

**EVALUACION DE LOS RENDIMIENTOS EN EL PROCESO DE
OBTENCION DE ALCOHOL A PARTIR DE HARINA DE ÑAME (*Dioscorea
Bulbifera, Trífida*) POR VIA ENZIMATICA**

**YAJAIRA ASTURIZAGA AVILEZ
CARMEN BOCANEGRA AMAYA**

**LINEA DE PROFUNDIZACION
FERMENTACION**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
Sincelejo, 2008**

**EVALUACION DE LOS RENDIMIENTOS EN EL PROCESO DE OBTENCION DE
ALCOHOL A PARTIR DE HARINA DE ÑAME (*Dioscorea Bulbifera, Trífida*)
POR VIA ENZIMATICA**

**YAJAIRA ASTURIZAGA AVILEZ
CARMEN BOCANEGRA AMAYA**

**Trabajo presentado como requisito para optar titulo de Biólogo con énfasis
en Biotecnología**

Director

**JAIRO SALCEDO MENDOZA
Ingeniero Químico**

Codirector

**RAMON LOZADA DEVIA
Quimico Msc .**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
Sincelejo, 2008**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Sincelejo, _____

**UNICAMENTE LOS AUTORES SON RESPONSABLES POR LAS IDEAS
EXPUESTAS EN EL PRESENTE TRABAJO**

Artículo 12, resolución 02 del 2003

DEDICATORIA

*A DIOS, a mis padres **IRIA y ALFREDO** quienes me brindaron esta oportunidad y que con tanta paciencia y amor han esperado este triunfo, que más que mío es de ellos. A mis hermanas Sandra, Angélica y Laurita, a mi compañero y novio incondicional **JESUS** y con un inmenso amor este logro es dedicado a mis hijos **ALFREDO ANGEL**, mi ángel y **DIANA CECILIA** mi checho.*

Carmen Bocanegra Amaya

*A Dios, por regalarme fortaleza, sabiduría y perseverancia a lo largo del camino;
A mis padres **Gonzalo y Armenia** por su comprensión, apoyo y paciencia; por creer en mi en la adversidad y los reveses.
A Leidi por brindarme su compañía y confianza en estos años.
A mis Hermanos, Javier y Eliana por ser fuente de alegría en todo momento.
A mis amigas Ana, Gloria, y Sora, quienes a pesar de la distancia me demostraron su amistad sincera e incondicional.
A ti Carmen amiga mía, por tu lucha incansable para lograr conjuntamente esta meta*

Yajaira Asturizaga Avilez

AGRADECIMIENTOS

Ante todo le damos las gracias a Dios todo poderoso por darnos la sabiduría y el tiempo para concluir con este trabajo toda una carrera de experiencias y conocimientos que nos han de servir mucho en la vida.

Agradecemos a Arturo Doncel auxiliar del laboratorio de microbiología y amigo por su desinteresada colaboración durante el proceso experimental del presente trabajo.

A Jesús Beltrán Sánchez por sus incondicionales aportes en el desarrollo lógico de este trabajo.

A todos nuestros compañeros de clase por su incondicional ayuda.

A Novo Nordisk por la disposición en la adquisición de las enzimas y reactivos empleados en esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	16
1 INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
3 ESTADO DEL ARTE	22
3.1 ASPECTOS GENERALLES DEL ÑAME	22
3.1.1 Taxonomía	22
3.2 GENERALIDADES DE <i>Dioscórea trifida</i>	23
3.2.1 Descripción botánica	24
3.3 GENERALIDADES DE <i>Dioscórea bulbifera</i>	25
3.4 PRODUCCION DEL ÑAME A NIVEL MUNDIAL	26
3.5 PRODUCCION NACIONAL	29
3.6 BIOPROCESAMIENTO DEL ÑAME Y TUBÉRCULOS AFINES	33
3.7 HIDRÓLISIS ENZIMATICA	35
3.7.1 Descripción de las enzimas usadas en el proceso	36
3.7.1.1 Pectinaza	36
3.7.1.2 Alfa-amilasa	38
3.7.1.3 Amiloglucosidasa	38
3.8 FERMENTACIÓN	39
3.8.1 Microorganismos Empleados	40
3.8.2 Etanol	42
3.8.2.1 Ventajas del Etanol como combustible	42
3.8.2.2 Limitantes del Etanol como combustible	44
3.9 EL ALCOHOL CARBURANTE EN COLOMBIA	45

3.9.1	Producción de alcohol y mercado potencial en Colombia	47
3.9.2	Proyecciones de consumo de alcohol	48
3.9.3	Alcohol carburante en Sucre	49
3.9.3.1	Marco legal	50
4	DISEÑO METODOLOGICO5	52
4.1	UNIVERSO Y LOCALIZACION DEL PROYECTO	52
4.3	VARIABLES	52
4.3.1	Variables independientes	52
4.3.2	Variables dependientes	52
4.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	53
4.5	PROCEDIMIENTOS	54
4.5.1	Selección Y Preparación De La Materia Prima	54
4.5.1.1	Obtención de la harina	54
4.5.1.2	Preparación de Los Sustratos Iniciales	54
4.5.2	Hidrólisis Enzimática	55
4.5.2.1	Montaje de los biorreactores para a hidrólisis	55
4.5.2.2	Licuefacción	56
4.5.2.3	Sacarificación	57
4.5.3	Fermentación	59
4.5.3.1	Preparación del inóculo	59
4.5.3.2	Filtración	59
4.6	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO	60
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1	PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	61
5.2	HIDRÓLISIS ENZIMATICA	62
5.2.1	Comportamiento de Dioscórea bulbifera	62
5.2.2	Comportamiento de Dioscórea trifida	64
5.3	FERMENTACIÓN	67
5.3.1	Grados Brix	67
5.3.2	Equivalentes de Dextrosa	69
5.3.3	Conteo de microorganismos	71

5.3.4	Concentración de Alcohol	73
5.4	EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS	78
6	CONCLUSIONES	83
7	RECOMENDACIONES8	85
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	86
9	ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1: Hoja de <i>Dioscórea trifida</i> y tubérculo	24
Figura 2: Enramada de <i>Dioscórea bulbifera</i>	26
Figura 3: Tubérculo y hojas de <i>Dioscórea bulbifera</i>	26

LISTA DE GRAFICAS

	Pag
Grafica 1(a): Comparativo de la Producción del cultivo de ñame a nivel mundial 2004.	27
Grafica 1(b): Comparativo de rendimiento del cultivo de ñame a nivel mundial 2004.	28
Grafica 2: Área cultivada y producción de ñame en Colombia (1961-2003)	28
Grafica 3: Comparativo de la superficie sembrada del cultivo de ñame a nivel mundial 2004	29
Grafica 4: superficie del cultivo de ñame en Colombia	30
Grafica 5: Consumo de alcohol en los próximos años	48
Grafica 6: Metodología para la etapa de la preparación de la materia Prima	56
Grafica 7 Metodología para la etapa de hidrólisis enzimática	58
Grafica 8 Metodología para la etapa de fermentación	59
Gráfica 9 Proceso de hidrólisis enzimático en D. bulbifera	63
Gráfica 10 Proceso de hidrólisis enzimático en D. bulbifera (°Brix)	64
Gráfica 11 Proceso de hidrólisis enzimático en D. trifida	65

Gráfica 12 Proceso de hidrólisis enzimático en D.trífida (°Brix)	66
Gráfica 13. °Brix durante el tiempo de fermentación de la especie D bubifera a 10%; 13% y 16% p/v	68
Gráfica 14. °Brix durante el tiempo de fermentación de la especie D trífida a 10%; 13% y 16% p/v.	69
Gráfica 15 Equivalentes de Dextrosa para la variedad D bulbifera a 10%, 13% y 16%p/v.	70
Grafica 16 Equivalentes de Dextrosa para la variedad D trífida a 10%, 13% y 16%p/v.	70
Grafica 17 Concentración de microorganismos (millones/ml) para D bulbifera al 10%, 13% y 16% p/v.	72
Grafica 18 Concentración de microorganismos (millones/ml) para D trífida al 10%13% y 16% p/v.	73
Grafica 19 Concentración de alcohol para D. bulbifera al 10%, 13%, y 16%	74
Grafica 20 Concentración de alcohol para D. trífida al 10%, 13%, y 16%	75
Grafica 21 Contraste de los datos obtenidos durante el proceso de fermentación: a. y d. concentración de alcohol, b. y e. concentración de microorganismos, c. y f. equivalentes de dextrosa para las dos variedades de ñame.	76
Grafica 22 (a). Volumen final de alcohol de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida en las concentraciones de trabajo (10%, 13% y 16% p/v).	78

Grafica 22(b). Concentración final de alcohol de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida en las concentraciones de trabajo (10%, 13% y 16% p/v).	78
Gráfica 23 Medias para el rendimiento de las variedades D. bulbifera y D. trífida	80
Grafica 24 Rendimientos de alcohol (Lt alcohol/ton de harina y Lt/ton de ñame)	82

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1: Composición de 100gr de materia seca del tubérculo <i>Dioscórea trifida</i> según varios autores.	25
Tabla 2: Superficie cosechada, producción y rendimiento obtenido por departamento – 2003	31
Tabla 3: Análisis proximal de los almidones nativos de ñame.	32
Tabla 4: Consumo mundial de alcohol carburante año 2010.	49
Tabla 5 Condiciones de uso de las enzimas usadas en el proceso de licuefacción	56
Tabla 6 Condiciones de uso de la enzima usada en el proceso de sacarificación	57
Tabla 7 Contenidos de materia seca y porcentajes de humedad y de las variedades de ñame D bulbifera y D trifida.	61
Tabla 8 Análisis de varianza para el rendimiento de las variedades D.trifida y D.bulbifera	79
Tabla 9. . Medias por mínimos cuadrados para rendimiento con 95% de intervalos de confianza y contraste de múltiples rangos según ñame. D trifida y D. bulbifera.	80
Tabla10: Contraste de Varianza	82

LISTA DE ANEXOS

	Pag
Anexo A. Fichas técnicas de las enzimas pectinex® Ultra SL-P termamyl® 120 L, tipo L y AMG 300L, de la Novo Nordisk.	97
Anexo B: Resultados de la hidrólisis enzimática por la especie D bulbifera	99
Anexo C: Datos registrados del comportamiento de D trífida	101
Anexo D: Datos registrados durante el proceso d fermentación en la variedad D bulbifera.	103
Anexo E: Resumen estadístico para la evaluación del rendimiento en la producción de alcohol.	106

RESUMEN

En la presente investigación se tomaron dos especies de ñames poco estudiadas *Dioscórea bulbifera* y *Dioscórea trifida* con el objetivo de medir su rendimiento en Lt/Tonelada en la producción de alcohol que puede ser utilizado como combustible, mediante un proceso de transformación en tres etapas: La primera etapa se basó en la preparación de la materia prima (Harina de ñame de las dos variedades a concentraciones de 10%, 13% y 16% p/v). La segunda etapa dio paso a la hidrólisis enzimática utilizando las enzimas comerciales Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120 L y la AMG 300 L de la Novo Nordisk, en esta etapa se obtuvo 93.3%, 69.36% y 81.52% de equivalentes de dextrosa para las concentraciones 10%, 13% y 16% p/v de D. Bulbifera y 98.20%, 88.02% y 65.13% para las concentraciones 10%, 13% y 16% p/v para D. trifida. La tercera etapa corresponde al proceso de fermentación donde se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* realizando la transformación de azúcares en alcohol; Se evaluaron en esta etapa los niveles de azúcares reductores, grados Brix, número de microorganismos y concentración de alcohol, en intervalos de 9 horas durante 48 horas. Los resultados en la producción de alcohol demostraron que la variedad D. trifida en las concentraciones 10% y 13% p/v presentó mayores rendimientos en cuanto a volúmenes de alcohol, con valores de 786,87 y 792,96 Lt/Tonelada de harina respectivamente. De forma similar se demostró que la variedad D. bulbifera en la concentración 16% p/v arrojó los menores rendimientos con un valor de 520,66 Lt/Tonelada de harina

ABSTRACT

In the present investigation they took two species of not very studied yams *Dioscórea bulbifera* and *Dioscórea trifida* with the objective of measuring their yield in LT / Ton in the production of alcohol that can be used as fuel, by means of a transformation process in three stages: The first stage was based on the preparation of the matter it prevails (yam Flour of the two varieties to concentrations of 10%, 13% and 16% p/v). The second stage do step to the enzymatic hidrólisis using the commercial enzymes Ultra Pectinex SP-L, Termamyl 120 L and the AMG 300 L of the Novo Nordisk, in this stage you 93.3%, 69.36% and 81.52% of equivalent of dextrosa for the concentrations 10%. 13% and 16% p/v of *D. Bulbifera* and 98.20%, 88.02% and 65.13% for the concentrations 10%, 13% and 16% p/v for *D. trifida*. The third stage corresponds to the process of fermentation where the yeast *Saccharomyces cerevisae* was used carrying out the transformation of you sugar in alcohol; They were evaluated in this stage the levels of you sugar reducers, degrees Brix, I number of microorganisms and concentration of alcohol, in intervals of 9 hours during 48 hours. The results in the production of alcohol demonstrated that the variety *D. trifida* in ace concentrations 10% and 13% p/v presented bigger yields as for volumes of alcohol, with values of 786,87 and 792,96 Lt/Tn of flour respectively. In a similar way it was demonstrated that the variety *D. bulbifera* in the concentration 16% p/v throws the smallest yields with a value of 520,66 Lt/Tn of flour.

INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ñame (*Dioscorea sp*) es un alimento básico en muchas regiones tropicales, principalmente en el occidente de África, Asia, el pacífico y el Caribe (Fao 1990) en esta última región se halla en la Costa Atlántica Colombiana, principal productora nacional donde se cultiva alrededor de 162. 000 toneladas lo que es equivalente al 9% de la exportación anual de tubérculos y granos (Corpoica 2000).

La producción nacional de este tubérculo para el 2000 fue 25000 has (FAO, 2003) centrándose en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar, los cuales contribuyeron con el 92% del área del país cultivada en el año 2002, superando las 20000 hectáreas, mientras que los otros cuatro departamentos de la Costa Atlántica (Atlántico, Magdalena, Cesar y Guajira) respondieron por el 2,8% de la superficie nacional cultivada¹.

En Sucre las variedades más cultivadas comprenden las especies *Dioscorea rotundata* y *Dioscorea alata*, con un 75% de la cantidad total cultivada, el 25% restante abarca las especies *Dioscorea esculenta*, *trífida* y *bulbifera* (Corpoica1999), siendo estas últimas de menor utilidad comercial esto por la falta de investigaciones orientadas a su composición bioquímica y aprovechamiento a nivel biotecnológico y agroindustrial. Por lo que se sugiere generar un valor agregado a la transformación de estas variedades como producto industrial y biotecnológico que además coadyuve a mejorar las condiciones ambientales, al ser utilizado como materia prima para la producción de alcohol.

Por otro lado cada día se hace más evidente la necesidad de nuevos compuestos que disminuyan la concentración de contaminantes en el mundo por lo que la

¹ UMATA-S, SECRETARIA DE DESARROLLO ECONOMICO Y AGROINDUSTRIAL, 2003

Cumbre de Kyoto (1993), concluyo con la adopción de una serie de medidas encaminadas a la reducción de emisiones de gases causantes del efecto invernadero por los 39 países industrializados, incluidos los de la antigua URSS. Específicamente el tratado obliga a limitar las emisiones conjuntas de seis gases (CO₂, CH₄, N₂O, compuestos perfluorocarbonados (PFC), compuestos hidrofluorocarbonados (HFC) y hexafluoruro de azufre) para el período 2008–2012; con una reducción global acordada del 5,2% para los países industrializados (Higuera. M, 2004).

En el país en acuerdo con la ley 693 de Septiembre 19 de 2001 sobre alcoholes carburantes a partir del 11 de septiembre de 2005, sería obligatoria la mezcla en un 10 por ciento de este carburante con los combustibles de origen fósil. Esto con el fin de reducir las emisiones contaminantes de medio ambiente y causantes del efecto invernadero. (Diario Oficial No 44.564 de 27 Sep 2001) (Kyoto-Minambiente 2005)

La información sobre el procesamiento de harina de ñame con estos fines es escasa , en la costa Atlántica no se conoce ningún tipo de transformación industrial sobre es promisorio tubérculo, nuestros máximos niveles de aprovechamiento solo se limitan a procesos de acopio, selección de clones y material genético deseado para la comercialización en los mercados internacionales de países como Estados Unidos y sectores de la Unión Europea, como referencias de procesos de transformación solo se tienen usos de carácter cultural ligados a la época de semana santa en la cual el ñame es usado para al fabricación de dulces perecederos, sin embargo en la Universidad de Córdoba se han estudiado las propiedades tecnofuncionales de los almidones extraídos de *D trifida* y *D bulbifera* (Salcedo. J, Espitia. R y Gómez. F 2004) con resultados favorables en la industrialización de dichas variedades, esto nos conduce a investigar sobre la posibilidad de usar las harinas para su transformación en alcohol carburante, surge entonces el interrogante, ¿cuál será el rendimiento de la conversión de harina de ñame de las especies *bulbifera* y *trifida* en alcohol?

El presente estudio pretende sentar precedentes o alternativas que incentiven el cultivo de estas especies, y propone soluciones frente al desaprovechamiento continuo de las diferentes especies de ñame por el desconocimiento de sus facultades en el desarrollo de nuevos productos para uso industrial. Esto mediante la Evaluación de los rendimientos (Lt de alcohol/ Ton de harina de ñame) en el proceso de obtención de alcohol a partir de harina de ñame, *D trifida* y *D bulbifera*, usando enzimas comerciales (AMG 300 L, PECTINEX ULTRA SP-L, TERMAMIYL 120 L) de la Novo Nordisk y levaduras comerciales (*Saccharomyces Cerevisae*).

Se puede apreciar que este estudio sería provechoso para los sectores agrícola, industrial y biotecnológicos. En el sector agrícola incentivando el cultivo de especies de ñame poco cultivadas, proponiendo alternativas diferentes para los agricultores, en el sector industrial fomentaría el uso de estas harinas en la producción de alcohol carburante compitiendo con otro tipo de productos como los almidones de yuca, papa y maíz, en el sector biotecnológico fomentará investigaciones que generen mayor información sobre las bondades de tan promisorio tubérculo, especialmente en sus variedades poco cultivadas, colaborando así con la perpetuación de las mismas, destacando su implementación en el proceso de obtención de alcohol en periodos donde la yuca es escasa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los rendimientos (LT de alcohol producido/Tonelada de Harina de ñame) en el proceso de obtención de alcohol a partir de las especies de ñame (*D. trifida*, *D. bulbifera*) a tres concentraciones: 10%,13% y 16% p/v, utilizando las enzimas (Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120 L AMG 300 L) y *Saccharomyces Cerevisae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Obtener harina de Ñame de las dos (2) especies seleccionadas; *Dioscórea trifida* y *Dioscórea bulbifera*.
- Evaluar los rendimientos durante el proceso de hidrólisis enzimática por cada variedad de ñame a diferentes concentraciones de sustrato.
- Determinar la cantidad de etanol producido durante el proceso de fermentación para cada especie de ñame a tres concentraciones de sustrato: 10%,13% y 16% p/v usando *Saccharomyces cerevisae*.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 ASPECTOS GENERALES DEL ÑAME (*Dioscórrea ssp*)

El ñame un tubérculo de la familia Dioscoreáceas, es una planta netamente tropical, desarrolla mejor con temperaturas medias entre 25 y 30°C y para obtener máximos rendimientos necesita de abundante agua, entre 1,500 y 2,000 ml/año. El período crítico para mantener la humedad es durante los cinco primeros meses de desarrollo; pasado este tiempo, el exceso de humedad puede ocasionar pudrición de los tubérculos. Requiere abundante luz para obtener mayor producción, un período de 12 horas con luz es adecuado. Se desarrolla bien en suelos francos, sueltos, profundos, con buen drenaje, pH alrededor de 6,0 de buena fertilidad.

Los tubérculos del ñame son una excelente fuente de carbohidratos; contienen vitaminas como carotenos, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico.

Además poseen la mayor parte de los aminoácidos esenciales: arginina, leucina, isoleucina y valina; en menor cantidad se encuentra histidina, metionina y triptófano su contenido en proteínas es del 4.8% en base seca, estas cualidades hacen del ñame un alimento con características suficientes para proveer la tercera parte de la proteína basal requerida por un adulto en países como África (Ayensu, 1972).

