

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**Aprovechamiento de efluentes agroindustriales ricos en aguas
almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de
Zymomonas mobilis.**

T E S I S

Por:

FREDY ENRIQUE BALON XOPO

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2009

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovechamiento de efluentes agroindustriales ricos en aguas
almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de
Zymomonas mobilis.

TESIS

Presentada por:

FREDY ENRIQUE BALON XOPO

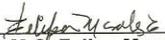
Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito
Parcial para Obtener el Título de:

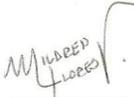
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

APROBADA


M.C. María Hernández González
Presidente


M.P. Francisco Hernández Centeno
Vocal


M.C. Felipa Morales Luna
Vocal


M.C. Mildred Inna Marcela
Flores Verástegui
Vocal suplente


Ing. José Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de la División de Ciencia Animal



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A mi **ALMA TERRA MATER**, por darme la oportunidad de crecer junto a ella y así terminar un eslabón muy importante en mi formación como profesional y como ser humano.

Al **DEPARTAMENTO Y LABORATORIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS Y A TODOS LOS QUE LO INTEGRAN**, por el gran apoyo depositado en mi, por la confianza y por su amistad.

A mis **maestros. Lic. Laura Olivia Fuentes, MC. Carmen Julia, M.C. Xochitl Ruelas, Dra. María de Lourdes Morales**, por su sincera amistad y apoyo durante la carrera y de manera muy especial a:

A la **M.C. MARIA HERNANDEZ GONZALEZ**, por los conocimientos aportados durante el trayecto de la carrera, por su amistad y sobre todo por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.

A la **M.C MILDRED INNA MARCELA FLORES VERASTEGUI**, por su apoyo incondicional, por sus ánimos al no dejar darnos por vencidos, por su paciencia, por la confianza depositada en mí y otros tesisas, y sobre todo por su amistad.

A la **M.C. FELIPA MORALES LUNA**, quien fue la que nos proporciono la materia prima para la realización de este trabajo de investigación, además de compartir sus conocimientos y amistad dentro y fuera del aula.

A todo el personal que integra al laboratorio de lácteos, al **M.C. OSCAR NOE REBOLLOSO PADILLA**, a la **T.L.Q. MARÍA DE JESÚS** que fue compañera de carrera y amiga, a **LAURITA**, y **BRENDA**, que juntos me apoyaron al proporcionarme parte del material necesario para la realización de este proyecto, además de estar siempre a disposición para lo que necesitara.

A mi compañera, novia y amiga **Yaradid Esmeralda López Cazares**, a su **hermano Abel López Cazares**, a **María del Carmen Escorcía Zavala**, por el apoyo incondicional y amistad.

A **amigos y compañeros de carrera**. Jesús Budar (Chuy), Humberto García, Mayra González, Dolores García, Belén Azucena, Brenda, Magali, Guísela, Teresa Castillo, Amira, María Concepción (Coni), Pedro Pascual, Bonifacio Antonio (Boni), Humberto García Ángel, Amalia Vásquez, Ventura Moreno (Turin), Leticia Pablo, Donaldo Juárez, Wendolyn (Jessy), Aglael Castro, Nayeli Robles, Montserrat Vargas, Antonio Mejía, Marbella Romero, Agustín, Ricardo.

DEDICATORIA

A **Dios**, por que me dio la oportunidad de terminar una etapa más de mi vida de manera satisfactoria.

A mis padres y hermanos:

A la **Sra. Soledad Xopo Cera y Sr. Enrique Balón Tenango**, por brindarme su apoyo incondicional, por sus consejos, por la ayuda económica que fue fundamental en la realización de mis estudios y sobre todo por darle vida a esa familia hermosa.

A la **Lic. Mayra Anayeli Balón Xopo, M.V.Z. Edgar Balón Xopo, Lic. Yuliana Balón Xopo**, los hermanos que siempre hemos estado unidos fuera lo que fuera, y los que siempre me han apoyado para seguir superándome como profesionista y como ser humano.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	iii
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCION	xii
CAPITULO 1 OBJETIVOS	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	1
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	1
1.3 HIPOTESIS.....	1
CAPITULO 2 REVISION DE LITERATURA.....	2
2.1 Trigo.....	2
2.1.1 Producción nacional de trigo.....	2
2.1.2 Clasificación de las variedades de trigo	2
2.1.3 Productos derivados de la molienda de trigo	3
2.1.4 Comercialización del trigo	3
2.1.5 Derivados del trigo	3
2.2 Aguas residuales.....	4
2.2.1 Aguas residuales de la industria alimentaria.....	5
2.2.2 Clasificación y composición de las aguas residuales de la industria	6
2.2.3 Composición de las aguas residuales de la industria alimentaria	6
2.2.4 Impacto de las aguas residuales al medio ambiente	7
2.3 El almidón	7
2.3.1 El almidón y sus características.....	7
2.3.2 Estructura de los gránulos de almidón.....	8
2.3.3 Estructura y composición de la amilosa.....	9
2.3.4 Estructura y composición de la amilopectina	10
2.3.5 Aplicaciones directas del almidón	10

2.3.6 Productos derivados almidón.....	11
2.3.7 Degradación del almidón	11
2.4 La biomasa.....	12
2.4.1 Biocombustibles.....	13
2.4.2 Ventajas del uso de la biomasa	13
2.4.3 Materia prima para biocombustible	14
2.4.4 Tipos de biocombustibles	14
2.4.4.1 Bioetanol.....	14
2.4.4.2 Biodiesel	15
2.4.4.3 Biocombustibles de segunda generación	15
2.4.5 Obtención del bioetanol: fermentación alcohólica.....	15
2.4.6 Usos del etanol	17
2.4.7 El etanol en México.....	18
2.4.7.1 El etanol como combustible	18
2.4.8 Producción mundial del bioetanol	18
2.4.9 Beneficios del uso de biocombustibles	19
2.4.9.1 Socioeconómicos.....	19
2.4.9.2 Medioambientales.....	20
2.5 <i>Zymomonas mobilis</i>	20
2.5.1 Antecedentes.....	20
2.5.2 Taxonomía	21
2.5.3 Morfología y características generales	21
2.5.4 Necesidades nutritivas	22
2.5.5 Catabolismo	22
2.5.5.1 Efecto del sustrato	23
2.5.5.2 Efecto de la temperatura	23
2.5.5.3 Efecto del etanol.....	24
2.5.5.4 Efecto del pH.....	24
2.5.5.5 Efecto del oxígeno	25
CAPITULO 3 MATERIALES Y METODOS	26
3.1 Desarrollo de la investigación	26

3.1.1 ETAPA 1: Mantenimiento de la cepa de <i>Zymomonas mobilis</i>	26
3.1.1.1 Proliferación del microorganismo.....	26
3.1.1.2 Identificación macroscópica.....	27
3.1.1.3 Identificación microscópica.....	27
3.1.1.4 Conservación de <i>Zymomonas mobilis</i>	27
3.1.2 ETAPA 2: Degradación del almidón mediante enzimas amilolíticas	27
3.1.2.1 Gelatinización	27
3.1.2.2 Licuefacción con α -amilasa	28
3.1.2.3 Sacarificación con glucoamilasa.....	28
3.1.3 ETAPA 3: Preparación de inóculo.....	28
3.1.3.1 Escala Mcfarland	29
3.1.4 ETAPA 4: Fermentación	29
3.1.4.1 Análisis de muestras.....	29
CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1 ETAPA 1: Identificación de la cepa de <i>Zymomonas mobilis</i>	31
4.1.1 Identificación macroscópica.....	31
4.1.2 Identificación microscópica	31
4.2 ETAPA 2: Degradación del almidón mediante enzimas amilolíticas	32
4.2.1 Gelatinización	32
4.2.2 Licuefacción con α -amilasa.....	33
4.2.3 Sacarificación con glucoamilasa	34
4.3 ETAPA 3: Preparación de inóculo.....	36
4.3.1 Escala Mcfarland	36
4.3.2 Determinación del medio de cultivo a utilizar	37
4.4 ETAPA 4: Fermentación.....	37
4.4.1 Determinación de las variables de control	37
4.4.1.1 pH.....	37
4.4.1.2 Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix)	39
4.4.2 Determinación de las variables de consumo	39
4.4.2.1 Monitoreo de azúcares reductores	39
4.4.2.2 Monitoreo de azúcares totales.....	40

4.4.3 Determinación de la variable de producción	40
4.4.3.1 Producción de bioetanol	41
4.4.3.2 Comportamiento de la producción de bioetanol con los dos medios de cultivo	42
CAPITULO 5 CONCLUSION	43
CAPITULO 6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
ANEXO 1	49
ANEXO 2	51
ANEXO 3	53
ANEXO 4	54

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Giros industriales con el mayor porcentaje nacional de extracción, consumo y descarga.	5
2	Demanda de agua de la industria alimentaria en México.	5
3	Composición de algunas materias primas y su porcentaje de almidón.	8
4	Algunas características de almidones usados en la industria alimentaria.	9
5	Enzima y su fuente de obtención.	12
6	Principales países productores de etanol en el año 2007.	19
7	Concentraciones de enzima utilizada y valor de V_o .	33
8	Concentraciones iniciales y finales de los parámetros en estudio con α -amilasa.	34
9	Concentración al final del proceso de sacarificación con la glucoamilasa.	35
10	Concentraciones finales de los parámetros en estudio después del esterilizado.	35
11	Absorbancia óptima para cada medio.	36
12	Determinación del medio más adecuado en relación a la absorbancia y al tiempo.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura química de la amilosa.	9
2	Estructura química de la amilopectina.	10
3	Principales fuentes de energía primaria y su demanda a nivel mundial.	13
4	Proceso de obtención de bioetanol a partir de diversas materias primas.	16
5	Principales usos del etanol a nivel mundial.	17
6	Vía de Entner-Doudoroff, utilizada por <i>Zymomonas mobilis</i> .	23
7	Colonias de <i>Zymomonas mobilis</i> en medio YPG.	31
8	<i>Zymomonas mobilis</i> observada al microscópio con el objetivo de 100x.	31
9	Almidón en proceso de enfriamiento.	32
10	Degradación de almidón utilizando una [3%] de α -amilasa.	33
11	Sacarificación con Glucoamilasa a [0,15%].	34
12	Producto sacarificado esterilizado.	36
13	Comportamiento del pH en el proceso fermentativo.	38
14	Medio de cultivo a las 48 horas de fermentación.	38
15	Comportamiento de ° Brix en el proceso fermentativo.	39
16	Comportamiento de Azúcares Reductores en el proceso fermentativo.	40
17	Comportamiento de Azúcares Totales en el proceso de fermentativo.	40

18	Cuantificación de bioetanol producido por <i>Zymomonas mobilis</i> en el proceso de fermentación.	41
19	Comportamiento en la producción de bioetanol en el medio con jarabe glucosado a partir de almidón y medio con glucosa.	42

RESUMEN

La producción de bioetanol por vía fermentativa se lleva a cabo principalmente por las levaduras, sin embargo, existen otros microorganismos con la capacidad de fermentar como en el caso de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

En el presente trabajo se llevó a cabo la degradación del agua almidonosa presente en los efluentes agroindustriales por vía enzimática iniciando con la gelatinización del almidón a una temperatura media de 61°C por 10 minutos, seguida de la aplicación de α -amilasa 3% (v/v) por 4 horas y glucoamilasa 0,15% (v/v) durante 75 minutos y su posterior fermentación con la bacteria *Zymomonas mobilis*.

La fermentación se realizó en dos matraces de 250 ml con 200 ml de medio cada uno, adicionados con el 2% (v/v) del microorganismo proliferado previamente en medio YPG por 5 horas 15 minutos. Los matraces fueron incubados a 30°C por 96 horas, sin agitación. En éste estudio se obtuvo una concentración del 0,82% de bioetanol a partir de 23 g/L de azúcares reductores en un tiempo de 36 horas superior a lo obtenido por Monsalve *et al.*, (2006) con una producción menor al 0,01%.

Palabras clave: bioetanol, fermentación, *Zymomonas mobilis*, almidón, α -amilasa, glucoamilasa.

INTRODUCCION

Debido a la preocupación de muchos países por la disminución en el uso de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), que son claves para el desarrollo en la vida de la sociedad, en años recientes se han orientado esfuerzos y políticas para desarrollar y explorar alternativas para la generación de energía.

Una fuente potencial de energía es la biomasa, que supone la obtención de combustibles desde fuentes vivas, por ejemplo plantas y microorganismos. Un ejemplo claro es el bioetanol que se obtiene por la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales (cereales, caña de azúcar, remolacha, maíz, **trigo**, sorgo dulce, cebada). El proceso de fermentación es llevado a cabo por ciertos microorganismos como levaduras (*Saccharomyces*) o bacterias (*Zymomonas mobilis*).

Otra fuente para su obtención es a partir de residuos forestales: como el aserrín, árboles comerciales imperfectos o árboles que estén en mal estado de salud.

Este tipo de energía renovable tiene ventajas sobre las no renovables de ser más limpia y más rentable a largo plazo. Una de sus desventajas es que se necesitan grandes cantidades de materia prima para producir el biocombustible.

