

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



**Obtención de bioetanol a partir de aguas residuales
almidonosas mediado por *Saccharomyces diastaticus*.**

Por:

Adolfo Vallejo Betan

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el título
de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

BUENAVISTA, SALTILLO, COAH. MÉXICO 10 Diciembre de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Obtención de bioetanol a partir de aguas residuales almidonosas
mediado por levaduras (*Saccharomyces diastaticus*).

T E S I S

POR:

ADOLFO VALLEJO BETAN

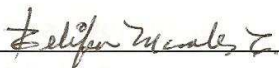
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para Obtener el Título de:

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



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verastegui
Vocal suplente



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

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



BUENAVISTA, SALTILLO, COAH. MÉXICO

10 Diciembre de 2009

COORDINACIÓN DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

A mi "**ALMA TERRA MATER**" por la grandiosa oportunidad de estudiar y pertenecer a esta gran institución, por las experiencias, la abandono pero siempre la llevare en mis recuerdos y diré con orgullo su nombre.

A la **M.C. María Hernández González** por compartir sus conocimientos y experiencias, por su apoyo en la realización del proyecto, por prepararme para los siguientes retos de la vida, aportar sus conocimientos no solo en el ámbito profesional también en lo personal. Por eso le agradezco infinitamente y siempre la recordare.

A la **M.C. Felipa Morales Luna y el M.P. Francisco Hernández Centeno** por su apoyo en la realización de este proyecto.

A los profesores que participaron en mi formación, **M.C. Xochitl Ruelas, Dra. María de Lourdes, Dra. Verónica Charles, M.C. Oscar Noe Reboloso, M.C. Laura Olivia Fuentes** y a cada maestro que compartió sus conocimientos en las aulas.

A la **M.C. Carmen Julia** por sus enseñanzas y su amistad a lo largo de mi estancia en la universidad.

A la **M.C. Mildred Inna y Carlitos** por grandioso apoyo y orientación, por su grandiosa amistad, su tiempo y dedicación en la elaboración de este proyecto.

iiiGRACIAS!!!!

DEDICATORIAS

A **DIOS**, por prestarme la vida y el cariño de mi familia, por su apoyo y darme la fuerza que se necesita para continuar luchando por lo que queremos, aunque no lo vemos, no significa que no este vigilando nuestras acciones y guiándonos.

A mis padres:

Antonio Vallejo Herrera y Elidía Betan Pérez

Por su apoyo, confianza y cariño, sin su apoyo no hubiera llegado tan lejos, por sus consejos que me guiaran por el camino que elija, y por enseñarme a levantar de las caídas y seguir sin importan cuantas veces mas caigamos no debemos rendirnos, siempre debemos luchar por nuestras metas.

A mis hermanos: **Agus, Odi, Eli, Álvaro, Luis, Mary, Oscar, Chali y Anel**; por sus consejos y esos momentos que hemos pasado, su apoyo incondicional en todo momento, aun estando lejos.

A mis abuelos:

Francisco Betan Díaz (†) y Albina Pérez Zamora (†)

Agustina Herrera Pérez

Por sus grandes valores y actitudes, su gran ejemplo de fortaleza y trabajo, siempre los llevare en mi corazón.

A mis sobrinos **Janet, Edgar, Michell, Miguel Ángel, David, Montse, Alvarito y Darío** por alegrarme la vida.

A mis mejores amigos: **Antonio Mejía, Montserrat Vargas, Leticia Pablo, Juan José Hernández, José Antonio Zuccolotto, Humberto (chino), Maira** con ustedes pase los mejores momentos en Saltillo, todo quedara para la posteridad y espero que algún día nos volvamos a juntar para recordar esos grandiosos momentos.

A mis compañeros y amigos: **keko, Marisol, Donaldo, Dolores, Rolando, Aglael, Belén, Alfredo, Amalia, Agustín, Nallely, Chuy, Laura, Marbella, Ventura, TT, Pancho, Don Peter, Freddy, Ricardo, María de Jesús, Alma**, y los que faltaron, sin ustedes mi estancia en Saltillo y en la Universidad hubiera sido aburrida, agradezco haberlos conocido.

INDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	4
INDICE GENERAL	6
INDICE DE CUADROS	9
INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
I. INTRODUCCION	13
1.1 JUSTIFICACION	15
1.2 HIPOTESIS	16
1.3 OBJETIVOS	16
1.3.1 Objetivo general	16
1.3.2 Objetivos específicos	16
II. REVISION DE LITERATURA	17
2.1 Almidón	17
2.1.1 Composición química del almidón	18
2.1.1.1 Amilosa	18
2.1.1.2 Amilopectina	19
2.1.2 Importancia biotecnológica del almidón	20
2.1.3 Obtención del almidón	21
2.1.4 usos del almidón	22
2.1.4.1 Productos derivados del almidón	22
2.2 Aguas residuales generadas por la industria alimentaria	23
2.2.1 Niveles de contaminación de las aguas residuales	24
2.2.2 Residuos de la industria agroalimentaria	24
2.2.2.1 Características de las aguas residuales de la industria agroalimentaria	25
2.2.3 Aguas residuales de la industria de la obtención de gluten de trigo	27
2.2.3.1 Obtención de almidón y gluten de trigo	28
2.2.3.1.1 Proceso Halle	28
2.2.3.1.2 Proceso Martin	28

2.2.3.1.3 Extracción de almidón de trigo con amonio.....	29
2.2.3.1.4 Refinación de almidón con dióxido de azufre.....	29
2.2.4 Contaminación por materia orgánica y microorganismos.....	30
2.3 Aprovechamiento de las aguas residuales.....	31
2.3.1 Uso de los residuos orgánicos.....	31
2.3.1.1 Alimentación Animal.....	32
2.3.1.2 Producción de Composta.....	32
2.3.1.3 Producción de metano.....	32
2.3.1.4 Biodiesel.....	32
2.3.1.5 Bioetanol.....	33
2.3.2 Microorganismo utilizado en la fermentación.....	33
2.3.2.1 Levaduras.....	33
2.3.2.2 Factores de Crecimiento.....	34
2.3.2.2.1 Oxígeno.....	34
2.3.2.2.2 Temperatura.....	34
2.3.2.2.3 Concentración de iones de hidrogeno.....	34
2.3.2.3 <i>Saccharomyces diastaticus</i>	35
2.3.2.3.1 Floculación.....	36
2.3.2.3.2 Capacidad de producción y tolerancia a la concentración de etanol.....	37
2.4 Importancia de los bioenergéticos.....	37
2.4.1 Los biocombustibles.....	38
2.4.2 Bioetanol.....	39
2.4.2.1 Obtención a partir de caldos azucarados.....	40
2.4.2.2 Obtención a partir de almidón.....	40
2.4.2.3 Obtención a partir de celulosas.....	41
2.4.3 Aplicaciones del etanol.....	41
2.4.3.1 Uso del etanol en el transporte.....	41
III MATERIALES Y METODOS.....	43
3.1 ETAPA 1: Obtención y Viabilización de la Levadura.....	43
3.1.1 Obtención de la levadura.....	43
3.1.2 Morfología de la levadura.....	43

3.2 ETAPA 2: Caracterización del Agua Almidonosa y	
Proliferación de la levadura	44
3.2.1 Caracterización del agua residual almidonosa.....	44
3.2.2 Proliferación de <i>S. diastaticus</i>	44
3.3 ETAPA 3: Fermentación	45
3.3.1 Preparación del medio.....	45
3.3.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación.....	45
IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
4.1 ETAPA 1: Obtención y Viabilización de la Levadura	47
4.1.1 Obtención de la cepa.....	47
4.1.2 Morfología de la levadura.....	47
4.2 ETAPA 2: Caracterización del Agua Almidonosa y	
Proliferación de la Levadura	48
4.2.1 Caracterización del agua residual almidonosa.....	48
4.2.2 Proliferación de <i>S. diastaticus</i>	49
4.3 ETAPA 3: Fermentación	49
4.3.1 Preparación del medio.....	49
4.3.2 Monitoreo de la fermentación.....	49
4.3.2.1 pH.....	49
4.3.2.2 Efecto de la esterilización sobre el agua almidonosa...	50
4.3.2.3 Monitoreo del comportamiento de almidón y azúcares	
durante la cinética de fermentación.....	51
4.3.2.4 Producción de etanol.....	53
V CONCLUSIONES	54
VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
ANEXOS	61
Anexo 1: Perfil bioquímico de la cepa <i>Saccharomyces diastaticus</i>	
proporcionado por el CINVESTAV.....	61
Anexo 2: Análisis t-student del comportamiento de pH.....	62
Anexo 3: Análisis t- student de para la consumo de	63
almidón.....	
Anexo 4: Análisis t-student para el consumo de azúcares totales....	64
Anexo 5: Análisis t-student para el consumo de azúcares	
reductores.....	65
Anexo 6: Análisis t- student para la producción de Etanol.....	66

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Diferentes almidones usados en la industria alimentaria.....	20
Cuadro 2. Comparación de los diferentes procesos de obtención de gluten y almidón de trigo.....	30
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>S. diastaticus</i>	35
Cuadro 4. Formulación del medio de proliferación para <i>S. diastaticus</i>	44
Cuadro 5. Contenido del medio malta extracto de levadura con almidón como fuente de carbono.....	45
Cuadro 6. Medio agar malta extracto de levadura.....	47

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fuentes naturales de almidón.....	17
Figura 2. Fragmento de la estructura lineal de la amilosa.....	18
Figura 3. Estructura helicoidal de la amilosa.....	19
Figura 4. Estructura química de la amilopectina.....	19
Figura 5. Aplicaciones del almidón en el sector industrial.....	21
Figura 6. Sedimentación de <i>S. diastaticus</i>	36
Figura 7. Formula del etanol.....	41
Figura 8. Crecimiento de <i>S. diastaticus</i> en agar malta extracto de levadura a las a)24 y b)48 horas.....	48
Figura 9. Observación microscópica de <i>S. diastaticus</i>	48
Figura 10. Comportamiento de pH en la fermentación.....	50
Figura 11. Seguimiento del consumo de almidón.....	51
Figura 12 Comportamiento de los azucares totales.....	52
Figura 13. Comportamiento de los azucares reductores durante la fermentación.....	52
Figura 14. Seguimiento de la producción de etanol durante la fermentación.....	53

RESUMEN

El almidón es la reserva energética de las plantas, semillas, cereales legumbres, tubérculos y algunas frutas. Esta formado por largas cadenas de amilosa (lineales) y amilopectina (ramificadas), siendo el polisacárido mas abundante e importante después de la celulosa comercialmente. Los usos comerciales y tecnológicos principalmente se destina para fines alimentarios, aunque en su forma natural tienen un uso limitado, por medio de procesos fisicoquímicos es modificado para obtener derivados que satisfacen la funcionalidad deseada.

Los residuos que producen las industrias del procesamiento de alimentos tienen efecto negativo al ambiente, debido a los fuertes volúmenes de agua y la elevada carga orgánica que contienen, como los sólidos generados durante la extracción de gluten de trigo, generando residuos líquidos con un alto contenido de sustancias orgánicas. Estos residuos pueden ser utilizados con fines como alimentación animal, fertilizantes y productos químicos como el biodiesel y el bioetanol, utilizando procesos de biotransformación.

En el presente trabajo de investigación se obtuvieron aguas residuales ricas en almidón con una concentración de 2. 626 g/lt., obtenidas de la separación de gluten de trigo. Lo anterior se utilizó como fuente de carbono para el proceso fermentativo con la levadura *S. diastaticus* que se inoculó con el tubo no. 4 de acuerdo con la escala de McFarland modificada.

S. diastaticus es un microorganismo que produce enzimas extracelulares, lo que permite obtener una alta producción de etanol y es tolerante a altas concentraciones del mismo en comparación con las metodologías tradicionales en donde se utilizan procesos enzimáticos previos para degradar la cadena almidón. Las características anteriores permiten la reducción del tiempo de producción.

Se obtuvo una concentración de etanol mayor a 3% a las 84 horas después de la inoculación del medio, bajo condiciones controladas de pH 4.2-4.3 y temperatura de 27°C, con la finalidad de evitar la presencia de microorganismos contaminantes y evitar obtener productos secundarios.

Palabras clave: almidón, etanol, fermentación, aguas residuales, levadura, *Saccharomyces diastaticus*

I. INTRODUCCION

En la producción de alimentos, anualmente millones de toneladas de cereales y frutos son dañados por el clima, durante el transporte, durante su almacenaje o bien durante su procesado, generando residuos orgánicos, tanto sólidos como líquidos. (Domínguez, 2002)

El gluten de trigo es utilizado en la industria panadera para la fortificación de harinas de panificación. Está conformado en su mayoría por las proteínas contenidas en el trigo que forman una masa visco-elástica a partir de la adición de agua al harina. El gluten está compuesto por 80% de proteínas, 7% de lípidos y 5% de hidratos de carbono. Las prolaminas y las gluteninas, en relación con los lípidos, aportan una característica muy particular en la formación del gluten. Son responsables de la cohesión y visco-elasticidad de la masa, propiedad que permite la retención de gas durante el amasado y en la cocción cuya consecuencia es un producto panificado poroso, esponjoso y con una corteza elástica.

