

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**



Tesis:

**Sacarificación y fermentación de la cáscara de tuna
(*Opuntia streptacantha* L.) para producir bioetanol**

Presentada por:

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

Tesis para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

Sacarificación y fermentación de la cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha*
L) para producir bioetanol

Presentada por:

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

TESIS:

Que Se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito
Parcial Para Obtener Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



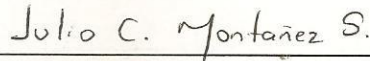
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Director



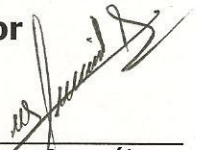
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Sinodal



Dr. Julio César Montañez Sáenz

Codirector



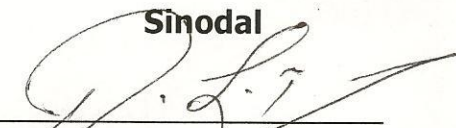
M.C. María Hernández González

Sinodal



M.C. Alberto Guerrero Rodríguez

Sinodal



Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador de la División de Ciencia



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2012

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas del proyecto "Producción y Cuantificación de actividades enzimáticas de interés industrial a partir de microorganismos aislados del rumen Bovino" con clave 02-03-0404-0219. El proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, bajo la convocatoria de proyectos especiales de investigación y por la Universidad Autónoma de Coahuila.

Los colaboradores de esta investigación son:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

M.C. Alberto Guerrero Rodríguez

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dr. Julio César Montañez Sáenz

M.C. Luz María Ramos Ponce

Ing. Lourdes Morales Oyervides



Lo siento, pero no quiero ser emperador. No es lo mío. No quiero gobernar ni conquistar a nadie. Me gustaría ayudar a todo el mundo. En este mundo hay sitio para todos, la buena tierra es rica y puede proveer a todos (...) Luchemos por un mundo de la razón, un mundo en el que la ciencia y el progreso lleven la felicidad a todos nosotros.

Charles Chaplin (1940) "El gran dictador"



AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por haberme dado una vida, llena de salud, bendiciones y alegrías, pero sobre todo por haberme dado la maravillosa familia, a la cual amo con todo mí ser. Gracias por permitirme llegar felizmente a este día y te pido que con tu luz me guíes y me acompañes siempre a lo largo de mi vida profesional.

A la hermosa "**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**", por todos los conocimientos que adquirí durante estos años, no me refiero necesariamente a cuestiones académicas, sino también a enseñanzas de vida que nos hacen crecer como persona, y que es en realidad lo que nos acompañara en todas nuestras acciones futuras. Gracias por permitirme ser parte de ti y por haberme formado como una profesionista no te defraudare.

A mi director de tesis, una de las personas que más admiro en la vida, la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por su valiosa cooperación en el desarrollo de este proyecto. Gracias, por su apoyo paciencia y disposición.

También quiero agradecer de manera muy especial al **Dr. Julio César Montañez Sáenz**, por haberme guiado en este trabajo, definitivamente sin su ayuda no hubiera sido posible la conclusión de este proyecto.

Al **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández** y a la **M.C. María Hernández González** por su apreciable tiempo y enseñanzas ofrecidas para la elaboración y revisión de este trabajo.



A la **M.C. Luz María Ramos Ponce** por apoyarme en el desarrollo de esta investigación, tus consejos y apoyo fueron de gran ayuda.

A la **Ing. Químico Lourdes Morales Oyervides**, por tenerme paciencia y enseñarme tantas cosas, definitivamente eres una persona admirable no solo porque eres muy inteligente sino también porque eres una gran persona. Nunca cambies lullú.

Al **M.C. Emilio Ochoa Reyes**, por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, gracias por ser una gran persona y sobre todo por ser un amigo y un ejemplo a seguir.

A los maestros del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, que compartieron conmigo sus conocimientos y contribuyeron en mi formación académica. En especial a la **Dra. Ma. De Lourdes Morales Caballero** por el apoyo que me brindo en los momentos más difíciles durante mi estancia en la Universidad y a la **M.C. María Hernández González** por su apoyo y por todo el conocimiento que me permitió aprender de ella.

A todos mis compañeros de generación, me fue muy grato compartir y aprender de ustedes, pero sobre todo a mis amigos (as): **Dolores Barranco Valle, Rosa Elena Guerra Olguín, Blanca Estela Hernández García, María Guadalupe Rodríguez Acosta, Guillermo Vargas Gallardo, Jesús Inocente Patricio Carrillo** y **Germán Cuapio Morales**, por el cariño y comprensión que me brindaron a lo largo de la carrera. y aunque cada uno de nosotros tomara rumbos distintos, saben que siempre los llevare en mi corazón y que nunca los olvidare.



DEDICATORIAS

Con amor y cariño a las personas más maravillosas del mundo mis padres:

Sra. Jsidora Arellano Sánchez

Sr. Alfredo Velázquez Cárdenas

Gracias por apoyarme incondicionalmente, lo cual me ha ayudado a concluir mis sueños, soy afortunada siempre al contar con su amor, comprensión y ejemplo. En todo momento de mi vida han sido participes y colaboradores de mis metas y propósitos. El objetivo logrado es de ustedes y la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A mis hermanas: **Gabriela, María Elena y Elandia**, gracias por ser mis mejores amigas, por su compañía y apoyo incondicional, en todo momento de mi vida, las quiero mucho. A mí cuñado favorito **Julio Cesar Olalde Naranjo**, por su ayuda y apoyo en los momentos más difíciles.

A mis hermanos: **Juan Carlos y Víctor Manuel** y a mi sobrino **Juan Antonio**, gracias mis amores chiquitos por ser tan lindos y cuidarme siempre, son un gran apoyo lo cual me inspira para seguir.

Al amor de mi vida: **Adolfo Baylon Palomino**, gracias por tu apoyo incondicional, por darme siempre consejos, hacerme sonreír, gracias por tu amor. Te deseo el mayor éxito del mundo en todo lo que hagas y sobre todo que seas feliz.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	5
1.3 HIPÓTESIS.....	6
1.4 OBJETIVOS.....	7
1.4.1 GENERAL	7
1.4.2 ESPECÍFICOS	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 Biocombustibles	8
2.1.1 Biocombustibles líquidos	9
2.1.1.1 Biocombustibles líquidos de primera generación	10
2.1.1.2 Biocombustibles líquidos de segunda generación	10
2.1.1.3 Biocombustibles líquidos de tercera generación	10
2.2 Producción mundial de bioetanol	12

2.2.1	Importancia del etanol a nivel mundial	13
2.3	Materia prima para la producción de bioetanol	14
2.4	Nopal.....	18
2.4.1	Clasificación taxonómica de la tuna	18
2.4.2	Producción nacional y comparativa a nivel mundial	19
2.5	Producción de tuna en México.....	20
2.5.1	Principales especies	22
2.5.2	Distribución Geográfica	22
2.6	Nopal cardón (<i>Opuntia streptacantha</i> L.)	23
2.6.1	Usos y aplicaciones de la tuna del nopal cardón.....	24
2.7	Etanol lignocelulósico	27
2.7.1	Composición de biomasa lignocelulósica	27
2.7.1.1	Celulosa	28
2.7.1.2	Hemicelulosa	29
2.7.1.3	Lignina.....	30
2.8	Hidrólisis	31
2.8.1	Pretratamiento de explosión por vapor	31

2.8.2	Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento	32
2.9	Proceso de fermentación	33
2.9.1	Alcance de los procesos de fermentación	35
2.9.2	Composición elemental del medio de fermentación	35
2.10	Microorganismos productores de de bioetanol	36
2.10.1	Características de un microorganismo productor de bioetanol...	38
2.11	Saccharomyces cerevisiae	39
2.11.1	Características morfológicas	41
2.11.2	Propiedades fisiológicas	42
2.11.2.1	Presencia de oxígeno.....	42
2.11.2.2	Temperatura	42
2.11.2.3	pH.....	43
2.11.3	Reproducción	44
2.11.4	Metabolismo	45
2.12	Zimomonas mobilis.....	46
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
	ETAPA I: PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	48

3.1 Pelado de la tuna y secado de la cáscara	48
3.1.1 Separación de la semilla.....	49
3.1.2 Hidrolisis de la pared celular de la cáscara de tuna	49
ETAPA II. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	50
3.2 Análisis de la composición proximal	50
3.2.1 Determinación del contenido de materia seca total o sólidos totales (Método termogravimétrico, AOAC).....	50
3.2.2 Determinación del contenido de cenizas totales (AOAC).....	50
3.2.3 Determinación del contenido de grasa total o extracto etéreo (Método Soxhlet, AOAC).	50
3.2.4 Determinación del contenido de proteína bruta (Método Kjeldhal). 50	50
3.2.5 Determinación del contenido de fibra cruda (Método termogravimétrico, AOAC).....	50
3.2.6 Determinación de fibra detergente neutro (FDN).....	50
3.2.7 Determinación de fibra detergente ácido (FDA).	51
3.2.8. Determinación de azúcares totales (Método fenol-sulfúrico).....	51
3.2.8 Determinación de azúcares reductores (Método Acido 3,5- Dinitrosalicílico, DNS).	52

ETAPA III. SACARIFICACIÓN ACIDA Y CON VAPOR DE LA CÁSCARA DE TUNA.....	53
3.3 Sacarificación con H₂SO₄ diluido	53
3.3.1 Cinética de sacarificación por explosión con vapor.....	53
ETAPA IV. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	54
3.4 Microorganismo	54
3.4.1 Preparación y propagación de células de levadura.....	54
3.4.2 Condiciones de cultivo.....	55
3.5 Fermentación alcohólica.....	55
3.5.1 Evaluación de la biomasa celular.....	55
3.5.2 Evaluación del consumo de sustrato.....	56
3.5.3 Evaluación de la concentración de etanol	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
ETAPA I. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	57
4.1 Pelado de la tuna y secado de la cáscara	57
4.1.1 Rendimiento total del material vegetal empleado.....	57
4.1.2 Deshidratación de la cáscar4 de tuna	58

4.1.3 Separación de la semilla..... 59

ETAPA II. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA
 61

4.2 Caracterización físicoquímica de la tuna..... 61

4.2.1 Caracterización físicoquímica de la cáscara de tuna..... 61

4.2.2 Caracterización físicoquímica de la pulpa de tuna 63

ETAPA III. SACARIFICACIÓN ACIDA Y CON VAPOR DE LA CÁSCARA DE TUNA..... 65

4.3 Sacarificación con H₂SO₄ diluido 65

4.3.1 Cinética de sacarificación por explosión con vapor..... 66

ETAPA IV. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA..... 68

4.4 Microorganismo 68

4.4.1 Características macroscópicas..... 68

4.4.2 Características microscópicas..... 68

4.4 Producción de etanol, biomasa y consumo de sustrato 70

4.4.1 Sustrato consumido por *S. cerevisiae* durante la fermentación . 72

4.5 Parámetros de la productividad de etanol 73

4.6 Rendimiento de etanol sobre el sustrato 75

V. CONCLUSIONES 77

VI. REFERENCIAS 79



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Biocombustibles: Desde la materia prima hasta el uso final.....	9
Fuente: FAO, 2008.	9
Figura 2.2. Esquema de la utilización de la pared celular vegetal de lignina, hemicelulosa y celulosa.....	11
Figura 2.3. Conversión de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos. Fuente: FAO, 2008.	15
Figura 2.4. Nopal cardón (<i>Opuntia streptacantha</i> L.)	24
Figura 2.5. Tuna del nopal cardón	26
Figura 2.6. Principales componentes de la biomasa lignocelulósica	28
Figura 2.7. Estructura de la celulosa	29
Figura 2.8. Estructura de la cadena de hemicelulosa.....	30
Figura 2.9. Estructura del polímero de lignina	30
Figura 2.10. Curso de biomasa, sustrato y producto para diferentes tipos de fermentaciones.	34
Figura 2.11. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Figura 2.12. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
Figura 2.13. Esquema del proceso de gemación de <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 2.14. Esquema del metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.	45
Figura 2.15. Células re-suspendidas de <i>Z. mobilis</i> CP4 (5600x).	46
Figura 3.1. Reacción general Método fenol-sulfúrico	51
Figura 3.2. Reacción general de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico	52
Figura 4.1. Velocidad de secado de la cáscara de tuna (<i>Opuntia streptacantha</i> L.)	58



Figura 4.2. Efecto de la variación del tiempo de hidrolisis en la degradación enzimática de jugo de tuna	59
Figura 4.3. Azúcares liberados durante la hidrolisis ácida de la cáscara de tuna. 66	
Figura 4.4. Azúcares liberados durante la cinética de sacarificación de la cáscara de tuna.....	67
Figura 4.5. Características macroscópicas de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD.....	68
Figura 4.6. Identificación microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD.....	69
Figura 4.7. Cinéticas de producción de etanol, biomasa celular y consumo de sustrato durante la fermentación.....	70
Figura 4.8. Azúcares residuales de la fermentación.....	72



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Producción de biocombustibles a nivel mundial en 2007.	12
Cuadro 2.2. Rendimiento de los biocombustibles con diferentes materias primas, a nivel mundial y por países.....	16
Cuadro 2.3. Rendimiento potencial hipotético para el etanol proveniente de los principales cultivos de cereales y de azúcar.....	17
Cuadro 2.4. Clasificación taxonómica de la tuna	19
Cuadro 2.5. Producción de tuna en México.....	20
Cuadro 2.6. Zonas productoras de tuna y los principales estados involucrados ..	23
Cuadro 2.7. Microorganismos productores de bioetanol	36
Cuadro 2.8. Microorganismos utilizados para la producción de bioetanol de acuerdo al sustrato utilizado	37
Cuadro 2.9. Microorganismos productores de bioetanol y su rendimiento de acuerdo al azúcar que fermentan.	38
Cuadro 2.10. Características de un microorganismo utilizado para producir bioetanol	39
Cuadro 2.11. Clasificación taxonómica de <i>S. cerevisiae</i>	40



Cuadro 2.12. Características de crecimiento de <i>S. cerevisia</i>	43
Cuadro 4.1. Rendimiento de la tuna	58
Cuadro 4.2. Composición fisicoquímica de la cáscara de tuna.....	62
Cuadro 4.3. Composición lignocelulósica de la cáscara de tuna	62
Cuadro 4.4. Caracterización fisicoquímica de la parte comestible de la tuna	63
Cuadro4.5. Composición lignocelulósica de la pulpa de tuna	64
Cuadro 4.6. Parámetros de productividad para la fermentación de etanol	74
Cuadro 4.7. Rendimiento de etanol en los diferentes tiempos de fermentación..	75



RESUMEN

La disminución de las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) ha dado lugar a un creciente interés en la producción y utilización de combustibles alternativos a los actuales combustibles fósiles. Los biocombustibles líquidos (bioetanol y biodiesel), obtenidos a partir de biomasa, son los únicos productos renovables que pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución y son una de las pocas alternativas de diversificación del sector transporte a corto plazo. En la actualidad, para producir bioetanol a escala industrial se emplea biomasa amilácea o azucarada como materia prima lo que ha derivado en un intenso debate sobre su sostenibilidad. En este contexto, el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica se muestra como una alternativa interesante ya que estas materias primas se encuentran ampliamente distribuidas, no compiten con el mercado alimentario y son más baratas que los recursos agrícolas convencionales.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de bioetanol con *Saccharomyces cerevisiae*, usando como fuente de carbono azúcares provenientes de la hidrólisis de cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha* L.). El trabajo se dividió en 4 etapas i) preparación de la materia prima, ii) caracterización fisicoquímica, iii) sacarificación ácida y con vapor de la cáscara de tuna y iv) fermentación alcohólica. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que la composición fisicoquímica de la tuna la hace una excelente materia prima para producir etanol ya que aproximadamente el 38% de su constitución está representada por celulosa



hemicelulosa y lignina, componentes que al ser hidrolizados se obtienen azúcares fermentables. En referencia a la sacarificación ácida se observó que cuando se empleó ácido sulfúrico diluido 0.50% (w/v) y un tiempo de sacarificación de 15 minutos, se logró obtener la mayor concentración de azúcares fermentables 45.29 g L^{-1} , el tiempo de exposición de la muestra al vapor también tiene un efecto importante en la hidrólisis de la cáscara de tuna, obteniéndose una concentración de 48.36 g L^{-1} , en un tiempo de exposición de 5 minutos. En cuanto a la cinética de producción de etanol, biomasa y consumo de sustrato, durante 144 horas, se observó que la producción de etanol empezó a incrementar en el lapso de 24 y 36 horas. La máxima producción de etanol (20.9 g L^{-1}) se alcanzó a las 36 horas de fermentación. El consumo de sustrato es menor en las primeras 15 hrs de fermentación, incrementándose a partir de las 24 hrs y las 144 horas, a partir de este tiempo de fermentación la velocidad de consumo de sustrato fue constante. En cuanto a la producción de biomasa, al comparar la cantidad de biomasa y de etanol producidos se observó que la relación biomasa-etanol no es proporcional, debido a que se produce 17 veces más biomasa que etanol, lo cual es conveniente para este estudio ya que los procesos de destilación son menos costosos, debido a que se tiene que separar poca biomasa del producto. La productividad específica de etanol (P_e) de 7.44 g L^{-1} y la productividad de etanol por hora $0.60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ alcanzados en este estudio nos proporcionan resultados alentadores ya que se obtuvieron buenos resultados para realizar estudios a escalas mayores.

Palabras clave: combustibles fósiles, fermentación, cáscara de tuna, bioetanol



I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las ciudades, dependen en gran parte de la energía obtenida de diferentes fuentes, como son las de origen: fósil, hídrica, geotérmica, desechos, carbón y biológico. De acuerdo con la Agencia Internacional de Energía hasta el 2006 el suministro mundial de energía primaria era de 11,741 Mt (Millones de toneladas equivalentes de petróleo). Sin embargo en los últimos años se ha ido demostrando que este tipo de energía contribuye en gran parte a la contaminación atmosférica; además algunos pozos petroleros están llegando a su máxima producción, por lo que constantemente suben los precios mundiales de la gasolina.

La mayoría de los gobiernos del mundo, como el brasileño, buscan la independencia de este tipo de energía y trabajan en investigaciones sobre el empleo de materias primas baratas para producir bioetanol por vía fermentativa, a la vez se busca una mayor eficiencia en los procesos de fermentación, recuperación y purificación del alcohol producido (Demirbas, 2011). Los biocombustibles son aquellos obtenidos a partir de biomasa mediante su procesamiento químico, térmico o biotecnológico, entre ellos se puede mencionar el bioetanol, biodiesel y biogás (Alarcón, 2010).

En la actualidad se emplean diversas materias primas para la producción de etanol, las más empleadas son la caña de azúcar, el maíz y el sorgo dulce, estos cultivos forman parte de la alimentación humana y animal. Muchos gobiernos de México y el mundo, trabajan en la búsqueda de materias primas que no representen



una competencia con el suministro de alimentos. Una alternativa viable son las materias primas lignocelulósicas como la cáscara de tuna.