3.1.1 Taxonomía : La clasificación del ñame según su morfo-fisiología es.

Reino:	Vegetal	Subclase:	Lilidae
Subreino:	Tracheobionta	Familia:	Dioscoraceae
Súper división:	Espermatophyta	Género:	Dioscórrea
División:	Magnoliophyta	Especies:	Trífida, bulbifera

Clase: Liliopsida

Fuente: AGRONET 2006

3.2 GENERALIDADES DE *Dioscórea trifida*

3.2.1 Descripción botánica: *D. trifida* es una planta de tallos volubles, delgados que enrollan hacia la izquierda, provistos de dos a ocho alas membranosas, generalmente en mayor número y desarrollo en la parte inferior del tallo. Las hojas miden hasta 25 cm de largo, son digitadas, con tres a siete segmentos o lóbulos, con el central más grande.

Las plantas son unisexuales. Las inflorescencias estaminadas son racimos simples o muy ramificados, con flores verduzcas de 4 a 6 mm de diámetro; mientras que las inflorescencias pistiladas consisten de dos racimos simples que nacen de la misma axila con flores de 12 a 24 mm de largo. Esta especie florece más regularmente que las otras *Dioscóreas* spp cultivadas. El fruto es una cápsula, con tres lóculos, cada uno con dos semillas diminutas, aladas.

El tallo subterráneo es un órgano irregular y corto del que emergen los tallos aéreos, raíces y estolones, estos últimos en círculos sucesivos.

El estolón que mide hasta 70 cm. de largo, se ensancha formando el tubérculo. Los tubérculos varían mucho en forma y tamaño, aun en la misma planta; se observa forma esférica, fusiforme, claviforme y a menudo con ramificaciones muy cortas. La superficie es rugosa, a veces con raicillas. La pulpa es uniforme, compacta y varía de color blanco, amarillo hasta morado, con un sabor y apariencia muy agradable después de cocinado. El peso de los tubérculos está entre 300 y 400 gr. cada uno (León, J. 1987). La figura 1, muestra ejemplares que corresponden a las características descritas anteriormente.



Figura 1: Hoja de Dioscórea trifida (izquierda) y tubérculo (derecha)

Estas características botánicas sumadas a su composición citada en la tabla 1 hacen de este tubérculo una buena opción para su implementación en la industria.

Tabla 1 Composición de 100 g de materia seca del tubérculo de D. Trifida, según varios autores.

Componente	Unidad	Collazos et al	Jacoby1/	Montaldo
Agua	g	72,2	72,4	72,6
Calorías	cal	112,0	105,0	100,0
Proteína	g	1,8	2,4	2,0
Grasas	g	1,5	0,2	0,2
Carbohidratos	g	23,5	24,1	24,3
Fibra	g	0,4	--	0,6
Ceniza	g	1,0	--	0,9
Calcio	mg	3,0	22,0	14,0
Fósforo	mg	30,0	--	43,0
Hierro	mg	0,7	0,8	1,3

Vitaminas	mg	--	--	--
Tiamina	mg	0,9	0,9	0,13
Riboflavina	mg	0,03	0,03	0,02
Niacina	mg	0,44	0,50	0,40
Ácido ascórbico	mg	3,10	10,00	3,00

Fuente: Pinedo 1975

3.3 GENERALIDADES DE *Dioscórea bulbifera*

Dioscórea bulbifera, como cualquier otro representante del genero *Dioscórea* cumple con las características propias de la familia Dioscoraceae (mencionadas anteriormente) pero con una gran particularidad, sus tubérculos son de diversa forma y su desarrollo se da en los nódulos foliares del tallo fuera de la superficie terrestre, es decir es un ñame netamente aéreo, gracias a su diversa morfología opta por diferentes nombres comunes, tales como: ñame papa, ñame tumba, ñame flor, etc. como se muestra en la figura 2.

Esta variedad es de amplio consumo en países como Costa rica y Cuba, gracias a que su cultivo es poco exigente y solo necesita un buen soporte para enrollar su tallo, como lo muestra la figura 3. (Rincón A., Araujo de VC, Padilla F.y Martín E. 2000).



Figura 2 Tubérculo y hojas de *Dioscorea bulbifera*.



Figura 3 Enramada de *Dioscorea bulbifera*

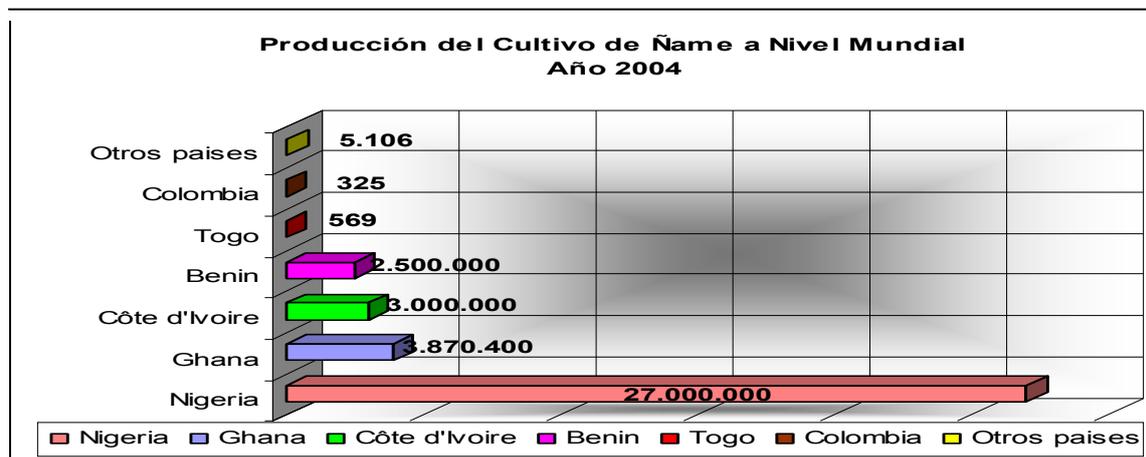
3.4 PRODUCCION DE ÑAME A NIVEL MUNDIAL

La mayoría de los ñames cultivados pertenecen a la familia Dioscoreácea, y al género *Dioscorea*. Es el principal alimento cultivado en África occidental, el Caribe, islas del Pacífico sur, sureste de Asia, India y partes de Brasil (Coursey. D. G, 1967; Adelusi. A, y Lawanson. A. O, 1987). Esta planta se presenta como una enredadera y se caracteriza por la presencia de tubérculos subterráneos y aéreos, los cuales junto con la papa, la yuca, la arracacha y la batata ocupan un lugar importante en la alimentación humana. Está estimado que existen más de 600

especies en el mundo. Las especies más cultivadas son: *D. alata*, *D. Rotundata*, *D. cayensis*, *D. Esculenta*, *D. bulbífera* y *D. trífida*, de los cuales la primera es la preferida en la producción de tubérculos para el consumo humano.

Durante el periodo de 1995 a 1999 África tuvo un área cultivada de 3325 Has, con una producción de 32438 Ton y un rendimiento de 9.76 Tonelada / Ha; en Asia el área cultivada fue de 16 Mil Ha, con una producción de 235 Mil Tonelada y un rendimiento de 14.43 Tonelada / Ha y Oceanía tuvo un área de 18 Mil Ha, con una producción de 278 Mil Tonelada y un rendimiento de 15.37 Tonelada / Ha. El país africano principal productor es Nigeria con el 73% de la producción mundial de ñame. En Sudamérica, el ñame es solo importante en Brasil, Colombia y Venezuela con un área total cultivada de 46 Mil Has, la producción fue de 439 000 Ton y un rendimiento de 9.60 Ton/Ha. (Buitrago. G y Perea. M, 1998). En términos generales la producción y el rendimiento mundial de ñame se puede apreciar en las gráficas 1(a y b).

Gráfica 1 (a) Comparativo de la producción del cultivo de ñame a nivel mundial – 2004



Fuente: FAO-2004

1 FAO: Fondo Internacional de desarrollo Agrícola

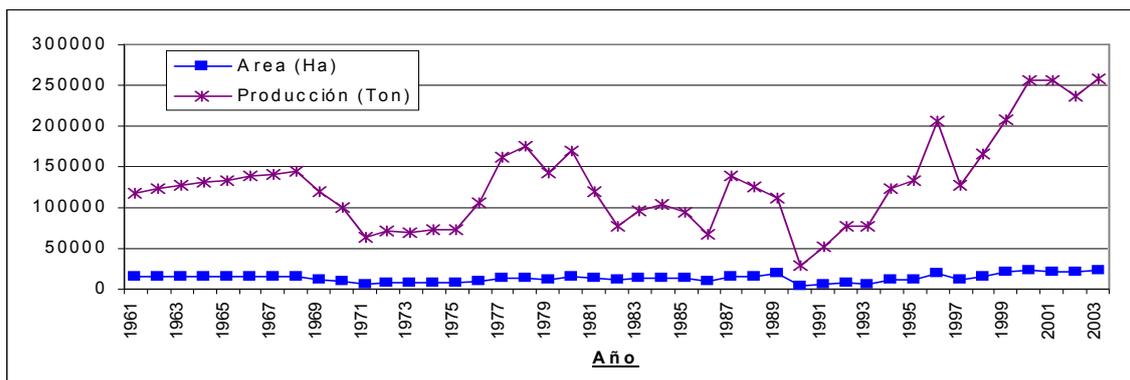
Gráfica 1 (b) Comparativo de rendimiento del cultivo de ñame a nivel mundial – 2004



Fuente: FAO-2004

La superficie sembrada entre 1990 y 2003 aumentó de 4547 a 23039 hectáreas (aumentó en cinco veces). La producción tuvo un incremento aún mayor, ya que se multiplicó en nueve veces, pues creció de 28322 a 254849 toneladas, y los rendimientos casi se duplicaron (aumentaron de 6.2 a 11.1 Tonelada/Ha) como se muestra en la Gráfica 2.

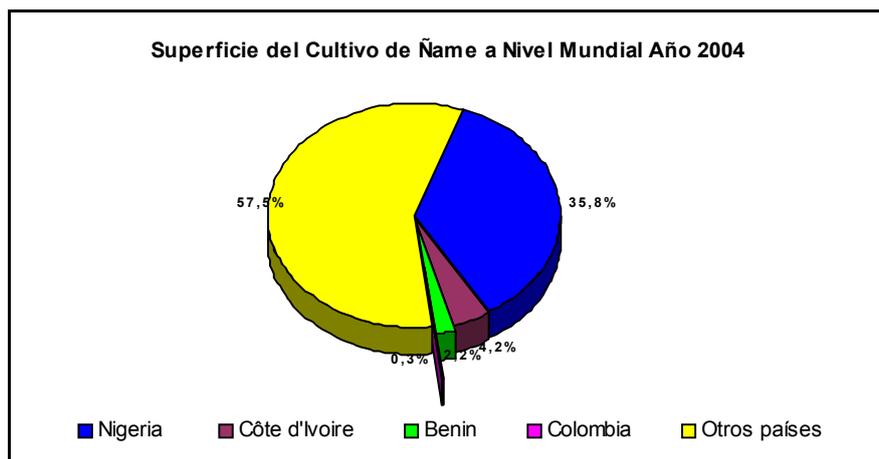
GRÁFICA 2 Área cultivada y producción de ñame en Colombia (1961 – 2003).



Fuente: FAO 2003

Sin embargo Colombia sigue siendo uno de los países con menor proporción de tierras sembradas a pesar de su amplio consumo como se ilustra en la Grafica 3.

Gráfica 3. Comparativo de la superficie sembrada del cultivo de ñame a nivel mundial – 2004



Fuente: FAO 2004

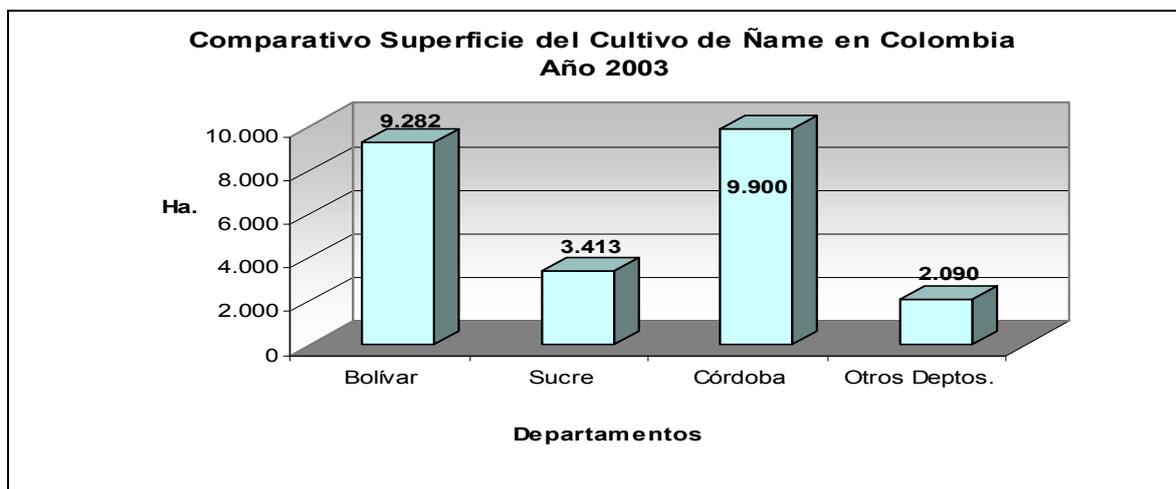
3.5 PRODUCCION NACIONAL

En Colombia se pueden encontrar varias especies de ñame como el ñame criollo (*D. alata*), ñame espino (*D. rotundata*), ñame papa (*D. bulbífera*), ñame azúcar (*D. esculenta*) y ñampín (*D. trifida*). Se considera que *D. alata* y *D. rotundata* son las especies de mayor importancia tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo, seguidas por *D. trifida*. Las otras especies tienen importancia desde el punto de vista de la diversidad genética. (Buitrago. G y Perea. M, 1998).

El cultivo del ñame se considera restringido en la Costa Atlántica, las áreas de mayor producción son: la zona costera del departamento de Córdoba, la sub-región natural de los Montes de María en los departamentos de Sucre y Bolívar, y algunos municipios de los departamentos del Cesar y la Guajira; sin embargo, se tiene conocimiento de la siembra de esta planta en áreas como Ungía y Acandí en el departamento del Chocó y en algunos departamentos de los territorios

nacionales, como se aprecia en la grafica 4, lo cual es una clara evidencia de la aceptación que tiene este tubérculo (1998, 39).

Grafica 4 superficie del cultivo de ñame en Colombia



Fuente: FAO 2004.

En el Departamento de Córdoba los municipios de mayor producción durante el año de 2003 fueron: Ciénaga de Oro con un área cosechada de 1800 Ha, con un rendimiento de 16000 Kg / Ha y una producción obtenida de 28.800 Toneladas y Sahagún con un área cosechada de 702.7 Ha, con un rendimiento de 10.000 Kg / Ha y una producción obtenida de 7027 Toneladas.

Aún cuando actualmente se le conoce en todo el mundo, en Colombia el ñame se ha caracterizado como producto de cultivo y consumo tradicional en la Costa Atlántica como lo ilustra la tabla 2. Su condición de alimento regional no reconocido como de primera necesidad ha estancado su explotación, que se realiza generalmente en predios de economía campesina con bajo nivel de tecnificación.

Tabla 2. Superficie cosechada, producción y rendimiento obtenido por departamento – 2003

DEPARTAMENTO	SUPERFICIE	PRODUCCIÓN	RENDIMIENTO
--------------	------------	------------	-------------

	(Ha)	(Toneladas)	(kg / Ha)
Bolívar	9.282	139.674	15.048
Córdoba	9.900	93.705	9.465
Sucre	3413	22.156	6.492
Cesar	380	6.660	17.526
Atlántico	83	730	8.795
Magdalena	89	623	7.000
La Guajira	81	621	7.667
Antioquia	1.273	17.474	13.727
Chocó	184	898	4.880
Total Nacional	24.685	282.541	11.446

Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Anuario estadístico del sector agropecuario 2003.

La producción nacional de este tubérculo se concentra en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar, los cuales contribuyeron con el 92% del área del país cultivada en el año 2002, superando las 20000 hectáreas, mientras que los otros cuatro departamentos de la Costa Atlántica - Atlántico, Magdalena, Cesar y Guajira - respondieron por el 2,8% de la superficie nacional cultivada (FAO 2004).

En cuanto al procesamiento y análisis de este tubérculo en el país solo se conocen las propiedades tecnofuncionales de sus almidones (Espitia. R, Gómez. F y Salcedo.J, 2004), gracias a su uso en la industria alimentaría, (Ver tabla 3).

Tabla 3 Análisis proximal de los almidones nativos de ñame

VARIABLES	<i>D. bulbifera</i> (%)	<i>D. trifida.</i> (%)
MATERIA SECA	95,94	92,63
PROTEINA	2,567	1,32

CENIZA	0,56	0,41
FIBRA	2,12	1,46
E. ETereo	0,2	0,21
ALMIDÓN	95,33	92,67

Fuente: Espitia. R, Gómez. F y Salcedo.J, 2004.

3.6 BIOPROCESAMIENTO DEL ÑAME Y TUBERCULOS AFINES

Como se mencionó anteriormente el bioprocesamiento del ñame con fines industriales es escaso solo en países Africanos como Nigeria es ampliamente estudiado para su empleo como alimento básico, con lo que han desarrollado técnicas para el procesamiento de ñame en harinas que serán la materia prima para la constitución de sopas y coladas. Por otra parte en Venezuela se han realizado análisis de diferentes harinas obtenidas a partir de ciertas variedades de ñame (*Dioscorea bulbífera* y *D. trifida*); en término de las propiedades reológicas de las harinas extraídas, se ha encontrado que la variedad *D. bulbífera* muestra excelentes condiciones como ingrediente idóneo para elaborar sopas tipo “instantáneas”, mientras que las suspensiones de harina *D. trifida* por tener valores elevados de viscosidad sugieren el empleo como espesante. (Corpoica Diagnóstico Agropecuario con Fines de Planificación 2003).

En cuanto a la industria de alcohol el ñame es un total desconocido, cosa contraria ocurre con tubérculos afines como la yuca y la papa.

Assis. T, (2007), en el estudio para la cuantificación de alcohol a partir de harina de batata obtuvo una concentración de etanol del 9.4% v/v y un rendimiento de 129 litros/Tn de raíz, durante un tiempo de fermentación de 56 horas, empleando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

González y Molina en el 2006, estudiaron la hidrólisis enzimática y la fermentación de la papa (*Solanum tuberosum*), a fin de determinar las mejores condiciones para producir alcohol, quienes en el seguimiento del proceso de fermentación alcanzaron una concentración máxima de alcohol de 10,33% v/v. El rendimiento de etanol del proceso fue de 94,5 Litros de etanol/Tn de papa, utilizando una concentración de 20% p/v de sustrato.

Bringhenti. L y Cabello. C, por este mismo año, en el estudio de la fermentación alcohólica de sustrato amiláceo hidrolizado enriquecido con melaza de caña, obtuvieron concentraciones de etanol del 1.6% v/v; 2% v/v; 2.4% v/v; 3.6% v/v y 4% v/v a partir de un hidrolizado de almidón residual de harina de yuca del 10% p/v, enriquecido con concentraciones de melaza de caña del 5; 10; 15 y 20% v/v respectivamente, en un volumen de reacción de 500 ml, usando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

Bringhenti. L y Cabello. C en el 2005, obtuvieron una concentración de etanol del 9.76% v/v a partir de residuos del proceso de obtención de harina y almidón de yuca usando una concentración del 18% p/v y enriquecido con un 12% de melaza residual del proceso de producción de sacarosa de caña de azúcar.

En Brasil se desarrolló un estudio sobre la utilización del residuo sólido obtenido en la extracción de almidón de yuca que es usado fundamentalmente en la alimentación animal, el objetivo de este trabajo fue desarrollar la evaluación técnica económica de la producción de alcohol a partir del subproducto de la obtención del almidón de yuca. Para esto se usó como enzima complementaria la pectinasa para la hidrólisis del mosto, la caracterización del subproducto presentó los siguientes resultados en base seca: 80% de almidón, 11.5% de fibra, 1.14% de cenizas, 0.85% de proteínas y 0.45% de azúcares. El proceso de hidrólisis tuvo una conversión de 86.31% del almidón inicial y un 80% de rendimiento de azúcares totales. Un análisis mostró que cerca del 75% de la materia seca inicial fue hidrolizado y el residuo presentó 37% de almidón, 30% de azúcares totales,

30% de fibra en base seca, el mosto obtenido presentó una concentración de 13 °Brix siendo necesario concentrarlo, la fermentación alcohólica se realizó en 48 horas, el análisis económico demostró un proceso viable, necesitando un ajuste para su realización comercial. (Magaly L. Cereda M., 2004).