Entre los principales países con mayor producción de etanol, encontramos a Estados Unidos (obtiene etanol a partir del maíz), Brasil (obtiene etanol a partir de la caña de azúcar al igual que Colombia), que juntos producen aproximadamente el 70% del total de etanol, seguidos por la Unión Europea, China y Canadá, entre otros.

Las tendencias globales en la demanda de biocombustibles seguirá creciendo y México tiene las condiciones y recursos naturales para la producción de insumos que a su vez se utilizarían en la obtención de etanol.

El presente estudio propone el uso de los efluentes agroindustriales ricos en aguas almidonosas como materia prima para la obtención de bioetanol, dando una alternativa para el tratamiento de estos desechos que causan un daño irreparable al medio ambiente.

CAPITULO 1

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aprovechar los efluentes agroindustriales ricos en aguas almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de *Zymomonas mobilis*.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Mantenimiento de la cepa de *Zymomonas mobilis*.
- Obtener aguas almidonosas de efluentes agroindustriales.
- Determinar las condiciones óptimas para la degradación del almidón a moléculas más simples.
- Establecer las condiciones óptimas de fermentación.
- Cuantificar la producción de bioetanol resultante del proceso fermentativo.

1.3 HIPOTESIS

Es posible obtener bioetanol a partir de aguas almidonosas provenientes de los efluentes agroindustriales derivados del procesamiento del trigo.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA

2.1 Trigo

El trigo es la tercera fuente de nutrientes en la dieta del mexicano, sobre todo para las poblaciones rurales y urbanas de escasos recursos. La importancia del trigo en la dieta de los seres humanos reside principalmente en su valor energético, además de contener más proteínas que el maíz y el arroz (FAO, 2005).

A nivel mundial el trigo tiene una distribución muy amplia y ocupa el segundo lugar entre los principales cultivos en los países en desarrollo, se siembra en más de 200 millones de hectáreas (CIMMYT, 2009).

2.1.1 Producción nacional de trigo

El trigo se cultiva en más de 20 estados de nuestro país, el 80% se concentra en la zona norte (principalmente en el noroeste) y en Guanajuato en el ciclo otoño-invierno, bajo condiciones de riego; el resto se genera en su mayoría, en regiones del centro y el altiplano central en el ciclo primavera-verano en condiciones de temporal. Los rendimientos promedios del ciclo otoño-invierno son de 5.3 toneladas por hectárea, el de primavera-verano es de 2 toneladas por hectárea (Peña *et al.*, 2008).

2.1.2 Clasificación de las variedades de trigo

En México las variedades de trigo se clasifican según la especie botánica a la que pertenecen, la dureza o textura de su grano y sus características de calidad de proteína o tipo de gluten.

En nuestro país el trigo que se cultiva en mayor proporción es el harinero-suave o blando (*Triticum aestivum L.*), seguido del trigo cristalino o durum también llamada harina gruesa (*Triticum durum L.*) y en menor proporción se siembra el harinero-duro (*Triticum aestivum L.*) (Peña *et al.*, 2008).

2.1.3 Productos derivados de la molienda de trigo

La industria molinera genera dos tipos de producto: de tipo A o harinas, con tres grados de calidad (común o estándar, fina y extrafina), los cuales constituyen la base para la elaboración de panes, tortillas, galletas, pasteles; y de tipo B o sémolas (exclusivamente del grupo 5), para elaborar pastas y macarrones (Peña *et al.*, 2007).

2.1.4 Comercialización del trigo

Dado que la cantidad y tipos de trigo que se producen a nivel nacional no concuerdan con la cantidad y calidad que exige la industria; en México se importa de Canadá y Estados Unidos trigo harinero y se exporta trigo cristalino. La razón es porque la producción de trigo harinero-duro (panificable) es inferior a la demanda de la industria local, mientras que la del trigo cristalino excede en más del 50% las necesidades de la industria de pastas alimenticias (Peña *et al.*, 2008).

2.1.5 Derivados del trigo

Además de los tipos de harina, el trigo tiene otros derivados de importancia, entre los que se encuentran:

Salvado. Es importante por su contenido en fibra, utilizado principalmente para los problemas de estreñimiento, y actualmente se está consumiendo en mayor cantidad adicionado en algún líquido (leche, sopas, etc.).

Germen de trigo. Es la parte más nutritiva, es rico en proteínas, ácidos grasos esenciales (linoléico y alfa-linolénico), vitaminas (B₁, B₂, B₆, niacina y folatos), minerales (fósforo, magnesio, hierro, etc.). Puede ser consumido sin cocción adicionado a zumos, bebidas, yogur, sopas, verduras y ensaladas (Mataix y Carazo, 2005).

Gluten. Es una masa de color crema muy claro, insípida y sin olor y es el resultado de mezclar agua con las proteínas del grano de trigo.

El gluten esta conformado básicamente por dos proteínas:

Gliadina. Le proporciona pegajosidad y al mismo tiempo es la responsable de su extensibilidad, es decir, es capaz de extenderse sin llegar a romperse.

Glutenina. Aporta elasticidad a la masa, de modo que cuando se estira tiende a recuperar su forma original.

La presencia del gluten es necesaria para que la harina, una vez adicionada de agua, forme una masa viscosa muy cohesiva y fácil de amasar. El mayor o menor contenido en gluten presente en una harina es básicamente lo que se denomina fuerza de la harina (Mataix y Carazo, 2005).

2.2 Aguas residuales

El agua juega un papel muy importante dentro de la industria agroalimentaria, ya que es utilizada con varios fines: para el transporte, como materia prima, como vehículo térmico, así como, en la limpieza de la maquinaria industrial. Para todo ello se emplean grandes volúmenes de agua, cuya naturaleza suele ser fuertemente contaminante una vez utilizada (Seoáñez, et al., 2002).

De acuerdo a las estadísticas, en el 2007 se generaron aproximadamente 5,98 Km³/año (188,7 m³/s) de aguas residuales de uso no municipal incluyendo la industria de las cuales se tratan 0,94 Km³/año (29,9 m³/s) (SEMARNAT, CONAGUA., 2008).

En México, las aguas residuales de la industria son de varios tipos y características (Bautista, 1999); En el cuadro 1 se muestran los giros industriales con el mayor porcentaje nacional de extracción, consumo y descarga.

Cuadro 1. Giros industriales con el mayor porcentaje nacional de extracción, consumo y descarga.

Industria	Extracción	Consumo	Descarga
Azucarera	35,2	22,3	38,8
Química	21,7	24,4	21,0
Papel y celulosa	8,2	16,1	6,0
Petróleo	7,2	3,7	8,2
Bebidas	3,3	6,4	2,4
Textil	2,6	2,4	2,7
Siderúrgica	2,5	5,5	1,7
Eléctrica	1,5	4,7	0,7
Alimentos	0,2	0,3	0,2

Fuente: Estadísticas de Medio Ambiente (INEGI, 1994).

2.2.1 Aguas residuales de la industria alimentaria

De acuerdo con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), la industria alimentaria requiere un abastecimiento anual de 214 millones de metros cúbicos de agua de la cual descarga aproximadamente 180 millones de metros cúbicos de aguas residuales generando anualmente 200 mil toneladas de DBO₅ (demanda bioquímica de oxígeno a cinco días), 151 mil toneladas de sólidos suspendidos totales y 26 mil toneladas de grasas y aceites (IMTA, 2009). En el cuadro 2 se muestra de la demanda de agua por la industria alimentaria en México.

Cuadro 2. Demanda de agua de la industria alimentaria en México.

Tipo de industria alimentaria	Abastecimiento (m³/ día)	Recirculación (m³/ día)	Descarga (m³/ día)
P. cárnicos	87	25	81
P. Lácteos	776	621	718
Conservas Al.	3,233	2,265	2,861
Molienda de cer.	439	373	410
Panadería ind.	215	328	143
Aceites y Grasas	546	1,108	463
Confitería y choc.	278	308	220

Fuente: Comisión Nacional del Agua: IMTA, 2001

2.2.2 Clasificación y composición de las aguas residuales de la industria

En general las aguas residuales se clasifican en dos tipos, de acuerdo a su composición:

Agua con productos minerales y orgánicos. Estas son generadas por industrias de la celulosa y del papel, las textiles, de la piel, etc., cuyos principales agentes contaminantes son: detergentes, sales, colorantes, grasas, aceites, minerales, etc. (Seoáñez, 2004).

Agua con productos orgánicos. Son las producidas en explotaciones y en industrias con pocos procesos químicos, como las siguientes:

Explotaciones agropecuarias:

Explotaciones agrícolas, forestales y ganaderas.

Industrias agroalimentarias:

1. Plantas lecheras.
2. Fabrica de derivados de la leche.
3. Destilería de alcoholes.
4. Industria cervecera.
5. Azucareras.
6. Industrias del almidón.
7. Industrias de las féculas.
8. Fabrica de conservas.

2.2.3 Composición de las aguas residuales de la industria alimentaria

Las características principales de la carga contaminante son: alto contenido de materia orgánica, en especial fermentados, azúcares, féculas y carbohidratos, estos como materiales de desperdicio originados del producto en bruto o en procesos. Por otra parte, también se originan altos contenidos de materiales sólidos no disueltos, tales como huesos, cáscaras y hojas (IMTA, 2009).

2.2.4 Impacto de las aguas residuales al medio ambiente

Las aguas residuales tienen efectos negativos hacia el medio ambiente entre los que destacan:

Malos olores y sabores a causa de la descomposición por falta de oxígeno, de las sustancias presentes con desprendimiento de gases.

Determinados y diferentes grados de toxicidad con efectos sobre las especies vegetales y animales y sobre los posibles consumidores.

Procesos infecciosos provocados por la presencia de microorganismos, como bacterias, virus y otros.

Eutrofización de las masas de agua receptoras, a causa de los niveles de concentración de determinados compuestos como los nitratos y los fosfatos, que estimulan el crecimiento de la vegetación (Bautista, 2003).

Contaminación por compuestos de origen químico inorgánico. Entre ellas esta la acidez que comunican los efluentes; la alcalinidad es un factor de contaminación y es provocada por la existencia de carbonatos y bicarbonatos.

Contaminación por productos químicos orgánicos. Destacan los aceites y grasas que producen asfixia y la muerte de la flora y fauna de los cursos de agua.

Aguas residuales con alta D.B.O (demanda biológica de oxígeno), son muy contaminantes por que la materia orgánica oxidable consume el O₂ de las aguas e impide la vida de los peces y otros seres vivos que necesitan oxígeno (Primo, 1995).

2.3 El almidón

2.3.1 El almidón y sus características

El almidón es el carbohidrato de reserva de las plantas superiores y constituye una fuente de energía esencial para muchos organismos, especialmente el hombre.

Se encuentra en los granos de cereales y legumbres, así como en tubérculos, raíces y bulbos (Bello Gutiérrez, 2000).

Se extrae principalmente de cereales como el trigo, maíz o arroz y de tubérculos como la papa (Brown et al. 2004). En el cuadro 3 se especifica la composición de algunas materias primas y su porcentaje de almidón observándose que el trigo es el segundo que tiene mayor cantidad de almidón.

Cuadro 3. Composición de algunas materias primas y su porcentaje de almidón.

Componente	Papa (%)	Maíz (%)	Trigo (%)	Arroz (%)
Almidón	16,0-30,0	55,0-70,0	63,0-65,0	79,0-82,0
Proteínas	0,5-2,0	8,0-10,0	8,0-14,0	7,0-9,0
Grasas	0,1-0,2	4,0-5,0	1,5-2,5	0,4-1,0
Fibra	0,5-0,8	2,0-3,0	0,5-2,5	0,9-1,5
Azúcares	0,2-0,4	2,0-3,0	1,8-2,5	0,0
Cenizas	1,0-1,5	1,0-2,0	0,4-0,8	0,5-1,0
Agua	60,0-80,0	15,0-18,0	13,0-16,0	12,0-15,0

Fuente: Vian Ortuño, 1996.

2.3.2 Estructura de los gránulos de almidón

En la planta se encuentra en forma de gránulos, con zonas concéntricas y alternativamente claras y oscuras; aunque sus estructuras, formas y tamaños varían de acuerdo con la especie vegetal que lo sintetiza. Cuando los gránulos están intactos son insolubles en agua fría.

Su peso molecular elevado, con una estructura bastante compleja, de la que se ha podido conocer que en su formación intervienen, a niveles diferentes, dos polímeros distintos: una fracción soluble en agua, llamada amilosa con el 20% y una insoluble la amilopectina con el 80% (Bello Gutiérrez, 2000; Morrison y Boyd, 1998). En el cuadro 4 se especifican algunas características de almidones usados en la industria alimentaria.

Cuadro 4. Algunas características de almidones usados en la industria alimentaria.

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

Fuente: Badui, 1993

Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades sensoriales y reológicas de los alimentos, principalmente mediante su capacidad de hidratación y gelatinización.

2.3.3 Estructura y composición de la amilosa

La amilosa es una macromolécula lineal, integrada por numerosas moléculas de glucosa, unidas por enlaces α -(1,4), establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades, su tamaño molecular es muy variable: oscila entre 150 000 y 750 000 Daltons. Esto se debe al diferente grado de polimerización (n), según su origen. Para el caso de los cereales el grado de polimerización (n) vale entre 1000 y 2000 (Bello Gutiérrez, 2000; Vian Ortuño, 1996). En la figura 1 se muestra la estructura química de la amilosa.