En nuestro país las nopaleras cultivadas para la producción de tuna, ocupan cerca del 24% del total, estas representan una alternativa rentable de producción debido a la diversidad de las zonas agroclimáticas donde se encuentran ubicadas las regiones productoras, los bajos requerimientos tecnológicos y el limitado uso de insumos. El rendimiento promedio es de alrededor de 7 toneladas por hectárea con oscilaciones entre las distintas zonas productoras de entre 5 y 20 toneladas por hectárea. La tuna del nopal (*Opuntia streptacantha* L.), es una de las 100 variedades que existen en México, se encuentra ampliamente distribuida en zonas áridas y semiáridas, estas áreas representan la mayor parte del territorio nacional. Se puede cosechar durante cuatro o cinco meses del año iniciando en el mes de julio. Además de consumirse como fruta fresca, la tuna se utiliza para fabricar muchos productos en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéuticas. La cáscara de la tuna, que es un desecho de estas industrias, representa aproximadamente el 50% de la fruta, teniendo grandes volúmenes de este desperdicio en los lugares donde se procesa la tuna y la fruta completa en las regiones donde ni siquiera se dan a la tarea de cosecharla, por la falta de mercado que tiene este fruto y por la elaboración de productos a base de tuna, que se procesan de forma tradicional, lo cual representa un inconveniente para la comercialización.



1.1 ANTECEDENTES

En los países de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), entre estos México, existe una preocupación creciente, por los temas y problemas que conciernen al ambiente junto con las regulaciones más estrictas en cuanto a la contaminación del aire y el agua y también la intensificación del apoyo gubernamental, se hallan a la base de los cambios estructurales que refuerzan la producción y el uso de los biocombustibles y en particular, del etanol (CARPOICA, 2008).

Los biocombustibles han sido promovidos mediante políticas impulsadas por los objetivos de seguridad energética, mitigación del cambio climático mediante la reducción de las emisiones de gases efecto invernadero, interés de apoyar la agricultura y el desarrollo rural. El desarrollo de los biocombustibles empezó con la producción de bioetanol, impulsada por la llamada primera crisis del petróleo desde mediados de los años setenta del siglo pasado. En una década la producción de bioetanol alcanzó unos 12 millones de toneladas y se mantuvo alrededor de este nivel hasta el año 2000.

La producción mundial de biocombustibles sigue creciendo, especialmente en países con grandes programas agrícolas como Brasil, donde la producción de etanol en el año 2008 fue de un total de 2,700 m³, creció respecto al 2007 un 20% (Visser., *et al.*, 2010). Los biocombustibles producidos a mayor escala son el bioetanol y el biodiesel (Wheals *et al.*, 1999). Los principales países productores de etanol como combustible son Brasil, Estados Unidos y Canadá. Brasil lo produce a partir de la caña



de azúcar y lo emplea como "hidro-alcohol" (95% etanol) o como aditivo de la gasolina (24% de etanol), Estados Unidos y Canadá lo producen a partir de maíz (con un poco de trigo y cebada) y lo utilizan en diferentes formulaciones que van desde el 5% al 85% de etanol (ArgenBio, 2007).



1.2 JUSTIFICACIÓN

El rápido e inevitable agotamiento de los combustibles fósiles utilizados para abastecer de energía a todo el mundo, la contaminación del medio ambiente que estos generan (Sharma *et al.*, 2007) y el aumento de los precios mundiales del petróleo (Kecebas *et al.*, 2009) han llevado a una búsqueda de fuentes alternativas de energía renovable y barata (Sharma *et al.*, 2007).

A diferencia de los combustibles fósiles el etanol es considerado un combustible renovable que se produce mediante la fermentación de azúcares (Brethauer y Wyman, 2010; Sharma *et al.*, 2007; Galbey, 2002).

El etanol es elaborado a partir de algunos productos básicos tales como el maíz, el trigo, la caña de azúcar; y el biodisel de semillas oleaginosas, estos productos son empleados en la alimentación humana y animal; además su desarrollo requiere de una gran cantidad de tierra agrícola (Demirbas, 2011). En la actualidad esto ha ocasionado serios problemas frente a la oferta mundial de alimentos y no hay una normatividad establecida sobre lo que se debe hacer al respecto. Por otro lado, el amplio uso de fuentes vegetales destinadas a la alimentación puede causar problemas significativos, como el hambre en los países en desarrollo (Kecebas *et al.*, 2009). Es conveniente encontrar nuevas fuentes para la producción de etanol.



La producción de etanol a partir de la fermentación de biomasa lignocelulósica es una opción viable que no compite con el suministro de alimentos. Los costos de producción de bioetanol pueden variar ampliamente, esto se debe principalmente a la materia prima utilizada, la escala de producción y la región donde se lleve a cabo (Sharma *et al.*, 2007). El costo de producción de bioetanol en la actualidad asciende a 1.65 dólares por galón en EE.UU. La materia prima representa el mayor costo para producir este biocombustible (Demirbas, 2011). Para lograr un precio competitivo del bioetanol se deben reducir los precios de las materias primas, ya que éstas pueden llegar a representar de un 60-70% del costo final. (Wyman, 1999).

Es por ello que para esta investigación se utilizó tuna roja del nopal, (*Opuntia streptacantha* L.). En México, la producción de tuna, en la que participan alrededor de 20 mil productores, ocupa una superficie aproximada de 65 000 hectáreas (Méndez *et al.*, 2006).

La producción de tuna en estos ecosistemas naturales es muy alta y si se considera que los costos de cultivo, mantenimiento, fertilización, control de plagas y ordenamiento del ecosistema no existen, la fruta es gratis. Aun así, la mayoría de los campesinos no cosecha la tuna por la dificultad que representa comercializarla. Más del 60% de la fruta se pierde en el campo. Esta fruta se encuentra disponible durante cuatro o cinco meses del año, desde medianos de noviembre, o hasta que se presenten las primeras heladas (López *et al.*, 1997).

1.3 HIPÓTESIS

Es posible la producción de bioetanol como biocombustible, a partir de tuna roja del nopal cardón (*Opuntia streptacantha* L.) empleada como única fuente de carbono.



1.4 **O**BJETIVOS

1.4.1 **GENERAL**

Evaluar la sacarificación y fermentación de la cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha* L.) para producir etanol.

1.4.2 **ESPECÍFICOS**

- Caracterizar fisicoquímicamente el material vegetal (*Opuntia streptacantha* L.).
- Aplicar un pretratamiento con ácido diluido a la cáscara de tuna, para hidrolizar los polisacáridos presentes en la pared vegetal.
- Realizar una cinética de hidrólisis por explosión con vapor.
- Realizar una sacarificación de la cáscara de tuna combinando ácido diluido y vapor.
- Producir etanol vía fermentación empleando la cepa *S. cerevisiae*.



II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son combustibles no fósiles, portadores de energía derivada de materias primas de origen agropecuario, agroindustrial o desechos orgánicos, a la cual se le denomina biomasa. Pueden ser sólidos (como la leña, el carbón vegetal y los pellets de madera), líquidos (como el etanol, el biodiésel y los aceites pirolíticos) y gaseoso (como el biogás). Todos estos constituyen opciones renovables y menos contaminantes que los combustibles derivados del petróleo y además forman parte de las fuentes alternativas de energía (IFPEOPLE, 2006).

Actualmente, aproximadamente el 98% de los combustibles utilizados para el transporte se derivan del petróleo lo cual genera consecuencias negativas en términos de seguridad de suministro y emisiones de CO₂ (Gómez *et al.*, 2008).

Por su origen se podría decir que los biocombustibles son una fuente de energía renovable, estos se utilizan principalmente como fuente de energía de vehículos a motor y producción de electricidad (Alarcón, 2010). En la Figura 2.1 se ilustran diferentes fuentes de biomasa tales, como: alimentos, fibras y residuos de madera, cultivos energéticos, cultivos de rotación breve y desechos agrícolas todos estos materiales han sido utilizados para la producción de biocombustibles (FAO, 2008).

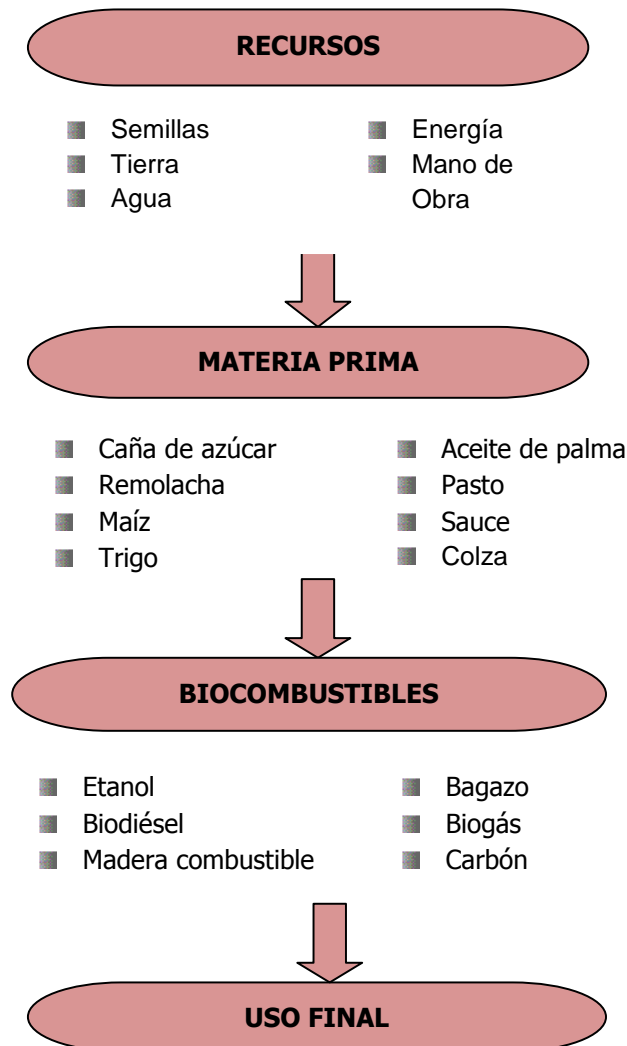


Figura 2.1. Biocombustibles: Desde la materia prima hasta el uso final.

Fuente: FAO, 2008.

2.1.1 Biocombustibles líquidos

Los biocombustibles líquidos, también denominados biocarburantes, son obtenidos a partir de la biomasa mediante procesos químicos y biológicos. Los biocombustibles líquidos son, el bioetanol y el biodiesel que se utilizan principalmente en el transporte y en la industria química. Aunque su producción

solo cubre parte de la demanda mundial, se estima que a futuro su uso y elaboración aumenten (Alarcón, 2010).

2.1.1.1 Biocombustibles líquidos de primera generación

Se refiere a los biocombustibles producidos a partir de biomasa comestible tales como: maíz, caña de azúcar, almidones, aceites vegetales y grasa animal (GBEP, 2007). Para la producción de este tipo de biocombustible, se emplean materias primas destinadas a la alimentación humana lo cual ha ocasionado notables incrementos en los costos del maíz y caña de azúcar principalmente.

2.1.1.2 Biocombustibles líquidos de segunda generación

La segunda generación de biocombustibles, incluye aquellos producidos a partir de materias primas provenientes de biomasa lignocelulósica, como la contenida en la paja, hierba, tallos, cañas, raíces, madera y cáscaras principalmente. También se utilizan tecnologías de transesterificación pero sobre oleaginosas no tradicionales. Aunque este tipo de combustibles todavía no se producen a escala industrial, se espera que los procesos para su producción sean viables en los próximos 10 años (FAO, 2008).

2.1.1.3 Biocombustibles líquidos de tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de tecnologías nuevas que siguen desarrollándose pero que actualmente no han llegado a ser comercialmente viables. Existen muchos ejemplos, pero el más notorio es un proceso de síntesis llamado Fischer-Tropsch, que convierte la celulosa a combustible a través de un proceso de gasificación de sólidos (Demirbas., 2011).



Existen muchos tipos de materiales celulósicos que sirven como materia prima para esta nueva tecnología tales como: residuos de madera, aserrín, el tallo del maíz (Figura 2.2), y muchas variedades de plantas como el pasto varilla (también conocido como *panicum virgatum*), ninguno de estos productos tiene aplicaciones alimenticias y hasta el momento no poseen valor comercial (Han *et al.*, 2011).

Uno de los primeros problemas que se presentan al producir biocombustibles de tercera generación, es que el pasto y la madera tienen paredes celulósicas. La celulosa está compuesta de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno comercial por lo tanto, en su sentido más básico, las tecnologías de conversión de tercera generación buscan extraer el oxígeno de la celulosa para crear moléculas nuevas que contienen la combinación necesaria de carbono e hidrógeno para crear combustibles (Han *et al.*, 2011). En general, el proceso de conversión tecnológico involucra primero romper las celulosas a moléculas más pequeñas, y luego refinarlas a combustibles (James, 2009).

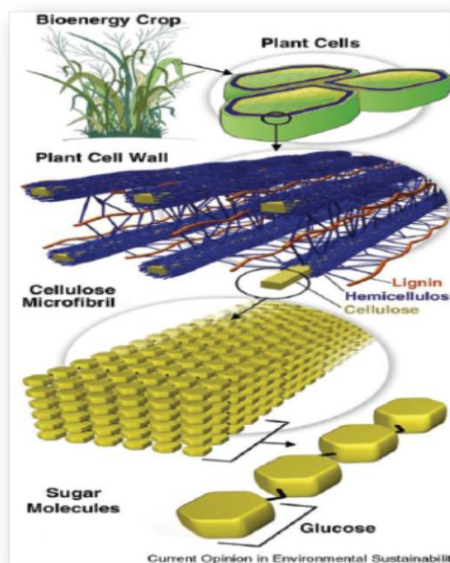


Figura 2.2. Esquema de la utilización de la pared celular vegetal de lignina, hemicelulosa y celulosa.

2.2 Producción mundial de bioetanol

En la actualidad, aproximadamente el 85% de la producción mundial de biocombustibles líquidos está representado por el bioetanol.

En el cuadro 2.1 se muestran los principales países productores de bioetanol entre los que destaca Brasil, el cual lo produce a partir de caña de azúcar y Estados Unidos a partir de maíz, estos aportan casi el 90 % de la producción mundial, el 10 % restante se divide entre Canadá, China, la Unión Europea y la India. La producción de biodiesel se concentra principalmente en la Unión Europea, aportando cerca del 60% del total (AIE, 2004).

Cuadro 2.1. Producción de biocombustibles a nivel mundial en 2007.

PAÍS/GRUPO DE PAÍSES	ETANOL		BIODIÉSEL		TOTAL	
	(Millones de litros)	(Mt)	(Millones de litros)	(Mt)	(Millones de litros)	(Mt)
Brasil	19 000	10.44	227	0.17	19 227	10.6
Canadá	1 000	0.55	97	0.07	1 097	0.62
China	1 840	1.01	114	0.08	1 954	1.09
India	400	0.22	45	0.03	445	0.25
Indonesia	0	0	409	0.3	409	0.3
Malasia	0	0	330	0.24	330	0.24
EE.UU.	26 500	14.55	1 688	1.25	28 188	15.8
Unión Europea	2 253	1.24	6 109	4.52	8 361	5.76
Otros	1 017	0.56	1 186	0.88	2 203	1.44
Mundo	52 009	28.57	10 204	7.56	62 213	36.12

Fuente: Datos provenientes de la base de datos OCDE-FAO

*Nota: Mt (Millones de toneladas equivalentes de petróleo).

La industria del bioetanol en los Estados Unidos genera 26 mil millones de litros al año. El productor más grande es Brasil con un rendimiento de 19 millones de litros de etanol derivado de caña de azúcar en 2007.

En Estados Unidos existe una ley de energía (EISA), la cual contiene disposiciones que especifican el incremento de Combustibles Renovables (RFS), 136 millones de litros para el año 2022, los volúmenes de etanol producidos a partir de celulosa aumentan de 0.4 mil millones de litros por año a 11 mil millones de litros por año en 2013, y 60 millones de litros en 2022. Se espera que para el 2015 el resto sea proporcionado por "biocombustibles avanzados" provenientes la mayoría de celulosa (Poulomi-Sannigrahi *et al.*, 2010).

2.2.1 Importancia del etanol a nivel mundial

La necesidad de combustibles alternativos y sostenibles es un tema de interés para todos los países del mundo, debido principalmente a la disminución de los combustibles fósiles, a la creciente preocupación sobre el cambio climático, y al incremento de las necesidades de energía (Poulomi-Sannigrahi *et al.*, 2010).

El etanol es un excelente combustible, puede ser mezclado con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. Un litro de etanol contiene alrededor del 66% de la energía suministrada por un litro de petróleo y mezclado con gasolina para el transporte, mejora el rendimiento de esta última (AIE, 2004).

En Estados Unidos y Brasil se mezcla del 10 al 22 % de etanol en gasolina (Prasad *et al.*, 2007). Esta mezcla da como resultado un combustible que contiene 35 % de oxígeno lo que lo reduce las emisiones de dióxido de carbono y óxido de nitrógeno durante la combustión (Wheals *et al.*, 1999).

Si el etanol se usa realizando una mezcla (95% etanol y 5% agua) como combustible, podría proveer grandes beneficios ambientales debido a su baja



presión y la reducción de emisiones en la atmosfera y así realizar una combustión más limpia, reduciendo las emisiones de dióxido de carbono, monóxido de carbono y ozono (Prasad *et al.*, 2007).

En comparación con la gasolina, el etanol contiene solo una cantidad mínima de azufre; por tanto, en la combustión del etanol o de la mezcla de etanol con gasolina producirá menores emisiones de dióxido de azufre, componente carcinogénico en la lluvia acida (FAO, 2008).

2.3 Materia prima para la producción de bioetanol

Debido a la expansión y crecimiento de la industria de los bioenergéticas, el sector agropecuario ha ido tomando un papel económico muy importante a nivel internacional, ya que es el principal proveedor de la materia prima para la producción de biocombustibles líquidos para el transporte, en particular del etanol (Alarcón, 2010). En la actualidad, para producir bioetanol a escala industrial se emplea biomasa amilácea o azucarada como materia prima lo que ha derivado un intenso debate sobre su sostenibilidad, ya que compiten con el suministro de alimentos (Tomás-Pejó., 2010).

El aumento en la producción de etanol en todo el mundo ha ido a la par, con el desarrollo de tecnologías que permiten obtener etanol a partir de diversos materiales; en la Figura 2.3 se ilustran las materias primas que han sido ampliamente utilizadas para la producción de bioetanol tales como; paja de trigo, maíz, rastrojo; cultivos agroenergéticos por ejemplo; el mijo o miscanto; residuos forestales, plantaciones forestales y materiales de desecho provenientes de diversas industrias, (Lal, 2005).

En el caso del biodiesel, las materias primas de mayor uso son la colza en la Unión Europea, la soja en los Estados Unidos y Brasil y los aceites de palma y coco en los países tropicales y subtropicales (FAO, 2008).

