

**EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE ALCOHOL DE LAS
VARIETADES DE ÑAME CRIOLLO BURRION (*D. alata*) Y ESPINO
ALEMÁN (*D. rotundata*) UTILIZANDO EL PROCESO SACARIFICACION -
FERMENTACION SIMULTANEA (SSF) POR VIA ENZIMATICA**

**ZAYLY MILENA GONZÁLEZ TATIS
ROLANDO JOSE LÓPEZ MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SINCELEJO
2009**

**EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE ALCOHOL DE LAS
VARIETADES DE ÑAME CRIOLLO BURRION (*D. alata*) Y ESPINO
ALEMÁN (*D. rotundata*) UTILIZANDO EL PROCESO SACARIFICACION -
FERMENTACION SIMULTANEA (SSF) POR VIA ENZIMATICA**

**ZAYLY MILENA GONZÁLEZ TATIS
ROLANDO JOSE LÓPEZ MARTÍNEZ**

**Proyecto de trabajo de grado para optar al título de Ingeniero
Agroindustrial**

**Director
JAIRO GUADALUPE SALCEDO MENDOZA
Ingeniero Químico**

**Codirector
SERGIO PATERNINA URZOLA
Biólogo.**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SINCELEJO
2009**

**Las ideas expuestas en este trabajo son únicas y exclusivas de los
Autores (Art. 2 Res 02 – 2003)**

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas necesarias en los momentos en que más las necesite y bendecirme con la posibilidad de caminar a su lado durante toda la vida.

A mis padres Tomas López y Ludís Martínez, por todo lo que me han dado en esta vida, especialmente por sus sabios consejos y por estar a mi lado en momentos difíciles.

A mis hermanos Andrés, Sandy, yonni: por su respaldo y motivación continua.

A mi compañera de tesis Zayly Gonzalez, por soportarme todo este tiempo y ayudarme a alcanzar este logro.

A mis amigos, compañeros y demás personas, por ser parte importante de mi vida, que me han ayudado a crecer y eso no tiene valor...

Rolando López Martínez.

DEDICATORIA

A Dios por brindarme conocimiento, paciencia y permitir culminar esta parte de mi proyecto de vida.

A mis padres Zaily Tatis y Elkin González por su apoyo, confianza y comprensión, por haber contribuido al logro de esta meta.

A mis hermanos Elkin, Jeison y Rafael y demás familiares que fueron un respaldo en este proceso.

A todos mis amigos y compañeros por su gran apoyo, compañía y consejos, gracias a ustedes llevo momentos muy gratos en mi memoria y corazón.

Zaily González Tatis.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Facultad de Ingeniería, Universidad de Sucre.

Al profesor Jairo Salcedo ingeniero químico y director del trabajo.

A Sergio Paternina, codirector por sus recomendaciones, colaboración y apoyo.

A Deris Cumplido y Robert Betín por su colaboración durante el proceso experimental del presente trabajo, en la Planta de Operaciones Unitarias sede Perico.

A Alis Mejía por sus recomendaciones y asesoría.

A APROS (Asociación de Productores Orgánicos de San Rafael) por suministrarnos la materia prima de esta investigación.

A Los compañeros y amigos de formación profesional, por su incondicional ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
1. INTRODUCCION Y PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
3. ESTADO DEL ARTE	21
3.1 GENERALIDADES DEL ÑAME	21
3.1.1 Prácticas de producción	22
3.1.1.1. Preparación del suelo y siembra.	22
3.1.1.2. Cosecha.	22
3.1.1.3. Prácticas de postcosecha.	23
3.2 PRODUCCIÓN DE ÑAME A NIVEL MUNDIAL.	23
3.2 .1 Producción de ñame a nivel nacional.	24
3.3 VARIEDADES DE ÑAME	26
3.3.1 Variedad Burrión (<i>D. alata</i>).	27
3.3.2 Variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>).	28
3.4 PRODUCTIVIDAD DE HARINA Y ALMIDÓN DE ÑAME	29
3.4.1 Características físico-químicas y morfológicas de algunos almidones.	31 32
3.5 ENZIMAS DEGRADADORES DE ALMIDÓN (AMILASAS).	33
3.5.1 Enzimas α – Amilasas	34
3.5.2 Las Glucoamilasas.	
3.5.3. Descripción del complejo enzimático Stargen™ 001 empleado en el proceso.	34 35
3.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDON.	36
3.7 FERMENTACIÓN ALCOHOLICA.	36
3.7.1 Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).	37
3.7.1.1 Etanol Red (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y emulgentes E491).	37
3.8 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SSF)	41
3.9 BIOETANOL.	41
3.9.1. Materias Primas.	41
3.9.1.1. Alcohol a partir de Almidón.	44
3.9.2. Ventajas del Etanol	45
3.9.3. Desventajas del Etanol	45
3.9.4. Bioetanol en Colombia.	48
4. DISEÑO METODOLOGICO	48

4.1 Tipo de investigación	48
4.2 Localización del proyecto	48
4.3 Variables	48
4.3.1 Variables Independientes	49
4.3.2 Variables Dependientes	49
4.4. Diseño Experimental	50
4.5 Procedimiento	
4.5.1 Obtención de harina de ñame de las variedades Criollo Burrión (<i>D. alata</i>) y Espino Alemán (<i>D. rotundata</i>).	50
4.6 Evaluación del comportamiento de las enzimas STARGEN 001 durante la sacarificación y licuefacción simultanea (SSF), de la harina de ñame de las variedades burrión (<i>D. alata</i>) y alemán (<i>D. rotundata</i>).	51
4.6.1 Proceso de Sacarificación - fermentación simultánea (SSF).	53
4.6.1.1 Preparación del inóculo.	54
4.6.1.2 Filtración.	54
4.7 Evaluación del rendimiento de alcohol producido	55
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1 OBTENCIÓN DE LA HARINA	
5.2 COMPORTAMIENTO DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO STARGEN 001 DURANTE EL PROCESO SSF.	56
5.2.1 Análisis de la producción de equivalente de dextrosa (E.D) de las variedades de ñame Burrión (<i>D. alata</i>) y la variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>).	56
5.2.2. Evaluación del crecimiento celular (<i>Etanol Red</i>) para las variedades de ñame Burrión (<i>D. alata</i>) y la variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>).	60
5.2.3. Evaluación de la variación de la concentración de alcohol durante el tiempo de SSF para las variedades del ñame Burrión (<i>D. alata</i>) y Alemán (<i>D. Rotundata</i>).	65
5.3 EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL	71
6. CONCLUSIONES	73
7. RECOMENDACIONES	74
8. BIBLIOGRAFÍA	82
9. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ñame Criollo Burrión (<i>D. alata</i>)	27
Figura 2. Ñame Espino Alemán (<i>D. rotundata</i>).	29
Figura 3. Integración del proceso de producción de alcohol carburante a partir de almidón.	39
Figura 4. Pasos para la obtención de harina de ñame.	50
Figura 5. Montaje de un biorreactor experimental a nivel de laboratorio, para la obtención de alcohol etílico de las variedades de ñame Burrión (<i>D. alata</i>) y Alemán (<i>D. rotundata</i>).	52

LISTA DE GRAFICAS

- Grafica 1.** Equivalente Dextrosa en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v. 57
- Grafica 2.** Equivalente Dextrosa en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v. 58
- Grafica 3.** Crecimiento microbiano en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v. 60
- Grafica 4.** Crecimiento microbiano en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v. 61
- Grafica 5.** Producción de alcohol (% v/v) en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*), a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v. 63
- Grafica 6.** Producción de alcohol (% v/v) en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. rotundata*), a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v. 64
- Grafica 7.** Medias para el Rendimientos de alcohol (L/Kg) Vs Variedades ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrion (*D. alata*). 68

Grafica 8. Medias para el Rendimientos de alcohol de las variedades 69
de ñame (Alemán y Burrión) Vs Concentraciones de harina.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de <i>D. alata</i> y <i>D. rotundata</i> (Base seca)	22
Tabla 2. Superficie cultivada, producción y rendimiento de ñame en Colombia, según departamentos. 2001.	25
Tabla 3. Principales municipios productores de ñame en la Costa Atlántica	26
Tabla 4. Rendimiento comercial y total de los genotipos con mas de 10 T/ha cosechados para la Feria de Fitomejoramiento Participativo en San Jacinto (Bolívar)	28
Tabla 5. Modelo Analítico de productividad de harinas.	30
Tabla 6. Modelo Analítico de producción de almidones.	31
Tabla 7. Características físico-químicas y morfológicas de algunos almidones.	32
Tabla 8. Proyectos indicativos productores de alcohol carburante.	46
Tabla 9. Datos comparativos de yuca y caña de azúcar	47
Tabla 10. Dosis enzimática de STARGEN 001 empleadas en los procesos de licuefacción – sacarificación simultánea.	53

- Tabla 11.** Rendimientos de harina de ñame de las variedades Criollo 55 Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*).
- Tabla 12.** Rendimiento en litros de alcohol/Kg de harina de las 65 variedades Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de sustrato de 12%, 25% y 35% p/v.
- Tabla 13.** Rendimientos de alcohol de las variedades de ñame Burrión 66 y Alemán a las concentraciones de 12%, 25 % y 35%.
- Tabla 14.** Pruebas de múltiple rangos para rendimiento por variedades 67 de ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*)
- Tabla 15.** Pruebas de múltiple rangos para rendimiento por 68 concentración de ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*)

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Ficha técnica: STARGEN™ 001.	82
ANEXO B. Ficha técnica: Ethanol Red™ Dry alcohol yeast	84
ANEXO C. Resumen estadístico; Equivalente Dextrosa variedad Burrión (<i>D. alata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.	86
ANEXO D. Resumen estadístico; Numero de Microorganismos (M.O) variedad Burrión (<i>D. alata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v	88
ANEXO E. Resumen estadístico; Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión (<i>D. alata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v	90
ANEXO F. Resumen estadístico; Equivalente Dextrosa variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.	92
ANEXO G. Resumen estadístico; Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.	94
ANEXO H. Resumen estadístico; Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.	96
ANEXO I. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Rendimiento con intervalos de confianza del 95,0%	98
ANEXO J. Resultados de la SSF para las variedades de ñame Burrión (<i>D. alata</i>) y la variedad Alemán (<i>D. rotundata</i>).	99

RESUMEN

El auge mundial de biocombustibles como el etanol, ha llevado a explorar nuevas fuentes y metodologías de proceso para optimizar su producción; por tal razón se aborda en esta investigación el proceso Sacarificación - Fermentación Simultáneas (SSF) con dos variedades de ñame Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*) a tres concentraciones de harina (12%, 25% y 35% p/v) utilizando el complejo enzimático Stargen™ 001 y la levadura Etanol Red, con el fin de evaluar los rendimientos de alcohol producidos (Litros de alcohol / Kg de harina de ñame) y determinar la mejor variedad y concentración de sustrato. Se utilizó un diseño experimental Multifactorial - categórico con 2 factores y 3 niveles para un total de 18 corridas durante 48 horas, midiéndose la Concentración de azúcares reductores o equivalentes de dextrosa (E.D), Concentración de alcohol y número de microorganismos (levaduras). Obteniéndose valores máximos de %ED para las variedades Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*) a la concentración de 25% p/v de 4.45 y 6.005 respectivamente durante las primeras cuatro horas de proceso. La evaluación del rendimiento mostró que a concentración de sustrato de 12% p/v se obtuvieron los mayores rendimientos 0.139 y 0.136 litros de alcohol/ kg de harina, para las dos variedades Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*) correspondientemente.

Palabras clave: Alcohol etílico, harina de ñame, SSF.

ABSTRACT

The booming global biofuels such as ethanol, has led to explore new sources and methodologies to optimize their production process, for this reason this research is addressed in the process Saccharification - Simultaneous Fermentation (SSF), using two varieties of yams, variety variety German (*D. rotundata*) and Burrión (*D. alata*), three concentrations of flour (12%, 25% and 35% w / v) and the enzyme complex Stargen TM 001 and Ethanol Red yeast, in order to assess produced yields of alcohol (liters of alcohol / kg of yam flour) and determine the best variety and concentration of substrate. for this research, an experimental design was used Multifactorial - categorical with 2 factors and 3 levels for a total of 18 runs during 48 hours, measuring the concentration of reducing sugars or dextrose equivalent (ED), alcohol concentration and number microorganisms (yeasts). Obtaining values for ED% for German varieties (*D. rotundata*) and Burrión (*D. alata*) to a concentration of 25% w / v of 4.45 and 6005 respectively during the first four hours of processing. The performance evaluation showed that a substrate concentration of 12% w / v were obtained with higher yields 0.139 and 0.136 liters of alcohol / kg of flour, for the two German varieties (*D. rotundata*) and Burrión (*D. alata*) correspondingly

Keywords: Ethanol, yam flour, SSF, fermentation.

1. INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gobierno nacional a través del Ministerio de Agricultura ha planteado el montaje de plantas de alcohol carburante en la Costa Atlántica, que utilizaran como materia prima yuca. El éxito de estas plantas productoras de alcohol depende del suministro continuo de materia prima, datos históricos de siembra y cosecha de yuca muestran que puede existir incertidumbre como fuente sostenible de materia prima, lo que plantea la necesidad de explorar nuevas materias primas de la región que en cualquier momento puedan sustituir a la yuca.

Entre las materias primas sustitutas, pueden estar las variedades de *D. alata* y *D. rotundata* comúnmente llamado ñame Criollo y Espino respectivamente, dado que son una excelente fuente de carbohidratos (FAO, 2003), se pueden considerar una fuente alternativa en la producción de Biocombustible.

La posibilidad para que el ñame sea una materia alterna para la producción de alcohol dependerá de factores como:

- Que tanto se aumentan los rendimientos Kilogramos / hectáreas de las diferentes variedades de ñame, que influiría en el costo de la materia prima.
- La capacidad que tengan las diferentes variedades de ñame al ataque de enzimas amilolíticas, que esta ligado a la cantidad de enzima que se consumirá en el proceso.
- Rendimientos a la producción de alcohol.
- Consumo de energía en el proceso de producción de dextrinas.