Grisales. P. A, *et, al.*, (2001). En el diseño de un proceso de producción de etanol anhidro a partir de jugo de caña, obtuvieron una concentración de 6 - 8% v/v de etanol. El jugo de caña contenía una composición de 14% de sólidos solubles (14 grados brix) y en la fermentación el microorganismo utilizado fue *Saccharomyces cerevisiae*.

En el trabajo "Estudio preliminar para la obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca utilizando extractos crudos de alfa amilasa (*B. Licheniformis*) y glucoamilasa (*A. niger*)", aplicaron extractos crudos enzimáticos a una solución de almidón de yuca 20% (p/v). Se ensayaron tres relaciones enzimas /sustrato 10, 20 y 30 ml/Kg. de almidón para el extracto de alfa amilasa y 15, 20, 45 ml/ Kg. de almidón para el extracto de glucoamilasa. Los mejores resultados de la hidrólisis del almidón de yuca se lograron con las relaciones de 30 ml/ Kg. de almidón en la licuefacción y 45 ml/Kg de almidón en la licuefacción, con lo que se obtuvo un jarabe de glucosa de 83.34% de equivalente de dextrosa (Lujan D. Alvarino N. Salcedo J., Revista Temas Agrarios, SIN 012-7610, 2001,).

3.7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los hidrolizados enzimáticos surgen de la necesidad de sustituir ciertas materias primas para ofrecer producto de alta competitividad que genere diversas opciones en el mercado; por esta razón cobra tanta importancia hoy día (Pardo. M et all 2004). La Hidrólisis enzimática es un proceso que involucra el desdoblamiento de carbohidratos de grandes cadenas en carbohidratos sencillos para su mejor

asimilación en determinados procesos, esto con la ayuda de enzimas. La hidrólisis de las harinas y almidones se hizo tradicionalmente por medios químicos, pero la efectividad de las enzimas, costos y condiciones suaves de reacción y ausencia de reacciones secundarias han hecho que las amilasas sean las óptimas para este proceso.(Sánchez. O y Cardona. C 2005)

La utilización de las enzimas en procesos industriales biotecnológicos adquieren cada vez mayor importancia en la medida en que se requieren nuevos y mejores productos destinados a satisfacer necesidades y mercados altamente exigentes. Sectores como la panadería, cervecería, detergentes, vinos y zumos de frutas están desarrollando ampliamente las bondades de la tecnología enzimática, mientras que otros, como la hidrólisis de almidón, presentan una aplicación mínima pese a la disponibilidad comercial de las enzimas , su eficiencia, especificidad, comodidad, economía y demanda actual de la industria alimentaria En el país se han realizados trabajos en el aprovechamiento de harinas y almidones mediante la utilización de enzimas, para la generación de nuevos productos, realizando importantes aportes para la elaboración de jarabes de glucosas(Pardo. M et al 2004).

3.7.1 Descripción de Las Enzimas usadas en el proceso

3.7.1.1 Pectinasa: Las pectinasas catalizan la hidrólisis al azar de los acoplamientos 1,4- α -D galactosurónico en pectinas. Pectinex Ultra SP-L es una preparación purificada altamente activa, producida por una cepa de *Aspergillus aculeatus*. Contiene una actividad pectolítica y hemicelulítica . El producto contiene principalmente pectin-transeliminasa, poligalacturonasa, pectinesterasa y hemicelulasas, siendo capaz de degradar las paredes celulares de las plantas y las pectinas solubles e insolubles.

Las pectinasas son ampliamente usadas en la industria del procesamiento de jugos de frutas (extracción y clarificación), extracción de aceites vegetales,

procesamiento de bebidas alcohólicas y una variedad de aplicaciones, en la industria de alimentos (Dörnenburg. H y Lang. C, 2000). (Beg, *et. al.*, 2002). (Dayanand. A y Patil. . S.R, 2006).

La clasificación de las pectinasas está basado en el ataque al esqueleto galacturónico, por la preferencia del substrato (pectina, ácido péptico o protopectina), por la hidrólisis y por el sitio de corte (endo-enzima licueficante o despolimerizante), y (exo-enzima o sacarificante) (Favela. T, *et. al.*, 2006).

Existen básicamente tres tipos de pectinasas : pectin esterasa, (desesterificante o desmetoxilante, remueve los grupos metil éster; las despolimerizantes (incluye las enzimas hidrolíticas y las liasas) y las protopectinasas .

a. Enzimas desmetoxilante o desesterificante: La pectin esterasa (Polimetilgalacturonato esterasa, PMGE), cataliza la hidrólisis de los grupos metil éster de la pectina, liberando metanol y convirtiendo la pectina en pectato.

b. Pectinasas despolimerizantes:

- **Hidrolasas:** Estas incluyen las polimetilgalacturonasas (PMG), que hidrolizan polimetil galacturonatos a oligometilgalacturonatos por corte de los enlaces α -1,4 pudiendo ser exo o endo-PMG y las poligalacturonasas (PG), que hidrolizan enlaces α -1,4 glicosídicos entre dos residuos de ácido galacturónico. Esta es la mejor enzima con función hidrolítica, pudiendo presentar acción endo (hidrolasas internas) u exo (hidrolasas secuenciales).
- **Liasas:** También llamadas transamilanasas, rompen enlaces glicosídicos resultando en galacturonatos, y pueden ser pectina liasas, la cual cataliza la eliminación β entre dos residuos de acido galacturónico mas o menos

esterificados, o péctato liasa que rompen enlaces α -1,4 de ácido péctico de modo endo o exo por transaminación.

c. Protopectinasas: Estas enzimas solubilizan protopectina, formando pectina soluble altamente polimerizada. Con base a sus aplicaciones son de dos tipos: Protopéctinasa tipo A, que rompe sitios internos de ácido poligalacturónico y la Protopéctinasa tipo B, que rompe sitios externos de las cadenas de polisacáridos que pueden estar conectadas a cadenas de ácidos poligalacturónicos constituyente de las paredes celulares (Pastore. G.M y Uenojo. M, 2007).

3.7.1.2 Alfa – amilasa (Termamyl 120 L): Hidroliza los enlaces α – (1,4) de los polímeros de glucosa, pero solo en el interior de las cadenas, proporcionando cadenas más cortas (Dextrinas).

Las α -amilasas catalizan la hidrólisis de los enlaces internos α -1,4 glucano en polisacáridos conteniendo 3 o más enlaces α -1,4, esto resulta en una mezcla de glucosa y maltosa (Starch Hydrolysis, 2000).

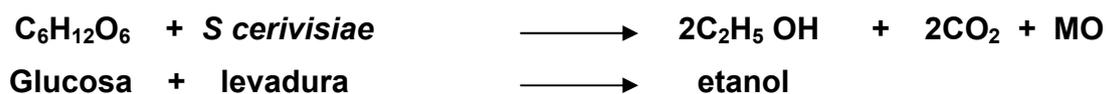
La acción de una α -amilasa sobre la fracción de amilosa de almidón, procede en dos etapas. Inicialmente, tiene una rápida degradación de la amilosa para dar maltosa y maltotriosa. En la segunda fase, más lenta ocurre hidrólisis de los oligosacáridos, formando glucosa y maltosa como productos finales.

3.7.1.3 Amiloglucosidasa (AMG 300): Rompe los enlaces α – (1,4) extrayendo progresivamente unidades de glucosa a partir de una molécula no terminal reducida.. También puede hidrolizar los enlaces α – (1,6), si bien lo hace muy lentamente. (Catherine Adley y otros. 1999). Las amiloglucosidasas parcialmente purificadas exhiben máxima actividad a bajos pH entre 4.5-6.0, presentando gran estabilidad sobre condiciones ácidas (pH 4.0-7.0). Una máxima actividad ocurre a

temperaturas entre 50-60°C, presentando estabilidad por más de 10 horas a 55°C (Lima, *et, a* 1999).

3.8 FERMENTACION

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía. La reacción global general que resume todo el proceso cuando se fermentan hexosas es:



Las materias primas vegetales que pueden potencialmente emplearse para producir alcohol son muy diversas, aunque genéricamente se incluyen preferencialmente aquellas ricas en hidratos de carbono, las cuales pueden agruparse en dos categorías desde el punto de vista de la fermentación: Directamente Fermentables e Indirectamente Fermentables

De acuerdo con esas categorías, las primeras no requieren transformaciones previas en hidratos de carbono, como acontece con la Sacarosa, la Glucosa y la fructosa. En el caso de las fuentes indirectas si necesitan realizar conversión previa en carbohidratos, para someterla luego a la fermentación, con el objeto de que puedan ser asimiladas por la levadura Alcohólica, tal es el caso de los almidones y la celulasas (Chávez. M.A, 2003)

Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de bioetanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que

también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se insufla una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos.

En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares produciendo energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las levaduras.

3.8.1 Microorganismos empleados: Las fermentaciones alcohólicas son llevadas a cabo por microorganismos. Se han utilizado diversas clases de levaduras, bacterias y hongos en la obtención de etanol.

Tradicionalmente, las levaduras son los microorganismos más empleados. Las levaduras son hongos unicelulares y uninucleados, que pueden reproducirse por gemación, fisión o ambas. Las levaduras son microorganismos tremendamente resistentes, siendo capaces de funcionar eficientemente en condiciones adversas. Pueden ser capaces de producir etanol a temperaturas de 35°C, con niveles ligeros de contaminación y altos niveles de alcohol en el medio, la cual puede llegar hasta una concentración de 18% dentro del caldo de fermentación (Lin. Y y Tanaka. S, 2006). Así mismo, es considerada por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, es un aditivo alimenticio seguro para consumo humano, siendo adecuada para producir bebidas alcohólicas y pan.

Se ha propuesto el empleo de cultivos mixtos de levaduras que asimilen tanto hexosas como pentosas, pero surge el problema de que estos microorganismos crecen más rápido y su conversión a EtOH es más elevada (Sánchez. O y Cardona. C, 2005).y (Laplace et all. 1993) emplearon un mutante de

Saccharomyces cerevisiae con capacidad respiratoria deficiente, cultivado junto con *Pichia stipitis* en cultivos por lotes y continuos en condiciones limitadas de O₂, obteniendo para este último caso la conversión del 100% de glucosa y del 69% de xilosa a una tasa de dilución de 0,02 h⁻¹.

Entre las especies de levadura más empleadas se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (anterior *S. carlsbergensis*) y *Candida utilis*. En ocasiones se usan *Saccharomyces anamensis* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las especies de *Kluyveromyces*, las cuales fermentan lactosa, son buenas productoras de etanol a partir de suero (Kosaric. N, et al, 1987)

Otra alternativa para aumentar la conversión de biomasa consiste en incluir la fermentación de pentosas en la SSF (Sacarificación y co - fermentación simultanea). En este proceso se basa la tecnología diseñada a partir de astillas de madera, en este diseño se plantea la utilización de *Zymomonas mobilis*, la cuál convierte 1 mol de hexosa en un mol de EtOH, liberando solo un mol de ATP, lo que resulta en mayores rendimientos (Hasta un 97% del máximo teórico) esta bacteria tiene una alta tolerancia al alcohol (100gr/Lt) pero su rango de sustratos fermentables es también muy estrecho (Glucosa, fructosa y sacarosa). (Hawgoob et al, 1985, Claassen. V, et al, 1999). También se puede mencionar la bacteria *C. thermosacharolyticum* quien permite la conversión simultanea en etanol de las pentosas formadas en la hidrólisis de la hemicelulosa. La principal dificultad reside en la formación de subproductos como el ácido acético, lo que limita los rendimientos; Además, la tolerancia al etanol por parte de esta bacteria es reducida (.Sánchez. O y Cardona. C, I 2005).

Por ultimo utilizando técnica de ingeniería genética (recombinantes) se han enzimas exógenos, y utilizar solo la levadura para la transformación biológica. De igual manera se han desarrollado cepas de *S. Cerevisiae* a las cuales se la ha introducido un plasmido que la confiere la capacidad de expresar los genes que codifican la α -amilasa de la bacteria *Bacillus subtilis* y la glucoamilasa del hongo

Aspergillus awamori, adquiriendo así la habilidad de convertir el almidón en EtOH. Con esta levadura, Ulgen et al. (2002) reportaron mayores concentraciones de etanol producido en cultivos por lotes alimentados (47.5 g/L) que en cultivos por lotes (15.6g/L) (.Sánchez. O y Cardona. C, II 2005).

3.8.2 Etanol: El Etanol conocido también como Alcohol Etílico, es un líquido incoloro de fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (también expresado como $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), inflamable, de olor y sabor agradable, miscible en agua en todas las proporciones y con la mayoría de disolventes orgánicos; su punto de ebullición es de 78.1°C . Es un componente fundamental de las bebidas alcohólicas, se utiliza también como disolvente, limpiador, combustible, en la fabricación de acetaldehído, perfumes, pinturas, barnices y explosivos y como intermedio en síntesis orgánicas de diversos compuestos (ácido acético, éter, butadieno, etc.) (Chávez.M.A, 2003).

3.8.2.1 Ventajas del Etanol como combustible: El Etanol es un biocombustible que ofrece grandes ventajas en virtud de sus características físico-químicas, materias primas de origen, costos de producción relacionados y efectos ambientales, entre muchas otras.

Seguidamente se anotan algunas de sus ventajas al ser empleado como combustible las cuales fueron señaladas por Bailey. B.K (1996); Barreto. T.J (1980); Briceño.C.O y Calero.C (2000-2004); Correa.L.C (2002, 2003); Chaves Solera.M.A (1993, 2003); Sabino Ometo.J.G (1998); Villena.M (2003):

- 🚧 Disminuye por sustitución parcial o total, cantidades importantes de gasolina y con ello de petróleo importado mejorando la Balanza Comercial.

- 🚧 Reduce la importación de hidrocarburos y con ello su dependencia extrema.

- ✚ El Etanol como biocombustible contrarresta y reduce el impacto de los problemas recurrentes de precios y reservas de Hidrocarburos en periodos de crisis de petróleo.

- ✚ Favorece como materias primas, el uso de recursos naturales renovables nacionales como es el caso de la caña de azúcar, el maíz, el sorgo, la yuca, el camote, el banano, la piña, los tubérculos, la melaza y en general cualquier producto (carbohidratos) fermentable. Prácticamente, cada país puede producir su propio biocombustible. De esta manera, la materia prima para la obtención de etanol esta “descentralizada” y no coincide con los centros de suministro de combustibles fósiles.

- ✚ Genera un ahorro significativo de divisas, las cuales serían empleadas en la importación de hidrocarburos (Costo de Oportunidad).

- ✚ Promueve y fomenta la reactivación económica y productiva; así como las inversiones nacionales en la zona rural, particularmente en el sector agropecuario.

- ✚ Establece una agrocadena donde se integran varios eslabones público-privados importantes, que incluye sectores: Energético-Agrícola-Industrial-Social-Ambiental-Económico.

- ✚ Se fomenta el comercio y el empleo rural en zonas deprimidas, contrarrestando la migración hacia los centros de población urbana. Puede operar también impulsando regiones nuevas con potencial agroindustrial.

- ✚ Fortalece y fomenta el desarrollo científico y tecnológico en todos sus alcances.

- ✚ El octanaje y la calidad de las gasolinas se aumenta y mejora, por lo que tiene una alta potencia como combustible. El etanol tiene mayor número de octanos respecto a la gasolina no oxigenada.

3.8.2.2 Limitantes del Etanol como combustible: Como cualquier otra fuente energética, al Etanol se le distinguen, identifican y atribuyen algunas deficiencias de índole funcional y mecánico que presuntamente limitan o perjudican su empleo como biocombustible, tanto en forma pura o en mezcla con la gasolina. Entre esas limitantes pueden citarse como más relevantes las siguientes:

- ✚ Su producción se dice que esta directamente ligada y es dependiente de los precios Internacionales de la fuente de carbohidratos empleada.
- ✚ La capacidad productiva de etanol anhidro en el país se considera que es limitada e insuficiente para poder atender y satisfacer las necesidades nacionales actuales y futuras, requeridas por un proyecto de esta magnitud.
- ✚ Si bien se acepta que el etanol contamina menos que el MTBE al mezclarse con la gasolina, también se reconoce que siempre se genera algún grado importante de polución atmosférica durante el periodo de zafra; sobre todo si las plantaciones de caña que dan origen a la materia prima a partir de donde se obtiene el alcohol son quemadas durante su cosecha, lo que anula su aporte y beneficio ambiental.
- ✚ La operación y funcionabilidad general de los vehículos es inferior a la tradicional mezcla combustible utilizada actualmente (Gasolina + MTBE), limitando con ello su eficiencia, lo que significa una pérdida para el usuario.
- ✚ Los vehículos no están estructural y mecánicamente preparados y adaptados para operar con mezclas de gasolina con etanol.

✚ El alto grado de solubilidad y afinidad que existe entre el etanol y el agua pueden inducir problemas en la operación de los vehículos, al provocar separación de fases en los tanques de depósito.

(Chávez Solera. M.A, 2004).

3.9 EL ALCOHOL CARBURANTE EN COLOMBIA

En Colombia el tema de oxigenación de la gasolina es algo nuevo, sin embargo éste incluye una amplia historia a través del tiempo y en diversos contextos culturales, de hecho después de la primera guerra mundial en Francia el alcohol como combustible era indispensable, tanto que durante la segunda guerra mundial aquellos países donde el petróleo escaseo el alcohol fue protagonista.

En la década de los 70 debido a la crisis del petróleo donde los precios del crudo tomaron valores exorbitantes países como Brasil con grandes cantidades de hectáreas sembradas de caña miraron la posibilidad de producir alcohol carburante que sustituiría los volúmenes de petróleo que necesitaban importar, llegando hoy Brasil a producir 13 billones de litros/ año y a exportar a diferentes mercados del mundo.

En la década de los noventa, nuestro país inició un proceso de reformulación de los combustibles utilizados como carburantes, teniendo en cuenta los problemas de tipo ambiental ya reconocidos universalmente y los avances tecnológicos en los motores tanto de combustión interna y de diesel. Así las cosas, se suspendió el uso de mejoradores de octanaje como el tetraetilo de plomo, se redujo la presión de vapor para evitar altas tasas de evaporación y se arrancó el programa de aditivación de las gasolinas para mejorar la combustión. Por estas consideraciones, el Gobierno Colombiano estableció que a partir del año 2005 las gasolinas consumidas, debían contener oxigenados para disminuir las emisiones

contaminantes principalmente el CO (Monóxido de Carbono) el que contribuye al calentamiento global, precursor de enfermedades coronarias y respiratorias y el envenenamiento. (UMPE 2004)

Así las cosas, en el 2001, por iniciativa parlamentaria se sancionó la ley 693, mediante la cual se reglamentó el uso de alcoholes carburantes, se crearon estímulos para su producción, comercialización y consumo y se dictaron otras disposiciones. Dicha norma estableció la obligatoriedad de que en el país se utilicen en los centros urbanos de más de 500.000 habitantes gasolinas oxigenadas con alcohol a partir de septiembre de 2005.

Entendiendo la importancia del tema y particularmente la posibilidad de obtener el alcohol a partir de biomasa, se vislumbro la posibilidad de generar un estímulo grande al desarrollo del agro particularmente de la caña de azúcar, por ser este un excelente cultivo para producir energía por su elevado nivel de eficiencia en el proceso fotosintético, condición que lo ubica en la primera opción para la producción de etanol combustible. Cultivos como la yuca, papa, remolacha, maíz fueron considerados para regiones de características agro ecológicas que hagan rentable su utilización como la Atlántica donde además se está considerando el ñame.

El 10% de etanol en las gasolinas según lo define la Ley, demandará cerca de 700 millones de litros al año de alcohol, correspondientes a cultivos de caña de 150 mil hectáreas.

