

**OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN YUCA
VARIEDAD CHILE EN UN PROCESO DE 2 ETAPAS:
HIDRÓLISIS (*Aspergillus niger*) - FERMENTACIÓN (*Zymomonas
mobilis*)**

PAOLA LANDAZÁBAL DELGADO

**BUCARAMANGA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
QUÍMICA
2004**

**OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN YUCA
VARIEDAD CHILE EN UN PROCESO DE 2 ETAPAS:
HIDRÓLISIS (*Aspergillus niger*) - FERMENTACIÓN (*Zymomonas
mobilis*)**

PAOLA LANDAZÁBAL DELGADO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de químico

DIRECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

MARIELA CARREÑO DE ARANGO, M Sc.

CODIRECTOR DEL PROYECTO

DANIEL RICARDO MOLINA, M Sc.

BUCARAMANGA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

QUÍMICA

2004

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a mis padres por ser partícipes de la formación adquirida a través de los años.

A Mariela Carreño de Arango y Daniel Ricardo Molina por su paciencia al dirigir el proyecto y por aportar su sabiduría para mi formación académica y personal.

A William Larrota Picón por su paciencia y su valiosa colaboración.

A la Escuela de Química , al laboratorio de Bioquímica de la UIS, al CINBIN, al Ministerio de Agricultura y desarrollo rural y al Fondo programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria PRONATTA.

A nuestros compañeros: Alejandra Duarte, Sandra M. Pinto, Wilson Oyola, Isadora Beltrán, Alberto Sánchez, Tatiana Luna, Andrea Cabanzo, Fernando Anaya, Mario A. Martinez, Leydy Alzate, Cesar Rugeles, Yenny Carreño, Yasmith Bocanegra, Sandra Sarmiento, Zoraida Chacón, Oscar Guarín, Sandra M. Gómez, Otilio Jiménez, Edulfo Labarcés, Luis A. Terán, por su compañía y apoyo en el transcurso de este trabajo.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este proyecto.

Dedicatoria

*Agradezco a Dios , por darme la oportunidad de
existir y realizarme como persona.*

*A mis padres por brindarme su apoyo,
comprensión
y paciencia a lo largo de estos años
y a quien les debo todo lo que soy.*

*Gracias a todos por brindarme
La oportunidad de ser y por haber aportado su granito
de arena
para lograr la meta propuesta.*

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1. ESTADO DEL ARTE	5
1.1 LA YUCA	5
1.1.1 Taxonomía de la yuca	7
• La yuca amarga	7
1.1.2 Condiciones de cultivo y su siembra	9
1.1.3 Nutrientes absorbidos del suelo	10
1.1.4 Producción, área y rendimiento de la yuca	12
1.1.5 Producción de yuca en el Departamento de Santander	14
1.2 EL ALMIDÓN	15
1.2.1 Historia	15
1.2.2 Propiedades del almidón	17
1.2.3 Estructura y composición	19
• Amilosa	19
• Amilopectina	20
1.3 HIDRÓLISIS	22
1.3.1 Hidrólisis ácida	22
1.3.2 Hidrólisis enzimática	23
1.4 HONGOS	26
1.4.1 <i>Aspergillus niger</i>	27
• Clasificación taxonómica	27

1.4.2	Características microscópicas	28
1.4.3	Características macroscópicas	30
1.5	FERMENTACIÓN	30
1.5.1	Historia de la fermentación	32
1.5.2	Fermentación alcohólica	34
1.5.3	Proceso de fermentación	35
1.5.4	Variables que influyen en la fermentación	36
1.6	MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA FERMENTACIÓN LA OBTENCIÓN DE ETANOL	37
1.6.1	Bacterias	38
•	Composición química de las bacterias	39
1.6.2	<i>Zymomonas mobilis</i>	39
•	Antecedentes	40
•	Características fenotípicas del género <i>Zymomonas</i>	41
•	Aspectos tecnológicos para la producción de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i>	42
1.7	ETANOL	43
1.7.1	Propiedades fisicoquímicas	43
1.7.2	Usos	44
1.7.3	Obtención de etanol a partir de almidón	45
2.	METODOLOGÍA	47
2.1	EXTRACCION DE ALMIDON DE YUCA VARIEDAD CHILE	47
2.2	HIDRÓLISIS	48
2.2.1	Microorganismo empleado en la hidrólisis	48
•	Aislamiento del microorganismo	48
•	Medio de cultivo	48
•	Preparación del inóculo	48

•	Curva de crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	48
2.2.2	Montaje de los bioreactores para la hidrólisis	49
2.2.3	Determinación de Azúcares reductores, % almidón y glucosa en la hidrólisis	50
2.2.4	Influencia de las variables en el proceso de hidrólisis	50
2.3	FERMENTACIÓN	52
2.3.1	Microorganismo empleado en la fermentación	52
•	Aislamiento del microorganismo	52
•	Medio de cultivo	53
•	Preparación del inóculo	53
•	Curva de crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i>	53
•	Curva estándar	54
2.3.2	Montaje de los bioreactores para la fermentación	54
2.3.3	Determinación de Glucosa y porcentaje de etanol	55
2.3.4	Influencia de las variables en el proceso de fermentación	55
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	59
3.1	CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Aspergillus niger</i>	59
3.2	DATOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE EN LA HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	60
3.3	MODELO MATEMÁTICO PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	62
3.3.1	Diseño experimental 3^3 para la etapa de hidrólisis	62
•	Gráficas de % de conversión calculado vs. % conversión experimental	65
•	Gráfica residual	66
3.3.2	Diseño de superficie de respuesta	66

3.4	CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Zymomona mobilis</i>	72
3.4.1	Pruebas bioquímicas	73
3.5	DATOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE EN LA FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA	74
3.6	MODELO MATEMÁTICO PARA EL PROCESO DE FERMENTACION DE LA GLUCOSA	75
3.6.1	Diseño experimental 3 ³ para la etapa de fermentación Gráficas de % de conversión calculado Vs.	75
•	% conversión experimental	78
•	Gráfica Residual	78
3.6.2	Diseño de superficie de respuesta	79
	CONCLUSIONES	85
	RECOMENDACIONES	87
	BIBLIOGRAFÍA	88
	ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Caracterización fisicoquímica del parénquima cortical, interior y almidón de yuca variedad chile en base seca	8
Tabla 2 Absorción de nutrientes del suelo	10
Tabla 3 Producción mundial de yuca	12
Tabla 4 Pronóstico de producción de yuca en el Departamento de Santander para el 2002	13
Tabla 5 Propiedades generales del almidón de yuca	17
Tabla 6 Contenido de almidón en productos agrícolas	18
Tabla 7 Ventajas de la bacteria sobre la levadura en la fermentación	38
Tabla 8 Propiedades fisicoquímicas del alcohol absoluto y su azeótropo con el agua	44
Tabla 9 Rentabilidad en la obtención de etanol a partir de yuca	45
Tabla 10 Valores para las variables normalizadas para los experimentos de hidrólisis del almidón de yuca	51
Tabla 11 Valores para las variables normalizadas para los experimentos de fermentación de la glucosa	55
Tabla 12 Datos obtenidos en la curva de crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	59
Tabla 13 Datos obtenidos en la etapa de hidrólisis	61

Tabla 14	Diseño experimental 3^3 para la etapa de hidrólisis	63
Tabla 15	Análisis de regresión múltiple para la etapa de hidrólisis	64
Tabla 16	Análisis de varianza para la ecuación 3	64
Tabla 17	Coeficiente estadístico para el modelo descrito	64
Tabla 18	Condiciones y resultados obtenidos para el diseño de superficie para la hidrólisis	67
Tabla 19	Análisis de regresión múltiple para la ecuación 4	68
Tabla 20	Análisis de varianza para la ecuación 4	68
Tabla 21	Coeficiente estadístico para el modelo descrito Ec. 4	68
Tabla 22	Validación del modelo	71
Tabla 23	Datos obtenidos en la curva de crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i>	72
Tabla 24	Pruebas bioquímicas hechas a la <i>Zymomonas mobilis</i>	73
Tabla 25	Datos obtenidos en la etapa de fermentación	74
Tabla 26	Diseño experimental 3^3 para la etapa de fermentación	75
Tabla 27	Análisis de regresión múltiple para la ecuación 5	77
Tabla 28	Análisis de varianza para la ecuación 5	77
Tabla 29	Coeficiente estadístico para el modelo descrito Ec. 5	77
Tabla 30	Condiciones y resultado obtenido para el diseño de Superficie para la fermentación	79
Tabla 31	Análisis de regresión múltiple para la ecuación 6	80
Tabla 32	Análisis de varianza para la ecuación 6	80
Tabla 33	Coeficiente estadístico para el modelo descrito Ec. 6	81
Tabla 34	Validación del modelo	83

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Fig. 1 Segmento lineal de la amilosa	21
Fig. 2 Segmento Cadena ramificada de amilopectina	21
Fig. 3 Características Microscópicas el <i>Aspergillus niger</i>	28
Fig. 4 Características morfológicas del <i>Aspergillus niger</i>	29
Fig. 5 Características macroscópicas del <i>Aspergillus niger</i>	30
Fig. 6 Características microscópicas del <i>Zymomonas mobilis</i>	41
Fig. 7 Características macroscópicas del <i>Zymomonas mobilis</i>	42
Fig. 8 Diagrama de flujo de obtención de alcohol etílico	46
Fig. 9 Diagrama de Extracción de almidón de yuca	47
Fig. 10 Metodología usada para la preparación del medio para la hidrólisis	57
Fig. 11 Metodología usada para la preparación del medio para la fermentación	58

LISTA DE GRAFICAS

	Pág
Gráfica 1 Curva de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	59
Gráfica 2 % conversión obtenido vs. % conversión calculado para la etapa de hidrólisis	65
Gráfica 3 Residuales etapa de hidrólisis	66
Gráfica 4 % conversión obtenido Vs. % conversión calculado para el diseño de superficie	69
Gráfica 5 Residuales de la superficie de respuesta de la hidrólisis	69
Gráfica 6 Superficie de respuesta de la etapa de hidrólisis	70
Gráfica 7 Contorno de superficie de respuesta para la etapa de hidrólisis	70
Gráfica 8 Curva de crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i>	72
Gráfica 9 % conversión obtenido vs. % conversión calculado para la etapa de fermentación	78
Gráfica 10 Residuales etapa de fermentación	79
Gráfica 11 % conversión obtenido Vs. % conversión calculado para el diseño de superficie	81
Gráfica 12 Residuales de la superficie de respuesta de la fermentación	82
Gráfica 13 Superficie de respuesta de la etapa de fermentación	82
Gráfica 14 Contorno de la superficie de respuesta para la etapa de fermentación	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A PORCENTAJE DE CONVERSIÓN DE ALMIDÓN A GLUCOSA	93
ANEXO B DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	94
ANEXO C DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	97
ANEXO D DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN EL MEDIO	98
ANEXO E ESCALA DE MAC FARLAND	101
ANEXO F % DE RENDIMIENTO DEL ETANOL	102

RESUMEN

TITULO*:

OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN YUCA VARIEDAD CHILE EN UN PROCESO DE 2 ETAPAS: HIDRÓLISIS (*Aspergillus niger*) - FERMENTACION (*Zymomonas mobilis*)

Landazábal Delgado Paola, Carreño de Arango Mariela** y Molina Velasco Daniel R.†

Palabras claves: *Aspergillus niger*, Almidón, Hidrólisis enzimática, Fermentación, *Zymomonas mobilis*, diseño experimental, superficie de respuesta.

La yuca es uno de los cultivos no convencionales más prometedores para la obtención de etanol en nuestro país, debido a su alto porcentaje de rendimiento ya que contiene de hidratos de carbono fácilmente fermentables.

En la actualidad, los procesos más rentables para la obtención de etanol a partir de almidón son aquellos que realizan una hidrólisis previa para transformarlo a glucosa y, posteriormente, convertirla a etanol mediante una fermentación con bacterias.

Este trabajo fue desarrollado en dos etapas: La primera etapa, hidrólisis se llevó a cabo con el hongo *Aspergillus niger*, ya que es uno de los mejores productores de amilasas, enzimas necesarias para la hidrólisis del almidón, y la segunda etapa, de fermentación en la cual se utilizó la bacteria gram negativa, *Zymomonas mobilis* pues esta presentaba mejores resultados que la levadura.

En la etapa de hidrólisis se determinaron las variables que influyen en el porcentaje de conversión de almidón de yuca a glucosa, utilizando el diseño experimental 3³ cuyas variables fueron la concentración de almidón, temperatura y pH. Se determinó que la concentración de almidón y pH, bajo las condiciones de trabajo son las que ejercen mayor influencia en el porcentaje de conversión de almidón a glucosa. Con el propósito de encontrar las mejores condiciones, se realizó una superficie de respuesta teniendo como variable de respuesta el porcentaje de conversión de almidón de yuca a glucosa.

En la etapa de fermentación se determinaron las variables que influyen en el porcentaje de rendimiento de etanol, utilizando el diseño experimental 3³ cuyas variables fueron la concentración de glucosa, temperatura y pH. Se observó que la concentración de glucosa y pH, bajo las condiciones de trabajo son las que presentaban mayor influencia en el porcentaje de rendimiento del etanol.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Directora: Mariela Carreño de Arango, Msc en Microbiología

† Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Codirector: Daniel R. Molina V, Msc en Química

SUMMARY

TITLE *:

ETHANOL OBTAINING From STARCH YUCCA CHILE VARIETY IN A PROCESS OF 2 STAGES: HYDROLYSIS (*Aspergillus niger*) - FERMENTATION (*Zymomonas mobilis*)

Landazábal Delgado Paola, Carreño de Arango Mariela **y Molina Velasco Daniel R.

Key words: *Aspergillus niger*, Starch, enzymatic Hydrolysis, Fermentation, *Zymomonas mobilis*, experimental design, surface of answer.

The yucca is one of the more promising non conventional cultures for the ethanol obtaining in our country, due to its high percentage of yield since it contains easily fermentables carbon hydrates. At the present time, the most profitable processes for the ethanol obtaining from starch, are those that make a previous hydrolysis to transform it to glucose and, later, to turn it to ethanol by means of a fermentation with bacteria.

This work was developed in two stages: The first stage, Hydrolysis was carried out with the fungus *Aspergillus niger*, since this is one of the best amylase producers, necessary enzymes for hydrolysis of the starch, and the second stage, fermentation in which the gramnegative bacterium *Zymomonas mobilis* was used, then this presented better results than the yeast.

In the hydrolysis stage the variables were determined that influence in the percentage of starch conversion of yucca to glucose, using the experimental design 3^3 whose variables were the concentration of starch, Temperature and pH. It was determined that the starch concentration and pH, under the conditions of work are those that exert greater influence in the percentage of starch conversion to glucose. In order to find the best conditions, made an answer surface having like answer variable the percentage of starch of yucca to glucose conversion.

In the fermentation stage the variables were determined that influence in the percentage of ethanol yield, using the experimental design 3^3 whose variables were the concentration of glucose, Temperature and pH. It was observed that the glucose concentration and pH, under the conditions of work are those that presented greater influence in the percentage of yield of the ethanol.

*Project of degree

** Sciences Faculty, School of Biology, Director: Mariela Carreño de Arango, Msc in Microbiology

** Sciences Faculty, School of Chemistry, Codirector: Daniel R. Molina Velasco. Msc in Chemistry

INTRODUCCIÓN

La biotecnología es un área que ha ganado terreno actualmente en el desarrollo industrial; causando gran repercusión en medicina, agricultura, suministro energético y producción de alimentos entre otras. Gracias a esto se ha logrado avanzar en puntos como el ahorro de energía, eliminación de residuos contaminantes, disminución de precios, sustituir productos y aditivos en la alimentación humana y animal.

El alcohol etílico es un producto de consumo masivo en el país y su producción actual no logra satisfacer la demanda, por lo tanto es necesario importarlo. La materia prima de la cual se abastecen los productores de etanol a nivel nacional es un subproducto de la industria azucarera (la melaza) ya que contiene grandes cantidades de azúcares fermentables y de bajo precio, por esta razón se ha convertido en la fuente más apropiada para tal fin.

Debido a la necesidad de incentivar la industrialización de algunos productos agrícolas, los cuales se pueden obtener a gran escala y cuya falta de comercialización ha llevado a ocasionar grandes pérdidas al país, se planteó una posibilidad de realizar estudios sobre la factibilidad de su procesamiento como materia prima para la obtención de muchos otros insumos (dextrinas, fructosa, etc) cuya escasez hace inevitable la importación.

En la actualidad, con la gran escasez de combustible, la yuca emerge como una excelente fuente de carbohidratos para la producción de alcohol, con el fin de reemplazar parte de la gasolina y como materia prima para la industria petroquímica. Existe un consenso general acerca de la producción de alcohol

etílico a partir de la yuca ya que daría un incentivo al desarrollo técnico de la industria de la fermentación, incluyendo la fabricación de enzimas amilolíticas utilizadas en la sacarificación del almidón. (NAVARRO, 1995)

En este proyecto se evaluó a nivel de laboratorio la obtención de alcohol etílico a partir de almidón de yuca amarga debido a la alta productividad y alto contenido de almidón hidrolizable en azúcares reductores, siendo este el cultivo no convencional más prometedor en la obtención de etanol. Además de esto, se persiguió contribuir al desarrollo de la investigación sobre el proceso fermentativo de la obtención de etanol a partir de harina de arracacha y de la papa.

En la actualidad, los procesos más rentables para la obtención de etanol a partir de almidón de yuca son los que realizan una hidrólisis previa con levaduras para la transformación de este a glucosa y una posterior fermentación a etanol mediante el uso de bacterias.

La yuca (*Manihot esculenta Cranz*) ocupando el cuarto lugar en importancia como fuente de energía producida en el trópico después del arroz, el maíz y la caña de azúcar, es la mayor fuente de caloría para más de 500 millones de personas en el mundo.(MONTALDO, 1996) Más de la tercera parte de la producción de este cultivo, se utiliza para la alimentación humana y en menor proporción para alimentación animal y usos industriales. En América, Brasil es el segundo productor mundial, produce 24 millones de toneladas al año; Venezuela, sexto productor del continente con una producción anual de 310000 toneladas al año de raíces.

La yuca a nivel mundial es principalmente producida como un cultivo de subsistencia por pequeños agricultores por que se adapta bien a los suelos pobres en nutrientes y es relativamente resistente a enfermedades presentando un buen rendimiento. La yuca es una de las plantas más eficientes en cuanto al proceso de fotosíntesis se refiere, contiene una alta cantidad de carbohidratos, sus raíces contienen un 45% de almidón y un 5% de azúcares reductores. (MONTALDO, 1996)

En muchos países, la yuca constituye un cultivo industrial de gran superficie para la producción de trozos y harinas para la alimentación animal o para la producción de almidones para usos industriales o alimentación humana. Grandes empresas son capaces de procesar hasta 500 toneladas diarias de yuca, las cuales han sido desarrolladas en Brasil, Tailandia, Vietnam, China, Filipinas e Indonesia con una producción actualmente del 11% de la producción mundial de almidón de uso industrial.(DOMINGUEZ, 1996)

En la industria del almidón y posterior producción de etanol utilizamos específicamente la yuca amarga, que a diferencia de la dulce contiene mayor concentración de almidón en sus raíces, pero también se presenta mayor contenido de principios tóxicos: los glucocianógenos linamarina y lotoaustralina que liberan ácido hidrocianico o prúsico. Sin embargo, durante el proceso de lavado y secado en la obtención de almidón estos desaparecen.(MONTALDO, 1996)

En la industria del papel tiene también gran importancia el almidón por lo que se usa para aumentar la resistencia, mejorar su apariencia, inhibir la penetración de tinta, formar superficies firmes, para escribir o imprimir, como adhesivo en revestimiento pigmentados, etc.

En la industria de alimentos se usa para dar textura, como aglutinante, adhesivo, espesante, retenedor de humedad; en la industria de edulcorantes, para obtener maltodextrinas, jarabes de glucosa y fructosa, dextrosa cristalina, glutamato monosódico, encapsuladores de fragancia entre otras.(MONTALDO, 1996)

El principal objetivo de la presente investigación es el aprovechamiento de un recurso agrícola, como lo es el almidón de yuca, ya que es una fuente energética importante en la producción de etanol. El bioproceso se desarrolla mediante monocultivo con *Aspergillus niger* y *Zymomonas mobilis* quienes son los encargados de realizar la hidrólisis y fermentación respectivamente del hidrolizado a alcohol.

ESTADO DEL ARTE

1.1 LA YUCA

En algunos lugares de América del sur se denomina con este nombre a la mandioca planta del género *Manihot* que pertenece a la familia de las *Euforbiáceas*. Es un arbusto muy robusto, de 2 – 3 m de altura, el tallo de la planta es leñoso y quebradizo, presentando una médula central gruesa.

