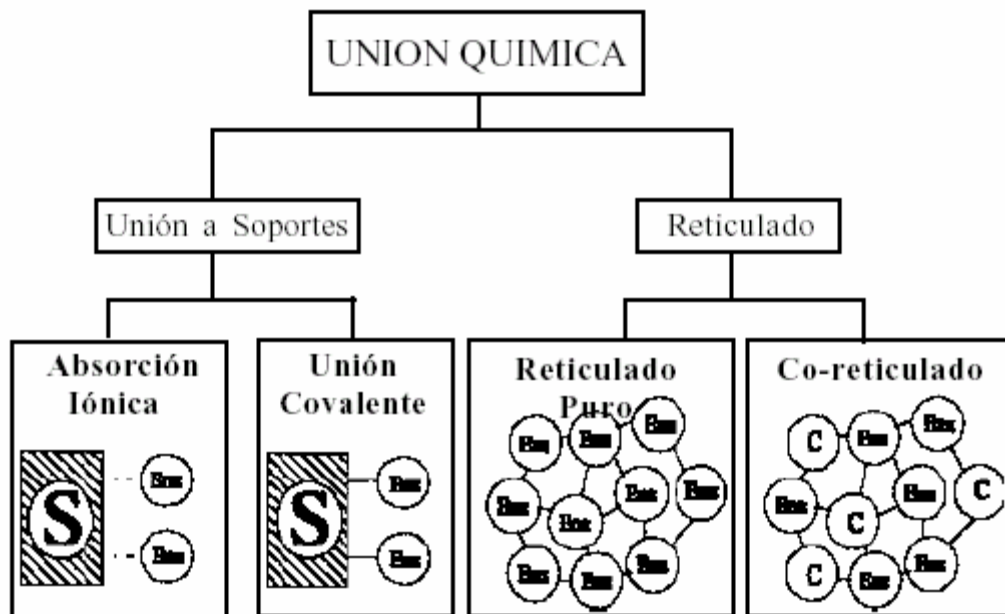


Figura No. 7. Métodos de inmovilización mediante unión química. (Kennedy y Cabral, 1983).

b) Adsorción

En la adsorción física, la célula se une a un soporte sin funcionar mediante interacciones iónicas. Las moléculas de las células deben estar en la superficie de la matriz sólida, poniendo una solución con el microorganismo en contacto con el soporte por cuatro técnicas:

- a) Procedimiento estático
- b) Electro deposición
- c) Proceso de reactor
- d) Baño con agitación

Como principales *ventajas* de este método destacan:

1. su preparación sencilla.
2. su bajo costo.
3. no hay cambios de especificidad.
4. los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

c) Unión covalente

La unión covalente de una célula a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con el sustrato, por ejemplo con las enzimas, los grupos químicos reaccionan con los nucleófilos de las proteínas y de entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta las siguientes *ventajas*:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
2. La carga de células permanece constante después de la inmovilización.
3. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluido o tanque agitado.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*:

1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones célula-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
2. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas células muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. Los soportes, tipo de célula que albergan y el producto creado, (Cuadro No. 7).

Cuadro No. 7. Tipos de soporte de inmovilización.

Soporte	Tipo de célula	Producto
Intercambiador de iones básico, aniónico Astillas de madera Cerámica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Vidrio poroso	<i>Acetobacter</i>	Ac. acético
	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Cerveza
Colchones de fibra de vidrio	<i>E. coli</i>	Metano
	<i>Zymomonas mobilis</i>	Biomasa
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Etanol

(Scragg, 2004).

2.8.1.3- Tipo de soportes para la inmovilización

Los soportes usados en una inmovilización, son de una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos e inorgánicos, que difieren en tamaño, forma, densidad y porosidad, y que pueden ser usados en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros, esferas, etc.

Las industrias prefieren los soportes inorgánicos, por la facilidad de unión con las células de trabajo. (Wiseman, 1985).

2.8.1.3.1- Tipo de soportes orgánicos e inorgánicos

Orgánicos

- Sintéticos: PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos.
- Naturales: pedazos de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos, albúmina.

Inorgánicos

- Sintéticos: arena, silicatos, arcillas, etc.
- Naturales: vidrios con porosidad, cerámicas, etc. (Scragg, 2004).

2.8.1.4– *Opuntia joconostle* como soporte natural para la inmovilización.

2.8.1.4.1- Genero *Opuntia*

Se encuentra distribuido ampliamente en ecosistemas semiáridos en el norte de México, distribuidas en comunidades específicas, llamadas nopaleras y esta representado por 104 especies.

El uso de *Opuntias* como alimento para animales domésticos y silvestres, ha sido de gran importancia en las regiones áridas y semiáridas del norte del país, pues constituye la principal fuente de agua y fibra durante la época de seca de invierno y primavera.

2.8.1.4.2- *Opuntia joconostle* (Coyonoxtle, Coyonoxtli, etc.).

Esta especie tiene una gran variabilidad y se encuentra distribuido principalmente en los estados de Coahuila, Zacatecas, S.L.P., Chihuahua, Aguascalientes, Durango, Jalisco y Guanajuato.

Crece en suelos relativamente pobres y es una planta invasora típica de pastizales (figura 8), es usado como forraje de cabras y ovejas, debido a su alto contenido en fibra. (López, et al., 1997).