La información sobre el procesamiento de ñame con estos fines es escasa, sin embargo se ha estudiado las propiedades tecnofuncionales de los

almidones de ñame del banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba (Salcedo, *et al.*, 2006) con resultados optimistas en el potencial para la industrialización de dichas variedades, cabe anotar que estos estudios revelan la gran diferencia que existe en el contenido de amilosa de las especies de ñame, demostrando que puede existir una gran divergencia entre ellos al ataque de enzimas amilolíticas, que son muy utilizadas en los procesos de licuefacción y sacarificación en la obtención de alcohol etílico, lo que conduce a indagar sobre la posibilidad de usar el ñame para su transformación en alcohol carburante, de aquí surgen los siguientes interrogantes: ¿Cuál será el rendimiento de la conversión de las variedades de ñame *D. alata* y *D. rotundata* de la costa Atlántica en alcohol?. ¿Que ventajas tiene estas variedades con respecto a otro tubérculo como la yuca? ¿Cual es la respuesta de las diferentes variedades de ñame al ataque de enzimas amilolíticas?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los rendimientos (Litros de alcohol producido / Kg. de Harina de ñame) de las variedades de ñame Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*) utilizando el proceso de Sacarificación-Fermentación Simultánea (SSF) por medio de el complejo enzimático STARGEN 001 y la levadura Etanol Red (Dry alcohol yeast)

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar el comportamiento del complejo enzimático STARGEN 001 durante la Sacarificación - Fermentación Simultánea, de la harina de ñame de las variedades Burrión (*D. alata*) y alemán (*D. rotundata*).
- Comparar los rendimientos de alcohol obtenidos en el proceso de Sacarificación – Fermentación Simultánea de las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a las concentraciones de sustrato 12%, 25% y 35% p/v.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. GENERALIDADES DEL ÑAME.

El tubérculo ñame es una de varias especies de plantas del género *Dioscorea* (de la familia *Dioscoreaceae*) y del orden *Dioscoreales*, nativo de regiones cálidas de ambos hemisferios cuya parte expuesta es en forma de enredadera. Algunas raíces de ñame pueden llegar a tener más de 2.25 m y más de 54 Kg.

Dependiendo de la variedad del ñame, la parte carnosa puede ser de diferentes tonalidades de blanco, amarillo, púrpura o rosado, y la piel desde blancuzca a chocolate oscuro. La textura de este tubérculo puede variar de suave y húmedo a áspero, seca y harinosa. El ñame tiene sabor parecido al de la papa dulce o batata y usos similares en la alimentación después de cocidos, en puré, en sopas y en guisos. También se preparan con él hojuelas crocantes y una chicha o masato de ñame. (Blanco *et al.*, 2004)

Los tubérculos del ñame son una excelente fuente de carbohidratos; contienen vitaminas como carotenos, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico, el contenido de proteínas es del 4.8% en base seca (FAO, 2002) (ver tabla 1)

Tabla 1. Composición química de *D. alata* y *D. rotundata* (Base seca)

COMPONENTES	<i>D. alata</i>	<i>D. rotundata</i>
MATERIA SECA G/100	27.4	32.3
ALMIDÓN %	84	85
FIBRA CRUDA %	2.2	2.1
EXTRACTO ETÉREO %	0.8	0.5
PROTEÍNA %	4.9	4.8
CENIZA %	3.6	2

Fuente: Procesamiento del ñame *D. alata* y *D. rotundata*, Hurtado, Ortiz, Rodríguez y Dufour, 1997.

3.1.1. Prácticas de producción. El ñame es un cultivo de bajo nivel tecnológico, sembrado generalmente en asocio, que genera alta mano de obra. A continuación se describen los aspectos productivos del ñame, (Sanchez vesga, 1997):

3.1.1.1. Preparación del suelo y siembra. En la producción de ñame criollo se realizan las prácticas de: arada, rastrillada, hoyada y siembra; si no se ara, entonces se hace limpieza manual, hoyada y siembra. En ñame espino se hace: Pica, quema, despalite, hoyada y siembra.

3.1.1.2. Cosecha. La cosecha se realiza manualmente después de haber cumplido su ciclo vegetativo cuando la parte aérea está seca. Para la especie alata se hace a los 10 o 12 meses. En la especie rotundata se hace una primera cosecha a los 6 u 8 meses y se llama la capada, que consiste en hacer un corte en la parte superior del tubérculo y extraerlo para comercializarlo dejando la cabeza en el suelo, la cual vuelve a tuberizar y produce en tres meses cuando la planta muere, un tubérculo de forma irregular que se usa como semilla.

Para la extracción de los tubérculos se utilizan cavadores, barretones o palancas con los cuales se cava alrededor del tallo evitando el mínimo contacto con el rizoma. El ñame espino es menos resistente por lo delicado de su corteza.

3.1.1.3. Prácticas de postcosecha. El ñame espino, por sus características de pérdida de peso rápida no se almacena, comercializándose inmediatamente después de la cosecha. El ñame criollo presenta mejores características de conservación que permiten realizar las labores de selección, clasificación, limpieza y almacenamiento del producto y su comercialización directamente o a través de intermediarios.

3.2. PRODUCCIÓN DE ÑAME A NIVEL MUNDIAL.

El tubérculo ñame es muy popular en centro y sur América, el Caribe, África y partes del Asia. Diversas variedades de ñame se cultivan a través de los trópicos y en parte de las regiones sub-tropicales y templadas. En África occidental y en Nueva Guinea el ñame es uno de los principales cultivos primarios. Existen más de 150 especies de ñames en el mundo (Blanco, 2004).

En Asia, África y América, existen tres fuentes de origen para las seis especies principales de ñame comestibles: *D. trifida* de la cuenca amazónica en América del Sur; el complejo *D. cayenensis-rotundata* (ñame amarillo y ñame blanco respectivamente) y *D. dumetorum* en África Occidental; *D. alata* (ñame de agua) y *D. esculenta* en el Sureste de Asia y *D. bulbifera* en África Occidental y/o Sureste de Asia. En muchos pueblos de África tropical, del Pacífico y las zonas del Caribe, el ñame se cultiva en gran escala. (Durango

y padilla, 1998). Además existen otras variedades como Dioscorea japonica, Diamante 22, Baboso de Ocú, Culebra, Mano de Tigre. (Vicomex, 1995)

El promedio de producción a nivel mundial es 9.13 T/ha. El más alto rendimiento lo registra las Islas Salomón, que produce dos veces y media más (24.6 T/ha). En América Costa Rica con 18.5 T/ha tiene la mayor productividad. Colombia ocupa el puesto 14, con 11 T/ha. En Latinoamérica los principales productores son Brasil y Colombia. (FAO, 2003)

3.2.1 Producción de ñame a nivel nacional. De acuerdo con las cifras del Ministerio de Agricultura (2002), en el país se cultivan 23,039 hectáreas en ñame y se producen 254,489 toneladas, con un rendimiento medio de 11,1 T/ha (Tabla 2).

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 subregión natural de los montes de María en los departamentos de Sucre y Bolívar (Tabla 3), y algunos municipios de los departamentos del Cesar y la Guajira. 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 (CORPORACION PBA, 2005).

En Colombia el ñame es cultivado por pequeños y medianos agricultores, con bajo nivel tecnológico, generalmente asociado con cultivos de yuca y maíz, constituye en muchas regiones la principal fuente de ingresos, de empleo rural y de oferta de alimento a sus pobladores, también es un producto de exportación (CORPOICA, 2003).

La comercialización de ñame es regional para consumo en fresco, aunque una parte se exporta a Estados Unidos, España y Alemania para alimento de la población latina y uso farmacológico. Además su exportación a los mercados de Estados Unidos y Europa le genera al país más de US\$2.5 millones anuales. (Sánchez, 1997).

Tabla 2. Superficie cultivada, producción y rendimiento de ñame en Colombia, según departamentos. 2001.

Departamento	Superficie cosechada (hectáreas)	Producción de raíces (toneladas)	Rendimientos de raíces (toneladas/hectáreas)
Antioquia	295	4.652	15.769
Atlántico	238	2.142	9.000
Bolívar	8.192	100.012	12.208
Cesar	570	10.960	19.228
Choco	173	1.408	8.139
Córdoba	10.059	102.510	10.191
La Guajira	190	1.093	5.753
Magdalena	90	560	6.222
San Andrés y Prov	4	7	1.750
Sucre	3.228	31.505	9.760
Total Nacional	23.039	254.849	11.062

Fuente: Ministerio de Agricultura, evaluación agrícola 2002.

Tabla 3. Principales municipios productores de ñame en la Costa Atlántica

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO
BOLIVAR	San Jacinto San Juan – Nepomuceno El Carmen
CORDOBA	Chinú Sahagún Pueblo Nuevo Ciénaga de Oro Moñitos
SUCRE	Toluviejo Sampués Morroa Los Palmitos Ovejas San Onofre

Fuente: PBA, 2004

3.3 VARIEDADES DE ÑAME.

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 y Perea, 1998).

3.3.1 Variedad Burrión (*D. alata*). El ñame Criollo Burrión presenta una apariencia irregular, cualidades culinarias como: dulzor, buena harina, excelente sabor, buena textura, color blanco, es un ñame muy rendidor 25.7 T/ha. (CORPORACION PBA, 2005). Figura 1.



Figura 1. Ñame Criollo Burrión (*D. alata*)

Según investigaciones realizadas por la Corporación PBA en 2005, se cuenta con análisis estadísticos del Rendimiento Comercial de genotipos con mas de 10 T/ha cosechados para la Feria de Fitomejoramiento Participativo en San Jacinto (Bolívar) (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento comercial y total de los genotipos con mas de 10 T/ha cosechados para la Feria de Fitomejoramiento Participativo en San Jacinto (Bolívar)

Código	Nombre Común	Rendimiento comercial T/ha	Rendimiento total
24	Criollo Burrión	25.75	25.75
14	Criollo con Espina	24.25	24.25
21	Familia Carne Blanca	12.75	16.75
31	Criollo Lomo Caimán	14.50	14.50
12	Lomo Caimán	1.25	11.25
33	Criollo peludo concha prieta	10.50	11.00
32	Osito Higuieron	10.50	10.50
20	Corpoica 03	10.25	10.25

Fuente: Corporación PBA. 2005.

3.3.2 Variedad Alemán (*D. rotundata*). El ñame Espino Alemán es originario de Brasil, la planta presenta poco follaje, su ciclo vegetativo es de 9 meses, es muy resistente a problemas fitosanitarios, el tubérculo posee una buena apariencia, forma cilíndrica, tipo exportación, de diversos tamaños, buena textura, agradable sabor, pulpa de color blanco y produce una excelente harina. Adicionalmente es un ñame muy rendidor, 22 T/ha. (Martínez Naar Fredy, 2009). Ver Figura 2.



Figura 2. Ñame Espino Alemán (*D. rotundata*).

3.4. PRODUCTIVIDAD DE HARINA Y ALMIDÓN DE ÑAME

Según el estudio realizado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, se pudo calcular los rendimientos potenciales de campo de las diferentes especies para la producción de harinas y de almidones. En la Tabla 5 se presenta el modelo analítico de la producción de harina de ñame en la Costa Atlántica.

Tabla 5. Modelo Analítico de productividad de harina de ñame en la Costa Atlántica

Especie	Periodo Vegetativo (meses)	Productividad en raíces o tubérculos kg/ha	Materia seca %	Productividad potencial Kg de harina/ha	Productividad potencial Kg harina/ha/mes
Ñame					
Criollo (C. A)	11	9.181	28.1	2.580	235
Ñame espino (C. A)					
(C. A)	11	22.930	37.3	8.553	778

Fuente: CORPOICA 2003.

El cultivo del ñame Espino en la Costa Atlántica presenta una productividad potencial relativamente alta (778 kg/ha/mes) para la fabricación de harinas. Su ventaja está determinada básicamente por el alto contenido de materia seca en los tubérculos. La producción de harina de ñame se justifica además por el contenido y calidad de la proteína (Flores y otros, 1985) y por el contenido de tiamina (Rodríguez, 1997).

Al analizar la productividad potencial de las especies en términos de almidón (Tabla 6), se observa la misma tendencia que en harinas, dado que en casi todos los casos el contenido de almidón representa entre el 76 y el 77% de la materia seca total. (CORPOICA, 2003)

Tabla 6. Modelo Analítico de producción de almidones de ñame en la Costa Atlántica

Especie	Periodo Vegetativo (meses)	Productividad en raíces o tubérculos kg/ha	Tasa de convers %	Productividad potencial Kg de almidón/ha	Productividad potencial Kg almidón/ha/mes
Ñame					
Criollo (C. A)	11	9.181	28.1	2.051	186
Ñame					
Espino (C. A)	11	22.930	37.3	6.586	599

Fuente. CORPOICA 2003.

3.4.1. Características físico-químicas y morfológicas de algunos almidones. La gran diversidad de características y propiedades funcionales de los diferentes tipos de almidón permite su utilización en una amplia gama de industrias como la alimenticia (panificación, coladas, espesante de sopas instantáneas, productos enlatados, fabricación de salsas, productos dietéticos, dulces y gomas, entre otros); en farmacéutica, cosmetológica, textil, de adhesivos, papelería y producción de alcoholes. (Ostertag, 1997).

Algunas de las características de los almidones de diferentes especies amiláceas se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Características físico-químicas y morfológicas de algunos almidones.

Raíces-Tubérculos	Contenido de amilasa%	Temperatura gelatinización (°C)	Viscosidad máxima (u.B)	Forma del granulo	Diámetro mayor-menor (µm)
Achira	23.3	61	570	Elipsoidal	45-25
Arracacha	18.5	58.7	717	Elipsoidal	10-8
Ñame	31.1	83.5	560	Elipsoidal	18-13
Papa	25.9	61	2.080	Elipsoidal	31-23
Yuca	21.5	63.3	482	Esférica	12-11

Fuente: Dufour y Hurtado, 1996. CIRAD-CIAT-CORPOICA

El almidón de ñame presenta el más alto contenido de amilosa y una alta temperatura de gelatinización, En las pruebas realizadas por el CIRAD-CIAT se encontró que el almidón de ñame, al igual que el de achira, presenta una alta resistencia a condiciones de esterilización.

3.5. ENZIMAS DEGRADADORES DE ALMIDÓN (AMILASAS).

Las enzimas son proteínas complejas altamente especializadas que tienen como función la catálisis o regulación de la velocidad de las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos (Universidad Nacional del Nordeste, 2004). Una de las principales características de las enzimas es su especificidad sobre el sustrato, es decir, que producen un cambio químico específico en otras sustancias, sin que exista un cambio en ellas mismas (Dugdale, 2009).

Las amilasas, son las enzimas responsables de la degradación del almidón, hidrolizan los enlaces glucosídicos α 1-4 (Satyanarayana *et al.*, 2005). Las amilasas dan como productos dextrinas y polímeros compuestos

progresivamente por unidades de glucosa (Asgher m, y otros 2006). Esta familia de enzimas hidrolíticas esta compuesta por las proteínas catalíticas: alfa-amilasa, beta-amilasa; glucoamilasa; isoamilasa (Tripathi pallavi et al., 2007).