A partir de harina de trigo se extrae el gluten por el método convencional generando residuos sólidos de la cascarilla de trigo y una corriente residual principalmente constituida por residuos fermentables del grano y minerales (Domínguez, 2000). La finalidad es liberar gradualmente el almidón sin dañar el gluten. Los sólidos que se pierden en el agua de lavado y centrifugado, generan volúmenes de agua ricos en carbohidratos compuestos. Los sólidos obtenidos al evaporar el efluente son comúnmente utilizados como aditivo en alimentos para animales o para la obtención de almidón purificado (Domínguez, 2002)

Debido a lo anterior y a que los residuos no tienen un fin adecuado, llegando a ser altamente contaminantes, se pueden utilizar como fuentes de carbono para realizar fermentaciones para la obtención de bioetanol utilizando microorganismos fermentadores como *Saccharomyces diastaticus*, sin la necesidad de una hidrólisis previa, con la finalidad de reducir el tiempo de la fermentación con el empleo de levaduras productoras de enzimas

extracelulares que degradan la cadena de almidón, con la conversión directa a etanol.

1.1 JUSTIFICACION

Las aguas residuales con alto contenido de sólidos como el almidón, provenientes del procesamiento de cereales y otros alimentos, generan un impacto al medio ambiente, estos pueden ser utilizados como materia prima en la síntesis de compuestos químicos de interés industrial, reduciendo el problema de la contaminación.

El uso de la levadura *Saccharomyces diastaticus* aislada por Andrews y Gililand, considera hoy en día una cepa de *S. cerevisiae*, secreta una enzima extracelular (glucoamilasa), capaz de hidrolizar la cadena del polímero de almidón, para obtener etanol apreciado por las industria farmacéutica, de biocombustibles y vinícola. Esta característica permite la reducción de tiempo y costo que implica los procesos de licuefacción y sacarificación, posterior fermentación. Además presenta las siguientes características: es altamente floculante, resistente a la concentración de alcohol y una alta velocidad de crecimiento celular.

La situación mundial de producción y aumento en el precio del petróleo, las condiciones de las reservas mundiales del mismo ha llevado a diferentes países a desarrollar programas de producción de combustibles alternativos al mismo. A diferencia de estos que provienen de la energía almacenada de restos fósiles, los biocombustibles provienen de la biomasa que constituye a los seres vivos.

1.2 HIPOTESIS

Es posible obtener bioetanol a partir de aguas residuales ricas en almidón sin la necesidad de un tratamiento enzimático previo al proceso fermentativo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Obtener bioetanol a partir de aguas residuales ricas en almidón, sin pretratamiento enzimático, mediada por *Saccharomyces diastaticus*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Caracterización del agua residual rica en almidón.
- Determinación del inóculo necesario para el tipo de agua almidonosa utilizada.
- Realizar la cinética de fermentación utilizando *Saccharomyces diastaticus*.
- Seguir la fermentación mediante análisis de laboratorio para establecer el tiempo óptimo que permita la mayor concentración de bioetanol.
- Obtener etanol de carbohidratos poliméricos sin la necesidad de una hidrólisis enzimática previa.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 ALMIDON

El almidón es una reserva energética de las plantas y para el hombre un alimento. Esta formado por amilosa en su parte interna y amilopectina en sus capas mas externas. Es el polisacárido más abundante e importante después de la celulosa desde el punto de vista comercial, tiene un gran número de usos industriales. (Gaytán, 2007)

Es el principal polisacárido de reservas de los vegetales Se encuentra en forma de complejas partículas (gránulos), en semillas, cereales, legumbres, tubérculos, y en algunas frutas como se muestra en la figura 1 (Badui, 1999). A diferencia de los demás carbohidratos, estos son relativamente densos e insolubles. Se sintetiza a partir de la glucosa generada en los procesos de fotosíntesis y se almacena en los amiloplastos. El contenido relativo de amilosa y amilopectina, así como las características de los granos, varía según la fuente del almidón. (Latorre, 2007).



Figura 1. Fuentes naturales de almidón.

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina. Ambas son largas cadenas unidas, sin embargo la amilosa es una cadena lineal y la amilopectina tiene ramificaciones. Las ramificaciones hacen a la amilopectina menos soluble en agua. (Badui, 1999)

2.1.1 Composición química del almidón

2.1.1.1 Amilosa

Es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos α (1-4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta un millón; es una α -D-(1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la α -maltosa como se muestra en la figura 2.

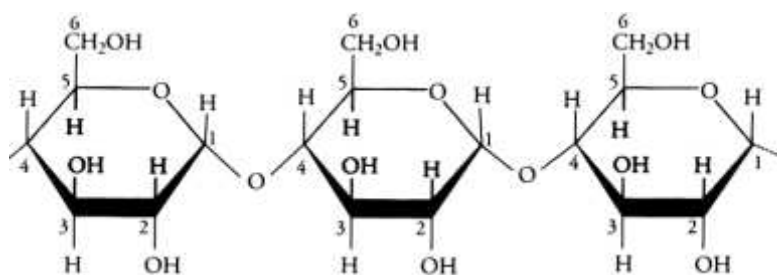


Figura 2. Fragmento de la estructura lineal de la amilosa.

Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa como se muestra en la figura 3. El yodo reacciona con la amilosa debido al complejo que se establece entre una molécula de este con cada 7-8 glucosas, esto hace posible la prueba del yodo para localizar el almidón. El color del complejo depende de la longitud de la hélice y por ello, del número de moléculas de yodo involucradas. Si la hélice es larga, el complejo de almidón-yodo es azul; si es corta el complejo es rojo (Badui, 1999).

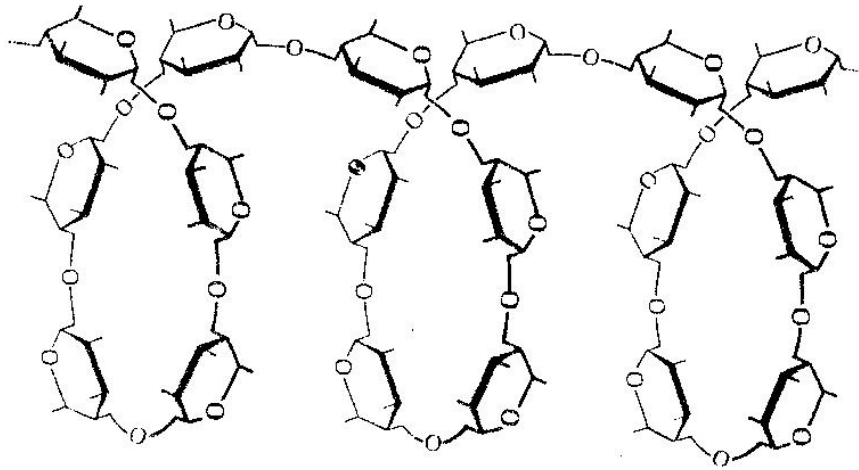


Figura 3. Estructura helicoidal de la amilosa

2.1.1.2 Amilopectina

La amilopectina es una molécula ramificada, esta formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1-4) así como ramificaciones que ocurren cuando el enlace es α (1-6) localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa aproximadamente como se muestra en la figura 4 (Badui, 1999).

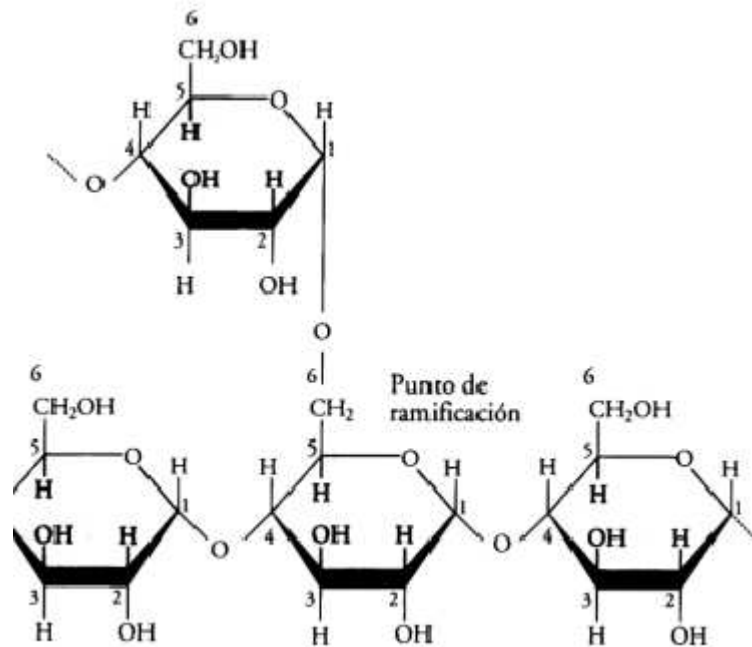


Figura 4. Estructura química de la amilopectina.

La estructura cristalina de los gránulos proviene de la amilopectina, esta por calentamiento en agua, proporciona soluciones claras y de alta viscosidad. A diferencia de la amilosa, esta no forma geles, aunque la concentración sea alta.

Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades reológicas y sensoriales de los alimentos, principalmente mediante la capacidad de hidratación y gelatinización. En el cuadro 1 se observan algunas características de algunos almidones usados en la industria alimentaria (Badui, 1999).

Cuadro 1. Diferentes almidones usados en la industria alimentaria

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	temperatura de gelatinización (°C)	Tamaño de granulo (micras)
Maíz	73	27	62-72	5-25
Papa	78	22	58-67	5-100
Arroz	83	17	62-78	2-5
Tapioca	82	18	51-65	5-35
Trigo	76	24	58-64	11-41

(Badui, 1999)

2.1.2 Importancia biotecnológica del almidón

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes que existen en la naturaleza. Es una fuente de energía ubicua y fácilmente accesible ya que las principales fuentes son los granos de cereales, legumbres y tubérculos. (Latorre, 2007).

Los usos comerciales y tecnológicos son diversos y numerosos. Una gran proporción del almidón se destina para fines alimentarios, se adiciona a refrescos, salsas, helados, alimentos precocinados o infantiles, etc., para utilizarlo como estabilizador de emulsiones, agente gelificante o sustituto de grasas, mejorando las propiedades de los

alimentos, modificando su estructura y consistencia (Synowiecki, 2007; Latorre, 2007). Además de su aplicación en la industria alimentaria, se utiliza almidón en la industria textil, minera, papelera, cosmética, y farmacéutica que se observa en la figura No. 5 (Pandey et al., 2000; Latorre, 2007).



Figura 5. Aplicaciones del almidón en el sector industrial.

2.1.3 Obtención del almidón

Los almidones tienen características diferentes y distintivas en cuanto a forma, distribución de tamaños, composición y cristalinidad de los granos, abundan en los alimentos amiláceos, a partir de grano o subproductos, de los que puede extraerse fácilmente, conservando la estructura nativa del almidón, siendo el más utilizado el obtenido a partir de maíz. (Guardado, 2006)

Aunque la mayor producción de almidón proviene de la molturación del maíz, también existe una gran cantidad de almidón que se extrae del trigo, sin embargo, este se obtiene más como un subproducto de la

obtención de gluten de trigo que por sus propiedades nutritivas o usos industriales (Anónimo, 2006).

En el caso del trigo, es a partir de harinas con bajo grado de extracción, en vez de partir del grano. Consiste en hacer una masa con harina y agua, en la cual el gluten se hidrata y formara la masa, se lava el gluten y el almidón arrastrado por el agua se separa mediante cribas. Otra forma consiste en amasar la mezcla bajo un chorro de agua con lo que el gluten se aglomera y el almidón es arrastrado por el agua elevando la pureza del gluten (proceso Martin). (Guardado, 2006)

2.1.4 Usos del almidón

Los almidones en su forma natural son de utilidad limitada, por medio de procesos fisicoquímicos el almidón nativo es modificado para obtener distintos derivados que satisfagan la funcionalidad deseada. Los procesos de modificación van encaminados a cambiar las características e integridad del gránulo, por lo consiguiente, altera sus propiedades de gelatinización, cocimiento, retrogradación o gelificación. El objetivo es modificar las propiedades de viscosidad y las propiedades de los geles resultantes así como las propiedades de retrogradación y afinidad de agua.

2.1.4.1 Productos derivados del almidón

A partir de este hidrato de carbono se obtienen distintos derivados, como la glucosa, las dextrinas y los almidones modificados, todos aquellos ampliamente usados en la elaboración de un gran número de alimentos e incluso en muchas otras industrias de productos no comestibles. (Badui, 1999).

Glucosa.- Se fabrica por hidrólisis completa del almidón, con ácidos y enzimas amilolíticas.

Dextrinas.- Se obtienen por una hidrólisis parcial del almidón empleando ácidos y calor. A diferencia de los jarabes de glucosa estas no cristalizan.