Figura No. 8. *Opuntia joconostle* (Coyonoxtle), como soporte natural para la inmovilización.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de procesamiento y conservación de alimentos de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, en Buenavista, Saltillo. Coahuila, que se ubica a los 25° 21’03” N y 101° 01’ 34” W a 1743 msnm

3.1 Aparatos y Materiales

Aparatos

Licuadora	Vortex
Potenciómetro	Parrilla magnética
Parrilla de calentamiento	Baño Maria con agitación
Refrigerador	Cromatógrafo de gases
Estufa de gas	Balanza
Espectrofotómetro	Incubadora
Refractómetro	Micro centrifuga 14000 rpm
Bomba de vacío	Cromatografo de Gases

Materiales

Tela muselina	Matraz Kitazato
Aluminio	Ollas de aluminio
Papel filtro poro abierto	Matraz Erlenmeyer
Agitadores	Matraz de aforación
Gradillas	Espátula
Pisetas	Termómetros
Micro pipetas	Tubos de ensaye
Pipetas	Tubos de ensaye con tapón
Probetas	Vasos de precipitado 100ml 500ml y 1000ml
Magnetos	Viales
Algodón	Jeringa para cromatógrafo de gases
Papel destrasa	

3.2 Reactivos

Los reactivos usados en la presente investigación fueron los de uso común para la determinación de almidón por yodo, azúcares totales por Fenol sulfúrico, azúcares reductores por DNS, enzimas α -amilasa y glucosidasa, así como reactivos para la preparación de medios nutritivos (caldo nutritivo).

3.3 Metodología

3.3.1 Etapa 1: Degradación de las aguas almidonosas a jarabe glucosado

Para la degradación de las aguas almidonosas a jarabe glucosado, se requiere como materia prima las aguas residuales de la industria establecida de la papa frita, que tienen un contenido elevado del mismo, sin embargo al no contar con la posibilidad de tener dichas aguas, se procedió a trabajar como lo sugiere el trabajo realizado por González en el 2003.

3.3.1.1 Obtención de las aguas almidonosas de la papa

Las aguas almidonosas se obtuvieron a partir de la molienda de papas (variedad Atlantic) en buffer de acetato a un pH de 4.6, posteriormente filtrado con tela muselina para eliminar el material extraño, como fibras, trozos de papa, cáscara, etc. volviéndose a filtrar con papel filtro poro abierto con la ayuda de una bomba de vacío. Todo lo anterior se hizo cuidando la muestra de la oxidación, (cubriendo el matraz, de la luz y el calor con papel aluminio).

Después de haber obtenido el agua almidonosa libre de material extraño, se determinó la concentración de almidón por un método espectrofotométrico a 620 nm., al igual que la de azúcares totales, por el método del fenol sulfúrico.

3.3.1.2 Degradación del almidón

En esta etapa se realizó la degradación a partir del almidón de papa entero que puede llegar a medir aproximadamente de 5-100 μ ., en su forma natural, a través de la acción de enzimas amilolíticas.

3.3.1.2.1 Licuefacción

Es un paso importante pues es la parte inicial de la degradación de los gránulos de almidón y consiste en el calentamiento a temperatura de 85° C por 5 minutos. Con este procedimiento los gránulos de almidón que están compactos y enteros se rompen y liberan las cadenas de amilosa y amilopectina al medio. Este procedimiento hace más fácil la degradación con enzimas, puesto que las cadenas se encuentran libres para proceder a su hidrólisis.

En esta parte se determinan las concentraciones de azúcares reductores por el método del DNS y la concentración de almidón presente en el medio.

3.3.1.2.2 Degradación amilolítica

Esta degradación, consiste en la adición de enzimas amilolíticas al medio almidonoso, para que las cadenas del almidón sean depolimerizadas, mediante las enzimas α -amilasa y glucosidasa.

3.3.1.2.2.1 Uso de la enzima α -amilasa

El medio almidonoso se llevó a una temperatura de 20° C y se le adicionó la enzima α -amilasa a diferentes concentraciones (0.05%, 0.10%, 0.15% 0.20%), a fin de establecer la óptima, monitoreando el proceso por un periodo de 60 minutos, en función a las concentraciones de almidón y azúcares reductores.

Del procedimiento anterior, se obtuvo maltosa y el medio se preparó para la acción de la siguiente enzima que es la glucosidasa.

3.3.1.2.2 Uso de la enzima Glucosidasa

El medio almidonoso se elevó a una temperatura de 55° C a pH 4.5 según las indicaciones del proveedor y se monitorearon las concentraciones de almidón y azúcares reductores, con el método de espectrofotometría, a diferentes tiempos, a fin de establecer el tiempo óptimo para la máxima obtención de glucosa.

La concentración usada de enzima glucosidasa fue de 0.15%, de acuerdo con la información proporcionada por el fabricante.

3.3.2 Etapa2: Fermentación

En esta etapa se preparó el medio para llevar a cabo la fermentación, de la siguiente manera:

- La muestra del jarabe glucosado obtenido en las etapas anteriores; fue calentado hasta lograr una concentración de entre 8-10 ° Brix (medida con un refractómetro).
- La muestra se bajó a un pH de entre 3.5 - 4.0, con la ayuda del ácido cítrico, tartárico o málico.
- Se adicionó el microorganismo iniciador (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente cultivado en caldo nutritivo, bajo condiciones de asepsia, ya sea en forma libre o inmovilizada.

3.3.2.1 Fermentación Libre

Al total de la muestra antes descrita se adicionó el 5% de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente cultivada.

Se incubó a 25° C en agitación lenta, y fue monitoreada cada 24 hrs. por un periodo de 192 hrs., en función a los siguientes parámetros:

- ° Brix (azúcares reductores)
- pH

- Concentración de etanol

3.3.2.2 Fermentación Inmovilizada

El proceso de inmovilización consistió en la fijación espontánea del microorganismo a la superficie porosa de un soporte orgánico (palo de coyonoxtle).