Las amilasas se pueden dividir en tres grupos: α amilasas, las cuales rompen al azar enlaces α 1-4 glicosídicos presentes en la parte interior del sustrato o de la cadena de amilasa y amilopectina (endoamilasas); β amilasas o examilasas, que rompen enlaces α 1-4 y enlaces α 1-6 glicosídicos ordenadamente a partir de los extremos no reductores del sustrato (Artime, 2005). Actúan sobre los residuos de glucosa externos de la amilasa y amilopectina produciendo solamente glucosa (glucoamilasa y glucosidasa) o maltosa y dextrinas y glucoamilasas que liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (Pandey *et al.*, 2000).

3.5.1. Enzimas α – amilasas. Las α -amilasas (1,4-D-glucanohidrolasa) son endohidrolasas las cuales degradan los enlaces α -1,4-D-glucosídicos y pueden pasar por alto, no hidrolizando los puntos de ramificación α -1,6 (Chaplín, 2004). 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 la α - amilasas sobre la fracción de amilasa del almidón, se da en dos etapas. Inicialmente, tiene lugar una rápida degradación de la amilasa para dar maltosa y maltotriosa. En la segunda fase, más lenta ocurre hidrólisis de los oligosacáridos, formando glucosa y maltosa como productos finales. La acción sobre la amilopectina produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas y oligosacáridos de cuatro o más residuos de glucosa todos con enlaces glicosídicos α 1-6 (López, 2002).

3.5.2. Las Glucoamilasas. Las amiloglucosidasas (α -D-1,4, glucan-glucohidrolasa), también conocida como glucoamilasa, es una enzima que cataliza una reacción de hidrólisis de enlaces α -1,4 y α -1,6 de los extremos no reductores del almidón y de otros polisacáridos transformándolos en glucosa. Su ventaja reside en alcanzar altos rendimientos próximos a los estequiométricos (Anto, *et. al.*, 2006).

La amiloglucosidasa es en su mayor parte producida por los géneros de hongos *Aspergillus* y *Rhizopus*, dentro de las cuales la amiloglucosidasa de *Aspergillus* es más termoestable. La amiloglucosidasa cataliza eficientemente la reacción de sacarificación del almidón dentro de un rango estrecho de temperatura (Fuchs, *et. al.*, 2003). A pesar de que otros microorganismos producen amiloglucosidasas, la producida por hongos del género *Aspergillus* es preferida por su mayor termoestabilidad. El peso molecular de la glucoamilasa, varía de acuerdo con la fuente fúngica de 48000 a 90000 Daltons (Akbarzadeh, *et. al.*, 2006).

3.5.3. Descripción del complejo enzimático STARGEN™ 001 empleado en el proceso. Es una mezcla de enzimas que descomponen los gránulos de almidón eficientemente a la temperatura de fermentación en presencia de una levadura activa. La mezcla incluye α – amilasa y una glucoamilasa que "taladra" agujeros en los gránulos de almidón. Ejemplos de organismos productores de glucoamilasa en la naturaleza; *Aspergillus niger*, *Hemicolla grisea*, y *Rhizopus oryzae*. Ejemplos de organismos productores en la naturaleza de α – amilasa en la *A. niger*, *A. Kawachi*, *R. niveus*, *Bacillus circulans*, y *B. polymyxa*.

La enzima STARGEN™ es capaz de hidrolizar gránulos insolubles (crudos) de almidón en azúcares fermentables, permitiendo la despolimerización

del almidón en glucosa en la producción de alcohol a través de un proceso de una sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). (Genencor International, 2005). Ver Ficha técnica en Anexo A.

3.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN.

La hidrólisis del almidón o ruptura de los gránulos de éste en medio acuoso tienen como finalidad la transformación de los polímeros de glucosa en azúcares sencillos (Mera y Carrera, 2005). Los primeros procesos de hidrólisis del almidón se realizaban químicamente, mediante la utilización de ácidos y temperaturas elevadas (150 - 200°C). Estos procedimientos, sin embargo, han sido sustituidos a partir de los años 60 del siglo pasado por otros basados en la utilización de enzimas, principalmente a causa de su mayor rendimiento en glucosa. El proceso se realiza en dos fases, denominadas licuefacción y sacarificación. La harina de cereal obtenida tras la molienda se introduce en primer lugar en un tanque de licuefacción, donde se mezcla con agua a alta temperatura (88°C) y con la enzima α -amilasa. Esta enzima ataca al almidón al azar, produciendo maltosa (dímero de glucosa) y oligómeros superiores. Después de la licuefacción, la masa resultante se calienta brevemente a 110°C y a continuación se enfría a 60°C, realizándose seguidamente la sacarificación mediante la adición de la enzima glucoamilasa. La glucoamilasa actúa sobre el extremo no reductor de las moléculas de maltosa y oligómeros superiores, liberando glucosa. En el almidón, además de los enlaces α (1-4), existen puntos de ramificación unidos mediante enlaces α (1-6), que no pueden ser atacados por ninguna de las dos enzimas anteriores. Sin embargo, estos enlaces pueden hidrolizarse mediante una tercera enzima, la pululanasa, que probablemente se encuentra presente como componente minoritario en las preparaciones

enzimáticas comerciales. El resultado es la conversión casi completa del almidón en glucosa. (Centro de desarrollo Tecnológico LEIA, 2007).



3.7. FERMENTACION ALCOHOLICA.

La fermentación alcohólica es el proceso de conversión de la glucosa en etanol, por la acción de microorganismos. Esta transformación se produce a través de una compleja secuencia de reacciones que puede expresarse, desde el punto de vista tecnológico, por la siguiente ecuación:



Según esta reacción, de 100 kilogramos de glucosa se obtienen 51,1 kilogramos de etanol y 48,9 kilogramos de dióxido de carbono. En la práctica, el rendimiento real en etanol es menor que el valor teórico, ya que aproximadamente un 5% de glucosa es utilizado por el microorganismo para producir nuevas células y otros productos de su metabolismo (Ribeiro y Seravalle, 2004).

3.7.1. Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Los microorganismos generalmente empleados en la fermentación son las levaduras, hongos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los más utilizados en la fermentación alcohólica son los de la familia *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) (Pacheco y Sgarbieri, 2002).

Las levaduras son microorganismos eucariotes que cuando se encuentran en un medio rico en azúcares, proliferan y producen grandes cantidades de alcohol y CO₂. La ruta bioquímica más común para la fermentación de la glucosa es la glucólisis o también conocida como la ruta de Embden Meyerhof. La glucólisis puede dividirse en tres etapas principales y varias reacciones enzimáticas.

En la primera etapa de la glucólisis se forma el gliceraldehído 3-fosfato. En la segunda etapa ocurre una reacción de oxido-reducción, donde se producen enlaces de alta energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato. En la última etapa (fermentación), se presenta otra reacción de oxido-reducción y se forman los productos de la fermentación: etanol y CO₂ (Madigan, *et. al.*, 1997).

3.7.1.1. ETANOL RED (*Saccharomyces cerevisiae* y emulgentes E491).

Etanol Red Fermentis es una cepa, que se ha desarrollado para la industria de etanol. Con alta tolerancia al etanol, esta cepa actúa rápido manteniendo una alta viabilidad celular, especialmente durante la "muy alta gravedad" de fermentación. Utilizando etanol Red se puede esperar niveles más altos de etanol y aumento de la productividad (Fermentis). Ver ficha técnica Anexo B.

3.8. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SSF)

Las fases de sacarificación y fermentación tradicionalmente se han realizado de un modo separado y consecutivo, configurando un proceso denominado hidrólisis y fermentación separadas (SHF, *separate hydrolysis and fermentation*). Un paso adelante en la configuración del sistema vino de la posibilidad de realizar ambas fases simultáneamente. Es lo que se denomina

sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, *simultaneous saccharification and fermentation*) y se consigue mediante la adición al caldo de fermentación de las enzimas hidrolíticas requeridas seguida de la inoculación en el mismo del microorganismo, de modo que éste pueda fermentar los azúcares según van siendo liberados de la biomasa por la acción enzimática. La SSF presenta la ventaja de simplificar el proceso, ya que se reduce el número de reactores necesarios. Además, y de mayor importancia, evita el problema de la inhibición por producto asociada a la actividad enzimática, al evitar la acumulación de los azúcares fermentables, que son transformados por los microorganismos inmediatamente tras su liberación, impide que ocurra esa inhibición por producto y consigue incrementar el rendimiento y eficiencia total del proceso. (Centro de desarrollo Tecnológico LEIA, 2007), la SSF además permite la reducción de los tiempos de proceso al desarrollar la sacarificación enzimática y la fermentación en forma simultánea. La menor temperatura del proceso de sacarificación enzimática se compensa con una mayor adición de enzimas, de forma tal que no afecte la velocidad global del proceso. La reducción en el tiempo de proceso permite aumentar la capacidad instalada de las plantas, mejorando la productividad y reduciendo los costos de producción. (Castaño y Mejía 2008).

Desde que se realizaron las primeras experiencias con la SSF de biomasa, los tiempos del proceso por lotes han disminuido de 14 días requeridos para la conversión del 70% de la celulosa en etanol con una concentración final de $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de alcohol, hasta 3-7 días para alcanzar conversiones de 90-95% con una concentración de $40\text{-}50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol (Wyman, 1994). La tecnología SSF fue asimilada para la producción industrial de etanol a partir de almidón, obteniéndose rendimientos altos y sostenibles del orden de 2,75 gal/saco de maíz (Madson y Monceaux, 1995).

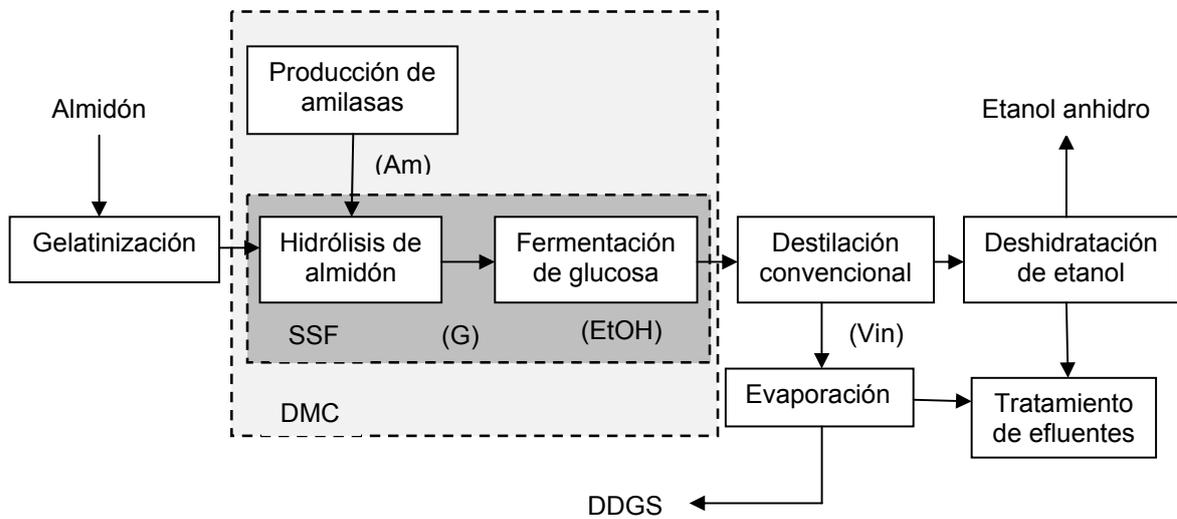


Figura 3. Integración del proceso de producción de alcohol carburante a partir de almidón. SSF: fermentación y sacarificación simultánea, DMC: conversión microbiana directa, Am: amilasas, G: glucosa, EtOH: etanol, Vin: vinazas, DDGS: granos secos de destilería con solubles (co-producto para alimentación animal).

Castaño y Mejía (2008), evaluaron la influencia de la concentración de azúcares reductores y la dosificación de la enzima Spirizyme fuel® sobre la productividad y concentración final de etanol, bajo el proceso SSF (sacarificación - fermentación simultáneas) a temperatura 30 °C, pH 4.5, partiendo del licuado de almidón de yuca como sustrato. El proceso SSF se compara con un control con características de sacarificación-fermentación independientes (SHF), proceso convencional. Sólo el factor concentración inicial de sustrato presenta efecto sobre la productividad de etanol. Las cinéticas de proceso, frente a las del control, presentan reducciones de tiempo de 47 y 33% para los niveles de sustrato evaluados. Los niveles de productividad son mayores en un 33% para el nivel de 150 g/l de AR (azúcares reductores) y se mantiene constante para 200 g/l. La glucosa en la estrategia SSF, conforme se produce se transforma en etanol, no permitiendo alcanzar concentraciones superiores a 100 g/l, lo que traduce

en que no se presentan inhibiciones por sustrato. La concentración de etanol no afecta la reacción de la enzima en el proceso de sacarificación.

Linde y Galbe (2006), estudiaron la Sacarificación y Fermentación Simultánea SSF de paja de cebada pretratada por vapor a bajas cargas de enzima y baja concentración de levadura, esta investigación fue realizada sobre la paja de cebada rociada con H_2SO_4 y vapor pre-tratado en condiciones que produce un material sumamente digestible, llevando a aumentar la concentración de agua-sólidos insolubles (Wáter-Insoluble Solids WIS), disminuyendo la carga de enzima y la concentración de levadura, para reducir el coste de producción. Fueron investigadas en términos de producción de etanol tres concentraciones de WIS (5, 7.5 y el 10 % p/p) y tres cargas de enzima (5, 10 y 20 celulosa FPU/G) de Celluclast 1.5 L complementada con Novozym 188. Los experimentos fueron realizados a temperaturas de 35°C y pH 5, previa esterilización. La producción de etanol más alta, el 82 % base teórica del contenido de glucosa en la paja de cebada, fue obtenida después SSF con el 5 % WIS en una carga de enzima de 20 celulosa FPU/G junto con 5 g/L la levadura.

Mojovic (2006), realizó ensayos de sacarificación-fermentación simultáneos a partir de hidrolizados de harina de maíz a una temperatura de 32° C. Durante el proceso SSF, la concentración de glucosa fue mantenida por debajo de concentraciones inhibitorias (100 g/l). Mojovic alcanzó concentraciones de 8% en volumen de etanol al cabo de 35 horas de proceso, partiendo de un hidrolizado de harina de maíz 1:3 (harina/agua), 85°C, pH 6.0 y 1 hora de proceso como condiciones de la licuefacción. Las condiciones de sacarificación fermentación simultáneas fueron pH 5.0, T 32° C, 1.35% p/p inóculo y 36 AGU de Supersan®.

Montesinos y Navarro (2000), en la “Producción de alcohol de harina de trigo cruda a partir de amyloglucosidase y *Saccharomyces cerevisiae*”, desarrollando los procesos de sacarificación fermentación simultáneos, encontraron rendimientos de 87- 89% de valor teórico, además de reducir en 5 horas el tiempo de proceso, lo que aumentó la productividad.