Almidones modificados.- Presentan mas propiedades funcionales que los naturales, se obtienen por gelatinización, eterificación, esterificación, enlaces cruzados y oxidación.

En la actualidad, numerosas investigaciones están centradas en la producción de bioetanol a partir de almidón. El bioetanol tiene una importancia creciente como alternativa de los combustibles fósiles (Lin y Tanaka, 2006;). Aunque la mayor parte del etanol que se genera actualmente procede del petróleo, cada día aumenta la producción de etanol de origen biológico a partir de la fermentación anaeróbica de residuos agroindustriales, la utilización de estos residuos resulta beneficioso para el medio ambiente (Pandey et al., 2000; Latorre, 2006).

2.2 AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La producción de aguas residuales generadas por la industria alimentaria ha aumentado debido a cambios socioeconómicos, ya que la población en constante crecimiento consume productos de primera necesidad (alimentos procesados) cuya demanda es constante. Las materias primas obtenidas de la naturaleza deben ser tratadas mediante procesos tecnológicos industriales, con la finalidad de la obtención de un producto alimenticio preparado y listo para su consumo. Los procedimientos son numerosos y varían en función al tipo de industria,

características de la materia prima y de producto final que se desea obtener. También se puede clasificar según la naturaleza de su acción, procesos químicos, físicos, mecánicos, biológicos, etc.

El tratamiento de las materias primas es determinado por las características exigidas al producto final y estos procesos son diversos desde:

- simple manipulación de la materia prima: selección y clasificación según su calidad, tamaño, color, etc.
- transformación total 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.

Los procesos empleados en la industria agroalimentaria son importantes desde el punto de vista medioambiental, pues los residuos que generan son diversos.

Las aguas residuales de las industrias agroalimentarias presentan ciertas características que las diferencian de los vertidos de otras industrias, como son los fuertes volúmenes de agua y su elevada carga orgánica. (Gaytán, 2007.).

2.2.1 Niveles de contaminación de las aguas residuales

La extracción de agua de los mantos acuíferos es mayor a la que se aporta, debido a que la población está acostumbrada a consumir agua limpia. El destino final de su utilización es dirigido a los cursos y masas de agua, esta es la contaminación consecuente de las actividades humanas, provocando el enriquecimiento de las aguas con nutrientes y sales minerales responsables del crecimiento de microorganismos provocando un desequilibrio biológico, afectando el sensible ambiente marino.

2.2.2 Residuos de la industria agroalimentaria

Los residuos de la industria agroalimentaria son lo bastante contaminantes para el medio ambiente, siendo el problema básico los efluentes líquidos, 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, y en particular transformados vegetales, se generan las mayores cantidades de residuos orgánicos, determinados por: el tipo de materia prima a procesar, tamaño, forma, partes aprovechables, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos. (Ostolaza, 1998).

Así, 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 y sistema de recolección.
- Calidad del producto final: la obtención óptima del producto final requiere selecciones de materia prima más rigurosas que aumentan el porcentaje de residuos.
- Tecnología de fabricación empleada. (Viniegra, et al., 2002).

2.2.2.1 Características de las aguas residuales de la industria agroalimentaria

- Sus características suelen ser accesibles a los sentidos (turbidez, olor, sabor, color, temperaturas altas, etc.).

- Tienen una presencia importante de materias en suspensión, y en menor grado de materia coloidal.
- Es frecuente la presencia de sustancias químicas orgánicas: aceites, grasas, etc.
- Es detectable la presencia de sustancias químicas inorgánicas variadas (sulfatos, cloruros, amoníaco, fósforo, etc.), dependiendo del tipo de industria.

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

El agua utilizada en las industrias agroalimentarias tiene 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, finalmente, para actuar sobre las materias primas en los procesos de fabricación, en este aspecto, se utiliza para lavar, pelar, escaldar, etc., y también en la limpieza de la maquinaria industrial. Para todo esto se emplean grandes volúmenes de agua, cuya naturaleza es fuertemente contaminante, una vez utilizada. La anterior obliga a las industrias agrícolas a intentar reutilizar el agua que usan y esto lo hacen en proporciones considerables. (Seoáñez, et al. 2007)

La mayoría de las industrias incorporan a sus productos una serie de aditivos para mejorar sus cualidades y aumentar su conservación (antioxidantes, colorantes, antiapelmazantes, conservantes, estabilizantes, potenciadores de sabor, etc.). Dichas sustancias aparecerán con mayor o menor frecuencia como componentes de las aguas residuales.

Las materias en suspensión en las aguas residuales son partículas sólidas del lavado a la entrada de la fábrica (es el que más agua exige, 31 al 55%, y en donde se provee de mayor materia en suspensión), o bien desechos vegetales residuales de los diferentes tratamientos por los que ha pasado el

producto. La carga contaminante varía también según la etapa del proceso de fabricación.

Los tipos de contaminantes que aparecen en estos efluentes son sólidos y líquidos. Los primeros constituidos por recortes y pieles de frutos, huesos, partículas de tierra y restos no aprovechables, deben ser tratados separadamente y no diluidos en agua, reduciendo el problema de la contaminación. 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, (Seoáñez, et al., 2003).

2.2.3 Aguas residuales de la industria de la obtención de gluten de trigo

Uno de los usos más importantes de los cereales es la obtención de granos, estos posteriormente utilizados para la obtención de harina (Serna, 2001).

La industria refinadora de este carbohidrato, llamada molienda húmeda, tiene como objetivo obtener el máximo rendimiento de gránulos de almidón nativo o sin dañar, para extraer los componentes químicos del grano: almidón, proteína (gluten), fibra (pericarpio) y aceite, este último compuesto, mediante el procesamiento del germen. La industria refinadora de almidón esta dominada por pocas empresas y utiliza casi exclusivamente al grano de maíz como materia prima. Esto se debe a que la semilla contiene una alta proporción de almidón (mayor de 70%) y principalmente al alto valor económico-comercial de los subproductos del proceso: gluten y germen. La refinación industrial de almidón de trigo a diferencia de la molienda húmeda de maíz, se realiza con dos grandes propósitos: la obtención de gluten vital y de almidón. El gluten vital es utilizado para suplementar formulaciones para panificación, especialmente en la manufactura industrial de pan integral (Serna, 2001).

2.2.3.1 Obtención de almidón y gluten de trigo

Existen diversos métodos para la obtención de gluten de trigo y almidón, estos tienen la finalidad de obtener el granulo sin dañar y separar la parte proteica de la harina de trigo (Serna, 2001).

2.2.3.1.1 Proceso Halle

Consiste en hidratar al trigo con agua con la posterior molienda en húmedo y fermentación. Durante este último paso, el gluten se degrada para facilitar la liberación de los gránulos de almidón. La separación del almidón se realiza por decantación después de diluir la mezcla almidón-gluten con agua (Serna, 2001).

2.2.3.1.2 Proceso Martin

Es el más usado a nivel mundial ya que está diseñado para obtener dos productos con valor agregado: almidón y gluten. Este proceso utiliza harina de trigo en lugar del grano entero. Se inicia cuando la harina de trigo se mezcla con agua en una proporción de 2:1; para hidratar las harinas de trigos duros se emplea mayor cantidad de agua. Estos ingredientes se amasan par obtener una masa uniforme con textura lisa. El almidón se obtiene por un simple lavado de la masa. La etapa de lavado está diseñada para liberar gradualmente a los gránulos de almidón sin romper el gluten en pedazos pequeños (Serna, 2001).

En el agua de lavado queda principalmente el almidón y las proteínas solubles, albúminas y globulinas; en el residuo insoluble queda el gluten vital o funcional constituido en su mayoría por prolaminas (gliadina) y glutelinas. El exceso de agua del gluten se remueve por un proceso de compresión a través de rodillos para posteriormente deshidratarse a una humedad de 8-10% en secadores de vacío o de tambor. El almidón disperso en agua (10% sólidos) primeramente se tamiza con equipos vibratorios para remover el gluten y el pericarpio contaminantes. Posteriormente, el almidón se separa por medio de decantación o centrifugación. El almidón se seca a humedades de

aproximadamente 10% y contiene alrededor de 0.3% de proteína. En este proceso se generan aproximadamente 65 y 14 kilogramos de almidón de primera y gluten vital respectivamente, de 100 kilogramos de harina de trigo. El resto es almidón de segunda y sólidos que se pierden en el agua de lavado y centrifugado (Serna, 2001).

2.2.3.1.3 Extracción de almidón de trigo con amonio

Se mezcla harina de trigo en cinco partes de una solución 0.2 M de hidróxido de amonio y se somete a operaciones de centrifugación y de secado por aspersion del sobrenadante rico en proteína. El almidón centrifugado se trata de nuevo con amonio para bajar más su contenido de proteína mediante el filtrado al vacío y el secado. Con este proceso se obtiene un rendimiento de aproximadamente 50% almidón y 25% de gluten vital seco (Serna, 2001).

2.2.3.1.4 Refinación de almidón con dióxido de azufre

El proceso de refinación de almidón después de tratar a los granos con una solución de dióxido de azufre sigue principios muy similares al proceso convencional de la molienda húmeda de maíz, el trigo se trata por aproximadamente dos horas en una solución de 2-4g/l de dióxido de azufre. La desventaja de este método es que el gluten pierde su funcionalidad y valor porque el dióxido de azufre rompe los enlaces disulfuro y así solo se puede utilizar como suplemento para alimentación animal. El rendimiento de almidón primario se estima en 55% aproximadamente (Serna, 2001). En el cuadro 2 se pueden observar la diferencia entre cada proceso y los rendimientos que se obtienen de almidón y gluten de trigo.

Cuadro 2. Comparación de los diferentes procesos de obtención de gluten y almidón de trigo.

Método de extracción	Rendimiento de Almidón (%)	Rendimiento de gluten (%)`	Características del proceso
Proceso Halle	---	----	El grano de trigo es hidratado para molienda y fermentación. El gluten es degradado
Proceso Martin	65	14-15	Se realiza a partir de harina de trigo. Se utiliza grandes cantidades de agua.
Extracción con hidróxido de amonio	50	25	Se realizan operaciones de centrifugado y secado por aspersion.
Refinación con dióxido de azufre	55	----	El gluten pierde funcionalidad y valor (se utiliza como suplemento de alimentación animal).

La textura, claridad y dureza de los geles elaborados con almidón de trigo es muy similar a la del maíz, sin embargo el poder engrosante es menor en el almidón de trigo (Serna, 2001).

2.2.4 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 y 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 estas sustancias en energía. El oxígeno 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 se vea afectada la distribución de la vida acuática (Gaytán, 2007)

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, por las clases de microorganismos, por la 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 del elemento nutritivo. (Tiempo en que descompone la mitad de la cantidad inicial de materia orgánica).

Otro tipo de contaminación, es la contaminación térmica; el vertido sale a mayor temperatura que la del receptor (aproximación al nivel térmico máximo de ciertas especies), 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, las sales minerales vertidas en el agua provocan el desarrollo de algas consumidoras de oxígeno, y en ciertos casos se llega incluso a la desaparición de la fauna acuática. Los desechos que se aportan constantemente llegan a modificar sensiblemente el ambiente marino y causan perturbaciones en la pesca. (Seoáñez, et al., 2003)

2.3 APROVECHAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES

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

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

2.3.1.1 Alimentación animal

Se utiliza principalmente para vacas, animales jóvenes, y ganadería brava. (Fonollá y Boza, 1993).

2.3.1.2 Producción de composta

Es el producto obtenido mediante un proceso de descomposición biológica de la materia orgánica, en condiciones controladas de humedad y temperatura, provocando la destrucción de elementos patógenos. La materia orgánica mejora la estabilidad del suelo, aumentando su porosidad y capacidad de retención hídrica, favoreciendo el intercambio de gases y agua. Asimismo favorece la fijación de nutrientes, aumenta el desarrollo de su flora microbiana, por esto, es una de las vías más importantes de regeneración de suelos. (Costa, et al., 1991; Antón, 1992).

2.3.1.3 Producción de metano

La fracción de residuos vegetales que se depositan en vertederos es susceptible de someterse a un 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. (Campos, 2002).

2.3.1.4 Biodiesel

El biodiesel proviene del procesamiento de aceites vegetales, tanto naturales como reciclados (soya, girasol, palma, etc.) y de grasas animales. Se lo obtiene mediante el proceso de transesterificación de los aceites por reacción química con el alcohol para formar ésteres grasos (biodiesel) y glicerina.

2.3.1.5 Bioetanol

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

2.3.2 Microorganismo utilizado en la fermentación

2.3.2.1 Levaduras

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre la piel de algunas frutas, hojas, flores, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales. Algunas están asociadas con insectos pero el suelo es el mayor reservorio, constituyen la causa más probable de alteración de productos como frutas y bebidas sin alcohol, que contienen azúcares fermentables, y de substratos donde la elevada acidez, la baja actividad del agua o la presencia de etanol, reducen el desarrollo bacteriano (Déak & Beuchat 1996, Brackett, 1997).