3.3.2.2.1 Inmovilización

Se preparó caldo nutritivo de la manera antes mencionada y se le agregó un trozo del soporte natural (aproximadamente 4cm de diámetro), ya esterilizado a 120° C por 15 minutos.

El trozo del soporte natural previamente esterilizado, se trasladó en condiciones asépticas, al caldo nutritivo con la levadura (5gr de levadura en 100ml de caldo nutritivo). El medio anterior conteniendo el trozo de soporte natural, se puso en agitación lenta durante 24 horas y dejando reposar por 48 horas con una temperatura de 25° C.

3.3.2.2.2 Fermentación

Al medio en condiciones óptimas, se le agregó el trozo de soporte natural conteniendo la levadura en sus poros (inmovilizada).

Se evaluó las concentraciones de los siguientes parámetros cada 24 hrs. durante 192 hrs.

- ° Brix (azúcares reductores)
- pH
- Concentración de etanol.

3.3.3. Análisis Estadístico

El diseño experimental al azar constó de 2 tratamientos con tres repeticiones cada uno. El tratamiento 1 fue en sistema libre, y el tratamiento 2 en sistema inmovilizado. Los parámetros evaluados ya se han descrito anteriormente.

Una vez obtenidos los datos, se procedió a su análisis estadístico. Se realizó un ANOVA y prueba t de student ($p > 0.05$), que arrojaron como resultado al mejor tratamiento, lo cual se discute en el siguiente capítulo.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 RESULTADOS

4.1 Etapa 1: Degradación de las aguas almidonosas a jarabe glucosado

4.1.1 Obtención de las aguas almidonosas de la papa

El líquido almidonoso proveniente de la molienda y filtración de la papa, variedad Atlantic, presentó un color blanco lechoso, un contenido promedio de almidón de 1687 mg/lt y apariencia espumosa, esto es a fin a lo reportado por González, (2003), para un estudio similar.

4.1.2 Etapa: Degradación del almidón

4.1.2.1 Licuefacción

El efecto observado en este paso del proceso es la formación de un gel. A partir del medio se tomaron muestras para calcular las concentraciones de almidón y azúcares presentes en el medio, dichos resultados se presentan en el cuadro No. 8. Los resultados que se observaron en esta etapa, no tienen mucha variación de un paso a otro, ya que el propósito de la misma es solo la liberación, previa hinchazón y ruptura del gránulo de almidón, de las cadenas de amilosa y amilopectina al medio, a fin de facilitar las degradaciones subsecuentes (Nigam y Singh, 1995).

Cuadro No. 8. Concentraciones de almidón y azúcares en mg/lt, presentes en el sistema.

Concentración de almidón y azúcares en mg/lt		
Tratamiento	Almidón	Azúcares
Previo a licuefacción	1687	878
Después de licuefacción	1688	833

4.1.2.2

4.1.2.3 Degradación amilolítica

4.1.2.3.1 Con enzima α -amilasa

El objetivo de la adición de diferentes concentraciones enzima al medio, fue para establecer la óptima. Los datos arrojados por dicha prueba se promediaron y se obtuvieron graficas de las cuales se realizó la determinación de V_0 , dichos datos fueron sometidos a un análisis de varianza ($p \geq 0.05\%$) y se pueden observar en el cuadro No. 9, donde fue posible establecer como optima a la concentración 0.15%.

Cuadro No. 9. Actividad enzimática medida por velocidades.

Determinación de la óptima relación [Enzima] [Sustrato]	
[α -amilasa]	V_0 (unidades de absorbancia en ml/min)
0.05%	0.273
0.10%	0.270
0.15%	0.425
0.20%	0.457

Una vez determinada la optima concentración de enzima, se procedió a la degradación del material almidonoso, el cuadro No. 10, presenta dichos datos.

Cuadro No. 10. Concentración de almidón total y azúcares reductores.

Concentración de almidón y azúcares reductores en mg/lit con tratamiento enzimático α-amilasa.		
Tiempo min.	Almidón	Azúcares R.
0	1688	833
15	1673	684
30	1670	777
60	1643	1056
120	1520	1074

Del cuadro 10 se obtuvieron las figuras 9 y 10, las cuales muestran el descenso en la concentración de almidón total, y el consecuente incremento en las concentraciones de azúcares, donde es posible establecer que el tiempo óptimo de contacto es de 120 minutos, lo cual es afín con González (2003), quien menciona que ocurre una rápida degradación del almidón hasta azúcares simples, que posteriormente serán convertidos totalmente en glucosa por medio de la acción de la enzima glucosidasa.

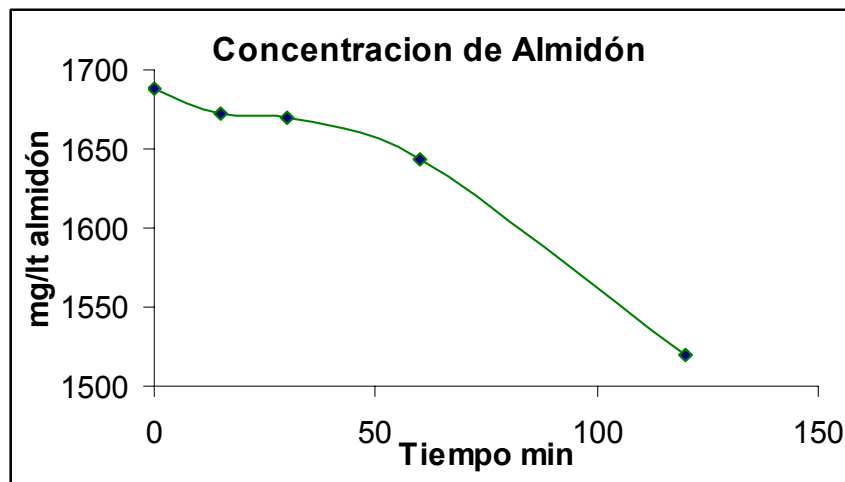


Figura No.9. Concentración de almidón total presente en la muestra.