Sus hojas son palmeadas, alternas y caducas, de pecíolo muy largo y divididas de 3-7 segmentos profundos. Las flores se hallan situadas en los extremos del tallo; la yuca es una planta de flores monoicas e inconspicuas, dispuestas en racimo. El fruto es producido entre los 50 y 60 días después de fecundada la flor. Echa unas raíces tuberosas ricas en almidón, de las que se obtiene la tapioca. (VILLA, 1996)

La yuca es una de las principales plantas útiles tropicales difundidas en todos los continentes. Existen diversas opiniones acerca del origen de esta especie; entre ellas están África, Asia, islas del Pacífico, América central, México, Brasil y la región amazónica. Sin embargo la mayoría de botánicos y ecólogos consideran la yuca como originaria de América tropical y el Nordeste de Brasil; en esta zona ha sido cultivada desde hace aproximadamente 5000 años. En el Perú, estudios arqueológicos indican que la yuca fue cultivada hace 4000 años por civilizaciones preincaicas. Las evidencias arqueológicas del cultivo de la yuca se basan en la presentación de cerámicas y pedazos de piedra que posiblemente eran utilizados como ralladores en el beneficio de la

yuca por los mismos nativos. En cada área de cultivo se encuentra un importante número de especies silvestres, las cuales pudieron hibridarse con las variedades cultivadas en cada región, con lo cual la domesticación de la yuca debió ocurrir simultáneamente en varios lugares.(VILLA,1996; DOMÍNGUEZ, 1996)

La distribución de la yuca a otros continentes se inició a partir del descubrimiento de América. Los portugueses la llevaron desde Brasil a las costas occidentales de África en el siglo XI, a finales del siglo XVIII se introdujo a Madagascar y luego por la costa oriental, lo cual explica la amplia dispersión de esta especie en el continente africano. Al sureste asiático se llevó a principios del siglo XVII.(DOMÍNGUEZ, 1996)

Hasta hace pocos años este cultivo estuvo marginado de la investigación; sin embargo, su reconocida importancia tanto en alimentación humana y animal como en procesos industriales (producción de almidones, alcohol, etc.) ha generado la necesidad de adoptar o implementar estrategias de estudio e investigación que han permitido incrementar los rendimientos de manera considerable, mejorar las técnicas de cultivo, ampliación de su uso aumentando su beneficio social.(VILLA,1996)

Existen tres enfermedades que afectan notoriamente el cultivo de yuca las cuales son: el añublo bacteriano (en hojas y tallos), las pudriciones de la raíz y el virus del mosaico africano (solo en Africa). Varios insectos chupadores (ácaro verde, piojo harinoso, mosca blanca) y algunos fitófagos (gusano cachón) atacan las hojas y un piojo subterráneo dañan a veces las raíces

1.1.1 taxonomía de la yuca (DOMÍNGUEZ,1996)

División:	Espermatophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Archiclamydea
Orden:	Geraniiales o Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Subfamilia:	Crotonidae
Tribu:	Manihoteae
Genero	<i>Manihot</i>
Especie	<i>Esculenta Crantz</i>

La yuca es considerada la cuarta fuente de calorías en la alimentación humana (124Kcal/100 g mientras que la papa tiene 76) producida en el trópico después del arroz, maíz y caña de azúcar; en esta misma zona su demanda como fuente de energía básica ha crecido en los últimos años, por su alto contenido de carbohidratos, debido a esto, para 500 millones de personas que viven en los trópicos es la más importante de las raíces y tubérculos. La producción diaria de calorías por hectárea es mucho más alta que cualquier cultivo básico. En la actualidad se cultiva en más de 80 países, sin embargo 2/3 de la producción mundial se alcanza en sólo 5 países ellos son: Brasil, Indonesia, Zaire, Nigeria e India. (DOMÍNGUEZ,1996)

1.1.1.1 La yuca amarga: La yuca amarga recibe este nombre debido a su contenido de ácido cianhídrico libre y de cianoglucósidos. La yuca amarga posee aproximadamente 30% (p/p) de almidón y un contenido de humedad del 53%.

El ácido cianhídrico se halla en mayor concentración en la corteza de la raíz; también se encuentra en menores cantidades en las hojas y en otros órganos de la planta. En las hojas adultas el contenido de ácido cianhídrico es de 41 mg de HCN/Kg de yuca, en el tallo leñoso adulto el contenido es de 13 mg de HCN/Kg de yuca, en los tallos verdes el contenido es de 24 mg HCN/Kg de yuca, en la médula del tallo el contenido es de 26 mg de HCN/Kg de yuca, en la raíz el contenido es de 53 mg hasta 1000 mg de HCN/Kg de yuca.(MOLTALDO, 1996)

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del parénquima cortical interior y almidón de la yuca variedad chile en base seca (CABANZO et al, 2002)

PARÁMETRO	ALMIDÓN	PARTE EXTERNA	PARTE INTERNA
% HUMEDAD	8,82	74,58	58,05
% MATERIA SECA	91,38	25,42	41,95
% ALMIDON	-	-	80,6
% CENIZAS	0,235	1,84	1,79
% EXTRACTO ETÉREO	0,31	0,29	0,36
% PROTEINAS	1,15	10,4	3,86
% FIBRA CRUDA	0,37	5,85	2,45
CIANURO (mg/Kg)	-	524,8	67,57
NITRITOS (mg/Kg)	-	11,87	8,58
NITRATOS (mg/Kg)	32,1	312,8	194,81
HIERRO (mg/Kg)	8,95	29,8	13,25
POTASIO (g/Kg)	0,183	1,74	5,21

1.1.2 Condiciones del Cultivo y su siembra

La yuca, una planta tolerante a la sequía, se desarrolla bastante bien en suelos pobres con pH bajo y es relativamente resistente a las enfermedades e insectos. El cultivo generalmente se propaga en forma vegetativa y como no tiene una época precisa de madurez, las raíces se pueden dejar en el terreno y cosechar prácticamente en cualquier época del año. (MONTALDO, 1996) Durante las dos últimas décadas ha habido un aumento en la producción, la cual es debido al incremento en el área de siembra más que al incremento en el rendimiento. En general, la yuca se considera como un cultivo rústico que crece relativamente bien en suelos pobres sin la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes. Aunque para algunos agricultores la yuca agota el suelo, estos prefieren sembrarla como último cultivo en los sistemas de rotación antes de que la parcela se vuelva a barbecho. Aunque la yuca extrae grandes cantidades de K del suelo, a comparación del maíz, caña de azúcar, banano y repollo, la yuca no es el cultivo que agota más el suelo por tonelada de alimento producido. Otro factor que afecta la fertilidad del suelo es la erosión, ya que la yuca tiende a aumentarla, especialmente durante la siembra y después de la cosecha. (DOMÍNGUEZ, 1996).

La yuca, una euforbiácea rústica sembrada tradicionalmente en Colombia (aproximadamente 300.000 Ha) por su adaptabilidad a la variedad de suelos y climas, desempeña un papel importante para el país. Debido a esto, la posibilidad de utilizar inmediatamente y adecuadamente la bioconversión en mayor escala a la actual, parece económicamente viable para los países que reciben radiación solar abundante y al mismo tiempo disponen de áreas extensas que pueden ser explotadas con plantas de alto contenido de hidratos de carbono, económicamente transformables en hidrocarburos (etanol, etileno, metanol) combustibles de aprovechamiento más eficiente.

En condiciones experimentales y en monocultivo, la yuca rinde hasta 9,0 Ton/ha de raíces, sin embargo; el rendimiento promedio en condiciones reales (suelos marginales, climas severos y asociación de cultivos) es de 9.8 Ton/ha en el mundo (12,4 Ton/ha en America Latina). Con una tonelada de yuca fresca se pueden obtener 280 Kg de harina o 230Kg de almidón o 350 Kg de trozos secos o 170 L de alcohol. (ALARCÓN et al, 1998)

Actualmente en Colombia, se están implementando cultivos industriales con clones de yuca donde se han alcanzado rendimientos de 84 Ton/ha (CIAT, 2002)

1.1.3 Nutrientes absorbidos del suelo

Como se puede observar en el siguiente cuadro, la yuca es uno de los cultivos tropicales que más absorbe nutrientes en el suelo: (DOMÍNGUEZ,1996)

Tabla 2. Absorción de nutrientes del suelo

CULTIVO	PRODUCCIÓN (6 Meses)	N (Kg)	P(Kg)	K (Kg)	Mg (Kg)
YUCA	18,6 ton/ha	87	37,9	117	35,1
PALMA ACEITERA	18 ton/ha	61	9,9	84	13,6
CAUCHO	1,13 ton/ha	9	2,0	11	2,3
MAIZ	3,4 ton/ha	82	20,7	69,2	14,7

Para mantener la fertilidad del suelo es necesario aplicar por lo menos la misma cantidad de nutrientes que el cultivo haya absorbido.

El incremento de los precios del petróleo durante los últimos años ha creado un gran interés en la producción de alcohol de biomásas como un sustituto del petróleo. Brasil ha tomado el liderazgo en esta iniciativa y tiene

actualmente en operación una planta que usa yuca como fuente de biomasa. Este interés se ha generado también en países como Colombia, Tailandia y Australia. La yuca es una posibilidad bastante atractiva ya que puede ser sembrada en áreas marginales para la agricultura, lo que ayudaría al no desplazamiento de otros cultivos como por ejemplo la caña de azúcar. (DOMÍNGUEZ, 1996)

De la yuca se aprovecha el almidón, que tiene importancia como cola, para hacer mucílago, para obtener azúcares, alcohol y jarabes.

A nivel industrial, se emplea en gran cantidad de productos procesados siendo uno de los más importantes el almidón. Las técnicas para la producción de alcohol utilizando como materia prima la yuca han sido desarrolladas por la industria privada y cuyo principal obstáculo tecnológico es lograr reducir los requerimientos de energía para la destilación mediante el uso de los tallos de la yuca como fuente de energía para el proceso, ya que los molinos están movidos por generadores eléctricos diesel encargados de suministrar la energía necesaria, ya sea como una completa fuente de energía o como energía auxiliar en casos de falla en el suministro principal. Para el procesamiento de 50 Ton de raíces de yuca cada 24 horas, se necesitan aproximadamente 200 HP.

La producción de alcohol es 170 litros por tonelada de yuca. (VILLA, 1996; DOMÍNGUEZ,1996)

1.1.4 Producción, área y rendimiento de la Yuca

Durante los últimos años la producción mundial de yuca ha sido estable, como lo muestra la tabla No. 3 el continente que produce mayor cantidad de yuca es Africa con aproximadamente el 54% de la producción mundial, seguido por Asia con un 28% y América Latina junto con el Caribe con un 17%.

En América Latina el principal productor es el Brasil con un 12,5% del total mundial, le siguen en importancia Paraguay y Colombia con 2,1 y 1,2% respectivamente de la producción mundial. (Boletín CCI, 1999)

Brasil y Tailandia destinan la mayor parte de la producción de yuca para la alimentación animal. Aunque en Brasil, la mayor parte de las raíces se utilizan en las fincas, mientras que en Tailandia se secan o se exportan hacia países desarrollados, dándoles un uso como fuente de energía en la industria de alimentos balanceados para animales. (BUIRAGO, 1990)

En Colombia, la yuca es un cultivo típico campesino con un promedio de área sembrado de 1 a 5 hectáreas, con sistemas de producción atrasados. (Boletín CSI,1999)

Tabla 3. Producción Mundial de yuca

PAISES	PRODUCCIÓN	AREA	RENDIMIENTOS
	1996	1996	1996
	MILES DE TON	MILES DE Ha	TON/Ha
INDIA	5800	245	23,4
CHINA	3500	230	15,1
PARAGUAY	2600	178	14,6
TAILANDIA	17700	1315	13,9
BRASIL	26400	1876	12,9
INDONESIA	15800	1341	11,9
NIGERIA	34600	2889	10,7
TANZANIA	6000	645	10,3
GHANA	7000	540	10,0
COLOMBIA	1800	187	9,9
VIETNAM	2200	274	8,6
ZAIRE	18800	2225	8,3
UGANDA	2400	346	7,6
MADAGASCAR	2400	36	6,9
ANGOLA	1400	260	5,7
MOZAMBIQUE	4700	912	4,0
TOTAL AMERICA LATINA	33200	2587	11,9
TOTAL ASIA	47800	3712	13,1
TOTAL AFRICA	87600	9837	8,3

Fuente: FAO. Cálculos: Corporación Colombiana Internacional.

1.1.5 Producción de yuca en el Departamento de Santander

Tabla 4. Pronóstico de producción de yuca en el Departamento de Santander para el 2002

MUNICIPIO	EVALUACION	AÑO 2001	PRONOSTICO	AÑO 2002
	Área Sembrada (Hectáreas)	Producción Obtenida (Toneladas)	Área Sembrar (Hectáreas)	Producción a Obtener (Toneladas)
Aratoca	75	490	70	490
Barichara	160	1120	180	1260
Charalá	130	2600	200	4400
Coromoro	150	840	100	560
Curiti	220	1760	220	2640
Encino	115	900	115	900
Mogotes	190	1900	200	2000
Ocamonte	80	1050	80	1050
Onzaga	200	1125	100	1520
Pinchote	100	1200	100	1500
San Gil	270	3780	270	3780
San Joaquin	63	630	63	630
Villa nueva	100	800	100	800

Fuente: Colombia. Ministerio de Agricultura (2001).

1.2 EL ALMIDON

1.2.1 Historia

Exactamente no se sabe desde qué época es conocido el almidón. Los griegos los llamaron *Amylon* quizás debido a que al contrario de lo que sucede con la harina, se obtenía no por el molino, sino por el lavado. Según rastros arqueológicos hallados en las tumbas de los reyes Egipcios, presentan muestras de pegantes a base de almidón, los cuales datan aproximadamente del año 3500 A.C.

En la industria del almidón se conoce muy poco acerca de su aparición. Se admite probablemente que los Holandeses en el siglo XVI habían fabricado almidón a gran escala, pero usando como materia prima el trigo; el desarrollo debió efectuarse muy lentamente al igual que en otros países. . (LINDEN et all, 1996)

Después de la celulosa, el almidón es la sustancia orgánica más ampliamente distribuida en la naturaleza; la celulosa forma parte del armazón de las plantas, mientras que el almidón representa su reserva de carbohidratos, transformándolos por hidrólisis en glucosa la cual es transformada por medio de la savia, aprovechando su solubilidad. En las plantas existen tres clases de almidón:

Almidón de asimilación, transitorio y de reserva. El Almidón de asimilación es aquel que ha de servir en la nutrición de la planta y el cual se encuentra en forma de almidón soluble. El almidón en el interior de la planta, es transformado en azúcares por medio de enzimas diastásicas; pasando primero por la fase de almidón soluble, el cual puede transformarse algunas

veces en gránulos muy finos, formando así el almidón transitorio. El resto del almidón es transportado a los sitios de almacenamiento donde tiene como función servir de alimento para los brotes jóvenes; este es llamado almidón de reserva. . (LINDEN et all, 1996)

El almidón es el carbohidrato más importante en la actividad humana por su función alimenticia y por sus múltiples aplicaciones en la industria y el comercio. A diferencia de los almidones cereales, que requieren procesos industriales muy tecnificados, los almidones de raíces y tubérculos como la papa, batata y la yuca entre otros, son más fáciles de obtener en el medio rural, ya que solo requieren de molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado.(ALARCÓN et all, 1998)

El almidón se halla en forma de gránulos con la forma y tamaño característicos de la planta de la cual se obtiene, por lo que un análisis microscópico es muy útil para confirmar el origen del almidón; además ayuda a determinar la presencia de materiales extraños, afrecho, insectos o residuos de estos. (BERNAL, 1994)

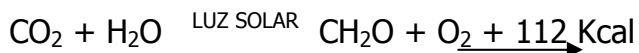
Cuando los gránulos están intactos, son insolubles en agua fría; si su membrana externa se rompe al ser molidos, estos gránulos se hinchan en agua fría y si se calienta por encima de 55 °C, forma un gel. En la tabla 5 podemos observar algunas propiedades del almidón. (FERMENA, 2000)

Tabla 5. Propiedades generales del almidón de yuca

PROPIEDAD	ESPECIFICACION
Tamaño de gránulo (eje mayor, μm)	4 - 35
Amilosa (%)	17 - 20
Amilopectina (%)	80 - 83
Temperatura de gelatinización ($^{\circ}\text{C}$) ^a	52 - 65
Viscosidad relativa	Alta
Claridad de la pasta	Clara
Tendencia a gelificar / retrogradar	Media
Sabor	Insípido
Calor de combustión (kJ/g)	17,6

^a Desde la temperatura inicial de gelatinización hasta completar la formación de la pasta.

La formación del almidón empieza con el proceso de fotosíntesis de la siguiente manera:



El formaldehído formado, se polimeriza a glucosa según la reacción:



1.2.2 Propiedades del almidón

El almidón es un polvo blanco, amorfo, plástico, cuya densidad es 1,6 g/mL, que a veces se caracteriza por un brillo peculiar. Es insoluble en agua, alcohol y éter. Al microscopio presenta características definidas, pudiéndose identificar fácilmente. Químicamente, es un hidrato del carbono (oxígeno, nitrógeno y carbono). Su procedencia se distingue por el tamaño y la forma de los granos.

- En virtud de su forma podemos dividir los almidones en 5 clases:
- Almidón de gránulos en forma de óvalos grandes formando anillos concéntricos y con núcleo (hilum) colocado excéntricamente. Ejemplo: la papa.
- Almidón de gránulos ovoides usualmente formando anillos concéntricos, con núcleo irregular. Ejemplo: las leguminosas.
- Almidón de gránulos ovoides con núcleo central. Ejemplo: el trigo.
- Almidón de gránulos trancos en uno de los extremos. Grupo del sagú. Ejemplo: la yuca.
- Almidón cuyos gránulos forman ángulos pequeños y poligonales. Ejemplo: el arroz.

En la tabla 6 podemos observar el % de almidón presente en diferentes productos agrícolas.

Tabla 6 Contenido de almidón en productos agrícolas

CLASE DE PLANTA	% EN PESO DE ALMIDON
Papa	8 – 29
Patatas	12 - 59
Maíz	65 - 78
Trigo	55 - 78
Arroz	50 – 89
Cebada	38 – 42
Centeno	54 – 69
Avena	30 – 40
Fríjol	38
Yuca	38 – 80

1.2.3 Estructura y composición

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

La diferencia entre la celulosa y el almidón radica en que en el almidón, los restos de glucosa están unidos entre sí por uniones glucosídicas 1-4, con orientación α , mientras que la celulosa tiene uniones 1-4 glucosídicas con orientación β . Además de esto se sabe que el almidón contiene alrededor del 20% de una fracción soluble en agua llamado amilosa y el 80% de una insoluble conocida como amilopectina.

En el gránulo de almidón podemos distinguir tres partes:

- La primera es una envoltura de amilopectina y α -amilosa o un almidón menos soluble y que contiene un éster fosfórico, el cual es un éster amilofosfórico. Es difícilmente atacada por enzimas, necesitándose para ello un calentamiento. Con dicho calentamiento forma una pasta y con una solución alcohólica de yodo-yoduro da una coloración violeta.
- La segunda parte es una sustancia inerte formada por β -amilosa, granulosa o β -almidón. Esta parte es más soluble que la anterior y no forma una pasta, ni da color con el yodo-yoduro.
- La tercera parte es hallada sólo en los cereales, pero no como constituyente del gránulo, la hemicelulosa

1.2.3.1 Amilosa

La α - amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas en las que todas las unidades de D - glucosa se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α (1,4); por lo tanto la unidad que se repite es la maltosa (figura 1) .

El peso molecular de la amilosa depende de su origen botánico, su aislamiento y el método utilizado. Entre los valores aceptados para la amilosa están entre 1,1 y 1,9 millones de daltons.

1.2.3.2 Amilopectina

Presenta una cadena lineal de tipo α (1,4) como en la amilosa; además tiene alrededor de 4-5% de las unidades de glucosa unidas por enlaces α (1,6) dando una estructura ramificada creciente. (Figura 2). El peso molecular de la amilopectina es muy variable; las mejores valoraciones del peso molecular promedio (por difracción) es de 10 a más de 20 millones de daltons. (MORRISON et al, 1996)

Figura 1. Segmento lineal de la amilosa

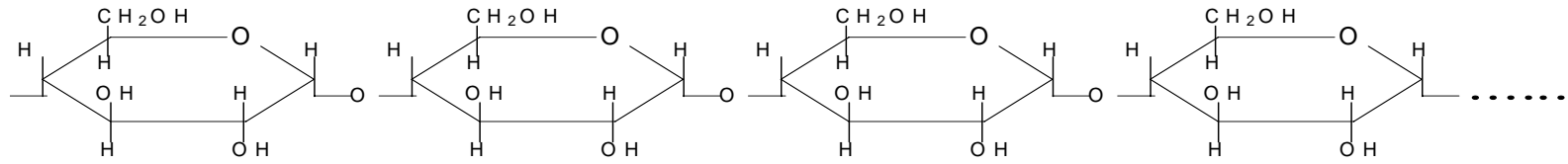
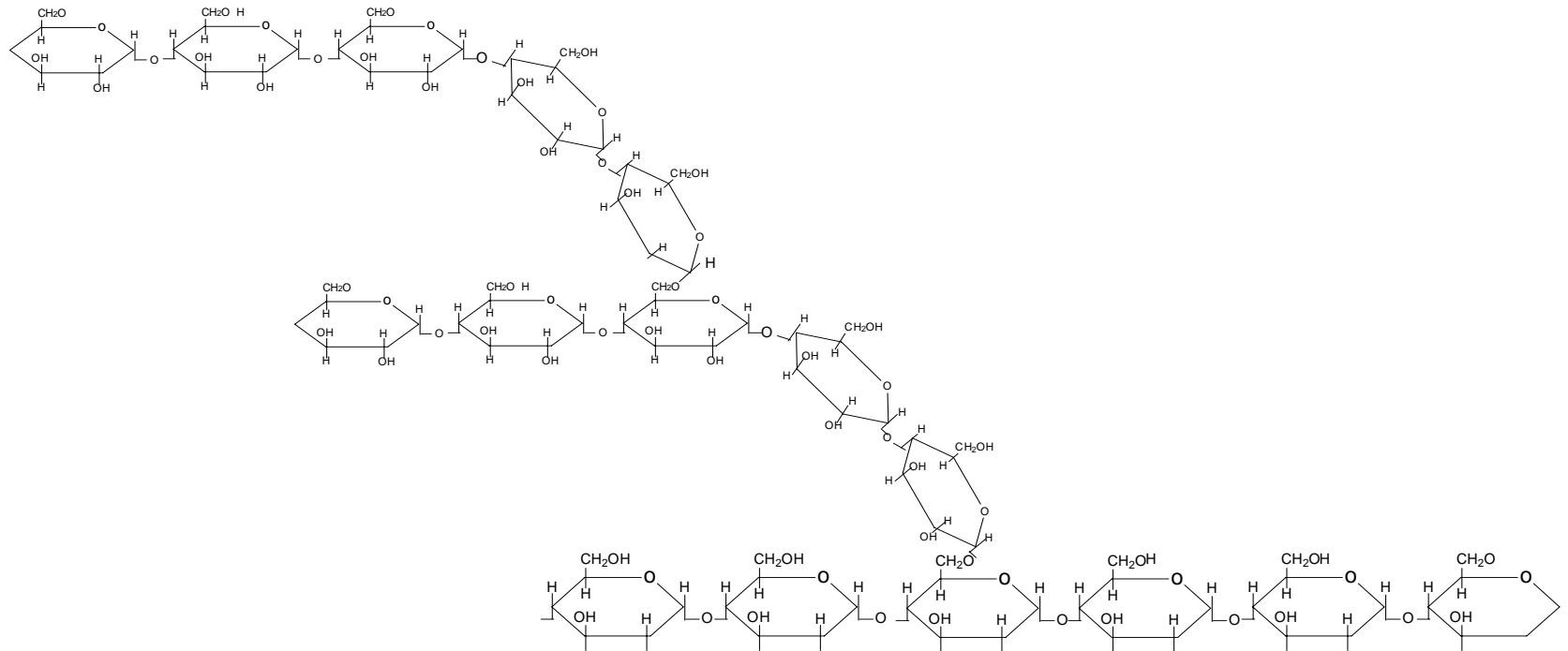


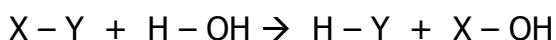
Figura 2. Segmento cadena ramificada de la amilopectina



1.3 HIDRÓLISIS

Se denomina hidrólisis a las reacciones de la química orgánica e inorgánica, en donde el agua efectúa una doble descomposición con otro compuesto. (El H^+ va en un componente y el OH^- va en el otro). Este término también puede aplicarse a reacciones en donde un ácido se añade al agua, en mayor o menor cantidad para acelerar la reacción; ésta hidrólisis puede llevarse a cabo con ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos o por acción enzimática, la cual es la más utilizada industrialmente.(FERMEMA, 2000)

Reacción de hidrólisis:



Con la finalidad de transformar las moléculas del almidón en azúcares fermentables los cuales son asimilados por las levaduras o bacterias, el almidón es sometido a un proceso de hidrólisis mediante el cual ocurre un desdoblamiento ya sea por un exceso de agua o por la presencia de una pequeña cantidad de fermento ó ácido. De acuerdo a lo anterior la hidrólisis puede ser ácida o enzimática.