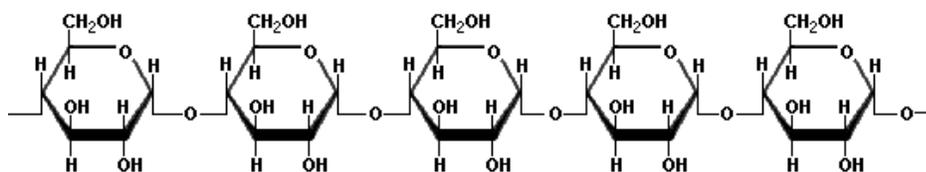


Figura 1. Estructura química de la amilosa.

Debido a su estructura lineal, suele tener una tendencia a gelificar en caliente y precipitar cuando se enfría como consecuencia del fenómeno de retrogradación.

2.3.4 Estructura y composición de la amilopectina

La amilopectina es un polímero ramificado, formado por unidades de glucosa, enlazadas por uniones α -(1,4), pero con numerosas ramificaciones, posiblemente al azar, a través de enlaces α -(1,6). Su peso molecular es muy alto, ya que algunas fracciones pueden llegar a alcanzar hasta 200 millones de Daltons. En la figura 2 se muestra la estructura química de la amilopectina.

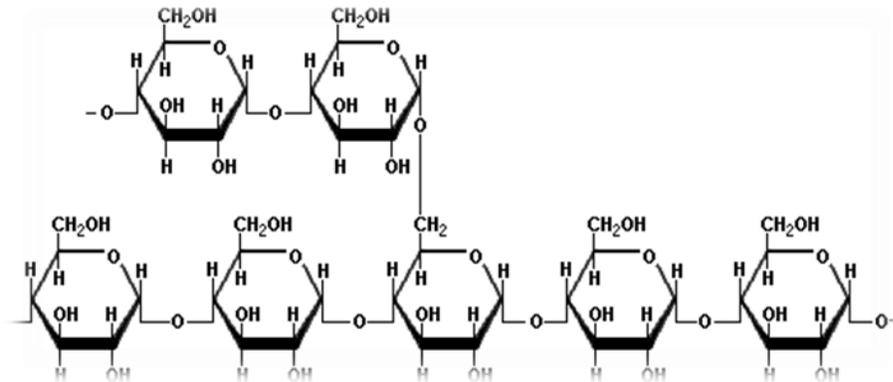


Figura 2. Estructura química de la amilopectina.

Por su estructura ramificada, da soluciones transparentes muy viscosas, pero no es capaz de formar redes moleculares, propias de los geles.

2.3.5 Aplicaciones directas del almidón

Uso como espesante en la preparación de sopas, salsas y dulces.

Uso como estabilizador en la preparación de helados, al igual que en alimentos para niños.

La amilosa se emplea para el recubrimiento de frutas y productos glaseados con el fin de evitar la adherencia y riesgos de oxidación (Vian Ortuño, 1996).

La amilopectina suele aplicarse como agente espesante, estabilizante y de adhesión (Bello Gutiérrez, 2000).

2.3.6 Productos derivados almidón

A partir de este hidrato de carbono se obtienen distintos derivados como las dextrinas, empleadas como agentes espesantes y estabilizadores de un gran número de alimentos, así como adhesivos y aglutinantes en sustitución de las gomas naturales.

Almidones modificados pueden ser utilizados como agentes estabilizadores, emulsionantes, humectantes, espesantes, etc. (Badui, 1993).

La glucosa utilizada en bebidas, la se obtiene por la hidrólisis completa del almidón con ácidos o con enzimas amilolíticas, el jarabe producido se purifica y se decolora por centrifugación, filtración y por la acción de carbono activado, se concentra.

2.3.7 Degradación del almidón

El proceso de degradación del almidón se realiza con enzimas como la α -amilasa y amiloglucosidasa, que facilitan la licuefacción y sacarificación del almidón, reduciéndolo a azúcares fermentables como la glucosa (Castillo, et al., 2005).

De manera específica la α -amilasa hidroliza al azar los enlaces α - (1,4) del almidón gelatinizado, provocando una drástica disminución de la viscosidad (licuefacción), es inactiva para los enlaces α -(1,6) de la amilopectina; por esta razón se obtienen una gama de productos: alfa dextrinas, maltosa, glucosa y oligosacaridos provenientes tanto de la amilopectina como de la amilosa (García, et al., 2004).

La amiloglucosidasa o glucoamilasa, libera glucosa a partir del extremo no reductor de la amilosa y amilopectina. Tiene la capacidad de hidrolizar igualmente los enlaces α -(1,6) de la amilopectina (García, et al., 2004).

Sin embargo, no es posible alcanzar el 100% de conversión de almidón a glucosa debido a que en la preparación de la enzima se encuentra generalmente contaminada con enzimas transglucosidasas, que emplean a la glucosa para producir maltosa y otros oligosacaridos (García, et al., 2004).

Estas enzimas pueden ser obtenidas de diferentes fuentes: como hongos y bacterias; algunos ejemplos se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Enzima y su fuente de obtención.

ENZIMA	ORIGEN
α-amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. Cereus</i> .
glucoamilasa	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> .

Fuente: Badui, 1993; García, et al., 2004

La aplicación de enzimas en la producción de edulcorantes a partir de almidones tiene potencial de hacer el procesamiento de alimentos menos dependiente del azúcar de caña en áreas en donde es muy poco probable la producción del azúcar o en donde los almidones son más accesibles y baratos que los azúcares (Mundo alimentario, 2007).

2.4 La biomasa

Este término se refiere a toda la materia orgánica que proviene de árboles, plantas y desechos de animales que pueden ser convertidos en energía o las provenientes de la agricultura (residuos de maíz, café, arroz, etc.), del aserradero (podas, ramas, aserrín, cortezas), de los residuos urbanos (aguas negras, basura orgánica) y de la industria alimentaria (BUN-CA, 2002).

La biomasa ha sido la fuente de energía más utilizada por el hombre durante casi toda su historia. Su uso inicio hace miles de años. Primero para calentarse y cocinar sus alimentos y luego a medida que se volvió más sofisticado, en todas las actividades artesanales e industriales (Mosquera, Merino, 2006).

2.4.1 Biocombustibles

Son productos de origen biológico utilizados como combustibles, presentan características físico-químicas similares a las de los combustibles convencionales de origen fósil (Mosquera, Merino, 2006).

Son combustibles generados a partir de biomasa, definida con un concepto energético, es la materia de origen biológico que en éste caso es susceptible de ser utilizada en usos energéticos (Dufey, 2006; Seoáñez, 2002).

Esta fuente de energía renovable representa aproximadamente el 10% del suministro de energía primaria a nivel mundial; no obstante en algunos países en desarrollo, la biomasa proporciona hasta un 90% del consumo total de energía (FAO, 2008). La figura 3 muestra las principales fuentes de energía primaria y su demanda a nivel mundial.

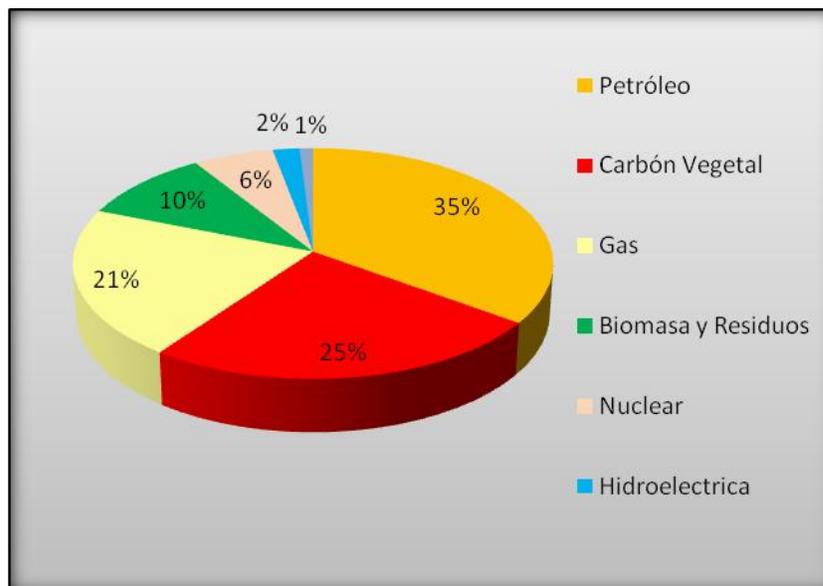


Figura 3. Principales fuentes de energía primaria y su demanda a nivel mundial.
Fuente: AIE, 2007.

2.4.2 Ventajas del uso de la biomasa

Es una fuente de energía inagotable y su uso no contribuye al calentamiento global, ya que produce una reducción de los niveles de dióxido de carbono.

A partir de ella se pueden obtener gran diversidad de productos ya sean sólidos, líquidos o gaseosos los cuales pueden ser aplicados para cubrir cualquier necesidad energética: de confort, transporte, cocinado, electricidad, etc., también pueden servir como materia prima para la industria.

Los biocombustibles de biomasa tienen un contenido insignificante de sulfuro, por lo tanto no contribuyen a la formación de lluvia ácida; causante de la muerte de los cultivos y contaminación del agua.

2.4.3 Materia prima para biocombustible

Dentro del término biomasa se incluye un conjunto de materias primas como las plantas de los cultivos energéticos o cultivos destinados a obtener vegetales que serán transformados en energía y prácticamente la mayoría de los residuos sólidos orgánicos de origen agrario o doméstico, incluso los residuos forestales y los de la industria agroalimentaria (Seoáñez, 2002).

De acuerdo al Departamento de Energía de los Estados Unidos, la utilización de residuos es una de las materias primas para biocombustibles con mejores posibilidades de uso a corto plazo, ya que son un subproducto de la producción de cultivos, granos, frutas, etc., que es actualmente abundante, subutilizado y de bajo costo (DOE, 2003).

2.4.4 Tipos de biocombustibles

Los biocombustibles se pueden clasificar según la fuente y el tipo. Se derivan de productos forestales, agrícolas y pesqueros o desechos municipales, así como de subproductos y desechos de la agroindustria. Pueden ser sólidos como la leña, el carbón vegetal y de gránulos de madera; líquidos como el etanol y el biodiesel o gaseosos como el biogás (FAO, 2008).

2.4.4.1 Bioetanol

Es un destilado líquido producido por la fermentación de los azúcares de las plantas y de cereales (caña de azúcar, maíz, remolacha, yuca, trigo, sorgo) o de productos forestales (Dufey, 2006).

2.4.4.2 Biodiesel

Es producido a partir de oleaginosas como girasol y soya o de árboles como la palma, el cocotero, la colza, el aguacate y también reciclando aceites procedentes de frituras (Dufey, 2006).

2.4.4.3 Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles líquidos producidos actualmente a partir de cultivos de azúcar o almidón (en el caso del etanol) y cultivos de semillas oleaginosas (en el caso del biodiesel) generalmente se denominan biocombustibles de primera generación, una segunda generación de tecnologías en fase de desarrollo podría permitir utilizar, además, biomasa lignocelulósica. La biomasa lignocelulósica es más resistente a la trituración que el almidón, el azúcar y los aceites; además el costo de materia prima celulósica es inferior al de las materias primas actuales.

Las posibles fuentes de materia prima serían los productos de desecho de la agricultura (paja, hojas), los desechos de procesos de elaboración como cáscaras de nuez, bagazo de caña de azúcar y aserrín (FAO, 2008).

2.4.5 Obtención del bioetanol: fermentación alcohólica

Este proceso se lleva cabo por la fermentación de diversas materias primas hasta su degradación a alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Los principales responsables de ésta transformación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura usada con mayor frecuencia. Así mismo, existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima (Vásquez, et al., 2007). En la figura 4 se muestra el proceso de obtención de bioetanol a partir de diversas materias primas.