Las levaduras son las más abundantes y ocupan un papel importante en la elaboración de cerveza, licores y pan, y en distintos procesos de fermentación o inversión de azúcares, proporcionan compuestos saborizantes, ácidos nucleicos y otros productos químicos útiles. Se distribuyen a través del viento principalmente y en general son organismos unicelulares con formas variadas, desde esféricas, ovoides y elipsoidales.

Las levaduras son los microorganismos más utilizados por su capacidad de transformar almidón o azúcares y dar alcohol y dióxido de carbono por vía fermentativa, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos.

Se multiplican por reproducción asexual (gemación y fisión binaria) y de manera sexual a través de la conjugación de dos células haploides con la disolución de la pared colindante para formar un cigoto diploide. El núcleo en el cigoto puede dividirse una o varias veces y formar ascosporas y cada una de estas se convierte en un nuevo individuo que puede reproducirse otra vez por gemación, fisión o fusión sexual.

2.3.2.2 Factores de crecimiento.

2.3.2.2.1 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.

2.3.2.2.2 Temperatura:

En la mayoría de las levaduras el rango de temperatura para el crecimiento es 24 – 47° C, además determina la actividad de las distintas enzimas de la levadura, y las diversas especies reaccionan de forma diferente.

2.3.2.2.3 Concentración de iones de hidrógeno:

El crecimiento y la fermentación de la levadura dependen en alto grado de la reacción del medio nutritivo. El pH para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces diastaticus* es entre 4.2 – 4.5 para dar las condiciones óptimas para la reproducción de la levadura y la fermentación; además actúa como agente precipitante de materia orgánica y mantiene bajas las poblaciones de microorganismos contaminantes.

2.3.2.3 *Saccharomyces diastaticus*

La levadura *Saccharomyces diastaticus* como se muestra en el cuadro 3, es considerada una cepa de *S. cerevisiae*. (Kriger, 1984, Latorre, 2007,) La cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* fue aislada por Andrews y Gilliland (1952) como un contaminante durante la fabricación de la cerveza (Sakai *et al.*, 1986) y debido a la gran diversidad existente dentro de esta especie, fue necesario subdividirla en seis grupos sin valor taxonómico pero con relevancia práctica. Las diferencias funcionales entre estas cepas son de importancia tecnológica para los procesos de producción, estas diferencias significativas, son el resultado de pequeñas mutaciones en el material genético (García, 2004). Estos grupos son: *cerevisiae*, *ellipsoideus*, *oviformis*, *cheresanus*, *logos* y *diastaticus* (Carro y Piña, 2001). En el género *Saccharomyces*, la glucosa es el principal sustrato regulatorio en condiciones aeróbicas. La represión de la respiración por glucosa en condiciones aeróbicas, lleva a un decrecimiento en la velocidad específica del consumo de oxígeno y consecuentemente en la acumulación de etanol. Poseen la capacidad de crecer en ausencia de aire (proceso fermentativo) o en su presencia (proceso oxidativo). Las características del crecimiento y producción de productos dependen de las condiciones de desarrollo.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *S. diastaticus*

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genero	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Diastaticus</i>

(Andrews y Gililand, 1962)

La producción industrial de etanol comGo combustible a partir del almidón involucra tres pasos: (A) licuefacción por endoamilasas (alfa-amilasa y beta amilasa), (B) sacarificación enzimática (glucoamilasas y enzimas desramificantes) y (C) fermentación de la glucosa (Forgaty y Kelly, 1979, Benítez y colaboradores, 1992). La cepa *Saccharomyces. var. diastaticus* resulta de interés para la producción de etanol a partir de materias primas amiláceas, por la capacidad de producir y secretar una enzima extracelular denominada glucoamilasa, que favorece la producción de etanol a partir del almidón, la misma difunde hacia el medio de cultivo hidrolizado a unidades de glucosa desde el extremo no reducido de la cadena de este polisacárido, con lo cual el proceso de sacarificación resulta mas sencillo. Además son altamente tolerantes al etanol (Wang y Sheu, 2000, Benítez y otros, 1992).

2.3.2.3.1 Floculación

El fenómeno de floculación como se observa en la figura 6 (sedimentación), se debe a un cambio en la composición de la pared celular de la levadura, donde tienen particular relevancia las proteínas y carbohidratos de la superficie, provocando la agregación de las células mediante la formación de puentes de calcio o de magnesio (Rose, 1980, Nishihara, 1982, Nishihara y Toraya, 1987)

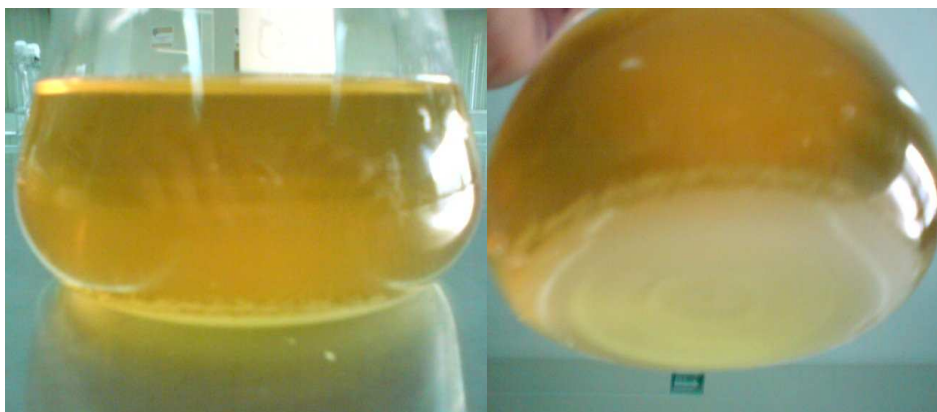


Figura No. 6: Sedimentación de *S diastaticus* en medio de proliferación.

2.3.2.3.2 Capacidad de producción y tolerancia a la concentración de etanol

La capacidad de producción de alcohol y la tolerancia al mismo son dos características relacionadas desde el punto de vista funcional, ya que la segunda puede limitar a la primera; sin embargo son independientes de su origen fisiológico, es decir, la habilidad de una levadura de producir alcohol a partir de un carbohidrato no necesariamente implica que esta tenga alta tolerancia y viceversa (D'Amore y G., 1987). La producción de alcohol es un fenómeno complejo que cuyo rendimiento depende de diversos factores como: la características intrínsecas de la cepa, las condiciones de aeración, la concentración del inóculo, la composición del medio, las condiciones de la fermentación, etcétera (Jones, 1981, García, 2004).

La tolerancia al alcohol involucra fenómenos bioquímicos, fisicoquímicos y metabólicos; sin embargo, no existe una definición universal de tolerancia al alcohol, puede referirse a la concentración de alcohol que inhibe el crecimiento o bien a la inhibición sobre la velocidad específica de fermentación o al efecto sobre la viabilidad (Rose, 1980, D'Amore y G., 1987). La tolerancia al alcohol depende de las características genéticas de la cepa, de diversos factores ambientales como: concentración de azúcares en el medio desde el inicio de la fermentación y en fases posteriores, estado metabólico de las células, temperatura, pH, y de manera importante la concentración de etanol en las diferentes etapas de la fermentación (D'Amore y G., 1987, García, 2004).

2.4 IMPORTANCIA DE LOS BIONERGETICOS

El agotamiento de los recursos energéticos, derivados de combustibles fósiles o tradicionales y el consumo de energía aumenta con mayor velocidad, derivando una enorme cantidad de gases contaminantes liberados a la atmósfera, causando cambios climáticos que preocupan a los gobiernos y sociedad. Una de las formas de hacer frente a este tipo de problemas es mediante recursos energéticos renovables. (FNB, 2004).

Los bioenergéticos se obtienen de procesos de transformación de biomasa y en una gran variedad de formas:

- A partir de biocombustibles sólidos como la leña, el carbón vegetal o los residuos agrícolas, que pueden quemarse directamente o gasificarse para producir calor y electricidad.
- A partir de cultivos energéticos como caña de azúcar, algunos cereales (maíz principalmente, caña de azúcar, mandioca) y oleaginosas (soja, girasol, palmas) para la obtención de bioetanol y biodiesel.
- Residuos municipales y el estiércol de los que se pueden obtener combustibles gaseosos como el biogas.

El aprovechamiento de la bioenergía presenta ventajas como la creación de sinergias entre los sectores agrícola-forestal (producción de los combustibles), energético, industrial (agroindustrias), ambiental y social. (Macera, 2006).

2.4.1 Los biocombustibles

A diferencia de los combustibles fósiles que provienen de la energía almacenada durante largos periodos en los restos fósiles, los biocombustibles provienen de la biomasa o materia orgánica que constituye todos los seres vivos. La situación mundial actual de producción y aumento en los precios del petróleo y la condición de las reservas mundiales de este recurso en la producción de múltiples industrias —en especial en la del transporte—, está llevando a algunos países a desarrollar fuertes programas de producción de combustibles alternativos al combustible fósil.

Los biocombustibles son extraídos de la biomasa, nombre dado a la materia orgánica de origen reciente que haya derivado de animales y vegetales como resultado del proceso de conversión fotosintético. La energía de la biomasa es generalmente producida de residuos de cultivos agrícolas,

actividades forestales y de la basura industrial, humana o animal. Los biocombustibles son una específica categoría de la biomasa usualmente asociada con la industria del transporte. Los combustibles de la biomasa utilizan la energía química, la cual se fija por fotosíntesis y se almacena dentro de las plantas. Esta energía química puede ser liberada para crear calor con fines tradicionales —como cocinar y crear calor en un espacio—, con fines industriales, o puede ser convertida a electricidad o en forma de combustible, líquido o gaseoso. (González y Castañeda, 2008).

La biomasa es una fuente de energía renovable, su producción es más rápida que la de los combustibles fósiles. (Ruiz, 2007).

Los combustibles de origen biológico pueden sustituir parte del consumo en combustibles fósiles tradicionales (petróleo, carbón), con la ventaja de que son renovables y tienen bajo impacto en el deterioro ambiental, siendo los más usados y desarrollados el bioetanol y el biodiesel. (Ruiz, 2007).

El biocombustible más importante es el alcohol carburante, el cual puede ser usado como oxigenante de la gasolina, lo que permite una mayor combustión, disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados.

El etanol o alcohol etílico, se puede obtener a partir de materiales que contienen celulosa 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).

2.4.2 Bioetanol

Desde la antigüedad se obtiene por fermentación anaeróbica de azúcares con levadura en solución acuosa y posterior destilación, siendo su aplicación principal tradicional la producción de bebidas alcohólicas.

Hay tres principales caminos para producir etanol a partir de materiales biológicos; todos incluyen una primera fase de fermentación por levaduras, seguida de una posterior destilación mediante la aplicación de calor. (Serna, 2001). La duración de cada sistema es distinta, así como la producción de alcohol, depende del elemento inicial, que puede ser:

- Sustancias con alto contenido de sacarosa: caña de azúcar, remolacha, melazas, sorgo dulce.
- Sustancias con alto contenido de almidón: maíz, papa, yuca.
- Sustancias con alto contenido de celulosa: madera, residuos agrícolas.

2.4.2.1 Obtención a partir de caldos azucarados

La obtención a partir del jugo extraído de la caña o tallos de algunas gramíneas es el que mas se practica, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales. La caña de azúcar es la preferida debido a su alta producción de biomasa y a su alto rendimiento en azúcares fermentables principalmente sacarosa. El proceso tradicional de obtención a partir de de caña de azúcar es el siguiente: las plantas son cortadas cuando dan un mejor rendimiento de azúcar/ha, los carbohidratos son almacenados en el tallo. La extracción del caldo se hace por medio de un prensado, posteriormente se somete a fermentación. La fermentación tiene una duración de varios días y es efectuada a temperaturas de aproximadamente 35 °C. (Serna, 2001).

2.4.2.2 Obtención a partir de almidón

El cereal mas utilizado para este propósito es el maíz. Existen dos procesos que actualmente están siendo utilizados. El más moderno, es la utilización de enzimas termoestables durante la gelatinización o cocimiento. El proceso tradicional consiste en la gelatinización del almidón, enfriando e incubando con amilasas y glucoamilasas. En ambos casos el proceso de fermentación y destilación son iguales. (Serna, 2001).

2.4.2.3 Obtención a partir de celulosa

A partir de celulosa primero se debe pre-tratar la materia vegetal para que la celulosa pueda ser atacada por enzimas hidrolizantes. El pre-tratamiento puede consistir en una combinación de trituración, ataque con ácidos y otras sustancias. Esto es uno de los factores que explican por qué los rendimientos para la caña de azúcar son altos, mediocres para el maíz y bajos para la madera. (Ruiz, 2007)

2.4.3 Aplicaciones del etanol

En la figura 7 se puede observar la formula del etanol, este tiene innumerables aplicaciones como: bebidas fermentadas para el consumo humano como vinos, aguardiente, vodka, ron, brandy, etc. En la industria se emplea en procesos como: disolución de la nitrocelulosa, disolvente de colorantes en las industrias alimenticias y textil; disolvente de: resinas; jabón, aceites, ceras, etc.; y oxidación en la fabricación de ácido acético, vinagre, acetaldehído, y cada vez mas como combustible o aditivo en las gasolinas, para todo tipo de transportes e instalaciones estacionarias, para mejorar sus propiedades en proporción del 10 al 20%, mayor que el de la gasolina sin mezclar.