1.3.1 Hidrólisis ácida:

El almidón tratado con ácidos se rompe en cadenas cortas de dextrina. El grado de degradación depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de hidrólisis. A medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta. Los ácidos más utilizados para la producción de dextrinas son el ácido clorhídrico, el ácido nítrico y el ácido sulfúrico. Si hervimos el almidón con ácido

clorhídrico 1N durante 1 hora, el almidón se rompe totalmente y se reduce a glucosa esta reacción es conocida como hidrólisis intensa.

Los productos de degradación son principalmente el hidroximetilfurfural, el ácido levulínico y el ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo. La recombinación de unidades de D-Glucosa o de ésta con fragmentos como maltosa, conducen a la formación de productos de reversión los cuales pueden ser hidrolizados, un ejemplo de estos productos de síntesis es la Genciobiosa.

Mediante este procedimiento, se logra el desdoblamiento de las moléculas de almidón por la acción de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico diluidos. La clase de ácido, su concentración, la cantidad empleada referida a la cantidad de almidón, así como la presión y la temperatura ejercen gran influencia en la duración de la sacarificación. Por lo general, la cantidad de ácido empleado es tal que el valor de pH se ajuste a 1,5 para una solución al 33% de almidón. El agua utilizada, debe ser lo más pura posible y libre de hierro, ya que el ácido fosfórico que existe en el almidón forma después de neutralizarse fosfatos de hierro insolubles, finamente dividido, quedando en suspensión en el jarabe y es muy difícil su separación por filtración.(FERMENA, 2000)

1.3.2 Hidrólisis enzimática (sacarificación de materiales amiláceos):

La sacarificación es el proceso que tiene por objeto la transformación del almidón de las materias primas amiláceas en azúcares. Dicha transformación es catalizada por enzimas. Estas enzimas se encuentran en la saliva, los jugos pancreáticos, las células de la sangre, las semillas y granos de muchas plantas, en hongos y bacterias. La función de estas enzimas es de romper

las moléculas de almidón, dando productos semejantes a los obtenidos por hidrólisis ácida. Las dos clases de amilasas más conocidas actualmente son:

- Alfa-amilasas: las cuales desdoblan el almidón en glucosa y maltosa; se caracteriza por la facilidad de fragmentación de los almidones en dextrinas reductoras, que no dan color con el yodo.
- Beta-amilasas: convierten el almidón en glucosa y maltosa.

Las amilasas actúan muy lentamente sobre el almidón, por lo que debe ser sometido a un proceso de cocción para obtener una buena dispersión y rompimiento de los granos de almidón llevándose a cabo una hidrólisis rápida. La acción de la amilasas sobre el almidón depende del origen del mismo; ya que el almidón consta de una mezcla de 75 – 80% de amilopectina y el resto de amilosa. Esta última se compone de cadenas longitudinales que contienen unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glicosídico. Una cadena lineal puede contener de 70 a 100 unidades de glucosa aproximadamente.(BERNAL, 1994)

La producción de jarabes de glucosa a partir de almidón se realiza en dos pasos, primero la licuefacción del almidón y segundo la sacarificación (conversión de la molécula de almidón en moléculas de glucosa).

La licuefacción se realiza utilizando como catalizador las enzimas β -amilasa o α -amilasa, y la sacarificación se realiza utilizando como catalizador la glucoamilasa o la pollulanasa y también se pueden utilizar mezclas de enzimas.(FRAZIER et all, 1993)

El proceso de hidrólisis enzimática con microorganismos consta de dos fases. En la primera de ellas, la materia prima se trata con una amilasa obtenida generalmente de microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Bacillus* o *Penicillium* que a una temperatura de 35°C y un pH próximo a 7 rompe los enlaces L-D-1,4 del almidón dando lugar a las dextrinas solubles.

En la segunda etapa, a una temperatura algo inferior y con un pH de 3-5 se tratan las dextrinas con la enzima glucoamilasa, dando lugar a la glucosa libre. Esta enzima, se obtiene de hongos de género *Rhizopus*.

La conversión de las moléculas de almidón en azúcar susceptible de fermentación, se logra mediante las diastasas de la malta o por las diastasas de los hongos. Esta transformación no es directa, sino que ocurre a través de productos intermedios no fermentables. La cantidad de maltosa producida depende de la concentración en el mosto, duración de la acción de las diastasas y de la temperatura.

La formación del azúcar partiendo del almidón por medio de las diastasas y de las amilasas es un efecto catalítico. Así deben de poder sacarificarse cantidades ilimitadas de almidón por medio de pequeñas porciones de diastasas, tal y como sucede cuando la sacarificación se lleva a cabo a temperatura baja, alrededor de 30°C. El empleo de esta baja temperatura sólo podría ser práctico si se trabajara con materiales y aparatos perfectamente estériles. En general, es más conveniente trabajar a temperaturas entre los 50 –55°C ya que a estas temperaturas la sacarificación se desarrolla muy rápidamente, pero acompañada de un debilitamiento de las diastasas. (FRAZIER et all, 1993)

1.4 HONGOS

Los hongos son organismos vivos, que poseen un cuerpo que puede ser filamentoso multicelular o no filamentoso unicelular. Antiguamente Los hongos figuraban en como una división del reino Plantas (*Plantae*). Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que, en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento habían perdido la clorofila, y con ello, su capacidad para realizar la fotosíntesis.

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, las cuales son diminutas partículas de protoplasma rodeadas de pared celular. Las esporas pueden tener menos del 50% de agua, aunque otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos. Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono. La mayoría de los hongos utilizan azúcares como la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Los hongos, además, precisan otros elementos como oxígeno, nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio.

La clasificación propuesta por Constantine J. Alexopoulos y Charles W Mims (1979). Según este sistema, los cinco filos principales son: Oomicetes (*Oomycota*), Zigomicetes (*Zygomycota*), Ascomicetes (*Ascomycota*) y Basidiomicetes (*Basidiomycota*) y Deuteromicetes (*Deuteromycota*), también llamados hongos imperfectos, sus respectivos individuos forman oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas.

Algunos otros filos se consideran hongos, o bien, grupos relacionados estrechamente con los hongos: Actinomicetes (*Actinomycota*), Mixomicetes (*Myxomycota*), Plasmodioforomicetes (*Plasmodiophoromycota*), Labirintulomicetes (*Labyrinthulomycota*) y Acrasiomicetes (*Acrasiomycota*). Los actinomicetes, constituyen un grupo intermedio entre las bacterias y los hongos, tienen hifas muy delicadas y una reproducción que suele ser mediante oídios o conidios.(GARCIA et all, 1998)

1.4.1 *Aspergillus Níger*

Al género *Aspergillus* pertenecen los hongos filamentosos (formadores de hifas), las cuales presentan un revestimiento (micelio) blanquecino y coloreado (negro, verde, pardo y amarillo) sobre el substrato en el cual crecen. La reproducción asexual se efectúa por medio de microconidias colocadas en esterigmatas en los extremos de la vesícula o cabeza que caracterizan al micelio aéreo. Durante la germinación las conidias aumentan de tamaño y forman varios tubos germinativos que se desarrollan en un micelio pluricelular ramificado, eso explica la forma redonda de la colonia.(KLICH et all, 1988)

La especie *niger* del género *Aspergillus* es miembro de la clase tentativa Deuteromycetes, están ampliamente distribuidos en la naturaleza: frutas, vegetales u otros substratos les sirven de alimento. Tienen importancia económica porque se les usa en muchas industrias para la hidrólisis de almidón y en la fermentación que incluyen la producción del ácido cítrico y el ácido glucónico, que son elaborados en abundancia por *Aspergillus niger*.

1.4.1.2 Clasificación Taxonómica: Como características utilizadas en la clasificación están: el color de la cabeza conidiana, la forma de la vesícula,

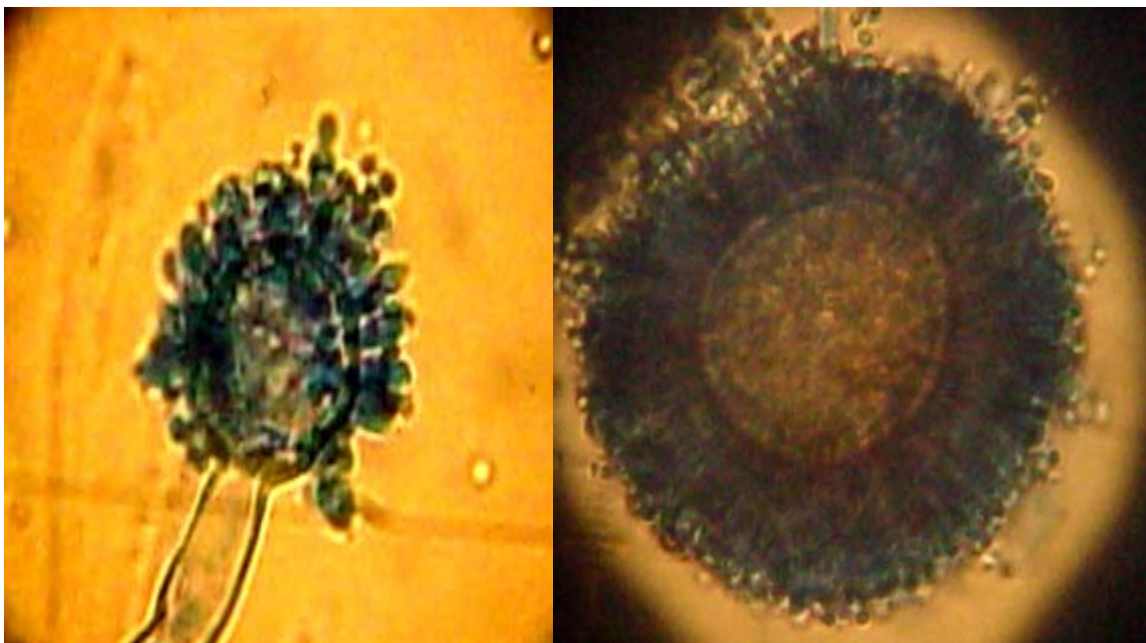
los cambios que se dan en el conidióforo y la forma de las células en nuez (Hulle) cuando están presentes y la existencia o no de esclerotes y estructuras asexuadas (VELEZ, 1989)

Clasificación taxonómica del *Aspergillus niger*

DOMINIO	Eucharya
SUBDOMINIO	Fungi
DIVISIÓN	Eumycota
SUBDIVISIÓN	Deuteromycotina
FAMILIA	Moniliaceae
ORDEN	Moniliales
GÉNERO	<i>Aspergillus</i>
ESPECIE	<i>niger</i>

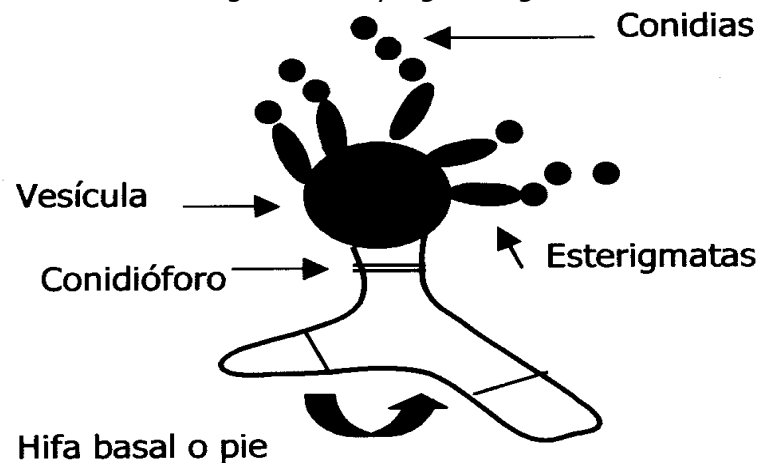
1.4.2 Características microscópicas. El *Aspergillus niger* presenta las siguientes características microscópicas:(SAMSON et all, 1995)

Figura. 3 Características microscópicas del *Aspergillus niger*



- **Cabeza conidial:** es radiada y está formada por la vesícula, las fialides y las conidias; las conidias son globulares con un diámetro de 4 a 5 μm con un color amarillento o ligeramente marrón especialmente cerca de los ápices.
- **Vesícula.** De forma globular y mide alrededor de 30 a 75 μm de diámetro, origina esterigmas (fialides) en toda la superficie.
- **Esterigmatas (fialides):** Células formadoras de conidias (fialosporas) que se forman sobre la vesícula de esterigmatas II. Se encuentran en dos series (biseriadas). Las primeras son largas (30 μm por 6 μm) de color pardo y pueden ser tabicadas. Las segundas son cortas (8 μm por 3 μm) y brotan conidias.
- **Conidias (fialosporas):** son de forma globular con un diámetro de 4 a 5 μm , su color varía de castaño a negro y su superficie es muy rugosa.
- **Micelio:** Compuesto por hifas septadas, pueden ser de colores claros o fuertemente coloreadas.

Figura 4. Características morfológicas del *Aspergillus niger*



1.4.3 Características Macroscópicas de la colonia

En Agar almidón a 25 °C la colonia del *Aspergillus niger* es densa, mostrando canales o surcos de longitudes variables; crece con un diámetro de 2.5 a 3.5 cm en 7 días. El micelio basal compuesto es de color amarillo y da origen a estructuras conidiales negras; las cabezas conidiales son grandes, negras y globulares, las cuales después de un tiempo se hacen radiadas o se rompen para formar cilindros sueltos. (KLICH, 1988)

Figura. 5 Características Macroscópicas de la colonia del *Aspergillus niger*



1.5 FERMENTACIÓN

La palabra fermentación se deriva etimológicamente de la palabra latina *fervere*, que significa ebullición o burbujeo y fue aplicada a la transformación que experimentaba el mosto de uva al convertirse en vino y durante el cual se producía gran cantidad de anhídrido carbónico a través de todo el líquido, por lo que le daba la impresión de que se encontraba en ebullición.

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica de origen vegetal libres de nitrógeno, entre ellas están los hidratos del carbono o sus derivados, por medio de ciertos microorganismos (bacterias, bacilos, levaduras o mohos), y que generalmente van acompañadas de un desprendimiento gaseoso y producción de energía.

Actualmente, el término fermentación tiene varias interpretaciones:

- Cuando se trata de cambios químicos a nivel molecular, el término fermentación se emplea correctamente para describir un desdoblamiento de los carbohidratos bajo condiciones anaerobias.
- Cuando el objetivo es la descripción de los productos finales el término fermentación se refiere al desdoblamiento de los carbohidratos y derivados bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas.
- Cuando los microorganismos fermentan los componentes de los alimentos, adquieren energía en el proceso; a medida que estos componentes se oxidan, disminuye dicha energía.

El principio fundamental de la conservación por medio de la fermentación es: estimular el crecimiento de los microorganismos productores de alcohol y ácido y suprimir o controlar el crecimiento de los tipos proteolíticos y lipolíticos. (JORGENSEN, 1989)

En general, observando los fenómenos producidos en las fermentaciones, se deduce que hay casos en que dichos fenómenos se producen por la intervención de seres vivos microscópicos, animales o vegetales y otros en que se produce por la acción de una sustancia orgánica sin vida; a las

fermentaciones producidas por microorganismos se les llama verdaderas o directas y a las otras falsas o indirectas.

Los fermentos que producen las primeras son insolubles y los que dan ocasión a las segundas son solubles y se conocen con el nombre de zimazas. Parece ser, que esta sustancia es la verdadera productora de las fermentaciones y que se encuentra contenida en los diversos fermentos insolubles de cuyas células sale al ponerse en contacto con las sustancias fermentables.(KIRK et all, 1985)

1.5.1 Historia de la fermentación

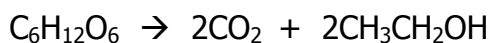
En 1762 Becher da a conocer los resultados de su trabajo afirmando que únicamente la presencia de azúcares podría dar origen al alcohol por medio de la fermentación.

En 1764 Mac Bride identifica un gas el cual es desprendido en la fermentación como el anhídrido carbónico.

En 1766 Cavendish consigue medir la cantidad total de anhídrido carbónico desprendido en la fermentación.

En 1773 Lavoisier publica su obra "Traité Elementaire de Chimie" poniendo de manifiesto los resultados de sus trabajos, confirmando que en la fermentación, el azúcar se desdobra en alcohol y anhídrido carbónico, mediante una reacción química que cumple con la "Ley de conservación de la materia".

En 1810 Gay-Lussac señala que para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica, es necesario la presencia de una sustancia azucarada y un fermento particular de naturaleza animal; así mismo, opinaba que el oxígeno era indispensable por lo que planteó la siguiente reacción:



Se observa que no es posible originar directamente alcohol y anhídrido carbónico mediante una simple ruptura, ya que tanto el grupo carboxílico como el metílico faltan en la molécula de glucosa. Por lo tanto es necesario que durante el proceso de fermentación, exista una migración de átomos, tanto de hidrógeno como de oxígeno, de átomos de unos carbonos a otros, como formación de productos intermediarios. Esta reacción muestra el proceso fermentativo global, resultado de una serie de reacciones parciales, sucesivas que se llevan a cabo a gran velocidad.

En 1836 varios autores manifiestan que las levaduras son vegetales y que son la causa de la fermentación alcohólica. Las levaduras de acuerdo con los resultados de las investigaciones de Leeuwenhock, son pequeñas esférulas que se multiplican y que sólo en estado viviente ejercen acción sobre el azúcar. (Teoría Vitalista)

Por esta misma época, otros científicos afirmaban que la fermentación era producida por una sustancia en descomposición, no por un ser vivo que se desarrolla o reproduce. (Teoría Mecánica)

En 1859 Louis Pasteur, hizo evidente que la levadura descompone el azúcar como consecuencia de su actividad vital; además de esto, demostró que en la fermentación de 100 partes de sacarosa, se originaban 105,4 partes de azúcar invertido, las que a su vez producían 51,1 partes de alcohol etílico, 49,4 partes de anhídrido carbónico, 3,2 partes de glicerina y 0,7 partes de ácido succínico, al igual que 1 parte de otras sustancias. Las primeras investigaciones de Pasteur sobre la fermentación se trataban especialmente con carbohidratos y las reacciones que libran el gas de dióxido de carbono. Sin embargo, pronto se reconoció que los microorganismos y las enzimas que actúan sobre los azúcares, no siempre producían gases; además de esto se

encontró que muchos también poseían el poder de desdoblar otros materiales diferentes a los carbohidratos como las proteínas y las grasas, las cuales producían dióxido de carbono, otros gases y una amplia escala de materiales.

1.5.2 Fermentación alcohólica

Desde la antigüedad, se han conocido los efectos de la fermentación alcohólica, despertando gran interés en las causas que la originaban. Las fermentaciones tienen lugar cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles.

Las fermentaciones han desempeñado un papel vital en el desarrollo del hombre desde los tiempos más remotos hasta la época actual. Los procesos de fermentación tienen como fin, estimular la multiplicación de los microorganismos ya que sus productos son muy deseados.

Con el tiempo se han propuesto muchos mecanismos que intentan explicar la fermentación (Lebedew, Kluver, Meyerhof entre otros).

Todo lo anterior se refiere a la fermentación de la glucosa. Cuando se van a fermentar disacáridos, se admite la existencia de una hidrolasa que realiza la hidrólisis correspondiente para luego empezar el proceso normal.

Una de las fermentaciones a nivel industrial más importante y conocida es la que da lugar al alcohol, mediante la interacción de una levadura sobre los azúcares.

1.5.3 Proceso de fermentación

Los procesos empleados en la fabricación de alcohol etílico (etanol) por fermentación, dependen de la naturaleza de la materia prima. Las materias sacaroideas requieren por lo general de algún tratamiento o a veces de ninguno, mientras que las materias celulósicas deben ser hidrolizadas a azúcares fermentables antes de que las bacterias actúen sobre ellas.

El éxito en cualquier proceso, depende de la eficacia del tratamiento preliminar, de la concentración del azúcar, del pH y de la temperatura óptima.