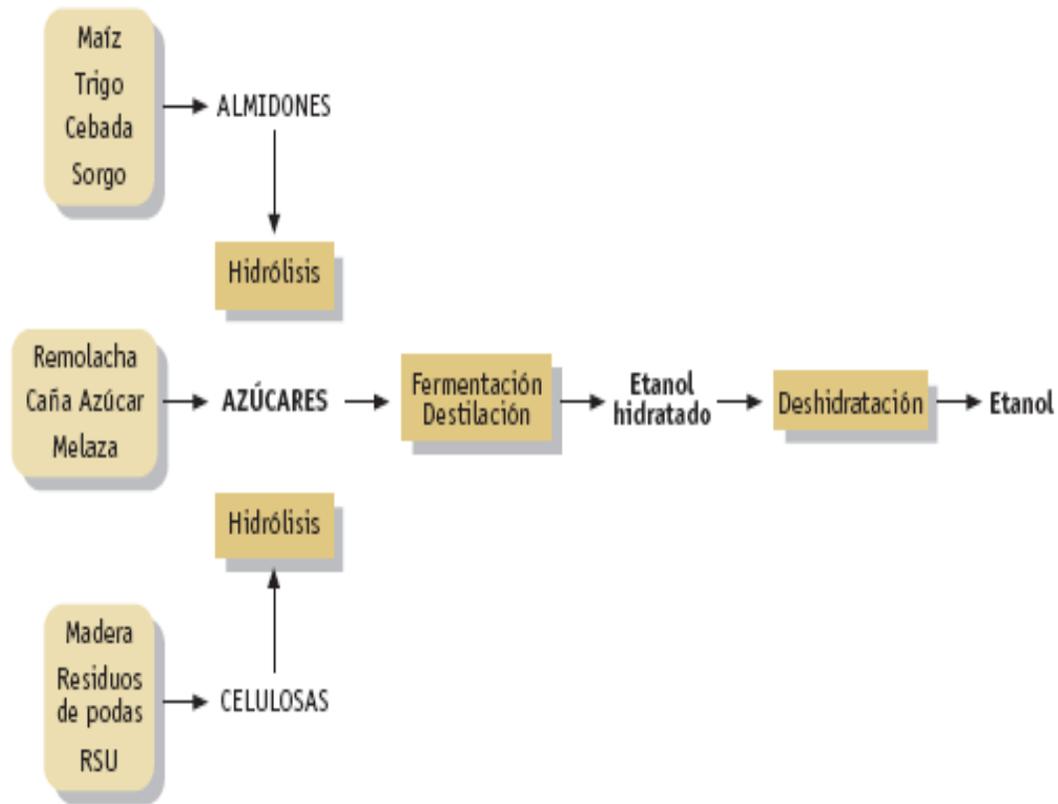


Figura 4. Proceso de obtención de bioetanol a partir de diversas materias primas.
Fuente: www.miliarium.com/.../Bioetanol/Bioetanol.asp

En Estados Unidos y algunos países europeos la fuente principal de obtención de etanol son los cereales y la remolacha, mientras que en los países de clima tropical se utiliza la caña de azúcar (Mosquera, Merino, 2006).

Considerando la tecnología a nivel mundial y las propiedades físico-químicas de los diferentes cultivos, los rendimientos industriales de etanol muestran que la caña de azúcar obtiene la mayor productividad, con 4 mil 880 litros de etanol por hectárea. Le sigue la remolacha azucarera con 4 mil 386 litros por hectárea; el maíz con 3 mil 980 litros por hectárea; la yuca con 2 mil 380 litros de etanol por hectárea y el sorgo dulce con mil 400 litros de etanol por hectárea (Becerra, 2009).

2.4.6 Usos del etanol

En la figura 5 se muestran los principales usos del etanol a nivel mundial.

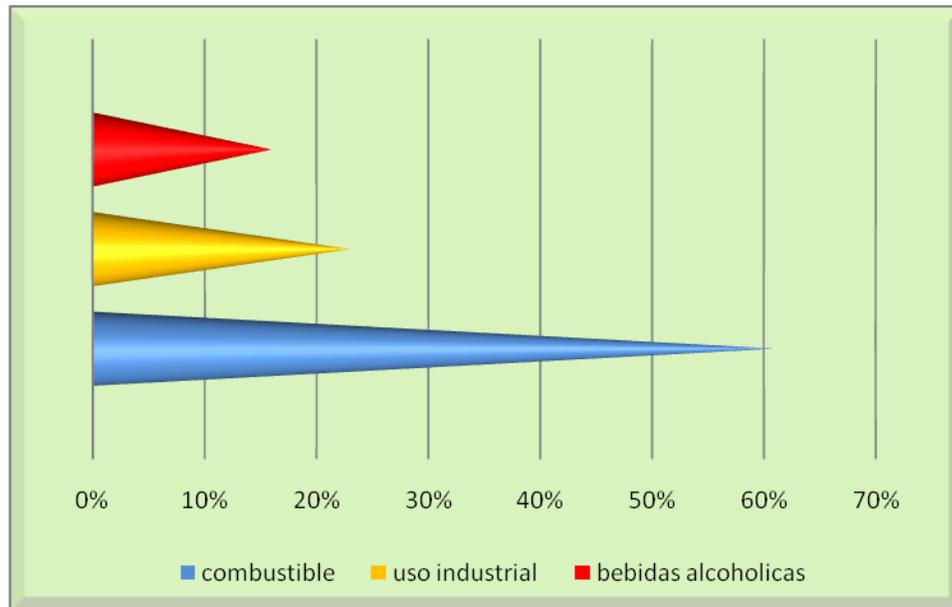


Figura 5. Principales usos del etanol a nivel mundial.

Fuente: IICA, 2004.

Se emplea en la síntesis del ETBE (5-etil-ter-butil-éter), aditivo de las gasolinas que incrementa el número de octanos y por lo tanto disminuye su consumo. El ETBE tiene varias ventajas: menor volatilidad, mejor eficiencia térmica y menor poder de corrosión (Mosquera, Merino, 2006).

El bioetanol podría sustituir el metil ter-butil éter (MTBE), aditivo de las gasolinas en México desde 1989. El MTBE es un compuesto muy estable, de baja degradación y muy soluble en agua y ha resultado ser un contaminante de aguas subterráneas (Nava, 2006). En algunas regiones, su uso ha disminuido por los riesgos que este puede presentar para la salud, ya que ha sido clasificado como potencialmente cancerígeno (Lemire, 2004; EPA, 2007).

El bioetanol ha sido utilizado en la industria (cosmética, farmacéutica y química, entre otras) y por último, su uso en la industria de bebidas (IICA, 2004), se utiliza en vinos, aguardiente, vodka, ron, brandy, etc.

2.4.7 El etanol en México

En México, desde hace varios años, se produce etanol de caña de azúcar en los diferentes ingenios del país que cuentan con destilerías, solo que su uso es para bebidas embriagantes e industrial, no para uso como combustible. Para el año 2004 la producción total aproximada de etanol en México fue de 35 millones de litros (Becerra, 2009).

2.4.7.1 El etanol como combustible

El etanol como carburante es una actividad nueva en México y de acuerdo con el Director General de Pemex, Jesús Reyes Heróles, se iniciara con una planta piloto en el 2009 en la Ciudad de Guadalajara; proyectando para el 2011 y 2012 oxigenar con etanol toda la gasolina que se consume en las tres principales zonas metropolitanas del país (Monterrey, México y Guadalajara) pero “producido principalmente de caña de azúcar”. Estimó que el requerimiento de Pemex para el año 2012, será de 15 mil barriles diarios de etanol para oxigenar el total de la gasolina al 2% en peso (Becerra, 2009).

2.4.8 Producción mundial del bioetanol

Actualmente, cerca del 85% de la producción mundial de biocombustibles líquidos esta representada por el etanol (FAO, 2008).

La producción del etanol derivado de plantas feculentas y azucareras, tales como la caña de azúcar y algunos cereales aumento un 53% desde 30 mil millones de litros en el 2000 hasta alrededor de 46 mil millones de litros en el 2005.

Se prevee que para el 2010 el consumo mundial del etanol alcance los 54 mil millones de litros (FAO, 2006).

De acuerdo con los datos del Annual Energy Outlook 2006 de la agencia de la información de la energía, el precio del etanol es de US\$ 1,17 por litro para el 2006.

El interés creciente que suscita el etanol obedece no solo a las preocupaciones por los altos precios del petróleo, sino también a otros motivos importantes entre los cuales cabe mencionar los siguientes:

- La necesidad de diversificar las fuentes de energía.
- El deseo de muchos países de reducir el gas de efecto invernadero.
- La necesidad de estabilizar los precios de los productos básicos.

El cuadro 6 muestra los principales países productores de etanol en el año 2007.

Cuadro 6. Principales países productores de etanol en el año 2007.

Producción Mundial de Etanol	
País	Millones de Galones
USA	6498,6
Brasil	5019,2
Unión Europea	570,3
China	486,0
Canadá	211,3
Tailandia	79,2
Colombia	74,9
India	52,8
América Central	39,6
Australia	26,4

Fuente: RFA, F.O. Licht, 2007

2.4.9 Beneficios del uso de biocombustibles

2.4.9.1 Socioeconómicos

Permiten la continuidad de la actividad del sector agrícola evitando el abandono de superficies productivas, ampliando así el desarrollo rural.

Podría facilitar el acceso de la energía en las zonas rurales, estimulando así aun más el crecimiento económico.

Ayudan a mantener la actividad de los sectores industriales relacionados directamente con la producción agrícola, tales como la industria de fertilizantes, maquinaria agrícola o producción de semillas con la creación de puestos de trabajo (Mosquera, Merino, 2006).

2.4.9.2 Medioambientales

Reducen el incremento neto de dióxido de carbono en la atmosfera y por consiguiente, ayudan a la reducción del incremento del efecto invernadero.

Reducen las emisiones de compuestos tóxicos tales como el plomo en algunas gasolinas o de los derivados del azufre (Mosquera, Merino, 2006).

2.5 *Zymomonas mobilis*

2.5.1 Antecedentes

Fue aislada como contaminante durante la producción de sidra en 1912, su eficiencia para la producción de alcohol fue conocida desde 1913 gracias a los estudios de Kluver y Hoppenbrouwers.

En 1934, Screder y sus colaboradores demostraron que cuando *Z. mobilis* era cultivada en presencia de glucosa, el 98% del sustrato era transformado en etanol y en CO₂. A principios de los años 50 Gibbs y DeMoss demostraron que la bacteria metabolizaba su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff.

No fue sino hasta los años 60 que la bacteria fue utilizada a nivel industrial para la producción de pulque, bebida alcohólica de origen Mexicano.

En 1965 se reportó por primera vez la velocidad de crecimiento de *Z. mobilis* y se demostró el efecto de la composición del medio de cultivo sobre: la producción de biomasa, el tiempo de generación y la producción de etanol a partir de glucosa.

Debido a la gran dispersión y en algunos casos, a la ambigüedad de resultados presentados, Swings y De Ley se dedicaron al estudio taxonómico y fenotípico de más de 40 cepas de *Z. mobilis* aisladas en diferentes países.

Aunque su estudio fue dedicado a los aspectos biológicos de la bacteria, ellos llegaron a la conclusión de que *Zymomonas* presentaba un gran potencial económico, lo cual fue comprobado dos años más tarde por el grupo australiano de Rogers que demostraron que en comparación con las levaduras tradicionalmente utilizadas para la producción de etanol, *Zymomonas mobilis* presenta rendimientos y velocidades de producción superiores (García, et al., 2004).

2.5.2 Taxonomía

Debido a su morfología y al hecho de metabolizar su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff, la bacteria ha sido clasificada dentro de la familia *Pseudomonadaceae*.

Utilizando criterios taxonómicos relacionados con más de cuarenta cepas, Swings y De Ley propusieron una nueva clasificación que reagrupa a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*. La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie *mobilis*.

2.5.3 Morfología y características generales

Bacilo Gram (-), de 2-6 μm de largo y 1,0-1,4 μm de ancho, usualmente es inmóvil, pero puede ser móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos polares, generalmente se encuentran en pares, sin embargo, también puede ser encontrada en un arreglo celular pleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos), presenta ausencia de esporas, es anaerobio facultativo, algunas cepas son anaerobias obligatorias (Bergey, 2005).

Fermenta 1 mol de glucosa o fructosa en casi 2 mol de etanol, 2 mol de CO_2 y un poco de ácidos orgánicos como el ácido láctico.

Algunas cepas también pueden utilizar sacarosa pero otras fuentes de carbono no se utilizan. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C, siendo las colonias brillantes, regularmente con borde blanco o color crema de 1-2 mm en diámetro después de 2 días y produce un olor a frutas.

Es un agente de la fermentación de la savia de agave, savia de palma y zumo de la caña de azúcar (Bergey, 1994). *Zymomonas* tolera 5% de etanol y es ácido tolerante, crece a pH de 3,5-7,5.

2.5.4 Necesidades nutritivas

Es una bacteria quimioorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio y en algunos casos por la biotina. El nitrógeno necesario para el crecimiento puede proporcionársele por medio de la peptona, extracto de levadura y caldo nutritivo.

Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azúfre, magnesio y potasio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc.) necesarios para el metabolismo de la bacteria se encuentran en forma de trazas en las sales utilizadas para la preparación del medio de cultivo. Las cepas más exigentes requieren de compuestos adicionales como de vitamina B₂, ácido lipóico, riboflavina, y ácido fólico (Van pee et al., 1974).

2.5.5 Catabolismo

Zymomonas es una bacteria que fermenta la glucosa por la vía de Entner-Doudoroff (Conway, 1992). En la figura 6 se muestra la vía de Entner-Doudoroff, utilizada por *Zymomonas mobilis*.