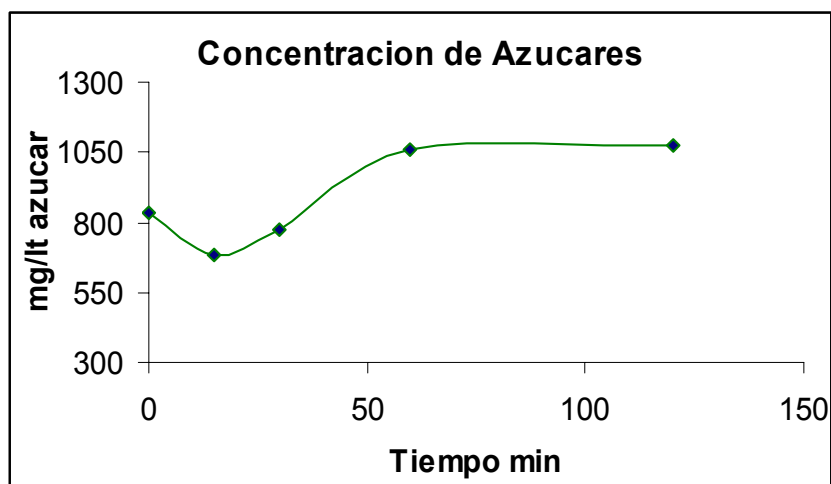


Figura No. 10. Concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.

4.1.2.2.2- Con enzima glucosidasa

En esta etapa se partió de una concentración de almidón de 1520 mg/lt., la cual fue degradada con enzima glucosidasa y de 1074mg/lt., de azúcares, se produjo una cantidad total de glucosa de 18877 mg/lt., en un tiempo óptimo de 480 minutos (8 horas), de acuerdo con el análisis de varianza realizado ($p \leq 0.05\%$), como lo muestra el cuadro 11. El tiempo de producción de la glucosa es afín con lo presentado por González en el 2003.

Cuadro No. 11. Concentración de almidón presente en la muestra y con aplicación de tratamiento enzimático con glucosidasa.

Concentración de almidón y producción de glucosa en mg/lt con tratamiento enzimático glucosidasa.		
Tiempo min.	Almidón	Glucosa
0	1520	1074
60	0.925	3474
180	0.213	15042
300	0.078	16398
360	0.061	16559
480	0.071	18877
1440	0.053	16045

En las figuras 11 y 12, se observa la eficiencia del trabajo conjunto de las enzimas ya que es posible tener una concentración de almidón mínima con su consecuente incremento en el contenido de glucosa. Esto es afín con González en 2003, quien menciona que el tiempo máximo de la producción de la glucosa fue de 8 horas, en donde también la concentración de almidón disminuye, hasta obtener las mínimas concentraciones.

Por tanto la degradación en el presente trabajo y los resultados arrojados de la hidrólisis del almidón incluyeron tres pasos, licuefacción con poca liberación de azúcares monoméricos, degradación amilolítica y glucolítica, donde finalmente se hidroliza el polímero generando grandes concentraciones de glucosa. Los resultados anteriores concuerdan con la descripción presentada por Nigam y Singh en 1995.

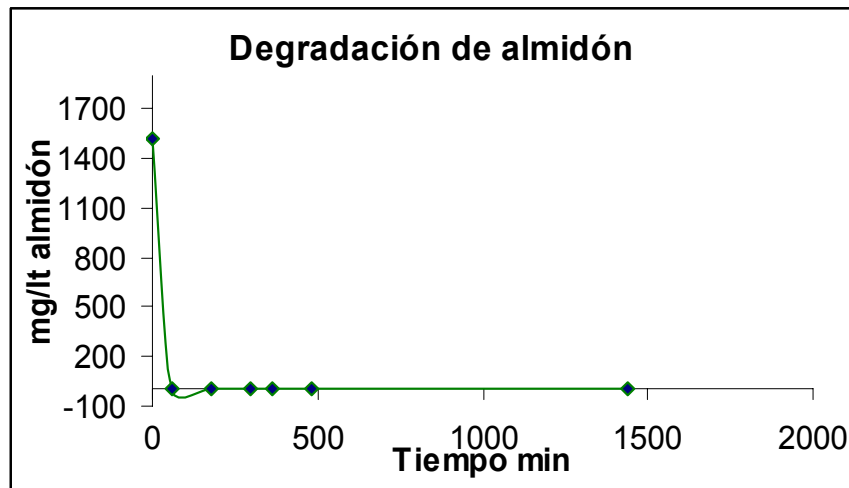


Figura No. 11. Degradación del almidón presente en la muestra, con tratamiento enzimático con glucosidasa.