La transformación de la glucosa en etanol por acción de microorganismo se produce a través de una completa secuencia de reacciones que pueden resumirse en:



Esta es la formula típica de la fermentación alcohólica, la cual fue desarrollada por Gay-Lussac; quien describe la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono con producción de 28 calorías

Gay – Lussac obtuvo 23 partes de glucosa, 22 de dióxido de carbono y 23 de alcohol, lo cual indica un rendimiento aproximado de 50% de alcohol y 50% de dióxido de carbono. El rendimiento teórico de la fermentación según el esquema de gay-Lussac es por 100 g de glucosa darían 48,90% de dióxido de carbono y 51,10% de alcohol etílico. Sin embargo, el rendimiento práctico que se alcanza en el proceso siempre es menor que el teórico ya que parte del azúcar presente inicialmente, es usada para la nutrición y reproducción de los microorganismos y además, porque siempre se forman

aunque en pequeñas cantidades, algunos productos secundarios, tales como los aceites fusel (alcohol n-propílico, isopropílico, n-butílico) ácido succínico, glicerina, ácido láctico entre otros.

La fermentación del mosto, por la que ocurre el desdoblamiento del azúcar en los productos antes mencionados, comprende una etapa aeróbica, en la que se permite la aireación para la reproducción de los microorganismos, y una etapa anaeróbica en la que se elimina el suministro de oxígeno y se logra la fermentación principal con la producción de etanol y CO₂.

1.5.4 Variables que influyen en la fermentación

El proceso de fermentación alcohólica es afectado por algunas variables que influyen específicamente sobre el crecimiento y desarrollo de los microorganismos que en él hacen parte. Los principales factores son la temperatura, la concentración inicial del azúcar, el pH, y los nutrientes, además de la concentración alcohólica.

Respecto a la temperatura, la velocidad óptima de fermentación se obtiene cuando ésta oscila entre 25 –35°C ; temperaturas en las cuales las pérdidas de etanol por evaporación se reducen al mínimo.

La concentración inicial de azúcar en la masa de reacción, determina los siguientes factores:

1. Las altas presiones osmóticas producidas por soluciones azucaradas (más del 22% en peso) pueden inhibir el crecimiento celular en las fases iniciales de la fermentación.
2. Las altas concentraciones de etanol (superiores al 12-14% en peso) destruyen las levaduras antes que se complete la fermentación, pero la bacteria es más resistente a estas.

La influencia del pH en la masa fermentable es algo complejo y no se puede generalizar mucho. Sin embargo, en la literatura se recomienda un intervalo entre 4,5 – 6,5 para obtener mejores resultados.

La influencia de la concentración inicial del sustrato, la clase y su composición química, influyen notablemente en el crecimiento celular; así como el rendimiento en la fermentación.

La concentración alcohólica es otro parámetro importante dependiendo del microorganismo utilizado, aunque la *Zymomonas mobilis* es un microorganismo que presenta más resistencia al alcohol comparado con el *Saccharomyces cerevisiae*

Los nutrientes o las sustancias asimilables por los microorganismos, que contribuyen a su crecimiento y desarrollo, ejercen también su influencia en el proceso de fermentación, en el rendimiento del alcohol, en la eficiencia y la velocidad.

1.6 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Entre las características de *Zymomonas mobilis* está el rendimiento de conversión en etanol, superior a la de la Levadura, que resulta de una vía metabólica de utilización de los azúcares diferente de la de las levaduras, en consecuencia produce menos biomasa.(LEVEAU et all, 2000)

En la tabla.7 se observan algunas ventajas de esta bacteria sobre la levadura en el proceso de fermentación de azúcares(KARSCH,1983)

Tabla 7. Ventajas de la bacteria sobre la levadura

Comparación respecto a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zymomona mobilis</i>
Rendimiento	88%	94%
Cantidad biomasa	Mayor	Menor
Cantidad de subproductos	Mayor	Menor
Concentraciones de alcohol	Soporta menos concentraciones	Soporta mayores concentraciones

1.6.1 BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares, que no contienen clorofila; presentan múltiples formas, siendo las más comunes: la esferoidal, cilíndrica o en forma de bastón y la espiral. La multiplicación bacteriana tiene lugar por división; las formas esféricas denominadas *cocos*, se dividen siguiendo cualquier plano; mientras que las que tienen forma de *bastón* lo hacen transversalmente. La forma de agrupación de las bacterias es muy importante para su clasificación. Para que las bacterias proliferen es necesario disponer de materiales de los que puedan derivar energía y sintetizar las proteínas, grasas, carbohidratos y otros constituyentes que componen una célula bacteriana. (JOERGENSEN, 1989)

Las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos basándose en la forma como utilizan los nutrientes:

a. Autótrofas: son las que asimilan el carbono y el nitrógeno del amoníaco o de los nitratos o nitritos, obtienen la energía para el crecimiento de las

reacciones oxidativas o utilizan la energía de la luz solar. No alteran los alimentos.

b. Heterótrofos: son aquellas que necesitan materiales orgánicos como fuente necesaria de carbono y energía. En este grupo están los organismos patógenos o agentes causantes de enfermedades.

1.6.1.1 Composición química de las bacterias

Las bacterias contienen una gran proporción de agua del 75 – 85 %.

Datos de bacterias deshidratadas:

Carbono	50% aproximadamente
Nitrógeno	8 – 15 %
Cenizas	2 – 15%

1.6.2 *Zymomonas mobilis*

La *Zymomonas mobilis* es una bacteria quimiorganófila que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio y en algunos casos por la biotina. La *Zymomonas mobilis*, forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales. El nitrógeno necesario para el crecimiento es proporcionado por las sales minerales, aminoácidos o péptidos. Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azufre, magnesio y potasio son proporcionadas igualmente por sales; otros oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentran en estado de trazas en las sales utilizadas para la preparación del cultivo.

Las células presentan una pared multicapa seguida de un espacio periplásmico transparente a los electrones y una membrana citoplasmática. El protoplasma incluye una alta densidad de ribosomas.

Cuando las células se cultivan en presencia de pequeñas cantidades de glucosa, son visibles en su superficie vesículas que parecen incluir una sustancia finamente granular y electrónicamente densa. Se aprecia multicapa cuando el cultivo se efectúa con concentraciones de sustrato relativamente elevadas. La membrana externa en triple capa posee un perfil asimétrico.

Un factor importante para la diferenciación de los diversos grupos de bacterias es el método tintoral de gram que consiste en la fijación química o física de un colorante al citoplasma. La *Zymomonas mobilis* es una bacteria gram negativa, que no es capaz de retener el cristal violeta tras la decoloración y sus paredes celulares se contracolorean de rojo con la safranina debido a su mayor contenido lipídico en su pared celular, por lo tanto pierden la coloración primaria del cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante (KONEMAN,1983)

1.6.2.1 Antecedentes

Desde que fue aislada como contaminante durante la producción de sidra en 1912, *Zymomonas mobilis* ha sido objeto de numerosos estudios. Su eficiencia para la producción de etanol es conocida desde 1931 gracias a los estudios de Kluyver y Hoppenbrouwers.

En 1934 Screder demostró que cuando *Zymomonas mobilis* era cultivada en presencia de glucosa, un 98% del sustrato era transformado en etanol y CO₂. Entre los microorganismos que presentan más resistencia al alcohol se encuentra la *Zymomona mobilis* (GARCIA, 1998)

A principios de los años 50 Gibbs y DeMoss demostraron que la bacteria metabolizaba su sustrato por la vía Entner-Doudoroff .

Swing y deLey utilizando criterios relacionados con más de 40 cepas propusieron una clasificación que reagrupa las cepas de *Zymomonas* en una

especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*. La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie *mobilis*.

1.6.2.2 Características Fenotípicas del Género *Zymomonas*

- Bastón gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo
 - Móvil o inmóvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos.
 - Arreglo celular pleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos)
 - Ausencia de esporas, de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular
 - Catalasa positiva y oxidasa negativa.
 - Anaeróbico y microaerófilico.
 - Las únicas fuentes de carbono que metaboliza son: glucosa, fructosa y sacarosa.
 - Talla del genoma 1.5×10^9 kdaltones, aproximadamente 1500 cistrones.
- (GARCIA et al,1998; LEVEAU et all, 2000)

Figura 6 Características microscópicas de la bacteria *Zymomonas mobilis*

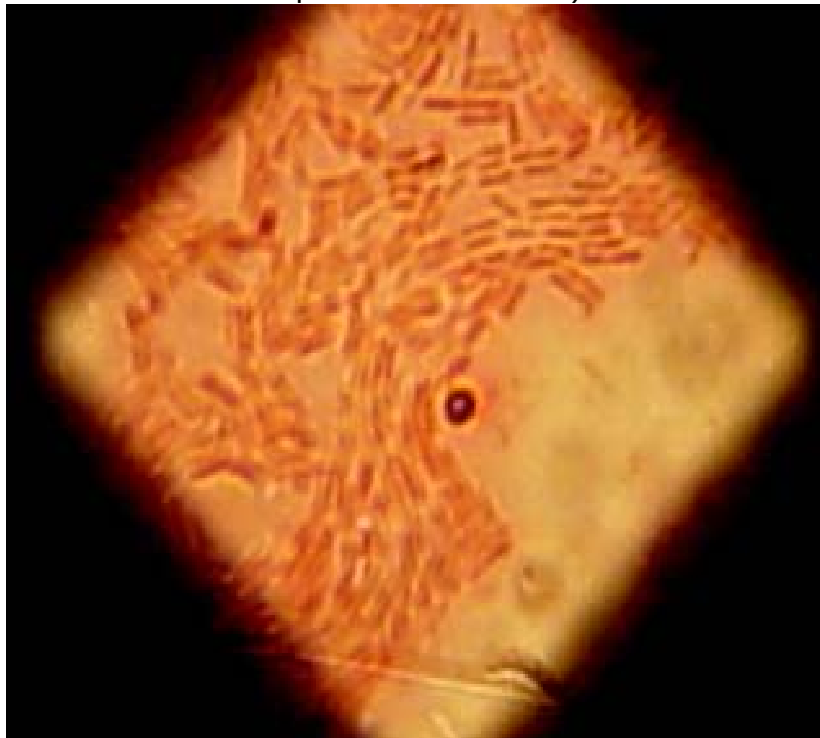


Figura 7. Características macroscópicas de la colonia de *Zymomona mobilis*



1.6.2.3 Aspectos Tecnológicos para la producción de etanol por *Zymomona mobilis*.

La producción de alcohol a gran escala requiere de microorganismos con ciertas características:

- Capacidad de metabolizar varios sustratos
- Tasas de crecimiento y de producción de etanol elevadas
- Máxima eficiencia para la conversión del sustrato
- Tolerancia a altas concentraciones de sustrato y de etanol
- Tolerancia a altas temperaturas

Un microorganismo que reúne todas estas características es la *Zymomona mobilis* ya que a diferencia de las levaduras presenta la tolerancia más elevada al etanol. Es capaz de la producción de etanol con concentraciones superiores al 13% (p/v)

Parece que la membrana celular es el blanco principal de la inhibición por el etanol tanto en levaduras como en bacterias. (GARCIA et all, 1998)

En el caso de las *Zymomonas*, tiene lugar una serie de modificaciones a nivel de la membrana que representa una adaptación a altas concentraciones de etanol; esto se traduce en una disminución de la relación lípido/proteína y una modificación de la composición de fosfolípidos. La proporción de fosfatidilglicerol y de fosfatidiletanolamina disminuye, mientras que la proporción de fosfatidilcolina aumenta.

La composición de ácidos grasos cambia poco. Se asegura también que el etanol influye sobre todo el contenido en hopanoides, los cuales en presencia de altas concentraciones de etanol, pueden representar un 36% de la fracción lipídica, que es el valor más elevado descrito para un microorganismo, esto podría ser debido a un cambio en la fluidez de la membrana que estimularía la biosíntesis de hopanoides, jugando un papel importante en la estabilización de la membrana en presencia de etanol.(LEVEAU et all,2000)

1.7 ETANOL

Es uno de los productos químicos más importantes de la industria, su sabor es picante, además es volátil e incoloro.

1.7.1 Propiedades Fisicoquímicas.

En la tabla No.8 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas del alcohol absoluto y su azeótropo con el agua (95%).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas del etanol absoluto y su azeótropo con el agua

CONSTANTE	ETANOL ABSOLUTO	ETANOL 95%
Punto de fusión (°C)	-112,3	
Punto de Ebullición (°C)	78,4	
Gravedad Especifica	0,785	
Índice de Refracción (n_D)	1,3633	1,3651
Viscosidad a 20°C (poises)	0,0122	0,0141
Tensión Superficial (dinas/cm)	22,3	22,8
Calor Especifico	0,581	0,618
Calor de fusión (cal/g)	24,9	
Calor de Evaporación en el punto de ebullición (cal/g)	204	
Calor de combustión (kg.cal/g.mol)	328	
Conductividad Eléctrica a 25°C (Ohm/cm)	1,35E-09	

1.7.2 Usos

El etanol se emplea como disolvente, extractor y anticongelante. Sirve de sustrato para la síntesis de otros compuestos orgánicos con función disolvente o extractora, colorante, farmacéutica, lubricante, detergente, pesticida, plastificante y cosmética entre otras. La utilización del etanol como combustible, ha sido un tema muy controvertido debido a los costos de producción y el contenido energético, pero a la vez tiene grandes ventajas como la producción de cantidades de contaminantes menores en motores de alcohol y la sustitución parcial del petróleo como fuente energética; uno de los países que utiliza esta tecnología es Brasil

El alcohol etílico reacciona con algunos metales para formar etóxidos (Etóxido de sodio), puede ser esterificado con ácidos orgánicos. Se oxida catalíticamente a acetaldehído y a ácido acético; en presencia de ácido sulfúrico se utiliza para la alquilación de núcleos aromáticos.

En muchos estudios se ha demostrado la factibilidad técnica y económica de producir alcohol a partir de almidón y sus ventajas frente al empleo de azúcares, en tabla No.9 se muestran algunos datos que dan idea de la rentabilidad en la obtención de etanol a partir de almidón de yuca, comparado con el obtenido a partir de la caña de azúcar (NAVARRO,1995)

Tabla 9. Rentabilidad en la obtención de etanol a partir de yuca

RENDIMIENTOS	CAÑA DE AZUCAR	YUCA
Ton/Ha	80	30
Lit alcohol/ton	60	170
Tiempo de Cosecha	18 meses	12 meses
Lit alcohol/año	3200	5000
Producción requerida ton/año	5.800.000	2.000.000
Extensión de terrenos requerida (Ha)	110000	70000
Inversión requerida para adecuar nuevas tierras \$/ha	30000	20000
Total \$	3.300.000.000	1.400.000.000

1.7.3 Obtención de etanol a partir de almidón

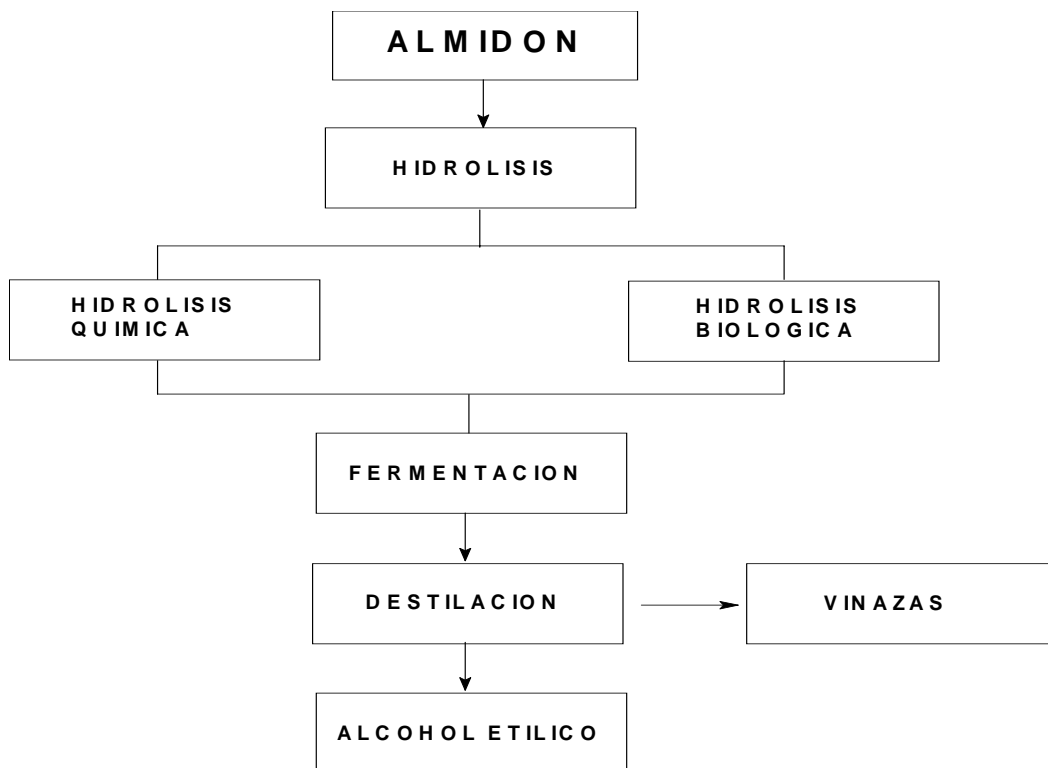
El etanol puede fabricarse por síntesis a partir de materiales petroquímicos o por fermentaciones biológicas con microorganismos específicos. En un proceso químico común, el etileno derivado del petróleo o del gas natural se

convierte a temperatura elevada en etanol mediante la adición de agua y en presencia de ciertos catalizadores.(KIRK, 1985)

En el proceso microbiológico, el microorganismo produce etanol como producto de la fermentación, ya sea de azúcar crudo o almidón previamente hidrolizado. Otro sustrato utilizable en la fermentación es la celulosa; aunque resulta mucho más complicada para el proceso comparada con el uso de granos ya que debe sufrir varios tratamientos previos que hacen más costosa la obtención.(DEMAIN et all, 1981)

En la figura 8 se observa el diagrama de flujo de obtención de alcohol a partir de almidón. Las etapas del proceso son hidrólisis, fermentación y destilación. (BREKELBAUM et all,1980)

Figura 8. Diagrama de flujo de obtención de alcohol etílico

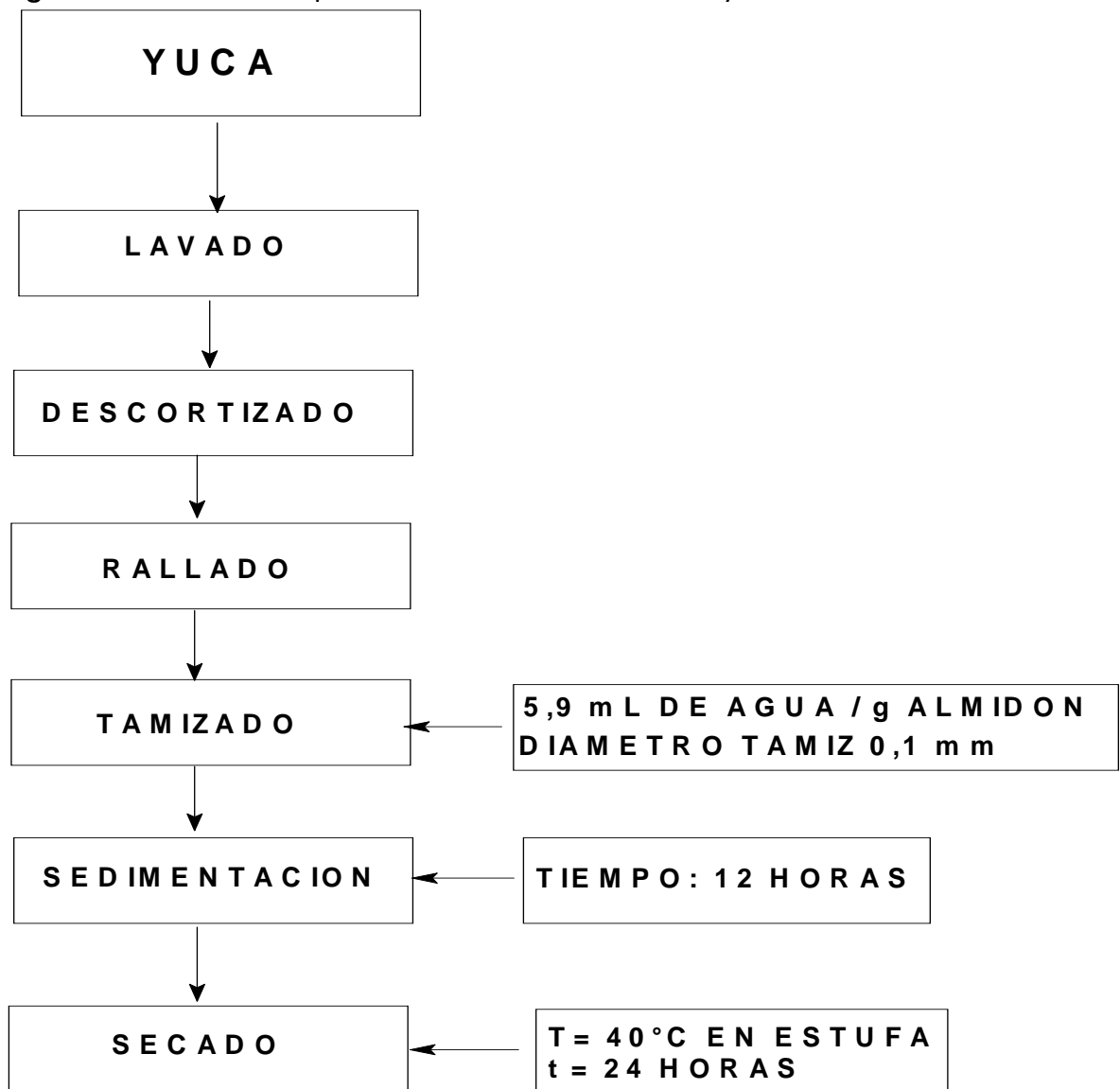


2. METODOLOGÍA

2.1 EXTRACCIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA VARIEDAD CHILE

La extracción del almidón de la yuca variedad chile se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Cabanzo y Luna que comprende los siguientes pasos; figura 9

Figura 9. Procedimiento para la extracción de almidón de yuca variedad chile



2.2 HIDRÓLISIS

2.2.1 Microorganismo empleado en la hidrólisis

2.2.1.1 Aislamiento del microorganismo

La cepa del *Aspergillus niger* fue aislada del medio ambiente en las instalaciones del Centro de Investigación Biotecnológica Industrial y Biología Molecular (CINBIN), de la Universidad Industrial de Santander, de acuerdo a la metodología seguida por Chacón y Sarmiento; el *Aspergillus niger* fue identificado teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas. (VELEZ, 1989; SAMSON et all, 1995).