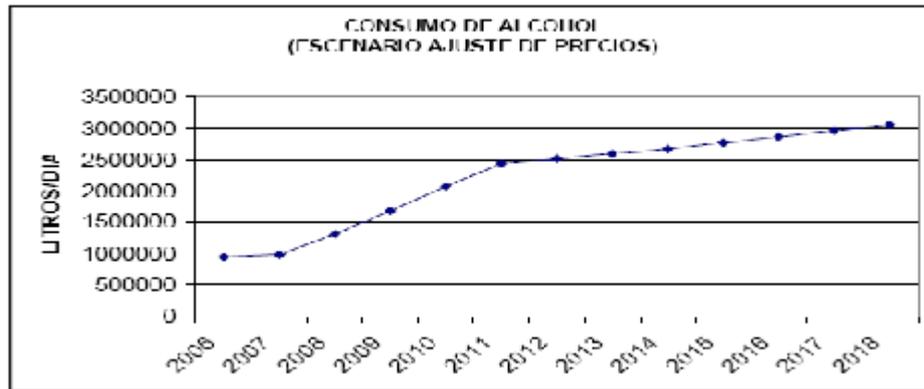
3.9.1 Producción de alcohol y mercado potencial en Colombia: El alcohol carburante podrá ser producido por la biomasa procedente de cultivos agrícolas de acuerdo con lo dispuesto en la Ley 693. Los alcoholes carburantes (en nuestro caso el etanol anhidro), en primera instancia se obtendrá a partir del procesamiento del cultivo de la caña de azúcar. Según estimaciones realizadas, para cumplir con los requerimientos de Ley 693 del 2001 de adicionar un 10% en volumen de alcohol a la gasolina consumida en el futuro, deben crearse cerca de

150 000 empleos entre directos e indirectos en su mayoría dentro del sector agrícola, quienes se ocuparán de la producción de cereales, oleaginosas y hortalizas y luego para la construcción de las destilerías que permitirán la producción de alcohol.

Por la elevada eficiencia en el proceso de fotosíntesis, la caña de azúcar se constituye en uno de los cultivos mas destacados para la producción de etanol. Simultáneamente se están teniendo en cuenta otros cultivos que permitan desarrollo en distintas regiones del país, intentando garantizar que la producción de alcoholes sea polo de desarrollo a nivel nacional. Una vez producido el alcohol y según la resolución 180687 del Ministerio de Minas y Energía emitida el 17 de junio del 2001], los productores de alcohol deben adicionar un desnaturizante al etanol, tratándose generalmente de gasolina, para evitar que el alcohol se desvíe hacia otros fines y garantizándose su calidad por parte de los productores de acuerdo con las normas establecidas en la resolución 447 del 14 de abril de 2003. Posterior, a la producción de alcoholes se realiza su transporte hasta las plantas de almacenamiento mayorista donde se realiza el mezclado, sin embargo el transporte del alcohol debe garantizar la no presencia de agua y seguir las condiciones de seguridad establecidas en el decreto 1609 de 2002, es por esto importante que Ministerios como Minas y Energía, Transporte y Medio Ambiente crean mecanismos de control para evitar el deterioro del producto.

3.9.2 Proyecciones de consumo de alcohol: Teniendo en cuenta los escenarios sobre ajuste de precio, según la Unidad de Planeación Minero Energética de la Republica de Colombia se calculo el consumo de alcohol carburante en el país para los próximos años; tal como se aprecia en la grafica 5

Grafica 5 Consumo de alcohol en los próximos años



Fuente: UMPE¹ 2003

Estas proyecciones convierten al país en un potente competidor mundial en el negocio de los combustibles, la tabla 4 ilustra los posibles clientes masivos de este promisorio producto que a su vez cuida el medio.

Existen varios países que consumen etanol en el mundo con volúmenes considerables, por ejemplo Japón es un país con un potencial de mercado de alcohol carburante bastante importante ya que todo el etanol que consume es importado por ejemplo para el año 2010 Japón consumirá entre 6 y 12 millones de M³/Año, es decir entre 6 y 12 billones de litros año aproximadamente entre 16 y 32 millones de litros día. Otro mercado potencial es USA el cual actualmente está importando alcohol del Brasil, existen países de Latinoamérica como Costa Rica y Republica Dominicana quienes también implantaran el uso de etanol carburante lo que los convierten en potenciales mercados.

Tabla 4 Consumo mundial de alcohol carburante año 2010

¹ UMPE, Unidad de Planeación Minero Energética –República de Colombia Av. Calle 40 A N° 13-09 Pisos 5, 11 y 14, Bogotá D.C. Colombia PBX : (+571) 2-875334 <http://www.upme.gov.co>.

PAIS	MILLONES DE M3/ AÑO
USA	18 -20
BRAZIL	15-18
JAPÓN	6-12
UNION EUROPEA	2-3
HEMISFERIO OCCIDENTAL	1-3
OTROS ASIA	1-3
CANADA	1-1.5
AFRICA	0.5-1
AUSTRALIA	0.5-1

Fuente: Seminario Internacional Alcohol Carburante Junio 2003

3.9.3 Alcohol carburante en Sucre: Desde comienzos del mes de septiembre del 2006, FINAGRO con el concurso de la Gobernación de Sucre adelantan los trabajos de campo para la puesta en marcha y funcionamiento de una planta de alcohol carburante en Sincelejo. Emigdio Murillo Arias, funcionario de FINAGRO, quien se desempeña como interventor agronómico del proyecto de montaje y puesta en marcha de la planta de alcohol carburante, sostiene que trabajarán durante tres meses seguidos, para mirar los terrenos y conocer a los agricultores en aras de orientar un proyecto sobre bases sólidas reales. Basándose en que se han sembrado unas 20 mil hectáreas de yuca por año, lo que pone al Departamento como el número uno para la puesta en marcha del proyecto de montaje de la planta de alcohol carburante.

Para el funcionamiento y la rentabilidad de esta planta, hay que partir de que la relación de producción de yuca a alcohol carburante es de 5 toneladas de yuca para producir un litro de alcohol. En tal sentido, se estimaría 20 mil kilos de yuca para obtener 200 litros de alcohol carburante, y dependiendo de esta relación, se requiere una producción igual o superior a 20 toneladas por hectáreas, eso, para hablar de rentabilidad del proyecto y de los cultivadores.

En la actualidad, La secretaría de Desarrollo Económico del Departamento trabaja en la siembra de 150 hectáreas de yuca industrial, con el apoyo de INCODER, el cual está destinado para la producción de semilla de yuca industrial en las variedades de Verónica, La P-12 y la M-TAY, con lo que se espera que para el próximo año se duplique el área de tierras cultivadas actualmente. Este proyecto

inicialmente se trabaja en los municipios de El Roble, Buenavista y Corozal, lo que se convierte en la base inicial para el montaje de la planta de alcohol carburante en Sincelejo. El Gobierno Nacional tiene la prioridad de montar en Sucre la planta de alcohol carburante por ello ya se trabaja con una firma consultora, para el estudio de este proyecto, para lo cual se arrancó con el suministro de la base de datos de las asociaciones e identificarlas, como integrantes al proyecto de la planta. (EL UNIVERSAL 2006).

En la actualidad se calcula que en Sucre hay unas 3200 hectáreas sembradas de yuca industrial. Se estima que en un inicio se requieren unas 6 mil hectáreas para generar el alcohol que se necesita para ser productivo dicho proyecto. En la lista de asociaciones de yuqueros que harían parte del proyecto aparecen 80, pero de estas, algunas como El Minuto de Dios, que reúne a pequeños productores, han manifestado quedarse con el sistema actual de sembrar y vender yuca picada deshidratada para la industria de concentrados.

3.9.3.1 Marco legal: La ley establece que para el 2010 en ciudades con más de 500 mil habitantes el consumo de combustible en sus vehículos debe contar con el 10% de alcohol carburante, es decir, una mezcla donde el 90% restante debe ser gasolina. En la actualidad en Colombia, teniendo en cuenta que algunas zonas como el Occidente y parte del centro del país ya empezó a consumir etanol en sus carros, la demanda es de un millón 370 mil litros diarios de dicho combustible y solo se está generando un millón de litros. Entonces cuando en todo el territorio empiece a consumirse el combustible el déficit va a ser mayor, pues cada mil kilos de yuca produce 200 litros de alcohol. (EL UNIVERSAL, 2006)

4- DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de estudio en el que se basó esta investigación fue exploratorio-descriptivo.

4.2 UNIVERSO Y LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación se ejecutó en las instalaciones del laboratorio de Bromatología y Microbiología de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja, en la ciudad de Sincelejo-Sucre, Colombia, a los 9° 18' de latitud Norte y 75° 23' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich, a una altitud de 231,85 yardas sobre el nivel del mar (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1998), La materia prima fue recolectada en el municipio de Tierra alta (Córdoba).

4.3 VARIABLES

4.3.1 Variables Independientes: Concentración de harina de ñame: 10, 13, 16% p/p base seca.

Variedad (2):, D bulbifera, D trífida.

4.3.2 Variables Dependientes: Rendimiento (Lt etanol producido/Ton, materia prima.

✚ Equivalentes de dextrosa

✚ Grados Brix

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño factorial categórico completamente al azar con tres repeticiones para un total de 24 experimentos.

Para el análisis de la información se realizó un análisis ANOVA, una prueba de múltiples rangos, que describirá, una grafica de dispersión por nivel, una grafica de interacción, todo con un nivel de confianza del 95%.

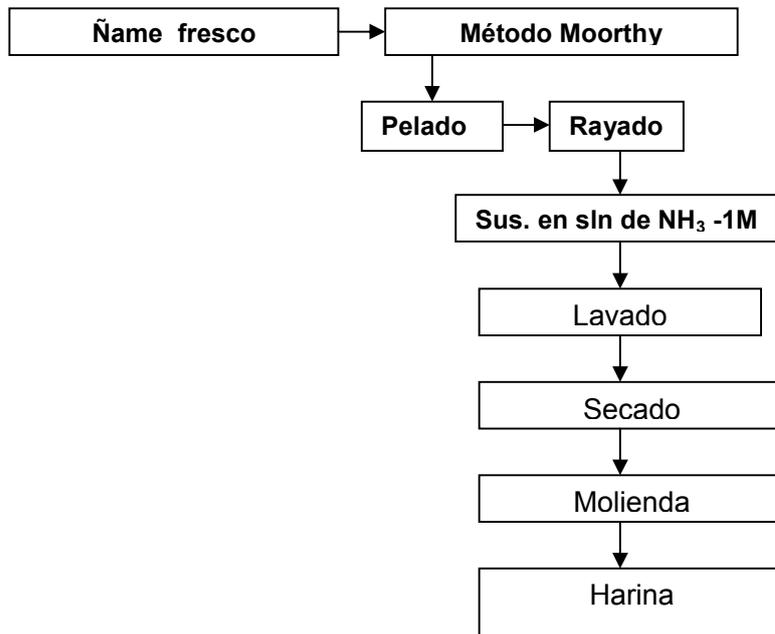
4.5 PROCEDIMIENTOS

4.5.1 Selección y preparación de la materia prima. Para la escogencia de la materia prima se seleccionó un predio, en el cual se realizó un muestreo por cuarteo para obtener un ñame que represente al cultivo, el cual se pesó y sometió a limpieza, luego se determinó el contenido de humedad según método 7.003/84, 930.15/90 de la AOAC adaptado.

4.5.1.1 Obtención de la harina. El ñame muestreado fué lavado con una solución 1M de amoníaco con el fin de eliminar completamente el residuo mucilaginoso del tubérculo, luego se rallo y extendió en capas finas para lograr un completo secado, molido y empacado (Moorthy. S.N, 1991).

4.5.1.2 Preparación de sustratos iniciales. Basado en el contenido de humedad se prepararon soluciones (500 ml) en base seca de harina de 10, 13, 16 % p/v, y se le determinó los azúcares reductores por el método descrito por Miller G L_(D.N.S.). Como se ilustra en la grafica 5.

Grafica 6 Metodología para la etapa de preparación de la materia prima.



4.5.2 Hidrólisis Enzimática: Las enzimas utilizadas para la hidrólisis enzimática fueron: pectinex® Ultra SP-L, Termamyl® 120 L Tipo L (Licuefacción) y AMG 300 L (sacarificación), de la Novo Nordisk, en las condiciones y cantidades estipuladas por los fabricantes, que se encuentran en los respectivos catálogos basados en su actividad enzimática. Ver anexo A.

Durante la hidrólisis se efectuaron mediciones de los grados Brix mediante refractómetro ausJENA DDR 783243 (0-30%), al igual que de azúcares reductores a través de la técnica del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (Miller. G. L, 1959), determinándose los Equivalentes de Dextrosa (E.D), durante el tiempo de residencia de cada enzima. Esta técnica permitió elaborar una curva de calibración empleando un patrón de glucosa de (1g/l); leído en un espectrofotómetro Merck SQ 118 V1.70 a 565 nm.

4.5.2.1 Montaje de los biorreactores para la hidrólisis: Se utilizó un baño termostático con control de temperatura (termostato de circulación tipo V15c). Los ensayos se montaron en beacker de 1000 ml con un volumen de reacción de 500 ml, cuyas concentraciones de las soluciones de harina de ñame fueron del 10%,

13% y 16% p/v, agregando previamente como cofactor enzimático 35 ml de solución de CaCl₂ a 70 ppm, con agitación constante de 250 rpm, realizando 4 ensayos por cada concentración de harina de ñame de las variedades trífida y bulbifera.

4.5.2.2 Licuefacción: Para este proceso se usaron las enzimas Pectinex Ultra SP-L y Termamyl 120 tipo L. En un beacker de 1 litro con agitación de 250 rpm se introdujo la solución, elevándose la temperatura hasta 60 °C durante 15 minutos agregándose las enzimas Pectinex Ultra SPL y Termamyl 120 L de la Novo Nordisk en las condiciones y cantidades estipuladas en la tabla 5. Posteriormente continuando con el proceso de licuefacción la temperatura es elevada a 90 °C con un tiempo de residencia de 2 horas hasta obtener una concentración constante de los azúcares reductores.

Tabla 5 Condiciones de uso de las enzimas usadas en el proceso de licuefacción

Variedad	Enzimas	Cantidad de enzima por concentración (ml)			Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	pH
		10%	13%	16%			
D Bulbifera	Pectinex SP-L	4.58	6.0	7.39	35	1	4.5
	Termamyl 120L	0.040	0.052	0.07	90 – 95	2	6.5
D Trífida	Pectinex SP-L	4.66	6.05	7.45	35	1	4.5
	Termamyl 120L	0.042	0.054	0.072	90 – 95	2	6.5

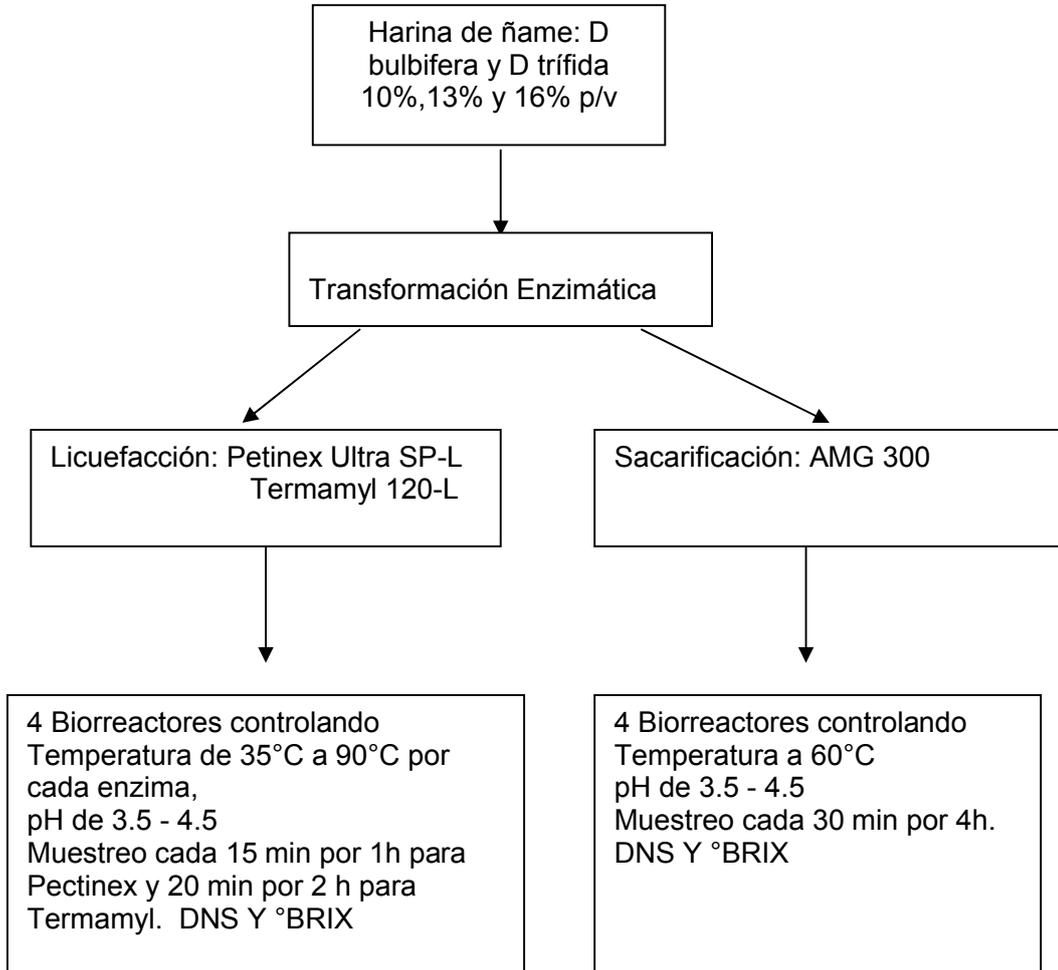
4.5.2.3 Sacarificación: En este proceso de obtención de glucosa por sacarificación se agregó la enzima amiloglicosidasa (AMG 300 de la Novo Nordisk) en las cantidades estipuladas en la tabla 6, ajustando el pH a 4.5 con una

solución tampón de ácido sulfúrico, enfriando y controlando la temperatura a 60 °C con agitación de 250 rpm, el tiempo de hidrólisis estuvo determinado por la constancia de los azúcares reductores, esto fue de 4 horas. (ver grafica 6)

Tabla 6 Condiciones de uso de la enzima AMG usada en el proceso de sacarificación

Variedad	Enzima	Cantidad de enzima por concentración (ml)			Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	pH
		10%	13%	16%			
D. Bulbifera	AMG 300	2.37	0.3	3.98	60	4	4.5
D. Trífida	AMG 300	2.40	3.32	4.06	60	4	4.5

Grafica 7 Metodología para la etapa de hidrólisis enzimática

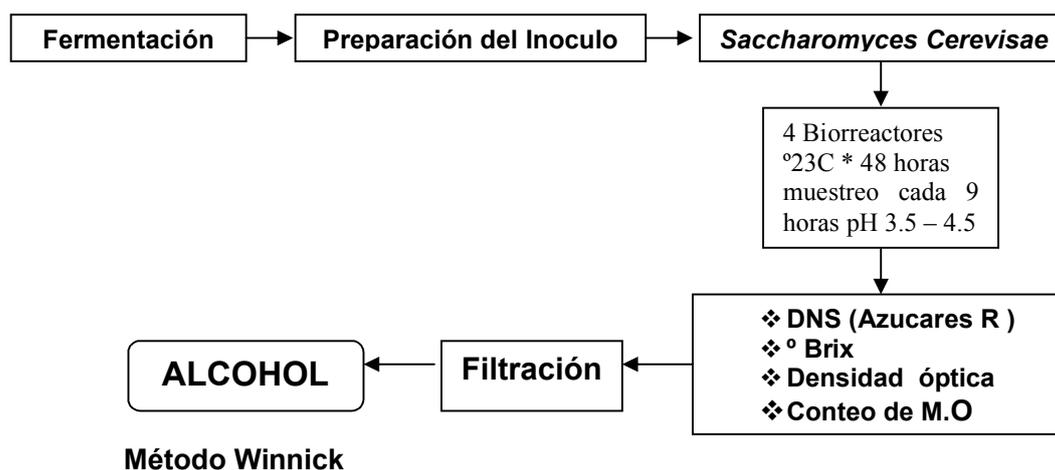


4.5.3 Fermentación: La fermentación alcohólica se llevó a cabo durante 48 horas, tomando muestras a cada uno de los ensayos en los tiempos 0, 9, 18, 27, 36, 45 y 48 horas. Durante este tiempo se efectuaron mediciones de los grados Brix concentración (%v/v) de etanol (Winnick, 1984) y crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* por conteo directo en cámara de Neuvauer.

4.5.3.1 Preparación del inóculo: Para esta etapa se preparó un inóculo cuyas características garantizó una concentración inicial en el fermentador de 10^6 microorganismos/ml.(0.2% p/p) proporcionándole los nutrientes característicos para este tipo de fermentación ((NH₄)₂SO₄ (1g/l), KH₂PO₄ (0,1g/l), MgSO₄ . 7 H₂O (0,2g/l) (Horii, 1978)).

4.5.3.2 Filtración. Una vez terminado el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación se procedió a la filtración del mosto, al secado y pesado del residuo, por el que se determinó la cantidad de harina que no fue transformada. (ver la grafica 7).