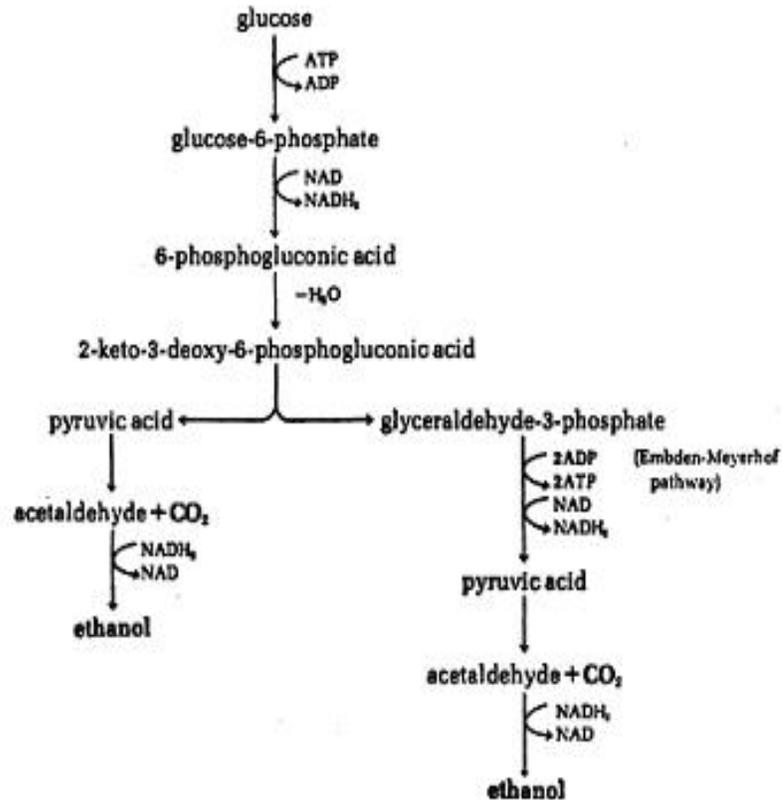


Figura 6. Vía de Entner-Doudoroff, utilizada por *Zymomonas mobilis*.
 Fuente: www.textbookofbacteriology.net/metabolism_3.html

2.5.5.1 Efecto del sustrato

Algunas cepas de *Z. mobilis* pueden crecer en medios con concentraciones muy elevadas de azúcares. De las estudiadas por Swings y De Ley, veintidos crecieron en medios con 400 g/l de glucosa. Todas las cepas crecieron en presencia de 200 g/l de glucosa. Recientemente se reportó la producción de 85 g/l de etanol a partir de 460 g/l de sacarosa fue reportada. El aumento en la concentración inicial de azúcares tiene un efecto más importante sobre los parámetros relacionados con el crecimiento que sobre aquellos relacionados con la producción de etanol (García, et al., 2004).

2.5.5.2 Efecto de la temperatura

Z. mobilis es capaz de crecer en una gama de temperaturas de 25 a 40°C, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35°C.

A temperaturas superiores a 30°C, son los rendimientos de etanol y biomasa más que los parámetros específicos, quienes se ven más afectados.

El mismo fenómeno fue observado a temperaturas superiores a 37°C. La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición de la membrana celular. *Z. mobilis* es incapaz de mantener constante la fluidez de la membrana al ser cultivada a diferentes temperaturas. A altas temperaturas la concentración de fosfolípidos disminuye. Este aumento en la temperatura induce la acumulación de etanol en el interior de las células, lo que significa su efecto inhibitorio (García et al., 2004). El crecimiento a 36°C es la mejor prueba fenotípica para diferenciar a *Z. mobilis* subespecie *mobilis* (+) de *Z. mobilis* subespecie *pomaceae* (-) (Swings et al., 1977). *Zymomonas* es eliminada al exponerla a una temperatura de 60°C por 5 minutos.

2.5.5.3 Efecto del etanol

Zymomonas crece en presencia de 5% de etanol y algunas cepas crecen incluso a altas concentraciones. De las cepas estudiadas por Swings y De Ley, todas crecieron en presencia de 55 g/l de etanol adicionados al medio de cultivo, mientras que solo 12 cepas pudieron desarrollarse en presencia de 100 g/l de alcohol adicionado (Swings y De Ley, 1977; Bringer-Meyer y Sahm, 1988). La acción perjudicial del etanol es en la membrana celular y en la actividad fermentativa (Carey y Ingram, 1983). Niveles altos de etanol o el estrés por calor induce un patrón característico de proteínas en la célula (Michel y Starka, 1986). Estudios realizados sobre el efecto del etanol adicionado al medio de cultivo y del producido por *Z. mobilis* mostraron que en ambos casos, su efecto inhibitorio es más importante sobre el crecimiento que sobre su producción (García et al., 2004).

2.5.5.4 Efecto del pH

Dependiendo de la cepa, *Zymomonas mobilis* puede crecer en una gama de valores de pH (3 a 7). De las cepas estudiadas por Swings y De Ley alrededor de 20 pudieron crecer a valores de pH de 3.5.

Tradicionalmente valores de pH de 5,0 a 6,5 se han usado en el metabolismo de *Z. mobilis*, pero el hecho de que la bacteria pueda crecer a pH inferiores a 5.0 la hace interesante desde el punto de vista biotecnológico. En efecto los riesgos de contaminación pueden ser reducidos considerablemente (García et al., 2004).

2.5.5.5 Efecto del oxígeno

Aunque *Z. mobilis* puede crecer en aerobiosis, el oxígeno tiene un efecto negativo sobre la producción de alcohol. Este induce la formación de subproductos de la fermentación (acetato, acetaldehído y lactato). Aparentemente el efecto inhibitor está ligado a la concentración de sustratos. En presencia de concentraciones elevadas en azúcares, los parámetros relacionados con el crecimiento disminuyen en presencia de oxígeno, con una reducción de 25% del rendimiento de etanol en comparación con lo obtenido en anaerobiosis. El hecho que *Z. mobilis* no necesite de oxígeno para su crecimiento representa una gran ventaja cuando se trata de producción de etanol a escala industrial (García et al., 2004).

3.1 Desarrollo de la investigación

3.1.1 ETAPA 1: Mantenimiento de la cepa de *Zymomonas mobilis*

La cepa fue adquirida en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), de la ciudad de México, clasificada en el catálogo de cultivos del laboratorio de colección microbiana como número CDBB-603.

3.1.1.1 Proliferación del microorganismo

Para este procedimiento se utilizaron los medios sugeridos por el CINVESTAV, los cuales se citan a continuación:

Medio 2: Glucosa, peptona, Extracto de levadura (YPG), Composición: Extracto de levadura 3,0 g/L, Glucosa 20,0 g/L, Peptona 10,0 g/L, Agar 20,0 g/L, H₂O 1000 ml.

Medio 55: MYC, Composición: Extracto de levadura 10,0 g/L, Dextrosa 20,0 g/L, Peptona 10,0 g/L, Agar 20,0 g/L, H₂O 1000 ml.

La proliferación se realizó en caldo de cada uno de los medios.

Se prepararon 50 ml de cada uno de los medios de cultivo a pH 6,8 - 7,2, los cuales se colocaron en tubos con rosca. Los componentes de los medios se pesaron en una balanza analítica de la marca OHAUS adventurer, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos, se dejaron enfriar hasta una temperatura entre 25°C – 30°C, enseguida fueron inoculados con la bacteria con ayuda de un asa bacteriológica previamente esterilizada, los tubos se colocaron en una incubadora marca Riossa a 30°C por 36 horas.

3.1.1.2 Identificación macroscópica

Los tubos positivos del proceso anterior, se sembraron por estría en tubos de rosca inclinados para cada uno de los medios, adicionados con agar (2%), incubados a 30°C durante 96 horas.

3.1.1.3 Identificación microscópica

Se utilizó el método de tinción de Gram y la identificación se realizó con un microscopio de la marca Zeiss, observando los frotis con el objetivo de 100x.

3.1.1.4 Conservación de *Zymomonas mobilis*

La cepa se resembró mensualmente y fue conservada en un refrigerador White-Westinghouse a una temperatura entre 4°C – 8°C.

3.1.2 ETAPA 2: Degradación del almidón mediante enzimas amilolíticas

En ésta etapa se llevó a cabo la degradación del almidón a unidades de glucosa con el uso de α -amilasa y amiloglucosidasa, iniciando por la gelatinización del almidón, seguida de una licuefacción con la α -amilasa para la conversión a unidades de maltosa, posteriormente la adición de la glucoamilasa para la conversión de maltosa a unidades de glucosa.

3.1.2.1 Gelatinización

El agua almidonosa resultante del procesamiento del trigo fue proporcionada por la sección de Agrotécnia del departamento de fitomejoramiento, la cual fue refrigerada y dejada en reposo para favorecer la separación de las fracciones densa y acuosa, posteriormente fue retirada la fracción acuosa, que es la que se utilizó en la presente investigación.

El agua almidonosa fue calentada a una temperatura media de 61°C por 10 minutos, cuidando que la temperatura no se exceda a más de 64°C, enfriando posteriormente hasta 25°C.

3.1.2.2 Licuefacción con α -amilasa

Al tener el almidón una temperatura de 25°C se ajustó a pH 6 con bicarbonato de sodio. Se evaluaron tres concentraciones de α -amilasa, 1, 3, y 5% (v/v), tomando muestras del producto en proceso para determinar las concentraciones de almidón, azúcares totales y azúcares reductores con intervalos de tiempo de treinta minutos durante cuatro horas manteniendo una temperatura constante de 25°C en agitación lenta.

Al término de las cuatro horas el material fue sometido a un calentamiento en agua a 55°C por quince minutos. Las especificaciones de la α -amilasa se muestran en el anexo 3.

3.1.2.3 Sacarificación con glucoamilasa

Para la sacarificación, se tomaron en cuenta las concentraciones más bajas de almidón del el ensayo anterior. En este proceso el producto de la licuefacción se ajustó a pH 4,5 con ácido cítrico a una temperatura constante de 55°C. Se evaluó un tratamiento por triplicado con glucoamilasa a una concentración de 0,15% (v/v) determinada por González (2003), tomándose muestras para determinar las concentraciones de almidón, azúcares totales y azúcares reductores, los tiempos empleados fueron de 0,15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 minutos.

Al término del proceso el producto fue sumergido en un baño con agua y hielo hasta alcanzar una temperatura de 25°C. Posterior a esto, el jarabe fue esterilizado a 121°C por 15 minutos y se enfrió hasta 30°C, determinándose nuevamente la concentración de almidón, azúcares totales y azúcares reductores. Las especificaciones de la glucoamilasa se muestran en el anexo 3.

3.1.3 ETAPA 3: Preparación de inóculo

Se realizó un barrido de los medios de cultivo YPG y MYC. Los barridos se evaluaron en un espectrofotómetro de la marca Genesys 10 uv, determinando la longitud de onda óptima para cada medio, basados en la escala de colores de la luz visible.

Los rangos de longitud de onda se establecieron de acuerdo al color reflejado de cada medio. Medio YPG (350 nm – 450 nm), medio MYC (400 nm – 450 nm).

3.1.3.1 Escala Mcfarland

Utilizando la longitud de onda determinada para los medios de cultivo de la etapa anterior, se determinó la absorbancia del tubo 4 de la escala de Mcfarland equivalente a $1,2 \times 10^9$ UFC/ml.

Posteriormente, se realizó la siembra de inóculo en caldo de cada uno de los medios (relación 1:9); tomando lecturas de crecimiento microbiano con intervalos de sesenta minutos durante siete horas incubados a 30°C con el fin de conocer el medio de cultivo más adecuado para esta investigación, en relación al tiempo de incubación, basándose en la turbidez producida por el crecimiento del microorganismo, determinada por espectrofotometría.

3.1.4 ETAPA 4: Fermentación

En dos matraces de 250 ml cada uno con 200 ml del producto obtenido en la etapa 2, se ajustó a pH 6,8 con bicarbonato de sodio, se añadió el 2% (v/v) del microorganismo previamente proliferado, al tiempo óptimo establecido en la etapa 3, incubando a 30°C durante 96 horas, sin agitación. Se tomaron muestras del producto en proceso cada 12 horas para determinar la concentración de los parámetros en estudio.

Se realizó un comparativo con el medio de cultivo óptimo para *Zymomonas mobilis* para ver su comportamiento en relación al medio hidrolizado.

3.1.4.1 Análisis de muestras

A las muestras se les determinó el pH con un potenciómetro de la marca HANNA Instrument HI 223.

Se determinó la concentración de sólidos solubles totales (°Brix) con un refractómetro manual Atago, Modelo ATC-1.

La determinación de la concentración de azúcares totales se realizó por el método de Dubois. La técnica se muestra en el anexo 1.

La determinación de la concentración de azúcares reductores se realizó por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). La técnica se muestra en el anexo 1.

La determinación del grado alcohólico se realizó por el método de micro-difusión. La técnica se muestra en el anexo 1.

Estos parámetros fueron determinados para ver su comportamiento durante el proceso fermentativo determinando su relación con la producción de bioetanol.

Los datos obtenidos fueron analizados con un diseño experimental completamente al azar utilizando el programa estadístico JMP 5.0.1.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ETAPA 1: Identificación de la cepa de *Zymomonas mobilis*

4.1.1 Identificación macroscópica

En la figura 7 se observa a *Zymomonas mobilis* en agar YPG, se aprecian colonias pequeñas y brillantes de color crema, esta descripción concuerda con lo especificado por Bergey (2005).



Figura 7. Colonias de *Zymomonas mobilis* en medio YPG.

4.1.2 Identificación microscópica

En la figura 8 se aprecia la morfología microscópica de la bacteria con la tinción de Gram observadas al microscopio con el objetivo de 100x, se aprecian bacilos Gram (-) solos o en pares, éstos resultados son similares a los citados por García *et al.*, (2004), Bergey (2005).