De acuerdo a la Red Mexicana de Bioenergía, la utilización de biomasa con fines energéticos constituye una fuente de energía renovable y limpia, plenamente establecida con tecnologías maduras en la mayor parte de sus distintas aplicaciones y está considerada uno de los pilares de la llamada "transición energética" hacia las fuentes renovables de energía.

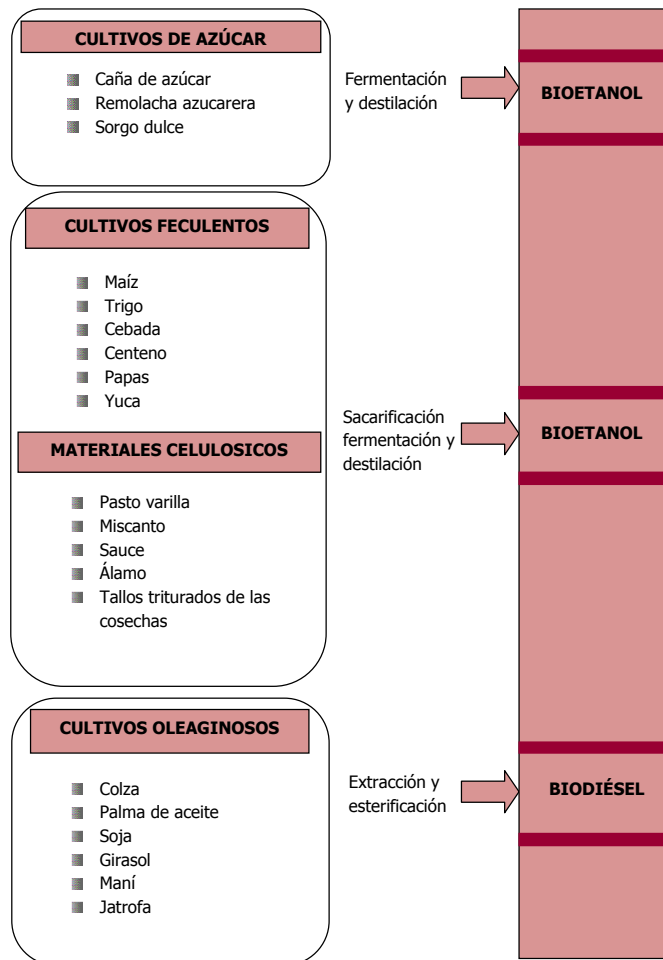


Figura 2.3. Conversión de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos.

Fuente: FAO, 2008.

Existen notables diferencias entre cultivos en relación a su rendimiento o conversión a biocombustible, las variaciones dependen en gran medida de la materia prima utilizada, del sistema de producción y del país donde se elabora. Estas diferencias se muestran en el cuadro 2.2 en el cual se puede observar que la caña de azúcar, en Brasil es la materia prima que representa un mayor rendimiento en su recuperación por hectárea, pero no en cuanto a su eficiencia y rendimiento para la producción de etanol.

Cuadro 2.2. Rendimiento de los biocombustibles con diferentes materias primas, a nivel mundial y por países.

CULTIVO	SUPERFICIE MUNDIAL	PRODUCCIÓN MUNDIAL	RENDIMIENTO	MÁXIMO DE ETANOL	CONSUMO DE GASOLINA EN ¹ 2003
	(Millones de ha)	(Millones de toneladas)	(Litros/ha)	(Miles de millones de litros)	(Porcentaje)
Trigo	215	602	952	205	12
Arroz	150	630	1 806	271	16
Maíz	145	711	1 960	284	17
Sorgo	45	59	494	22	1
Caña de azúcar	20	1 300	4 550	91	6
Yuca	19	219	2 070	39	2
Remolacha azucarera	5.4	248	5 060	27	2
Total	599	940	57

Fuente: Rajagopal *et al.*, 2007, datos mundiales; Naylor *et al.*, 2007, datos nacionales

En el cuadro 2.3 se presentan un cálculo hipotético realizado mediante estimaciones teóricas basadas en la producción mundial de etanol a partir de los principales cultivos, basado en los rendimientos medios a nivel mundial y la eficiencia en materia de conversión más comúnmente citada. En el cuadro 2.2 se resumen los resultados de dichas estimaciones. Los cultivos que aquí se mencionan representan el 42% de toda la superficie agrícola cultivada actualmente. La conversión de toda la producción de cultivos a etanol correspondería al 57% del consumo total de gasolina en el año 2003 (Rajagopal *et al.*, 2007).

Cuadro 2.3. Rendimiento potencial hipotético para el etanol proveniente de los principales cultivos de cereales y de azúcar.

CULTIVO	SUPERFICIE MUNDIAL	PRODUCCIÓN MUNDIAL	RENDIMIENTO	MÁXIMO DE ETANOL	CONSUMO DE GASOLINA EN ¹ 2003
	(Millones de ha)	(Millones de toneladas)	(Litros/ha)	(Miles de millones de litros)	(Porcentaje)
Trigo	215	602	952	205	12
Arroz	150	630	1 806	271	16
Maíz	145	711	1 960	284	17
Sorgo	45	59	494	22	1
Caña de azúcar	20	1 300	4 550	91	6
Yuca	19	219	2 070	39	2
Remolacha azucarera	5.4	248	5 060	27	2
Total	599	940	57

Nota: ... = no aplica.

¹Utilización mundial de gasolina en 2003= 1.1 billones de litros (Kim y Dale, 2004).

De acuerdo al *World Energy Outlook* (AIE, 2006), en una proyección al 2030, se pronostica un aumento de la proporción de la tierra cultivable a nivel mundial dedicada a cultivar biomasa para biocombustibles líquidos del 1% en 2004

al 2.5% en 2030. Conforme al "escenario de política alternativa", para el 2030 esa proporción habrá aumentado el 3.8%.

Los productos no tradicionales utilizados como biomasa lignocelulósica, son factibles. Un enfoque clave en el tratamiento de esta visión es la necesidad de utilizar de forma efectiva y a bajo costo una gran cantidad de productos agrícolas y de biomasa forestal, los cuales contienen diferentes niveles de celulosa, hemicelulosa y lignina (Ragauskas *et al.*, 2006).

El tratamiento de estos materiales es mucho más factible (Wyman, 1999; Galbe *et al.*, 2002) que el bioprocesamiento de almidón de maíz (Bothast *et al.*, 2005) o caña de azúcar (Pessoa *et al.*, 2005) en bioetanol.

2.4 Nopal

Nopal es el nombre común para designar a un taxa de cactáceas endémicas de México, estas presentan características tales como, ser perenes, suculentas, presentar un crecimiento arbustivo, de tallos bien definidos con ramas desde la base, segmentados, presentan espinas, que son más abundantes en sus yemas jóvenes. La flor es hermafrodita hemicíclica con eje largo, de color variable (Granados y Castañeda, 1991).

El nombre científico del taxa es *Opuntia* que hace referencia a un género que se encuentra ampliamente distribuido en el continente Americano, aunque la mayor diversidad de este se encuentra situado en México (Corrales y Flores, 2000). Este tipo de plantas tienen como uso tradicional en nuestra cultura, el de alimentación en forma de verdura o por el fruto que desarrollan llamado tuna.

2.4.1 Clasificación taxonómica de la tuna

La clasificación taxonómica de la tuna se presenta en el cuadro 2.4, el fruto que pertenece a esta familia se le denomina genéricamente *Opuntia spp* y en

México es conocido comúnmente con el nombre de tuna. La tuna es una baya polispérmica, carnosa ovoide o piriforme, de dimensiones variables, con la epidermis normalmente poblada de pequeñas espinas llamadas gloquidios y cuya pulpa puede ser blanca, amarilla, naranja, roja o purpura, es normalmente jugosa, comestible y con muchas semillas adheridas a la pulpa (INFOASERCA, 1999).

Cuadro 2.4. Clasificación taxonómica de la tuna

TAXONOMÍA DE LA TUNA	
Reino	<i>Vegetal</i>
Subreino	<i>Embryophita</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledonea</i>
Subclase	<i>Dialipetalas</i>
Orden	<i>Opuntiales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia	<i>Opuntipideae</i>
Tribu	<i>Opuntiae</i>
Genero	<i>Opuntia</i>

Fuente: ASERCA, CIESTAAM, 1995.

2.4.2 Producción nacional y comparativa a nivel mundial

En el ámbito mundial, cada día aumenta el número de productores de tuna. Actualmente éste fruto se cosecha en diversos países entre los que se encuentran: Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Perú, EE.UU., Sudáfrica, Argelia, Marruecos, Egipto, Jordania, Libia, Túnez, Pakistán, Israel, Grecia, Italia, España y Portugal. En la mayoría de estos países, la tuna es un producto secundario del nopal, su producción y cosecha es muy poca. Sin embargo existe un grupo de países que enfoca su producción a la comercialización en mercados internacionales. Este grupo está encabezado por México seguido de Italia, Sudáfrica, Chile, Israel y Estados Unidos (INFOASERCA, 1999).

Durante los últimos años, la superficie cultivada con nopal en los principales países productores, ha alcanzado cerca de 60 mil hectáreas, de las cuales el 90% se localizan en México, estos datos afirman que nuestro país se ha convertido en el productor de tuna más importante del mundo, con 79.4% (aproximadamente 500 mil toneladas) de la producción mundial, seguido de Italia con el 12.2% y Sudáfrica con 3.7% (SIAP-SAGARPA, 2001).

2.5 Producción de tuna en México

En México la producción de tuna es muy importante, nuestro país es el principal productor de esta fruta en el mundo. Actualmente, México cuenta con más de 53 mil hectáreas con nopaleras que producen 344 mil toneladas de tuna (SAGARPA, 2011).

En la producción de tuna participan 17 estados; sin embargo, en sólo cuatro de ellos se concentra el 88% de la producción. En el cuadro 2.5 se presentan las entidades productoras de tuna más importantes, el Estado de México encabeza la lista, con un total de 45.2%, seguido de Zacatecas y en menor proporción participan Puebla e Hidalgo con 11.5% y 8.1% respectivamente, el 11.9% restante se divide en los otros 13 estados de la República Mexicana que también producen tuna (SIAP, 2002).

Cuadro 2.5. Producción de tuna en México

ESTADOS	PRODUCCIÓN DE TUNA (%)
Estado de México	45.2
Zacatecas	23.3
Puebla	11.5
Hidalgo	8.1
República Mexicana	11.9

Fuente: SIAP, 2002.

La producción de tuna aumentó significativamente respecto a años anteriores, un ejemplo claro es la superficie de nopal tunero que se tenía en 1991 la cual fue de 265,968 toneladas provenientes de 44,637 hectáreas de cultivo y tuvieron un rendimiento promedio a nivel nacional de 6.0 ton/ha (SIAP, 2002). Para el 2003 la producción de tuna ocupó una superficie aproximada de 65,000 hectáreas cultivadas (Méndez *et al.*, 2006).

Las nopaleras cultivadas para la producción de tuna, ocupan cerca del 24% del total de las existentes en México, con más de 20,000 productores, de los cuales cerca de 88% pertenecen al régimen ejidal y el resto a la pequeña propiedad (SAGARPA, 2004).

El cultivo de tuna representa una alternativa rentable de producción debido a la diversidad de las zonas agroclimáticas donde están ubicadas las regiones productoras, los bajos requerimientos tecnológicos y el limitado uso de insumos. El rendimiento promedio es de alrededor de 7 toneladas por hectárea con variaciones entre las distintas regiones productoras de entre 5 y 20 toneladas por hectárea (Méndez-Gallegos *et al.*, 2006).

Las tunas son frutos no climatéricos y dependiendo de su especie presentan diferentes características. Generalmente llegan a pesar de 0.1 a 0.25 Kg y están formadas por una cáscara gruesa y carnosa la cual llega a representar del 30-50% del peso total de la fruta (INFOASERCA, 1999).



2.5.1 Principales especies

Las especies de nopal que se usan para la producción de tuna son varias sin embargo *Opuntia streptacantha* es la que se cultiva con mejores resultados. Otras especies cultivadas son *Opuntia quitensis*, *Opuntia ficus indica*, *Opuntia ficus indica* spp. *Opuntia amyclaea* y *O. megacantha* (MAG, 2001). Las que se recolectan en forma natural son *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. streptacantha* (Nobel, 1998).

2.5.2 Distribución Geográfica

Para López y Elizondo (1990), en México se pueden distinguir cuatro zonas nopaleras, considerando su abundancia, sus características fisiológicas y las condiciones climáticas y edafológicas donde crecen. En el cuadro 2.6 se muestran estas zonas así como los principales estados involucrados, la variedad que se cultiva y la época de año en que se cosecha, iniciando en el mes de julio. Debido a que estos son productos de rápida maduración solo están disponibles de 4 a 5 meses del año, aunque pueden ser conservadas en refrigeración o congelación por años pero evidentemente se genera un gasto extra de post-cosecha (SIAP, 2002).

En general la tuna se produce en zonas con precipitaciones entre 400 y 750 mm anuales y a temperatura de 13 a 28°C. En cuanto a heladas es notorio que en la región sur se presentan excepcionalmente pudiendo pasar años entre una y otra; en las regiones centro y centro-norte se presentan a partir de julio y agosto respectivamente, pudiendo presentarse tardías durante los meses de marzo y abril. Por ello se considera que la región de Puebla es la mejor dotada naturalmente para la producción de esta fruta, pues cuenta con mayor cantidad de lluvia y está prácticamente libre de heladas (INFOASERCA, 2010).

Cuadro 2.6. Zonas productoras de tuna y los principales estados involucrados

ZONA	ESTADOS	VARIEDAD	COSECHA
Centro-Sur	Estado de México, Puebla, Querétaro y Oaxaca	<i>O. ficus indica</i> , <i>O. megacantha</i> , <i>O. amyclaea</i> y <i>O. tormentosa</i> .	Septiembre- Octubre
Altiplano	Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes Durango, Guanajuato, Querétaro y Jalisco.	<i>O. leucotricha</i> (nopal duraznillo), <i>O. ficus indica</i> y <i>O.</i> <i>streptacantha</i> (nopal cardón).	Julio- Septiembre
Norte	Chihuahua, Durango, Zacatecas y Coahuila	<i>O. cantabrigiensis</i> , <i>O.</i> <i>phaeacantha</i> (nopal rastrero), y <i>O. rastrera</i> , <i>O. lindheimeri</i> y <i>O.</i> <i>rastrera</i>	Agosto
Costera del Golfo de México	Coahuila, norte de Nuevo León Tamaulipas	<i>O. lindheimeri</i> asociadas con otras especies forrajeras	Agosto

Fuente: (SIAP, 2002)

2.6 Nopal cardón (*Opuntia streptacantha* L.)

Es una planta corpulenta, arborescente, de unos 5 m de altura, con cladodios de 25-30 cm de largo, de color verde oscuro; presenta areolas muy pequeñas y próximas entre sí, con numerosas espinas y flores amarillas o anaranjadas. Estas características se pueden observar en la Figura 2.4, donde también se ilustra que el fruto es grande y tiene muchas espinas (Melgarejo, 2000).



Figura 2.4. Nopal cardón (*Opuntia streptacantha* L.)

Del nopal es posible utilizar los frutos frescos directamente como alimento humano; la pulpa comestible constituye entre 40 y 50% del fruto y por lo general contiene de 12 a 15% de azúcar con base en peso fresco, con la peculiaridad de que los azúcares presentes son considerados reductores, predominan la glucosa con 60% y la fructosa 40% (SAGARPA, 2004).

2.6.1 Usos y aplicaciones de la tuna del nopal cardón

Dentro de la gran región conocida como el desierto Chihuahuense, existen regiones como el altiplano potosino-zacatecano, que se destaca por tener las poblaciones naturales de nopal de mayor tamaño y densidad. Esta característica la distinguen, como la zona cactológica por excelencia (Marroquín *et al.*, 1964).

De acuerdo a López-González, (1997) de los nopales silvestres existentes en esta región, la especie de mayor importancia es *Opuntia streptacantha* L., la cual es aprovechada por su:

- **Fruta:** Se consume en fresco. Tiene el problema de su rápida maduración, después del corte no resiste el empaque y traslado, por lo cual se prefiere procesar en el campo en pequeñas agroindustrias
- **Verdura:** Aun cuando el brote tierno (nopalito), tiene muchas espinas, su demanda es alta por su agradable sabor.
- **Forraje:** Se utiliza, principalmente, en los pequeños establos lecheros y en los ranchos ganaderos como parte de la ración.

En la Figura 2.5 se muestran algunas características típicas de la tuna del nopal cardón, ésta es de color rojo intenso, aromático y muy refrescante, de gran importancia en las zonas semidesérticas y desérticas (Rojas, 1990). Es un fruto de regular tamaño, no muy resistente para su manejo, de consistencia pastosa y de fácil descomposición, lo que impide su comercialización a gran escala, es un fruto de sabor agradable y solo se vende en los mercados cercanos a los lugares donde crece, como las ciudades de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guadalajara y Guanajuato (López-González *et al.*, 1997). El consumo de la tuna en fresco y de los productos procesados se concentra en el campo y en las ciudades del centro y norte de México (López *et al.*, 1997).



Figura 2.5. Tuna del nopal cardón

La tuna del nopal cardón, es recolectada para consumo en fresco o para ser procesada rústicamente en pequeñas industrias familiares, de la tuna se utiliza el mucílago, la cáscara, la pulpa y las semillas. La pulpa se emplea en la elaboración de vinos, licores, refresco, colonche con canela, pulque curado, atole, miel de tuna tipo maple, queso, mermeladas, jalea, ate, nieve, pastel, gelatinas, mousse, deshidratados para dulces de alto valor energético, barras de cereales o pulpa de fruta deshidratada, salsas, gel, alcohol industrial, vinagres y aromatizantes (SAGARPA, 2004). De las semillas se obtiene aceite y este es semejante en calidad a los aceites comestibles de soya y cártamo (Gallegos y Méndez, 2000).

La industrialización de la tuna todavía se encuentra a nivel artesanal, con pequeña escala de operaciones, bajo nivel tecnológico y con productos tradicionales de distribución local o cuando mucho a nivel regional. (Flores *et al.*, 1995).



2.7 Etanol lignocelulósico

El bioetanol producido a partir de materias lignocelulósicas, también llamado de segunda generación, se presenta como una alternativa para el futuro. La biomasa lignocelulósica no compite con el mercado alimentario y, al estar ampliamente distribuida, su costo es menor, lo que contribuye a disminuir el precio final del biocombustible.

La biomasa lignocelulósica puede clasificarse según Sánchez y Cardona (2008) en seis grupos principales: residuos agrícolas, maderas duras, maderas blandas, residuos celulósicos, biomasa herbácea y residuos sólidos urbanos (RSU).

Entre las diferentes materias primas de origen lignocelulósico, la cáscara de tuna es una abundante fuente de biomasa, principalmente en América. En el caso concreto de la tuna, la cáscara representa cerca del 50% de su composición y de acuerdo a estadísticas reportadas por SAGARPA, en nuestro país se produjeron 344 mil toneladas de tuna en el año 2011, lo que supone 172 mil toneladas de cáscara de tuna disponible.