2.2.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del hongo, corresponde al medio mineral Czapek (NaNO_3 , 3 g/L; K_2HPO_4 , 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; KCl, 0,5 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L.) modificando la fuente de carbono por el almidón de yuca. El pH se ajustó utilizando buffers de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ hasta valores de 4,5; 5,0; 5,5.

2.2.1.3 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de esporas en solución salina estéril, a partir de microorganismos cultivados en cajas petri, después de 15 días de incubadas al medio ambiente. La concentración de esporas se determinó por recuento en la Cámara de Neubauer.

2.2.1.4 Curva de crecimiento del *Aspergillus niger*

Se realizaron ensayos para determinar el tiempo de crecimiento del hongo, inicialmente, se preparó un medio de cultivo con la composición descrita en el

numeral 2.2.1.2 con una concentración de almidón de 4%p/v. Posteriormente fue inoculado con una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* con una concentración aproximada de 10^7 conidiosporas/mL.

El medio de cultivo previamente inoculado se dividió en 10 bioreactores. Los cuales se incubaron en condiciones iguales de temperatura, agitación, aireación y pH; la cantidad de biomasa producida fue determinada cada 12 horas, separando la biomasa del medio por filtración, la biomasa obtenida se secó en la estufa a una $T=90^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, para luego ser pesada. Los datos obtenidos están registrados en la Tabla 12. Se graficó la cantidad de biomasa vs. tiempo.

2.2.2 Montaje de los bioreactores para la hidrólisis

Los ensayos se realizaron en bioreactores de 500 mL con un volumen de reacción de 200 mL de medio de cultivo preparado de la misma manera que el numeral 2.2.1.2. Las concentraciones de almidón y el pH fueron ajustados de acuerdo a las condiciones reportadas en literatura, las cuales fueron las siguientes: la concentración de almidón de 2% p/v, 4 % p/v y 6% p/v y los valores de pH de 4,5; 5,0 y 5,5. Los medios de cultivo son gelificados y posteriormente esterilizados en un autoclave a 15 psi por 15 minutos.(Ver figura 9) Posteriormente los bioreactores se inocularón con una concentración aproximada de 10^7 conidiosporas/mL de *Aspergillus niger*.

Los bioreactores son incubados bajo condiciones controladas de temperatura y agitación horizontal suministrada por un agitador marca MLW con 100 desplazamientos por minuto.

2.2.3 Determinación de azúcares reductores, % almidón en el medio y glucosa al final de la hidrólisis

Los azúcares reductores se determinaron por el método fotocolorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico, mediante una curva de calibración con glucosa. (Ver anexo B). Este método permite determinar cuantitativamente la producción de amilasa, por parte del *Aspergillus niger*.

La concentración de glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa y peroxidasa utilizando el Kit de Sera - Pak. (Ver anexo C). Esta concentración de glucosa está dada en g/L

El % de almidón en el medio se determinó por el método colorimétrico de Antrona – Ácido Sulfúrico, mediante una curva de calibración con glucosa. (Ver anexo D). Dicho método consiste en la hidrólisis ácida del almidón con el ácido perclórico.

2.2.4 Influencia de las variables en el proceso de hidrólisis

Para determinar las variables que más influyen en el proceso de hidrólisis se realizó un diseño factorial de experimentos (tamizado) del tipo 3³ con una réplica (Tabla 14), se consideraron como variables independientes el pH, la temperatura y la concentración de almidón. Los valores máximos y mínimos de estas variables se tomaron de la literatura (LEON, 1997) y se muestran junto con sus valores normalizados en la Tabla 10,. Estos niveles, normalizados con la ecuación 1

$$X = \frac{V - m}{M} \quad \text{ECUACIÓN 1}$$

Donde:

X = Variable normalizada

V = variable sin normalizar

m = Valor 0,5 de la variable sin normalizar

M = diferencia entre el valor +1 y el valor 0,5 de la variable sin normalizar.

Tabla 10. Valores para las variables normalizadas para los experimentos de hidrólisis del almidón de yuca

VARIABLE	NIVEL				
	-0,20	0	0,5	1	1,20
CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN (% P/V)	3,58	2	4	6	6,4
TEMPERATURA (°C)	-	25	30	35	-
pH	4,89	4,5	5,0	5,5	5,6

Se tomó como variable de respuesta o variable dependiente el % de conversión a glucosa que se determina siguiendo el procedimiento descrito en el anexo A. Con los resultados de los ensayos realizados (Tabla 14) y utilizando el programa de computación STATGRAPHICS® PLUS 4.0 (NAKAMURA, 1997) se obtuvo un modelo matemático de la forma:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n + \text{interacciones} + b_MX^t$$

ECUACIÓN 2 (BOX, 1993)

Este programa estadístico utiliza la metodología de mínimos cuadrados, que consiste en un método matricial para calcular el coeficiente que acompaña a cada variable de la ecuación 2 obteniéndose el modelo matemático que bajo las condiciones empleadas, representa el % de conversión del almidón de yuca (Ecuación 3). La influencia de las variables independientes T, pH y concentración de almidón, sobre la variable dependiente % de conversión, se determinó basados en el análisis estadístico de r, F, P y los coeficientes b para cada variable en el modelo.

Para determinar las condiciones para obtener altos porcentajes de conversión de almidón a glucosa en el proceso de hidrólisis, se construyó un diseño ortogonal , central y rotatable, con réplica (ver tabla 18), en el cual se utilizaron las dos variables que mostraron el mayor grado de influencia en el modelo matricial.(Ecuación 4)

Con el modelo obtenido y utilizando el programa STATGRAPHICS® PLUS 4.0 se graficó la superficie de respuesta (Gráfica 5) y su respectiva curva de nivel (Gráfica 6) de las variables independientes sobre la variable dependiente del proceso de hidrólisis.

La validación del modelo matemático (descrito en la ecuación 3) se realizó con base en el análisis de los estadísticos r , F , P y las gráficas de residuos. En la validación experimental del modelo, se tomaron condiciones de trabajo de pH y concentración de almidón al azar, directamente de las curvas de nivel. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22. Estos experimentos se realizaron con volúmenes de reacción de 100 mL.

2.3 FERMENTACION

2.3.1 Microorganismo empleado en la fermentación

2.3.1.1 Aislamiento del microorganismo

La cepa de *Zymomonas mobilis* fue aislada en un medio a base de jugo de manzana y de pera, en cajas de petri a temperatura ambiente durante 4 días en condiciones de microaerofilia, en las Instalaciones del Centro de Investigación Biotecnológica Industrial y Biología Molecular (CINBIN), de la Universidad Industrial de Santander, la *Zymomonas mobilis* fue identificada teniendo en cuenta sus características morfológicas y bioquímicas . El medio

utilizado para el aislamiento contiene: g/L de extracto de levadura 10; Agar agar 15; bactopectona 10; manzana o pera 200. Se adicionó 0,01 g/L de tetraciclina para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas.

2.3.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Zymomonas mobilis*, corresponde al hidrolizado del almidón, el cual contiene algunas sales suministradas anteriormente (ver numeral 2.2.1.2) ajustando el pH con NaOH.

2.3.1.3 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de colonias a partir de microorganismos cultivados en cajas petri, en una solución de glucosa al 3% y sales iguales a las del medio mineral Czapek. La concentración de colonias en el medio se obtuvo por el método turbidimétrico determinando su absorbancia en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400 contra la curva patrón de la escala de Macfarland.

2.3.1.4 Curva de crecimiento de *Zymomonas mobilis*

La cuenta de células viables se considera como la medida de la concentración celular. El método consiste en medir la absorción o dispersión de la luz por un cultivo mediante procedimientos fotoeléctricos y relacionar las cuentas viables con las mediciones ópticas en forma de una curva estándar. Por medio de la curva estándar, todas las lecturas ópticas posteriores pueden convertirse a concentración celular.

2.3.1.4.1 Curva Estándar :

Inicialmente se prepararon soluciones de BaCl₂ al 1% y de H₂SO₄ al 1%. La absorbancia se hizo en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400 utilizando la Escala de Macfarland como curva patrón (método turbidimétrico). La absorbancia se midió a 550 nm. (ANEXO E).

Se realizaron ensayos para determinar el tiempo de crecimiento de la bacteria, en el medio obtenido de la hidrólisis, en una concentración de glucosa de 5%. Posteriormente fue inoculada una suspensión de colonias de *Zymomonas mobilis* con una concentración aproximada de 10⁸ ufc/mL.

El medio de cultivo previamente inoculado se dividió en 12 bioreactores. Los cuales se incubaron en condiciones iguales de microaerofilia, temperatura y pH.

Cada hora se tomó un bioreactor y midiendo la absorbancia se observó su crecimiento en el medio (método turbidimétrico). Los datos obtenidos están registrados en la Tabla 23. Se graficó unidades formadoras de colonias vs. tiempo.

2.3.2. Montaje de los bioreactores para la fermentación

Los ensayos se montaron en bioreactores de 250 mL con un volumen de reacción de 100 mL de medio de cultivo obtenido de la etapa de hidrólisis. Las concentraciones de glucosa y el pH fueron ajustados de acuerdo a las condiciones seleccionadas. Los medios de cultivo son esterilizados en un autoclave a 15 psi por 15 minutos.(Ver figura 10) Posteriormente los bioreactores se inocularon con una concentración aproximada de 10⁸ ufc de *Zymomonas mobilis*/mL.

Los bioreactores fueron incubados bajo condiciones controladas de temperatura.

2.3.3. Determinación de glucosa y porcentaje de etanol

La concentración de glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa y peroxidasa utilizando el Kit de Sera - Pak. (Ver anexo C). Esta concentración de glucosa está dada en g/L

La densidad del etanol obtenido se determinó por el método de gravedad específica por picnómetro y luego fue comparada con las tablas de la oficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) para confirmar el porcentaje de etanol en el destilado.

2.3.4. Influencia de las variables en el proceso de Fermentación

Para determinar las variables que más influyen en el proceso de fermentación se realizó un diseño factorial de experimentos (tamizado) del tipo 3^3 con una replica (Tabla 26) se consideraron como variables independientes el pH, la temperatura y la concentración de glucosa. Los valores máximos y mínimos de estas variables se tomaron de la literatura y se muestran junto con sus valores normalizados en la Tabla 11. Estos niveles, fueron normalizados con la ecuación 1

Tabla 11 Valores para las variables normalizadas para los experimentos de fermentación de los hidrolizados del almidón.

VARIABLE	NIVEL				
	-0,20	0	0,5	1	1,20
CONCENTRACION DE GLUCOSA (g/L)	139,6	100	150	200	210,3
TEMPERATURA (°C)	-	30	34	38	-
pH	4,79	4,0	5,0	6,0	6,20

Se tomó como variable de respuesta o variable dependiente el % de rendimiento de etanol que se determina siguiendo el procedimiento descrito en el anexo F. Con los resultados de los ensayos realizados (Tabla 26) y utilizando el programa de computación STATGRAPHICS® PLUS 4.0 (NAKAMURA, 1997) se obtuvo un modelo matemático de la forma:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n + \text{interacciones} + b_MX^t$$

Este programa estadístico utiliza la metodología de mínimos cuadrados, que consiste en un método matricial para calcular el coeficiente que acompaña a cada variable de la ecuación 2 obteniéndose el modelo matemático que bajo las condiciones empleadas, representa el % de rendimiento de etanol (Ecuación 5). La influencia de las variables independientes T, pH y Concentración de glucosa, sobre la variable dependiente % de rendimiento de etanol, se determinó con base al análisis estadístico de r, F, P y los coeficientes b para cada variable en el modelo.

Para determinar las condiciones y obtener altos porcentajes de rendimiento de etanol en el proceso de fermentación, se construyó un diseño ortogonal, central y rotatable, con réplica (ver tabla 30), en el cual se utilizaron las dos variables que mostraron el mayor grado de influencia en el modelo matricial. (Ecuación 6)

Con el modelo obtenido y utilizando el programa STATGRAPHICS® PLUS 4.0 se graficó la superficie de respuesta (Gráfica 9) y su respectiva curva de nivel (Gráfica 10) de las variables independientes sobre la variable dependiente del proceso de fermentación.

La validación del modelo matemático (descrito en la ecuación 5) se realizó con base en el análisis de los estadísticos r, F, P y las gráficas de residuos.

En la validación experimental del modelo, se tomaron condiciones de trabajo de pH y concentración de glucosa al azar, directamente de las curvas de nivel. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 34. Estos experimentos se realizaron con volúmenes de reacción de 100 mL.

Figura 10. Metodología usada para la preparación del medio para la hidrólisis

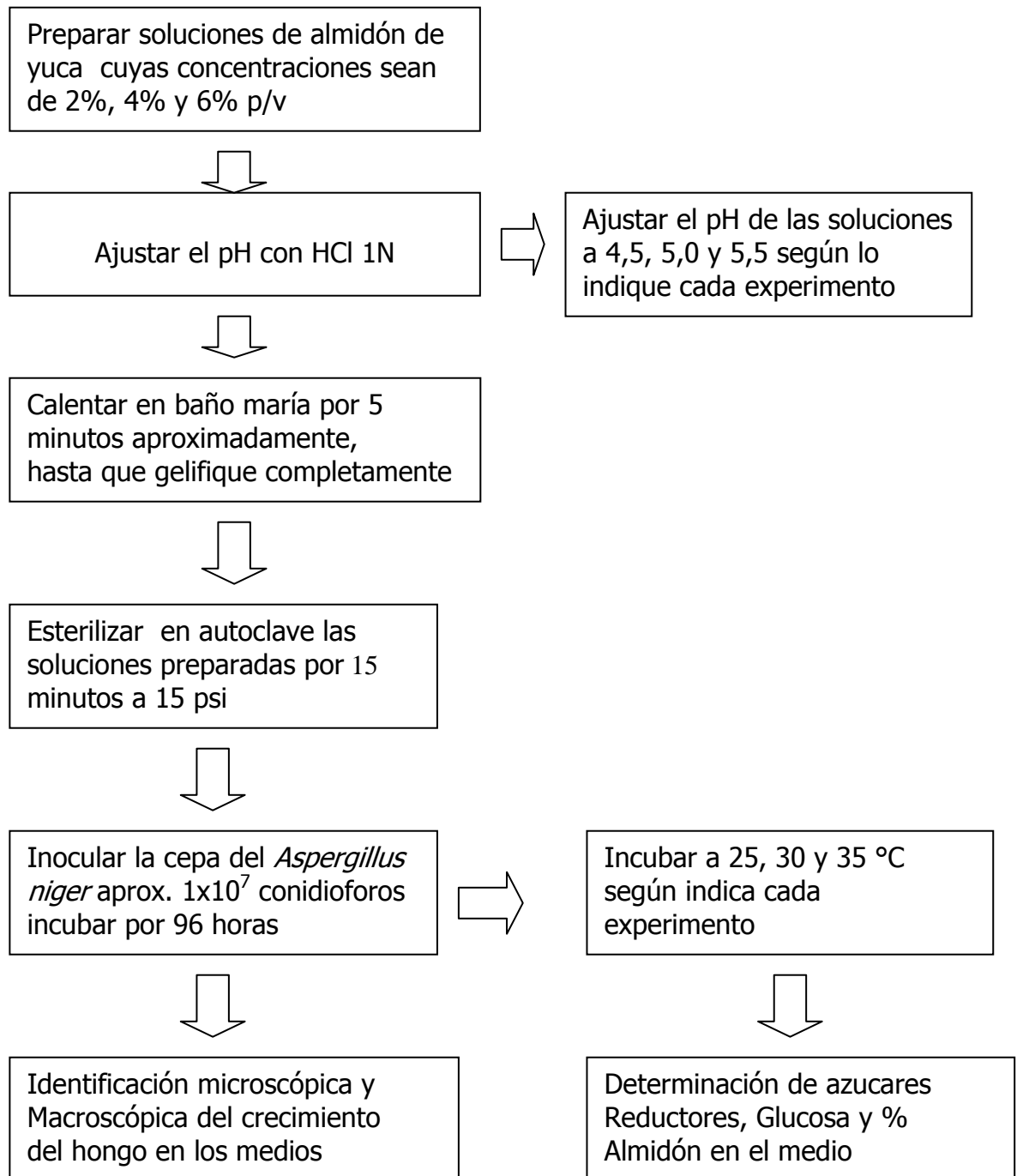
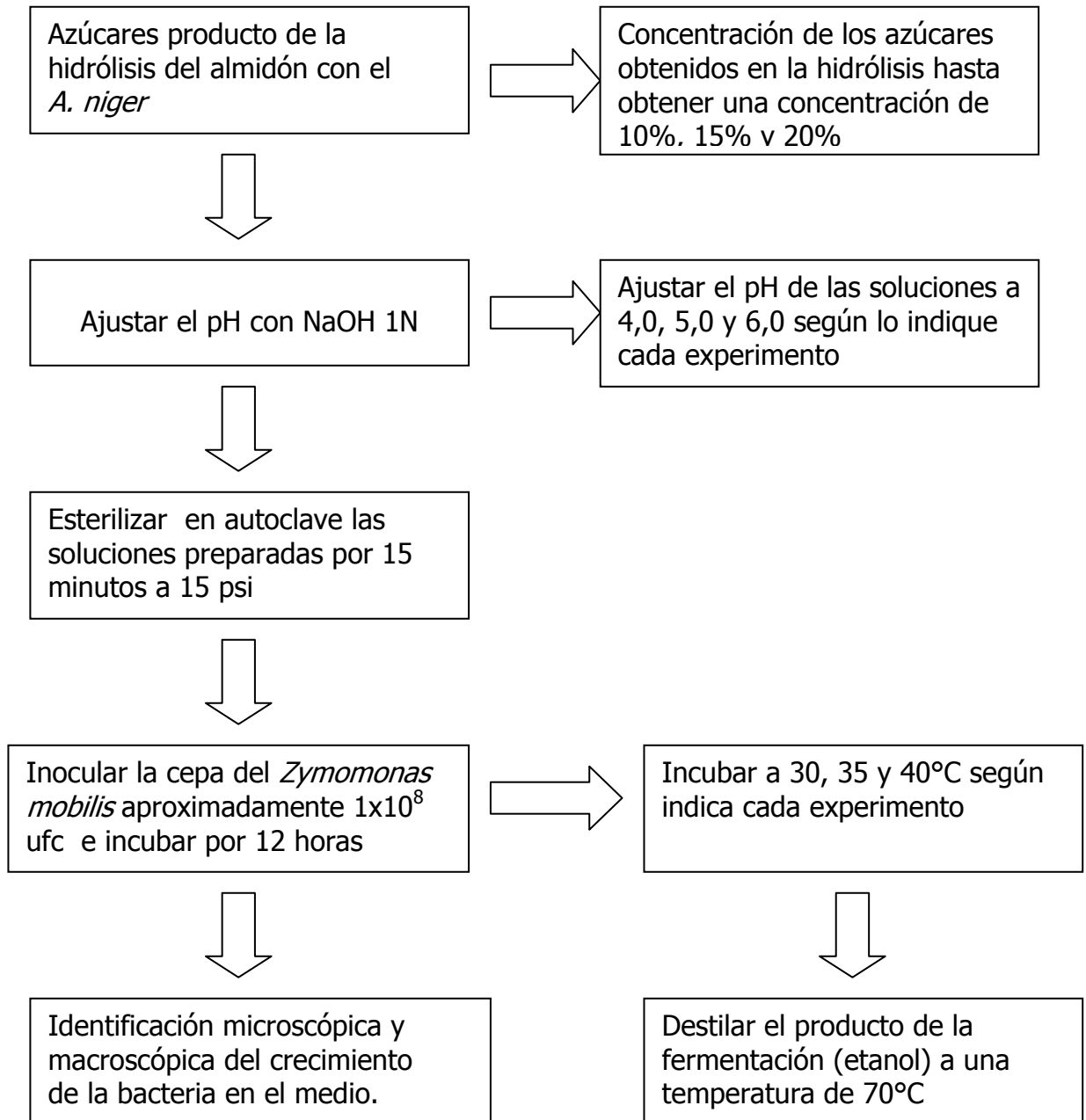


Figura 11. Metodología usada para la preparación del medio para la fermentación



3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

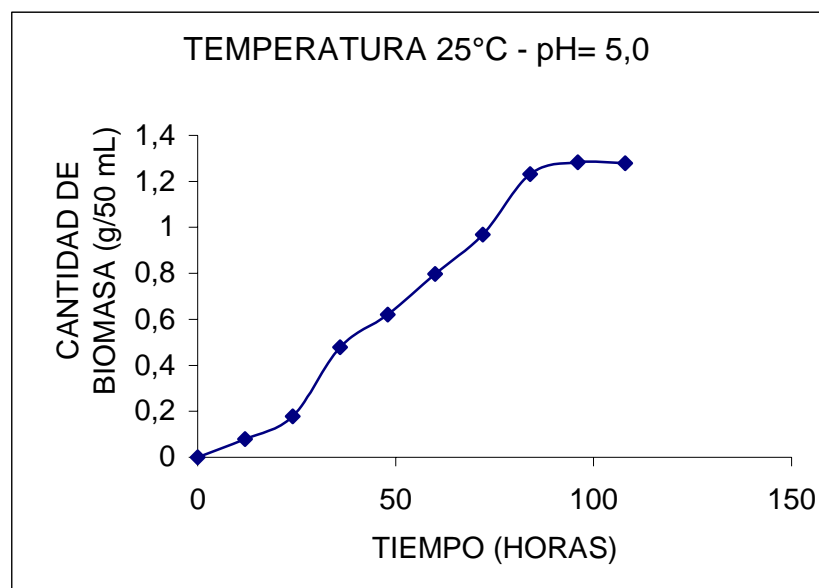
3.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE *Aspergillus niger*

Los resultados obtenidos para la curva de crecimiento del *Aspergillus niger* se presentan en la tabla 12 y su gráfica

Tabla 12 Datos obtenidos en la curva de crecimiento del *Aspergillus niger*

TIEMPO	CANT BIOMASA (g /50 mL)
0	0
12	0,079
24	0,178
36	0,479
48	0,621
60	0,798
72	0,968
84	1,232
96	1,283
108	1,279

Gráfica 1. Curva de crecimiento del *Aspergillus niger*



Por datos reportados en la literatura (LEON, 1997) la hidrólisis del almidón por el *Aspergillus niger* es de 96 horas, el cual es confirmado con la curva de crecimiento realizada.