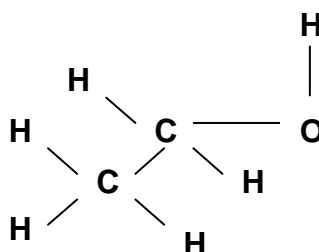


Figura No. 7: Formula del etanol.

2.4.3.1 Uso del etanol en el transporte

- Es menos inflamable que la gasolina por lo tanto es más seguro de utilizar.

- Disminuye la dependencia de los países agro-productores, del abastecimiento de combustibles fósiles por parte de los países productores de petróleo.
- Durante su combustión se produce un aumento del calor de vaporización, lo cual genera una mayor potencia respecto a la gasolina.
- Tiene bajas emisiones tóxicas.
- Genera menores emisiones de monóxido de carbono cuando se usa como aditivo de la gasolina.
- Produce menos dióxido de carbono al quemarse que la gasolina, pero el impacto total depende del proceso de destilación y de la eficiencia de los cultivos.
- Genera emisiones altamente evaporativas.
- Presenta una menor densidad de energía que la gasolina, el conductor debe llenar el tanque del automotor con más frecuencia.
- Contiene dos terceras partes de la energía contenida por el mismo volumen de la gasolina.

III MATERIALES Y METODOS

Localización del sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Tecnología de Alimentos del Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos, ubicado en el campus 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 (Gaytán, 2007).

La presente investigación se desarrolló como a continuación se describe.

3.1 ETAPA 1: Obtención y Viabilización de la Levadura.

3.1.1 Obtención de la levadura

La levadura empleada fue una cepa pura de *Saccharomyces diastaticus* del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) de su colección de cepas microbianas y cultivos celulares ubicado en la Ciudad de México.

3.1.2. Morfología de la levadura

La levadura se viabilizó en medio agar malta extracto de levadura proporcionado por el CINVESTAV en la ficha técnica que acompañaba la cepa, posterior siembra por estría e incubada en aerobiosis a 24°C por 24 y 48 horas, seguido de un estudio de la morfología microscópica observada en microscopio óptico con objetivos 10x, 40x y 100x.

3.2 ETAPA 2: Caracterización del Agua Almidonosa y Proliferación de la Levadura

3.2.1 Caracterización del agua residual almidonosa

Las aguas ricas en almidón, proporcionadas por la sección de agrotecnia del Departamento de Fitomejoramiento, se obtuvieron a partir de harina de trigo mezclada con agua en una proporción 2/1 para separar el gluten del almidón, obteniendo el almidón diluido en el agua del lavado en contenedores para su conservación y evitar que se contamine. Después de haber obtenido el agua almidonosa, se determinó la concentración de almidón, por un método espectrofotométrico a 620 nm.

3.2.2 Proliferación de *Saccharomyces diastaticus*

La proliferación de la levadura para iniciar la etapa de fermentación se llevó a cabo en un matraz erlenmeyer que contenía la formulación que se muestra en la cuadro No. 4, agregando una asada de la cepa en cada matraz, con la finalidad de tener una cantidad conocida de inóculo mediante el seguimiento de la velocidad de crecimiento cada hora, por medio de la escala modificada de McFarlan (Rangel, 2007); en la cual se manejó una longitud de onda de 400 nm. Esto debido a la coloración del medio, obtenida de un barrido en el espectrofotómetro registrando la mayor absorbancia del medio de proliferación.

Cuadro 4. Formulación del medio de proliferación para *S. diastaticus*

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	1.83 gramos
Extracto de malta	1.83 gramos
Glucosa	6.1 gramos
Peptona de soya	3.05 gramos
Agua destilada	610 mililitros

3.3 ETAPA 3: Fermentación

3.3.1 Preparación del medio

La preparación del medio de cultivo se muestra en el cuadro 5. El almidón que se obtuvo de la mezcla de harina de trigo con agua, contenía una concentración menor al momento de la separación del gluten, se realizó una evaporación para eliminar la mayor cantidad del líquido sin perder el almidón, para poder obtener la concentración de 2% al inicio de la fermentación.

Cuadro 5. Contenido del medio malta extracto de levadura con almidón como fuente de carbono

Ingredientes	Contenido
Almidón diluido	468 mililitros
Extracto de levadura	1.8 gramos
Extracto de malta	1.8 gramos
Peptona de soya	3 gramos

El pH del medio de cultivo se ajustó con ácido cítrico entre 4.2 y 4.3, posteriormente fue esterilizado en autoclave a una temperatura de 120°C y 15 lb de presión por 15 minutos.

3.3.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación

Los matraces esterilizados se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez inoculado el medio de cultivo, en condiciones de asepsia, se mantuvo a una temperatura de 24° a 27°C, tomando muestras cada 12 horas durante 96 horas evaluando:

- pH por medio de potenciometría, utilizando el potenciómetro HANNA HI-223.
- Sólidos solubles totales por refractometría utilizando el refractómetro manual marca ATAGO modelo ATC-1E

- Alcohol por el método de micro difusión modificado, utilizando como reactivos: dicromato de potasio, ácido sulfúrico, carbonato de potasio; en tubos de ensayo en ausencia de oxígeno al momento de iniciar la reacción, durante una hora (Anónimo 2, 2009).
- Almidón por el método espectrofotométrico con solución saturada de yodo y utilizando el espectrofotómetro Genesys UV-10 a una longitud de onda de 620 nm (Fernández, 2000).
- Azúcares totales utilizando fenol-sulfúrico como reactivo y posterior lectura de la reacción en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm (Dubois, 1956).
- Azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS) y lectura de la reacción en el espectrofotómetro a una longitud de 540 nm (Miller, 1960).
- Acidez titulable por titulación, utilizando hidróxido de potasio y fenolftaleína como indicador.

IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ETAPA 1: Obtención y Viabilización de la Levadura

4.1.1 Obtención de la cepa

La cepa de la levadura fue adquirida en el CINVESTAV y fue recibida con la siguiente información y en el cuadro 6 se muestra el medio de cultivo para la misma, incluido:

Numero CDBB: 708

Nombre: ***Saccharomyces diastaticus***

Descripción:

- Floclula

Aplicaciones

- Fermenta almidón

Medio de cultivo y Temperatura:

- Medio 17
- Temperatura: 24°C

Cuadro No.6: Medio agar malta extracto de levadura (YM)

Reactivos	Cantidad
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Peptona	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL.
Preparación: Esterilizar a 15 lbs/15'	

4.1.2 Morfología de la levadura

El crecimiento de la levadura en agar presentó colonias color crema, con consistencia cremosa y rápido crecimiento como se muestra en la figura 8.

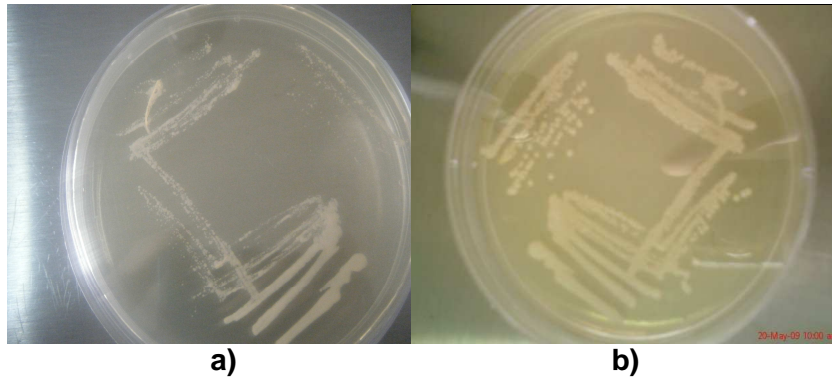


Figura 8. Crecimiento de *S. diastaticus* en agar malta extracto de levadura a las a)24 y b)48 horas.

Tomando una muestra de estas colonias para su observación microscópica y teñida con azul de metileno se puede ver que las colonias tienen forma ovalada y ancha como se muestra en la figura 9, concordando con lo reportado con García (2004).

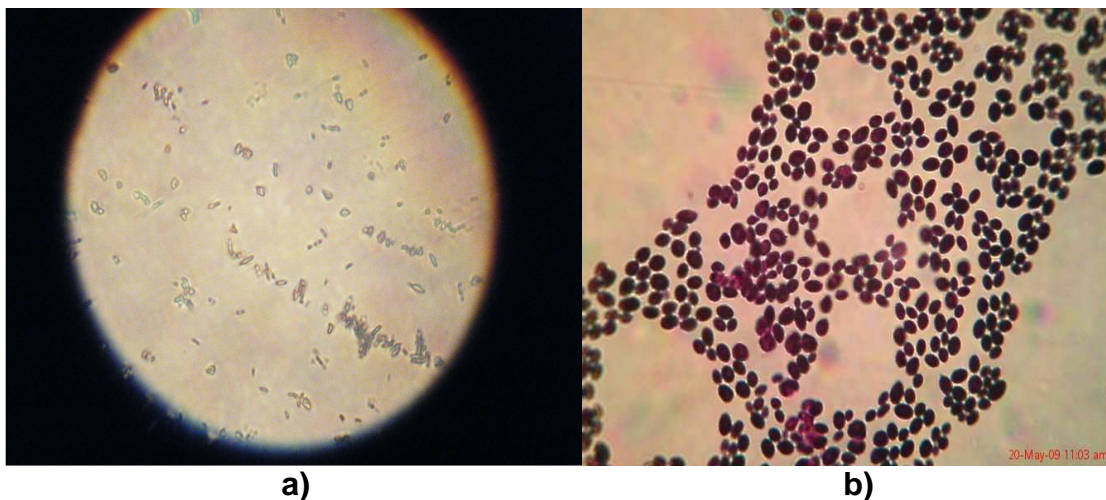


Figura 9: Observación microscópica de *S. diastaticus*, con objetivos a) 10x y b) 100x.

4.2. ETAPA 2: Caracterización del Agua Almidonosa y Proliferación de la Levadura

4.2.1 Caracterización del agua residual almidonosa

El agua residual proveniente de la obtención del gluten de trigo presentó un color amarillo claro debido a que el almidón contenido se precipitaba, al agitarse y tomar muestras para cuantificar la

concentración del mismo se presenta un amarillo opaco de consistencia lechosa con un promedio de almidón de 2. 626 g/lt.

4.2.2 Proliferación de *S. diastaticus*

La cuantificación del microorganismo se realizó en medio malta-extracto de levadura a 27° C por 15 horas para alcanzar una absorbancia cercana al tubo No. 4 de la escala McFarland modificada (Rangel, 2007), lográndose para *Saccharomyces diastaticus* una lectura de 0.527 equivalente a 1.10×10^6 ufc/ml. Lo anterior para tener un control de la biomasa durante la fermentación.

4.3 ETAPA 3: Fermentación

4.3.1 Preparación del medio

El contenido de almidón de los residuos obtenidos de la separación del gluten contenía una menor concentración del almidón de la que se necesitaba, por tal motivo se realizó una evaporación del líquido a una temperatura menor a 90°C para evitar la formación de geles; y la esterilización del medio provocó la liberación de azúcares más sencillos facilitando la actividad de la levadura sobre el sustrato.

4.3.2 Monitoreo de la fermentación

Realizada la inoculación del medio se llevó a cabo un monitoreo cada 12 horas para evaluar los siguientes parámetros: pH, almidón, azúcares totales, azúcares reductores y producción de etanol

4.3.2.1 pH

En la figura 10 se observa el comportamiento del pH, estadísticamente existe diferencia significativa, en base al análisis de t de

student, sin embargo los cambios que se muestran no afectan la actividad del sistema, ya que el rango de crecimiento óptimo de la levadura puede llegar hasta un valor de pH de 4.5.

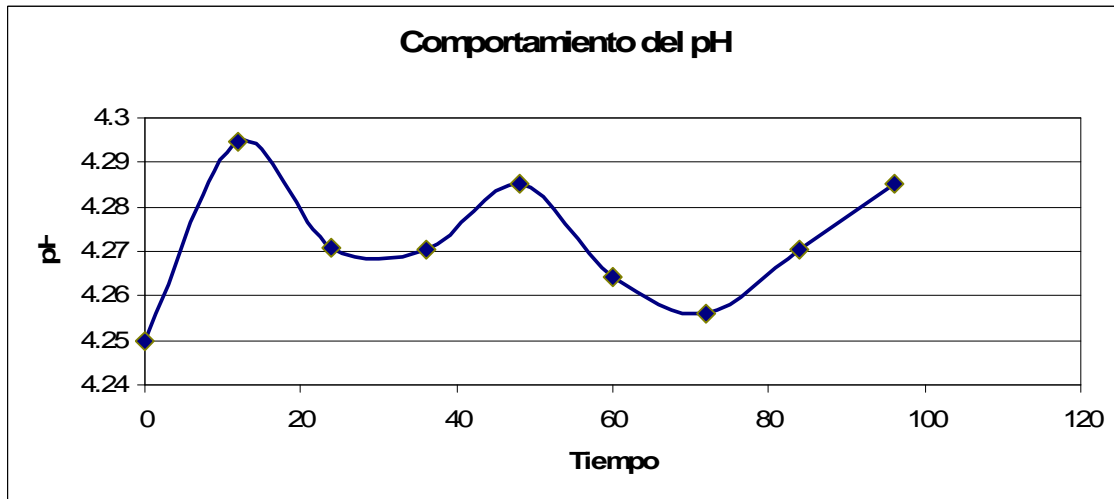


Figura 10. Comportamiento del pH en la fermentación.