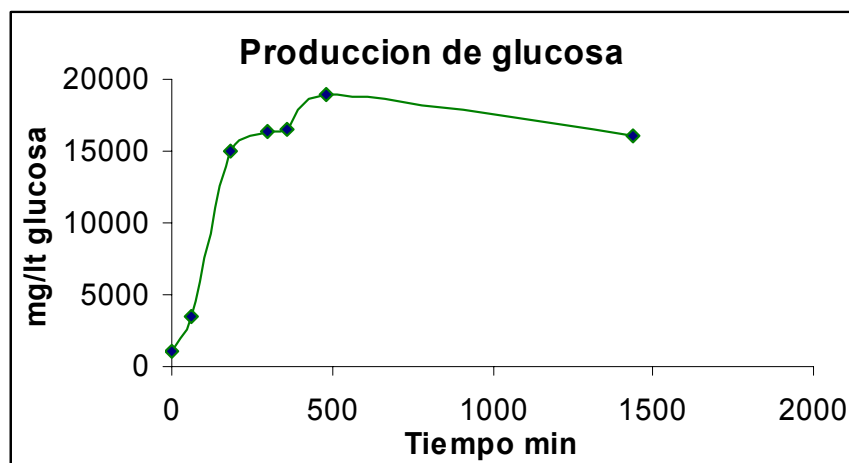


Figura No.12. Producción de glucosa, por medio de tratamiento enzimático con glucosidasa.

La cantidad de almidón todavía presente en el sistema 0.053mg/lt, (cuadro 11), posiblemente no fue degradada debido a que la glucosidasa fue inhibida por algún otro tipo de enzimas, como la transglucosidasa, la cual toma como sustrato a la glucosa para poder producir maltosa, y es apreciado como un decremento en la lectura de concentración de glucosa a las 1440 min., como lo reporta Greenwood en 1970.

4.2 Etapa 2: Fermentaciones

4.2.1 Fermentación Libre e inmovilizada

Para poder inmovilizar se necesitó que el soporte natural *Opuntia imbricata* (Coyonoxtle), estuviera en condiciones para la fijación (figura 13), de la levadura, el cual se tuvo que esterilizar y cortar en pedazos de 5 cm. de alto.



Figura No.13. Soporte natural *Opuntia joconostle* (Coyonoxtle), en condiciones de ser usado.

En la figura No. 14, se permite observar la formación de la biopelícula dentro del medio, mediante las levaduras.

Después de la formación de la biopelícula se le dio un suave lavado con agua destilada estéril y en condiciones asépticas para ser incorporado en el medio de fermentación.



Figura No.14. Formación de la biopelícula en el soporte natural Coyonoxtle.

4.2.1.1 Comportamiento del consumo de sustrato para la fermentación libre e inmovilizada

Para las fermentaciones en el sistema, libre e inmovilizado, se trabajó inicialmente con una concentración de 8 ° Brix, (azúcares reductores), se trabajó con este parámetro ya que se considera adecuado para el desarrollo levaduriforme y la consecuente formación del metabolito de interés, como lo muestran estudios realizados por Bastidas y Arellano en el 2001, quienes utilizaron concentraciones de entre 6-8 ° Brix, para la producción de etanol a partir de jugo de caña.

El comportamiento de los ° Brix (azúcares reductores) se observa en la figura 15, dichos datos fueron sometidos a un análisis de varianza $p \leq 0.05\%$, anexo A1, de donde es posible citar que las diferencias entre los sistemas libre e inmovilizados son estadísticamente significativos teniendo un descenso pronunciado, de 8 a 5.50 ° Brix a un tiempo de 24 horas para el sistema inmovilizado, a diferencia del libre que llegó a 6.7 ° Brix al mismo tiempo, y así sucesivamente hasta las 196 hrs. donde el sistema inmovilizado alcanza los 3.9°Brix y el libre solo 5.7°Brix.

Dicho comportamiento se le atribuye a la estabilidad que el microorganismo tiene al fijarse al soporte, como lo reportó Wiseman en 1985, donde menciona que la estabilidad y actividad de las células aumenta por la inmovilización.

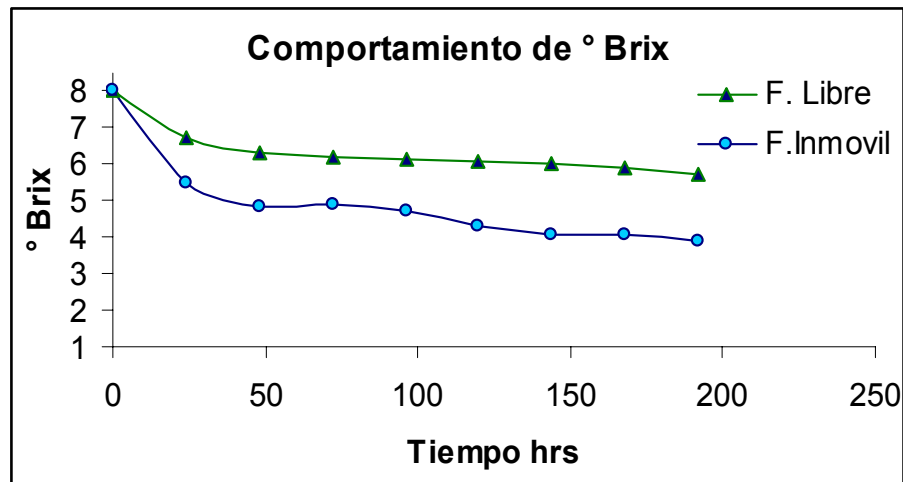


Figura No.15. Comportamiento de ° Brix para la fermentación libre e inmovilizada.

4.2.1.2 Comportamiento del pH para la fermentación libre e inmovilizada

El siguiente parámetro cuantificado fue el comportamiento del pH frente a las fermentaciones. En la figura 16, se observa que el sistema inmovilizado muestra un mayor aumento en comparación con el sistema libre, lo anterior es afín con el autor Grisales, et al., en el 2002, quien menciona que el pH comprende entre 3 a 4.5, para la reproducción de la levadura y una óptima fermentación, además el pH de 3 a 4.5 actúa como agente precipitante de la materia inorgánica y mantiene bajas las poblaciones de microorganismos contaminantes.