Experimentalmente, el tiempo de hidrólisis del almidón se determinó cualitativamente por el método de coloración con lugol. Este método permite distinguir la reducción del grado de polimerización del almidón al reaccionar con el yodo, formándose dextrinas a medida que disminuye su peso molecular. Estas dextrinas son originadas por la hidrólisis enzimática del almidón y se pueden diferenciar de acuerdo a su coloración (azul – púrpura – pardo – sin color). Un factor que debe tenerse en cuenta en la hidrólisis es un tiempo de 12 horas de reposo después de inoculada la cepa para evitar el estrés, ya que esto reduce la actividad enzimática y por tanto la hidrólisis del almidón. (CHACON et al, 2002)

3.2 DATOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE EN LA HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN.

Los datos nos indican que a una temperatura de 25°C el *Aspergillus* se desarrolla más fácilmente, produciendo la enzima α -amilasa necesaria para la hidrólisis del almidón, y por lo tanto la conversión de almidón a glucosa .

Los datos obtenidos en la etapa de hidrólisis son reportados en la tabla 13.

Tabla 13. Datos obtenidos en la etapa de hidrólisis

T (°C)	PH	Concent Almidón (g/L)	Glucosa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)	Almidón (%)	Cantidad Biomasa (g)
25	4,5	2	3,65	3,94	0,31	0,306
25	4,5	4	38,30	40,40	0,14	1,326
25	4,5	6	36,85	39,12	1,09	1,308
25	5,0	2	11,70	13,22	0,18	0,341
25	5,0	4	12,20	13,43	0,46	0,475
25	5,0	6	47,65	51,12	1,22	1,415
25	5,5	2	19,35	22,42	0,10	0,844
25	5,5	4	36,85	44,21	1,39	1,332
25	5,5	6	38,05	40,92	0,92	1,361
30	4,5	2	0,32	0,46	0,52	0,167
30	4,5	4	1,15	2,31	2,18	0,233
30	4,5	6	22,15	23,68	1,48	0,937
30	5,0	2	1,21	2,41	0,48	0,297
30	5,0	4	9,63	10,68	0,34	0,315
30	5,0	6	18,45	21,20	1,86	0,799
30	5,5	2	2,03	4,05	0,26	0,549
30	5,5	4	8,89	9,38	0,78	0,321
30	5,5	6	13,35	14,34	1,87	0,422
35	4,5	2	0,41	0,53	0,42	0,175
35	4,5	4	12,70	14,17	0,31	0,327
35	4,5	6	23,11	25,73	1,36	0,957
35	5,0	2	0,99	1,75	0,56	0,27
35	5,0	4	1,82	3,41	1,78	0,311
35	5,0	6	24,00	25,73	1,19	0,76
35	5,5	2	0,46	0,96	0,56	0,205
35	5,5	4	24,85	26,93	0,18	0,679
35	5,5	6	30,65	32,95	0,78	0,978

3.3 MODELO MATEMÁTICO PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN

3.3.1 Diseño experimental 3³ para la etapa de hidrólisis

En la tabla 14 se reportan las condiciones y los datos obtenidos para la etapa de hidrólisis

Los datos reportados en la tabla 14, nos proporcionan un modelo matemático polinómico, que representa la relación entre la variable dependiente (% de conversión) y las variables independientes (T, pH, Conc Alm), obteniéndose la ecuación 3), el análisis de regresión múltiple (Tabla 15), y el análisis de varianza (tabla 16).

Modelo Obtenido:

$$\begin{aligned} \% \text{ CONVERSIÓN: } & 36.8903 + 31.9139*C - 118.81*T - 40.9684*T*pH - \\ & 42.3665*C*pH + 88.516*T^2 + 41.7998*pH^2 - 196.457*T^2*C*pH + \\ & 260.162*C^2*T*pH - 341.725*C^2*T*pH^2 + 331.667*C*T^2*pH^2 \end{aligned}$$

(Ecuación 3)

Al observar los coeficientes que acompañan a las variables en la ecuación 3, se observa que el coeficiente de mayor valor corresponde a la Temperatura (T) y que el rendimiento alcanza su máximo cuando está en el nivel más bajo (nivel 0) ya que el signo que le antecede es negativo. Teniendo en cuenta esto, se fijó el tratamiento de la muestra en este valor.

Tabla 14 Diseño experimental 3³ para la etapa de hidrólisis.

T (°C)	pH	Concentración almidón (%p/v)	% Conversión
0	0	0	16,44
0	0	0,5	86,26
0	0	1	55,33
0	0,5	0	52,70
0	0,5	0,5	27,48
0	0,5	1	71,55
0	1	0	87,16
0	1	0,5	83,00
0	1	1	57,13
0,5	0	0	1,42
0,5	0	0,5	2,58
0,5	0	1	33,26
0,5	0,5	0	5,45
0,5	0,5	0,5	21,68
0,5	0,5	1	27,70
0,5	1	0	9,14
0,5	1	0,5	20,01
0,5	1	1	20,05
1	0	0	1,85
1	0	0,5	28,60
1	0	1	34,69
1	0,5	0	4,44
1	0,5	0,5	4,09
1	0,5	1	36,04
1	1	0	2,07
1	1	0,5	55,97
1	1	1	46,02

Las tablas 15, 16 y 17 muestran el análisis de regresión múltiple, el análisis de varianza y el coeficiente Estadístico respectivamente, para el modelo descrito por la ecuación 3

Tabla 15. Análisis de regresión múltiple para la etapa de hidrólisis (Ecuación 3)

Parámetro	Valor Calculado	Error Standard	T	Valor - P
CONSTANTE	36,8903	5,03984	7,31974	0,0000
C	31,9139	6,86557	4,64839	0,0000
T	-118,81	18,3553	-6,41276	0,0000
T * pH	-40,9684	12,4844	-3,28158	0,0021
C * pH	-42,3665	12,3497	-3,43057	0,0013
T ²	88,516	17,227	5,1382	0,0000
PH ²	41,7998	8,35316	5,00406	0,0000
T ² * C * pH	-196,457	116,853	-1,68124	0,1000
C ² * T * pH	260,162	115,929	2,24415	0,0300
C ² * T * pH ²	-341,725	122,756	-2,78377	0,0080
C * T ² * pH ²	331,677	122,995	2,69668	0,0100

El estadístico P determina el grado de significancia de cada efecto de las variables independientes sobre el modelo, esto es un efecto con valor – P menor a 0,10 y 0,01 es significativo para niveles de confianza del 95% y del 99% respectivamente (ver tabla 15) y por lo tanto se debe incluir en el modelo

Tabla 16. Análisis de varianza para la ecuación 3

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	32593,6	10	3259,36	18,65
Residual	7516,52	43	174,803	
Total	40110,12	53	---	

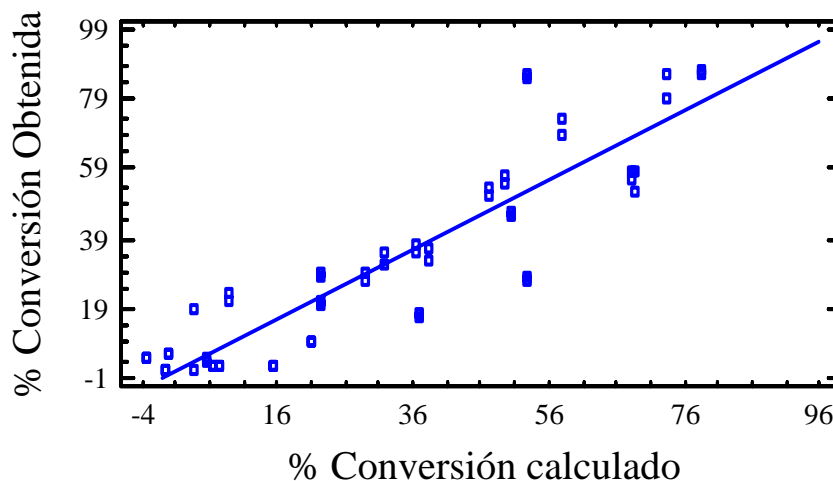
Tabla 17. Coeficiente Estadístico para el Modelo descrito

Valor F			Ecuación 3	
Valor F de Tablas (10/43)				
F (95%)	F (99,9%)	F (experimental)	R	Error
3,87	3,54	18,65	81,2603	13,2213

Al comparar los estadísticos F con grados de libertad de 10 y 43 (3,87 y 3,54 para un nivel de confianza de 95 y 99.9% respectivamente) reportados en la literatura (BOX, 1993) con el F obtenido para el modelo, se observa que el F del modelo es mayor y por lo tanto el modelo matemático es significativo al nivel de confianza del 99,9%.

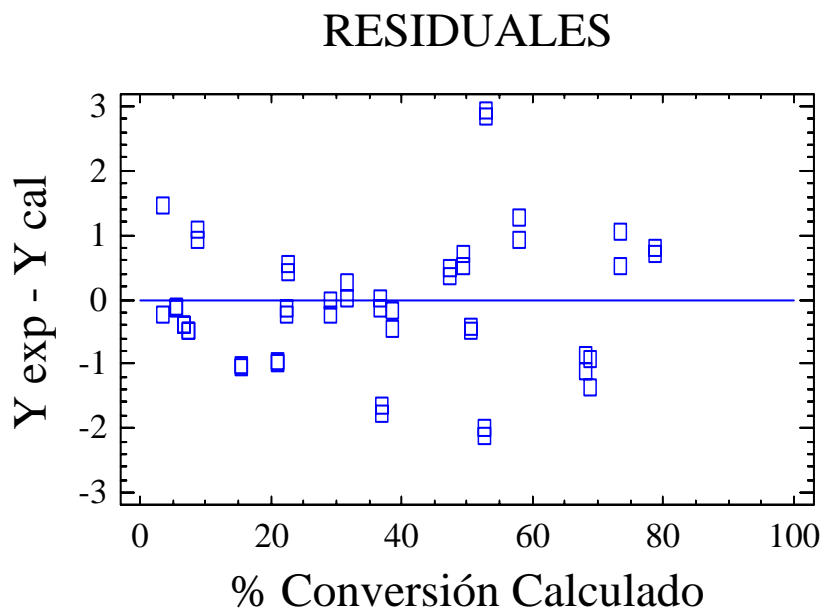
3.3.1.1 Gráficas de % conversión calculado vs. % conversión experimental Con el fin de evaluar la ecuación obtenida, se graficó el % conversión calculado vs % conversión experimental y se calculó el coeficiente de correlación para esta etapa. El coeficiente de correlación (R) del modelo matemático indica la correlación del porcentaje de rendimiento experimental frente al porcentaje de rendimiento calculado por el modelo matemático. En este caso el coeficiente de correlación es de 81,26 (Gráfica 2)

Gráfica 2. % conversión obtenido Vs. % conversión calculado para la etapa de hidrólisis



3.3.1.2 Gráfica Residual. Los residuales nos indican la relación entre las variables independientes (pH, T y C. Alm) con la variable dependiente (% conversión a glucosa). La gráfica 3 muestra que los residuos para el modelo matemático (ecuación 3) no están relacionado con el nivel de la variable dependiente, esto se deduce porque no se presenta una tendencia sistemática

Grafica 3. Residuales etapa de hidrólisis



3.3.2 Diseño de superficie de Respuesta

Las condiciones y el resultado obtenido para el diseño de superficie se muestra en la tabla 18, con estos datos y utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4,0 se obtuvo el modelo matemático descrito por la ecuación 4.

Tabla 18 Condiciones y resultados obtenidos para el diseño de superficie.

pH	CONC ALMIDÓN (%p/v)	% CONVERSIÓN
0.5	-0.207107	49,2
0.5	0.5	27,475
1.0	0.0	87,165
1.0	1.0	57,135
0.5	1,20711	61,07
1,20711	0.5	66,98
0.0	1.0	55,33
-0.207107	0.5	70,74
0.5	0.5	27,475
0.0	0.0	16,445

Con este modelo empírico, se obtuvieron las graficas 4, 5, 6 y 7 que corresponden al % conversión calculado vs. % conversión obtenido, la de residuales, la gráfica de la superficie de respuesta y las curvas de nivel respectivamente.

$$\% \text{ CONVERSIÓN} = 18.5176 + 74.7004 * C - 229.042 * C * \text{pH} - 33.0923 * C^2 + 72.2004 * \text{pH}^2 + 158.647 * C^2 * \text{pH}$$

(Ecuación 4)

Las tablas 19, 20 y 21 muestran el análisis de regresión múltiple, el análisis de varianza y los coeficientes estadísticos para el modelo descrito por la ecuación 4 respectivamente.

Tabla 19. Análisis de regresión múltiple para la ecuación 4

Parámetro	Valor Calculado	Error Standard	T	Valor - P
CONSTANTE	18,3377	2,24785	8,15788	0,0000
C	74,6037	10,0527	7,42128	0,0000
C * pH	-229,885	17,8728	-12,8623	0,0000
C ²	-32,8464	10,0281	-3,27543	0,0055
pH ²	72,4813	3,71521	19,5093	0,0000
C ² * pH	159,208	17,7621	8,96336	0,0000

Tabla 20. Análisis de Varianza para la Ecuación 4

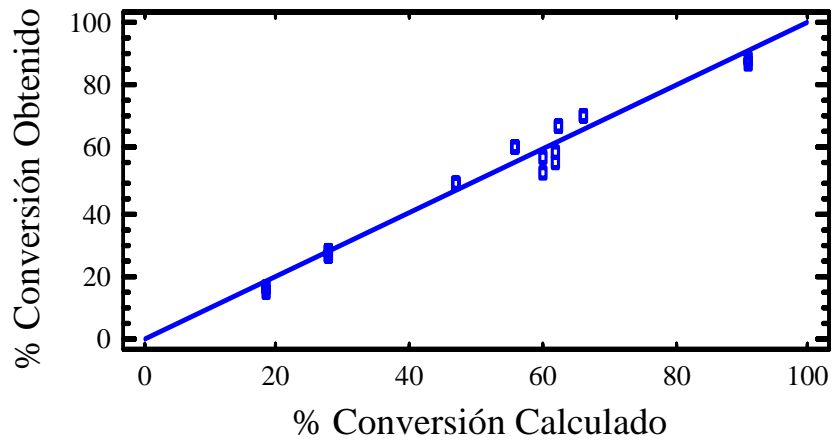
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	8537,09	5	1707,42	
Residual	298,514	14	21,3224	80,08
Total	8835,61	19		

Tabla 21. Coeficiente Estadístico para el Modelo descrito

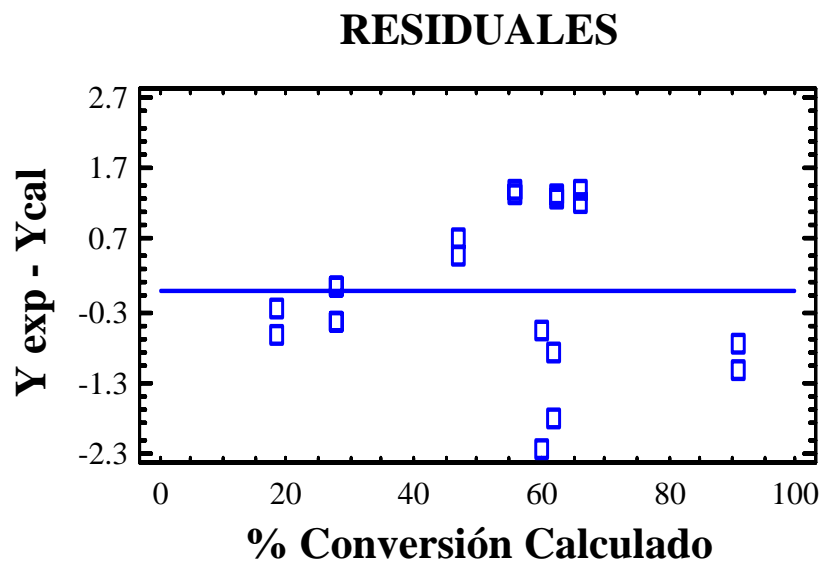
Valor F			Ecuación 4	
Valor F de Tablas (5/14)		F (experimental)	R	Error
F (95%)	F (99,9%)			
2,96	7,92	80,08	96,62	4,61

El coeficiente de correlación R del modelo indica que el porcentaje de conversión experimental está altamente correlacionado con el porcentaje de conversión expresado por el modelo.

Gráfica 4. % conversión obtenido vs. % conversión calculado para la etapa de hidrólisis

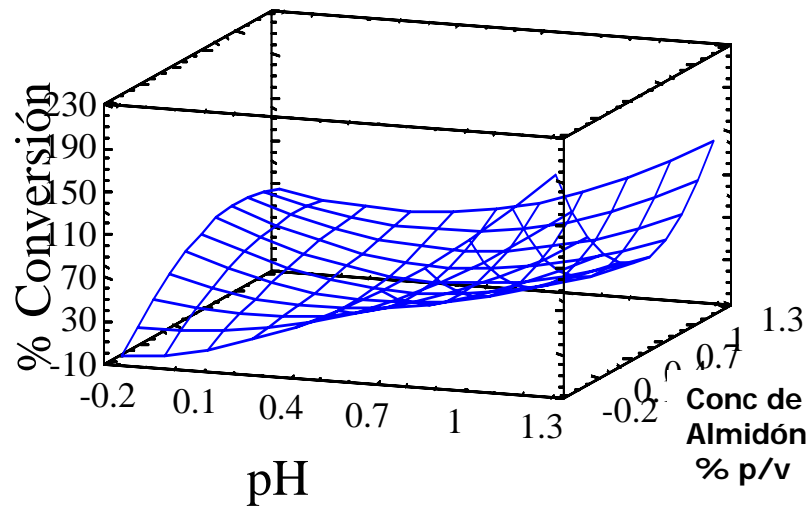


Gráfica 5. Residuales etapa de hidrólisis.

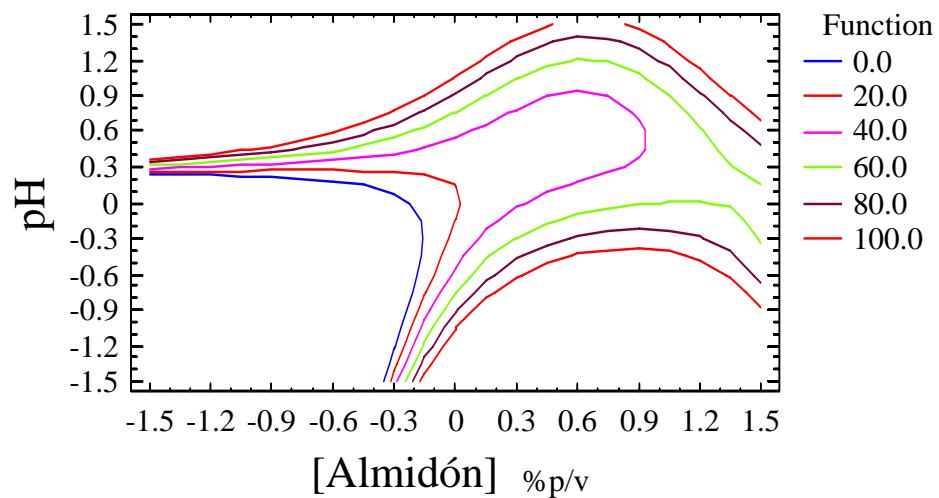


A continuación se muestra la superficie de respuesta obtenida y su contorno de superficie de respuesta.

Gráfica 6. Superficie de respuesta obtenida para la etapa de hidrólisis.



Gráfica 7. Contorno de superficie de respuesta para la etapa de hidrólisis



En la gráfica 6 se identifican las condiciones para una máxima conversión del almidón de yuca.

La curva de nivel de la gráfica 7 nos permite obtener por interpolación las condiciones de trabajo para las variables independientes en las cuales se obtiene un alto porcentaje de conversión.

Tabla 22. Validación del modelo descrito por la ecuación 4

Condiciones		% Conversión		% Error
pH	Conc. Almidón	Experimental	Calculado	
4,07	3,99	96,3	99,71	4,0
4,42	4,61	92,6	99,04	6,5
4,52	4,94	95,2	98,71	3,5
6,1	4,14	91,8	98,49	8,1

La validación de los modelos descritos por la ecuación 4 se realizó con volúmenes de reacción de 100 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Los datos de validación del modelo matemático, no sobrepasan un porcentaje de error del 10% (ver tabla 22), lo que indica que el modelo representa la influencia de las variables pH y T sobre el % de conversión de almidón a glucosa.

Por inspección directa de las líneas de nivel de la gráfica 7, se observa que para tener altos porcentajes de conversión (>95%) para el proceso de hidrólisis del almidón, se necesitan condiciones de pH en los intervalos desde 4,0 hasta 4,55 y desde 5,9 hasta 6,2 y de concentración de almidón en los intervalos desde 3,9 p/v hasta 4,15 %p/v y desde 4,60 %p/v hasta 5% p/v.