Se inició a un pH de 4.2 y de acuerdo con Grisales (2002), este nivel actúa como agente precipitante de materia inorgánica y mantiene bajas las poblaciones de microorganismos contaminantes para la producción de etanol a partir de jugo de caña, manteniéndolo en un rango de 4.2-4.5, esto con el fin de permitir el óptimo desarrollo de levadura en el proceso de fermentación, concordando con Laluece y Mattoon (1984) pues de acuerdo a dicho estudio, los cambios en pH mayores a 4.5 afectan el crecimiento de la levadura.

4.3.2.2 Efecto de la esterilización sobre el agua almidonosa

El contenido de almidón antes de esterilizar el medio fue de 2%, sin embargo, el empleo de las altas temperaturas utilizadas en este paso provocó la licuefacción de los gránulos de almidón liberado disminuyendo la concentración del mismo, ocasionando que las cadenas poliméricas se degradaran y el medio presentara mayor cantidad de carbohidratos fácilmente

asimilables por la levadura. Debido a esto, las cadenas que no fueron degradadas en el paso anterior quedaran como reserva.

4.3.2.3 Monitoreo del comportamiento de almidón y azúcares durante la cinética de fermentación

Al inicio de la cinética se tiene una concentración baja de almidón debido al efecto antes descrito durante la esterilización como se muestra en la figura 11 partiendo de 0.1%, en donde a las primeras 12 horas se observa un mínimo consumo debido a que la cepa se adapta al medio a partir de las 12 hasta las 36 horas, y después de este período se observa la acción de las enzimas extracelulares sobre el almidón.

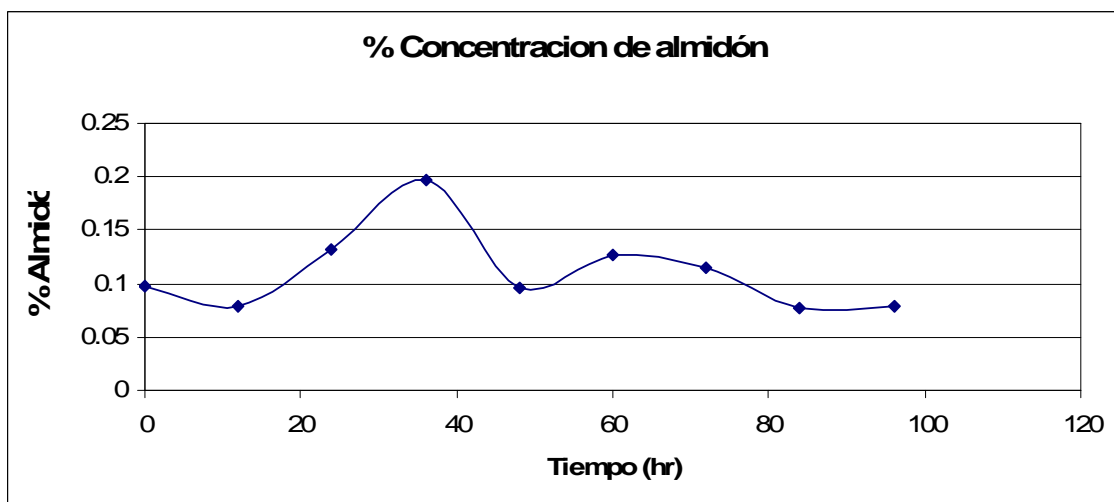


Figura 11. Seguimiento del consumo de almidón

Se puede observar que al inicio hay mayor presencia de azúcares simples (figuras 12 y 13) fácilmente metabolizados por el microorganismo; sin embargo, al llegar a las 24 horas la cantidad de azúcares disminuye, provocando que la levadura, no teniendo más sustrato fácilmente asimilable, empiece a sintetizar glucoamilasas que actúan sobre las cadenas de almidón a partir de las 24 horas hasta las 72, debido a la acción de estas, como menciona Roma (2002).

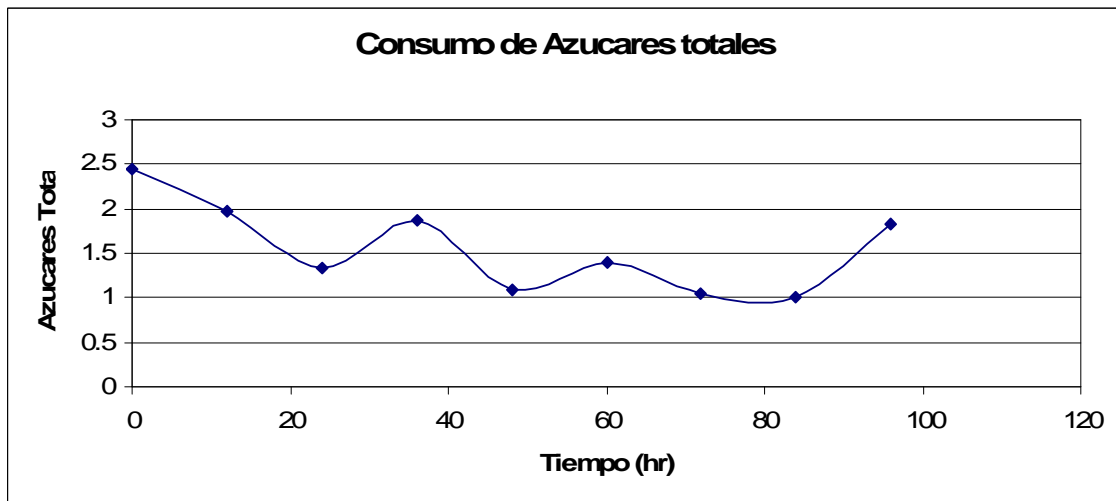


Figura 12. Comportamiento de los azucares totales.

En la figuras 12 y 13 se observa detalladamente el comportamiento del consumo de azúcares. Los decrementos se deben al consumo de azúcares y los incrementos son ocasionados por la actividad de la enzima en la degradación del sustrato; donde atribuyen este comportamiento a la producción de enzimas extracelulares que son liberadas por el microorganismo para poder asimilar el sustrato al interior de la célula para su posterior metabolismo de acuerdo con Laluce y Matoon (1984) concordando con Roma (2002).

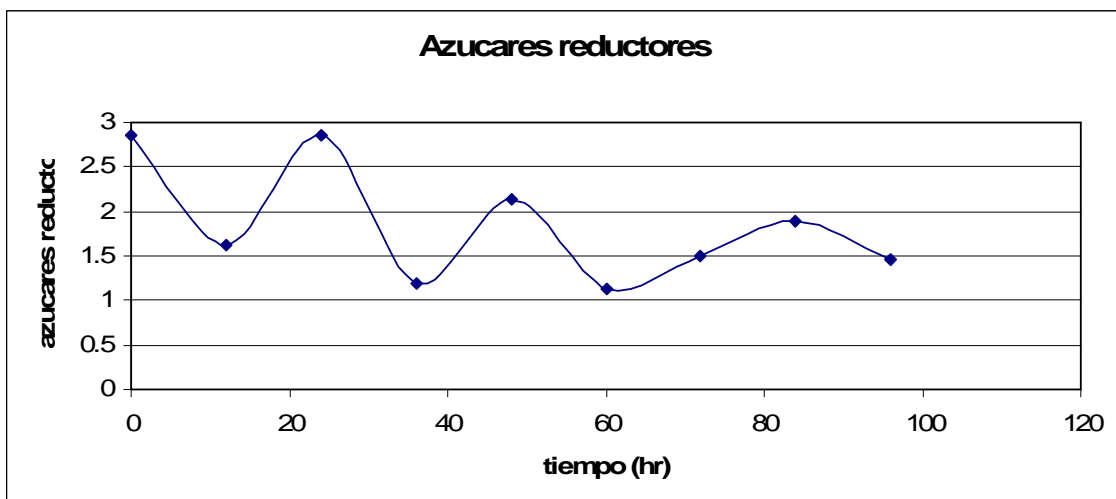


Figura 13. Comportamiento de los azucares reductores durante las fermentación

4.3.2.3 Producción de etanol

De acuerdo a la figura 14, al inicio de la fermentación se observa que hay un rápido incremento en la producción de etanol hasta las 24 horas, debido a la asimilación de los carbohidratos simples liberados durante la esterilización del medio; después de este periodo se observa un decremento de la producción, debido a que la levadura ha consumido todos los azúcares sencillos y debe producir enzima para degradar las cadenas de carbohidratos poliméricos aun presentes en el medio para poder metabolizarlas, obtener moléculas simples y seguir produciendo etanol.

A partir de las 24 hasta las 72 horas se observan ligeros incrementos y caídas en la producción, ya que la levadura se dedica principalmente a la síntesis de enzimas extracelulares; y a partir de las 72 horas el microorganismo tiene suficientes azúcares fácilmente asimilables, lo que provoca un aumento rápido en la producción de etanol, llegando a su punto de mayor producción a las 84 horas.

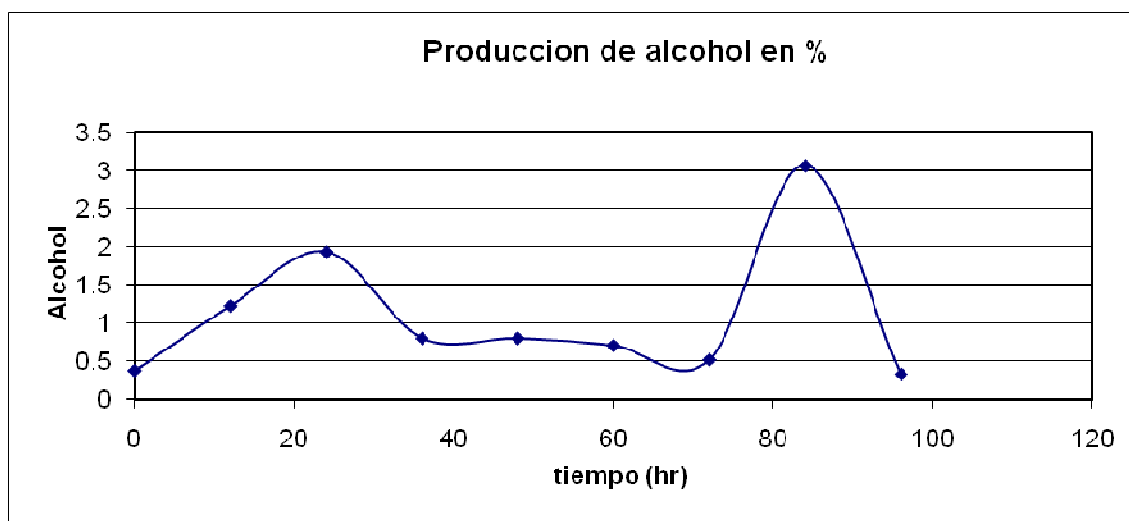


Figura 14. Seguimiento de la producción de etanol durante la fermentación.

Este estudio concuerda con Laluce y Matoon (1984), en la obtención de etanol a partir de diferentes medios que contienen como fuente de carbono al almidón.

V. CONCLUSIONES

Los residuos obtenidos de las industrias agroalimentarias, como la de procesamiento industrial de cereales, son una fuente aprovechable para la producción de etanol.

Las aguas residuales de la industria de obtención de gluten de trigo, se pueden utilizar en la producción de etanol ya que tiene las características para utilizarla como materia prima sin la necesidad de tratamientos previos a la fermentación con *S. diastaticus*, reduciendo el tiempo del proceso.

La utilización de estos residuos reduce el impacto que causa al ambiente.

Se debe tener un control de las condiciones de la fermentación (pH, temperatura) ya que estos afectan la producción de etanol, obteniéndose productos secundarios.

La máxima producción de etanol se alcanza a las 84 horas bajo condiciones de temperatura promedio de 27°C y un pH promedio de 4.2-4.3.

Después de este periodo la producción disminuye, debido a que la levadura empieza a consumir el etanol como fuente de obtención de energía.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Andrews J. and Gilliland R.B. 1952. super-attenuation of beer: a study of organisms capable of Rausing abnormal attenuations, *J. Inst. Brew.*

Anónimo 1. 2006. Memorias cereales (offline). Disponible en: <http://www.qui.reduc.edu.cu>

Anónimo 2. 2009. (offline). Disponible en: http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_1/etanol.html

Antón F. A. 1992. Compostaje de los residuos orgánicos: Urbanos y Agrarios. I Problemática de los residuos orgánicos. Cuadernos de Fitopatología 1, Septiembre

Badui. D. S. 1999. Química de los Alimentos. Pearson Education. 3ª edición. México.