2.7.1 Composición de biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está formada básicamente por tres diferentes polímeros; celulosa, hemicelulosa y lignina como se ilustra en la Figura 2.6 (Fengel y Wegener, 1984), envueltos en una compleja estructura, junto con otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular como son los extractivos y las cenizas. Las cenizas presentes en la biomasa contienen principalmente Ca, K y Mg y son compuestos inorgánicos que persisten después de la incineración del material. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan entre el 60-80% del total del peso de los materiales lignocelulósicos. La lignina es un polímero no polisacárido tridimensional de unidades fenilpropano y representa entre el 20-35% del total (Fengel y Wegener, 1989).

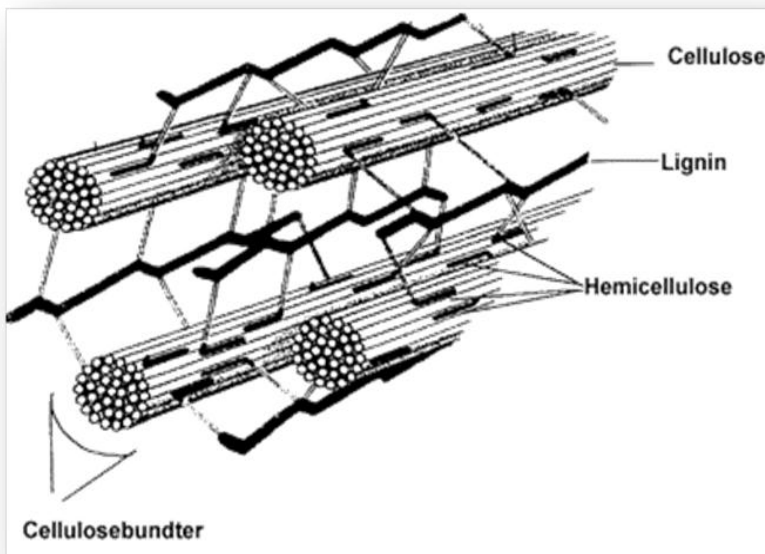


Figura 2.6. Principales componentes de la biomasa lignocelulósica

2.7.1.1 Celulosa

La celulosa es la macromolécula más abundante de la Tierra y su producción anual se ha estimado en 10^{11} toneladas (Brown, 2003).

Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. La celulosa es un monosacárido de gran importancia en la fermentación, ésta posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cepas de celulosa son "empaquetados" denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y están débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005). La distribución de los componentes de su estructura se pueden observar en la Figura 2.7 Sin embargo, una vez que se hidroliza este polisacárido los azúcares simples, pueden fermentarse sin dificultad. La celulosa puede ser hidrolizada mediante procesos ácidos o enzimáticos (Poulomi *et al.*, 2010).

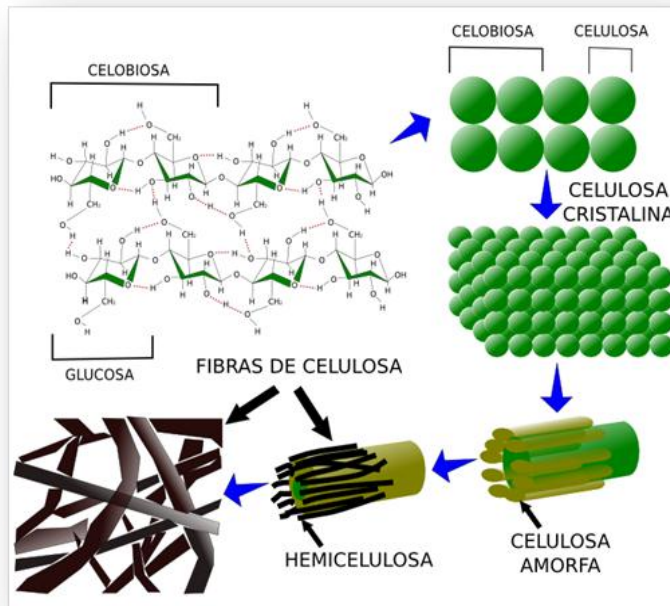


Figura 2.7. Estructura de la celulosa

2.7.1.2 Hemicelulosa

Es un carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros del orden de las pentosas (como xilosa y arabinosa) de hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), los azúcares y ácidos que lo forman están unidos por enlaces glucósidicos, la estructura de uno de los componentes de la hemicelulosa se muestra en la Figura 2.8, al hidrolizar muchos de estos componentes se obtienen azúcares fermentables, como glucosa, manosa, galactosa (Palacio, 1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y lignina (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

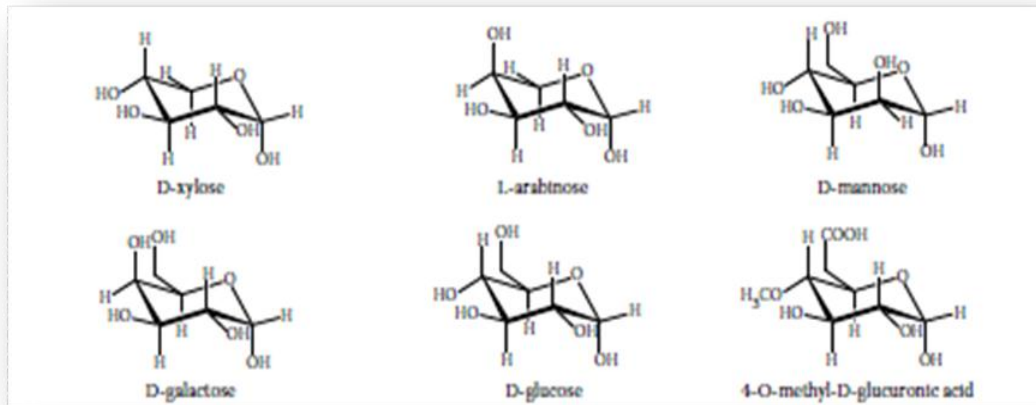


Figura 2.8. Estructura de la cadena de hemicelulosa

2.7.1.3 Lignina

Es un heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. Su estructura heterogénea se presenta en la Figura 2.9. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Fengel y Wegener, 1984).

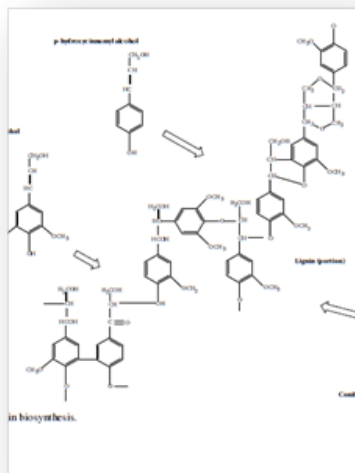


Figura 2.9. Estructura del polímero de lignina

2.8 Hidrólisis

Para que los polisacáridos presentes en la biomasa lignocelulósica den lugar a azúcares potencialmente fermentables, estos se deben de someter a una etapa de hidrólisis. La hidrólisis de los polisacáridos puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida puede realizarse utilizando un ácido concentrado o un ácido diluido (Tomás-Pejó., 2010).

Entre los pretratamientos fisicoquímicos, la explosión por vapor (EV) ha sido el más utilizado para la biomasa lignocelulósica (Ballesteros *et al.*, 2006). Debido a que se puede utilizar en una gran variedad de materias primas.

2.8.1 Pretratamiento de explosión por vapor

Este es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa es sometida a la acción de vapor saturado a relativamente alta presión durante un periodo determinado de tiempo (que puede variar desde unos segundos a varios minutos) tras el cual, el reactor se somete a una brusca descompresión. La EV combina efectos mecánicos con efectos químicos. Los efectos mecánicos están causados por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalladura que producen separación de las fibras, principalmente en las zonas de celulosa amorfa más débiles. El efecto químico se debe a que algunos grupos acetilos de la hemicelulosa son hidrolizados produciendo ácido acético, éste provoca la disminución ligera del pH del agua y debido a la temperatura del proceso se lleva a cabo la hidrólisis de la hemicelulosa (auto hidrólisis). Durante la EV la lignina es redistribuida y parcialmente solubilizada (Palonen, 2004).

Los factores que afectan en mayor medida, la efectividad del pretratamiento de EV son, el tamaño de partícula, la temperatura y el tiempo de exposición de la muestra. Entre las ventajas que presenta este tipo de pretratamiento destacan, la posibilidad de emplear tamaños de partícula relativamente grandes, se evita la adición de catalizadores ácidos (a excepción de las maderas blandas), la alta recuperación de azúcares y además se perfila como una alternativa de hidrólisis potencialmente viable para ser empleada a escala industrial. Sin embargo, también presenta desventajas, como la parcial degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos, los cuales son agentes potencialmente inhibidores en las etapas posteriores de fermentación (Tomas-Pejó., 2010).

2.8.2 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento

Cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pretratamiento como alta temperatura, alta presión y ambiente ácido se puede provocar la degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos, generándose productos tóxicos que pueden afectar las siguientes etapas de producción de bioetanol y además limita la obtención de azúcares fermentables, debido a su degradación.

La naturaleza y concentración de los compuestos tóxicos generados durante el pre-tratamiento dependen de la materia prima, del pretratamiento utilizado, de las condiciones del mismo y de la utilización o no de catalizadores. Estos compuestos son potencialmente inhibidores para las levaduras en la etapa de fermentación. De ahí, el interés de utilizar levaduras con elevada tolerancia a los inhibidores como *S. cerevisiae* o bien que hayan sido sometidas a un proceso de adaptación.

Atendiendo a su origen, los compuestos de degradación pueden dividirse en tres grupos, derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson *et al.*, 2000). Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente. En anaerobiosis, la mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de reducir los furanos a sus correspondientes alcoholes de menor toxicidad (Mussatto y Roberto, 2004; Oliva *et al.*, 2003; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Sin embargo, si los furanos están presentes en altas concentraciones ejercen un efecto inhibitorio sobre el microorganismo, ya que interfieren con enzimas glicolíticas y la síntesis de macromoléculas provocando la prolongación de la fase lag y una disminución en la productividad del etanol (Almeida *et al.*, 2007; Klinker *et al.*, 2004).

2.9 Proceso de fermentación

La fermentación es la descomposición de sustancias orgánicas por la acción de enzimas microbianas que originan moléculas nuevas. Para el cultivo de microorganismos en condiciones óptimas, así como para la producción por parte de los microorganismos de los metabolitos o las enzimas deseadas, deben desarrollarse procedimientos de fermentación. Entre los procedimientos de fermentación se encuentra el desarrollo de cepas mediante manipulación genética y/o la regulación del metabolismo mediante la optimización del medio de cultivo así como el control adecuado de los factores fisicoquímicos que afectan al rendimiento de las fermentaciones (Morales-Oyervides, 2011).



En el transcurso de la fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo, estas fases se muestran en la Figura 2.10 y son la fase logarítmica, fase exponencial, fase estacionara y fase de muerte o declinación (Willey *et al.*, 2008).

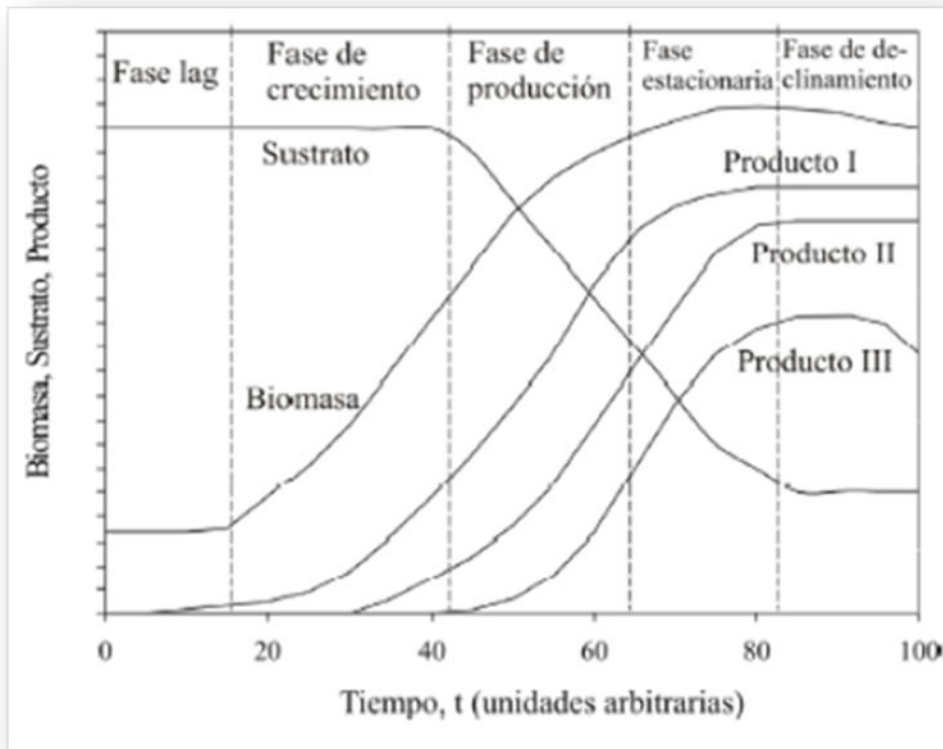


Figura 2.10. Curso de biomasa, sustrato y producto para diferentes tipos de fermentaciones.

Los sustratos más comúnmente usados para la fermentación son los azúcares, en especial la D-glucosa. Una clase de fermentación importante de la glucosa es la fermentación alcohólica. Para muchas levaduras en un medio adecuado, la fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente glucosa, fructosa, manosa y galactosa, en ausencia de aire, en los siguientes productos finales:



Alrededor del 70 % de la energía es liberada como calor; el resto es preservado en dos enlaces fosfatos terminales de ATP (adenosin trifosfato), para usarlo en las reacciones de transferencia, tales como la activación de la glucosa (fosforilación) y de aminoácidos antes de las polimerización (Hernández-Nodarse., 2007).

2.9.1 Alcance de los procesos de fermentación

Existen cuatro grupos de fermentaciones comercialmente importantes:

- Las que se producen células microbianas (o biomasa) como producto.
- Las que producen enzimas microbianas.
- Las que producen metabolitos microbianos.
- Las que modifican un compuesto que se adiciona durante la fermentación.

La producción comercial de biomasa microbiana puede dividirse en dos procesos principales: la producción de levaduras que se usa en la industria de la panificación y la producción de células microbianas que se usan como alimento humano o animal (Morales-Oyervides, 2011).

2.9.2 Composición elemental del medio de fermentación

Los nutrientes existentes en los medios de cultivo dan a la célula microbiana todos los ingredientes requeridos para que produzca más células semejantes a ella misma. Por lo tanto, es conveniente considerar un diseño de medio de fermentación que genere las mejores garantías de crecimiento, el mejor desarrollo para el microorganismo y el máximo rendimiento de producción. El medio debe

satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales del microorganismo, además de las restricciones técnico-económicas para minimizar los costos de separación y purificación. La determinación de los requerimientos nutrimentales, ambientales y la composición, dependen de la estequiometría de crecimiento y formación de producto (Woli *et al.*, 1997).

2.10 Microorganismos productores de de bioetanol

Los microorganismos más utilizados para la producción de etanol, por medios fermentativos se mencionan en el cuadro 2.7. Entre ellos se encuentran las levaduras, debido a su alta productividad en la conversión de azúcares a bioetanol. Además, la producción de toxinas es muy inferior a la de otros microorganismos.

Cuadro 2.7. Microorganismos productores de bioetanol

BACTERIAS	LEVADURAS
<i>Zimomonas mobilis</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
<i>Clostridium acetobutilycum</i>	<i>Pichia stipatis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pchysolen tnnnophilus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida shehate</i>

Las especies más utilizadas que se reportan son: *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida seudotropicalis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida bytyrii*, *Pichia stipatis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens*. También se ha reportado el uso de bacterias como *Zimomomas mobilis* la cual ha sido de las bacterias la más utilizada y se han obtenido altos rendimientos, se ha empleado también *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli*, esta última ha sido genéticamente modificada para emplearse como microorganismo fermentador (Hernández-Nodarse, 2007).

Industrialmente, el bioetanol se produce utilizando *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador debido a la capacidad que tiene este microorganismo para metabolizar un amplio espectro de azúcares (Ertola *et al.*, 2007) y tolerar minerales presentes en sustratos de uso industrial como se observa en el Cuadro 2.8, donde este microorganismo se ha utilizado como microorganismo fermentador de un gran número de sustratos (Gunasekaran y Chandra, 1999). Sin embargo, *Z. mobilis* ha mostrado tener un mayor rendimiento en la producción de etanol.

Cuadro 2.8. Microorganismos utilizados para la producción de bioetanol de acuerdo al sustrato utilizado

SUSTRATO	MICROORGANISMO
Maltosa (almidón)	<i>S. cerevisiae</i>
Trigo	<i>S. cerevisiae</i>
Maíz	<i>S. cerevisiae</i>
Yuca	<i>S. cerevisiae</i>
Inulina	<i>Kluyveromyces marxianicus</i>
Patata sin sub-productos	<i>Toluropsis colliculosa</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. diasticus</i>
Sorgo	<i>Zimomonas mobilis</i>

De acuerdo con reportes previos (Holcberg y Margalith., 1981., Converti *et al.*, 1985) cuando *S. cerevisiae* se cultiva a altas concentraciones de azúcar (menores a 30 – 40%) se incrementa la producción de etanol. Adicionalmente, cuando *S. cerevisiae* se encuentra bajo condiciones de alta concentración de oxígeno disuelto (González *et al.*, 2007) la concentración de azúcares supera 0.16 g L⁻¹ (Ertola *et al.*, 2007) o 9 g L⁻¹ (Hidalgo, J. 2003), la levadura convierte su metabolismo oxidativo a oxido-reductor o fermentativo incrementándose la producción de etanol. Dicho fenómeno se conoce como efecto Crabtree. En el cuadro 2.9 se muestran algunos rendimientos encontrados sobre la producción de etanol con *S. cerevisiae* y otros microorganismos etanogénicos.

El metabolismo de las levaduras como en los demás organismos, esta mediado por reacciones enzimáticas. Las enzimas piruvato descarboxilasa (pdc) y alcohol deshidrogenasa (adh) están presentes en microorganismos etanológicos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Dichas enzimas son claves en la producción de etanol (Gunasekaran *et al.*, 1999) y presentan algunas diferencias de acuerdo con el microorganismo.

Cuadro 2.9. Microorganismos productores de bioetanol y su rendimiento de acuerdo al azúcar que fermentan.