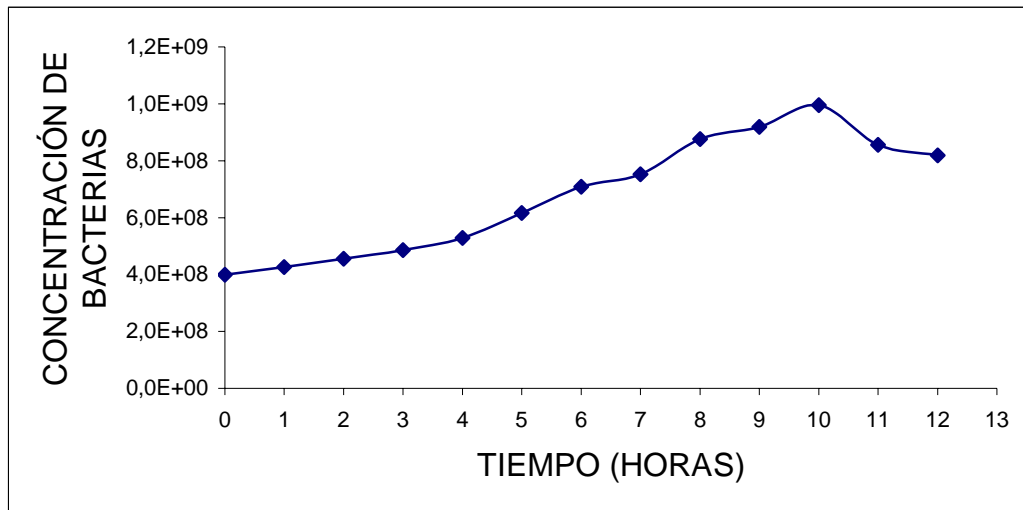
3.4 CURVA DE CRECIMIENTO DE *Zymomonas mobilis*

Por datos reportados en la literatura, la fermentación de la glucosa por la *Zymomonas mobilis* es de 10-12 horas. Experimentalmente, se comprobó que el tiempo de estabilización de la bacteria es de 10 horas. Los datos de la curva de crecimiento del *Aspergillus niger* se presentan en la tabla 24 y su respectiva gráfica

Tabla 23. Datos obtenidos en la curva de crecimiento de *Zymomonas mobilis*

Tiempo (horas)	Concentración de Bacterias
0	3,99E+08
1	4,26E+08
2	4,56E+08
3	4,86E+08
4	5,29E+08
5	6,16E+08
6	7,09E+08
7	7,52E+08
8	8,76E+08
9	9,19E+08
10	9,95E+08
11	8,56E+08
12	8,19E+08

Gráfica 8. Curva de crecimiento de *Zymomonas mobilis*



3.4.1 Pruebas Bioquímicas

El objetivo de estas pruebas bioquímicas fue de comprobar las características fenotípicas de la *Zymomonas mobilis*.

En la tabla 24 se observan los resultados obtenidos, dando pruebas negativas y positivas confirmando así, su identidad.

Tabla 24. Pruebas Bioquímicas hechas a la *Zymomonas mobilis*

Prueba	TSI	LIA	CIT	UREA	NIT	RM	VP	MAL	MOT	PPA	CAT	OXID
Positiva	X				X	X					X	
Negativa		X	X	X			X	X	Débil	X		X

Donde:

TSI: Triple azúcar: Lactosa, glucosa, sacarosa con producción de gas.

LIA: Lisina descarboxilasa

CIT: Citrato, consiste en un cambio de pH

UREA: Urea

NIT: Nitratos no reduce nitratos a nitritos

RM: Rojo de metilo

VP: Voger Proscawer (producción de Acetil metil carbinol)

MAL: Malonato consiste en un cambio de pH

MOT: Movilidad

PPA: fenil alanina

CAT: Catalasa

OXI: Oxidasa

3.5 DATOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA

Los datos obtenidos en la etapa de fermentación con la *Zymomonas mobilis* se encuentran registrados en la tabla 25.

Después de una destilación a una temperatura de 75-80°C obteniéndose altas concentraciones de etanol.

Tabla 25. Datos obtenidos en la etapa de fermentación

T (°C)	pH	C. GLUCOSA INICIAL (g/L)	C. GLUCOSA FINAL (g/L)	DENSIDAD (g/mL)	% ETANOL
30	4,0	100	32,6	0,8077	95,39
30	5,0	100	26,1	0,8078	95,36
30	6,0	100	30,4	0,8099	95,16
30	4,0	150	50,1	0,8091	95,03
30	5,0	150	45,8	0,8110	94,53
30	6,0	150	48,3	0,8101	94,77
30	4,0	200	81,2	0,8111	94,51
30	5,0	200	73,2	0,8115	94,4
30	6,0	200	79,6	0,8117	94,35
34	4,0	100	29,7	0,8061	95,79
34	5,0	100	23,4	0,8071	95,54
34	6,0	100	27,1	0,8080	95,31
34	4,0	150	49,3	0,8080	95,31
34	5,0	150	41,3	0,8101	94,77
34	6,0	150	45,9	0,8079	95,19
34	4,0	200	77,8	0,8000	96,26
34	5,0	200	70,2	0,8040	96,31
34	6,0	200	74,3	0,8011	97,01
38	4,0	100	24,6	0,8022	96,74
38	5,0	100	21,8	0,8040	96,31
38	6,0	100	22,4	0,8021	96,77
38	4,0	150	43,5	0,7999	97,29
38	5,0	150	36,1	0,8045	96,19
38	6,0	150	38,9	0,8067	95,64
38	4,0	200	75,8	0,7970	97,95
38	5,0	200	64,3	0,7979	97,75
38	6,0	200	67,2	0,7998	97,31

3.6 MODELO MATEMÁTICO PARA EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA

3.6.1 Diseño experimental 3^3 para la etapa de fermentación. En la tabla 26 se reportan las condiciones y los datos obtenidos para la etapa de fermentación

Tabla 26. Diseño experimental 3^3 para la etapa de fermentación

T	pH	C GLUCOSA	% RENDIMIENTO
0.5	1	0	45,075
0	1	1	30,05
0	0.5	1	39,42
0.5	0	0	51,69
1	0	0	59,015
0	0.5	0	42,295
0.5	0	1	51,965
0	1	0	34,39
1	0	0.5	62,785
0.5	0.5	0.5	59,065
1	1	0.5	52,560
1	0.5	0.5	70,220
0.5	0	0.5	52,665
1	1	1	53,050
0	0	0.5	39,450
0.5	0.5	0	57,31
1	0.5	1	61,805
0.5	1	0.5	46,465
0.5	0.5	1	54,055
0	0.5	0.5	40,895
0.5	1	1	44,220
0	0	1	35,010
1	0.5	0	62,270
0	1	0.5	29,945
0	0	0	37,48
1	0	1	57,84
1	1	0	52,505

Con los datos de la tabla 26 se obtuvo un modelo matemático polinómico que representa la relación entre la variable dependiente (% de rendimiento) y las variables independientes (T, pH, C Glucosa) obteniéndose el modelo (Ecuación 5), el análisis de regresión múltiple (Tabla 27), y el análisis de varianza (tabla 28).

Modelo Obtenido:

% RENDIMIENTO: $36.4548 + 10.48447 * C + 37.8877 * T + 27.0975 * \text{pH} - 52.8909 * T * \text{pH} - 9.25069 * C * \text{pH} - 14.6347 * T^2 - 30.7068 * \text{pH}^2 - 11.4836 * C^2 + 4.76281 * C^2 * \text{pH} - 4.56115 * T * \text{pH}^2 + 6.80748 * T * \text{pH}^2 * C$
(Ecuación 5)

Al observar los coeficientes que acompañan a las variables en la ecuación 5, se observa que el coeficiente de mayor valor corresponde a la Temperatura (T) y que el rendimiento alcanza su máximo cuando está en el nivel más alto (nivel 1) ya que el signo que le antecede es positivo. Teniendo en cuenta esto, se fijó el tratamiento de la muestra en este valor.

Las tablas 27 y 28 muestran el análisis de regresión múltiple y el análisis de varianza respectivamente, para el modelo descrito por la ecuación 5.

El estadístico P determina el grado de significancia de cada efecto de las variables independientes sobre el modelo, esto es un efecto con valor – P menor a 0.10 y 0.01 es significativo para niveles de confianza del 90% y del 99% respectivamente (ver tabla 27) y por lo tanto se debe incluir en el modelo

Tabla 27. Análisis de regresión múltiple para la etapa de fermentación (Ecuación 5)

Parámetro	Valor	Error	T	Valor - P
	Calculado	Standard		
CONSTANTE	36,4548	0,718312	50,7506	0,0000
C	10,4844	2,16639	4,83955	0,0000
T	37,8877	1,99315	19,0089	0,0000
pH	27,0975	2,15726	12,5611	0,0000
C * pH	-9,25069	2,05842	-4,49408	0,0001
T ²	-14,6347	1,8528	-7,8987	0,0000
PH ²	-30,7068	1,97668	-15,5345	0,0000
C ²	-11,4836	1,9587	-5,86287	0,0000
C ² * pH	4,76281	0,363163	13,1148	0,0000
T * pH ²	-4,56115	1,64151	-2,77864	0,0081
C * T * pH ²	6,80748	2,26053	3,01146	0,0043

Tabla 28. Análisis de varianza para la ecuación 5

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	5962,35	10	596,235	234,69
Residual	109,244	43	2,54056	
Total	6071,59	53		

Tabla 29. Coeficiente Estadístico para el Modelo descrito

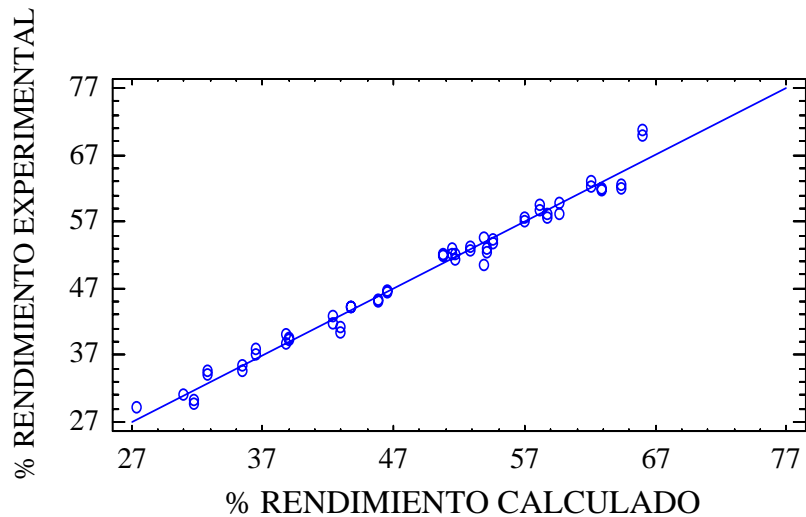
Valor F			Ecuación 3	
Valor F de Tablas (10/43)				
F (95%)	F (99.9%)	F (experimental)	R	Error
2,08	3,64	234,69	98,2007	1,59

Al comparar los estadísticos F (Tabla 29) con grados de libertad de 10 y 43 (2,08 y 3,64 para un nivel de confianza de 95 y 99,9% respectivamente) reportados en la literatura (BOX,1993) con el F obtenido para el modelo, se observa que el F del modelo es mayor y por lo tanto el modelo matemático es significativo al nivel de confianza del 99,9%.

3.6.1.2 Gráficas de % conversión calculado vs. % conversión experimental:

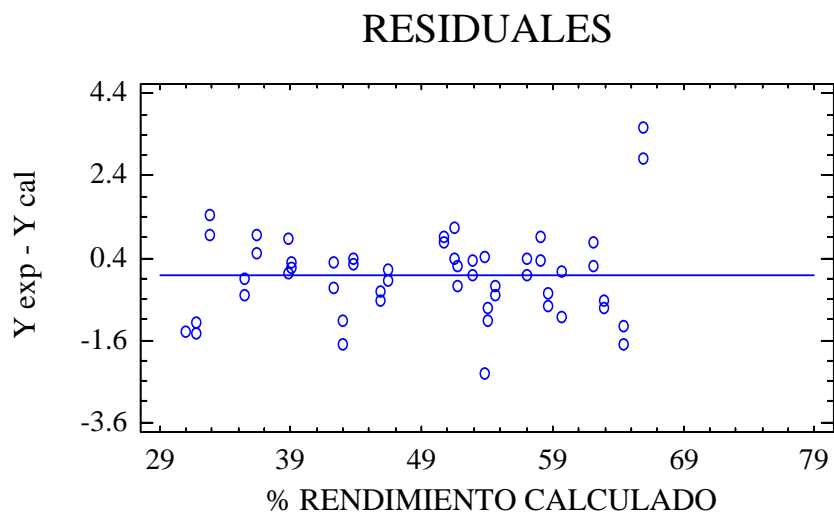
Con el fin de evaluar la ecuación obtenida, se graficó el rendimiento calculado vs. experimental y se calculó el coeficiente de correlación para esta etapa. El coeficiente de correlación (R^2) del modelo matemático indica la correlación del porcentaje de rendimiento experimental frente al porcentaje de rendimiento calculado por el modelo matemático. En este caso el coeficiente de correlación es de 98,2007 dándole una confiabilidad a los experimentos del 99%. Ver gráfica 9

Gráfica 9. % conversión obtenido vs. % conversión calculado para la etapa de fermentación



3.6.1.3 Gráfica Residual. Los residuales nos indican la relación entre las variables independientes (pH, T y C. glucosa) con la variable dependiente (% rendimiento de etanol). La gráfica 10 muestra que los residuos para el modelo matemático (ecuación 6) no están relacionado con el nivel de la variable dependiente, esto se deduce porque no se presenta una tendencia sistemática, es decir los datos están dispersos.

Grafica 10. Residuales etapa de fermentación



3.6.2 Diseño de superficie de respuesta

Las condiciones y el resultado obtenido para el diseño de superficie se muestra en la tabla 30. con estos datos y utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0, se obtuvo el modelo matemático descrito por la ecuación 4.

Tabla 30 Condiciones y resultados obtenidos para el diseño de superficie para la fermentación

pH	CONC GLUCOSA (g/L)	% RENDIMIENTO
0,5	-0,207107	49,2
0,5	0.5	27,475
1	0	87,165
1	1	57,135
0.5	1,20711	61,07
1,20711	0.5	66,98
0	1	55,33
-0,207107	0,5	70,74
0.5	0,5	27,475
0	0	16,445

Con este modelo empírico, se obtuvieron las graficas 11, 12, 13 y 14 que corresponden al % rendimiento calculado vs. % rendimiento obtenido, la de residuales, la gráfica de la superficie de respuesta y las curvas de nivel respectivamente.

$$\% \text{ RENDIMIENTO} = 16.445 + 11.9334 \cdot \text{pH} + 93.3225 \cdot C - 336.395 \cdot \text{pH} \cdot C - 54.4375 \cdot C^2 + 283.343 \cdot C^2 \cdot \text{pH} + 58.7866 \cdot \text{pH}^2 + 111.795 \cdot \text{pH}^2 \cdot C - 127.657 \cdot \text{pH} \cdot C^2$$

(ECUACIÓN 6)

Las tablas 31, 32 y 33 muestran el análisis de regresión múltiple, el análisis de varianza y los coeficientes estadísticos para el modelo descrito por la ecuación 6 respectivamente.

Tabla 31. Análisis de regresión múltiple para la etapa de Fermentación

Parámetro	Valor Calculado	Error Standard	T	Valor - P
CONSTANTE	16,445	1,00291	16,3973	0,0000
pH	119,9334	4,25499	2,80456	0,0171
C	93,3225	4,25499	21,9585	0,0000
PH*C	-336,395	14,0407	-23,9585	0,0000
C ²	-54,4375	4,01164	-13,5699	0,0000
C ² *pH	283,343	12,6859	22,3353	0,0000
pH ²	58,7866	4,01164	14,654	0,0000
pH ² *C	111,795	12,6859	8,8125	0,0000
pH ² *C ²	-127,657	11,3466	-11,2507	0,0000

Tabla 32. Análisis de varianza para la ecuación 6

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	8813,48	8	1101,68	
Residual	22,1283	11	2,01166	547,65
Total	8835,61			

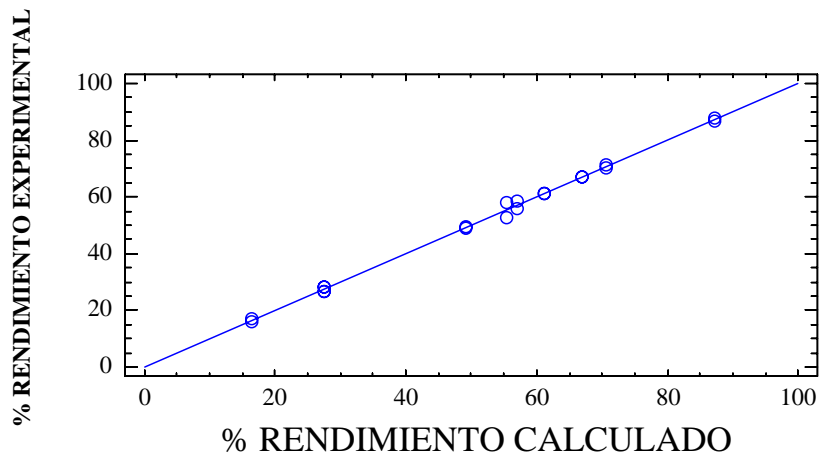
Tabla 33. Coeficiente Estadístico para el Modelo descrito

Valor F			Ecuación 3	
Valor F de Tablas (8/11)				
F (95%)	F (99,9%)	F (experimental)	R	Error
2,90	8,35	547,65	99,74	1,41

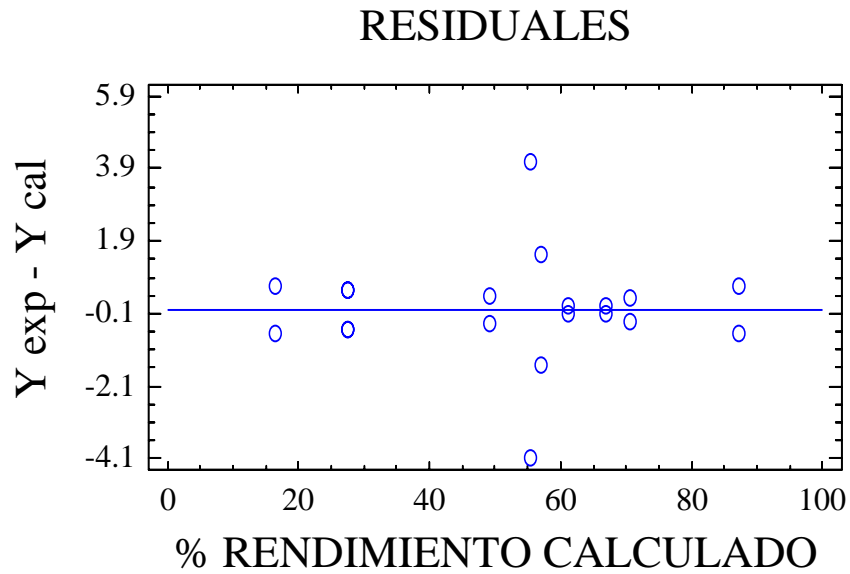
Al comparar los estadísticos F (Tabla 33) con grados de libertad de 8 y 11 (2,90 y 8,35 para un nivel de confianza de 95 y 99,9% respectivamente) reportados en la literatura (BOX, 1993) con el F obtenido para el modelo, se observa que el F del modelo es mayor y por lo tanto el modelo matemático es significativo al nivel de confianza del 99,9%.

El coeficiente de correlación R del modelo indica que el porcentaje de conversión experimental está altamente correlacionado con el porcentaje de conversión expresado por el modelo.

Gráfica 11. % rendimiento obtenido vs. % rendimiento calculado para el diseño de superficie de la etapa de fermentación.

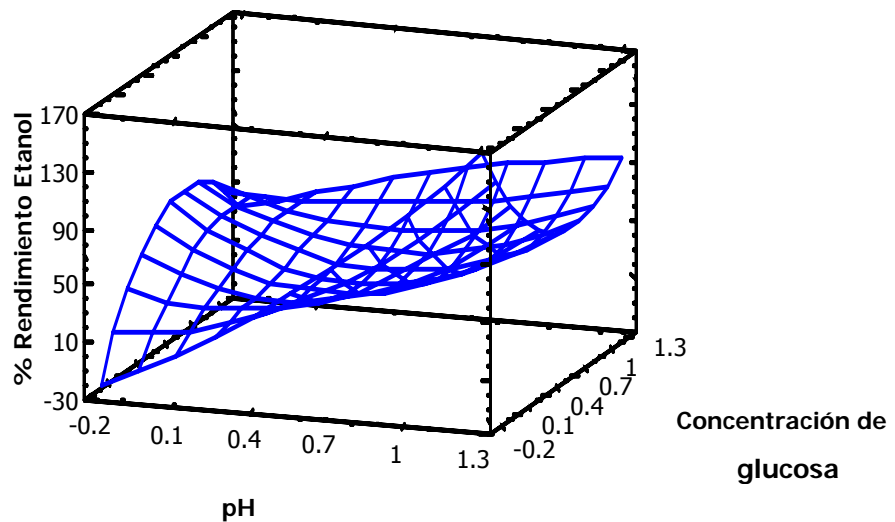


Gráfica 12. Residuales de la superficie de respuesta de la etapa de fermentación

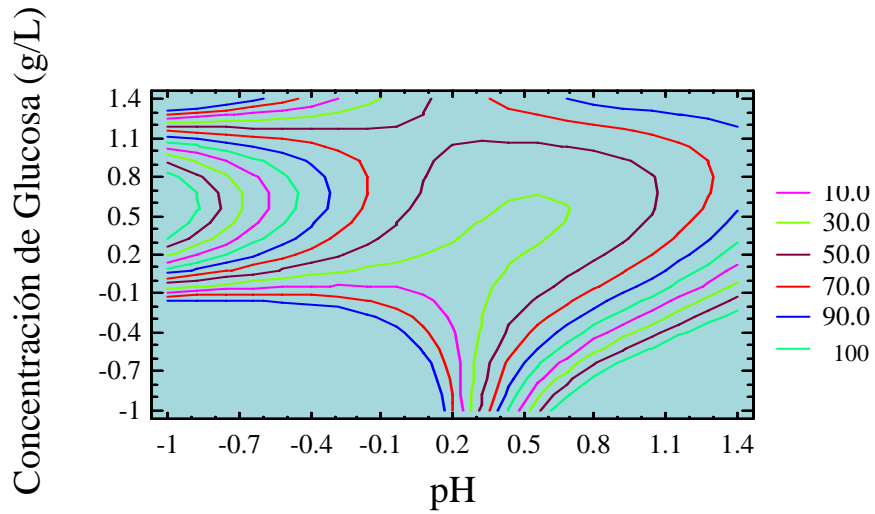


A continuación se muestra la superficie de respuesta obtenida y su contorno de superficie de respuesta de la etapa de fermentación.