Benítez, T., Martínez-Force, E., Jiménez, J. and Aguilera, A. 1992. Production of ethanol by yeast. *In: Handbook of applied mycology fungal biotechnology*. Edited Arora, D., Elander, R.P., Mukerji, K.G.v.4.

Brackett RE. 1997. Fruits, vegetables, and grains. en: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle MP *et al.*, ed. ASM Press, Washington.

Camps Michelena Manuel, Marcos Martin Francisco. 2002. Colección energías renovables. Los biocombustibles. Ediciones Mundi-Prensa. Mexico, D.F.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 7 de mayo 2008. Colección Nacional de Cepas

Microbianas y Cultivos Celulares. Boletín técnico *Saccharomyces diastaticus* México D.F.

Costa F., García C., Hernández T., Polo A. 1991. Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. CSIC.

Carro D. y Piña B. 2001. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. *ACE Revista de Enología*.

D'Amore, T. Y G.G. Stewart. 1987. "Ethanol tolerance in yeasts", *Enzyme Microbial Technol.*

Déak T, Beuchat LR. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Domínguez-Espinosa R. María, Wang Ruohang, Pacho-Carrillo J. Daniel. 2002. Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnol. Ciencia ed. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.*

Dubois M; Giles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances analytical chemistry. 28

Escudé Sánchez Alberto I. Producción de ácido cítrico a partir de aguas residuales con altos contenidos de almidón mediante fermentación de *Aspergillus niger* unigras 0007 ASP HSA utilizando microorganismos libres e inmovilizados. Tesis. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México.

Fernández- Reyes, J. F. 2000. Actividad α -amilasa en tortillas de maíz con diferentes concentraciones de calcio. Tesis de licenciatura. Departamento de Investigación de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México.

FNB. 2004 ABC de los Alcoholes Carburantes. Federación Nacional de Biocombustibles. www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf/0/6ac

Fonolla 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.*

Forgaty, W. M. and Kelly, C.T. 1979. Starch degrading enzymes of microbial origin. *Part I. Distribution and characteristics. Prog. Indust. Microbiol. M.J. Bull.*

García Garibay. Et. Al. Coordinadores. 2004. *Biología Alimentaria.* Limusa Noriega editores. México.

García Garibay, M. Et al. 1977. Informe técnico de desarrollo y transferencia de tecnología. UNAM, México.

Gaytán Sánchez N. 2007. 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. Tesis. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México.

González Merino Arcelia, Castañeda Zavala Yolanda. 2008. *Biocombustibles, biotecnología y alimentos. Impactos sociales para México. Argumentos (Méx.). Vol. 21 num. 57.*

Grisales Paola Andrea, Ríos L. Andrés y Triana Mauricio. Diseño de un proceso de producción de etanol anhidro a partir de jugo de caña. Universidad de Valle.

Guardado Jordi, Estela. 2006. Almidones de los cereales nativos y modificados: propiedades y aplicaciones en la alimentación. Disponible en <http://www.qui.reduc.edu.cu>

Hader I., Castaño P., E. Carlos, Mejía G. 2008. Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultánea (SSF). Revista de de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 15 num. 2. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

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.

Jones R. P., N. Pamment y P.F. Greenfield. 1981. "Alcohol fermentation by yeast. The effect of environmental and other variables". Process Biochem.

Kruger-van-Ril, N.J.W. 1984. The yeasts. A taxonomic study, Elsevier, Amsterdam.

Laluce Cecilia y Mattoon James R. 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of Starch and dextrans to ethanol. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology.

Latorre Garcia, Lorena. 2007. Analisis estructural y modificacion funcional de la glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* variedad *diastaticus*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. España.

Lázaro L., Arauzo J. 1994. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Zubia.

Lin y Tanaka S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Madson PW, Monceaux DA. 1995. Fuel ethanol production. En Lyons TP, Kelsall DR, Murtagh JE (Eds.). The Alcohol Textbook. Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Masera Cerutti Omar (coordinador). 2006. La bioenergía en México. Un catalizador del desarrollo sustentable. Red mexicana de bioenergía, A.C. Mundi-Prensa. México, D.F.

Miller, G.L. 1960 "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars". Analytical Chemical.

Nishihara H., Toraya T. y S. Fukui. 1982." Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzyme treatments" arch. Microbiol.

Nishihara, H. Y Toraya, T. 1987,"Essential roles of cell surface protein and carbohydrate components in flocculation of a brewer's yeast". Agric. Biol. Chem.

Ostolaza M. 1998. Aprovechamiento Energético de residuos Orgánicos. Ingeniería Química.

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D y Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem.

Potter Norman N. y Hotchkiss Joseph H. 1995. Ciencia de los alimentos. Edición en español: editorial Acribia S.A. Zaragoza, España

Rangel Ortega, Sarahi del C. 2007. Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) como antimicrobiano contra patógenos anaerobios alimentarios. Tesis. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México.

Roma Lorena, Ferrari Miriam y Orejas Joaquín. Producción de *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* en un biorreactor de tanque agitado. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina.

Rose A.H. 1980. "Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*", Biology and activities of yeasts, F.A. Skinner S.M. Passmore y R.R. Davenport (comps). Academic press, Londres.

Ruiz Díaz Gabino. 2007. Etanol, biocombustible alterno. Monografía. UAAAN. Saltillo, Coahuila. México.

Sakai T., Koo K-I., Saitoh k. and Katsuragi T. 1986. Use of protoplast fusion for the development of rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* , *Agric. Biol. Chem.* v. 50.

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.

Serna Zaldívar Sergio R. Othon. 2001. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editor, S.A. México, D.F.

Synowiecki J. 2007. The use of Starch processing enzymes in the food industry. En *Industrial Enzymes*. Editado por J Polaina y A MacCabe. Springer. Dordrecht, The Netherlands.

V. Viniegra, O. Sierra, J. I. Jauregui. 2002. Gestión y tratamiento de residuos sólidos orgánicos de la industria de transformados vegetales.

Wang, F. S. and Sheu, J. W. 2000. Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast, *Chemical Engineering Science.* v. 55.

ANEXOS

ANEXO 1: Perfil bioquímico de la cepa *Saccharomyces diastaticus* proporcionado por el CINVESTAV.

Perfil bioquímico 24 horas

PRUEBA	REACCION	RESULTADO
GLU	D-glucosa	+
GLY	Glicerol	-
2KG	2-Keto-D-Gluconato	-
ARA	L-Arabinosa	-
XYL	D-Xilosa	-
ADO	Adoitol	-
XLT	Xilitol	-
GAL	Galactosa	+
INO	Inositol	-
SOR	Sorbitol	-
MDG	α -Metil-D-Glucósido	-
NAG	N-Acetil-D-Glucosamina	-
CEL	Celobiosa	W
LAC	Lactosa	-
MAL	Maltosa	+
SAC	Sacarosa	+
TRE	Trealosa	
MLZ	Melizitosa	
RAF	Rafinosa	+*

W= reacción débil o negativa a las 48 horas

*Prueba de RAF positiva a las 48 horas

ANEXO 2: Análisis t-student del comportamiento de pH

Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	0	12	24	36	48	60	72	84	96
0	0	-0.0448	-0.021	-0.0205	-0.0353	-0.0145	-0.0063	-0.0205	-0.0352
	0	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861
	0	-0.0628	-0.0391	-0.0386	-0.0533	-0.0326	-0.0243	-0.0386	-0.0533
	0	-0.0267	-0.0029	-0.0024	-0.0172	0.00358	0.01183	-0.0024	-0.0172
12	0.04475	0	0.02375	0.02425	0.0095	0.03025	0.0385	0.02425	0.0095
	0.00861	0	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861
	0.02667	0	0.00567	0.00617	-0.0086	0.01217	0.02042	0.00617	-0.0086
	0.06283	0	0.04183	0.04233	0.02758	0.04833	0.05658	0.04233	0.02758
24	0.021	-0.0238	0	0.0005	-0.0143	0.0065	0.01475	0.0005	-0.0142
	0.00861	0.00861	0	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861
	0.00292	-0.0418	0	-0.0176	-0.0323	-0.0116	-0.0033	-0.0176	-0.0323
	0.03908	-0.0057	0	0.01858	0.00383	0.02458	0.03283	0.01858	0.00383
36	0.0205	-0.0242	-0.0005	0	-0.0147	0.006	0.01425	8.9e-16	-0.0147
	0.00861	0.00861	0.00861	0	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861
	0.00242	-0.0423	-0.0186	0	-0.0328	-0.0121	-0.0038	-0.0181	-0.0328
	0.03858	-0.0062	0.01758	0	0.00333	0.02408	0.03233	0.01808	0.00333
48	0.03525	-0.0095	0.01425	0.01475	0	0.02075	0.029	0.01475	8.9e-16
	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861
	0.01717	-0.0276	-0.0038	-0.0033	0	0.00267	0.01092	-0.0033	-0.0181
	0.05333	0.00858	0.03233	0.03283	0	0.03883	0.04708	0.03283	0.01808
60	0.0145	-0.0303	-0.0065	-0.006	-0.0208	0	0.00825	-0.006	-0.0207
	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0	0.00861	0.00861	0.00861
	-0.0036	-0.0483	-0.0246	-0.0241	-0.0388	0	-0.0098	-0.0241	-0.0388
	0.03258	-0.0122	0.01158	0.01208	-0.0027	0	0.02633	0.01208	-0.0027
72	0.00625	-0.0385	-0.0147	-0.0143	-0.029	-0.0082	0	-0.0142	-0.029
	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0	0.00861	0.00861
	-0.0118	-0.0566	-0.0328	-0.0323	-0.0471	-0.0263	0	-0.0323	-0.0471
	0.02433	-0.0204	0.00333	0.00383	-0.0109	0.00983	0	0.00383	-0.0109
84	0.0205	-0.0243	-0.0005	-9e-16	-0.0148	0.006	0.01425	0	-0.0147
	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0	0.00861
	0.00242	-0.0423	-0.0186	-0.0181	-0.0328	-0.0121	-0.0038	0	-0.0328
	0.03858	-0.0062	0.01758	0.01808	0.00333	0.02408	0.03233	0	0.00333
96	0.03525	-0.0095	0.01425	0.01475	-9e-16	0.02075	0.029	0.01475	0
	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0.00861	0
	0.01717	-0.0276	-0.0038	-0.0033	-0.0181	0.00267	0.01092	-0.0033	0
	0.05333	0.00858	0.03233	0.03283	0.01808	0.03883	0.04708	0.03283	0

Level		Least Sq Mean
12	A	4.2945000
48	A B	4.2850000
96	A B	4.2850000
24	B C	4.2707500
36	B C	4.2702500
84	B C	4.2702500
60	C D	4.2642500
72	C D	4.2560000
0	D	4.2497500

ANEXO 3: Análisis t- student de para la concentración de almidón

Mean[i]-Mean[j]	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Std Err Dif									
Lower CL Dif									
Upper CL Dif									
0	0	0.01875	-0.0333	-0.0993	0.00219	-0.0282	-0.0172	0.02045	0.01908
	0	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537
	0	0.00747	-0.0446	-0.1106	-0.0091	-0.0395	-0.0284	0.00917	0.0078
	0	0.03002	-0.022	-0.088	0.01347	-0.0169	-0.0059	0.03172	0.03035
12	-0.0187	0	-0.052	-0.118	-0.0166	-0.0469	-0.0359	0.0017	0.00033
	0.00537	0	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537
	-0.03	0	-0.0633	-0.1293	-0.0278	-0.0582	-0.0472	-0.0096	-0.0109
	-0.0075	0	-0.0407	-0.1067	-0.0053	-0.0356	-0.0246	0.01298	0.0116
24	0.03327	0.05202	0	-0.066	0.03547	0.0051	0.01612	0.05372	0.05235
	0.00537	0.00537	0	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537
	0.022	0.04075	0	-0.0773	0.02419	-0.0062	0.00484	0.04245	0.04108
	0.04455	0.0633	0	-0.0547	0.04674	0.01637	0.02739	0.065	0.06363
36	0.09928	0.11802	0.066	0	0.10147	0.0711	0.08212	0.11972	0.11835
	0.00537	0.00537	0.00537	0	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537
	0.088	0.10675	0.05473	0	0.09019	0.05982	0.07084	0.10845	0.10708
	0.11055	0.1293	0.07728	0	0.11274	0.08238	0.09339	0.131	0.12963
48	-0.0022	0.01656	-0.0355	-0.1015	0	-0.0304	-0.0194	0.01825	0.01688
	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537
	-0.0135	0.00528	-0.0467	-0.1127	0	-0.0416	-0.0306	0.00698	0.00561
	0.00908	0.02783	-0.0242	-0.0902	0	-0.0191	-0.0081	0.02953	0.02816
60	0.02818	0.04692	-0.0051	-0.0711	0.03037	0	0.01102	0.04862	0.04725
	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0	0.00537	0.00537	0.00537
	0.0169	0.03565	-0.0164	-0.0824	0.01909	0	-0.0003	0.03735	0.03598
	0.03945	0.0582	0.00618	-0.0598	0.04165	0	0.02229	0.0599	0.05853
72	0.01716	0.03591	-0.0161	-0.0821	0.01935	-0.011	0	0.03761	0.03624
	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0	0.00537	0.00537
	0.00588	0.02463	-0.0274	-0.0934	0.00808	-0.0223	0	0.02633	0.02496
	0.02843	0.04718	-0.0048	-0.0708	0.03063	0.00026	0	0.04888	0.04751
84	-0.0204	-0.0017	-0.0537	-0.1197	-0.0183	-0.0486	-0.0376	0	-0.0014
	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0	0.00537
	-0.0317	-0.013	-0.065	-0.131	-0.0295	-0.0599	-0.0489	0	-0.0126
	-0.0092	0.00958	-0.0424	-0.1084	-0.007	-0.0373	-0.0263	0	0.00991
96	-0.0191	-0.0003	-0.0524	-0.1184	-0.0169	-0.0473	-0.0362	0.00137	0
	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0.00537	0
	-0.0304	-0.0116	-0.0636	-0.1296	-0.0282	-0.0585	-0.0475	-0.0099	0
	-0.0078	0.01095	-0.0411	-0.1071	-0.0056	-0.036	-0.025	0.01265	0