Grafica 8 Metodología para la etapa de fermentación



4.6 EVALUACION DEL RENDIMIENTO

Para evaluar el rendimiento se empleó un diseño con un único factor categórico completamente al azar en cuatro bloques y en seis niveles, para un total de 24 experimentos. Se realizó un análisis de varianza, una prueba de múltiples rangos y una gráfica de dispersión por nivel con una confiabilidad del 95%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PREPARACION DE LA MATERIA PRIMA

En la tabla 7 se relacionan los resultados de las pruebas de caracterización realizadas a una muestra de la materia prima, partiéndose de una cantidad inicial de ñame de 10Kg para D, bulbifera y de 8 Kg para D, trífida.

Tabla 7 Contenidos de materia seca y porcentajes de humedad y de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida.

Variedad	D. bulbifera	D. trífida
Peso de ñame fresco (Kg)	13	15
Peso de ñame sin cáscara (Kg)	12.5	14.3
Peso de la cáscara (Kg)	0.5	0.7
Peso de la Harina seca (Kg)	9.77	9.69
Peso de Harina húmeda (Kg)	10.88	10.81
% Materia seca	90.9	92.6
% Humedad harina	10.16	10.33

Se puede apreciar como la variedad D. bulbifera presentó un menor porcentaje de humedad en fresco, en comparación con la D. trífida, sin embargo la diferencia entre el porcentaje de humedad de la harina de ambas es muy poca. Los datos obtenidos de materia seca y porcentajes de humedad son muy cercanos a los descritos por Racherd y Viscarrondo; (2006), quienes reportaron un porcentaje de humedad de 10,73% para la variedad trífida.

5.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En este trabajo se evaluó el proceso de hidrólisis, el cual implica dos etapas denominadas licuefacción y sacarificación. El proceso de licuefacción se inició tomando 50 , 65 y 80 gramos de harina de ñame en sus respectivas concentraciones (10%, 13% y 16% p/v) para obtener 500 ml de solución, al que se le adicionaron las dos enzimas, Pectinex SL-P y termamyl 120L . Para la sacarificación se adicionó la tercera enzima AMG 300 a los 240min. Teniendo en cuenta los requerimientos de uso para cada una de ellas.

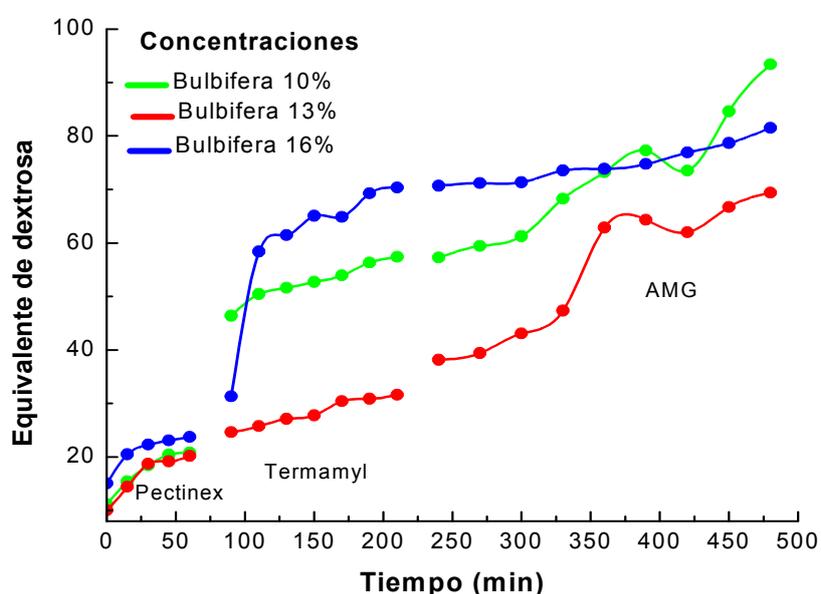
5.2.1 Comportamiento de *Dioscorea bulbifera*: La grafica 9 muestra como aumentan los equivalentes de dextrosa a medida que se van adicionando las enzimas, esto es 11.12 a 93.38 unidades de dextrosa para la concentración del 10% p/v, de 10.00 a 69.38 E.D para el 13% p/v y de 15.02 a 81.52 E.D para el 16% p/v, se aprecia como los mejores rendimientos al final del proceso se obtuvo en la solución de menor concentración.

Con la adición de la enzima pectinex no se demuestran grandes diferencias entre concentraciones sin embargo la concentración 16% p/v mostró que sus resultados fueron mayores que las concentraciones 10% y 13% respectivamente, lo que se aprecia fácilmente al graficar estos valores.

Luego al adicionar la enzima Termamyl se denota la gran velocidad e intensidad que ejerce esta en la composición química de la harina en cuanto a la producción de equivalentes de dextrosa, en el proceso de licuefacción donde las curvas adquieren valores que oscilan entre 46,37 E.D y 57.34 E.D para la concentración 10% p/v, y producciones máximas de 70,31 E.D a los 210min para la concentración 16% demostrando de acuerdo a sus resultados que presento mayores valores de E.D respecto a las concentraciones 10% y 13% p/v .De esta manera termina el proceso de licuefacción, y se da paso a la adición de la tercera

y ultima enzima la cual tiene una incidencia definitiva en la producción de equivalentes de dextrosa en el proceso de sacarificación; aumentado vertiginosamente los valores presentes en todas curvas, donde la concentración 10% p/v fue de 93.38 E.D , mientras que las concentraciones 13% y 16%p/v fueron de 69.36 y 81.52 E.D al termino del proceso.

Gráfica 9 Proceso de hidrólisis enzimático en D. bulbifera

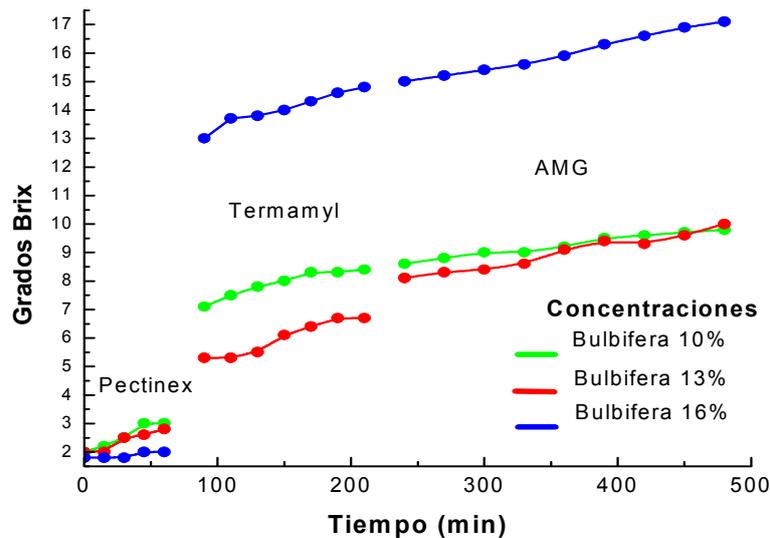


En el anexo B se registraron los datos correspondientes a los equivalentes de dextrosa y grados Brix. El comportamiento de los grados Brix en la grafica, son directamente proporcionales a los equivalentes de dextrosa, sin embargo aquí los mayores valores se obtuvieron en la concentración más alta, esto es de 17.1 para el 16%p/v.

En la gráfica 10 se ilustran los valores de los grados Brix de las diferentes concentraciones de harina utilizadas, notándose claras diferencias en los valores

máximos, lo cual se debe a la diferencia en las concentraciones y a la acción efectiva de las enzimas en cada una de ellas.

Gráfica 10 Proceso de hidrólisis enzimático en *D. bulbifera* (°Brix)



5.2.2 Comportamiento de *Dioscorea trifida*: En el anexo C se registraron los datos correspondientes a equivalentes de dextrosa y °Brix para la variedad D trífida la cual se comporta de forma similar a la variedad D. bulbifera en cuanto a la tendencia de las curvas de equivalentes de dextrosa, aumentando proporcionalmente a medida que se desarrolla el proceso de hidrólisis enzimática.

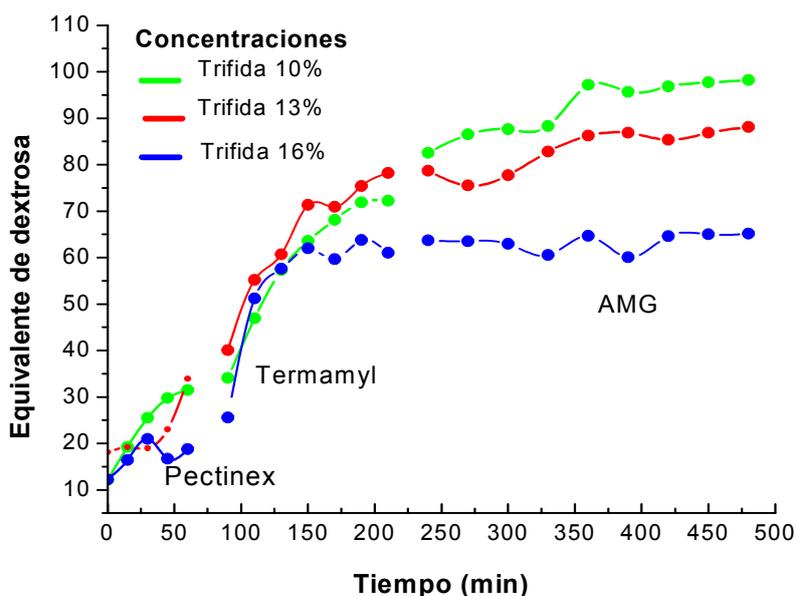
En la grafica 11 se puede apreciar que durante el proceso de hidrólisis se observa como los valores máximos se dan en la concentración 10% p/v llegando hasta 90,120 unidades de equivalentes de dextrosa, dicho valor se asemeja a los presentados en la literatura: Novo Nordisk recomienda usar AMG y Promozyme para alcanzar valores de ED iguales a 95, hidrolizando el almidón de yuca. Benavides (1983) obtuvo valores de 95, hidrolizando harina de arroz. Caro (1986) alcanzo valores de ED de 81 para la sacarificación de almidón de yuca solo

utilizando AMG y Chica (1996) logro rendimiento de 85-90% hidrolizando almidón de papa.

Para las concentraciones 13% y 16% p/v se alcanzan valores finales e 88,12 y 65,13 unidades de equivalentes de dextrosa respectivamente.

Al final del proceso se observa que la enzima AMG no presento rendimientos favorables en la producción de ED para la concentración 16% proporcionando solo un aumento de 1.44 desde los 240min hasta el final del proceso 480 min indicando que las cantidades de productos a pesar del aumento del tiempo no varían sustancialmente.

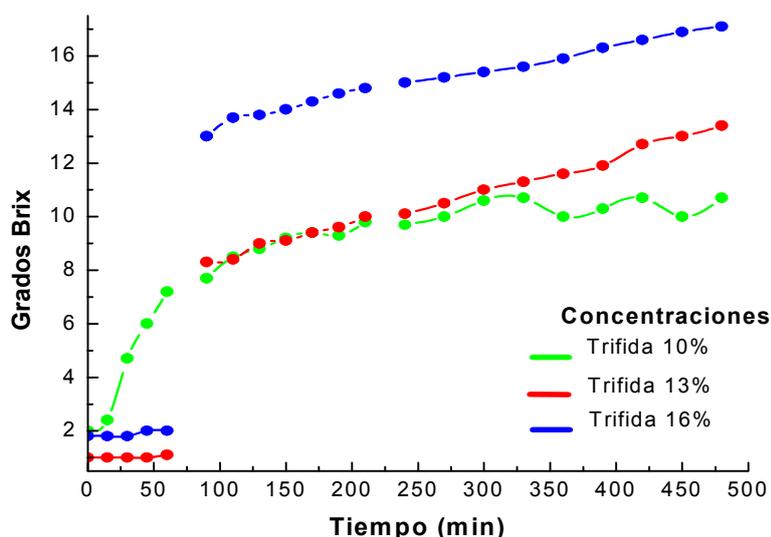
Gráfica 11 Proceso de hidrólisis enzimático en D.trífida



En la grafica 12 se representan los valores de los grados Brix para las concentraciones 10%, 13%, y 16%p/v de la variedad D.trífida en el periodo de licuefacción y sacarificación .donde se aprecia un incremento de sólidos solubles que oscilan entre 2 y 17.1.

Para cada concentración se observaron claras diferencias en los valores máximos atendiendo a la efectividad del tratamiento enzimático de esta manera; 10,7 para 10% p/v, 13,4 para el 13% p/v y 17,1 para el 16% p/v, este ultimo valor concuerda con los resultados obtenidos en la variedad D bulbifera a igual concentración. Con la variedad D. trifida se obtuvo un aumento en los valores de los grados Brix para las concentraciones 10% y 13% p/v con respecto a la variedad D. bulbifera en iguales concentraciones. A pesar de esta diferencia el comportamiento en las curvas en los grados Brix en ambas variedades son similares.

Gráfica 12 Proceso de hidrólisis enzimático en D.trifida (°Brix)



5. 3 FERMENTACIÓN

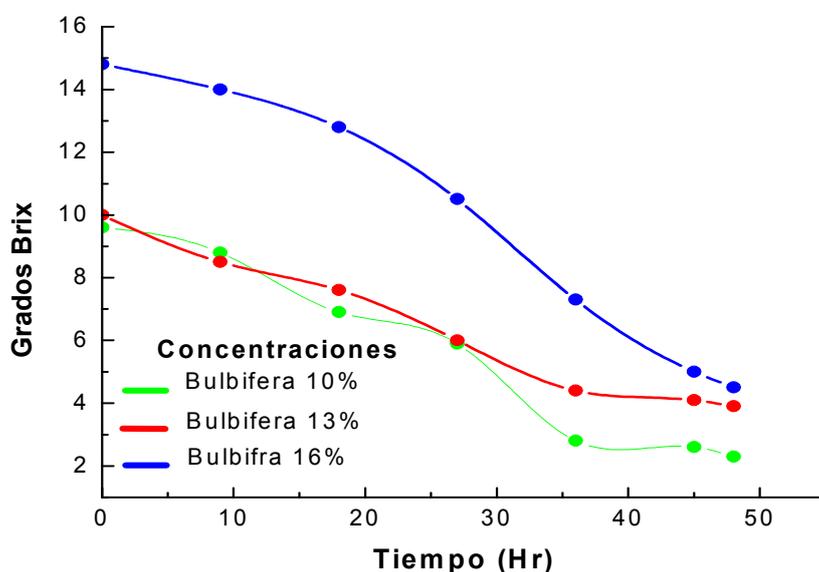
Para evaluar el resultado de este proceso se observaron diferentes factores que se registraron periódicamente (cada 9 h.) durante 48 horas; los cuales se clasificaron así; grados Brix, equivalentes de dextrosa, conteo de

microorganismos, porcentaje de alcohol (ml de tiosulfato) y evaluación de los rendimientos durante el proceso de obtención de alcohol. Los datos fueron registrados en el anexo D.

5.3.1 Grados Brix: El comportamiento de los grados Brix en los tres tratamientos de la variedad D bulbifera 10%, 13% 16% se ilustran en la grafica 13, donde las curvas para las tres concentraciones tienden a disminuir a medida que avanza el proceso de fermentación; Al cumplir las 48 horas se registran valores de grados Brix que datan así: Para la concentración 10% p/v el valor final fue de 2,3 , en la concentración 13% p/v fue 3,9 y en la de 16% p/v el valor fue de 4,5.

Cabe anotar que la concentración del 10% p/v presentó una mayor disminución de los productos hidrolizados, esto demuestra una fermentación más completa a lo largo de todo el proceso, en comparación con la concentraciones 13% y del 16 % p/v, esto es debido al incremento de las presiones osmóticas por las altas concentraciones de sólidos solubles, lo que conlleva a un incremento de etanol intracelular y por consiguiente una baja en el nivel de las enzimas intracelulares que intervienen en la producción de etanol, pues se ha demostrado que las membranas citoplasmáticas y de varios organelos son el principal blanco a la inhibición por etanol (Ingram y Buttke, 1984).

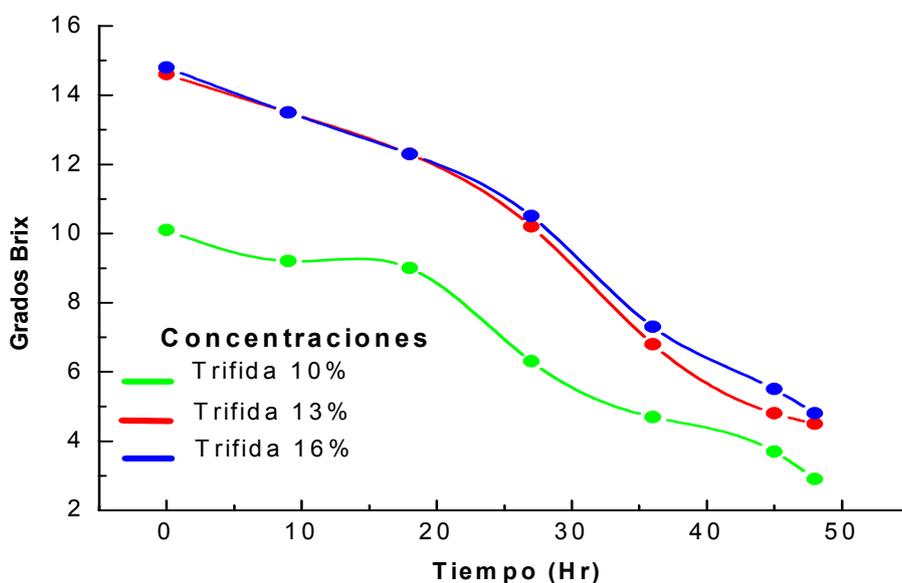
Gráfica 13. °Brix durante el tiempo de fermentación de la especie D bubifera a 10%; 13% y 16% p/v



En la grafica 14 se muestran los datos correspondientes a los grados Brix tomados durante el proceso de fermentación de la variedad D trífida a las tres concentraciones de trabajo, de manera similar a la variedad bulbifera se aprecia que la concentración de 10% p/v registra los valores más bajos, esto es de 10,01 a 2,9, mientras que las dos concentraciones 13% y 16% registraron valores muy semejantes entre si, esto es gracias a que el alcohol genera modificaciones en la organización y permeabilidad de las células presentes por concentración, afectando su composición lipídica y el funcionamiento de proteínas de membrana involucradas en el transporte de azúcares y aminoácidos (Aguilera y Benítez, 1986).

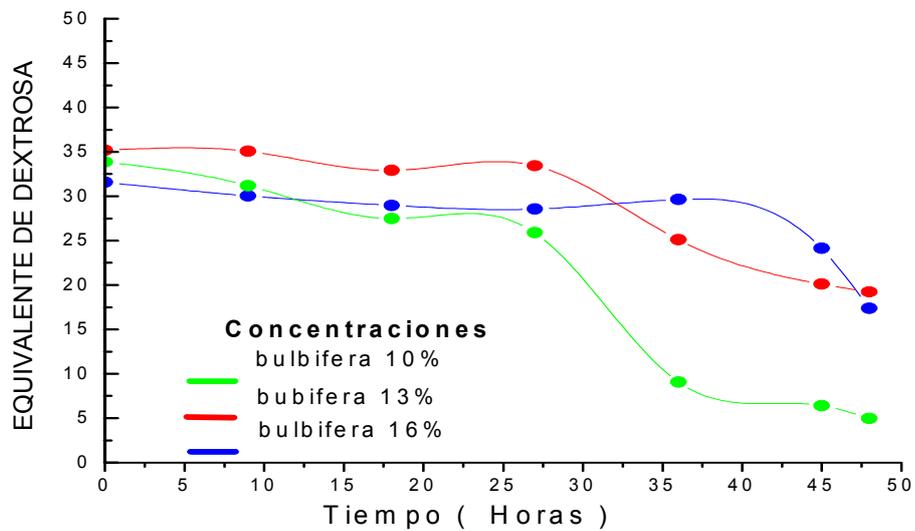
Estos cambios en la permeabilidad, causan la fuga de cofactores, coenzimas y nucleótidos, la pérdida de estas biomoléculas esenciales para la actividad de enzimas involucradas en la glicólisis y durante el proceso de producción de alcohol, son suficientes para explicar el efecto inhibitorio del mismo. (Mizoguchi, 1998). Es decir a mayor concentración de harina mayor porcentaje de grados Brix.

Gráfica 14. °Brix durante el tiempo de fermentación de la especie D trífida a 10%; 13% y 16% p/v.