MICROORGANISMO	SUSTRATO		RENDIMIENTO	CITA
	Azúcar	g/L	Etanol (%)	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ara:Glc:Xyl	20:40:40	84	Mohagheghi <i>et al.</i> , 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza de caña (sacarosa)	250	93.57	Peña, y Arango, 2009.
<i>Escherichia coli</i>	Xyl	95	90	Dien <i>et al.</i> , 2000

2.10.1 Características de un microorganismo productor de bioetanol

El primer aspecto a considerar en el desarrollo de un sistema de producción de bioetanol es, la selección del microorganismo adecuado para el proceso y las características que este debe de tener son las siguientes:

- Las cepas deben ser genéticamente estables y tener las mismas reacciones en un gran número de fermentaciones.
- Deben de ser capaces de fermentar el medio lo más rápidamente posible y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico.

- Deben producir lo menos posible otros compuestos ya que provoca un descenso del rendimiento en etanol y complica la destilación (compuestos volátiles).

Deben ser poco exigentes en factores de crecimiento para limitar las adiciones de vitaminas a los medios industriales.

En el cuadro 2.10, se resumen las características que se deben considerar al momento de seleccionar un microorganismo par producir etanol, entre las más importantes se encuentra el rendimiento y la tolerancia al etanol. El rendimiento no debe ser menor del 90% y tolerar una concentración de etanol superior a 40 g L⁻¹.

Cuadro 2.10. Características de un microorganismo utilizado para producir bioetanol

CARACTERÍSTICAS DE UN MICROORGANISMO PRODUCTOR DE ETANOL	
Rendimiento de etanol	>90% teórico
Tolerancia al etanol	>40 g L ⁻¹
Productividad de etanol	>1 g L ⁻¹ h ⁻¹
Concentración de carbohidratos	>50 g L ⁻¹
Requisitos simples de crecimiento	Formulación de medio de cultivo barato
Condiciones de cultivo	pH ácido y temperaturas altas

2.11 *Saccharomyces cerevisiae*

Pertenece al grupo de las levadura (reino *Fungi*, orden *Saccharomycetales*) es el nombre común de un grupo de hongos unicelulares (eucariotas) y por lo tanto sus estructuras se encuentran formadas por pared celular, núcleo diferenciado y organelos como ribosomas y mitocondrias. La formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas y el desarrollo de las mitocondrias dependen de las condiciones fisicoquímicas y la edad del cultivo (Longo *et al.*, 1997).

La taxonomía clásica de las levaduras se basa en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como son la forma de las células, la apariencia de los cultivos en los medios sólidos y líquidos, la tolerancia a diferentes condiciones de cultivo y la posibilidad de asimilar o fermentar diferentes sustratos, la taxonomía de *S. cerevisiae* se muestra en el cuadro 2.11 (García Garibay *et al.*, 2004).

Cuadro 2.11. Clasificación taxonómica de *S. cerevisiae*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino	<i>Fungí</i>
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetidae</i>
Genero	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>cerevisiae</i>

Tradicionalmente varias especies del genero *Saccharomyces cerevisiae* han sido utilizadas para la producción de bioetanol a nivel industrial, debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2007).



2.11.1 Características morfológicas

En la Figura 2.11 se pueden observar las características macroscópicas de *Saccharomyces cerevisiae*, la forma de las células puede ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o sumamente alargada, en agrupaciones de dos, cadenas cortas o racimos o bien sin agruparse. La apariencia es muy diversa: de color crema a ligeramente café o blanco, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas, brillantes u opacas. Sus dimensiones son: 2.5-10 μ de ancho y 4.5-21 μ de largo. (Wilkins *et al.*, 2007).

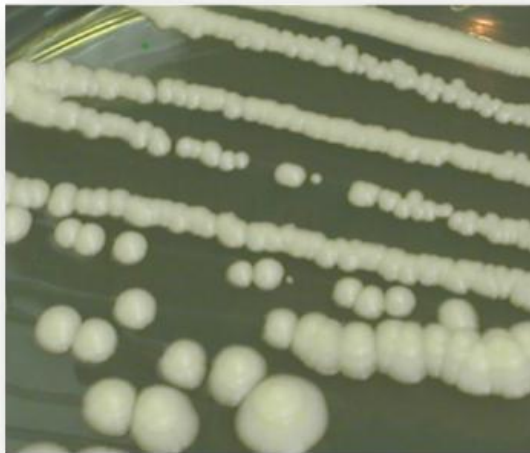


Figura 2.11. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

En cuanto a las características microscópicas las células de *S. cerevisiae* se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas como se muestra en la Figura 2.12 donde la pared celular se tiñe de azul y se observan claramente las características anteriormente mencionadas (Fajardo y Sarmiento, 2007).

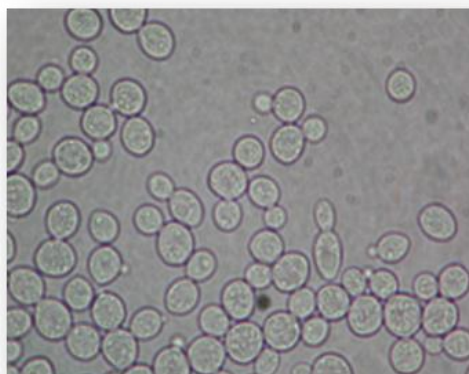


Figura 2.12. Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.11.2 Propiedades fisiológicas

2.11.2.1 Presencia de oxígeno

Las levaduras son aeróbicas o facultativas, cuando el oxígeno está presente, éstas crecen eficientemente a partir de carbohidratos del medio para producir la biomasa y CO₂. Sin embargo cuando no hay oxígeno o éste disminuye, las levaduras cambian a metabolismo anaeróbico o fermentativo, que se traduce en la formación de menor cantidad de biomasa y producción de etanol. *Saccharomyces cerevisiae* crece en condiciones aerobias o microaerobias, con la presencia de oxígeno en concentraciones de por lo menos 1 ppm (García Garibay *et al.*, 2004).

2.11.2.2 Temperatura

La temperatura es un factor relevante, debido a que desde el punto de vista microbiológico, presentan temperaturas óptimas para su crecimiento donde se obtiene el mayor rendimiento. Esta temperatura suele encontrarse muy cerca de la temperatura máxima soportada y varía según la clase de microorganismo. En las levaduras la temperatura afecta la capacidad de éstas para desdoblar los azúcares, la reproducción y el crecimiento celular, con temperaturas mínimas permisibles entre 0.3 y 0.5 °C, y las máximas entre 34 y 47 °C (Feldmann, 2005).

La fermentación es un proceso exotérmico, que requiere de un control de temperatura en su valor óptimo que es de 30°C. La temperatura de las levaduras, oscila entre 25 y 30°C (Frazier y Westhoff., 2000).

2.11.2.3 pH

El pH es, al igual que la temperatura, una variable significativa en la producción de biomasa. Cada microorganismo presenta un rango de pH donde su crecimiento es posible e incluso algunos presentan un pH óptimo, puesto que cambios en el pH son causantes de la desnaturalización de enzimas y de problemas en el intercambio de iones en la membrana celular. El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido a un pH de 4.0-7.0, no se desarrollan bien en medios alcalinos. A partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa (Garzón *et al.*, 2009).

En el cuadro 2.12, se resumen los requerimientos de crecimiento más importantes de *S. cerevisiae*, teniendo una tolerancia a carbohidratos importante la cual oscila entre 30 y 45%.

Cuadro 2.12. Características de crecimiento de *S. cerevisiae*

PRINCIPALES CARÁCTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO	
Temperatura (°C)	25-30
pH (rango óptimo)	4.5-7.0
Nitrógeno (%)	7.5-8.5
Proteína (%)	35-45
Ácidos Nucleicos (%)	06-dic
Carbohidratos (%)	30-45



2.11.3 Reproducción

S. cerevisiae se reproduce por gemación. En el proceso de gemación se forman una pequeña protuberancia en la perforación de la célula, la cual se debe a un debilitamiento local de pared celular. Esta pequeña protuberancia se agranda conforme se va del material citoplasmático proveniente de la célula, hasta alcanzar casi el tamaño de esta (Dámaso, 2006). El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula de la hija. Se forma la pared de la madre. La producción de las gemas puede ocurrir en uno en ambos extremos de la célula, lo que se conoce como gemación polar ilustrado con mayor detalle en la Figura 2.13. En el lugar de donde se formó una gemación queda una cicatriz en la pared de la célula.

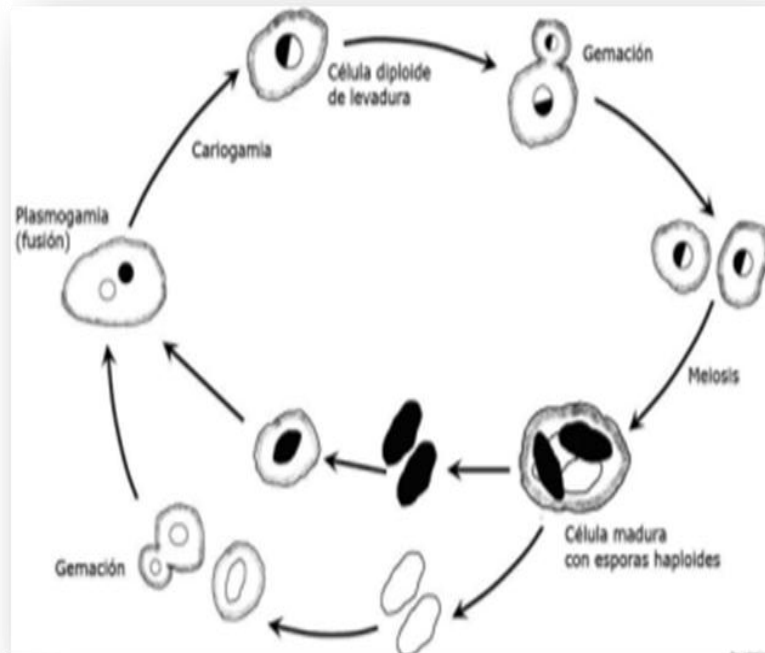


Figura 2.13. Esquema del proceso de gemación de *S. cerevisiae*



2.11.4 Metabolismo

La mayoría de levaduras usan azúcares como su principal fuente de carbono y energía. La mayor fuente de energía es la glucosa y la glucólisis es la principal vía para la conversión de la glucosa a piruvato. La producción de energía en forma de ATP es acompañada de la generación de intermediarios y disminución de energía en forma de NADH para las vías biosintéticas. *S. cerevisiae*, realiza fermentación alcohólica mediante la ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas a través de la cual una molécula de D-glucosa produce dos moléculas de piruvato (Madigan *et al.*, 2003). Bajo condiciones anaeróbicas el piruvato producido durante la glucólisis es descarboxilado a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa, después el acetaldehído es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenada, con la liberación de CO₂, ilustrado en la Figura 2.14.

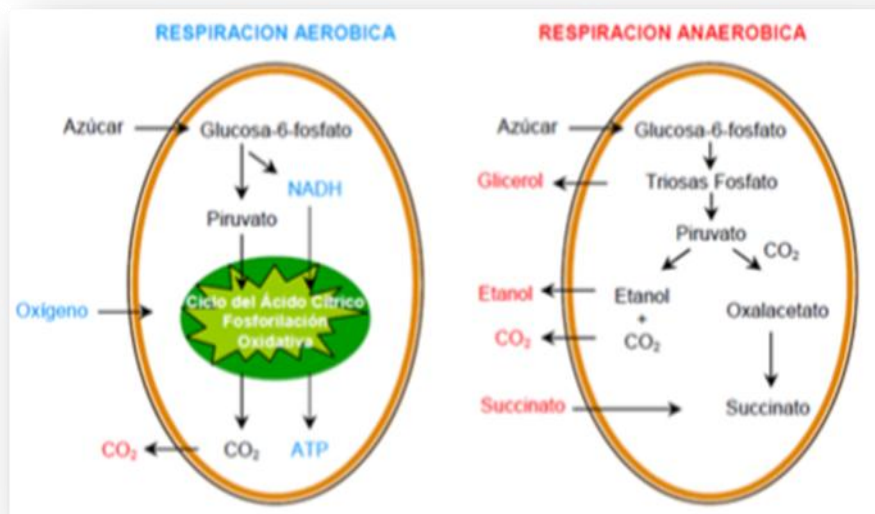


Figura 2.14. Esquema del metabolismo de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.



En teoría, el rendimiento es de 0.511, este es un factor de conversión de glucosa a etanol (Oberoi *et al.*, 2010). *Saccharomyces cerevisiae*, fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta la lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa (Wilkins *et al.*, 2007).

2.12 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram negativa, es decir presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano. Es una bacteria anaeróbica y microaerofílica, tolerante al oxígeno (Wilkins, 2008). Tiene varias propiedades atractivas como biocatalizadores para la producción de etanol, tolera hasta 120 g/L y tiene un alto rendimiento de etanol. Este microorganismo fue descubierto originalmente en el pulque mexicano y en el vino de palma africano. Regularmente forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales, este microorganismo se ilustra en la Figura 2.15, donde se puede observar como un microorganismo en forma de bastón el cual mide cerca de 5 μm de largo (García Garibay *et al.*, 2004).

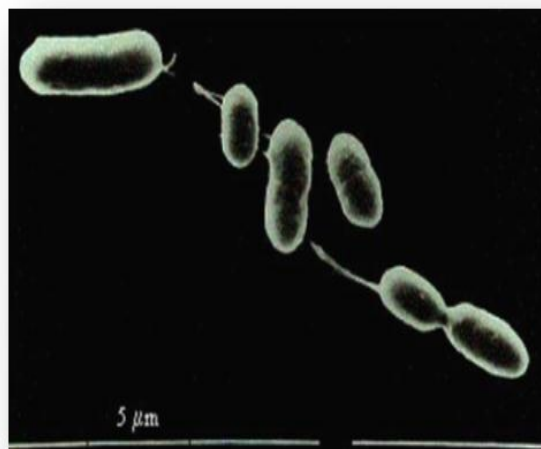


Figura 2.15. Células re-suspendidas de *Z. mobilis* CP4 (5600x).

Zimomonas mobilis en condiciones anaeróbicas produce etanol a partir de glucosa, fructosa y sacarosa mediante la ruta metabólica de Entner-Doudoroff (Wilkins, 2008).

Desde el punto de vista energético *Z. mobilis* ha sido considerada ineficiente para producir biomasa, ya que una sola molécula de ATP es producida por cada molécula de monosacárido metabolizada, (comparada con otros microorganismos que utilizan la ruta metabólica de EMP) y más carbono es canalizado para la producción de etanol, obteniendo rendimientos y productividades de etanol por arriba de 1.9 mol etanol/ mol glucosa, esto representa aproximadamente el 97% de la eficiencia de conversión teórica. Como consecuencia de una menor producción de ATP, *Z. mobilis* mantiene un mayor flujo metabólico de la glucosa, lo que garantiza una mayor productividad de etanol y tolerancia a altas concentraciones de azúcares y etanol (Wilkins, 2008). El pH también es un factor del cual depende la producción de etanol, un pH de 6.5 es óptimo para el crecimiento de las células de *Z. mobilis* mientras que un pH de 4.0 es óptimo para la producción de etanol.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Producción Animal de la UAAAN y de Ingeniería Química de la UAdeC, en Saltillo, Coahuila, México. Este trabajo se dividió en 4 etapas, las cuales se describen a continuación.

ETAPA I: PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada en este estudio fue una variedad de tuna roja del nopal cardón, (*Opuntia streptacantha* L.), proveniente de la región de Saltillo, Coahuila. El muestreo se llevó a cabo entre los meses de agosto y septiembre de 2011. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.1 Pelado de la tuna y secado de la cáscara

Se separó cáscara y pulpa. Las cascaras de tuna fueron cortadas en trozos pequeños y posteriormente se sometieron a un proceso de secado, el cual se llevó a cabo en un deshidratador de bandejas por aire caliente a una temperatura de 60°C, (CEB-2600, México). El material seco fue triturado en un molino de discos (Thomas-Wiley, U.S.A) y tamizado para obtener un tamaño de partícula a través del tamiz No. 80, el cual se diluye sin problemas en el agua y facilita la hidrólisis por ampliación del área de contacto.



3.1.1 Separación de la semilla

La pulpa de tuna, fue macerada mecánicamente, y enseguida se sometió a un tratamiento enzimático. La enzima utilizada fue pectinasa (Pectinex Ultra, Sigma-Aldrich, México). El tratamiento enzimático se llevó a cabo empleando una relación de

50 μ L de enzima a 3000 unidades por 50 mL de concentrado de pulpa de tuna, a una temperatura de 37°C, tomando 250 μ L de muestra en los tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos). La actividad enzimática se midió por la técnica de azúcares reductores (Miller, 1959).

3.1.2 Hidrolisis de la pared celular de la cáscara de tuna

Se pesaron 20 mg de muestra, se colocaron en un vaso de precipitado de 50 mL, junto con 2 mL de H₂SO₄ concentrado, se colocó en una parrilla con agitación por un tiempo de 5 minutos, transcurrido este tiempo se agregaron 0.5 mL de agua destilada y se dejó en agitación constante por 3 horas, enseguida se agregaron 80 mL de agua destilada, se filtró en un papel Watman N° 1, con ayuda de una bomba de vacío; al final se aforó a 100 mL. A la solución obtenida se le determinaron azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956) y azúcares reductores (Miller, 1959).



ETAPA II. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

3.2 Análisis de la composición proximal

En el análisis proximal se determinaron el contenido de humedad, materia seca total, cenizas totales, proteína bruta, extracto etéreo o grasa total, fibra cruda, fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) azúcares totales y azúcares reductores.

3.2.1 Determinación del contenido de materia seca total o sólidos totales (Método termogravimétrico, AOAC).

3.2.2 Determinación del contenido de cenizas totales (AOAC).

3.2.3 Determinación del contenido de grasa total o extracto etéreo (Método Soxhlet, AOAC).

3.2.4 Determinación del contenido de proteína bruta (Método Kjeldhal).

3.2.5 Determinación del contenido de fibra cruda (Método termogravimétrico, AOAC).

3.2.6 Determinación de fibra detergente neutro (FDN)

El procedimiento para determinación de fibra detergente neutro se utiliza para conocer los componentes de pared celular que no son solubles como lignina, celulosa y hemicelulosa, el cual es un método rápido para determinar fibra total en vegetales, ya que estos componentes se digieren lentamente y en diferentes porcentajes.



3.2.7 Determinación de fibra detergente ácido (FDA).

El procedimiento para determinar fibra detergente ácido permite la obtención rápida de la cantidad de celulosa y lignina en vegetales. La diferencia entre el valor de las paredes celulares y la fibra detergente ácido da una estimación del valor de hemicelulosa ya que esta diferencia también incluye una fracción de proteína adherida a las paredes celulares. Este método se emplea también como procedimiento preliminar en la determinación de lignina.

3.2.8. Determinación de azúcares totales (Método fenol-sulfúrico).

En ácido sulfúrico concentrado, los polisacáridos son hidrolizados a sus constituyentes monosacáridos, a su vez estos son deshidratados a reactivos intermediarios que en presencia de fenol forman productos amarillo-naranja estable como se muestra en la Figura 3.1 la intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en la solución (Dubois *et al.*, 1956).