3.9. BIOETANOL.

Denominado también, alcohol etílico o alcohol carburante, es un alcohol líquido de fórmula química C_2H_5OH , que se produce de la fermentación de cultivos agrícolas que contienen azúcares (caña de azúcar, remolacha), o aquellos que pueden convertirse en azúcares como los almidones (maíz, papas, etc) ó de celulosa (madera).

3.9.1. Materias Primas. Para obtener etanol existen tres procesos: a) directamente del jugo de un vegetal como la caña de azúcar, que produce alrededor del 15% de azúcares diluidos, b) por disolución de una solución concentrada de azúcar, como las melazas o mieles resultantes de la producción de azúcar, y c) por la sacarificación de sustancias celulósicas, como el bagazo o amiláceas como el almidón de maíz o de yuca. La obtención de etanol a partir de almidón es más complejo debido a que éste debe ser hidrolizado previamente para convertirlo en azúcar (OLADE).

3.9.1.1. Alcohol a partir de Almidón. De cada 100g de almidón se pueden obtener teóricamente 111g de glucosa, lo que implica una relación estequiométrica de 9:10. (Sanchez y cardona, 2005)

(Gulati *et al.*, 1996). Evaluó las opciones para la producción de etanol a partir de productos de maíz, donde el almidón es obtenido por medio de la

molienda húmeda y seca, los rendimientos de etanol pueden llegar a 403,1L/ton y 419,4 - 460,6 L/ton respectivamente.

En Francia, aunque se obtiene alcohol a partir de melazas de remolacha azucarera, también se produce a partir de trigo alcanzando rendimientos de 0,357 L etanol/kg de trigo mediante el proceso Biostill (Ehnstroem, 1984). Se ha reportado la producción de etanol a partir de otros vegetales que ofrecen una alta concentración de almidón como sorgo (du Preez et al., 1985), papa, papa dulce, yuca (Nigam y Singh, 1995; Hosein y Mellowes, 1989), harina de yuca y ñame (Hosein y Mellowes, 1989). (Sanchez y cardona op cit, 2005)

(Wang, *et al.*, 2005), el proceso enzimático de grano seco-molido usando Stargen 001, fue comparado con el proceso convencional del grano seco-molido. El proceso SSF fue llevado a cabo a una temperatura de 30 °C A 50 rpm durante 72 horas. La concentración final de etanol en el proceso enzimático de grano seco-molido fue de $15,5 \pm 0.2$ % (v/v), 9.2 % mas alto que el proceso convencional, la rata de fermentación fue también mas alta para el proceso enzimático grano seco-molido. Las producciones de etanol de los procesos enzimático y convencional de grano seco- molido fueron de 0.395 ± 0.006 y 0.417 ± 0.002 L/kilogramo (2.65 ± 0.04 y 2.80 ± 0.01 gal/bu), respectivamente. Tres coproductos adicionales fueron producidos, germen 8.0 ± 0.4 % (db), fibra de pericarpio 7.7 ± 0.4 % (db), y fibra endosperma 5.2 ± 0.6 % (db) además de granos secos destilados con solubles (Distillers Dried Grains with Solubles DDGS) con el proceso enzimático de grano seco – molido. DDGS generado del proceso enzimático de grano seco-molido fue el 66 % menos que el proceso convencional.

(Wang, *et al.*, 2007). Estudio, el proceso de grano seco - molido que usa la enzima que hidroliza el almidón crudo RSH (Raw Starch Hidrolizing RSH) Stargen 001, comparándola con dos combinaciones (DG1 y DG2) de licuación comercial y enzimas de sacarificación. En el tratamiento RSH se

usó la enzima Stargen 001, que contiene α - amilasa de *Aspergillus kawachi* y glucoamilasa de *A. Níger*. El tratamiento de enzima DG1 incluyó la α - amilasa y amyloglucosidase, La α - amilasa es del *Bacilo licheniformis* y Amyloglucosidase de *A. Níger*. El tratamiento de enzima DG2 incluyó a Spezyme Fred, (la endo-amilasa) es de *B. licheniformis* y la L Fermentzyme 400, (la exo-glucoamylase) es de *A. Níger*. Para los tratamientos RSH, DG1 y DG2, las concentraciones de etanol en 72 hr de fermentación fueron el 14.1-14.2 % (v/v). Durante SSF, la concentración de glucosa más alta para el tratamiento RSH fue el 7 % (p/v), mientras que para DG1 y tratamientos DG2, las concentraciones de glucosa tenían el máximo del 19 % (p/v). Las concentraciones glicerol fueron 0.5 % (p/v) para el tratamiento RSH y el 0.8 % (p/v) para DG1 y tratamientos DG2.

Asturizaga y Bocanegra (2008), realizaron trabajo de grado sobre la evaluación de los rendimientos en el proceso de obtención de alcohol a partir de harina de ñame (*Dioscorea Bulbifera*, Trífida) por vía enzimática (Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120 L AMG 300 L) a concentraciones de 10%, 13% y 16% p/v, mediante un proceso de licuefacción a temperatura 90 °C con un tiempo de residencia de 2 horas y sacarificación a 60 °C. En la etapa de hidrólisis enzimática se obtuvo para *D. Bulbifera* 93.3%, 69.36 % y 81.52% p/v y para *D. trífida* 98.20%, 88.02% y 65.13% p/v de equivalentes de dextrosa, respectivamente, los resultados en la producción de alcohol demostraron que la variedad *D. trífida* 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. bulbuifera* en las concentraciones 16% p/v arrojó los menores rendimientos con un valor de 520.66 L/Tonelada.

Bohórquez y Madero (2008), realizaron la hidrólisis enzimática y fermentación de los almidones de yuca de las variedades de uso industrial MCOL 2215 y MTAI 8 en tres concentraciones (10%, 13% y 16% p/v) con el fin de evaluar los rendimientos de alcohol producido (Litros de alcohol / Kg de materia prima), utilizando las enzimas Termamyl® 120L con un tiempo de reacción de 2 horas y una temperatura de 90° C y la enzima AMG 300L durante 4 horas a una temperatura de 65° C, determinándose los azúcares reductores o equivalentes de dextrosa (E.D); obteniéndose para la variedad MCOL 2215 valores de E.D de 65 en las concentraciones del 13% y 16% p/v y grados Brix de 14.5 a una concentración de 16% p/v, mientras que en la variedad MTAI 8 se obtuvieron 100 E.D y 13,8 grados Brix en la concentración del 10% p/v. La evaluación del rendimiento mostró que la variedad MTAI 8 a una concentración de 10% p/v presentó el mayor rendimiento, 618,425 litros de alcohol / tonelada de almidón, a diferencia de la variedad MCOL 2215 la cual presentó menor rendimiento, 478,35 litros de alcohol / tonelada de almidón a una concentración del 16% p/v.

León y colaboradores (2005), en el estudio de la producción de etanol a partir de yuca mediante biorreactor de tanque agitado con control de variables, obtuvieron una concentración de etanol de 6.4% v/v a una temperatura de 37°C, pH de 6.0 y a una concentración de almidón del 18 % p/v, mediante hidrólisis química con HCl 0.1 N y fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*.

Assis, (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/ton de raíz, durante un tiempo de fermentación de 56 horas, empleando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

3.9.2. Ventajas del Etanol: El etanol es un biocombustible que ofrece grandes ventajas en virtud de sus características fisicoquímicas, materias primas de origen, costo de producción relacionados y efectos ambientales, entre otros. Señalando por la OLADE (Organización Latinoamericana De Energía) como las más relevantes las siguientes:

- Es una fuente renovable y por consiguiente inagotable, en la medida que se renueven los cultivos agrícolas.
- Es menos inflamable que la gasolina por lo tanto es más seguro de utilizar.
- Disminuye la dependencia de los países agro-productores, del abastecimiento de combustibles fósiles por parte de los países productores de petróleo.
- Tiene un alto índice de octano: 105
- Durante su combustión se produce un aumento del calor de vaporización, lo cual genera una mayor potencia respecto a la gasolina.
- Tiene bajas emisiones tóxicas.
- Genera menores emisiones de monóxido de carbono cuando se usa como aditivo de la gasolina.
- Produce menos dióxido de carbono al quemarse que la gasolina, pero el impacto total depende del proceso de destilación y de la eficiencia de los cultivos

3.9.3. Desventajas del Etanol. Se identifican y atribuyen algunas deficiencias del etanol al ser empleado como combustible (OLADE).

- Genera emisiones altamente evaporativas.
- Presenta una menor densidad de energía que la gasolina, el conductor debe llenar el tanque del automotor con más frecuencia.
- Contiene dos terceras partes de la energía contenida por el mismo volumen de la Gasolina.

3.9.4. Bioetanol en Colombia. La norma colombiana NTC 5308 define alcohol carburante, como etanol anhidro obtenido a partir de la biomasa, con un contenido de agua inferior a 0.7% en volumen.

Para cumplir con los requerimientos establecidos en la Ley 693, y extender el uso al resto del territorio nacional se deberán instalar complejos agroindustriales alcoholeros distribuidos en diferentes regiones del país. (Ministerio de Minas y Energía, 2005). Los estudios realizados por CORPODIB (Corporación para el desarrollo industrial de la biotecnología y la producción limpia), señalan, con carácter indicativo, las localizaciones y tamaños de instalaciones industriales como se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Proyectos indicativos productores de alcohol carburante

Localización	Capacidad Litros/ Día	Materia Prima
Hoya Rió Suárez	300.000	Caña de Azúcar
Vegachí (Antioquia)	300.000	Caña de Azúcar
Valle del Cauca	300.000	Caña de Azúcar
Costa Norte	300.000	Caña de Azúcar - Yuca
Cundinamarca	150.000	Caña de azúcar
Llanos Orientales	100.000	Caña de Azúcar - Yuca
Eje Cafetero	250.000	Caña de Azúcar
Huila	200.000	Caña de Azúcar
Nariño	150.000	Caña de azúcar

Fuente: Corpodib, 2003.

La supremacía de la caña de azúcar con respecto a otras materias primas en la producción de alcohol, esta ligada a la cantidad de azúcar y consecuentemente de etanol, que es posible producir a partir de una unidad de área (hectárea) cultivada por unidad de tiempo (año), la caña a lo contrario de la yuca y el ñame posee azúcares fermentables que son directamente metabolizables por las levaduras, no necesitando hidrólisis previa para la producción del mosto. Ver tabla 8.

Tabla 9. Datos comparativos de yuca y caña de azúcar

	Yuca	Caña de Azúcar
Producción Agrícola ton /ha año	20	80
% de Carbohidratos	33.5	15
Producción de Carbohidratos ton /año ha	6.7	12
Rendimiento Teórico	0.718	0.6810
Producción de etanol l/h año	4810	8170

Fuente: Culturas de tuberosas en América Latina, Vol. 3, Fundación Cargill

Una de las desventajas de los productos amiláceos con respecto a la caña de azúcar es la baja producción agrícola ton/ha año, pero con las nuevas variedades de yuca industrial (25 – 50 ton/ha) que se están introduciendo en el departamento de Sucre, puede empezar a cambiar las relaciones comparativas de la tabla 9.

4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

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

4.2. LOCALIZACION DEL PROYECTO.

En el presente trabajo se utilizó harina de ñame de las variedades Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*), suministradas por APROS (Asociación de Productores Orgánicos de San Rafael) del municipio de San Rafael, Departamento de Bolívar. La evaluación para la obtención de alcohol se realizó en las instalaciones del laboratorio de bioprocesos, ubicada en la Planta Piloto de Operaciones Unitarias (Procesos agroindustriales) Universidad de Sucre, la cual está localizada en la sede los pericos, en el Km. 8 de la vía que de Sincelejo conduce al municipio de Sampúes.

4.3. VARIABLES

4.3.1. Variables Independientes

- Concentración de sustrato (12, 25, 35% p/v base seca)
- Variedades de ñame Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*).

4.3.2. Variables dependientes

- Rendimiento (Litros de etanol producido/ Kg. de harina de ñame)

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizó un diseño Multifactorial - categórico con 2 factores (Variedades) y 3 niveles (concentraciones) para un total de 18 corridas. El análisis de los resultados se realizó mediante la utilización del software Statgraphics®*Plus* Versión 5.1, a través de un análisis ANOVA, una prueba de múltiples rangos y una gráfica de medias para el rendimiento, todo con nivel de confiabilidad del 95%.

4.5. PROCEDIMIENTO.

Los procedimientos utilizados en la evaluación de los rendimientos de alcohol a partir de harina de ñame de las variedades (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*) utilizando el proceso SSF se detallan a continuación:

4.5.1. Obtención de harina de ñame de las variedades Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*). La figura 4 muestra los respectivos pasos que se ejecutaron para la adecuación de los ñames para obtención de la harina, los cuales se describen como:

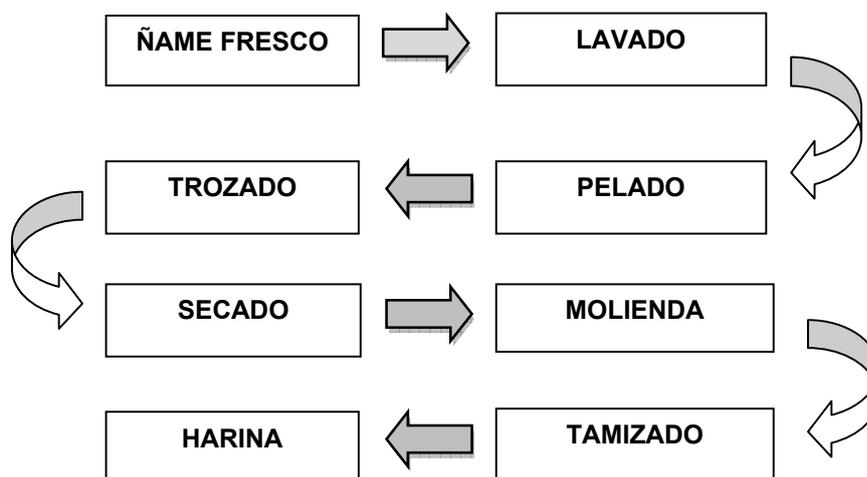


Figura 4. Pasos para la obtención de harina de ñame de las variedades Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*).

- **Lavado:** Las raíces se lavaron con agua para eliminar las impurezas (tierra y piedras) propias de la extracción al ser cosechas.
- **Pelado:** Se descascararon los tubérculos con el fin de dejar expuesta la pulpa para el proceso de trozado.