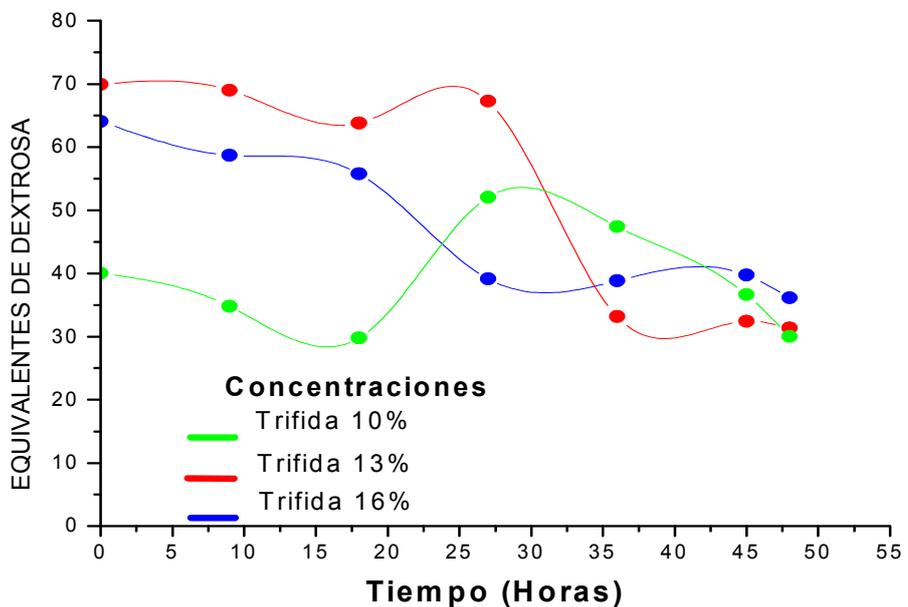


5.3.2 Equivalentes de Dextrosa: El comportamiento de este factor mostro similitud al e de los grados Brix en cuanto a las características de la curva y al descenso de las unidades de glucosa a medida que la fermentación aumenta y la levadura actúa sobre ello. Para evidenciar esto se registran los datos en las graficas 15 y 16 Datos correspondientes a la variedad D bulbifera y D trífida a las concentraciones de trabajo.

Gráfica 15 Equivalentes de Dextrosa para la variedad D bulbifera a 10%, 13% y 16%p/v.



Grafica 16 Equivalentes de Dextrosa para la variedad D trifida a 10%, 13% y 16%p/v.



Se observa como el consumo de equivalentes de dextrosa aumenta a medida que avanza el tiempo para ambas variedades, destacando el valor mínimo a las 48 horas para la variedad D bulbifera 10%p/v en un 4,96 E.D, mientras que las otras

concentraciones restantes presentaron valores muy cercanos entre ellas; pero superiores a 4.96 E.D representados de la siguiente manera: 19.23 unidades de equivalentes de dextrosa para la concentración 13%p/v, y de 17,36 E.D para el 16%p/v, Ahora para la variedad D trífida la unidades de dextrosa se consumieron con menor eficacia, poniendo en evidencia el alto contenido en sustrato para esta variedad al final del proceso, donde los datos finales de las tres concentraciones no fueron muy lejanos entre si .

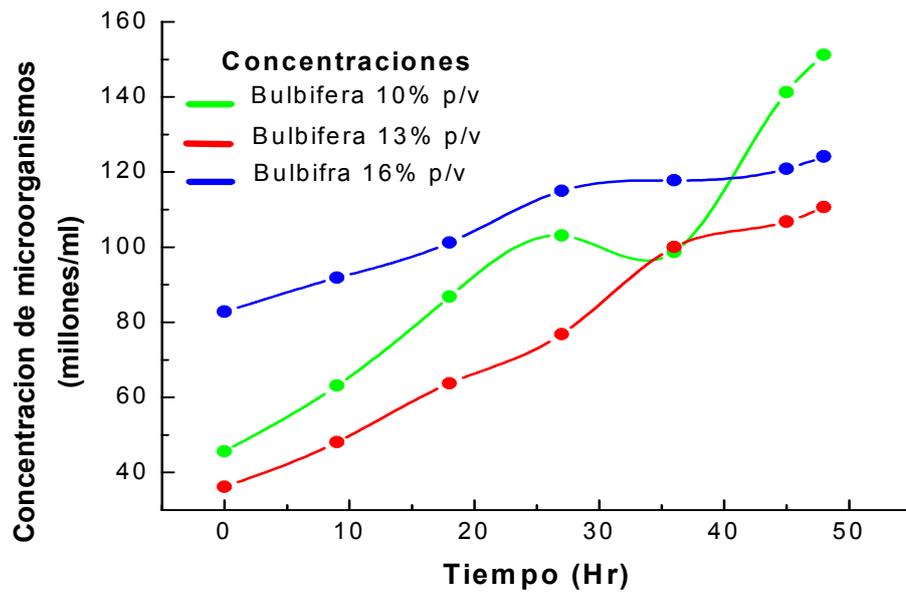
El valor final para la concentración 10%p/v fue de 30.01 E.D y para las concentraciones 13% y 16%p/v fue de 31,36 y de 36,13 E.D respectivamente.

Por tanto la variedad D. bulbifera a la concentración 10% resulta más eficiente en cuanto al consumo de ED ya que a menores cantidades de sustrato mayor es la conversión de glucosa hasta etanol.

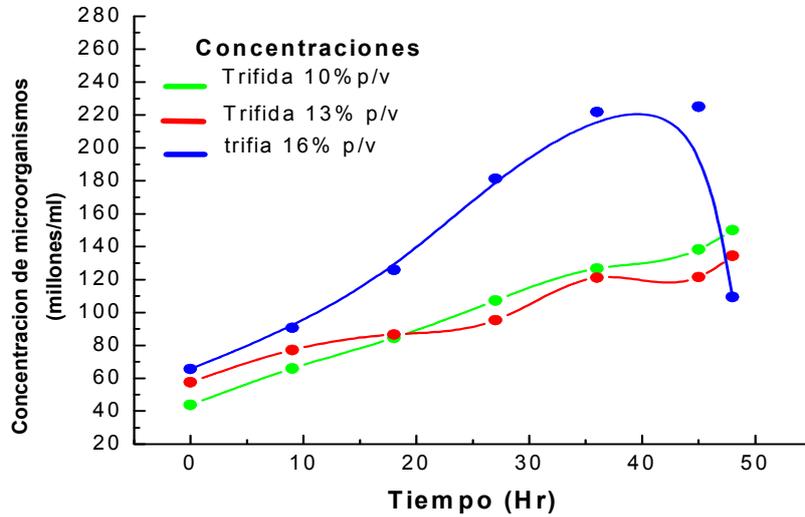
5.3.3 Conteo de Microorganismos: El conteo de microorganismos en este proceso hace referencia al crecimiento celular de la levadura empleada, es este caso fue la *Saccharomyces cerevisiae*. Los datos se registraron en el anexo D.

La graficas 17 y 18 muestran la concentración de microorganismos para las dos variedades (D bulbifera y D trífida) a las tres concentraciones, se observa como al inicio del proceso los valores son bajos, esto en contraste con las curvas obtenidas por la toma de ED y °Brix donde al inicio presentan una alta producción, este comportamiento describe una fase inicial donde se presenta un crecimiento pequeño y lento hasta las 27 horas, donde el microorganismo se adapta al medio del cual tiene que obtener los nutrientes, una segunda etapa donde se presenta un crecimiento exponencial este abarco desde las 27 horas hasta las 36 horas y una fase estacionaria en la que se alcanza una máxima concentración de microorganismos, esto fue de las horas 45 hasta las 48, cualidad típica de los organismos biológicos (Crueger & Crueger, 1989).

Grafica 17 Concentración de microorganismos (millones/ml) para D bulbifera al 10%, 13% y 16% p/v.



Grafica 18 Concentración de microorganismos (millones/ml) para D trífida al 10%13% y 16% p/v.,

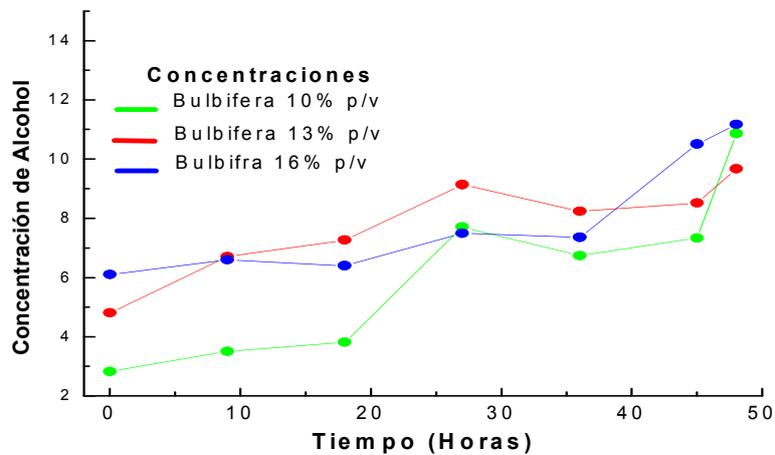


5.3.4. Concentración de Alcohol: La producción de etanol durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de harina de ñame del 10%, 13% y 16% p/v de la variedad D. bulbifera se representan en la gráfica 19, observándose una concentración final de etanol de 10,87% v/v; 9.68% v/v y 11.18% v/v, respectivamente, observándose la producción de alcohol a partir de las 18 horas hasta alcanzar un valor máximo a las 48 horas para las tres concentraciones de D. bulbifera donde el menor valor lo adquiere la concentración 13% p/v. Lo cual se debe a un menor consumo de los productos de la hidrólisis por parte de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados obtenidos en las tres concentración superan los datos publicados por Grisales, *et al.*, (2001), quienes obtuvieron una concentración de 6 - 8% v/v de etanol a partir de jugo de caña; de igual forma supera a las cifras reportados por González y Molina (2006), quienes alcanzaron una concentración del 10,33% v/v y un rendimiento de 94,5 litros de etanol / tonelada de papa, utilizando una concentración de 20% p/v; solo la concentración 13%p/v reporta datos menores a los de Bringhenti y Cabello (2005), quienes obtuvieron una concentración de

etanol del 9.76% v/v a partir de residuos del proceso de obtención de harina y almidón de yuca usando una concentración del 18% p/v y enriquecido con un 12% de melaza residual

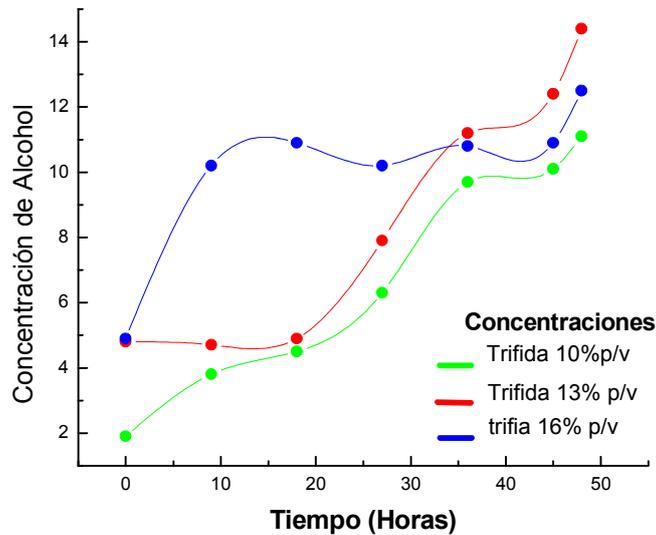
Grafica 19 Concentración de alcohol para D. bulbifera al 10%, 13%, y 16%



En la grafica 20 se observa como aumenta la concentración de alcohol a partir de las 18 horas hasta alcanzar un punto máximo a las 48 horas para las tres concentraciones de D. trifida donde el menor valor lo adquiere la concentración 10% p/v con un 11.1% v/v .aun así, este supera a los datos obtenidos por la variedad .D.bulbifera.

Las concentraciones 13% y 16%p/v presentaron los mejores resultados, esto es de 14.4% v/v y 12,5% v/v respectivamente, con lo que se puede asumir que la concentración más rentable para el proceso de obtención de alcohol es la de 13%p/v.

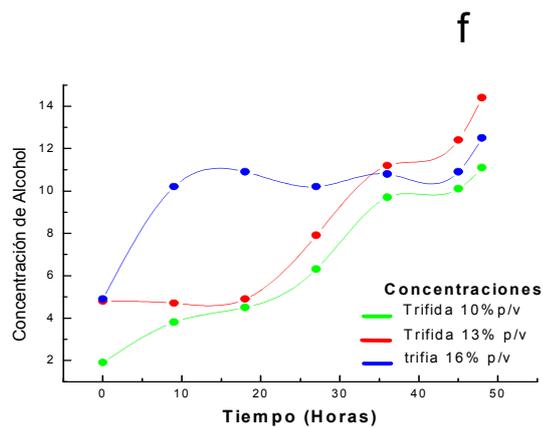
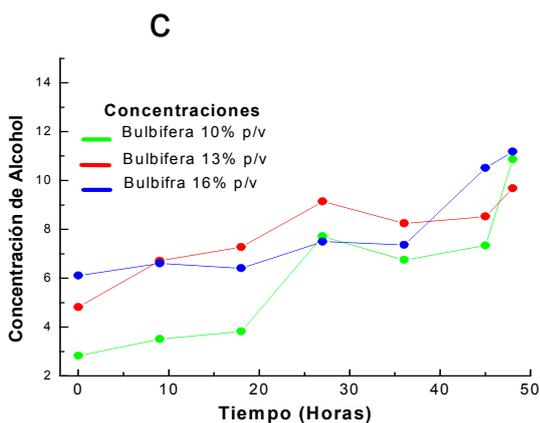
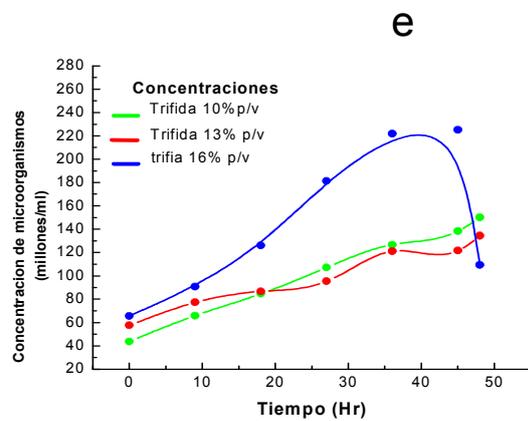
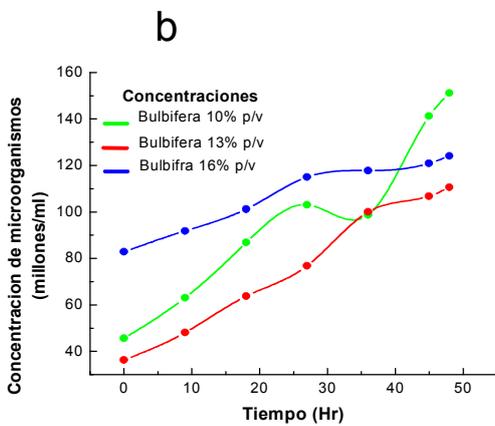
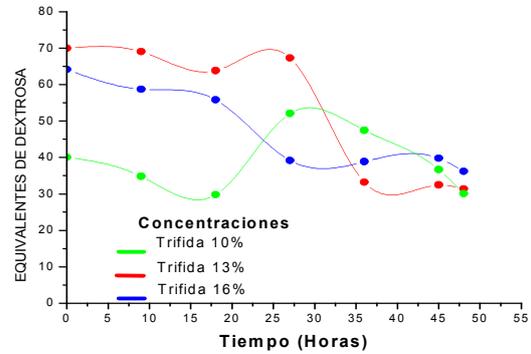
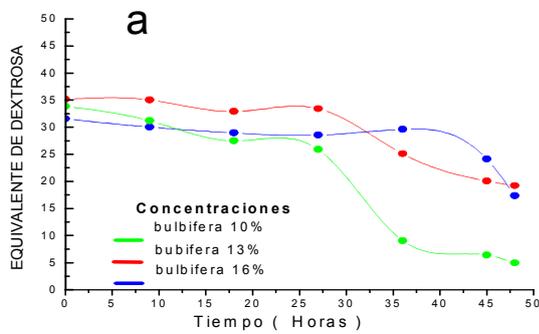
Grafica 20 Concentración de alcohol para D. trifida al 10%, 13%, y 16%



Al contrastar todos los datos en la grafica 21 a, b ,c , d ,e ,y f se puede observar que al inicio hay un lento consumo de equivalentes de dextrosa que coincide con la parte donde se dan un pequeño crecimiento de microorganismo y donde la producción de alcohol es muy pequeña esto es aproximadamente a las 18 horas de iniciado el proceso. Además, se muestra un rápido y característicos aumento en la reproducción de los microorganismos hasta las 48 horas. Con una gran diferencia específicamente en la concentración 16%p/v de D. trífida (e y f) donde tiene su producción máxima de microorganismos a las 44 horas seguida de una gran disminución de la tasa de crecimiento en las horas finales; lo cual se ve reflejado directamente en los valores que alcanza en la producción de alcohol (f)

Grafica 21 Contraste de los datos obtenidos durante el proceso de fermentación: a. y d. concentración de alcohol, b. y e. concentración de

microorganismos, c. y f. equivalentes de dextrosa para las dos variedades de ñame.

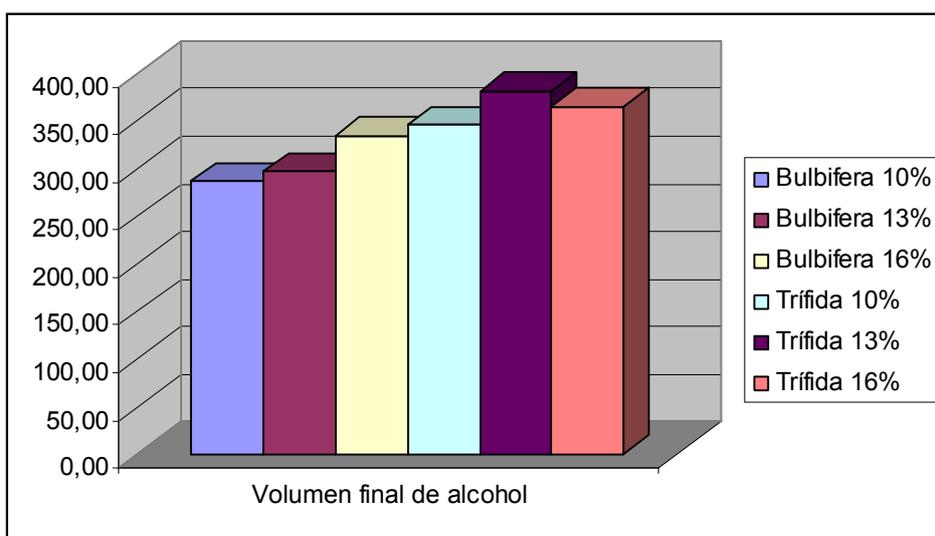


Los valores graficados anteriormente, grados brix, equivalentes de dextrosas, números de microorganismos, y concentración de alcohol, corresponden a los

promedios de los comportamiento cinéticos de los datos experimentales por concentración y variedades en el proceso de fermentación

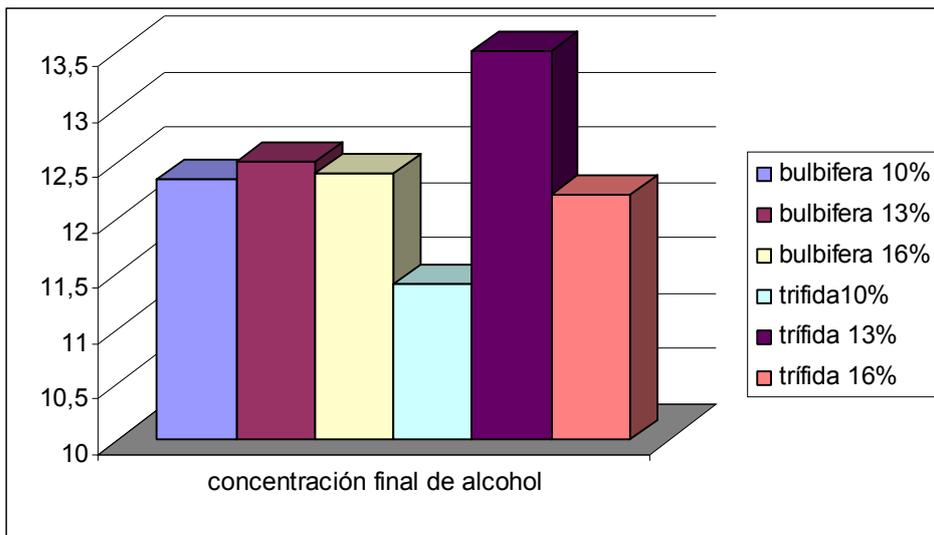
Finalizado el proceso de fermentación se tomaron los datos correspondientes al volumen y concentración final de alcohol obtenido por cada tratamiento, luego del filtrado (ver anexo D). Estos datos se muestran en la grafica 22 (a y b) donde se aprecia que la variedad con mayor volumen fue la D trífida al 13% p/v con 381,75 ml y una concentración final del 13.5% v/v y que la de menor volumen fue la de D bulbifera 10% p/v con 286,75 ml y una concentración final de 12.35% v/v.