Gráfica 13. Superficie de respuesta obtenida para la etapa de fermentación



Gráfica 14 Contorno de superficie de respuesta para la etapa de fermentación.



La validación de los modelos descritos por la ecuación 6 se realizó con volúmenes de reacción de 100 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 34

Tabla 34. Validación del modelo descrito por la ecuación 6

Condiciones		% Conversión		Error
pH	Conc. Glucosa	Experimental	Calculado	
4,53	170,34	91,4	99,71	5,3
5,89	141,37	93,8	99,04	5,2
4,49	196,55	94,2	98,71	4,5
5,75	135,17	95,6	98,49	2,9

Los datos de validación del modelo matemático, no sobrepasan un porcentaje de error del 10% (ver tabla 34), lo que indica que el modelo representa la influencia de las variables pH y T sobre el % de rendimiento de etanol.

Por inspección directa de las líneas de nivel de la gráfica 14, se observa que para tener altos porcentajes de rendimiento (>95%) para el proceso de fermentación, se necesitan condiciones de pH en los intervalos desde 4,50 hasta 4,55 y desde 5,75 hasta 5,9 y de concentración de glucosa en los intervalos desde 135 g/L hasta 141g/L y desde 170 g/L hasta 197 g/L.

CONCLUSIONES

1. En la hidrólisis del almidón de yuca variedad chile con *Aspergillus niger* se encontró una conversión máxima del 87.16% a las condiciones siguientes: % de Almidón de 2g/100mL, pH 5,5 y a una temperatura de 25°C.
2. El uso del diseño experimental 3^3 en la etapa de hidrólisis, permitió establecer el efecto de cada una de las tres variables independientes (T, pH y C. Almidón) para compararlas entre sí, y mediante el uso de parámetros estadísticos ver el grado de influencia en el proceso de hidrólisis del almidón de las variables pH y C. Almidón.
3. Los datos obtenidos en la validación del modelo de hidrólisis descrito por la ecuación 4, no sobrepasa un porcentaje de error del 10%, lo que indica que cada uno de los modelos representa la influencia de las variables pH y C Almidón sobre el % de conversión de almidón a glucosa.
4. Las cepas aisladas de *Zymomonas mobilis* demostraron ser competitivas para la producción de etanol a nivel industrial.
5. En la fermentación de los azúcares reductores por *Zymomonas mobilis* los mejores resultados se obtuvieron a las condiciones de pH 5.0, concentración de azúcares reductores de 150 g/L y temperatura de 38°C con un rendimiento del 70,22%.

6. El uso del diseño experimental 3^3 en la etapa de fermentación, permitió establecer el efecto de cada una de las tres variables independientes (T, pH y Conc. glucosa) para compararlas entre sí, y mediante el uso de parámetros estadísticos ver el grado de influencia en el proceso de fermentación de las variables pH y Conc. glucosa.

7. Los datos obtenidos en la validación del modelo de fermentación descrito por la ecuación 6, no sobrepasa un porcentaje de error del 10%, lo que indica que cada uno de los modelos representa la influencia de las variables pH y C Glucosa sobre el % de Rendimiento de etanol.

7. El ajuste del pH de los medios de cultivo mediante buffers es un factor importante, debido a la formación de ácidos como: Ácido cítrico, málico, glucónico, succínico, fumárico y oxálico, durante el proceso.

RECOMENDACIONES

1. El mejoramiento de las cepas de *Aspergillus niger* y *Zymomonas mobilis* usando genética molecular, es un factor importante que permite mejorar tanto los porcentajes de conversión de glucosa como los del rendimiento de etanol.
2. Efectuar una investigación para implementar un proceso continuo de conversión del almidón en etanol con el uso de los microorganismos empleados en este estudio.
3. Realizar un estudio a nivel de planta piloto, donde se evalúe la hidrólisis, fermentación y posterior destilación con microondas para obtener mayores porcentajes de rendimiento de etanol y así llevar a cabo el proceso a escala industrial.
4. Estudiar y optimizar las variables de los procesos de hidrólisis y fermentación demostradas experimentalmente en el laboratorio, para llevarlas a escala industrial.
5. Evaluar económicamente el proceso, teniendo en cuenta la producción por hectárea de yuca, el tiempo de cosecha, el % de almidón obtenido de esta variedad

BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists.
Sidney William. 1984

BREKELBAUM, F., TORO, J., IZQUIERDO, V. Primer simposio colombiano sobre alcohol carburante. Memorias. CIAT. Cali, mayo 1980

BOX, G., HUNTER, W., HUNTER, Y. Estadística para investigadores, Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. REVERTE: Barcelona. 1993 p. 317-429

BUITRAGO, Julián. La yuca en la alimentación animal. CIAT. 1990 pg. 14,25-26,251-257

CABANZO, C., LUNA, T. Estudio del proceso de extracción de almidón de yuca de tres variedades (Amarga, Armenia y Chile) y evaluación de la remoción del cianuro en el residuo líquido obtenido en la sedimentación del almidón. Tesis. Colombia. Universidad Industrial de Santander. 2002

CHACON Z, SARMIENTO S. Producción biotecnológica de amilasa a partir de *Aspergillus niger*. Tesis. Colombia: Universidad Industrial de Santander. 2002

Corporación Colombiana Internacional. BOLETÍN cci. Perfil del producto No.6 Oct-Dic 1999. <http://www.cciorg.co/publicaciones/perfil/>.

DOMÍNGUEZ M, Carlos E. YUCA: Investigación, producción y utilización. PNUD CIAT. Palmira, Valle. 1996. p. 29-31, 93, 317

FERMEMA, O., Química de los alimentos. 2^{da} ed. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España 2000. P. 228 – 240.

FRAZIER, W. y WESTHOFF D. Microbiología de los alimentos. Zaragoza. España: Acribia S.A. 1993. p. 431-438

GARCIA G, QUINTERO R. Biotecnología alimentaria. México: Limusa – Noriega editores. 1998 p. 617-633

HART LF, FISHER H.J. Análisis moderno de los alimentos. Ed. Acribia: España. 1991. 2 Edición p.238

JORGENSEN, Alfred. Microbiología de las fermentaciones industriales. Ed. Acribia. Zaragoza. 1989 p.376-399

KARSCH T., ESSER, K. Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, advantages an disadvantages. Journal of Applied Microbiology an Biotechnology. 1983 . Vln 83 , p. 387-391

KIRK, Raimond y OTHMER, Donald. Enciclopedia de técnica química. Tomo VII. Editorial Hispanoamericana. 1985

KLICH, M., PITT, J. A laboratory guide to the common aspergillus species and their teleomorphs. Australia . 1988 p. 5-30

KONEMAN, Elmer D. Diagnóstico microbiológico. Ed. Medica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1983 p. 123-144

LEON T. Amleto. Diseño y puesta en marcha de un sistema semicontinuo en dos etapas "Hidrólisis – Fermentación" para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Universidad Industrial de Santander. 1997

LEVEAU J.,BOUIX,M. Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. España. Ed. Acribia S.A. 2000. p.531-564

LINDEN, G., Lorient D. Bioquímica agroindustrial: Revalorización Alimentaria de la Producción Agrícola. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España 1996. P. 297 – 298.

MONTALDO, A. La yuca frente al hambre del mundo tropical. Maracay, Venezuela: Anaco ediciones. Universidad Central de Venezuela. 1996. p. 301,309,315,316.

MORRISÓN, ROBERT T., Boyd Robert N., Química orgánica. 5^{ta} ed. Addison-Wesley Iberoamericana. USA, 1996. P. 1258 – 1259, 1284, 1357

NAKAMURA, Shoichiro. Análisis numérico y visualización gráfica con MATLAB. Traducción de GARCIA, Roberto E. Prentice – may Hispanoamericana: México. 1997 p. 476

NAVARRO S. Alfredo. Industria agroquímica para sustituir importaciones de gasolina con alcohol etílico. Universidad Nacional de Colombia. 1995 p.79,80,81,82,83

SAMSON, R., HOPKSTRA, E. Introduction to food-borne fungi. Editorial Ponsen & Loogen. 4 edición Netherlands. 1995 p. 64

STAINER, R. , INGRAHAM, J., WHEELIS, M. Microbiología. Barcelona: Reverté. 2 edición. 1989 p.723-724

VELEZ ARANGO, Herta. Curso avanzado de hongos oportunistas. Universidad de Antioquia. Medellín . 1989 p. 4-8

VILLA LONDOÑO, J. A. El cultivo de la Yuca. Politécnico Colombiano. Medellín. 1996 p. 13,14,15,21,47,53,54,55,56

ANEXOS

ANEXO A

EL PORCENTAJE DE CONVERSIÓN DEL ALMIDÓN A GLUCOSA

El porcentaje de conversión del almidón a glucosa (% conversión) fue determinado por la ecuación:

$$\% \text{ conversion} = \frac{[\text{Glucosa}]}{[\text{Alm}] * 1.11} * 100$$

Donde:

[Glucosa] = Concentración de glucosa en gramos por litro de solución

[Alm] = Concentración de almidón de yuca en gramos por litro de solución

1.11= Factor de correlación requerido para cuantificar el incremento de sólidos totales durante la hidrólisis.

ANEXO B

DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores fueron determinados por duplicado en muestras de los hidrolizados del almidón, utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Cada mezcla de reacción consistió en 1.0 mL del hidrolizado del almidón y 1.0 mL de DNS. Se utilizó un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400. La cantidad de azúcar reductor en cada hidrolizado se estimó a partir de su absorbancia en 540 nm y una curva estándar de glucosa.

Preparación del reactivo DNS. Se mezclaron y disolvieron en 250 ml de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de Tartrato de sodio y potasio. Posteriormente se agregó 5 g de ácido 3, 5 dinitrosalicílico bajo calentamiento y oscuridad. Se dejó enfriar y se aforó a 500 mL con agua destilada y se almacenó a temperatura ambiente protegiendo el reactivo de la luz.

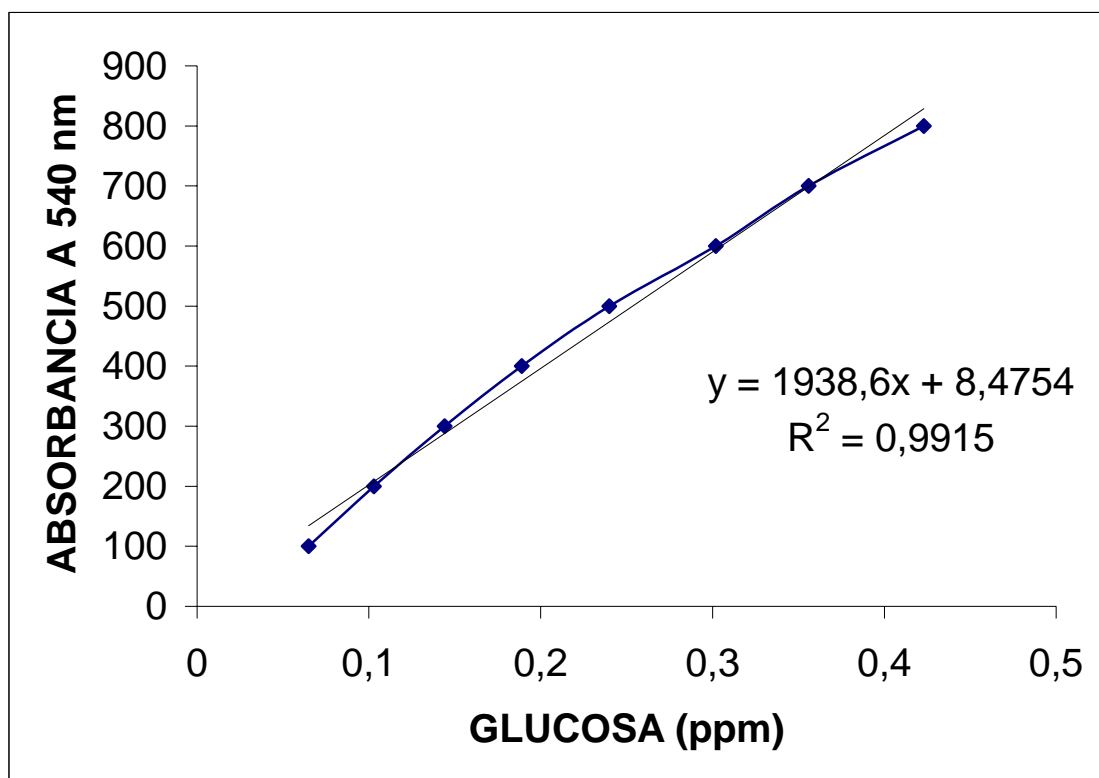
Preparación de las soluciones patrón de glucosa para la curva de calibración. Se preparó una solución de glucosa analítica con una concentración de 1000 ppm, por dilución de esta se prepararon 8 soluciones de concentraciones 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 ppm respectivamente.

Procedimiento para la obtención de los datos de la curva de calibración de glucosa con el método colorimétrico de DNS. En un tubo de ensayo tapa rosca, se mezclaron 1 mL de solución de glucosa con 1

mL de reactivo DNS. Se dejó reaccionar en un baño de agua en ebullición por 5 min. La reacción se detuvo introduciendo el tubo de ensayo en un baño de hielo durante 10 min. Posteriormente se agregó 10 mL de agua destilada y se dejó reposar por 5 min. Inmediatamente se leyó su absorbancia a 540 nm. El blanco utilizado se preparó de la misma forma pero agregando agua destilada en lugar de la solución de glucosa

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE LA GLUCOSA POR EL METODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICILICO

ABSORBANCIA	GLUCOSA (ppm)
0,065	100
0,103	200
0,144	300
0,189	400
0,24	500
0,302	600
0,356	700
0,423	800



ANEXO C

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La Glucosa fue determinada por el método de glucosa oxidasa y peroxidasa utilizando el Kit de Sera - Pak. La glucosa es convertida a ácido glucónico formando un complejo coloreado con la 4-aminofenazona. Este análisis se llevo a cabo utilizando un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400. La absorbancia se leyó a 500 nm.

REACTIVO	BLANCO	MUESTRA	ESTANDAR
Kit	2,0	2,0	2,0
Patrón (mL)			0,02
Muestra (mL)		0,02	
Agua Destilada	0,02		

Se calibra el 0 de absorbancia con el blanco y se mide la absorbancia a 500 nm de la muestra y el estándar. La concentración de glucosa (g/L) se determina por la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa (g/L)} = \frac{\text{Abs M}}{\text{Abs E}} \times \text{Concentración Estándar}$$

Donde:

Abs M = Absorbancia de la muestra

Abs E = Absorbancia de la solución estándar

ANEXO D

DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN EN EL MEDIO

La determinación de almidón se hizo utilizando un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400 por el método colorimétrico de Antrona – Ácido Sulfúrico. Las absorbancias del complejo coloreado se leyó a 630 nm (HART, 1991).

Preparación de las soluciones patrón de glucosa para la curva de calibración

Estas soluciones fueron preparadas de la misma manera que las utilizadas para la determinación de azúcares reductores con el reactivo DNS. (ANEXO B)

Obtención de los datos de la curva de calibración de glucosa para el método colorimétrico de Antrona – Acido sulfúrico

Inicialmente para la extracción de grasas y azúcares presentes en la muestra, se pesaron 2 g de muestra en un tubo de centrifuga, luego se añadieron 25 mL de una mezcla de éter etílico – éter de petróleo (1:3). Seguidamente se taparon y se agitaron enérgicamente, posteriormente se centrifugó y se descarto el sobrenadante. Al precipitado se le añadió alcohol al 80%, se agitó y se centrifugó durante 15 min, después de esto se hizo la extracción del almidón de la siguiente manera: a la muestra desengrasada se le adicionó 5 mL de agua y se agitó, luego se le añadió 6,5 mL de ácido perclórico al 52% se agitó por 15 min y se dejó reposar otros 15 min. Después de esto se le adicionó 20 mL de agua destilada, se agitó nuevamente y se llevó a la centrifuga por 15 min. La solución obtenida se

llevó a un balón de 100 mL y se aforó con agua destilada; de esta solución se tomaron 5 mL y se llevaron a un balón de 200 mL para luego ser aforado con agua destilada.

Para la reacción de coloración se tomaron 3 tubos de ensayo al primero se le adicionó 5 mL de agua destilada (blanco), al segundo 5 mL de solución problema y al tercero 5 mL de solución patrón diluida; estos tubos fueron enfriados en un baño de hielo para luego añadirse 10 mL de la solución antrona – ácido sulfúrico (0,2 g/100 mL). Estas soluciones se mezclaron cuidadosamente y se calentaron en un baño en ebullición durante 7,5 min; inmediatamente los tubos se enfriaron y la absorbancia se leyó a 630 nm. El color es estable durante 30 min.

Los cálculos para determinar el % de almidón en la muestra, fue determinado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Glucosa} = \frac{C * B * FD}{A * P * 10}$$

$$\% \text{ Almidón} = \% \text{ Glucosa} * 1.06$$

Donde:

A = Absorbancia de la solución patrón

B = Absorbancia de la muestra

C = Concentración patrón 0,125 mg/ 5 mL

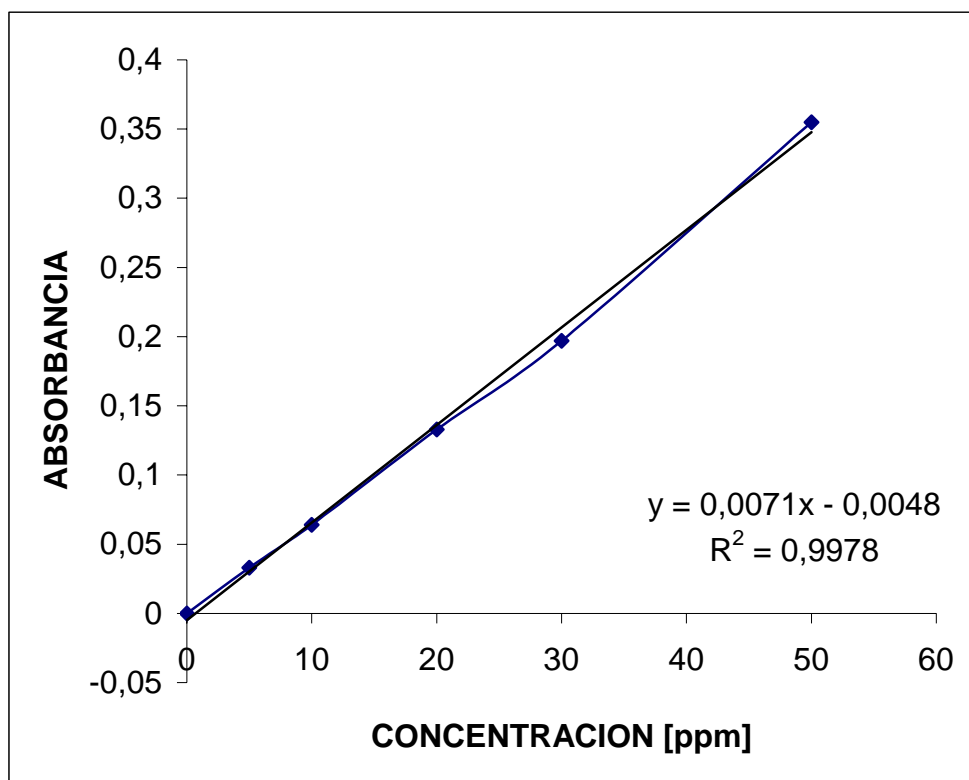
P = Peso de la muestra (g)

FD = Factor de dilución 800

1,06 = Factor estequiométrico de la relación glucosa - almidón

**CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL
PORCENTAJE DE ALMIDÓN POR EL MÉTODO DE ANTRONA - ÁCIDO
SULFÚRICO**

ABSORBANCIA	GLUCOSA [ppm]
0	0
0,033	5
0,064	10
0,133	20
0,197	30
0,355	50



ANEXO E

ESCALA DE MAC FARLAND

No. DE TUBO	Vln DE BaCl ₂ 1% (mL)	Vln DE H ₂ SO ₄ 1% (mL)	BACTERIAS /mL
1	0,1	9,9	3 X 10 ⁸
2	0,2	9,8	6 X 10 ⁸
3	0,3	9,7	9 X 10 ⁸
4	0,4	9,6	12 X 10 ⁸
5	0,5	9,5	15 X 10 ⁸
6	0,6	9,4	18 X 10 ⁸
7	0,7	9,3	21 X 10 ⁸
8	0,8	9,2	24 X 10 ⁸
9	0,9	9,1	27 X 10 ⁸
10	1,0	9,0	30 X 10 ⁸

ANEXO F

% DE RENDIMIENTO DEL ETANOL

El rendimiento de una fermentación es la relación entre la cantidad real de alcohol producida y la esperada teóricamente con base en la concentración de azúcar de la solución a fermentar.

Si se tratan X gramos de azúcar, glucosa, el volumen de alcohol esperado teóricamente será:

$$\frac{X \text{ g de glucosa}}{100 \text{ mL de sln}} \times \frac{184 \text{ g de alcohol}}{360 \text{ g de glucosa}} \times \frac{500}{0.79} = Y \text{ mL de alcohol}$$

Donde:

184 g es el peso de 4 moléculas de alcohol etílico que por fermentación se producen a partir de 2 moléculas de glucosa

360 g es el peso de 2 moléculas de glucosa

0,79 es la densidad del etanol en g/mL

500 es el volumen en mL medido para cada fermentación

El rendimiento total será determinado así:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{V_{\text{In etanol experimental}}}{V_{\text{In etanol teórico}}} \times 100$$