- **Trozado:** Este proceso se realizó de manera manual con cuchillos, haciendo cortes delgados en los tubérculos con un espesor aproximado de 3 mm.
- **Secado:** El secado de las raíces de ñame se realizó mediante métodos naturales, aprovechando la energía solar, el ñame trozado se extendió sobre plásticos negros.
- **Molienda:** Luego de tener el ñame seco se realizó pulverización, desintegrando el material sólido por medio de un Molino de cizalla.
- **Tamizado:** Con el objetivo de obtener un material uniforme se hizo pasar la harina por un tamiz de diámetro de 0.6 μm .
- **Empacado:** El almidón fue almacenado en bolsas de polietileno sellables para preservar sus características y evitar que se contaminara.

4.6. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS ENZIMAS STARGEN 001 DURANTE LA SACARIFICACIÓN - FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF), DE LA HARINA DE ÑAME DE LAS VARIETADES BURRION (*D. alata*) Y ALEMÁN (*D. rotundata*).

Para el desarrollo de las corridas experimentales se utilizaron erlenmeyeres de 1 litro con desprendimiento lateral adaptados como biorreactores con un volumen de reacción de 800 ml, donde se procesaron soluciones de harina de ñame con concentraciones de 12%; 25% y 35% p/v. Ver figura 5.



Figura 5. Montaje de un biorreactor experimental a nivel de laboratorio, para la obtención de alcohol etílico de las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*).

4.6.1 Proceso de Sacarificación - fermentación simultánea (SSF). En los biorreactores manteniendo una agitación de 250 rpm, a temperatura ambiente se agregó la enzima STARGEN™ 001 suministrada por Genencor International, Ver Tabla 10 y la levadura Etanol Red de Fermentis, en las condiciones y cantidades estipuladas en las fichas técnicas. Ver anexo A y B.

El proceso sacarificación - fermentación simultánea se realizó durante 48 horas, tomando muestras en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 8, 20, 32 y 48 horas, se efectuaron mediciones de azúcares reductores a través de la técnica del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), determinándose los Equivalentes de Dextrosa (E.D), mediante la siguiente ecuación (Benavides, *et. al.*, 1983):

$$ED = (AR/PM) \times 100$$

Donde AR es la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra expresados en g/ml, y PM es el peso de la muestra seca en gramos. La técnica del DNS, permitió elaborar una curva de calibración empleando un patrón de glucosa de (1g/l); cuya reacción fue leída en un espectrofotómetro Merck SQ 118 V1.70 a 565 nm. Así mismo se midieron las concentraciones (%v/v) de etanol por el método Winnick, 1984 y el crecimiento celular de *Etanol Red* por conteo directo en cámara de Neubauer.

Tabla 10. Dosis enzimática de STARGEN 001 empleadas en los procesos de licuefacción – sacarificación simultánea.

Parámetros	Burrión (<i>D. alata</i>) p/v			Alemán (<i>D. rotundata</i>) p/v		
	12%	25%	35%	12%	25%	35%
Dosis enzima						
(ml)	0.174	0.3636	0.509	0.174	0.3636	0.509

4.6.1.1 Preparación del inóculo. Inicialmente se preparó un medio de cultivo con 0.25 g de levadura correspondiente a la cantidad estipulada en la ficha técnica (25-80 por hectolitro) en 1.5 ml de agua destilada, agitando durante 5 minutos antes de adicionarse al birreactor, para cada una de las concentraciones de harina de ñame de las variedades Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*).

4.6.2 Filtración. Al finalizar el proceso de fermentación se llevó a cabo la filtración del mosto, utilizando para ello una tela de algodón, midiéndose el

volumen filtrado, el peso de la harina húmeda, esta última se sometió a secado durante 24 horas a 70 °C y finalmente se pesó la harina seca.

4.7. EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE ALCOHOL PRODUCIDOS.

Para evaluar el rendimiento se empleó un diseño Multifactorial - categórico con 2 factores y 3 niveles para un total de 18 corridas. 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 DISCUSION

5.1 OBTENCIÓN DE LA HARINA

Se obtuvieron 12.1 kg de harina a partir de 46 Kg de ñame fresco de la variedad Criollo (Burrión), para un rendimiento del 26.3% p/p, mientras que para la variedad espino (Alemán), se obtuvieron 14.7 kg de harina, a partir de 46 kg de ñame fresco, para un rendimiento del 31.95% p/p. (Ver tabla 11)

Tabla 11. Rendimientos de harina de ñame de las variedades Criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*).

ÑAME	PESO INICIAL (FRESCO, Kg)	HUMEDAD EN FRESCO %	PESO HARINA Kg	HUMEDAD DE LA HARINA %	Kg HARINA / HECTARIA
ALEMAN	46	68	14.7	8.7	7029
BURRIÓN	46	73	12.1	8.7	6772

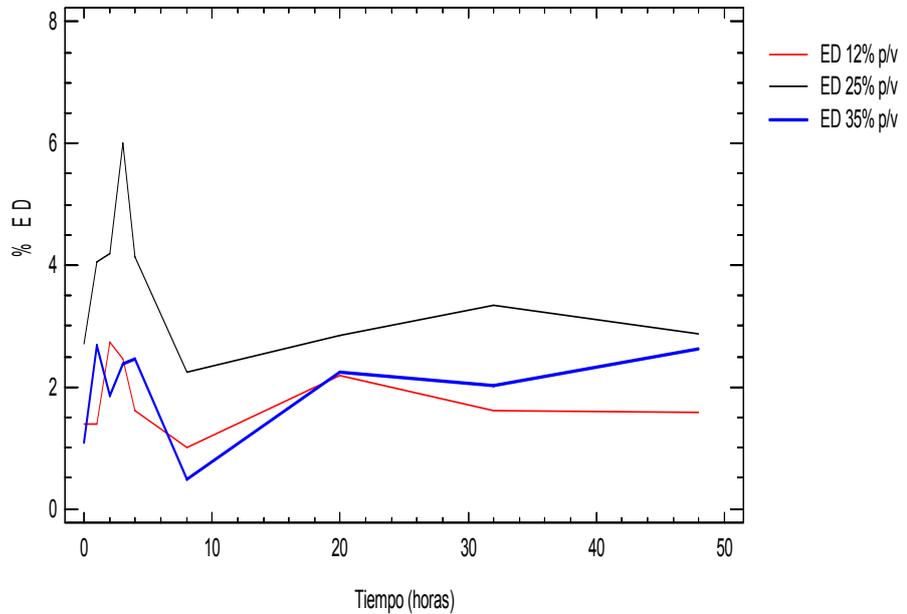
Se puede observar que el rendimiento obtenido de la variedad Espino Alemán (*D. rotundata*) es mayor que la variedad Criolla Burrión (*D. alata*), proporcionales a los valores obtenidos por CORPOICA (2003), donde se determino que en la elaboración de harina de ñame los mayores rendimientos industriales se pueden obtener al utilizar el ñame espino, *Dioscorea rotundata*, como materia prima, debido a que su contenido medio

de materia seca es de 37.3%, significativamente superior al del ñame criollo, *Dioscorea alata*, cuyo promedio es de 28.1%.

5.2. COMPORTAMIENTO DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO STARGEN 001 DURANTE EL PROCESO SSF.

Para realizar este análisis se evaluaron mediciones correspondiente a; la producción de equivalentes de dextrosa (E.D), crecimiento celular (*Etanol Red*) y variación de la concentración de alcohol durante el tiempo, en el proceso SSF para las variedades del ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*).

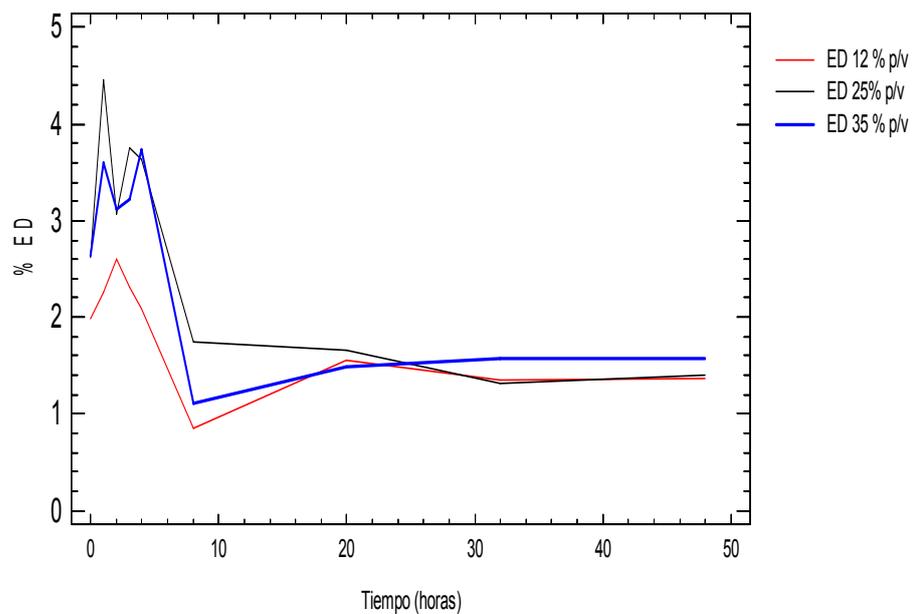
5.2.1. Análisis de la producción de equivalente de dextrosa (E.D) de las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y la variedad Alemán (*D. rotundata*). Durante el proceso de SSF se midieron los azúcares reductores, los cuales fueron convertidos a E.D. Estos se ilustran en los gráficos 1 y 2. Donde se comparan las medias para cada una de las concentraciones y cada una de las variedades de ñame. El resumen estadístico se muestra en los anexos C y F, los cuales representan intervalos con 95% de confianza para las medias.



Grafica 1. Equivalente Dextrosa en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v.

En la gráfica 1 se puede observar que durante la etapa de SSF la acción de la enzima Stargen 001 y la levadura Etanol Red arrojaron valores máximos de E.D corresponden a 6,005%, 2.45% y 2.73% para las concentraciones de sustrato de 25%, 35% y 12% p/v respectivamente (los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo C); el valor máximo 6.005% es similar al obtenido por Wang, *et, al.*, (2007), donde la concentración de glucosa más alta para el tratamiento RSH fue el 7 % (p/v) utilizando la enzima Stargen durante SSF de grano seco-molido.

Al inicio del proceso se presentaron los mayores ascensos de concentración al cabo de las primeras 4 horas, descendiendo a medida que transcurría el tiempo, debido a que los azúcares fermentables se transforman en etanol por efecto del metabolismo de la levadura. Estos resultados son análogos con los analizados por Castaño y Mejía (2008) quienes trabajaron con la producción de etanol a partir de almidón de yuca con SSF los cuales obtuvieron un leve incremento de concentración de azúcares reductores al inicio del proceso; al cabo de las 5 horas, para luego descender.

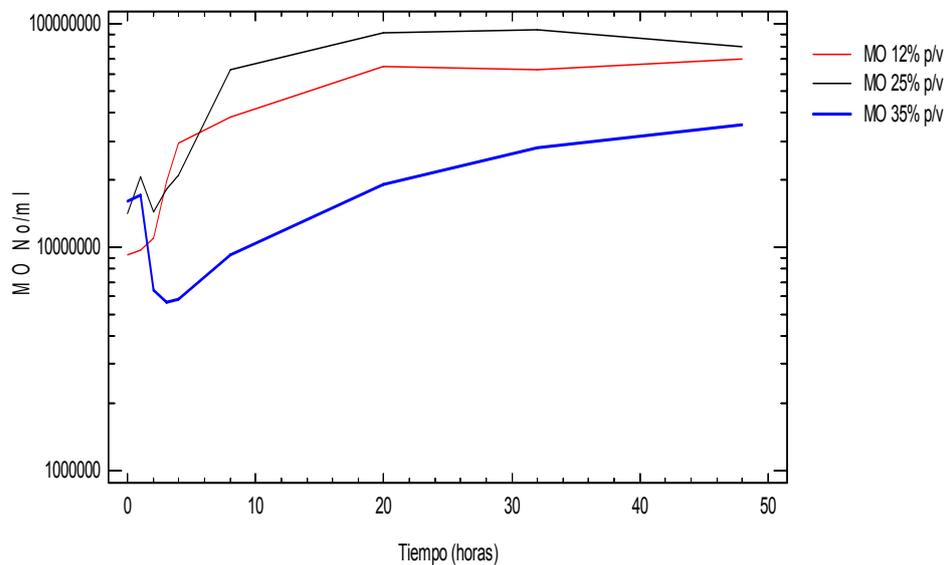


Grafica 2. Equivalente Dextrosa en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v.

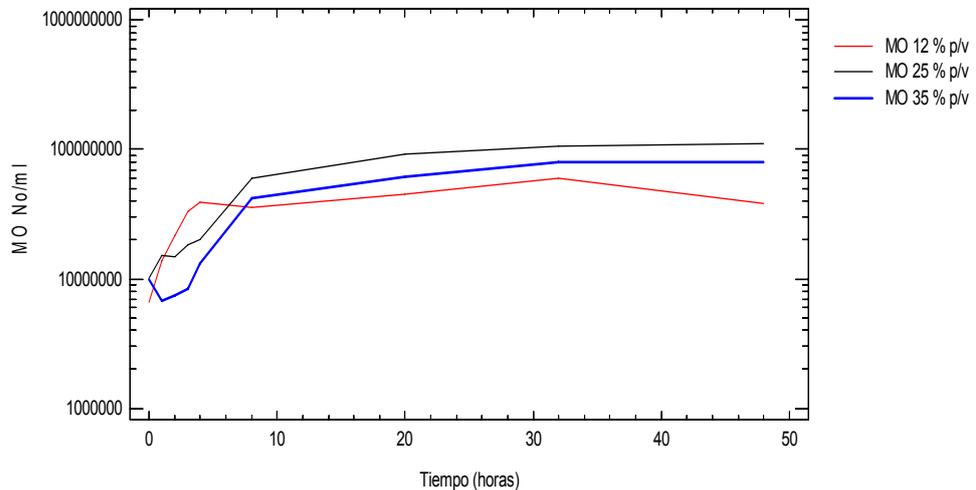
La grafica 2, muestra que la variedad Alemán (*D. rotundata*) en las primeras 4 horas, presenta los mayores valores de E.D al igual que en la variedad Burrión (*D. alata*), alcanzando valores de 4.45%, 3.6 % y 2.6% para las concentraciones de sustrato de 25%, 35% y 12% p/v respectivamente (Los resúmenes estadísticos se muestran en el anexo F), esto se explica por que se presento menor velocidad de consumo de sustrato de la levadura frente a la velocidad de hidrólisis de las maltodextrinas por efecto de la levadura (Castaño y Mejía, 2008). A medida que transcurre el proceso se evidencia que los azúcares reductores disminuyen, prima entonces el consumo de los azúcares producto de la sacarificación por parte de los microorganismos, para transformarlos en alcohol. Optando los E.D un comportamiento constante al final del proceso (20 - 48 horas), en un rango de 1.3 y 1.6 %.