Grafica 22 (a). Volumen final de alcohol de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida en las concentraciones de trabajo (10%, 13% y 16% p/v).



Fuente: Los autores

Grafica 22(b). Concentración final de alcohol de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida en las concentraciones de trabajo (10%, 13% y 16% p/v).



Fuente: Los autores

5.4 EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ALCOHOL.

Tabla 8 Análisis de varianza para el rendimiento de las variedades D.trífida y D.bulbifera

Análisis de la Varianza para Rendimiento

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	286104,0	5	57220,7	21,97	0,0000
Intra grupos	46876,1	18	2604,23		
Total (Corr.)	332980,0	23			

Teniendo en cuenta que el análisis de varianza para el rendimiento mostró un p-valor inferior a 0,05 se demuestra que hay diferencias estadísticamente significativas según ñame; encontrándose diferencias entre variedades y concentraciones, con un nivel de confianza de 95,0%. Para determinar dichas diferencia, se aplico una prueba de múltiples rangos. Estos resultados se registraron en la tabla 8.

Tabla 9. . Medias por mínimos cuadrados para rendimiento con 95% de intervalos de confianza y contraste de múltiples rangos según ñame. D trífida y D. bulbifera.

Contraste Múltiple de Rango para Rendimiento1 según Ñame

Método: 95,0 porcentaje LSD			
Ñame	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Bulbifera 16%	4	520,655	X
Trífida 16%	4	554,342	X
Bulbifera 13%	4	569,34	X
Bulbifera 10%	4	706,54	X
Trífida 10%	4	775,02	XX
Trífida 13%	4	792,725	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Bulbifera 10% - Bulbifera 13%	*137,2	75,8115
Bulbifera 10% - Bulbifera 16%	*185,885	75,8115
Bulbifera 10% - Trífida 10%	-68,48	75,8115
Bulbifera 10% - Trífida 13%	*-86,185	75,8115
Bulbifera 10% - Trífida 16%	*152,197	75,8115
Bulbifera 13% - Bulbifera 16%	48,685	75,8115
Bulbifera 13% - Trífida 10%	*-205,68	75,8115
Bulbifera 13% - Trífida 13%	*-223,385	75,8115
Bulbifera 13% - Trífida 16%	14,9975	75,8115
Bulbifera 16% - Trífida 10%	*-254,365	75,8115
Bulbifera 16% - Trífida 13%	*-272,07	75,8115
Bulbifera 16% - Trífida 16%	-33,6875	75,8115
Trífida 10% - Trífida 13%	-17,705	75,8115
Trífida 10% - Trífida 16%	*220,678	75,8115
Trífida 13% - Trífida 16%	*238,383	75,8115

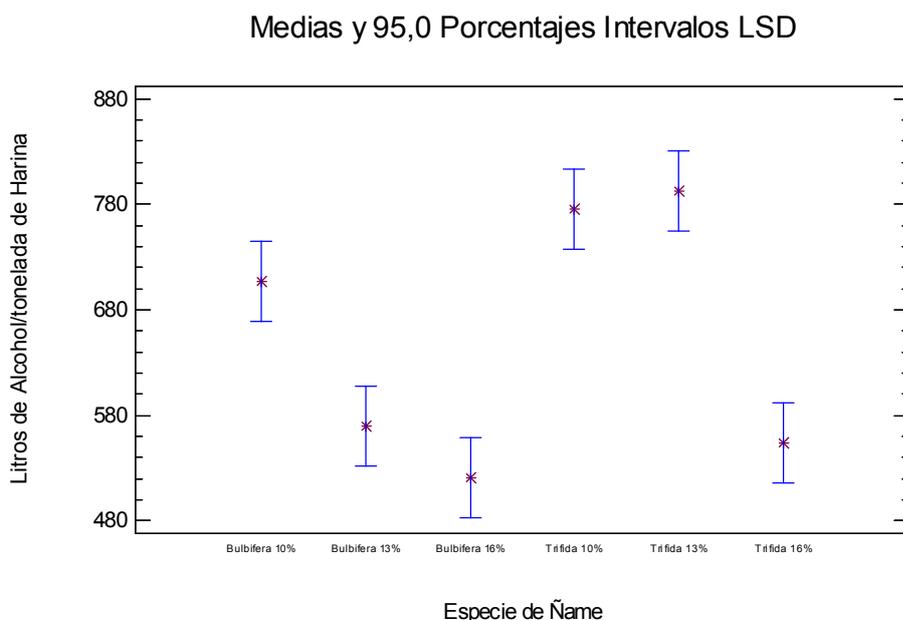
* indica una diferencia significativa.

Según la prueba de rangos múltiples se identificaron tres grupos homogéneos estos comprenden los grupos constituidos por las siguientes concentraciones: bulbifera 13%, bulbifera 16% y trífida 16%, entre los cuales existe diferencia significativa entre las variedades. También se resaltaron diez parejas con el asterisco, en las cuales existe diferencia estadísticamente significativa, Con un

nivel de confianza del 95%. Para el resto de las relaciones no existe diferencia significativa entre sus medias.

Cabe destacar el valor que tiene la media de la variedad D. trífida 13%p/v, ya que muestra el mayor rendimiento con 792,725 litros de alcohol / tonelada de harina y la variedad D. bulbifera 16%p/v con el menor rendimiento de 520,655 L/Ton de harina de ñame, tal como lo demuestra la grafica 23.

Gráfica 23 Medias para el rendimiento de las variedades D. bulbifera y D. trífida



El cuadro estadístico mostrado en la tabla 9, comprueba la hipótesis nula de que la desviación típica de Rendimiento dentro de cada uno de los 6 niveles de Ñame, es la misma. De particular interés están los tres p-valores. Dado que el menor de

los p-valores es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%.

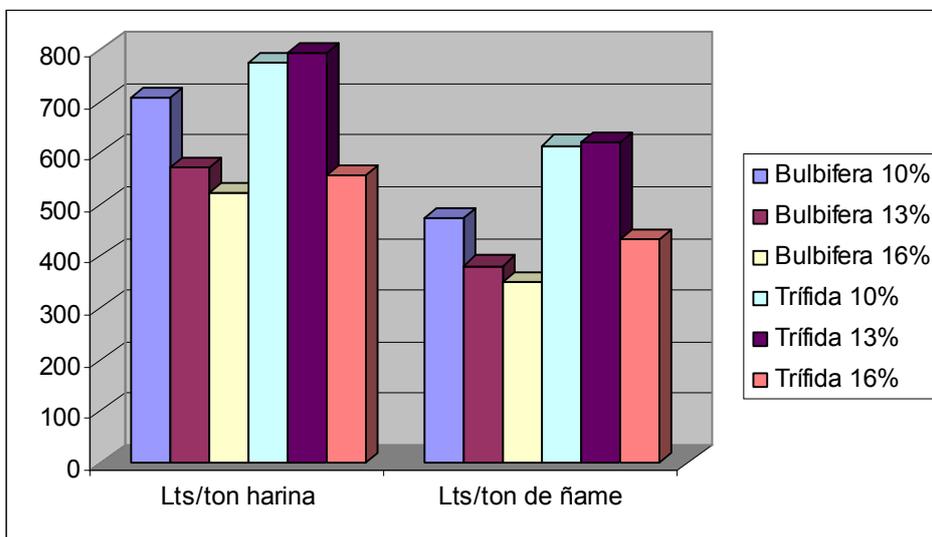
Tabla 10: Contraste de Varianza

Contraste de Varianza	Valor-p
Contraste C de Cochran: 0,35211	P-valor = 0,489588
Contraste de Hartley: 6,6104	P-valor = 0,664126
Contraste de Bartlett: 1,22494	P-valor = 0,930212
Test de Levene:	P-valor = 0,257844

El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a cero.

En la grafica 24 se puede apreciar los rendimientos en litros de alcohol/ton de harina al final del proceso de fermentación para cada variedad por concentraciones; donde la variedad D trífida presenta mayores rendimientos en cuanto a volumen de alcohol en las concentraciones 10% y 13% p/v con valores de 775.02 y 792.73 lts/ton de harina respectivamente, los cuales está por encima a los datos de Assis, (2007), en el estudio para la cuantificación de alcohol a partir de harina de batata, donde obtuvo un rendimiento de 129 litros / tonelada de raíz ; Por otra parte la variedad que arrojó los menores rendimiento fue la D.bulbifera al 16% con valores de 520.66 lts/ton de harina sin dejar de lado que la variedad D. trífida al 16% mostró cantidades similares de 554,35 lts/ton de harina.

Grafica 24 Rendimientos de alcohol (Lt alcohol/ton de harina y Lt/ton de ñame)



Fuente: Los autores.

Estos datos sugieren que las concentraciones más acordes para trabajar son las más bajas, ya que la cantidad necesaria de materia prima es menor y la concentración de alcohol obtenida es mayor como lo fue en D trífida 13% dato que además no es lejano a la obtenida por la concentración de harina más alta (16% p/v).

6. CONCLUSIONES

- ✚ El porcentaje de humedad de las harinas de las variedades de ñame D bulbifera y D trífida fueron del 10.16 y 10.33%, estando dentro del límite establecido por la legislación de Colombia y Brasil, los cuales establecen un porcentaje máximo del 14%.
- ✚ Con el empleo de la enzima Pectinex ultra usada como complementaria, se obtuvieron mayores resultados en cuanto a los rendimientos de alcohol las variedades de ñame a las concentraciones de harina del 10% y 13% p/v, esto gracias al ataque oportuno que esta enzima hace sobre la celulosa y la pectina presente en la harina.
- ✚ Al utilizar las enzimas Pectinex Ultra, Termamyl y AMG durante el proceso de hidrólisis se obtienen altas concentraciones de equivalentes de dextrosas, para las variedades D.bulbifera y D. trífida al 10% p/v donde se alcanzaron valores de 93.38 y 98,20 respectivamente, los cuales se encuentra cercanos al rango optimo reportado por la literatura (ED = 94-98).
- ✚ Las concentraciones de harina más favorables para la producción de alcohol son las del 10% y 13% p/v debido a que a menores cantidades de sustrato en el proceso de fermentación, hacen más eficiente la conversión de glucosa hasta etanol, donde los volúmenes de alcohol son muy cercanos a los obtenidos por la concentración más alta 16%.
- ✚ La variedad de ñame con mejores rendimientos durante el proceso de obtención de alcohol fue la D trífida, a una concentración del 13% p/v donde se obtuvo un mayor volumen de alcohol después del proceso de fermentación con

una concentración del 13,5% v/v y la de menor rendimiento fue la del 10% p/v con una concentración del 11,4% v/v de la misma variedad.

- ✚ La concentración de alcohol obtenida por D trífida al 13% p/v sobrepasa la obtenida por Meléndez en el 2002 quien obtuvo una concentración del 10,33% v/v al trabajar con ñame al 20%.
- ✚ Los rendimientos de alcohol obtenidos en el presente trabajo son comparables con los obtenidos por González. F, J.; Molina. C, M. quienes obtuvieron un rendimiento de 365,4 Lt/ton en la Producción de alcohol a partir de papa, y también a los resultados de Gulati. et. al en 1996 donde los rendimientos de alcohol a partir de maíz llegaron a 403,1 Lt/ton .
- ✚ En cuanto a los niveles de rendimiento por concentración y variedad de harina de ñame demostró que las concentraciones de alcohol fueron relativamente similares, es decir la variación entre las concentraciones de harina de ñame por variedad no es tan lejana.

7. RECOMENDACIONES

- ✚ Para trabajar con ñame en el proceso de obtención de alcohol hay que tener en cuenta la relación precio y rendimiento de alcohol de la materia prima, además de la adecuada selección de enzimas para lograr un óptimo rendimiento en cuanto a volumen y concentración de alcohol.
- ✚ Las concentraciones de harina para obtener mejores resultados en el proceso de obtención de alcohol son las menores, esto permite un mejor aprovechamiento de la materia prima y una mayor concentración de alcohol respecto a otros tubérculos.
- ✚ Evaluar los rendimientos durante el proceso de obtención de alcohol usando otro tipo de microorganismos como las bacterias *Zymomonas mobilis* que transforman la glucosa en etanol con un rendimiento del 5 al 10 % mayor que la mayoría de las levaduras.
- ✚ Se recomienda el empleo de la variedad D trífida como potencial productora de alcohol a menores concentraciones, a pesar que su cultivo no es tan amplio como las demás especies de ñame.

8. BIBLIOGRAFIA

ADELUSI A, LAWANSON AO. (1987). Disease induced changes in carotenoid content of edible yam (*Dioscorea* spp) infected by *Botryodiplodia theobromae* and *Aspergillus niger*. Mycopathologia 98:49-58.

AGUILERA, A.; BENITEZ, T. 1986. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. Vol 142. pp 389–392.

ASSIS, T. 2007. Estudo para quantificação de álcool a partir da batata. Fundação centro tecnológico de minas gerais. CETEC. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. SBRT. pp 1-8.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 17th Edition. Editor Horwitz, W. Maryland, USA. 2000.

AYENSU. 1972, 182

BAILEY, B.K. 1996. Production and Utilization. En: Wyman, Taylor y Francis (eds.). Handbook of Bioethanol. Washington. 20 p

BARRETO DE MENEZES, T.J. 1980. Etanol, O Combustível Do Brasil. São Paulo, Brasil: Ed. Agron_mica Ceres. 233 p.

BENAVIDES, M. CABRERA, J.; ZAPATA, L. 1983. Modificación enzimática de almidones y proteínas. Proyecto multinacional de tecnología de alimentos OEA-IIT. Ministerio de Desarrollo Económico. Colombia.

BEG, Q. K.; DAHIYA, N.; HOONDAL, G. S.; TEWARI, R.; TIWARI, R. P. 2002. Microbiol alkaline pectinases and their industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 59. pp 409-418.

BRAKO, L. Y J. L. ZARUCHI. 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden. St. Louis, Missouri, EE.UU. 1 286 p.

BRICEÑO, C.O.; CALERO, C.X. 2004b. Aspectos Básicos del Desempeño del Etanol como Combustible Vehicular. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA). Documento de Trabajo. 12 p.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. 2005. Qualidade do alcohol produzido a partir de residuos amiláceos da agroindustrializacáo da mandioca. Enero. Agric. Botucatu. Vol 20. pp 36-52.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. E. 2006. fermentacáo alcohólica de substrato amiláceo hidrolizado, enriquecido com melado de cana. Cienc. Agrotec., Lavras. Vol 31, No 2. pp 429-432.

BUITRAGO, G., PEREA, M. 1998. Aplicación de la Biotecnología agrícola al cultivo de ñame. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. p. 35-38.

CALERO C., C.X. 2000. Alcohol Carburante: una Alternativa con Altos Beneficios Económicos, Sociales y Ecológicos para Colombia. Cali, Colombia. Carta Trimestral 3 de 2000 – CENICAÑA. p: 16-20.

CARDONA, Carlos Ariel. SANCHEZ, Oscar Julián. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante I: Obtención a Partir de Diferentes Materias Primas. Interciencia, noviembre 2005 vol 30, numero 011, pp. 671-678.

CARDONA, Carlos Ariel. SANCHEZ, Oscar Julián. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de Procesos. Interciencia, noviembre 2005 vol 30, numero 11.

CARO, A. J. 1986. Hidrólisis enzimática del almidón de yuca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

CEREDA PASCOLI Marney, LEONEL Magali, Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares, no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol, Ciencia e tecnologia de Alimento, vol.19 n.1 Campinas Jan./Apr. 1999,

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000100020

Colombia le cumple al protocolo de Kyoto, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, República de Colombia, http://www.minambiente.gov.co/noticias_home_2005/050705_foro_cambio_climatico/foro_cambio_climatico.htm

COLLAZOS, C., P. L. WHITE., H. S. WHITE et al. 1975. La composición de los alimentos peruanos. Instituto de Nutrición. Minist. de Salud. Lima. 35 p.

CORPOICA. Diagnostico agropecuario con fines de planificación 2003.

CORPOICA. Diagnostico agropecuario con fines de planificación 2000.

CORPOICA. Diagnostico agropecuario con fines de planificación 1999.

COURSEY, D.G. 1967. Yams: an account of the nature, origins, cultivation and utilization of the useful members of the Dioscoreaceae. Longmans, London. 230 p.

COURSEY, D.G. ADELUSI and LAWANSON 1987.

CORRÊA CARVALHO, L.C. 2003. The Brazilian Ethanol Experience. En: Seminario Internacional de Alcohol Carburante. Santiago de Cali, Colombia, junio 17 y 18 del 2003. Memoria. Cali, ASOCAÑA, CORPODIB y TECNICAÑA. 34 p.

CORRÊA CARVALHO, L.C. 2002. Biocombustíveis: o Passado e o Futuro. Revista STAB – maio/junho 20(5): 8-9.

CHACON Ana Gabriela, GOMEZ Luis, TORRES Sergio , SABORIO Francisco, Aclimatización de plántulas de yampí (*dioscórea trifida*) y ñame (*d. alata*) producidas *in vitro*1/. Agronomía Costarricense 29(3): 47-58. ISSN:0377-9424 / 2005 www.mag.go.cr/rev_agr/inicio.htm www.cia.ucr.ac.cr.

CHAVES SOLERA, M.A. 1985. Las Vinazas en la Fertilización de la Caña de Azúcar. El Agricultor Costarricense 43(9-10): 174-177.

CHAVES SOLERA, M.A. 1993. Antecedentes, Situación Actual y Perspectivas de la Agroindustria Azucarera y Alcoholera Costarricense. En: Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, 9, San José, Costa Rica, 1993. Resúmenes. San José, Colegio de Ingenieros Agrónomos, octubre. 116 p.

CHAVEZ SOLERA. 2003 La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante. El agricultor Costarricense

CHAVEZ SOLERA, M. 2003. Producción de Alcohol Carburante en Costa Rica: Consideraciones sobre su potencial real de uso.

CHICA. L, N. E. 1996. Sacarificación del almidón de papa. Tesis de especialización en ciencia y tecnología de alimentos. Manizales. Universidad Nacional de Colombia

CLAASSEN PAM, Van LierJB, LOPEZ CONTRRAS AM, Van Niel EWJ, SIJTSMA L, STAMS AJM, de Vries SS, Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomasa for the supplí of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 741-755.

CRUEGER, W. CRUEGER, A. 1989. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. España: Acribia S.A.

DAYANAND, A.; PATIL, S. R. 2006. Exploration of regional agrowastes for the production of pectinase by *Aspergillus niger*. Food. Technol. Biotechnol. Vol 44. pp 289-292.

DIARIO OFICIAL 44.564 de septiembre 19, ley 693, por la cual se dictan normas sobre el uso de alcoholes carburantes, se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo, y se dictan otras aplicaciones, 2002.

DIARIO ELUNIVERSAL, Sincelejo- Colombia. Creada Empresa para Gerenciar Proyecto de Alcohol Carburante en Sucre, 20 de septiembre del 2006.

DÖRNENBURG, H.; LANG, C. 2000. Perpectives in the biological function and the technological of polygalacturonases. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 53 pp 366-375.

DUARTE ANDRADE INÉS. Monitoreo de un Proceso Continuo de Fermentación Alcohólica. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Coimbra-Brasil. Seminario II 2000.

ESPITIA R., GÓMEZ F., SALCEDO J. 2004. "Caracterización y evaluación de las propiedades tecnofuncionales de los almidones de ñame a partir de tres especies (*Dioscórea bulbífera*, *Dioscórea trifida* y *Dioscórea esculenta*)".

FAO, 1999 <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1028s/a1028s01.pdf>

FAO, 2003 www.fao.org

FAO, 2004 www.fao.org

FAVELA. T, E.; VINIEGRA. G, G.; VOLKE. S, T. 2006. Production of hidrolitic depolymerising pectinases. Food Technol. Biotechnol. Vol 44. pp 221-227.

GONZÁLEZ. F, J.; MOLINA. C, M. 2006. Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*). Ingeniería. Vol 16. pp 29-39.