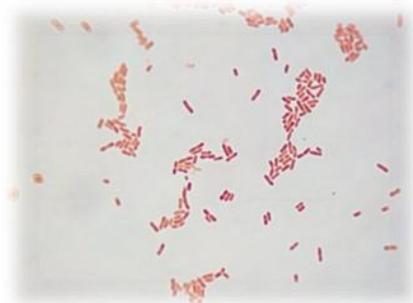


Figura 8. *Zymomonas mobilis* observada al microscopio con el objetivo de 100x.

4.2 ETAPA 2: Degradación del almidón mediante enzimas amilolíticas

4.2.1 Gelatinización

Para este proceso se dejó reposar el agua almidonosa, con el objetivo de favorecer la separación de dos fracciones, la densa y la acuosa. La fracción utilizada en esta investigación fue la acuosa ya que la otra fracción tenía demasiado sedimento.

El proceso de gelatinización se realizó con la temperatura especificada por Badui (1993), en el cual cita que la temperatura de gelatinización para el almidón de trigo oscila entre los 58°C - 64°C. Para la presente investigación se utilizó una temperatura media de 61°C, la cual se aplicó durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta 25°C.

En la figura 9 se aprecia el almidón en su proceso de enfriamiento, se observó un cambio en la coloración y viscosidad de la muestra, este cambio fue debido a que en la gelatinización hay un rompimiento de los gránulos de almidón liberando las fracciones de amilosa y amilopectina al medio que al enfriarse dieron esa característica al almidón, estos resultados son similares a lo citado por Badui (1993) y Bello Gutiérrez (2000).



Figura 9. Almidón en proceso de enfriamiento.

4.2.2 Licuefacción con α -amilasa

De las 3 concentraciones de enzima evaluadas se determinó la V_o de cada una, con el fin de establecer la concentración de enzima más adecuada para llevar a cabo el proceso de licuefacción del almidón. Estos resultados se observan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Concentraciones de enzima utilizada y valor de V_o

Concentración óptima de la enzima α-amilasa	
[Enzima]	V_o (Unidades de Absorbancia/ 30 min.)
1%	0,205
3%	0,250
5%	0,231

En relación a los valores de V_o se definió que la concentración de enzima óptima fue de 3% y se procedió a realizar la degradación del producto gelatinizado. Estos resultados se observan en la figura 10.

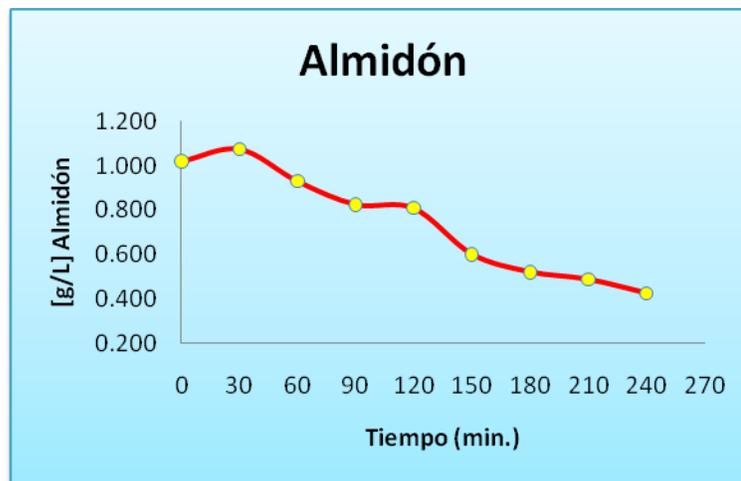


Figura 10. Degradación de almidón utilizando una [3%] de α -amilasa.

Se observa que el almidón es degradado por la acción enzimática en relación al tiempo, debido a que la α -amilasa efectuó el rompimiento al azar de los enlaces α -(1,4), provocando una disminución en la viscosidad y liberando maltosa, glucosa y otros oligosacaridos al medio (García, et al., 2004).

Estos datos fueron tomados en intervalos de 30 minutos durante 4 horas y se definió un tiempo máximo de degradación de 240 minutos, posteriormente el producto fue sumergido en agua a 55°C para disminuir al máximo la acción enzimática.

En el cuadro 8 se aprecian las concentraciones de almidón, azúcares reductores y azúcares totales obtenidos de la degradación del almidón, observándose un aumento de los azúcares reductores y una ligera disminución de los azúcares totales.

Cuadro 8. Concentraciones iniciales y finales de los parámetros en estudio con α -amilasa.

α -amilasa [3%]	Almidón [g/L]	A. Reductores [g/L]	A. Totales [g/L]
Inicio (min. 0)	0,858	14,338	4,443
Final (min. 240)	0,463	19,474	3,547

4.2.3 Sacarificación con glucoamilasa

El proceso de sacarificación tiene como objetivo producir el jarabe glucosado. La concentración evaluada fue de 0,15% de glucoamilasa, especificada por González (2003), a diferentes tiempos respetando las condiciones de trabajo de la enzima. Los resultados se muestran en la figura 11.



Figura 11. Sacarificación con Glucoamilasa a [0,15%].

Se aprecia que la concentración de almidón va disminuyendo con un tiempo máximo de 75 minutos, debido a que la glucoamilasa libera glucosa a partir del extremo no reductor de la amilosa y amilopectina, tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces α -(1,6) de la amilopectina (García, et al., 2004). A partir de los 90 minutos se observa un aumento en la concentración de almidón que puede ser atribuida a la acción de la transglucosidasa que forma maltosa y otros oligosacaridos a partir de glucosa (García, et al., 2004).

Posteriormente el producto fue sumergido en agua con hielo, hasta tener 25°C, con el fin de disminuir al máximo la actividad enzimática, determinándose la concentración de almidón, azúcares reductores y azúcares totales. Los resultados se observan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Concentración al final del proceso de sacarificación con la glucoamilasa.

Glucoamilasa [0,15%]	Almidón [g/L]	A. Reductores [g/L]	A. Totales [g/L]
Final (min. 75)	0,285	22,524	4,071

Al término de este proceso, se le adicionaron los demás componentes al medio de cultivo y fue esterilizado, dejándose enfriar hasta tener 30°C determinándose nuevamente las concentraciones de almidón, azúcares reductores y azúcares totales. Estos resultados se observan en el cuadro 10. El comportamiento del almidón, azúcares reductores y azúcares totales durante el proceso de degradación se muestra en el anexo 4.

Cuadro 10. Concentraciones finales de los parámetros en estudio después del esterilizado.

Después de Esterilizado	Almidón [g/L]	A. Reductores [g/L]	A. Totales [g/L]
[Final]	0,210	23,605	7,455

La disminución de la concentración del almidón fue debido a que la temperatura de autoclave destruye los gránulos de almidón Badui (1993), y por lo tanto da un aumento en las concentraciones de los azúcares.

En la figura 12 se observa el producto esterilizado el cual presento un cambio en su coloración debido a que cuando los monosacáridos son sometidos a altas temperaturas estos se caramelizan dando este cambio, además de que se favorecen mecanismos que implican la polimerización y epimerización de los monosacáridos Badui (1993).



Figura No. 12. Producto sacarificado esterilizado.

4.3 ETAPA 3: Preparación del inóculo

Los resultados de la prueba de barrido aplicada a los medios se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Absorbancia óptima para cada medio.

Medio de Cultivo	Absorbancia óptima (nm)
YPG	380
MYC	400

4.3.1 Escala Mcfarland

Los resultados de la lectura del tubo número 4 equivalente a $1,2 \times 10^9$ UFC/ml de la escala de Mcfarland determinada con la absorbancia de barrido para cada uno de los medios fueron para el medio YPG de 0,728 nm y para el medio MYC de 0,726 nm.

4.3.2 Determinación del medio de cultivo a utilizar

En el cuadro 12 se observa que los medios iniciaron con una lectura de absorbancia similar, sin embargo, durante las primeras horas de incubación no hubo un crecimiento bacteriano de forma uniforme en el medio MYC, esto se ve reflejado en que alcanzó una lectura aproximada a la especificada en la escala de Mcfarland a las 6 horas de incubación; por el contrario, el medio YPG mostró lecturas de absorbancia gradual, por tal motivo, fue el medio YPG el que en un tiempo de 5 horas 15 minutos obtuvo una absorbancia muy cercana a la especificada en la escala de Mcfarland y por lo tanto este fue el medio ideal para llevar a cabo el proceso de preparación del inóculo.

Cuadro 12. Determinación del medio más adecuado en relación a la absorbancia y al tiempo.

Medio YPG 380 nm (0,728 nm)			Medio MYC 400 nm (0,726 nm)		
Tubo	Minutos	Absorbancia	Tubo	Minutos	Absorbancia
1	0	0,154	1	0	0,151
2	60	0,182	2	60	0,132
3	120	0,287	3	120	0,148
4	180	0,383	4	180	0,170
5	240	0,588	5	240	0,318
6	300	0,641	6	300	0,466
7	315	0,719	7	360	0,723
8	360	0,807	8	420	0,891

4.4 ETAPA 4: Fermentación

4.4.1 Determinación de las variables de control

4.4.1.1 pH

En la figura 13 se aprecia que en las primeras 12 horas de la fermentación el pH se mantiene constante debido a que el microorganismo está un proceso de adaptación a las condiciones del medio, sin embargo a las 24 y 36 horas el pH disminuye de 7 a 5,6 y 5,8 respectivamente, debido al aumento en el metabolismo

bacteriano y producción de metabolitos, estos resultados son similares a los citados por García, et al., (2004), por lo tanto, se espera que el consumo de los azúcares aumente en relación al tiempo, así como también, que haya una producción máxima de bioetanol dentro de esos tiempos. Posteriormente se observa que en las últimas 24 horas del proceso fermentativo el pH se encuentra fuera de los límites para el crecimiento microbiano considerando que *Zymomonas mobilis* crece a pH 3,5 – 7,0 García, et al., (2004).

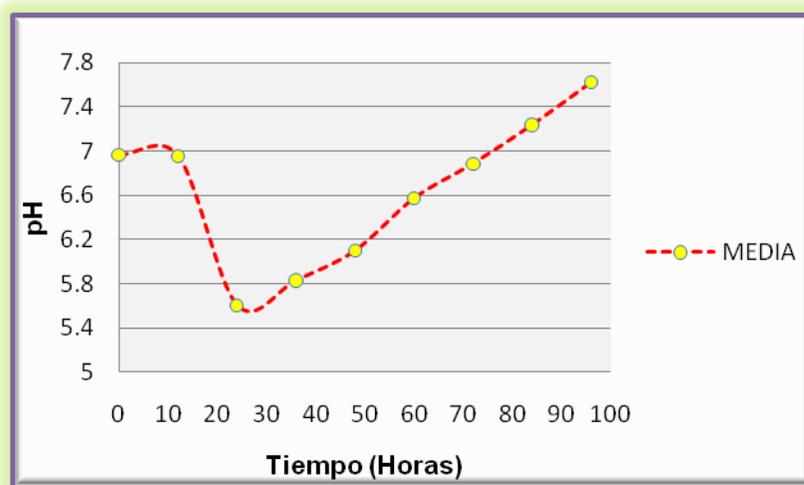


Figura 13. Comportamiento del pH en el proceso fermentativo.

Cabe mencionar que el medio presentó un cambio en su color original a una coloración lechosa después de las 48 horas de fermentación, debido a la densidad microbiana, sin embargo, durante este cambio conservó su olor característico hasta aproximadamente las 60 horas de fermentación. Este cambio se observa en la figura 14.

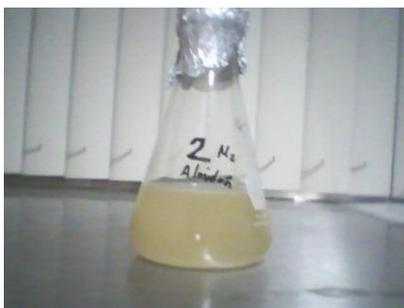


Figura 14. Medio de cultivo a las 48 horas de fermentación.

4.4.1.2 Sólidos solubles totales (° Brix)

En la figura 15 se observa que desde las primeras 12 horas el consumo de los sólidos solubles va aumentando de manera considerable, debido a que la bacteria está utilizando los azúcares y demás sólidos solubles para su crecimiento García, et al., (2004), teniendo un máximo de consumo a las 36 horas.

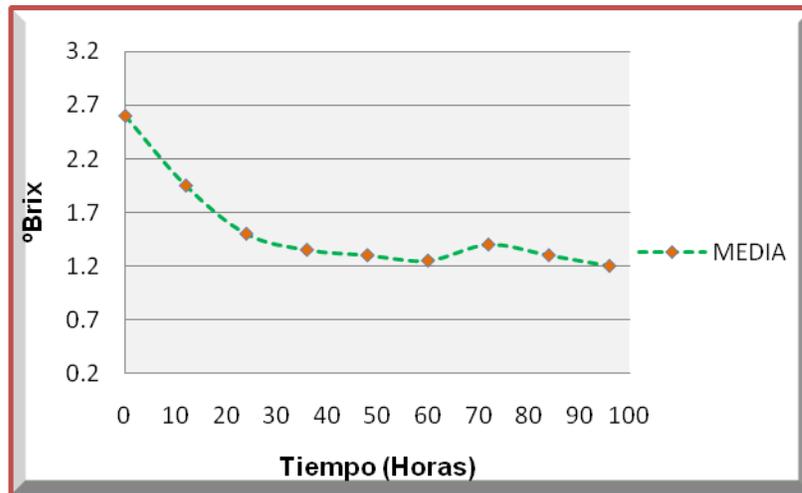


Figura 15. Comportamiento de ° Brix en el proceso fermentativo.