Estadísticamente hay diferencias significativas en los dos sistemas, pues partiendo ambos sistemas de 3.46, el sistema inmovilizado tuvo una tendencia a aumentar rápidamente hasta 4.33 y el sistema libre tuvo un aumento no significativo a 3.65, como se puede observar en el cuadro No. A 4.

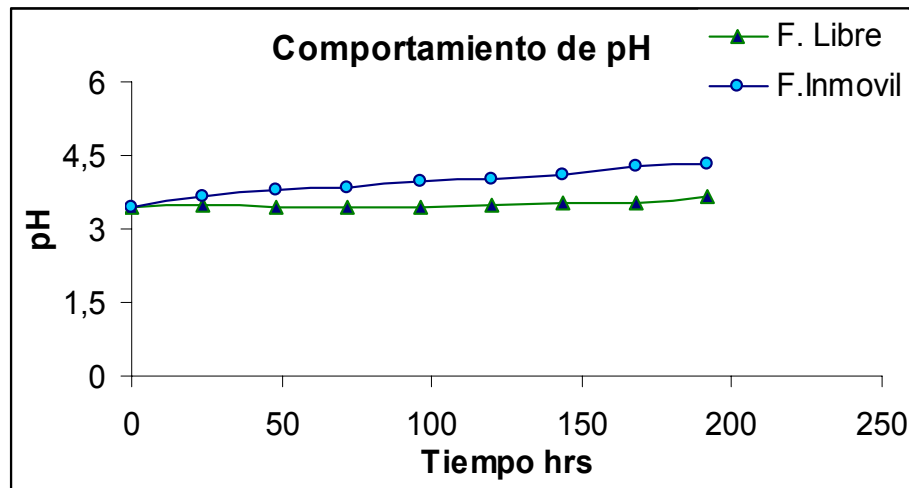


Figura No.16. Comportamiento de pH para la fermentación libre e inmovilizada.

4.2.1.3 Comportamiento de la formación de producto para la fermentación libre e inmovilizada

La concentración de alcohol (figura 17) formada por el sistema inmovilizado, muestra la máxima producción a las 48 horas, siendo la misma de 2838.26 mg/l y teniendo un descenso a las 72 horas, de hasta 1926.03 mg/l, dichas concentraciones fueron mediadas mediante la técnica de cromatografía de gases. Este descenso en la concentración del alcohol se puede atribuir a lo propuesto de Desroiser en 1998 quien cita que el orden de ataque a los carbohidratos es primero a los azúcares simples, seguido por los alcoholes y finalmente los ácidos orgánicos, comprobándose lo mismo con lo observado en el cromatograma obtenido de la muestra donde se presenta el pico para la presencia de ácido acético en la muestra de las 72 hs. donde ocurre el citado descenso en la concentración, y al observar el comportamiento de los grados brix, donde también se aprecia este descenso marcado a las 48 y después de las 72 hs., las concentraciones de los mismos no presentan disminuciones tan marcadas.

En dicha figura, es posible apreciar diferencia altamente significativa para ambos sistemas, donde, el sistema inmovilizado trabajó a un tiempo menor y con una máxima producción a las 48 horas a comparación del sistema libre, quien muestra su máxima producción a las 96 horas y siendo menor que la fermentación inmovilizada (2343.73 mg/l), como se puede apreciar en el anexo A3. La actividad observada por el sistema inmovilizado concuerda con los autores Trevan, Rosevear,

en 1993; Kosaric en 1983 y Linko en 1981, quienes mencionan que el uso de células inmovilizadas aumenta la producción de metabolitos en un periodo corto de tiempo, debido a que se aumenta la estabilidad y disminuye considerablemente costos de producción.

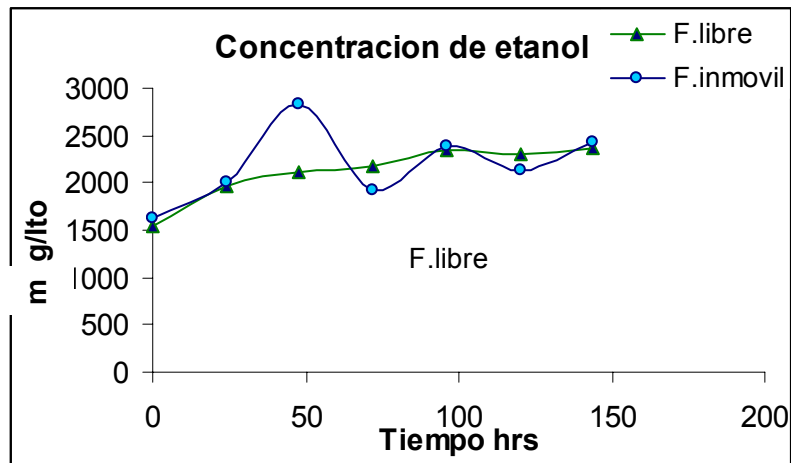


Figura No.17. Concentración de alcohol mediante la fermentación con células libres e inmovilizadas.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Las enzimas amilolíticas (amilasa y glucoamilasa), fueron capaces de degradar el almidón, teniendo que la concentración optima para la amilasa es de 0.15% con un tiempo de contacto de 120 min. Y de 480 min., para la glucosidasa, permitiendo con ello la obtención de un jarabe glucosado apropiado para el proceso fermentativo.

Periodos de contacto mas prolongados con la glucosidasa dan como resultado decrementos en el contenido de glucosa, debido a la acción de la enzima transglucosidasa.

Las condiciones físicas del soporte natural del palo de coyonoxtle fueron aptas para la fijación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fue capaz de inmovilizarse y formar una biopelícula.