GULATI M. KOHLMAN K. LADISH MR. HASPELL R y BOTHAST RJ. Assessment of thanol production options for corn products. BIORRESOURC TECHNOL. 1996.

HAWGOOD, N. Evans. S, GREENFIELD PF.(1985). Enhanced ethanol production in multiple batch fermentation with auto-flocculating yeast strain. Biomass 7: 261-278

INGRAM, A;, BUTTKE, T. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv Microb. Physiol. Vol 25. p 253-300.

KOSARIC, N. et al: Ethanol. Vol A 9 de Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, bajo la edición de Hans-Jürgen Arpe. Weinheim [Alemania]. Fifth Edition (First International Edition in English). John Wiley & Sons. 1987. 587-653

LAWRENCE, T., J. Toll y D. H. Van Sloten. 1986. Directory of germplasm collections. 2. Root and tuber crops. International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR. Roma. 178 p.

LEON , F, JG. 1987. Botánica De Los Cultivos Tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 455 p.

LEÓN F., J.G. 2003. La Incorporación del Etanol en la Cadena de las Gasolinas Automotor. En: Seminario Internacional de Alcohol Carburante. Santiago de Cali, Colombia, junio 17 y 18 del 2003. Memoria. Cali, ASOCAÑA, CORPODIB y TECNICAÑA. 46 p

LIMA, F. A.; MOREIRA, F. G.; PEDRINHO, S. R. F. 1999. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. Revista de Microbiología. Sao Paulo. Vol 30, No 2. pp 120-125

LIMA. MARCONDES, 1979. Mandioca como material prima industrial. Revista Química Industrial, Rio de Janeiro. pp 302-365.

LIN, Y. y TANAKA, S.: Etanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 69. 2006. 627-642

LUJAN, D. ALVARINO, N. SALCEDO, J. Revista Temas Agrarios SIN 012-7610, 2001 pág. 65-72.

HIGUERAS, M. Protocolo de Kioto: Situación actual y perspectivas. www.wwf/adena.es España 2004; 3 – 4.

HORRY J. Biotechnology Bioengineering Symposium. No 6. 1979

MAGALY L. CEREDAV M., Avaliacao Tecnico Economica da producto de etanol de Farelo de Mandioca, utilizando pectinase como enzima complementar, 2004.

MEADE, G. P. CHEN, J. P 1977. Sugar Cane Handbook. 10 ed. Willey-Interscience Publication. Jhon Wiley and sons, New Cork. 947 p.

MELLENDEZ, I 2002. Estudio de la Hidrólisis enzimática y del proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de yuca, ñame y malanga. Tesis de licenciatura para la obtención del título en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química. Universidad e Costa Rica, San José de Costa Rica.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. Analyt Chem. 1959: p. 31, 426-429. En RAIBAULT. Maurice. Manual de laboratorio: Métodos físicos, químicos y microbiológicos. Cali, Colombia: ORSTOM UV. 1994:p. 1-3.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL – ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SECTOR AGROPECUARIO, 2003.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE 2005. Unidad de planeamiento minero y energético: los biocombustibles en Colombia. Seminario OLADE. Brasilia.

MIZOGUCHI, H. 1998. Permeability barrier of the yeast plasma membrane induce by ethanol. J. Ferm, Bioeng. Vol 85. pp 25–29.

MONTALDO, A. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. IICA, San José. Costa Rica. 1975.

MOORTHY, S.N. 1991. Extraction of starches from tuber crops using ammonia. Carbohydrate Polymers 16:391-398.

NOVO NORDISK A/S. Ficha de aplicación de las enzimas CEREMIX®, TERMAMYL®. 1990.

NOVO NORDISK A/S. 2001. Ficha técnica Termamyl® 120 L, Tipo L, AMG 300L, Pectinex® Ultra SP-L 2004.

PARDO M, RIVERA. P, CASTELLANOS. O y GONZALES. G. Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de almidón de papa . Revista Colombiana de Biotecnología. Vol 5 Dic 2004. Bogota D.C

PARENTE, José de Sá. Biodiesel: uma aventura tecnológica num. país ençado. Disponível em: <<http://www.tecbio.com.br/Downloads/Livro%20Biodiesel.pdf>> Acesso em: 06 jul 2006.

PASTORE, G. M.; UENOJO, M. 2007. Pectinases: Aplicaciones industriales y perspectivas. Quimic Nova. Vol 30. pp 388-394.

PINEDO, M. 1975. Estudio sobre un clon de *pituca* (*Colocassia esculenta*). Calidad de su harina en la Panificación. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos. Perú.

RINCON, Alicia. VISCARRONDO, Consuelo. CARRILLO, Fanny. Evaluación del posible uso tecnológico de algunos tubérculos de las dioscoreas: ñame congo (*Dioscorea bulbífera*) y mapuey (*Dioscorea trifida*) realizados para la Sociedad Latinoamericana de Nutricion en Venezuela. ;2000.

RACHERD y VISCARRONDO. Evaluación de harinas y almidones de mapuey (*Dioscorea trifida*), variedades blanco y morado.” realizados para la Sociedad Latinoamericana de Nutricion en Venezuela. ;2006.

RODRIGUEZ, Gonzalo Alfredo. Identificación de Posibilidades de Acondicionamiento y transformación de Raíces y tubérculos Autóctonos: Arracacha (*Arracacia xabthorriza*), Ñame (*Dioscórea ssp*), Ulluco (*Ullucus tuberosus*), Ibia (*Oxalis tuberosa*) y ubio (*Tropaeolum tuberosum*). Tabaitatá, Marzo de 1999. grodriguez@corpoica.org.co

SABINO OMETTO, J.G. 1998. O Álcohol Combustível e o Desenvolvimento Sustentado. São Paulo, Brasil: PIC Editorial. 79 p.

SANCHEZ, L. MOLINA, A. DANIEL, V. 2000 Evaluación de la Producción de Jarabes De Glucosa Por Hidrólisis Enzimática Del Almidón De Tres Variedades De Yuca (Amarga, Armenia Y Chile) Utilizando Las Enzimas Comerciales Fungamyl 2500BG(Para La Licuefacción Del Almidón) Y AMG 1000BG Para La Sacarificación Del Hidrolizado De Almidón.

SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE ALCOHOL CARBURANTE junio 2003. Unidad de Planeación Minero Energética – UPME República de Colombia Av. Calle 40 A N° 13-09 Pisos 5, 11 y 14, Bogotá D.C. Colombia PBX : (+571) 2-875334 <http://www.upme.gov.co>.

UNITE STATES, Advisory Comité on Technology Innovation. 1983. Alcohol Fuel: Options for developing countries. Washington Press.

VILLENA DÍAZ, M. 2003. ALCOHOL CARBURANTE: Experiencia Europea. En:Seminario Internacional de Alcohol Carburante. Santiago de Cali, Colombia, junio 17 y 18 del 2003. Memoria. Cali, ASOCAÑA, CORPODIB y TECNICAÑA. 47 p.

ANEXOS

Anexo A. Fichas técnicas de las enzimas pectinex® Ultra SL-P, termamyl® 120 L, tipo L y AMG 300L, de la Novo Nordisk.

➤ **Enzima pectinex® Ultra SL-P.**

Aplicaciones:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Industria alimenticia: tratamientos de pulpa de frutas tejidos vegetales, extracción de aceite vegetales. ➤ Industria de fermentaciones: Procesamiento de bebidas alcohólicas.
Características:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Apariencia: líquido con olor típico de los productos fermentados. ➤ Color: pardo ➤ Densidad: g/ml.
Propiedades según los proveedores:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Actividad: 26,00 PG/ml (pH 3,5 y 20 °C).
Parámetros óptimos:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pH ~ 4,5. ➤ Temperatura: 30 °C.

➤ **Enzima termamyl® 120 L, tipo L.**

Aplicaciones:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Industria alimenticia: almidón, alcohol, azúcar y cerveza. ➤ Industria de fermentaciones: vitaminas, aminoácidos, antibióticos, etc. ➤ Industria textil y adhesivos.
Características:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Apariencia: líquido no viscoso de grado alimenticio. ➤ Color: marrón oscuro ➤ Densidad: 1,20 – 1,25 g/ml
Propiedades según los proveedores:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Actividad: 120, KNU/g (1 KNU: cantidad de enzima que rompe 5,26 g de almidón por hora, avalado por el método estándar de Novozymes A/S).
Parámetros óptimos:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pH: 6,5 ➤ Temperatura: 90 – 105 °C. ➤ Calcio: 50 – 70 ppm.

➤ **Enzima AMG 300L.**

Aplicaciones:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Industria alimenticia: producción de glucosa y fructosa, bajar la viscosidad de los cereales, en alimentos para bebé. ➤ Industrial del papel: protección contra daños mecánicos. ➤ Industria de fermentaciones: producción de cerveza clara.
Características:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Apariencia: líquido. ➤ Color: marrón. ➤ Densidad: 1,2 g/ml.
Propiedades según los proveedores:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Actividad: 1 Unidad Novo Amiloglucosidasa (AGU): Cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de maltosa / minuto a condiciones estándar.
Parámetros óptimos:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pH ~ 4,5. ➤ Temperatura: 60 °C.

Anexo B Resultados de la hidrólisis enzimática para la especie D, bulbifera

A continuación se registraron los resultados obtenidos durante el proceso de licuefacción y sacarificación enzimática, para esta variedad en sus tres concentraciones.

Resultados de la hidrólisis enzimática para *D. bulbifera*

Tiempo (min)	Pectinex			Tiempo (min)	Termamyl			Tiempo (min)	AMG		
	Concentraciones				Concentraciones				Concentraciones		
	10%	13%	16%		10%	13%	16%		10%	13%	16%
0	11,12	10,00	15,02	90	46,37	24,63	31,31	240	57,25	38,14	70,68
15	15,40	14,40	20,46	110	50,41	25,73	58,36	270	59,43	39,41	71,19
30	18,42	18,68	22,27	130	51,58	27,09	61,43	300	61,25	43,03	71,34
45	20,42	19,15	23,08	150	52,70	27,73	65,05	330	68,25	47,31	73,51
60	20,75	20,17	23,71	170	53,92	30,40	64,86	360	73,24	62,86	73,82
				190	56,29	30,84	69,26	390	77,23	64,27	74,75
				210	57,34	31,59	70,31	420	73,49	61,97	76,88
								450	84,57	66,72	78,67
								480	93,38	69,36	81,52

Resultados de la hidrólisis enzimática para *D. Bulbifera* (°Brix)

Tiempo (min)	Pectinex			Tiempo (min)	Termamyl			Tiempo (min)	AMG		
	Concentraciones				Concentraciones				Concentraciones		
	10%	13%	16%		10%	13%	16%		10%	13%	16%
0	2,0	2,0	1,8	90	7,1	5,3	13,0	240	8,6	8,1	15,0
15	2,2	2,0	1,8	110	7,5	5,3	13,7	270	8,8	8,3	15,2
30	2,5	2,5	1,8	130	7,8	5,5	13,8	300	9,0	8,4	15,4
45	3,0	2,6	2,0	150	8,0	6,1	14,0	330	9,0	8,6	15,6
60	3,0	2,8	2,0	170	8,3	6,4	14,3	360	9,2	9,1	15,9
				190	8,3	6,7	14,6	390	9,5	9,4	16,3
				210	8,4	6,7	14,8	420	9,6	9,3	16,6
								450	9,7	9,6	16,9
								480	9,8	10,0	17,1

Anexo C: Datos registrados del comportamiento de D trífida

En las siguientes tablas se registraron los resultados para el proceso de licuefacción y sacarificación enzimática, para esta variedad en sus tres concentraciones

Resultados de la hidrólisis enzimática para *D. Trífida*

Tiempo (min)	Pectinex			Tiempo (min)	Termamyl			Tiempo (min)	AMG		
	Concentraciones				Concentraciones				Concentraciones		
	10%	13%	16%		10%	13%	16%		10%	13%	16%
0	12,05	18,07	12,23	90	34,07	40,04	25,50	240	82,52	78,67	63,69
15	19,22	19,18	16,43	110	46,90	55,15	51,19	270	86,48	75,49	63,54
30	25,48	18,90	20,96	130	57,28	60,64	57,57	300	87,59	77,72	62,92
45	29,73	23,01	16,72	150	63,60	71,32	61,98	330	88,36	82,77	60,53
60	31,46	33,88	18,75	170	68,12	70,93	59,60	360	97,14	86,19	64,67
				190	71,86	75,39	63,77	390	95,68	86,85	60,08
				210	72,22	78,18	61,00	420	96,83	85,37	64,58
								450	97,71	86,86	64,99
								480	98,20	88,12	65,13

Resultados de la hidrólisis enzimática para *D. Trífida* (°Brix)

Tiempo (min)	Pectinex			Tiempo (min)	Termamyl			Tiempo (min)	AMG		
	Concentraciones				Concentraciones				Concentraciones		
	10%	13%	16%		10%	13%	16%		10%	13%	16%
0	2,0	1,0	1,8	90	7,7	8,3	13,0	240	9,7	10,1	15,0
15	2,4	1,0	1,8	110	8,5	8,4	13,7	270	10,0	10,5	15,2
30	4,7	1,0	1,8	130	8,8	9,0	13,8	300	10,6	11,0	15,4
45	6,0	1,0	2,0	150	9,2	9,1	14,0	330	10,7	11,3	15,6
60	7,2	1,1	2,0	170	9,4	9,4	14,3	360	10,0	11,6	15,9
				190	9,3	9,6	14,6	390	10,3	11,9	16,3
				210	9,8	10,0	14,8	420	10,7	12,7	16,6
								450	10,0	13,0	16,9
								480	10,7	13,4	17,1

Anexo D: Datos registrados durante el proceso de fermentación en la variedad D bulbifera.

a. °Brix obtenidos durante el proceso de fermentación de D bulbifera al 10%, 13% y 16% p/v

D. BULBIFERA			
T (hr)	C - 10%	C - 13%	C - 16%
0	9,6	10,0	14,8
9	8,8	8,5	14,0
18	6,9	7,6	12,8
27	5,9	6,0	10,5
36	2,8	4,4	7,3
45	2,6	4,1	5,0
48	2,3	3,9	4,5

b. °Brix durante el proceso de fermentación de D trifida al 10%, 13% y 16% p/v

D. TRÍFIDA			
T (hr)	C - 10%	C - 13%	C - 16%
0	10,1	14,6	14,8
9	9,2	13,5	13,5
18	9,0	12,3	12,3
27	6,3	10,2	10,5
36	4,7	6,8	7,3
45	3,7	4,8	5,5
48	2,9	4,5	4,8

c. Equivalentes de dextrosa para las dos variedades de ñame en las concentraciones de trabajo.

T (hr)	Equivalente de dextrosa					
	BULBIFERA			TRIFIDA		
	C-10%	C - 13%	C - 16%	C - 10%	C - 13%	C - 16%
0	33,8706	35,1757	31,5709	40,0365	69,9264	64,0873
9	31,2001	35,0596	30,0332	34,7827	68,9829	58,7099
18	27,4914	32,9166	28,9723	29,8006	63,8073	55,7958
27	25,8913	33,442	28,5785	52,055	67,2666	39,1837
36	9,08336	25,1293	29,6451	47,4202	33,1879	38,8548
45	6,39645	20,0864	24,1237	36,6787	32,4132	39,7596
48	4,96501	19,2397	17,3673	30,0147	31,3634	36,1332

d. Conteo de microorganismos para las dos variedades de ñame en las concentraciones de trabajo.

T (hr)	microorganismo/ ml					
	BULBIFERA			TRÍFIDA		
	C-10%	C - 13%	C - 16%	C - 10%	C - 13%	C - 16%
0	4,6E+07	3,6E+07	8,3E+07	4,4E+07	5,8E+07	6,6E+07
9	6,3E+07	4,8E+07	9,2E+07	6,6E+07	7,7E+07	9,1E+07
18	8,7E+07	6,4E+07	1E+08	8,5E+07	8,7E+07	1,3E+08
27	1E+08	7,7E+07	1,2E+08	1,1E+08	9,5E+07	1,8E+08
36	9,9E+07	1E+08	1,2E+08	1,3E+08	1,1E+08	2,2E+08
45	1,4E+08	1,4E+08	1,2E+08	1,4E+08	1,2E+08	2,3E+08
48	1,5E+08	1,1E+08	1,2E+08	1,5E+08	1,3E+08	1,1E+08

e. Concentración de alcohol v/v de las dos variedades de ñame durante el proceso de fermentación

VARIEDAD Y CONCENTRACIÓN DE ÑAME	CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL V/V
D. bulbifera 10%	10,87
D. bulbifera 13%	9,68
D. bulbifera 16%	11,18
D. trifida 10%	11,1
D. trifida 13%	14,4
D. trifida 16%	12,5

f. Concentración final de alcohol v/v de las dos variedades de ñame después del proceso de fermentación.

VARIEDAD Y CONCENTRACIÓN DE ÑAME	CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL V/V	VOLUMEN FINAL ALCOHOL(ml)
D. bulbifera 10%	12,35	286,75
D. bulbifera 13%	12,5	296,75
D. bulbifera 16%	12,4	334,50
D. trifida 10%	11,4	346,00
D. trifida 13%	13,5	381,75
D. trifida 16%	12,2	364,80

Anexo E Datos estadísticos para la evaluación del rendimiento en la producción de alcohol.

Resumen Estadístico para Rendimiento

Ñame	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica	Mínimo
Bulbifera 10%	4	706,54	2839,66	53,2885	646,0
Bulbifera 13%	4	569,34	1389,97	37,2823	532,71
Bulbifera 16%	4	520,655	3669,19	60,5738	460,03
Trifida 10%	4	775,02	5501,85	74,1745	730,16
Trifida 13%	4	792,725	832,302	28,8497	750,0
Trifida 16%	4	554,342	1392,38	37,3146	504,56
Total	24	653,104	14477,4	120,322	460,03

Ñame	Máximo	Rango	Asimetría típica.	Curtosis típicada
Bulbifera 10%	765,7	119,7	-0,0432698	-1,02209
Bulbifera 13%	617,35	84,64	0,560059	-0,362937
Bulbifera 16%	604,67	144,64	0,898817	0,893918
Trifida 10%	885,94	155,78	1,60265	1,58501
Trifida 13%	813,0	63,0	-1,50854	1,44143
Trifida 16%	592,18	87,62	-0,683818	0,283204
Total	885,94	425,91	0,354789	- 1,18284

Contraste Múltiple de Rango para Rendimiento según Ñame

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ñame	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Bulbifera 16%	4	520,655	X
Trifida 16%	4	554,342	X
Bulbifera 13%	4	569,34	X
Bulbifera 10%	4	706,54	X
Trifida 10%	4	775,02	XX
Trifida 13%	4	792,725	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Bulbifera 10% - Bulbifera 13%	*137,2	75,8115
Bulbifera 10% - Bulbifera 16%	*185,885	75,8115
Bulbifera 10% - Trifida 10%	-68,48	75,8115
Bulbifera 10% - Trifida 13%	*-86,185	75,8115
Bulbifera 10% - Trifida 16%	*152,197	75,8115
Bulbifera 13% - Bulbifera 16%	48,685	75,8115
Bulbifera 13% - Trifida 10%	*-205,68	75,8115
Bulbifera 13% - Trifida 13%	*-223,385	75,8115
Bulbifera 13% - Trifida 16%	14,9975	75,8115
Bulbifera 16% - Trifida 10%	*-254,365	75,8115
Bulbifera 16% - Trifida 13%	*-272,07	75,8115
Bulbifera 16% - Trifida 16%	-33,6875	75,8115
Trifida 10% - Trifida 13%	-17,705	75,8115
Trifida 10% - Trifida 16%	*220,678	75,8115
Trifida 13% - Trifida 16%	*238,383	75,8115

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la Tabla ANOVA para el Rendimiento según Nombre

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	286104,0	5	57220,7	21,97	0,0000
Intra grupos	46876,1	18	2604,23		
Total (Corr.)	332980,0	23			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Rendimiento en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 21,9723, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las Rendimiento medias de un nivel de Nombre a otro para un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, se selecciono los Tests de Rangos Múltiples.

Con una diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Contraste de Varianza

Contraste C de Cochran:	0,35211	P-valor = 0,489588
Contraste de Bartlett:	1,22494	P-valor = 0,664126
Contraste de Hartley:	6,6104	
Test de Levene:	0,257844	P-valor = 0,930212

El StatAdvisor

El cuarto estadístico mostrado en esta tabla, comprueba la hipótesis nula de que la desviación típica de Rendimiento1 dentro de cada uno de los 6 niveles de Nombre, es la misma. De particular interés están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%.

Gráfico de Cajas y Bigotes