4.4.2 Determinación de las variables de consumo

Una vez llevado a cabo el proceso de fermentación y teniendo las muestras se procedió a su análisis evaluando las variables que se describen a continuación.

4.4.2.1 Monitoreo de azúcares reductores

En la figura 16 se observa que a medida que transcurre el tiempo del proceso de fermentación el consumo de los azúcares reductores va en aumento teniendo un máximo de consumo a las 36 horas mostrando diferencia significativa con los demás tiempos analizados, esto tiene relación con los parámetros de pH y ° Brix anteriormente analizados. El análisis de varianza aplicada a estos datos se muestra en el anexo 2.

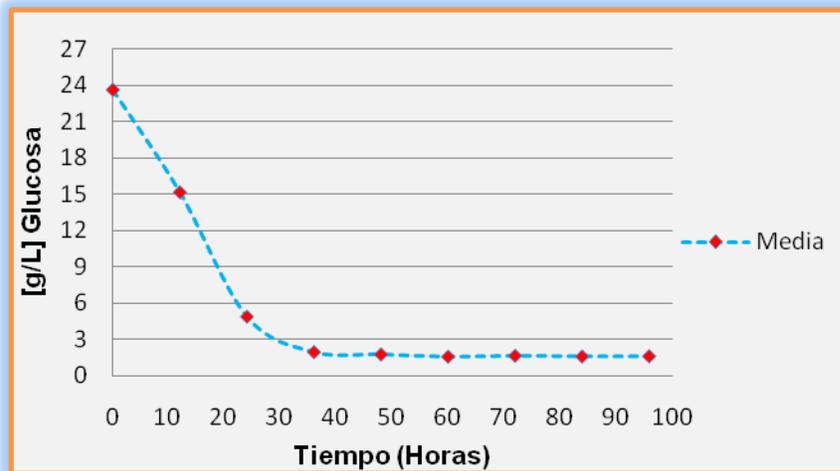


Figura 16. Comportamiento de Azúcares Reductores en el proceso fermentativo.

4.4.2.2 Monitoreo de azúcares totales

En la figura 17 se aprecia un comportamiento similar de consumo de los azúcares totales y azúcares reductores en donde el máximo consumo de estos azúcares es a las 36 horas de la fermentación. El análisis de varianza se muestra en el anexo 2.



Figura 17. Comportamiento de Azúcares Totales en el proceso de fermentativo.

4.4.3 Determinación de la variable de producción

El analizar las variables de control y de consumo, nos permite conocer o estimar en que tiempo se produjo la mayor cantidad de bioetanol.

4.4.3.1 Producción de bioetanol

En la figura 18 se observa que a las 36 horas de fermentación se obtiene una producción de bioetanol de 0,8%, habiendo diferencia significativa con respecto a los demás tiempos, este resultado esta sustentado con el análisis de las variables de control y de consumo antes descritas. El análisis de varianza se muestra en el anexo 2. En relación al beneficio-costos la fermentación tendría una duración máxima de 36 horas. El resultado obtenido en este trabajo fue superior a lo reportado por Monsalve et al., (2006) donde obtiene una concentración máxima menor al 0,01% de bioetanol a partir de 20, 40 y 60 g/L de azúcares reductores, en los tres medios utilizados (Glucosa, jarabe de cascara de banano y jarabe de yuca). Sin embargo, es inferior a los resultados del trabajo realizado por Sánchez et al., (2005), quien reporta una producción de 0,53% y 1,6% de bioetanol a partir de 10 y 30 g/L de glucosa utilizando el 5% de inóculo inicial y un pH de 5, por lo tanto, la cantidad de inóculo y el pH inicial fueron las causas de estas concentraciones de etanol comparándolas con las que se obtuvieron en esta investigación. En relación al trabajo realizado por Torres et al., (1988), obtuvo 105 g/L de bioetanol a partir de 223 g/L de azúcar en 70 horas a partir de almidón de trigo hidrolizado. En este trabajo se está reduciendo el tiempo a 36 horas.

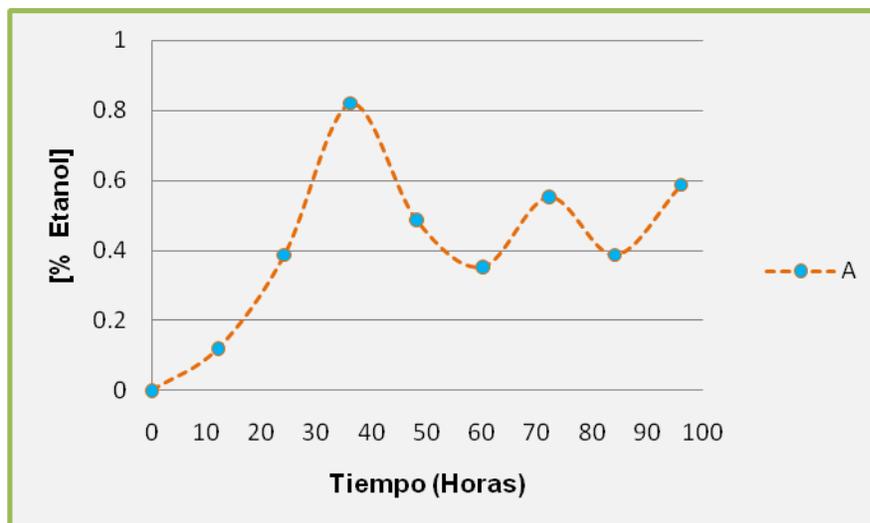


Figura 18. Cuantificación de bioetanol producido por *Zymomonas mobilis* en el proceso de fermentación.

4.4.3.2 Comportamiento de la producción de bioetanol con los dos medios de cultivo

En la figura 19 se observa la producción de bioetanol por *Zymomonas mobilis* del medio con jarabe glucosado obtenido a partir de almidón de trigo(A) y el medio con glucosa (G), mostrando una similitud en el comportamiento de la producción de bioetanol, pero con una concentración mayor en el medio con glucosa. Este comportamiento es similar a lo reportado por Monsalve et al., (2006), en donde la producción de etanol es mayor en el medio con glucosa en relación a los medios con jarabe de banano y jarabe de almidón de yuca.

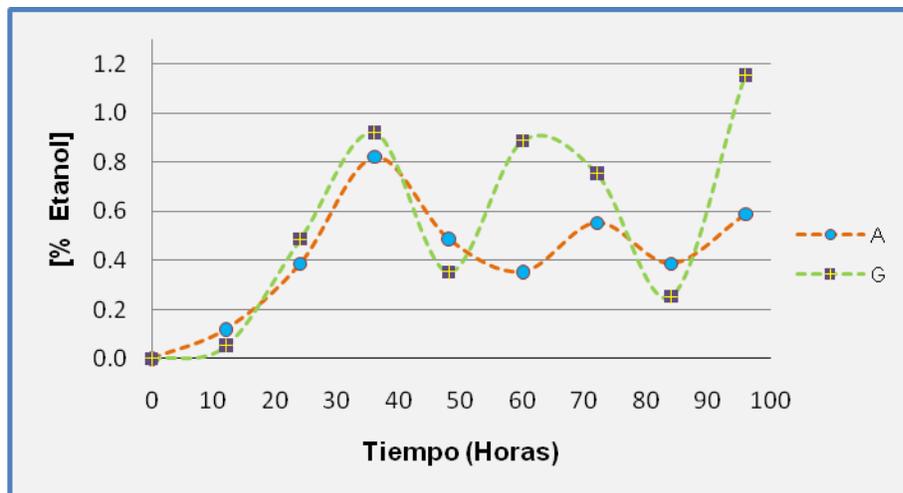


Figura 19. Comportamiento en la producción de bioetanol en el medio con jarabe glucosado a partir de almidón y medio con glucosa.

CAPITULO 5

CONCLUSION

En el presente estudio se obtuvo una concentración del 0,82% de bioetanol a partir de 23 g/l de azúcares reductores, en un tiempo máximo de 36 horas, inferior a las 72 horas reportado por Torres et al., (1988).

El agua almidonosa procedente de los efluentes agroindustriales son una buena opción como materia prima para el proceso de conversión del almidón a jarabe glucosado utilizando enzimas amilolíticas y la posterior obtención de bioetanol dándole las condiciones adecuadas.

La producción de bioetanol por un proceso de fermentación es una tecnología limpia y sencilla que puede ser llevada a cabo con un mínimo de capacitación, puede ayudar a mejorar la vida de las personas dando fuentes de empleo y lo más importante es que a través de este tipo de tecnologías se colabora en el cuidado del medio ambiente, fomentando el uso que muchos países desarrollados le han dado al bioetanol como parte de los combustibles, o en su caso seguir utilizándolo en la industria.

Con este trabajo se acepta la hipótesis propuesta por que se demuestra que si es posible obtener bioetanol a partir de efluentes agroindustriales ricos en aguas almidonosas dándoles un uso alternativo, además, se demuestra la capacidad de la bacteria *Zymomonas mobilis* en el proceso de obtención de etanol a partir de jarabe glucosado obtenido de una fuente diferente a las ya utilizadas.

CAPITULO 6

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AIE (International Energy Agency), 2007, *www.iea.org/*

Badui Dergal Salvador, 1993, Química de los alimentos, Tercera Edición, Ediciones Pearson Educación, impreso en México, pp. 96-102.

Bautista Carmen, 2003, *Aguas. Guía técnico-jurídica*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España.

Bautista Zúñiga Francisco, 1999, Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Departamento Editorial, Yucatán, México, pp. 46-47.

Becerra Pérez Luis Armando, La industria del etanol en México, Economía UNAM, Vol.6, Num.16, Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/ecu/ecunam16/ECU001600606.pdf>. Visitado en 5/010/09.

Bello Gutiérrez José, 2000, ciencia bromatológica, principios generales de los alimentos, ediciones Díaz de Santos, S.A., Madrid España. pp. 85

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994, ninth edition, USA. pp. 201.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984-1989, recopilación 2005 second edition, Michigan State University, USA.

Castillo Rodríguez Francisco, Roldán Ruiz María Dolores, Blasco Plá Rafael, Huertas Romera María José, Caballero Domínguez Francisco J., Conrado, Moreno-Vivián, Martínez Manuel, Luque-Romero, 2005, Biotecnología ambiental, editorial Tébar, Madrid España, pp. 315-319

Centroamérica de Biomass Users Network (BUN-CA), 2002, Manuales sobre energía renovable. Biomasa, Primera Edición, San José, Costa Rica, Septiembre, 2002.pág. 4, disponible en: <http://www.bun-ca.org/publicaciones/BIOMASA.pdf>

CIMMYT, Centro internacional de mejoramiento del maíz y trigo, 2009, Disponible en: http://www.cimmyt.org/spanish/wpp/rainf_wht/index.cfm

Departamento de Energía de los Estados Unidos. <http://www.energy.gov/>

Dufey Annie, Instituto Internacional para el Medio Ambiente y Desarrollo (iied), 2006, Producción y comercio de biocombustibles y desarrollo sustentable: los grandes temas, septiembre, Londres, pág. 3

EPA (Agencia de Protección Ambiental), 2007, <http://www.epa.gov/espanol/>

FAO, 2005. Food Outlook, September 2005, Disponible en: www.fao.org/giews/.

FAO, 2006, Perspectivas Alimentarias, (<http://www.fao.org/docrep/009/j7927s/j7927s11.htm#31>)

FAO, 2008, Estado Mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: Perspectivas, riesgos y oportunidades. Roma, 2008.

García Garibay Mariano, López Agustín, Quintero Ramírez Rodolfo, López-Munguía Canales Agustín, 2004, Biotecnología alimentaria, editorial Limusa, Quinta reimpresión, México D.F., pp. 577-580; 527- 529.

García Garibay Mariano, López Agustín, Quintero Ramírez Rodolfo, Agustín López-Munguía Canales, 2002, Biotecnología alimentaria, editorial Limusa, Quinta reimpresión, México D.F., pp. 619 a 627.

González Sánchez Hugo Javier, 2003, Tesis: Estudio de variables en la elaboración de frituras de papa (Solanum tuberosum) variedad Atlantic y tratamiento de las aguas almidonosas, Octubre, Saltillo, Coahuila, México.

IICA (Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura), 2007, Atlas de la agroenergía y los Biocombustibles en las Américas, San José, Costa Rica, pp.5-14.

IICA (Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura), 2004, Cadena Agroindustrial. Etanol, pag. 12-13, Nicaragua. Disponible en: http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Cadena_Etanol.pdf

IMTA (*Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*), *Agua para la producción de alimentos*. Disponible en: http://www.imta.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=180:agua-para-produccion-de-alimentos&catid=52:enciclopedia-del-agua&Itemid=80.

L. Brown Theodore, E. Bursten Bruce, R. Brudge Julia, 2004, Química. La ciencia central, Pearson Educación de México, Novena edición, pp. 1019.