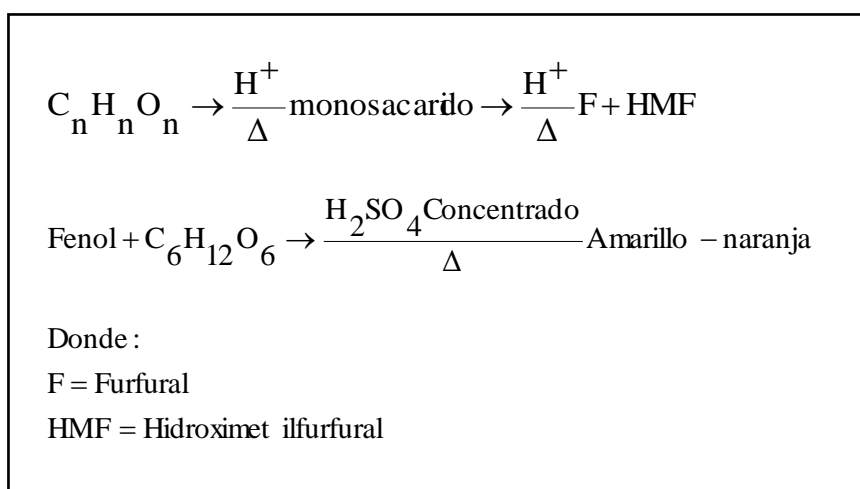


Figura 3.1. Reacción general Método fenol-sulfúrico



3.2.8 Determinación de azúcares reductores (Método Acido 3,5-Dinitrosalicílico, DNS).

El método empleado se basa en la hidrolisis de la sacarosa para producir una molécula de glucosa y una de fructosa, y la posterior medición de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico como se ilustra en la Figura 3.2. Se formó un compuesto nitrogenado amarillo, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

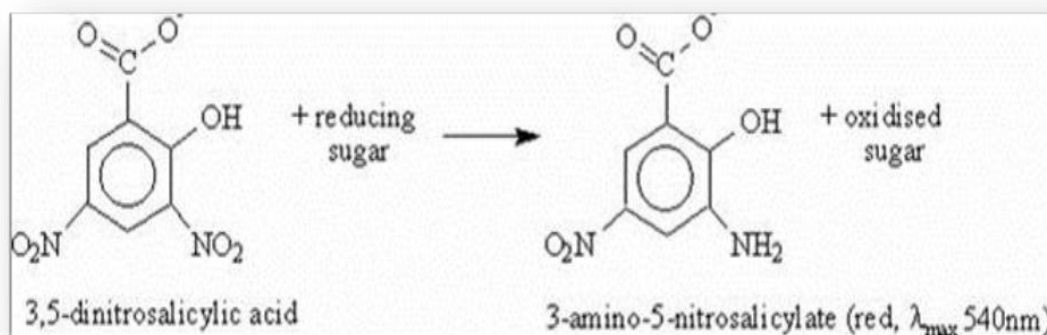


Figura 3.2. Reacción general de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico

Los azúcares reductores como la glucosa y la fructosa son azúcares reductores, es decir se oxidan fácilmente con agentes oxidantes suaves. El grupo aldehído se oxida. Mientras que los azúcares que tienen el grupo carbonilo formando un acetal son azúcares no reductores, por ejemplo la sacarosa que tiene los átomos de carbono anomérico de los monosacáridos unidos entre sí, de manera que ambos carbonilos están protegidos y no reaccionan.

Todos los análisis se realizaron por triplicado, media y valores de desviación estándar se calcularon utilizando el Microsoft Excel programa de software.



ETAPA III. SACARIFICACIÓN ACIDA Y CON VAPOR DE LA CÁSCARA DE TUNA

3.3 Sacarificación con H₂SO₄ diluido

En matraces Erlenmeyer de 125 mL, se colocó cáscara de tuna a una proporción de 12%, la cual fue tratada con ácido sulfúrico concentrado en proporciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 % (w/v), se utilizó agua como control, las muestras fueron sometidas a sacarificación con vapor realizando un autoclavado a 121 °C durante 10 min y 15 psi.

Una vez concluido el tiempo de sacarificación las muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 mL (Axygen, USA) y centrifugadas a 8000 rpm por 30 min a 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). El precipitado se recogió en el matraz receptor a través de filtración al vacío y se le analizó la cantidad de azúcares reductores liberados en la sacarificación, con el método reportado por Miller, (1959), y azúcares totales, (Dubois *et al.*, 1956).

3.3.1 Cinética de sacarificación por explosión con vapor

En matraces Erlenmeyer de 125 mL, se colocó cáscara de tuna a una proporción de 12%, la cual fue tratada con ácido sulfúrico concentrado a 0.5% (w/v), y sometida a sacarificación con vapor por tiempos de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos a 121°C y 15 psi.

Una vez concluido el tiempo de sacarificación las muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 mL (Axygen, USA) y centrifugadas a 8000 rpm por 30 min a 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). El precipitado se recogió en el matraz receptor a través de filtración al vacío y se analizó la cantidad de azúcares reductores liberados, con el método reportado por Miller, (1959), y azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956).



ETAPA IV. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

3.4 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae*; esta fue comprada en la ATCC (American Type Culture Collection). La cepa fue crecida en placas que contienen de 20 a 25 mL de medio YPD. El medio contenía (g L⁻¹): D-xilosa 15.0, extracto de levadura 10.0, peptona de carne 20.0, agar bacteriológico 15.0 y ajustado a un pH de 7 con NaOH 5 M. El medio se esterilizó en una autoclave (Market Forge, USA) a 121°C por 15 minutos y 15 psi.

Las muestras recolectadas se inocularon de manera convencional (estría abierta cruzada). Con el asa calibrada se toma la colonia de manera que se formó una burbuja uniforme en el ojo del asa; esta gota se extiende en el centro de la caja, el cual se denomina "zona de descarga", posteriormente se deben realizar 3 diluciones por la técnica de estría abierta cruzada. Calentando al rojo vivo el asa microbiológica cada vez que se estríe, para lograr la separación de las colonias de manera efectiva. Las cajas deben de ser incubadas a 30°C (Isotemp Incubator Senior Model, Fisher, USA) en condiciones aeróbicas, por un periodo de 48 horas.

3.4.1 Preparación y propagación de células de levadura

Se inocularon asépticamente matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL del medio, con una suspensión de células incubadas previamente por 48 horas la cual contenía un inóculo que se estandarizó, por el empleo de asas calibradas de 0.1 mL. El medio de cultivo utilizado para la producción de células de levadura fue el medio YPD. El medio contenía (g L⁻¹): D-xilosa 15.0, extracto de levadura 10.0, peptona de carne 20.0 y ajustado a un pH de 7 con NaOH 5 M. El medio se esterilizó en una autoclave (Market Forge, USA) a 121°C por 15 minutos a 15 psi.

La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital (Labnet 311DS, USA), empleando una velocidad de agitación de 180 rpm y una temperatura de 30 ± 2 °C durante 2 días.

3.4.2 Condiciones de cultivo

Se realizaron fermentaciones sin incorporación de oxígeno, por un periodo de 144 horas, se tomo muestra cada 12 horas, la fermentación se llevo a cabo en reactores de 25 mL, en los cuales se depositaron 18 mL de medio de cultivo y 10% de inculo, los frascos se incubaron (Isotemp Incubator Senior Model, Fisher, USA) a 30°C y pH inicial de 6.58, el pH se ajusto con NaOH 5 M.

3.5 Fermentación alcohólica

Se evaluó la cinética de producción de etanol, biomasa y consumo de sustrato tomando muestras por triplicado a los tiempos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas de fermentación. La muestra al tiempo inicial de fermentación (0 hrs) representó la muestra control.

Una vez concluido el tiempo de fermentación de las muestras, éstas fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 mL (Axygen, USA) y centrifugadas a 8000 rpm por 30 min a 4°C (Sorball, Biofuge Primo R Thermo Centrifugation, USA). El sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo de centrifuga y sometido a una segunda centrifugación bajo las condiciones de 8000 rpm por 20 min a 4°C, esto con el objetivo de eliminar restos celulares.

3.5.1 Evaluación de la biomasa celular

A partir del precipitado obtenido en la primera centrifugación se evaluó la biomasa celular, la cual fue lavada 3 veces utilizando volúmenes de 30 mL de agua



desionizada para remover restos de medio de cultivo. La determinación de biomasa se llevó a cabo por el método gravimétrico. Brevemente el método consiste en llevar la biomasa a peso constante en un horno de secado (Felisa, México) a 80°C por 24 horas.

3.5.2 Evaluación del consumo de sustrato

El análisis de consumo de sustrato se realizó cuantificando el contenido de azúcares totales Dubois *et al.*, (1956) y de azúcares reductores Miller, (1959). Se empleó glucosa anhidra como patrón estándar.

3.5.3 Evaluación de la concentración de etanol

La cuantificación de etanol se realizó por cromatografía de gases equipado con detector de ionización de flama (Varian Star 3600 CX). Las condiciones del equipo fueron establecidas así: volumen de inyección de 1 μL , temperatura del inyector 150°C, flujo de columna de 30°C/min (CP Wax X 52 CB), temperatura del detector 270°C. El gas de arrastre empleado fue helio con flujo de 30 mL/min, hidrogeno 40 mL/min y aire con un flujo de 300 mL/min. Los valores obtenidos fueron calculados empleando una curva de calibración de etanol previamente estandarizada, la cual se preparó de la siguiente manera: Se preparó un conjunto de muestras de solución agua/etanol a diferentes concentraciones. Se empleó etanol anhidro de 99.9% de pureza y agua desionizada. Las muestras fueron preparadas obteniéndose mezclas con concentraciones de 10 gL^{-1} , 20 gL^{-1} , 30 gL^{-1} , 40 gL^{-1} y 50 gL^{-1} .



IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante las cuatro etapas en las cuales se dividió este trabajo:

ETAPA I. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

En esta etapa se realizaron todas las operaciones unitarias necesarias, para preparar el material vegetal. Los resultados se presentan a continuación:

4.1 Pelado de la tuna y secado de la cáscara

4.1.1 Rendimiento total del material vegetal empleado

La tuna está constituida por pulpa, cáscara y semillas. La cáscara es un subproducto de la industria transformadora de la tuna, y sus desechos generan problemas de contaminación si no son tratados correctamente. En el cuadro 4.1, se muestran los resultados obtenidos del rendimiento neto de las tres partes que constituyen la tuna, como se puede observar la cáscara representa la mayor proporción con valores cercanos al 50%. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por SAGARPA en 2004 los cuales indican valores donde la cáscara de la fruta representa del 40-50% del fruto, la pulpa 40-50% y las semillas 5-10%. De acuerdo con otros autores Villarreal (1964); Paredes (1977), en proporción la cáscara y la pulpa representarían del 40 al 50% cada una y las semillas entre un 5 y un 10%.



Cuadro 4.1. Rendimiento de la tuna

RENDIMIENTO NETO (%)	
Cáscara	46.80
Pulpa	43.57
Semillas	9.63

4.1.2 Deshidratación de la cáscar4 de tuna

Se evaluó la velocidad de secado de la cáscara de tuna, en la Figura 4.1 se presenta la velocidad de deshidratación, donde se puede observar que se evapora cerca de 1 Kg de agua por hora de secado, además al final, aun quedó una proporción de humedad correspondiente al agua ligada, esta se refiere a aquella que se encuentra haciendo interacción entre los enlaces que mantienen unidos a los componentes propios de la cáscara de tuna, como son carbohidratos, proteínas y grasas.

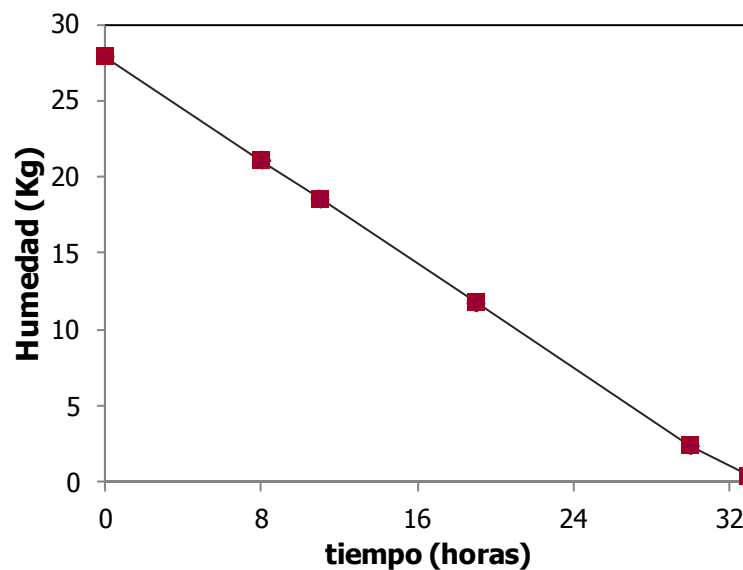


Figura 4.1. Velocidad de secado de la cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha* L.)



La cantidad de humedad parcial encontrada en la cáscara de tuna constituye el 85.55%, Sánchez-Mejorada (1991) reportó, valores de hasta 88.54% en cáscara de tuna del nopal cardón, no se reporta el mes del año en que se realizó el análisis.

4.1.3 Separación de la semilla

La Figura 4.2 ilustra una cinética típica de liberación de azúcares reductores, por efecto de la hidrólisis con la enzima pectinasa (3800 unidades/mL), en concentración de 50 μ L de enzima y 50 mL de jugo de tuna. Es decir se utilizaron 190 unidades de la enzima para separar la semilla de la pulpa.

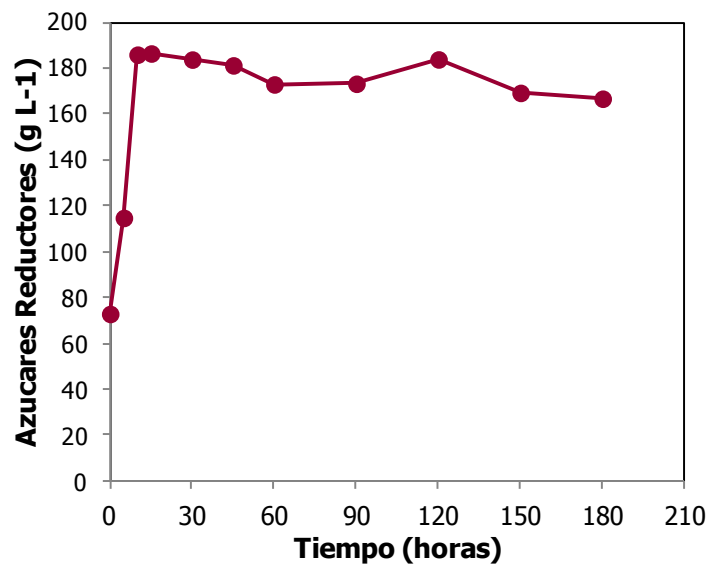


Figura 4.2. Efecto de la variación del tiempo de hidrólisis en la degradación enzimática de jugo de tuna

En la Figura 4.2 se puede observar la variación del contenido de azúcares reductores, liberados durante la hidrólisis. Al inicio de la cinética el jugo de tuna tenía una concentración de azúcares reductores superior a 50 g L⁻¹ luego, con la adición de la mezcla enzimática hubo un incremento progresivo de la

concentración de azúcares hasta 187 g L^{-1} , esto se presentó a los 15 minutos de la cinética, después de este lapso la concentración de azúcares permaneció constante hasta el final. Además 15 minutos fueron suficientes para separar la semilla, lo cual indica que la acción de la enzima pectinasa en el jugo de tuna fue favorable. Padrón-Pereira (2010), reporta el uso de enzimas con actividad pectinasa, hemicelulasa y celulasa para la clarificación de una mezcla diluida de pulpa de frutos de Cactus (*Opuntia boldinghii* Britton & Rose) y jugos de naranja y toronja, a una concentración de enzimas (0.76 mL/100 mL de mezcla de jugo diluido, %v/v) y sustrato (53.85 mL de mezcla de jugo/100 mL de agua, %v/v), encontró que en 90 minutos se obtuvo el mayor contenido de azúcares reductores (4.19 g glucosa/100 mL de mezcla de jugo diluido). Los resultados obtenidos en este estudio son más viables en cuanto al tiempo empleado para la hidrólisis.



ETAPA II. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

4.2 Caracterización fisicoquímica de la tuna

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de la tuna, se analizó cáscara y pulpa por separado, los análisis se realizaron en base seca.

4.2.1 Caracterización fisicoquímica de la cáscara de tuna

El cuadro 4.2 se muestran los resultados obtenidos del análisis bromatológico de la cáscara de tuna. En el cuadro 4.2 se puede observar que la fibra detergente neutro (FDN), constituye la mayor proporción de la materia seca total de la cáscara de dicha fruta, esta fibra corresponde al contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. El contenido de carbohidratos representa un 4% aproximadamente. En cuanto a la humedad esta constituye el 11.91%. Realizando una comparación con un análisis efectuado en la cáscara de tuna del nopal cardón, por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en el 2006, donde se obtuvieron resultados similares en cuanto a proteína de 0.43% y grasa total de 0.22%, en lo referente al contenido de carbohidratos, fibra dietética y cenizas se reportan valores más bajos, teniendo 1.41% de carbohidratos, 7.80% de fibra dietética y 0.10% de cenizas, no se menciona la época del año en el que fue realizado el análisis. En cuanto al contenido de fibra cruda Sánchez-Mejorada (1991) reportó 7.80% en la cáscara de tuna del nopal cardón, valor similar al reportado en este estudio.

Cuadro 4.2. Composición fisicoquímica de la cáscara de tuna

COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA BASE SECA (%)	
Humedad	11.91
Materia seca total	88.09
Cenizas	14.25
Proteína	0.04
Grasa total	1.16
Carbohidratos	4.41
Fibra cruda	6.59
Fibra detergente neutro (FDN)	38.41
Fibra detergente acido (FDA)	22.70

La materia lignocelulósica en las paredes de los vegetales constituye la mayor proporción. En el cuadro 4.3 se presenta el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina que se encuentra en la cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha* L.).

Cuadro 4.3. Composición lignocelulósica de la cáscara de tuna

COMPOSICIÓN LIGNOCELULÓSICA (%)	
Celulosa y Lignina	22.70
Hemicelulosa	15.71

Se puede observar que estos elementos representan un porcentaje importante en la constitución de la cáscara. Estos datos se obtuvieron con los resultados de FDA Y FDN, respectivamente. Mejía-Giraldo *et al.* (2007), reportan valores de celulosa 14.21% y de hemicelulosa 4.88%, pero en cáscara de mango, los valores presentados en este estudio para cáscara de tuna son mayores, sin embargo, Naresh Sharma *et al.* (2007) reportan valores de celulosa 23.48% y de

hemicelulosa 18.40%, en cáscara de plátano, estos valores son similares a los reportados en el presente estudio.