Del seguimiento cinético al proceso fermentativo es posible citar que el microorganismo fijo en el sustrato presenta mayor estabilidad, expresado en un alto consumo del sustrato (azúcares reductores, expresados como grados Brix) al compararlo con el sistema libre.

La obtención de etanol a partir de aguas ricas en almidón degradadas a jarabes glucosados, mediante una fermentación mediada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* libre e inmovilizadas fue posible.

La fijación de las levaduras al soporte permitió que el tiempo para la máxima producción de alcohol fuera de 48 hrs., considerablemente menor en comparación con las 96 hrs. requeridas para el sistema con microorganismos libres, lo cual trae consigo ventajas desde el punto de vista económico para su producción a gran escala.

CAPITULO 6

LITERATURA CITADA

- Alarcón F. Dufour D.** (1998). Almidón agrio de yuca en Colombia: Producción y recomendaciones. CIAT, CIRAD, Santiago de Cali, Tomo1.
- Anónimo. 1,** 2007. Fondo de educación ambiental. Disponible en:
<http://www.sagan-gea.org/hojared/CAgua.html>
- Anónimo. 2,** 2005. Biocatalizadores inmovilizados. Universidad nacional de Quilmes, Departamento de ciencia y tecnología, Argentina.
<http://www.bioprocesos.unq.ar/Celulas%20inmovilizadas%20TP.pdf>
- Antón F. A.** (1992). Compostaje de los residuos orgánicos: Urbanos y Agrarios. I Problemática de los residuos orgánicos. Cuadernos de Fitopatología 1, Septiembre, pag. 113-121.
- Badui. D. S.** (1999). Química de los Alimentos. Pearson Education. 3ª edición. México.
- Bastidas E. y Arellano L.** (2001). Diseño preliminar de un proceso basado en fermentación extractiva para fabricación de etanol. Escuela de Ingeniería Química. Universidad del Valle. Cali. 2001.
- Bernfeld P. y Wan J.** (1963). Science. Pag. 142, 678,679.
- Claassen P. A., Van Lier JB, López Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA** (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol. Pag. 741-755.
- Costa F., García C., Hernández T., Polo A.** (1991). Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. CSIC.
- Desroiser N. W.** (1998). Conservacion de los alimentos. Editorial Continental Mexico, D. F. Segunda edicion, pag. 291.

- Dinelli, D.** (1972). Process Biochem. Ed. by Pye, E. K. y Weetall, H. H., Plenum Press, New York. Pag: 207-215.
- Dinelli D.,** Marconi, W., Cecere, F., Galli, G. y Morisi, F. (1978). In: Enzyme Engineering, Vol.3. Ed. by Pye, E. K. y Weetall, H. H., Plenum Press, New York.
- Fennema, O. R.** (2000). Química de los Alimentos, 2ª edición. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- FNB (2004)** ABC de los Alcoholes Carburantes. Federación Nacional de Biocombustibles. www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf/0/6ac
- Fonollá J.,** Boza, J.A. (1993) Utilización de los residuos del espárrago, procedentes de la industria conservera en la alimentación de rumiantes. Avances en la alimentación y mejora animal, pag. 163-165.
- González H.,** (2003) Estudio de variables en la elaboración de frituras de papa (Solanum tuberosum) variedad Atlantic y tratamiento de las aguas almidonosas generadas.
- Greenwood C. T.** (1970). In "The carbohydrates" (W. Pigman, D. Horton y A. Herp, eds.) Academic Press, New York.
- Grisales, P. A.,** Rios, L. A., Triana, M. (2002). Diseño de un proceso de producción de etanol anhidro a partir de jugo de caña. Escuela de Ingeniería Química- Universidad del Valle
- Hartmeier W.** (1985) Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* Pag. 149-153.

- Hermida J.R.** (1993). Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. Tecnologías complementarias en la industria alimentaria, 137-148.
- Jiménez L., Chica A., Cabello de los Cobos R.** (1989). Procesos de conversión de biomasa residual en energía. II. Procesos de obtención de bioalcohol en energía. Energía, pag. 99-108.
- Kennedy J.F. y Cabral, J.M.S.** (1983) Solid Phase Biochemistry. Schouten, W.H. (ed.) Wiley Pub., New York.
- Klei H. E. Sundstrom D. W. Shim D.** (1985) Immobilization of enzymes by microencapsulation en *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press.
- Kosaric N, Wieczorek A, Cosentino G. P, Mager R, Prenosil J.** (1983). Ethanol fermentation. En Biotechnology. Ed. H. Dellweg. Tomo 3, pag. 257- 385.
- Kretzchmarh, T. N.** (1992). Direct Conversion of Starch Hydrolyzate to Ethanol Using A. Inmobilizate of Amyloglucosidae and Saccharomyces Cerevisae in Batch Stirred Tank Reactor. Bioprocesses engineering V7.
- Lázaro L., Arauzo J.** (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Zubia. Pag. 227-240.
- Lewin B. A.** (2001). Genes VII. Marban. Saccharomyces cerevisiae chromocemes
- Linko P, Linko Y. Y.** (1981). Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor. Biotechnology Letters. Pag: 21-26.
- López J., Fuentes J., Rodríguez A.** (1997). Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México, UAAAN.