Los resultados de E.D obtenidos por medio de SSF de las variedades de ñame criollo Burrión (*D. alata*) y Espino Alemán (*D. rotundata*), difieren de las obtenidas por Asturizaga y Bocanegra (2008) en el estudio realizado por medio del proceso convencional (fermentación – sacarificación independientes), obteniéndose valores de 93.3%, 69.36 % y 81.52 % para *D. bulbifera* y 98.20%, 88.02% y 65.13% para *D. trifida* de equivalentes de dextrosa, a concentraciones de 10, 13 y 16% p/v respectivamente, dado a que la acción del complejo enzimático Stargen 001 es diferente a las enzimas utilizadas en este estudio (Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120 L AMG 300 L), debido a que integra la acción enzimática de estas en un solo proceso (sacarificación), facilitando la transformación de los azúcares resultantes de manera consecutiva en alcohol, impidiendo que se alcancen altos valores de azúcares reductores.

5.2.2. Evaluación del crecimiento celular (*Etanol Red*) para las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y la variedad Alemán (*D. rotundata*). En este proceso se obtiene un aumento de biomasa en función del tiempo de SSF esta se incrementa a medida que se produce el consumo de equivalentes de Dextrosa (E.D). Los resultados de esta etapa se ilustran en las gráficas 3 y 4.



Grafica 3. Crecimiento microbiano en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v.



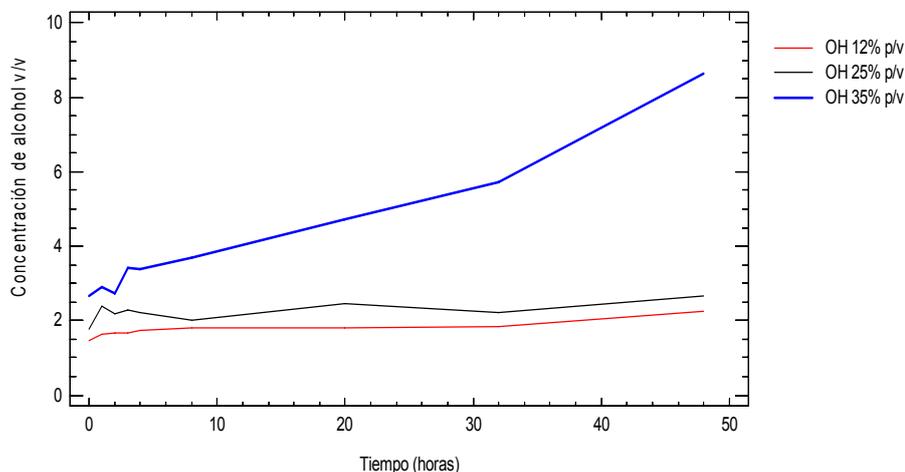
Grafica 4. Crecimiento microbiano en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. alata*) a concentraciones de harina de 12%, 25% y 35% p/v.

Se observa que el crecimiento microbiano tuvo un crecimiento exponencial, las variedades Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. alata*) mostrando un crecimiento de la biomasa lento en las primeras 4 horas del proceso SSF, pues la levadura se encuentra en la etapa de adaptación a las condiciones del proceso. No es necesario hacer la inoculación del microorganismo un tiempo después del iniciado el proceso de sacarificación, ya que la velocidad de formación de glucosa al inicio del proceso soporta el crecimiento de la levadura (Castaño y Mejía, 2008).

A partir de la hora 20 se alcanza el mayor número de microorganismos, dado que durante este tiempo las células de levadura presentan necesidades nutricionales, influenciándose directamente el crecimiento celular y la multiplicación, además de la transformación de azúcares en alcohol gracias a

su metabolismo, obteniéndose un número de microorganismos en la variedad Burrión (*D. alata*) de 94.638.889, 69.629.667 y 35.375.000 unidades, y en la variedad Alemán (*D. alata*) valores de 112361111, 80166667 y 59694444 unidades, para las concentraciones de sustrato de 25%, 12% y 35% p/v respectivamente. Adicionalmente se evidencia que a las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas, presentaron un comportamiento en el crecimiento celular parecido. Los resúmenes estadísticos se detallan en el anexo D y G.

5.2.3. Evaluación de la variación de la concentración de alcohol durante el tiempo de SSF para las variedades del ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*). La gráfica 5 muestran los valores obtenidos en la producción de alcohol de la variedad de Burrión (*D. alata*), observándose que en las primeras horas de fermentación la producción de etanol es baja con valores de 1.48 % v/v, 1.91 % v/v y 2.67 % v/v para las concentraciones del 12%, 25% y 35% p/v respectivamente; al final de la fermentación se alcanzaron valores de 2,25% v/v, 3,01% v/v y 8,65 % v/v, siendo este último el que presentó mayor porcentaje de alcohol, similar al obtenido por Mojovic (2006), quien realizó ensayos de sacarificación - fermentación simultáneos a partir de hidrolizados de harina de maíz, alcanzando concentraciones de 8% en volumen de etanol al cabo de 35 horas de proceso.



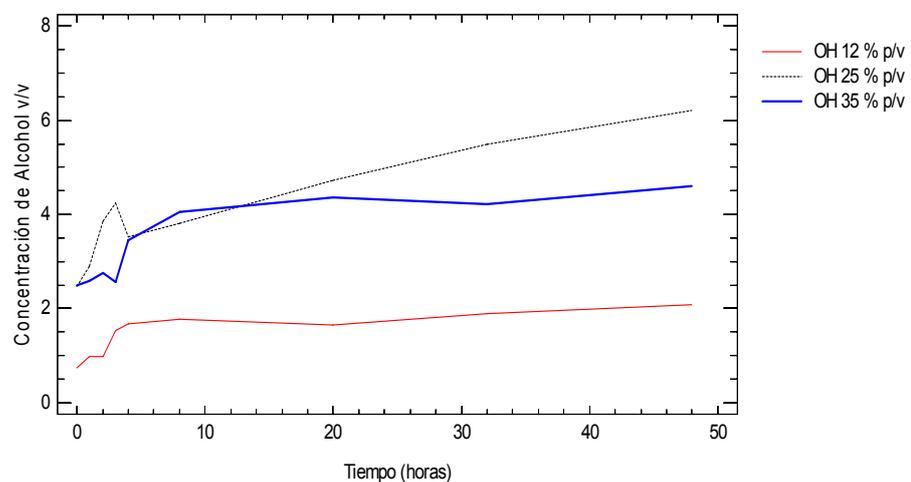
Gráfica 5. Producción de alcohol (% v/v) en función del tiempo de SSF para la variedad Burrión (*D. alata*), a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

La producción de etanol durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de harina de ñame del 12%, 25% y 35% p/v de la variedad Alemán se representan en la gráfica 6, observándose una concentración final de etanol de 2.3% v/v; 6.2% v/v y 4.6% v/v, respectivamente, donde se puede apreciar que en las tres concentraciones de harina, al igual que en la variedad Burrión la mayor producción de etanol se presentó después de la octava hora. Esto es debido a que velocidad de producción de azúcares reductores es menor a la de consumo, (Castaño y Mejía, 2008). Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo E y H.

Se puede notar que el porcentaje de etanol obtenido en la concentración de harina del 25% p/v es menor al alcanzado en la del 35% p/v, lo cual se debe a un menor consumo de los productos de la hidrólisis por parte de la

levadura Etanol Red, esto se ve reflejado en la poca disminución de equivalente de dextrosa durante el proceso.

Los resultados obtenidos en las tres concentraciones están por debajo de los datos publicados por Asturizaga y Bocanegra (2008), quienes lograron una concentración final de etanol de 10,87% v/v; 9.68% v/v y 11.18 % v/v a partir de harina de ñame de la variedad *D. bulbifera* a las concentraciones del 10%, 13% y 16% p/v respectivamente. De igual forma los resultados alcanzados a la concentración del 25% p/v están por debajo de los reportados por Wang, *et al.*, (2007), utilizando como materia prima maíz a la misma concentración de sustrato y la enzima Stargen, consiguiendo concentraciones finales de etanol luego de 72 horas de 14.1 ± 0.038 (v/v), pero oscila entre los reportes de León, *et al.*, (2005), los cuales obtuvieron una concentración de etanol de 6.4% v/v, con una concentración de almidón de yuca del 18 % p/v .



Gráfica 6. Producción de alcohol (% v/v) en función del tiempo de SSF para la variedad Alemán (*D. rotundata*), a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

5.3 EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL.

Los datos de las corridas experimentales para el rendimiento en Litros de alcohol / Kg de harina se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Rendimiento en litros de alcohol/Kg de harina de las variedades Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de sustrato de 12%, 25% y 35% p/v.

Variedades de ñame a 12%, 25% y 35% p/v	Rendimiento (L de alcohol/Kg de harina)
Burrión 12% p/v	0,136
Burrión 25% p/v	0,059
Burrión 35% p/v	0,108
Alemán 12% p/v	0,139
Alemán 25% p/v	0,135
Alemán 35% p/v	0,066

La evaluación del rendimiento de alcohol de las variedades Burrión y Alemán se realizó a partir de un análisis de varianza de los datos obtenidos para cada variedad en las concentraciones de harina evaluadas (Ver anexo J), el cual mostró diferencia significativa entre concentraciones de sustrato. (Tabla 13).

Tabla 13. Rendimientos de alcohol de las variedades de ñame Burrión y Alemán a las concentraciones de 12%, 25 % y 35%.

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	G	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentracion	0,00838909	2	0,00419454	26,22	0,0000
B:Variedades	0,000680395	1	0,000680395	4,25	0,0615
INTERACCIONES					
AB	0,0102235	2	0,00511173	31,95	0,0000
RESIDUOS	0,0019197	1	0,000159975		
		2			
TOTAL (CORREGIDO)	0,0212126	1			
		7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Teniendo en cuenta que el análisis de varianza para el rendimiento de alcohol mostro un P- Valor inferior a 0.05 para las concentraciones de sustrato, se demuestra que hay diferencia estadísticamente significativa y homogeneidad entre las variedades con un P-Valor 0.0615, con un nivel de confianza del 95%.

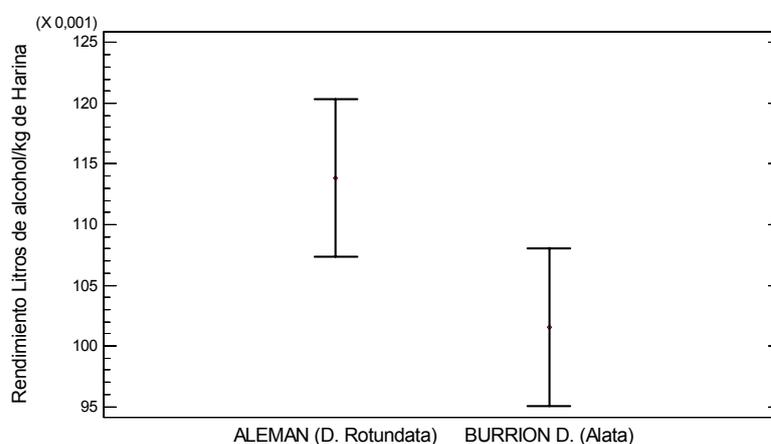
El análisis de varianza para el rendimiento de alcohol, observando un P-Valor de 0,0000, lo cual expresa una diferencia estadísticamente significativa según concentraciones de sustrato 12%, 25% y 35% p/v de las dos variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*).

Para identificar las diferencias entre variedades y concentraciones, adicionalmente se realizó una prueba de múltiples rangos. Los resultados se muestran en la tabla 14 y 15.

Tabla 14. Pruebas de múltiple rangos para rendimiento por variedades de ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD				
<i>Variedades</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BURRION (<i>alata</i>)	9	0,101556	0,00421604	X
ALEMAN (<i>rotundata</i>)	9	0,113852	0,00421604	X

La tabla 15 muestra un solo grupo homogéneo entre variedades de ñame verificando que no se presentó una diferencia significativa; Siendo el valor de la media de la variedad Burrión 0.101556 litros de alcohol / kilogramo de harina similar a la variedad Alemán 0.113852 litros de alcohol / kilogramo de harina. Estos datos se representan en la gráfica 7. Esto implica que el empleo de la enzima Stargen 001 es indiferente a las variedades estudiadas, permitiendo que se pueda trabajar con la variedad de ñame de mayores rendimientos de harina, variedad Alemán (*D. rotundata*). Con el objetivo de aumentar los rendimientos globales del proceso.



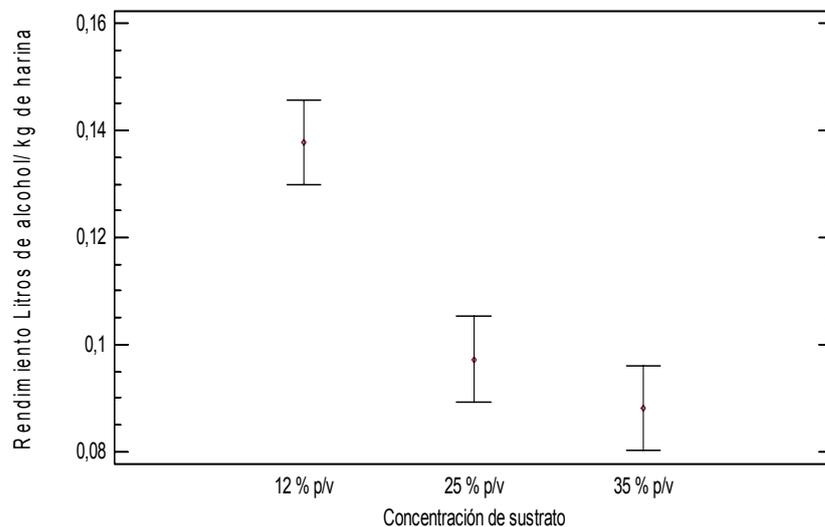
Gráfica 7. Medias para el Rendimientos de alcohol (L/Kg) Vs Variedades ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrion (*D. alata*).

Tabla 15. Pruebas de múltiple rangos para rendimiento por concentración de ñame Aleman (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*)

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD				
Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
35 % p/v	6	0,0881111	0,00516358	X
25 % p/v	6	0,0972222	0,00516358	X
12 % p/v	6	0,137778	0,00516358	X

En la tabla 15 se observan dos grupos homogéneos; de igual manera se observa que la media de la concentración 12% p/v, presenta el mayor valor de rendimiento con 0.13778 litros de alcohol / kilogramo de harina y el menor

valor de rendimiento lo presenta la concentración 35% p/v con un valor de 0.0881111 litros de alcohol/Kilogramos de harina. Estos datos se representan en la gráfica 8. La concentración del 12% presento buen aprovechamiento del sustrato al arrojar los mejores valores de litros de alcohol obtenido/kilogramos de harina consumidos, lo que implica que se pueda trabajar con la menor concentración evaluada, permitiendo reducir los costos de sustrato en el proceso.