4.2.2 Caracterización fisicoquímica de la pulpa de tuna

La tuna es un fruto de ciclo corto que se desarrolla aproximadamente en 120 días, los cambios respiratorios y bioquímicos después de la cosecha, son poco significativos, la caracterización bromatológica para este, se ilustra en el cuadro 4.4 al ser un producto proveniente de plantas xerófitas le permite acumular grandes cantidades de agua en forma muy rápida y es por ello que es un fruto muy succulento, teniendo valores de humedad por encima de 60%, el contenido de carbohidratos también representa una porción importante de la pulpa.

Cuadro 4.4. Caracterización fisicoquímica de la parte comestible de la tuna

COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA (%)	
Humedad	67.14
Materia seca total	32.86
Cenizas	1.51
Proteína	0.39
Grasa	0.08
Carbohidratos	13.25
Fibra cruda	0.40
Fibra detergente neutro (FDN)	11.50
Fibra detergente ácido (FDA)	4.70

De acuerdo con estudios realizados por Russel y Felker, (1987); Sepúlveda y Sáenz, (1990); Stintzing *et al.* (2005) y Mercado-Silva, (2004), donde se reporta que la pulpa de tuna variedad (*Opuntia ficus-índica*), con maduración media, destaca por su alto contenido de humedad y carbohidratos, resaltando su alto

contenido de fructosa. El agua constituye el 87.55 %, proteína 0.73%, grasa total 0.51%, carbohidratos 9.57%, fibra dietética, ceniza 1.64%. Otros estudios, Sumaya-Martínez *et al.* (2010). mencionan que la composición química de la tuna consiste de 85 % de agua, 14 % de azúcares y de 1 % de proteína. Estos últimos resultados son similares a los encontrados en este estudio.

La composición lignocelulósica de la pulpa de tuna se presenta en cuadro 4.5, esta constituye una porción menor en comparación con los valores encontrados para la cáscara, los azúcares presentes en la tuna pertenecen al orden de monosacáridos como glucosa y fructosa principalmente. Reportes anteriores, Sepúlveda y Sáenz, (1990); Rodríguez *et al.* (1996) mencionan que los azúcares presentes en la pulpa de tuna son de tipo reductor, con cerca del 53% de glucosa y el resto fructosa.

Cuadro4.5. Composición lignocelulósica de la pulpa de tuna

COMPOSICIÓN LIGNOCELULÓSICA (%)	
Celulosa y Lignina	6.80
Hemicelulosa	4.70



ETAPA III. SACARIFICACIÓN ACIDA Y CON VAPOR DE LA CÁSCARA DE TUNA

En esta etapa se analizó el efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido, utilizado para hidrolizar la cáscara de tuna, se aplicó simultáneamente un autoclavado a 121°C por 10 min y 15 psi. También se realizó una cinética de sacarificación por explosión con vapor, los resultados se presentan a continuación:

4.3 Sacarificación con H₂SO₄ diluido

El estudio de la hidrólisis ácida de la cáscara de tuna se muestra en la Figura 4.3 es evidente que durante el tratamiento con ácido sulfúrico diluido 0.50% (w/v) se obtiene una concentración de azúcares mayor, en comparación con los tratamientos donde se utilizó ácido sulfúrico en concentraciones de 0.25%, 0.75% y 1.00% (w/v). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Oberoi *et al.* (2010), bajo las mismas condiciones de estudio reportan concentraciones de azúcares totales de 50.81 g L⁻¹, utilizando cáscara de naranja, en comparación con la cáscara de tuna esta ofrece mejores resultados obteniéndose 71.77 g L⁻¹ de azúcares totales. En cuanto a la concentración de azúcares reductores, se puede observar que al igual que los azúcares totales, el tratamiento con ácido sulfúrico diluido en 0.50% (w/v) ofrece la mayor concentración de azúcares fermentables, teniendo 45.29 g L⁻¹, y que a mayor concentración de ácido, evidentemente disminuye la concentración de azúcares reductores. Mejía *et al.* (2007), reportan tratamientos similares en cáscara de mango y menciona que los azúcares tienden a reducir su concentración cuando se utiliza ácido sulfúrico diluido en concentraciones mayores de 0.50% (w/v), debido a que el ácido por encima de esta concentración degrada los azúcares fermentables.

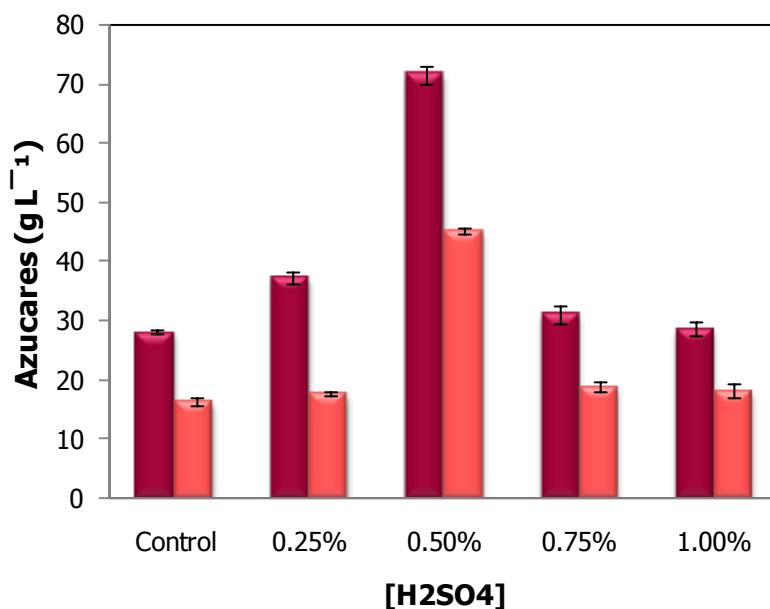


Figura 4.3. Azúcares liberados durante la hidrolisis ácida de la cáscara de tuna



4.3.1 Cinética de sacarificación por explosión con vapor

En este trabajo se empleó un tratamiento por explosión con vapor (EV) que combina un efecto químico ácido sulfúrico diluido 0.50% (w/v) o autohidrólisis con un efecto mecánico. Éste último está causado por la rápida despresurización del reactor que provoca una evaporación del agua que impregna la biomasa, creando fuerzas de cizalla que dan lugar a la separación de las fibras. Los resultados se muestran en la Figura 4.4 en la cual se observa que la concentración de azúcares fue mayor cuando se empleó un tiempo de 5 minutos, aunque la cantidad de azúcares fue muy similar empleando 15 minutos de exposición al vapor se eligió utilizar 5 minutos para optimizar los gastos de energía. Tomás-Pejó (2009), empleó un tratamiento por explosión con vapor para hidrolizar paja de trigo, utilizó 5 minutos y 210°C obteniendo resultados favorables. De acuerdo con Ballesteros *et*



al., (2002); Duff y Murray, (1996) las variables más importantes en el tratamiento por EV son la temperatura, el tiempo y el tamaño de partícula.

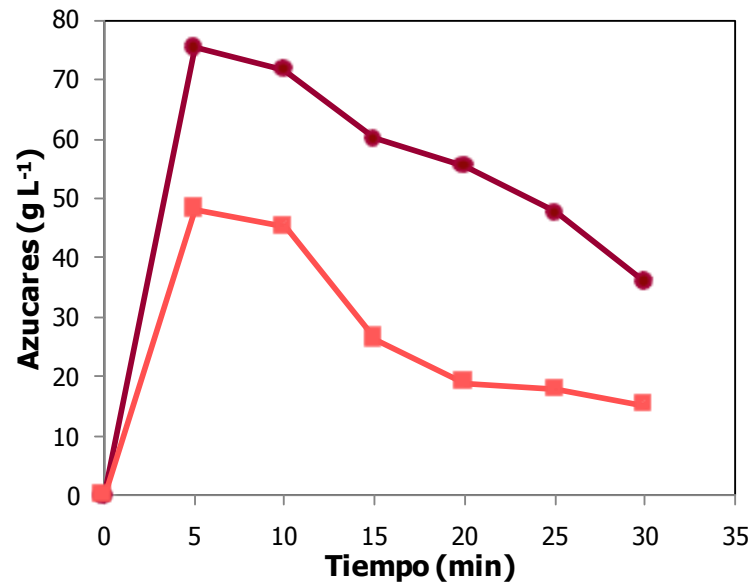


Figura 4.4. Azúcares liberados durante la cinética de sacarificación de la cáscara de tuna





ETAPA IV. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

4.4 Microorganismo

4.4.1 Características macroscópicas

Las características macroscópicas de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada, se ilustran en la Figura 4.5 se observa de apariencia brillante, color crema y la forma de las células es esférica. Dicha descripción concuerda con la mencionada por Wilkins *et al.* (2007).



Figura 4.5. Características macroscópicas de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD

4.4.2 Características microscópicas

En cuanto a las características microscópicas de las células de *S. cerevisiae* teñidas con azul de algodón se ilustran en la Figura 4.6, estas presentan una forma ovalada. De acuerdo a reportes anteriores Fajardo y Sarmiento (2007) mencionan entre las características microscópicas de *S. cerevisiae* la forma ovalada. Otros reportes Yanke *et al.* (1995), mencionan que las levaduras son



hongos microscópicos unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, debido principalmente a la alteración de las condiciones físicas y químicas en el ambiente.

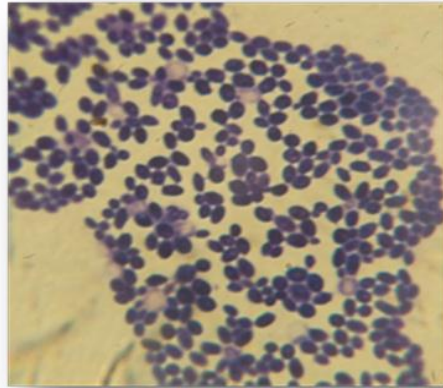


Figura 4.6. Identificación microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD

La pared celular de la levadura *S. cerevisiae* se tiñe de color azul, debido a que en su pared tienen una capa formada por péptidoglicano. Es decir pertenece a los microorganismos Gram negativos.



4.4 Producción de etanol, biomasa y consumo de sustrato

Aquí se evaluó la cinética de producción de etanol utilizando como fuente de carbono cáscara de tuna previamente hidrolizada. En la Figura 4.7 se presenta la cinética de fermentación de producción de etanol, consumo de sustrato y producción de biomasa celular por *S. cerevisiae*.

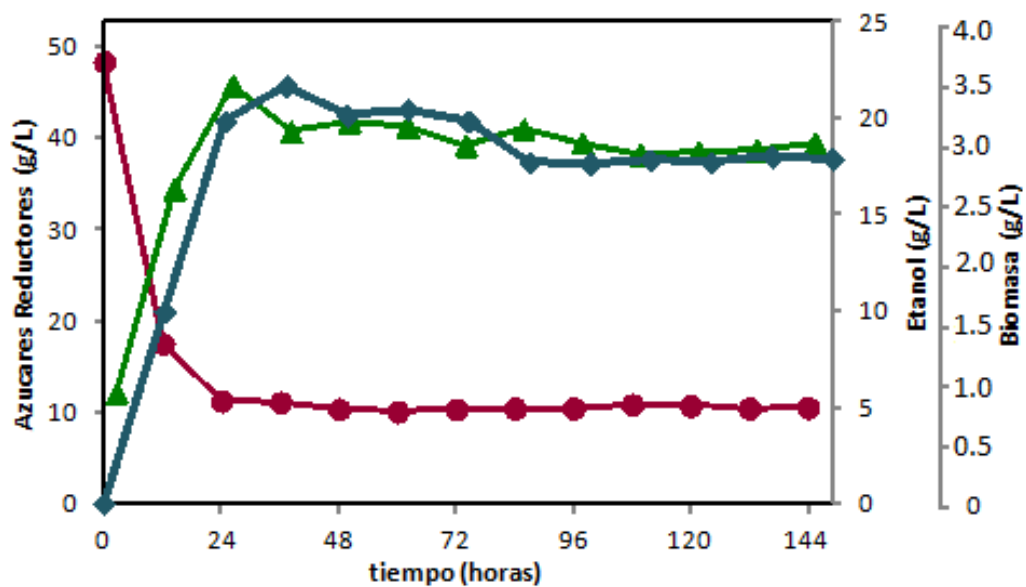
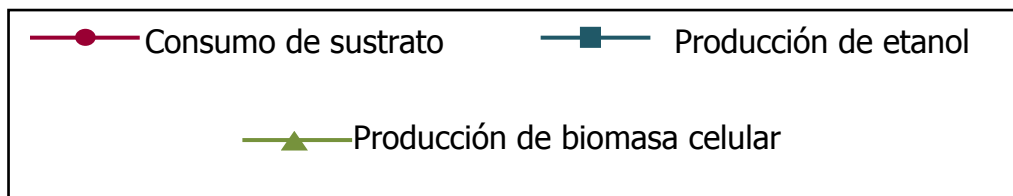


Figura 4.7. Cinéticas de producción de etanol, biomasa celular y consumo de sustrato durante la fermentación.



De acuerdo a la Figura 4.7 se puede ilustrar que la producción de etanol se empezó a incrementar en el lapso de 24 y 36 horas, siendo este el inicio de la fase exponencial de producción. La máxima producción de etanol (20.9 g L^{-1}) se alcanzó a las 36 horas de fermentación, siendo que la producción de etanol



permaneció constante hasta el final de la fermentación. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que la duración de la fase lag fue de aproximadamente 20 horas. En referencia a la fase de crecimiento exponencial los resultados mostraron un comportamiento similar a los reportados por Sharma *et al.* (2007). Con respecto a la fase estacionaria de producción de etanol, esta se alcanzó a las 36 horas de fermentación. De los resultados obtenidos se puede mencionar que la producción de etanol por *S. cerevisiae* fue menor a los reportados por Wilkins *et al.* (2007), en este estudio se reportan valores de 37 g L⁻¹, empleando *S. cerevisiae* y de 40 g L⁻¹, empleando *Kluyveromyces marxianus* utilizando sacarificación y fermentación simultánea de la cáscara de naranja. Oberoi *et al.* (2010) reportaron valores de 30 g L⁻¹, empleando cáscara de naranja y a *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador. Grohmann *et al.* (1994) obtuvieron valores de 40 g L⁻¹, empleando sacarificación y fermentación simultánea de la cáscara de naranja y también a *S. cerevisiae*. Estas diferencias en la producción de etanol puede deberse a la materia prima utilizada, al método de obtención de etanol y al microorganismo fermentador.

En la Figura 4.7 también se presenta la tendencia del consumo de sustrato durante la producción de etanol por *S. cerevisiae*. De acuerdo a la ilustración se puede observar que los valores de velocidad de consumo es menor en las primeras 15 hrs de fermentación, incrementándose a partir de las 24 hrs, después de este tiempo de fermentación la velocidad de consumo de sustrato fue constante. Oberoi *et al.* (2011) reportaron que el consumo de sustrato fue constante a partir de las 10 horas de fermentación y permaneció hasta las 15 horas que finalizó.

En cuanto a la producción de biomasa, al comparar la cantidad de biomasa y de etanol producidos (Figura 4.7), se observa que la relación biomasa-etanol no es proporcional, lo que confirma lo reportado por Oberoi *et al.* (2010), donde se obtuvo una proporción de 10:30 biomasa-etanol. En este estudio se obtuvo una



proporción 3:20, la cantidad de biomasa producida es poca, lo cual es favorable ya que se invierte poco dinero en la separación de la biomasa durante la destilación.

4.4.1 Sustrato consumido por *S. cerevisiae* durante la fermentación

S. cerevisiae metabolizó los azúcares provenientes de la hidrólisis de la cáscara de tuna, al inicio de la fermentación el medio contenía cerca de 50 g L⁻¹ de azúcares reductores, y al final de la fermentación solo quedaron poco mas de 10 g L⁻¹ es decir solo quedó el 23% de sustrato residual. Estos datos se muestran en la figura 4.8 lo cual confirma que *S. cerevisiae*, fue capaz de consumir 77% de los azúcares fermentables obtenidos de la hidrólisis de la cáscara de tuna.

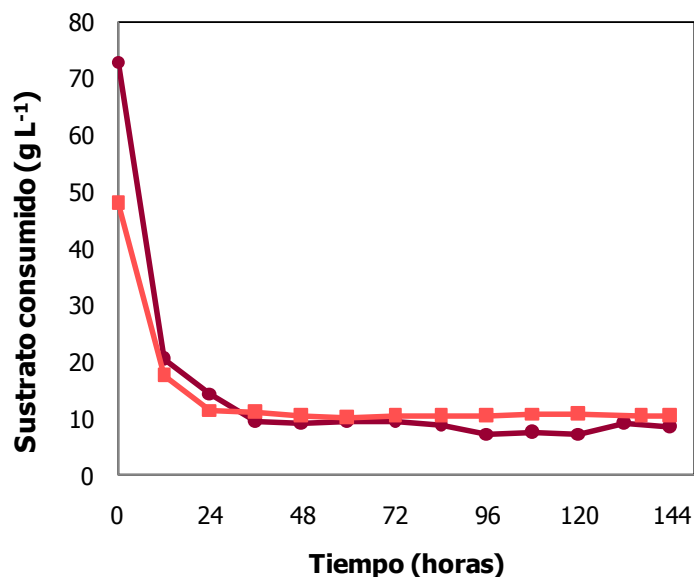


Figura 4.8. Azúcares residuales de la fermentación



En lo referente a los azúcares totales, se puede observar que la mayoría de estos azúcares pertenecían al orden de azúcares reductores, ya que la cantidad de azúcares residuales después de la fermentación fue equivalente con respecto a los

reductores. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Oberoi *et al.* (2010), donde reportan valores de azúcares residuales de 8.25 g L⁻¹, pero a las 15 horas de fermentación y empleando azúcares provenientes de la hidrólisis de la cáscara de naranja.