- Madson P. W.** Monceaux D. A. (1995) Fuel ethanol production. En Lyons TP, Kelsall DR, Murtagh JE (Eds.). The Alcohol Textbook. Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido. pp. 257-268.
- Maeda H.** y Tsao, G. T. (1979). Process Biochem, July, 2-5.
- Mata J.** (1998). Plantas de biometanización para la fracción orgánica de los RSU: II Tecnologías. Residuos, pag: 72-75.
- Monsalve G.,** John F., Medina De Perez, Victoria Isabel And Ruiz Colorado, Angela Adriana. (2006). Producción De Etanol A Partir De La Cáscara De Banano Y De Almidón De Yuca . Vol.73, No.150, P.21-27. Issn 0012-7353.
- Nigam P.,** Singh D. (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Technol. No.17, pag: 770-778.
- Ocampo, A.** (1998). Gasohol: Un combustible limpio para Colombia. Revista Facultad de Ingeniería. No. 17. Universidad de Antioquia. Noviembre de 1998.
- Ostolaza M.** (1998). Aprovechamiento Energético de residuos Orgánicos. Ingeniería Química, 30, 55-160.
- Palacio, H;** (1956). Fabricación de alcohol. Editorial Salvat. s. a. Primera Edición.
- Prescott, S. C.** (1962). Microbiología industrial. Editorial Aguilar-Madrid. Tercera Edición.
- Prescott M. L.,** Harley, P. J., Klein, A. D. (2004). Microbiología. 5ª Ed. Edit. Mc. GRAW-HILL. Interamericana. España.
- Radley J. A.** (1968). "Starch and its derivatives" 4th ed. Chapman y may, London.
- Rentshler, D. F.**(1962) US Patent 3,039,935; chem. Abstr., 57, 10085i

- Rosevear A.** (1993). Biocatalizadores inmovilizados. Segunda edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza-España. Capítulo 16.
- Scragg A.** (2004). Biotecnología para ingenieros “Sistemas biológicos en procesos tecnológicos”, México D.F., edit Limusa, S.A. de C.V.
- Seoáñez C. M.,** Bellas, V. E., Seoáñez, O. P. (2003). Manual de Tratamiento, Reciclado, Aprovechamiento y Gestión de las Aguas Residuales de las Industrias Agroalimentarias. Ed. Mundi-prensa, España.
- Stanier, R. Y.,** Adelberg, E. A., Ingraham, J. L., 1996. General Microbiology, fourth edition, edit. Prentice-Hall inc.
- Stratta J.** (2000). Los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel
- Taylor R. F.** (1991) Protein Immobilization: fundamentals and applications, Marcel Dekker, New York.
- Trevan M. D,** Poltorak O. M, Chukhtrai E. S. (1993). Estabilidad en enzimas y células. Biología Molecular y Biotecnología. Segunda edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza-España Capítulo 15. MVZ-CÓRDOBA 2002; Tomo 2, pag:., 216-223 Matiz A. et al. 223
- V. Viniegra,** O. Sierra, J. I. Jauregui. (2002). Gestión y tratamiento de residuos sólidos orgánicos de la industria de transformados vegetales.
- Vaclavik V. A.,** Christian E. W. (2002). Fundamentos de ciencia de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Venkatasubramanian K.,** Constantinides A. y Vieth W. R. (1978). In Enzyme Engineering. Edit. Pye E. K. Y Weetall H. H. Plenum Press.

Whistler R. L. y Paschall, E. F. (1985). "Starch: Chemistry and Technology". Vol. 1.
Academia Press, New York.

Wiseman A. (1985). Manual de biotecnología de los enzimas. Edit. Acribia, S. A.
Zaragoza, España.

Wurzburg O. B. (1972). "Starch in the food industry" en Handbook of food Additives.
Edit. T. E. Furia, CRC Press, Cleveland.

Zaborsky O. R. (1973) immobilized enzymes. CRC Press, Ohio.

CAPITULO 7

ANEXOS

Cuadro No. A1. ° Brix para los sistemas libres e inmovilizados por tiempo.

Tiempo/ Ferment								Minimo cuadrado medio
0,L	A							8,0000000
0,Z	A							8,0000000
24,L		B						6,7000000
48,L			C					6,3000000
72,L			C	D				6,2000000
96,L			C	D				6,1500000
120,L				D	E			6,0500000
144,L				D	E			6,0000000
168,L					E	F		5,9000000
192,L						F	G	5,7000000
24,Z							G	5,5000000
72,Z								4,9000000
48,Z							H	4,8500000
96,Z							H	4,7000000
120,Z								4,3000000
144,Z							I	4,1000000
168,Z							I	4,1000000
192,Z							J	3,9000000

Cuadro No. A2. pH para los sistemas libres e inmovilizados por tiempo.

Tiempo/ Ferment		Minimo cuadrado medio
192,Z	A	4,3300000
168,Z	A	4,2950000
144,Z	B	4,1150000
120,Z	C	4,0300000
96,Z	D	3,9650000
72,Z	E	3,8450000
48,Z	F	3,7800000
24,Z	G	3,6500000
192,L	G	3,6500000
168,L	H	3,5500000
144,L	H	3,5350000
120,L	H I	3,5000000
24,L	I J	3,4800000
0,L	I J K	3,4600000
0,Z	I J K	3,4600000
48,L	I J K	3,4600000
96,L	J K	3,4400000
72,L	K	3,4200000

Cuadro No. A3. Alcohol para los sistemas libres e inmovilizados por tiempo.

Tiempo/ Ferment		Minimo cuadrado medio
48,Z	A	2838,2600
144,Z	B	2433,8500
96,Z	C	2397,3100
144,L	D	2362,8900
96,L	E	2343,7300
120,L	F	2297,8300
72,L	G	2182,2100
120,Z	H	2143,8700
48,L	I	2114,9500
24,Z	J	2014,5700
24,L	K	1969,9200
72,Z	L	1926,0300
0,Z	M	1636,1200
0,L	N	1536,1300