Grafica 8. Medias para el Rendimientos de alcohol de las variedades de ñame (Alemán y Burrión) Vs Concentraciones de harina.

Los rendimientos para las variedades Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*) a las diferentes concentraciones de sustrato 12%, 25% y 35% p/v están por debajo de los reportados por Wang, *et al.*, (2005), donde en el proceso enzimático de grano seco-molido usando Stargen 001, obtuvieron producciones de etanol de 0.395 ± 0.006 L/kilogramo; los obtenidos por

Asturizaga y Bocanegra (2008), en que la variedad de ñame *D. trifida* a las concentraciones 10% y 13% p/v presentó rendimientos de alcohol de 786,87 y 792,96 L/ Tonelada de harina respectivamente, al igual que Bohórquez y Madero (2008), mostraron que la variedad de yuca MTAI 8 a una concentración de 10% p/v presento un rendimiento de 618,425 L de alcohol / T de almidón.

Por otra parte, los rendimientos alcanzados por las variedades de ñame Aleman a las concentraciones de sustrato 12%y 25% p/v y Burrion al 12% p/v, estan por encima de Assis, (2007), quien en el estudio para la cuantificación de alcohol a partir de harina de batata obtuvo un rendimiento de 129 litros/ton de raíz, durante un tiempo de fermentación de 56 horas, empleando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

6. CONCLUSIONES

- Durante proceso SSF los equivalentes de dextrosa (%E.D) aumentan significativamente en las primeras cuatro horas de proceso, a la concentración de sustrato 25% p/v las variedades Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) alcanzaron los máximos valores de 6.005 y 4.45 % ED, respectivamente.
- La variedad Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de sustrato de 12% p/v presentaron los mayores rendimientos de alcohol alcanzando 0.136 litros de alcohol/Kg de harina y 0.139 litros de alcohol/Kg de harina respectivamente; los menores rendimientos se obtuvieron a concentraciones de 25% p/v y 35% p/v, con valores de 0.059 y 0.060 litros de alcohol/Kg de harina, para las variedades Burrión y alemán correspondientemente.
- El porcentaje de humedad de las harinas de las variedades Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*), los cuales fueron del 8.7% están dentro del límite establecido por la legislación de Colombia y Brasil, los cuales establecen un porcentaje máximo del 14%.
- En el proceso SSF, los equivalentes de dextrosa (E.D) disminuyen a medida que transcurre el tiempo, la variedad Burrión (*D. alata*) a una concentración de harina de 35% p/v presento al final del proceso 2.63 %E.D y la variedad Alemán (*D. rotundata*) a concentración de sustrato de 25% p/v alcanzo valores finales de 1.396 %E.D, mientras que el porcentaje de alcohol se comporta de forma inversa, obteniéndose valores máximos al final del proceso de 8.65% y 6.2% v/v respectivamente, lo que indica que el consumo de azúcares reductores

por parte de la levadura Etanol Red durante su crecimiento celular, se refleja en una mayor producción de alcohol.

- Las variedades de ñame Alemán (*D. rotundata*) y Burrión (*D. alata*), presentaron rendimientos de alcohol utilizando el proceso SSF inferiores a los obtenidos a partir de harina de ñame (*Dioscorea Bulbifera*, *Trifida*) con valores de 786,87 y 792,96 L/ T de harina, a concentraciones de 10% y 13% p/v respectivamente, y almidón de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8 con rendimientos de 588.3 y 618,425 L de alcohol / T de almidón a una concentración de sustrato de 10% p/v, correspondientemente, a través del proceso convencional: Sacarificación, Licuefacción y Fermentación Independientes.

7. RECOMENDACIONES

- Es conveniente realizar estudios con concentraciones de harina de ñame mas bajas, ya que los mejores rendimientos de alcohol se obtuvieron a concentraciones de harina del 12% p/v, evitándose un desaprovechamiento de sustrato, haciendo el proceso mas eficiente.
- Desarrollar trabajos de investigación para evaluar los procesos SSF de obtención de alcohol a nivel piloto.
- Se recomienda realizar estudios con microorganismos nativos, para la obtención de enzimas degradadoras de almidón.
- Desarrollar investigaciones donde se pueda determinar el consumo de energía involucrado en la producción de alcohol a partir de harina ñame utilizando el sistema SSF (Sacarificación – Fermentación Simultanea).
- Implementar trabajos de investigación que utilicen como materia prima el almidón extraído del ñame.
- Evaluación de SSF utilizando nutrientes para la levadura, en la preparación del inculo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASGHER M.; JAVAID M.; RAHMAN S.U; LEGGE R.L.; 2006. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. 29 de marzo de 2006. Journal of Food Engineering. P 950.

ASSIS, T. Estudio para quantificacáo de alcohol a partir da batata. Fundacáo centro tecnológico de minas gerais. CETEC. Servico Brasileiro de Respostas Técnicas. 2007; SBRT. pp 1-8.

ASTURIZAGA Y, BOCANEGRA C. Evaluación de los rendimientos en el proceso de obtención de alcohol a partir de harina de ñame (*Dioscórrea Bulbifera, Trifida*) por vía enzimática. Sincelejo 2008. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Biotecnología). Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias.

AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; SCHARER, J.; YOUNG, M.M. 2006. Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances. Vol 24. pp 80-85.

ANTO, H.; PATEL, K. C.; TRIVEDI, U. B. 2006. Glucoamylase production by solid state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology. Vol 97, N 10. pp 1161-1166.

BLANCO-METZLER A, TOVAR J y FERNANDEZ-PIEDRA M. 2004. Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. *ALAN*. [online]. sep. 2004, vol.54, no.3 [citado 07 Julio 2006], p.322-327. Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000300011&lng=es&nrm=iso. ISSN 0004-0622.

BOHÓRQUEZ D, MADERO J. Evaluación de los rendimientos en litros de alcohol / kilogramo de almidón de yuca (*Manihot esculenta crantz*) de las variedades industriales MCOL 2215 Y MTAI 8, Vía enzimática. Sincelejo 2008 (Biólogo con énfasis en Biotecnología) Trabajo de grado. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias.

BUITRAGO G y PEREA M. Aplicación de la Biotecnología agrícola al cultivo de ñame. Universidad Nacional de Colombia. Santa fé de Bogotá, 1998.

CASTAÑO H Y MEJÍA C. Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso Sacarificación- Fermentación Simultáneas (SSF). [En línea] <<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v15n2/v15n2a07.pdf>>[citado el 18 de Marzo de 2009]

CHAPLIN, M. 2004. The Use of Enzymes in Starch Hydrolysis. Faculty of Engineering Science and the Built Environment. University South Bank London. pp 1-5.

CENTRO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO LEIA, Industria química basada en biomasa Implicaciones tecnológicas. [En línea] <http://www.leia.es/anuncios/INFORME_FINAL_OT_BIO-28-FEB-2007.pdf> [citado el 20 de Abril de 2009]

CORPOICA. Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios, con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Dioscorea* sp.) [En línea] <http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Agroindustria%20para%20la%20elaboracion%20de%20harina%20de%20achira.pdf> [citado el 14 de Marzo del 2009]

CORPORACIÓN PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE Y PARTICIPATIVO DE LOS PEQUEÑOS AGRICULTORES, CORPORACIÓN PBA. Programa de investigación participativa para la producción y la transformación sostenible del ñame (*Dioscorea s.p.*) en la Costa Atlántica. Bolívar [En línea] <http://www.corporacionpba.org/paginas/IMG/pdf/PROGRAMA_DE_INVESTIGACION_PARTICIPATIVA_EN_NAME_CAPITULO_1.pdf.pdf> [citado el 26 de Enero del 2008]

DUGDALE D. Enzima- Información General [Artículo de Internet] <http://www.umm.edu/esp_ency/article/002353.htm .> [citado el 14 de Marzo del 2009]

DURANGO R Y PADILLA A. Caracterización morfológica de un banco de germoplasma de ñame. *Dioscorea* spp. Recolectado de la Costa Atlántica. Trabajo de Grado. Universidad de Córdoba. Montería. 1998. 69 p.

FERMENTIS. Ficha técnica Etanol Red™. Dry Alcohol Yeast. URL disponible en: <<http://www.fermentis.com>> o (fermentis@lesaffre.fr)

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [En línea] www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/article. 2003, [consultada: el 06 de Julio de 2006].

FUCHS, E.; GOMES, E.; LEMOS, C. M. Y.; SILVA, R. 2003. Glucoamylase: estructura y termoestabilización. Revista de Biotecnología, Ciencia y Desarrollo. Brasilia. No 31. pp 86-94.

GENENCOR INTERNATIONAL. Ficha técnica STARGEN™ 001, Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production. 2005. URL disponible en: <<http://www.fgenencor.com>>

GULATI M, KOHLMAN K, LADISH MR, HESPELL R, BOTHAST RJ (1996). Assessment of ethanol production options for corn products. Bioresource Technol. 5: 253-264.

LEON, T. A.; CORREDOR, S. L.; FORERO, O. M. 2005. Producción de etanol a partir de yuca mediante biorreactor de tanque agitado con control de variables. Universidad Autónoma de Bucaramanga. pp 1-13.

LINDE M., GALBE M., ZACCHI G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. Enzyme and Microbial Technology 40 (2007) 1100–1107.

LÓPEZ, J. 2002. Semilla vegetativa de yuca. En: Ospina, B y Ceballos, H. La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, pp. 49-75. CIAT. Cali, Colombia. 586 pp.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 1997. Biology of microorganisms. Eighth Edition. Prentice Hall. USA. pp 126-129 y 458.

MADSON PW, MONCEAUX DA. Fuel ethanol production. En Lyons TP, Kelsall DR, Murtagh JE (Eds.) The Alcohol Textbook. Nottingham University Press. pp. 257-268. Citado por: Sánchez O, Cardona C. En: Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. 2005, vol.30, no.11, p.679-686.

MARTÍNEZ G FREDY, (Comunicación personal, 1 de Mayo de 2009), Funcionario de la Secretaria de Educación Departamental, Oficina de Calidad Educativa. Sincelejo.

MERA, I; CARRERA, J. 2005. obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta* .

MINISTERIO DE MINAS Y ENERGIA. Impacto de la biogasolina en la cadena de distribución y en el consumidor final. Septiembre 5 de 2005. Bogota D.C. Disponible en: <http://www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf?opendatabase>.

MOJOVIC L, NIKOLIK S, RAKIN M, VUKASINOVIK M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. Fuel. 2006; 85:1750-1755.

MONTESINOS T, NAVARRO J. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymes Microbial. Technol.2000. 27; 362-370.

OLADE, Organización Latinoamericana de Energía. Introducción al Tema de Biocombustibles. [En línea] < www.olade.org.ec/documentos2/conceptosBio.pdf > [Citado 19 de Febrero de 2008]

OSTERTAG, 1997. Citado por: CORPOICA. En: Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios, con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Dioscorea sp.*) 2003; 34p.

PACHECO, T; SGARBIERI, C. 2002. Diferentes métodos de concentracao de proteina de levedura e suas implicacoes nas propriedades funcionais. Bol. SBCTA, V 36, n 2, p 83 – 94.

PANDEY, A; NIGAM, P; SOCCOL, C; SOCCOL, Y; SINGH, D; MOHAN, R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31, pp.135 – 152.

RIBEIRO, E. y SERAVALLE, E. 2004, Química de Alimentos. Sao Paulo: Eggard Blucher, 184p

SALCEDO J. Evaluación de propiedades tecnofuncionales de ñames del Banco de Germoplasma de la Universidad de Córdoba, 2006

SATYANARAYANA, T; RAO, J; EZHILVAN NAN, M. 2005. α - Amylases. In: Enzyme Technology, A. Pandey, C. Webb, CR. Soccol, C. La roche (Eds.), Asiatech Publishers Inc; New Delhi, India pp 189 – 220.

SÁNCHEZ O., CARDONA C. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. [En línea]<http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442005001100006&script=sci_arttext>[Citado 19 de Febrero de 2008]

SÁNCHEZ C. Descripción de Aspectos Productivos, de Postcosecha y de Comercialización del Ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar [En línea] <www.turipana.org.co/name.htm> [citado el 31 de Enero del 2008]

STARCH HYDROLYSIS. 2000. Disponible en Internet: URL: <http://www.bio-link.org/pdf/starch.pdf>

TRIPATHI Pallavi; LEGGIO, Leila; MANSFELD, Johanna; 2007. ULBRICH-HOFMANN, Renate; Kayastha, Arvind. *alpha- amylase of mung bean (vigna radiata) correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling*. 23 de mayo de 2007. Phytochemistry. p. 1623.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Mecanismos de acción de las enzimas [En línea] <<http://fai.unne.edu.ar/biologia/metabolismo/enzimas.htm>> [citado el 14 de Marzo del 2009]

VICOMEX. Viceministerio de Comercio Exterior de Panamá, “Perfil de Ñame”, Dirección de Promoción de exportación – VICOMEX, 1995. Disponible en http://www.vicomex.gob.pa/p_name.html. [Consultada el 02 de Marzo de 2005]

WANG P. Comparison of Enzymatic (E-Mill) and Conventional Dry-Grind Corn Processes Using a Granular Starch Hydrolyzing Enzyme. Cereal Chem. 2005; 82(6):734–738.

WANG. Comparison of Raw Starch Hydrolyzing Enzyme with Conventional Liquefaction and Saccharification Enzymes in Dry-Grind Corn Processing. *Cereal Chem.* 2007; 84(1):10–14.

ANEXOS

ANEXO A

Ficha técnica: STARGEN™ 001.