4.5 Parámetros de la productividad de etanol

Para evaluar el crecimiento celular y la producción de etanol con cáscara de tuna se determinaron los parámetros: producción específica de etanol (P_e), productividad (P), rendimiento celular sobre la fuente de nutrientes ($Y_{X/S}$), rendimiento de etanol sobre la fuente de sustrato ($Y_{P/S}$), estos parámetros fueron determinados acorde a las ecuaciones siguientes:

$$P_e = \frac{[\text{Etanol}]_{\max}}{X} \quad (4.1)$$

$$P = \frac{[\text{Etanol}]_{\max}}{T} \quad (4.2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_f} \quad (4.3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{[\text{Etanol}]_{\max} - [\text{Etanol}]_0}{S_0 - S_f} \quad (4.4)$$

Donde:

P_e : Producción específica de etanol (g L⁻¹);

Etanol_{\max} : máxima concentración de etanol (g L⁻¹);

X : Concentración celular a tiempo t (g L⁻¹);

P : Productividad de etanol (g L⁻¹ h⁻¹);

T : Tiempo para alcanzar la máxima concentración de etanol (h);

$Y_{x/s}$: Rendimiento celular sobre la fuente de nutrientes (g L^{-1});

X_{max} : Concentración celular a tiempo t (g L^{-1});

X_0 : Concentración celular inicial (g L^{-1});

S_0 : Concentración inicial de sustrato (g L^{-1});

S_f : Concentración final de sustrato (g L^{-1});

$Y_{p/s}$: Rendimiento de etanol sobre sustrato (adimensional);

Etanol_0 : concentración de etanol inicial (g L^{-1})

Cuadro 4.6. Parámetros de productividad para la fermentación de etanol

PARÁMETROS DE PRODUCTIVIDAD DE ETANOL	
P_e : Productividad específica de etanol	7.44 g L^{-1}
P : Productividad	$0.60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$Y_{x/s}$: Rendimiento celular sobre la fuente de nutrientes	$6\text{E}-02 \text{ g L}^{-1}$
$Y_{p/s}$: Rendimiento de etanol sobre sustrato (adimensional)	0.57

La productividad específica de etanol, productividad específica de etanol por hora, rendimiento biomasa-sustrato y rendimiento etanol-sustrato se presentan en el cuadro 4.6, de acuerdo a estos resultados se puede mencionar que la productividad específica de etanol por hora fue baja, comparando con los resultados obtenidos por Oberoi *et al.*, (2010), donde reporta valores de 2.02 g L^{-1} a las 15 horas de fermentación.

4.6 Rendimiento de etanol sobre el sustrato

El rendimiento del producto basado en el consumo de sustrato se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{Etanol}_t - \text{Etanol}_0]}{0.511 \times (\text{Concentración de carbohidratos})} \quad (4.5)$$

Donde:

Etanol_t= Concentración de etanol en el tiempo de muestreo.

Etanol₀= Concentración de etanol a las 0 horas.

0.511= Factor de conversión de glucosa a etanol.

Cuadro 4.7. Rendimiento de etanol en los diferentes tiempos de fermentación

TIEMPO (HORAS)	CONCENTRACIÓN DE ETANOL (g L ⁻¹)	RENDIMIENTO (%)
0	0	0
12	10.4	42.11
24	19.9	80.58
36	20.9	84.63
48	20.2	81.79
60	20.2	81.63
72	19.8	80.17
84	17.7	71.67
96	18.2	73.70
108	17.8	72.08
120	17.7	71.67
132	18.0	72.89
144	17.9	72.48

El rendimiento de los diferentes tiempos de fermentación se presenta en el cuadro 4.7, se puede observar que a las 36 horas de fermentación se obtuvo un mayor rendimiento obteniéndose cerca del 85% de etanol respecto a la cantidad de azúcares metabolizados por *S. cerevisiae*. Sharma *et al.*, (2007) reportan valores de rendimiento de etanol, a partir de cáscara de plátano de 62.80% a las 35 horas de fermentación y empleando *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador, lo cual indica que en este estudio se obtuvieron mejores resultados ya que se obtuvo en proporción un 22% más en cuanto al rendimiento de etanol producido.



V. CONCLUSIONES

La cáscara de tuna (*Opuntia streptacantha* L.), es una materia potencial para obtener azúcares fermentables, los cuales se pueden utilizar posteriormente como fuente de carbono durante la fermentación alcohólica, de la cual se obtiene como producto etanol, esto puede ser posible debido a que posee un alto contenido de polisacáridos representados por celulosa y hemicelulosa principalmente (38.41 %). Además el alto contenido de minerales (14.25 % cenizas) la hace que sea un material con características favorables para ser empleado como fuente de sustrato por los microorganismos fermentadores, ya que no se adicionan minerales al medio de fermentación, con lo que se reducen costos de producción.

Mediante el presente estudio se evidenció que es viable la hidrólisis ácida de la cáscara de tuna. En el proceso de hidrólisis se obtuvieron altas concentraciones de azúcares fermentables, empleando el tratamiento con ácido sulfúrico diluido 0.50% (w/v) a una temperatura de 121°C, por 10 minutos y 15 psi, con estas condiciones se obtuvieron rendimientos de 45.29 g L⁻¹. La principal ventaja del tratamiento con ácido sulfúrico diluido es la baja cantidad de ácido requerido en el proceso.

La hidrólisis por explosión con vapor de la muestra, favorece la liberación de azúcares fermentables, obteniéndose una concentración de 48.36 g L⁻¹, en un tiempo de 5 minutos, a 121°C y 15 psi, esto indica que la exposición de la muestra al vapor combinado con un tratamiento con ácido diluido es un tratamiento viable



ya que se aumenta la cantidad de azúcares fermentables significativamente. La producción de bioetanol, utilizando cáscara de tuna como única fuente de carbono y a *S. cerevisiae* como microorganismo fermentador, es posible. Al realizar una fermentación alcohólica en un tiempo de 36 horas y 25°C, se obtuvieron 20.9 g L⁻¹, lo cual indica que *S. cerevisiae* fue capaz de metabolizar los azúcares obtenidos durante la hidrólisis.



VI. REFERENCIAS

1. AIE (Agencia Internacional de Energía). (2004). Biofuels for transport: an international perspective. 9 rue de la Federation, 75739 Paris Cedex 15, France. [En línea]. <www.iea.org>.
2. AIE (Agencia Internacional de Energía). (2006). World Energy Outlook. 9 rue de la Federation, 75739 Paris Cedex 15, France. [En línea]. <www.iea.org>.
3. AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, Estados Unidos.
4. Alarcón-Elías. (2010). Producción de Bioetanol con *Zymomonas mobilis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.
5. Almeida J. R. M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Technology and Biotechnology*. 82, 340-349.
6. ArgenBio (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología). (2007). Las Levaduras: Bebidas, Combustibles y un poco de Historia. Buenos Aires, Argentina.
7. ASERCA. (1999). La tuna; base del desarrollo de culturas mesoamericanas. Claridades agropecuarias No. 71. México. Pág. 44.
8. Bai F. W., Anderson W. A., Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 26, 89-105.

9. Ballesteros I., Oliva J. M., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros M. 2002. Enzyme hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry*. 38, 187-192.
10. Ballesteros M. (2006). Carburantes sin petróleo: Bioetanol. *Investigación y Ciencia* 362, 78-85.
11. Bothast R. J., Schlicher M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiol and Biotechnology*.
12. Brethauer S., Wyman C. E., (2010). Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technology*. 101, 4193–4202.
13. Brown R.M. 2003. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 2st century? *Polymer Chemistry*. 42, 487-495.
14. CARPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). (2008). Bibliografía sobre biocombustibles. Bogotá, Colombia.
15. Converti A., Perego P., Lodi A., Paris F., Del Borghi M. A. (1985). Kinetic Study of *Saccharomyces* Strains: Performance at High Sugar Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1108 – 1114.
16. Dámaso-Crespo. (2006). Biogerontología. Ed. Santander: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria. Textos Universitarios Universidad de Cantabria. Ciencias biomédicas.
17. Demirbas A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Applied Energy*. 86, S108–17.
18. Demirbas-Ayhan. (2011). Competitive liquid biofuels from biomass. Sirnak University, Dean of Engineering Faculty, Department of Mechanical Engineering, Sirnak, Turkey. *Applied Energy*. 88, 17–28.



19. Dubois M., Guiles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. y Smith E. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 25-530.
20. Duff S. J. B. y Murray W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 55, 1-33.
21. Ertola R., Yantorno O. and Migone C. (2007). Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA. [En línea]. <<http://fai.unne.edu.ar/biologia/microind/levaduras.htm>>.
22. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación). (2008). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Roma, Italia. [En línea]. <www.fao.org>.
23. Fajardo C. E., Sarmiento F. (2008). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.
24. Fedepalma. (2005). Biocombustibles. [En línea] <<http://www.fedepalma.org>>.
25. Feldmann G. J. (2005). Levaduras y biotecnología. Pág. 26-44.
26. Fengel D. y Wegener G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. Berlín.
27. Fengel D. y Wegener G. (1989). Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Berlín-New York.
28. Flores V. y Aguirre J. R. (1979). El nopal como forraje. Universidad Autónoma Chapingo, México. Pág. 91.



29. Flores V., De Luna E. J. y Ramírez M. P. (1995). Mercado mundial de la tuna. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA), Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Pág. 173.
30. Frazier W. C. y Westhoff D. C. (2000). Microbiología de alimentos. Editorial. Acribia, S.A. España. Pág. 41-43.
31. Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiol and Biotechnology*. 59, 618–628.
32. Gallegos V. C. y Méndez G. (2000). La Tuna, Criterios y Técnicas para su Producción Comercial. Universidad Autónoma Chapingo, Colegio de Posgraduados Fundación Produce Zacatecas, A. C.
33. Gallegos, V. C. y Cervantes H. J. (2002). Estudio para el desarrollo de la cadena productiva del nopal en Zacatecas. Secretaría de Economía, Gobierno de Zacatecas, Universidad Autónoma Chapingo. México. Pág. 295.
34. García H. (2003). Caracterización de la Cadena Agroalimentaria del Nopal Tunero e Identificación de sus Demandas Tecnológicas. Colegio de Posgraduados Campus San Luis Potosí. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí.
35. García-Garibay., Quintero-Ramírez., López-Munguía. (2004). Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. México D. F. Pág. 268.
36. GBEP (Asociación Mundial de la Bioenergía). (2007). A Review of the current state of bionergy develops in G8+5 countries. Roma, Italia.
37. Gómez L. D., Steele-King, C. G., Mc Queen-Mason S. J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytologist*. 178, 473-485.



38. González R. Barcenilla J. y Tabera L. (2007). Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. *Revista de Enología*. Pág. 86.
39. Granados S. D. (1991). El nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México D.F.
40. Granados y Castañeda. (1997). El Nopal: Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México D.F.
41. Gunasekaran P. y Chandra R. K. (1999). Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. *Current Science*.
42. Han L. P., Steinberg Y., Zhao Y. L., Hui X. G. (2011). Accumulation and partitioning of nitrogen, phosphorus and potassium in different varieties of sweet sorghum. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, 100193 Beijing, PR China. *Field Crops Research* 120, 230–240.
43. Hernández Nodarse M. T. (2007). Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Boletín Electrónico No. 08. Universidad Rafael Landívar.
44. Hidalgo J. (2003). Tratado de enología, tomo I. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
45. Holcberg I. B. Y Margalith P. (198). Alcoholic Fermentation by Immobilized Yeast at High Sugar Concentrations. *Applied Microbiol Biotechnology*. 13, 133 – 140.
46. IFPEOPLE. (2006). Luces y sombras de la ley de biocombustibles en Argentina. [En línea]. <http://www.empresasustentable.com/community/news/20060525_biol/view>
47. INFOASERCA. (1999). La Tuna; Base Del Desarrollo De Culturas Mesoamericana. [En línea]. <<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/071/ca071.pdf>>.



48. James C. (2009). La Argentina y los Biocombustibles de Segunda y Tercera Generación. Cámara Argentina de Energías Renovables. Buenos Aires, Argentina.
49. Kecebas A, Alkan M. A. (2009). Educational and consciousness-raising movements for renewable energy in Turkey. *Energy Educ Sci Technol*.
50. Kinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 66, 10-26.
51. Kim S., Dale B. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*. 26940, 361-375.
52. Lal R. (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel.
53. Larsson S., Quintana S., Reimann A., Nilvebrant N. O., Jonsson, L. J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86, 617-632.
54. Laureano P. L., Teymouri F., Alizadeh H. y Dale B E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 124 (1-3): 1081–1099.
55. Longo V. D., Ellerby L. M., Bredesen D. E., Valentine J. S., Gralla E. B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell. Biol.*
56. López G. J. J. y Elizondo E. J. (1990). Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal en México. Memorias de la 3a. Reunión Nacional y la 1ra. Internacional, sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.



57. López-González J. J., Fuentes-Rodríguez J. M., Rodríguez-Gómez A. (1997). Industrialización De La Tuna Cardona (*Opuntia streptacantha*). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
58. Madigan M., Martinko J., Parker J. (2003). BROCK: Biología de los microorganismos. Pearson Education. Décima edición. Madrid, España. Pág. 103-108.
59. Marroquín F., Borja L., Velázquez C., De la Cruz C. (1964). Estudio Ecológico Dasonómico de las Zonas Áridas del Norte de México. INIF-SAG. México, D.F. Pág. 133.
60. Mejía-Giraldo., Martínez-Correa., Gutiérrez-Betancourt y Castaño-Castrillón. (2007). Usage of the common mango agroindustrial waste (*mangifera indica* L.) in the destruction of fermentables sugars. Universidad de San Buenaventura, Santiago de Cali, Bogotá, Colombia.
61. Melgarejo M. P. (2000). Tratado de Fruticultura para Zonas Áridas y Semiáridas. Editorial Acribia. Madrid España.
62. Méndez-Gallegos S. J. y García-Herrera J. (2006). La tuna: Producción y diversidad. CONABIO. Biodiversitas. México, D.F.
63. Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
64. Molina M., y Córdova T. (2006). Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura: Informe Nacional. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. Pág. 172.
65. Monroy O. H. y Viniegra G. (1990). Biotecnología para el aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos. ISBN-10 968463000X. México.



66. Morales-Oyervides L. (2011). Producción de pigmentos fúngicos por *Penicillium purpurogenum* GH2 utilizando un biorreactor airlift. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
67. Mussatto S. I. y Roberto I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative process: a review. *Bioresource Technology*. 93, 1-10.
68. Naylor R., Liske A. J., Burke M. B., Falcon W. P., Gaskell J. C., Rozelle S. D., Cassman K. G. (2007). The ripple effect: biofuels, food security, and the environment. *Environment*. 49 (9), 31-43.
69. Nobel S. P. (1998). Los incomparables agaves y cactus. Editorial Trillas. México D. F. Pág. 211.
70. Oberoi-Harinder., Venkata-Vadlani., Madl-Ronald., Lavudi-Saida and Abeykoon-Jithma. (2010). Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. Hyderabad, India. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3422–3429
71. Oberoi-Harinder., Vadlani-Praveen., Nanjundaswamy-Ananda, Bansal-Sunil Singh-Sandeep, Kaur-Simranjeet, Babbar-Neha. (2011). Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Bioresource Technology*. 102, 1593–1601
72. Oliva J. M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros M. (2003). Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 105, 141-154.



73. Padrón-Pereira., Moreno-Álvarez. (2010). Evaluation of the Use of Enzymes and Gravity Filtration for Clarification of Diluted Mixture of Cactus (*Opuntia boldinghii* Britton & Rose) fruits Pulp, Orange and Grapefruit Juices. Universidad Simón Rodríguez. Carabobo, Venezuela.
74. Palacio H. (1956). Fabricación del alcohol. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. Pág. 279-305.
75. Palmqvist E. y Hahn H. B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology*. 74, 25-33.
76. Palonen H. (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Tesis de doctorado. [En línea]. <<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>>.
77. Peña C. y Arango R. (2009). Evaluación de la Producción de Etanol Utilizando Cepas Recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de Melaza de Caña de Azúcar. [En línea]. <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49611945017>>.
78. Pessoa A., Roberto I. C., Menossi M., Revert R., Ortega F. S., Penna T. (2005). Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry Biotechnology*.
79. Poulomi-Sannigrahi, Yunqiao-Pu and Arthur-Ragauskas. (2010). Cellulosic biorefineries—unleashing lignin opportunities. School of Chemistry and Biochemistry, Institute of Paper Science and Technology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA.
80. Prasad S., Singh A., Joshi H. C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 50, 1-39.



81. Rajagopal D., Sexton S. E., Roland H. D., Zilberman D. (2007). Challenge of biofuel: filling the tank without emptying the stomach?
82. Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B. H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C. A., Frederick W. J., Hallett J. P., Leak D. J., Liotta C. L. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials.
83. Red Mexicana de Bioenergía. (2011). [En línea]. <<http://www.rendio.org/>>.
84. Ríos R. J. y Quintana M. (2004). Manejo general del cultivo del nopal. Colegio de Postgraduados, Secretaría de la Reforma Agraria. Manual del participante. México. Pág. 81.
85. Rodríguez S., Orphee C., Macías S., Generoso S. y Gomes G. L. (1996). Tuna: Propiedades fisicoquímicas de dos variedades.
86. Rojas T. (1990). La Agricultura en Tierras Mexicanas desde sus Orígenes hasta Nuestros Días. CONACULTA Grijalbo. México.
87. Ruiz-Castello. Diagnostico Bioquímico y Tecnológico de un Proceso de Producción de Bioetanol Mediante el Aprendizaje Automático. Tesis Doctoral. Universidad Pontifica. Madrid, España.
88. Russell C. E. and Felker P. (1987). The prickly-pears (*Opuntia spp.*, *Cactaceae*): A source of Human and Animal Food in Semiarid Regions. *Econ. Bot.* 41, 433-445.
89. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2004). Plan Rector Sistema Producto Nacional Nopal. México D.F.
90. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. Producción de tuna en México. [En línea] <<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B371.aspx>>.



91. Sánchez O. J. y Cardona C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270-5295.
92. SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). (1992). Sistema-Producto Nopal y Tuna. Datos básicos. México, D.F. Pág. 11-16,21-26.
93. Sepúlveda E. and Sáenz C. (1990). Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*
94. Sharma N., Kalra K. L., Oberoi H. S., Bansal. (2007). Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian J. Microbiol.* 47, 310–316
95. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2002). Cierre de Producción Agrícola por Estado. [En línea]. <<http://www.siap.gob.mx/>>.
96. Stintzing F. C. and Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia spp.*): A review on their Chemistry, Technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 175-194.
97. Sumaya-Martínez., Suárez-Diéguez, Cruz-Cansino, Alanís-García. (2010). Innovación de Productos de Alto Valor Agregado a Partir de la Tuna Mexicana. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México.
98. Tomás-Pejó. (2010). Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
99. Visser M. E., Filho O. D., Martins A. M., Steward L. B. (2010). Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. Universidad Federal de Vicosa, Vicosa, MG, Brazil. *Biomass and bioenergy*. 35. 489-494.
100. Wheals A. E., Basso L. C., Alves, D. M., Amorim H. V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. Volumen (17): 482-487.

101. Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. (2008). Curva de crecimiento. Microbiología. Séptima edición. Pág. 123.
102. Wilkins R. M., Widmer W. W., Grohmann K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. Oklahoma State University, Stillwater. *Process Biochemistry*. 42, 1614–1619.
103. Wilkins R. M. (2009). Effect of orange peel oil ethanol production by *Zimomonas mobilis*. Oklahoma State University, Stillwater, USA. *Biomass and bioenergy*. 33, 538–541.
104. Wyman C. E. (1999). Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*. 24, 189-226.
105. Wyman C. E. (1999). Production of low cost sugars from biomass: progress opportunities and challenges. In Proceedings of the biomass conference of the Americas. Oakland.
106. Yanke L. J., Selinger L. B., and Cheng K. (1995). Comparison of cellulolytic and xylanolytic activities of anaerobic rumen fungi. Proceedings of the 23rd Biennial Conference on Rumen Function. Chicago. USA. Pág. 32.