Lajolo Franco Maria, Wenzel de Menezes Elizabete, 2006, Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos, Editora da Universidade da sao Pablo, impreso en Brazil, pp. 19-25

Lemire S., Ashley D., Olaya P. Romieu I., Welch S., Meneses F. and Hernández M., 2004, Environmental Exposure of Organic Compounds as Assessed by Blood Concentrations, 1998. Revista de Salud Pública de México, Vol. 46, No. 1, pp. 5-7, Enero- Febrero.

Mataix Verdú José, Carazo Marín Emilia, 2005, **Nutrición para educadores**, segunda edición, fundación Universitaria Iberoamericana, ediciones Díaz de Santos. pp. 201-215.

Monsalve G. John F., Medina de Pérez Victoria Isabel, Ruíz Colorado Ángela Adriana, 2006, Producción de etanol a partir de cascara de banano y de almidón de yuca, Dyna, noviembre, Año/Vol. 73, numero 150, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, pp. 21-27. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49615002>.

Mosquera Martínez Pepa, Merino Ruesga Luis, 2006, *Empresa y energías renovables. Lo que su empresa debe saber sobre energías renovables, eficiencia energética y Kioto*. FC Editorial, Madrid España, pp. 183-189; 193-208

Nava V. and Morales M, 2006. Degradation of Metyl tert-Butyl Ether (MTBE) by Pseudomonas Strains. The Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, México City, Mexico, September.

Peña Bautista, R.J., Pérez Herrera Mir, E., Gómez Valdez, M.M., Mendoza Lozano, M. A. 2008. Calidad de la cosecha de trigo en México. Ciclo primavera-verano 2006. Publicación especial del CONASIST-CONATRIGO. México D.F.

Peña Bautista, R.J., Pérez Herrera P., Villaseñor Mir, E., Gómez Valdez, M.M., Mendoza Lozano, M. A. y Monterde Gabilondo, R. 2007. Calidad de la cosecha del trigo en México. Ciclo otoño-invierno 2005-2006. Publicación especial del CONASIST. México D.F.

Primo Yúfera Eduardo, 1995, *Química Orgánica Básica y Aplicada. De la molécula a la industria*, tomo 2, ed. Reverté, Universidad Politécnica de Valencia, Barcelona, España, pp. 898.

Revista Mundo alimentario, 2007, *Aplicaciones de las Enzimas para la Producción de Alimentos, Ingredientes Alimenticios, Mejoramiento Nutricional y la Bioconservación*. Disponible en:

http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MA019_ENZIMA.pdf

RFA (Renewable Fuels Association), F.O. Licht, <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics/#B>, Pagina Visitada: 9/10/09.

SEMARNAT. CONAGUA. Estadísticas del Agua en México, 2008. México, D.F., 2008.

Seoáñez Calvo Mariano, 2004, *Ingeniería del medio ambiente. Depuración de las aguas residuales por tecnologías ecológicas y de bajo costo*. Ediciones MUNDI-PRENSA, Impreso en Madrid España, pp. 84.

Seoáñez Calvo Mariano, Seoáñez Oliet Pilar, 2002, Tecnología de alimentos, Manual de tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias agroalimentarias, ediciones Mundi-Prensa, Madrid España, pp. 125.

Thornton Morrison Robert, Neilson Boyd Robert, 1998, Química Orgánica, quinta Edición, pp. 1309, Ediciones Pearson Addison Wesley.

Torres, EF y Baratti, J., J. 1988, Ferm. Ferm. Technol. , Technol., pp. 66, 67-172.

Vásquez H.J., Dacosta O., 2007, Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, Vol. VIII, No. 004., pp. 249-259, UNAM, Octubre–Diciembre. Red de Revistas Científicas de América Latina y del Caribe, España y Portugal (redalyc). <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=40480404>

Vian Ortuño Ángel, 1996, Introducción a la Química Industrial, Editorial Reverté, Barcelona, España, pp. 464-470.

ANEXO 1

Determinación de Azúcares Totales

Se determinó por el método de Dubois. En un baño de hielo se coloca un tubo, se adiciona 1 ml de muestra y se temperiza por 1 minuto, se adicionan 2 ml de fenol sulfúrico (Solución de H_2SO_4 con fenol a una concentración de 1 mg/ml; debe usarse durante las 24 horas iniciales de la preparación) lentamente por las paredes del tubo. Se coloca en un baño a ebullición durante 5 minutos. Se sacan y enfrían a temperatura ambiente. Se lee en absorbancia a 480 *nm* en el espectrofotómetro. Para tomar la muestra de 1 ml, se realizó una dilución 1:10 de la muestra original.

Determinación de Azúcares Reductores.

Se determinó por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller. En el cual en un tubo de ensaye se colocan 0,5 ml de muestra y 0,5 ml de reactivo DNS. Se coloca en un baño a ebullición por 5 minutos. Se saca y se coloca en un baño de hielo y agua durante 2 minutos, transcurrido ese tiempo, se le adicionan 5 ml de agua destilada agitándose para su homogenización. Se lee al espectrofotómetro con una absorbancia de 540 *nm*. Para tomar la muestra de 0,5 ml, se realizó una dilución de 1:10 de la muestra.

Determinación de Almidón

En un tubo de ensaye se colocaron 10 ml de Solución Diluida de Yodo (Solución de Stock se prepara disolviendo 0,55 g de cristales de yodo y 1,1 g de yoduro de potasio en agua y se completa a 25 ml con agua destilada en un matraz de aforación; de la Solución Stock se toman 2 ml y se afora a 100 ml), 9 ml de agua destilada y 1 ml de muestra. Homogenizar bien, y leer su absorbancia a 620 *nm*.

Determinación de Grado Alcohólico

En un tubo de ensaye pequeño se le colocan 2 ml de Dicromato de Potasio y 2 ml de agua destilada.

En un tubo de ensaye grande colocar 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio.

Colocar el tubo de ensaye pequeño dentro del tubo de ensaye grande, colocar 1 ml de muestra en el tubo grande, se tapa el tubo grande y se mezcla con movimientos rotatorios sobre una superficie plana, se deja reposar por 60 minutos, se saca el tubo pequeño y se lee su absorbancia a 600 *nm* en el espectrofotómetro.

Solución dicromato de potasio

3,75 g de dicromato de potasio, disolver en 150ml de agua destilada, colocar en baño de hielo, agregar 280ml de ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del recipiente, agitar suavemente, enfriar a temperatura ambiente y llevar a un volumen de 650ml con agua destilada.

Solución saturada de carbonato de potasio

112g de carbonato de potasio anhidro, disolver en aproximadamente 50ml de agua destilada, alcanzar temperatura ambiente, aforar a 100ml de agua destilada.

ANEXO 2
ANALISIS ESTADISTICO

AZUCARES TOTALES

ANALYSIS OF VARIANCE				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	17	157,912	9,288	12875,82
Error	36	0,025	0,0007	Prob > F
C.Total	53	157,938		< ,0001

COMPARACION DE MEDIAS

Hora							Media
0	A						7,455
12		B					5,399
24			C				3,030
72				D			2,666
84					E		2,630
48						F	2,505
60						G	2,394
36						G	2,382
96						G	2,366

T-student $\alpha = 0,05$

AZUCARES REDUCTORES

ANALYSIS OF VARIANCE				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	17	3114,206	183,189	217429,8
Error	36	0,030	0,001	Prob > F
C.Total	53	3114,236		< ,0001

COMPARACION DE MEDIAS

Hora								Media
0	A							23,605
12		B						15,164
24			C					4,899
36				D				1,979
48					E			1,784
72						F		1,678
96							G	1,633
84							G H	1,619
60							H	1,597

T-student $\alpha = 0,05$

ETANOL

ANALYSIS OF VARIANCE				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	17	5,560	0,327	31,538
Error	36	0,373	0,010	Prob > F
C.Total	53	5,933		< ,0001

COMPARACION DE MEDIA

Hora							Media
36	A						0,820
96		B					0,587
72		B					0,553
48		B	C				0,487
24			C	D			0,387
84			C	D			0,387
60				D			0,353
12					E		0,120
0						F	0,000

T-student $\alpha = 0,05$

ANEXO 3
CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS

ALFA AMILASA (FLUKA)

10065 (EC 3.2.1.1)

α -amilase from *Aspergillus oryzae*

Lot & filling 1344197 12308023

Powder 36,0 U/mg

1 U corresponde a la cantidad de enzima la cual libera 1 μ mol de maltosa por minuto a pH de 6,0 y 25 °C.

Almacenar a 4°C.

AMILOGLUCOSIDASA O GLUCOAMILASA (SIGMA)

A – 7255 10 gramos Lot 122K1561

Amyloglucosidase

(EC 3.2.1.3)

From *Rhizopus* mold (9032-08-0) EC No. 232-877-2

Contiene aproximadamente 35% de proteína; tierra diatomáceos, almidón y azúcar.

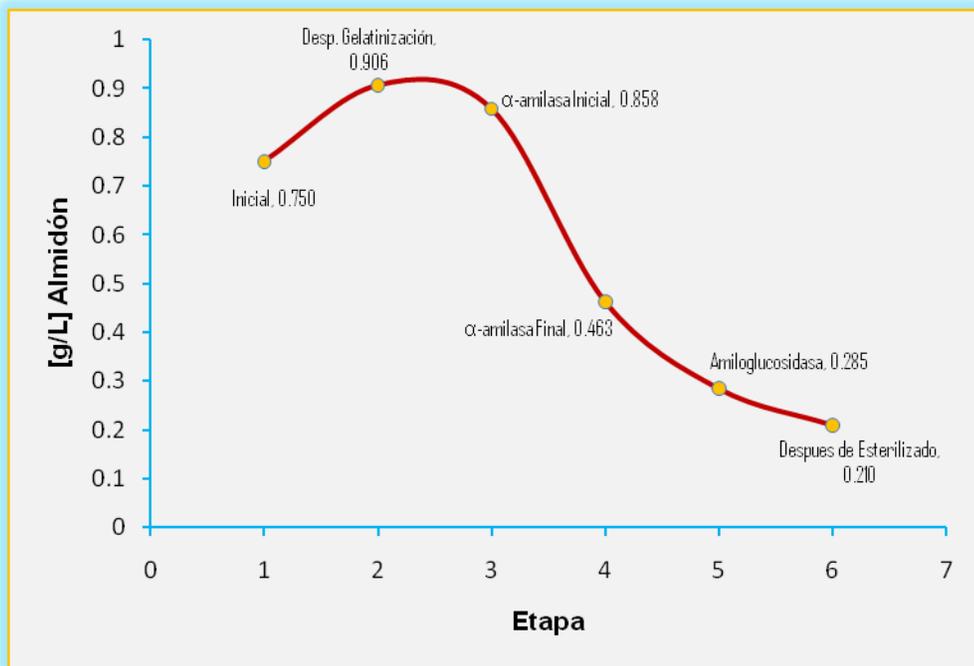
21,100 unidades/gramo sólido.

Una unidad libera 1,0 mg de glucosa a partir de almidón en 3 minutos a pH de 4.5 y a 55°C.

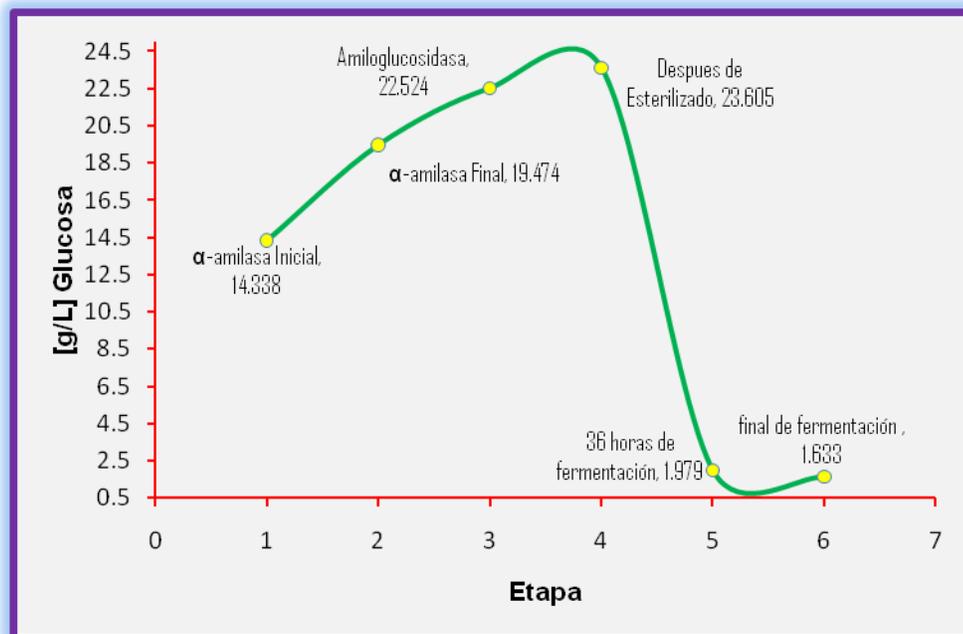
Almacenar de 2-8°C.

ANEXO 4

Comportamiento del almidón durante el proceso de degradación



Comportamiento de azúcares reductores durante el proceso



Comportamiento de azúcares totales durante el proceso