DESCRIPCIÓN	La enzima STARGEN™ 001 contiene Aspergillus kawachi alfa amilasa expresada en Thichoderma reesei y glucoamilase de Aspergillus niger, que trabaja sinérgicamente para hidrolizar sustrato de almidón granulado a glucosa.
CARACTERÍSTICAS TÍPICAS	<p>Actividad: mínimo 456 GSHU/g. GSHU: (Unidades de Almidón Granular Hidrolizado).</p> <p>Apariencia: liquido café claro.</p> <p>pH: 4.0 - 4.5</p> <p>Gravedad específica: 1.10 - 1.15 g/ml</p>
APLICACIONES	La enzima STARGEN™ 001 es el producto diseñado para la producción de etanol a partir de granos y otras materias primas almidonadas en el proceso de sacarificación y fermentación simultanea, sin el paso de cocción.
CONDICIONES RECOMENDADAS	<p>Ph. 3.0-4.5</p> <p>Sólidos secos: 12-38% p/p finamente molido: 95%, menos de 0.59 milímetros de diámetro.</p>
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA	<p>Pre-tratamiento: tiempo máximo recomendado de hidratación es de 2 horas a pH <4,5 y temperatura fresca.</p> <p>Fermentación: 24 - 90 horas a 20- 40 °C, con suficiente agitación para mantener los sólidos en suspensión en un entorno de baja viscosidad; largos tiempos de fermentación típicamente resultan en niveles más bajos de almidón residual.</p>

DIRECTRICES DE DOSIFICACIÓN	Los niveles óptimos usados para la enzima STARGEN™ 001 en sacarificación y fermentación simultánea depende de parámetros de procesamiento, tal como el tipo de material, tamaño de la partícula, viscosidad, tiempo de procesamiento, pH, temperatura y sólidos secos. Una mínima dosis de enzima Stargen™ 001 a partir de 1.0-2.5 kg / MT (tonelada métrica) de grano sólidos se recomienda en la mayoría de las condiciones de fermentación.
------------------------------------	--

Fuente: Genencor International.

ANEXO B.

Ficha técnica: Ethanol Red™ Dry alcohol yeast

INGREDIENTES	Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), emulgentes (E491)
PROPIEDADES	<p>Etanol Red, es una cepa especialmente seleccionada, que se ha desarrollado para la industria de etanol. Con alta Tolerancia al Etanol manteniendo una alta viabilidad celular, especialmente durante la "mas alta gravedad" de fermentación.</p> <p>Diseñada para la producción de alcohol a temperaturas elevadas, Etanol Red es capaz de maximizar los rendimientos de alcohol en una amplia gama de temperaturas. Los rendimientos de 48g y ethanol/100g concentración de etanol de 18% v / v a una temperatura de 35 °C (95 °F).</p> <p>Utilizando Etanol Red se puede esperar bajar los costos de refrigeración, niveles más altos de etanol y el aumento de la productividad.</p>
DOSIFICACIÓN	<p>Lanzamiento directo (sin propagación): Un mínimo de 2-4 libras por cada 1000 litros de mosto (25-50g por hectolitro) para lograr una primera concentración de células viables de aproximadamente 18-36 millones de células viables por galón (5-10 millones de euros por mililitro) en la fermentación.</p> <p>Lanzamiento indirecto (corto propagación): Ejerciendo un control estricto sobre aspectos de contaminación, la levadura seca puede ser propagada durante un corto período de tiempo. En consecuencia la cantidad necesaria de levadura debe disminuir.</p> <p>Antes de utilizarla en la fermentación, la levadura en primer lugar debe ser rehidratada en 5 veces su peso de agua estéril o mosto. Esto se hace a 95 °F ± 9°F (35°C ± 5°C) de 15-30 minutos para asegurar "Acondicionamiento" y una perfecta homogeneización</p>

TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN	86 – 104 F (30 C - 40 ° C)
ANÁLISIS TÍPICO	<ul style="list-style-type: none"> • % Peso en Seco: 94,0 - 96,5 • Células vivas en el embalaje:> 20 x 10⁹ / gramo • Total de bacterias: <1 x 10⁴ / gramo • Bacterias de ácido acético: <1 x 10³ / gramo • Lactobacillus: <1 x 10³ / gramo • Microorganismos patógenos: de conformidad con el Reglamento.

Fuente: Fermentis

ANEXO C.

Resumen estadístico; Equivalente Dextrosa variedad Burrión (*D. alata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.

ANOVA Equivalente Dextrosa (%ED) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 12% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,23867	2	1,11934	2,19	0,1337
Intra grupos	12,2636	24	0,510985		
Total (Corr.)	14,5023	26			

ANOVA Equivalente Dextrosa (%ED) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 25% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,142172	2	0,071086	0,05	0,9556
Intra grupos	37,4813	2	1,56172		
Total (Corr.)	37,6235	4			
		2			
		6			

ANOVA Comparación Equivalente Dextrosa (%E.D) a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	18,0412	2	9,02059	12,46	0,0002
Intra grupos	17,3779	2	0,72408		
Total	35,4191	4			
(Corr.)		2			
		6			

Pruebas de Múltiple Rangos, Equivalente Dextrosa (%E.D) a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MED12%	9	1,771	X
MED35%	9	1,98467	X
MED25%	9	3,60196	X

ANEXO D.

Resumen estadístico; Numero de Microorganismos (M.O) variedad Burrión (*D. alata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v

ANOVA Numero de Microorganismos (M.O) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 12% p/v

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,22707E14	2	6,13537E13	0,09	0,9106
Intra grupos	1,5655E16	2	6,5229E14		
Total	1,57777E16	2			
(Corr.)		6			

ANOVA Numero de Microorganismos (M.O) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 25% p/v

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9,23055E13	2	4,61527E13	0,04	0,9646
Intra grupos	3,06722E16	2	1,27801E15		
Total	3,07645E16	2			
(Corr.)		6			

**ANOVA Numero de Microorganismos (M.O) variedad Burrión (*D. alata*),
concentración de sustrato 35% p/v**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,0	2	0,5	0,00	1,0000
Intra grupos	2,6363E15	2	1,09846E14		
Total	2,6363E15	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Comparación Número de microorganismos (M.O) variedad
Burrión (*D. alata*), concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,25298E15	2	2,12649E15	3,23	0,0573
Intra grupos	1,58069E16	2	6,5862E14		
Total	2,00598E16	4			
(Corr.)		2			
		6			

**Pruebas de Múltiple Rangos, Medias Número de microorganismos
(M.O), a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MMO35%	9	1,58713E7	X
MMO12%	9	3,49262E7	XX
MMO25%	9	4,62916E7	X

ANEXO E.

Resumen estadístico; Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión (*D. alata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v

ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 12% p/v

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0220576	2	0,0110288	0,21	0,8105
Intra grupos	1,24889	2	0,052037		
Total	1,27095	4			
(Corr.)		2			
		6			

ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión (*D. alata*), concentración de sustrato 25% p/v

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,000246914	2	0,000123457	0,00	0,9988
Intra grupos	2,45086	2	0,102119		
Total	2,45111	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión (*D. alata*),
concentración de sustrato 35% p/v**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,0	2	0,5	0,00	1,0000
Intra grupos	2,6363E15	2	1,09846E14		
Total	2,6363E15	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Comparación Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Burrión
(*D. alata*), concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	30,3228	2	15,1614	11,72	0,0003
Intra grupos	31,0527	2	1,29386		
Total	61,3756	4			
(Corr.)		2			
		6			

**Pruebas de Múltiple Rangos, Medias Porcentaje de Alcohol (%OH) a
las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MOH12%	9	1,7642	X
MOH25%	9	2,24444	X
MOH35%	9	4,21358	X

ANEXO F

Resumen estadístico; Equivalente Dextrosa variedad Alemán (*D. rotundata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.

ANOVA Equivalente Dextrosa (%ED) variedad Alemán (*D. rotundata*), concentración de sustrato 12% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,912233	2	0,456116	1,07	0,3598
Intra grupos	10,2591	2	0,427463		
Total	11,1713	2			
(Corr.)		6			

ANOVA Equivalente Dextrosa (%ED) variedad Alemán (*D. rotundata*) concentración de sustrato 25% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,363595	2	0,181797	0,11	0,8987
Intra grupos	40,6772	2	1,69488		
Total	41,0408	2			
(Corr.)		6			

ANOVA Equivalente Dextrosa (%ED) variedad Alemán (*D. rotundata*) concentración de sustrato 35% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,32526	2	1,66263	1,08	0,3550
Intra grupos	36,8883	2	1,53701		
Total	40,2135	4			
(Corr.)		2			
		6			

ANOVA Comparación Equivalente Dextrosa (%E.D) variedad Alemán (*D. rotundata*), concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,25361	2	1,62681	1,81	0,1861
Intra grupos	21,63	2	0,901248		
Total	24,8836	4			
(Corr.)		2			
		6			

Pruebas de Múltiple Rangos, Equivalente Dextrosa (%E.D) a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MED12%	9	1,82059	X
MED35%	9	2,45263	X
MED25%	9	2,62922	X

ANEXO G.

Resumen estadístico; Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán (*D. rotundata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.

**ANOVA Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 12% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,02609E14	2	3,01305E14	0,90	0,4182
Intra grupos	7,99603E15	2	3,33168E14		
Total	8,59864E15	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 25% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,72742E14	2	1,36371E14	0,07	0,9308
Intra grupos	4,5493E16	2	1,89554E15		
Total	4,57657E16	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 35% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,00875E14	2	5,04375E13	0,05	0,9547
Intra grupos	2,6045E16	2	1,08521E15		
Total	2,61459E16	2			
(Corr.)		6			

**ANOVA Comparación Numero Microorganismos (M.O) variedad Alemán
(*D. rotundata*), concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,63573E15	2	8,17865E14	0,78	0,4689
Intra grupos	2,51079E16	2	1,04616E15		
Total	2,67437E16	2			
(Corr.)		6			

**Pruebas de Múltiple Rangos, Medias Número de microorganismos
(M.O), a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MMO 12%	9	3,26042E7	X
MMO35%	9	3,43943E7	X
MMO25%	9	4,99375E7	X

ANEXO H.

Resumen estadístico; Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (*D. rotundata*), concentraciones 12, 25 y 35 % p/v.

**ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 12% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487243	2	0,0243621	0,01	0,9859
Intra grupos	41,1602	2	1,71501		
Total	41,209	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 25% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487243	2	0,0243621	0,01	0,9859
Intra grupos	41,1602	2	1,71501		
Total	41,209	4			
(Corr.)		2			
		6			

**ANOVA Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (*D. rotundata*)
concentración de sustrato 35% p/v.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,57687	2	1,78844	1,57	0,2296
Intra grupos	27,4183	2	1,14243		
Total	30,9951	2			
(Corr.)		6			

ANOVA Comparación Porcentaje de Alcohol (%OH) variedad Alemán (*D. rotundata*), concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	34,2583	2	17,1291	21,42	0,0000
Intra grupos	19,1954	2	0,79981		
Total	53,4537	2			
(Corr.)		6			

Pruebas de Múltiple Rangos, Medias Porcentaje de Alcohol (%OH) a las concentraciones 12%, 25% y 35% p/v.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MOH12%	9	1,47407	X
MOH35%	9	3,45679	X
MOH%25%	9	4,12716	X

ANEXO I.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Rendimiento con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media
MEDIA GLOBAL	18	0,107704
Concentración		
12 % p/p	6	0,137778
25 % p/p	6	0,0972222
35 % p/p	6	0,0881111
Variedades		
ALEMAN (Rotundata)	9	0,113852
BURRION (Alata)	9	0,101556
Concentración por Variedades		
12 % p/p, ALEMAN (Rotundata)	3	0,139111
12 % p/p, BURRION (Alata)	3	0,136444
25 % p/p, ALEMAN (Rotundata)	3	0,134667
25 % p/p, BURRION (Alata)	3	0,0597778
35 % p/p, ALEMAN (Rotundata)	3	0,0677778
35 % p/p, BURRION (Alata)	3	0,108444

ANEXO J.

Resultados de la SSF para las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y la variedad Alemán (*D. rotundata*).

Equivalente de Dextrosa (E.D) de las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*), a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

t (h)	Alemán (<i>D. Rotundata</i>)			Burrión (<i>D. alata</i>)		
	12%	25%	35%	12%	25%	35%
0	1,98333333	2,62666667	2,63966667	1,378	2,70666667	1,09
1	2,26066667	4,45666667	3,60466667	1,399	4,06	2,69
2	2,60333333	3,06666667	3,121	2,73033333	4,19	1,87
3	2,31	3,76	3,21566667	2,46066667	6,00566667	2,38
4	2,09333333	3,63	3,736	1,602	4,14333333	2,45
8	0,85533333	1,74666667	1,11233333	0,997	2,252	0,492
20	1,55866667	1,66333333	1,49466667	2,2	2,85666667	2,24
32	1,35466667	1,31633333	1,57666667	1,599	3,33333333	2,02
48	1,366	1,39666667	1,573	1,573	2,87	2,63

Crecimiento Celular (*Etanol Red*) para las variedades de ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

t (h)	Alemán (<i>D. Rotundata</i>)			Burrión (<i>D. alata</i>)		
	12%	25%	35%	12%	25%	35%
0	6537500	10208333,3	9991666,67	9265833,33	14206555,6	16000000
1	13933333,3	15081111,1	6745416,67	9733333,33	20654166,7	17250000
2	21833344,4	14684444,4	7375000	11072222,2	14365798,7	6425000
3	33305555,6	18441777,8	8422222,22	19651111,1	18100000	5650000
4	39400000	20325000	13155555,6	29111111,1	20900000	5800000
8	35416666,7	60252777,8	42466666,7	38231555,6	62527777,8	9250000
20	44930555,6	91750000	61847916,8	65177777,8	91564888,9	19091666,7
32	59694444,4	106333333	80166666,7	62462966,7	94638888,9	28000000
48	38386111,1	112361111	79377444,4	69629666,7	79666666,7	35375000

Variación de la concentración de alcohol para las variedades del ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

t (h)	Alemán (<i>D. Rotundata</i>)			Burrión (<i>D. alata</i>)		
	12%	25%	35%	12%	25%	35%
0	1,26666667	2,45555556	2,5	1,47777778	1,91111111	2,66666667
1	2,01111111	2,88888889	2,58888889	1,64444444	2,53333333	2,9
2	1,31111111	3,84444444	2,75555556	1,65555556	2,61111111	2,73333333
3	2,47777778	4,24444444	2,56666667	1,66666667	2,52222222	3,42222222
4	1,95555556	3,51111111	3,44444444	1,73333333	2,47777778	3,4
8	2,24444444	3,8	4,05555556	1,8	2,31111111	3,68888889
20	2,34444444	4,72222222	4,36666667	1,8	2,71111111	4,73333333
32	2,86666667	5,47777778	4,22222222	1,84444444	2,65555556	5,72222222
48	2,32222222	6,2	4,61111111	2,25555556	3,01111111	8,65555556

Volumen del mosto (filtrado) al final del proceso SSF, para las variedades del ñame Burrión (*D. alata*) y Alemán (*D. rotundata*) a concentraciones de harina de 12; 25 y 35% p/v.

Variedades	Concentración p/v	Volumen final alcohol (ml)
Alemán (<i>D. Rotundata</i>)	12%	572.66
	25%	432.5
	35%	413.33
Burrión (<i>D. alata</i>)	12%	576.66
	25%	440
	35%	352.5