Level		Least Sq Mean
36	A	0.19745642
24	B	0.13145488
60	B	0.12635676
72	C	0.11533823
0	D	0.09818002
48	D	0.09598728
12	E	0.07943208
96	E	0.07910317
84	E	0.07773270

ANEXO 4: Análisis t-student para el consumo de azúcares totales

Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	0	12	24	36	48	60	72	84	96
0	0	0.47156	1.09732	0.56301	1.34655	1.04174	1.38779	1.44517	0.62038
	0	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335
	0	0.40149	1.02725	0.49294	1.27648	0.97167	1.31772	1.3751	0.55031
	0	0.54163	1.16739	0.63308	1.41662	1.11181	1.45786	1.51524	0.69045
12	-0.4716	0	0.62576	0.09144	0.87499	0.57018	0.91623	0.97361	0.14882
	0.03335	0	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335
	-0.5416	0	0.55569	0.02137	0.80492	0.50011	0.84616	0.90354	0.07875
	-0.4015	0	0.69583	0.16151	0.94506	0.64025	0.9863	1.04368	0.21889
24	-1.0973	-0.6258	0	-0.5343	0.24923	-0.0556	0.29047	0.34784	-0.4769
	0.03335	0.03335	0	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335
	-1.1674	-0.6958	0	-0.6044	0.17916	-0.1257	0.2204	0.27777	-0.547
	-1.0273	-0.5557	0	-0.4642	0.3193	0.01449	0.36054	0.41791	-0.4069
36	-0.563	-0.0914	0.53432	0	0.78355	0.47873	0.82479	0.88216	0.05738
	0.03335	0.03335	0.03335	0	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335
	-0.6331	-0.1615	0.46425	0	0.71348	0.40866	0.75472	0.81209	-0.0127
	-0.4929	-0.0214	0.60439	0	0.85362	0.5488	0.89486	0.95223	0.12745
48	-1.3466	-0.875	-0.2492	-0.7835	0	-0.3048	0.04124	0.09862	-0.7262
	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335
	-1.4166	-0.9451	-0.3193	-0.8536	0	-0.3749	-0.0288	0.02855	-0.7962
	-1.2765	-0.8049	-0.1792	-0.7135	0	-0.2347	0.11131	0.16869	-0.6561
60	-1.0417	-0.5702	0.05558	-0.4787	0.30481	0	0.34605	0.40343	-0.4214
	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0	0.03335	0.03335	0.03335
	-1.1118	-0.6402	-0.0145	-0.5488	0.23474	0	0.27598	0.33336	-0.4914
	-0.9717	-0.5001	0.12565	-0.4087	0.37488	0	0.41612	0.4735	-0.3513
72	-1.3878	-0.9162	-0.2905	-0.8248	-0.0412	-0.3461	0	0.05738	-0.7674
	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0	0.03335	0.03335
	-1.4579	-0.9863	-0.3605	-0.8949	-0.1113	-0.4161	0	-0.0127	-0.8375
	-1.3177	-0.8462	-0.2204	-0.7547	0.02883	-0.276	0	0.12745	-0.6973
84	-1.4452	-0.9736	-0.3478	-0.8822	-0.0986	-0.4034	-0.0574	0	-0.8248
	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0	0.03335
	-1.5152	-1.0437	-0.4179	-0.9522	-0.1687	-0.4735	-0.1274	0	-0.8949
	-1.3751	-0.9035	-0.2778	-0.8121	-0.0285	-0.3334	0.01269	0	-0.7547
96	-0.6204	-0.1488	0.47694	-0.0574	0.72617	0.42136	0.76741	0.82479	0
	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0.03335	0
	-0.6905	-0.2189	0.40687	-0.1274	0.6561	0.35129	0.69734	0.75472	0
	-0.5503	-0.0788	0.54701	0.01269	0.79624	0.49143	0.83748	0.89486	0

Level		Least Sq Mean
0	A	2.4428746
12	B	1.9713118
36	C	1.8798680
96	C	1.8224916
60	D	1.4011332
24	D	1.3455497
48	E	1.0963207
72	E F	1.0550814
84	F	0.9977049

ANEXO 5: Análisis t-student para el consumo de azúcares reductores

Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	0	12	24	36	48	60	72	84	96
0	0	1.23589	0.00209	1.66545	0.71279	1.72241	1.35138	0.97304	1.39057
	0	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
	0	1.23192	-0.0019	1.66147	0.70882	1.71843	1.3474	0.96906	1.3866
	0	1.23987	0.00607	1.66942	0.71677	1.72638	1.35535	0.97701	1.39455
12	-1.2359	0	-1.2338	0.42956	-0.5231	0.48652	0.11549	-0.2629	0.15468
	0.00189	0	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
	-1.2399	0	-1.2378	0.42558	-0.5271	0.48254	0.11151	-0.2668	0.15071
	-1.2319	0	-1.2298	0.43353	-0.5191	0.49049	0.11946	-0.2589	0.15866
24	-0.0021	1.2338	0	1.66336	0.7107	1.72032	1.34929	0.97094	1.38848
	0.00189	0.00189	0	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
	-0.0061	1.22982	0	1.65938	0.70673	1.71634	1.34531	0.96697	1.38451
	0.00189	1.23778	0	1.66733	0.71468	1.72429	1.35326	0.97492	1.39246
36	-1.6654	-0.4296	-1.6634	0	-0.9527	0.05696	-0.3141	-0.6924	-0.2749
	0.00189	0.00189	0.00189	0	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
	-1.6694	-0.4335	-1.6673	0	-0.9566	0.05299	-0.318	-0.6964	-0.2788
	-1.6615	-0.4256	-1.6594	0	-0.9487	0.06094	-0.3101	-0.6884	-0.2709
48	-0.7128	0.5231	-0.7107	0.95265	0	1.00962	0.63859	0.26024	0.67778
	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
	-0.7168	0.51912	-0.7147	0.94868	0	1.00564	0.63461	0.25627	0.6738
	-0.7088	0.52707	-0.7067	0.95663	0	1.01359	0.64256	0.26422	0.68176
60	-1.7224	-0.4865	-1.7203	-0.057	-1.0096	0	-0.371	-0.7494	-0.3318
	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0	0.00189	0.00189	0.00189
	-1.7264	-0.4905	-1.7243	-0.0609	-1.0136	0	-0.375	-0.7533	-0.3358
	-1.7184	-0.4825	-1.7163	-0.053	-1.0056	0	-0.3671	-0.7454	-0.3279
72	-1.3514	-0.1155	-1.3493	0.31407	-0.6386	0.37103	0	-0.3783	0.03919
	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0	0.00189	0.00189
	-1.3554	-0.1195	-1.3533	0.31009	-0.6426	0.36705	0	-0.3823	0.03522
	-1.3474	-0.1115	-1.3453	0.31804	-0.6346	0.375	0	-0.3744	0.04317
84	-0.973	0.26286	-0.9709	0.69241	-0.2602	0.74937	0.37834	0	0.41754
	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0	0.00189
	-0.977	0.25888	-0.9749	0.68844	-0.2642	0.7454	0.37437	0	0.41356
	-0.9691	0.26683	-0.967	0.69639	-0.2563	0.75335	0.38232	0	0.42151
96	-1.3906	-0.1547	-1.3885	0.27487	-0.6778	0.33184	-0.0392	-0.4175	0
	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0
	-1.3945	-0.1587	-1.3925	0.2709	-0.6818	0.32786	-0.0432	-0.4215	0
	-1.3866	-0.1507	-1.3845	0.27885	-0.6738	0.33581	-0.0352	-0.4136	0

Level		Least Sq Mean
0	A	2.8547241
24	A	2.8526338
48	B	2.1419314
84	C	1.8816890
12	D	1.6188336
72	E	1.5033445
96	F	1.4641513
36	G	1.1892768
60	H	1.1323161

ANEXO 6: Análisis t- student para la producción de Etanol

Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	0	12	24	36	48	60	72	84	96
0	0	-0.8491	-1.5566	-0.4245	-0.4245	-0.3302	-0.1415	-2.6887	0.04717
	0	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696
	0	-1.4155	-2.123	-0.9909	-0.9909	-0.8966	-0.7079	-3.2551	-0.5192
	0	-0.2827	-0.9902	0.14188	0.14188	0.23622	0.42489	-2.1223	0.61357
12	0.84906	0	-0.7075	0.42453	0.42453	0.51887	0.70755	-1.8396	0.89623
	0.2696	0	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696
	0.28265	0	-1.274	-0.1419	-0.1419	-0.0475	0.14114	-2.406	0.32982
	1.41546	0	-0.1411	0.99093	0.99093	1.08527	1.27395	-1.2732	1.46263
24	1.5566	0.70755	0	1.13208	1.13208	1.22642	1.41509	-1.1321	1.60377
	0.2696	0.2696	0	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696
	0.9902	0.14114	0	0.56567	0.56567	0.66001	0.84869	-1.6985	1.03737
	2.12301	1.27395	0	1.69848	1.69848	1.79282	1.9815	-0.5657	2.17018
36	0.42453	-0.4245	-1.1321	0	2.5e-10	0.09434	0.28302	-2.2642	0.4717
	0.2696	0.2696	0.2696	0	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696
	-0.1419	-0.9909	-1.6985	0	-0.5664	-0.4721	-0.2834	-2.8306	-0.0947
	0.99093	0.14188	-0.5657	0	0.5664	0.66074	0.84942	-1.6977	1.0381
48	0.42453	-0.4245	-1.1321	-3e-10	0	0.09434	0.28302	-2.2642	0.4717
	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696
	-0.1419	-0.9909	-1.6985	-0.5664	0	-0.4721	-0.2834	-2.8306	-0.0947
	0.99093	0.14188	-0.5657	0.5664	0	0.66074	0.84942	-1.6977	1.0381
60	0.33019	-0.5189	-1.2264	-0.0943	-0.0943	0	0.18868	-2.3585	0.37736
	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0	0.2696	0.2696	0.2696
	-0.2362	-1.0853	-1.7928	-0.6607	-0.6607	0	-0.3777	-2.9249	-0.189
	0.89659	0.04754	-0.66	0.47206	0.47206	0	0.75508	-1.7921	0.94376
72	0.14151	-0.7075	-1.4151	-0.283	-0.283	-0.1887	0	-2.5472	0.18868
	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0	0.2696	0.2696
	-0.4249	-1.274	-1.9815	-0.8494	-0.8494	-0.7551	0	-3.1136	-0.3777
	0.70791	-0.1411	-0.8487	0.28339	0.28339	0.37772	0	-1.9808	0.75508
84	2.68868	1.83962	1.13208	2.26415	2.26415	2.35849	2.54717	0	2.73585
	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0	0.2696
	2.12228	1.27322	0.56567	1.69775	1.69775	1.79209	1.98077	0	2.16944
	3.25508	2.40603	1.69848	2.83056	2.83056	2.92489	3.11357	0	3.30225
96	-0.0472	-0.8962	-1.6038	-0.4717	-0.4717	-0.3774	-0.1887	-2.7358	0
	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0.2696	0
	-0.6136	-1.4626	-2.1702	-1.0381	-1.0381	-0.9438	-0.7551	-3.3023	0
	0.51923	-0.3298	-1.0374	0.09471	0.09471	0.18905	0.37772	-2.1694	0

Level		Least Sq Mean
84	A	3.0660377
24	B	1.9339623
12	C	1.2264151
36	C D	0.8018868
48	C D	0.8018868
60	C D	0.7075472
72	D	0.5188679
0	D	0.3773585
96	D	0.3301887