EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS EN LITROS DE ALCOHOL / KILOGRAMO DE HARINA DE YUCA DE LAS VARIEDADES MCOL 2215 (VENEZOLANA) Y MTAI 8, VIA ENZIMÁTICA

RUBER DAVID LÁZARO ARRIETA
ALIS JOSÉ MEJÍA LÓPEZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2008

EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS EN LITROS DE ALCOHOL / KILOGRAMO DE HARINA DE YUCA DE LAS VARIEDADES MCOL 2215 (VENEZOLANA) Y MTAI 8, VIA ENZIMÁTICA

RUBER DAVID LÁZARO ARRIETA
ALIS JOSÉ MEJÍA LÓPEZ

Trabajo presentado como requisito para optar el título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología

Director:
JAIRO SALCEDO MENDOZA
Ing. Químico

Codirector:
GERMÁN NARVÁEZ GÓMEZ
Ing. Agroindustrial

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2008

"ÚNICAMENTE LOS AUTORES SON RESPONSABLES DE LAS IDEAS EXPUESTAS EN EL PRESENTE TRABAJO."

(Artículo 12, resolución 02 del 2003)

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____
Presidente del jurado

_____
Jurado

_____
Jurado

Sincelejo, _____

DEDICATORIA

A Dios por darme salud y perseverancia.

A mis abuelos Flor María y Francisco por el esfuerzo que hicieron para. ayudarme a cumplir esta meta.

A mi tía Lucy por su apoyo incondicional y paciencia.

A mi madre Merys por sus concejos y oportuna colaboración.

A mi tíos Sergio y Enrrique por su valiosa ayuda.

A mis hermanos Luis, Lewis, Sergio Andres, Marizela y Nakaritt por ser quienes son y por su amistad.

A mis compañeros Wilkin Day Paternita y Leimar Murillo Montes (Q.E.P.D) por los momentos inolvidables que compartimos.

A mis demás familiares y amigos por estar siempre conmigo dándome una palabra de aliento y a todas aquellas personas que de una u otra manera colocaron su granito de arena para realizar y culminar este trabajo.

Alis José

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, sabiduría y fortaleza

A mis padres Edilberto y Minelba por su apoyo incondicional y permitir hacer éste sueño realidad.

A mis hermanos Edinson, Edilberto, Luis, Oscar, Mirledis, Mario, Zaida, Dira y Fay por incentivarme a salir adelante y apoyarme en todo momento.

A mis sobrinos Liceth, Durkis, Yicell, Tairelis y Yorbis por estar siempre allí, brindándome instantes de alegría en aquellos momentos oportunos.

A mis compañeros Wilkin Day Paternita y Leimar Murillo Montes (Q.E.P.D) por los momentos inolvidables que compartimos.

A todos mis familiares y amigos que estuvieron presentes en todo este proceso.

Ruber

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos salud, entendimiento, y paciencia durante la elaboración de este proyecto y además por guiarnos en la realización de este logro tan importante en nuestras vidas.

A la universidad de Sucre que a través de sus docentes, personal administrativo e instalaciones nos brindó todo su apoyo para culminar esta etapa de formación.

A nuestro director Jairo Salcedo por brindarnos su apoyo y por su valioso aporte en la realización de este proyecto.

Al Profesor Germán Narváez por ser nuestro codirector y por sus sugerencias en la realización de este documento.

Al profesor Ricardo Andrade y Olga Perna por darnos a conocer las recomendaciones que consideraron pertinentes para el desarrollo de este Trabajo.

Al ingeniero Eusebio Ortega, investigador del CIAT en Córdoba y Sucre por su valiosa colaboración.

Al profesor Carlos Gómez Santís por sus asesorias.

A Arturo Doncel por sus consejos, amistad y paciencia.

A la Secretaría de Desarrollo Económico y Medio Ambiente del Departamento por su colaboración.

A todos los compañeros y amigos que de una u otra forma contribuyeron a nuestra realización profesional Gracias.

Alis y Ruber

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCION	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GENERAL	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. ESTADO DEL ARTE	24
3.1. GENERALIDADES DE LA YUCA	24
3.2. TAXONOMIA	25
3.3. VARIEDAD CORPOICA-TAI	27
3.3.1. Origen de la variedad	27
3.3.2. Características morfológicas	27
3.4. VARIEDAD MCOL 2215 (VENEZOLANA)	28
3.4.1. Origen de la variedad	28
3.4.2. Características morfológicas	28
3.4.3. Rendimiento y calidad de las raíces	29
3.5. RENDIMIENTO DE RAÍCES FRESCAS (Ton/ha) Y CONTENIDO DE MATERIA SECA (%) DE LAS VARIEDADES VENEZOLANA Y MTAI	29
3.6. PRODUCCIÓN DE YUCA INDUSTRIAL EN SUCRE	31
3.7. El ALMIDÓN	32
3.7.1. Estructura y composición del almidón	33
3.7.1.1. Amilosa	34
3.7.1.2. Amilopectina	34
3.8. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	35

3.9. LAS ENZIMAS 37

3.9.1. Las amilasas 39

3.9.1.1. Las α-Amilasas 40

3.9.1.2. Las Glucoamilasas 41

3.9.1.3. Aplicaciones de las amilasas 42

3.9.2. Las pectinasas 42

3.9.2.1. Enzimas desmetoxilante o desesterificante 43

3.9.2.2. Pectinasas despolimerizantes 43

3.9.2.3. Protopectinasas 44

3.10. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA 44

3.11. *Saccharomyces cerevisiae* 45

3.12. ETANOL 46

3.12.1. Orígenes de los biocombustibles 47

3.12.2. Obtención de etanol 48

3.12.3. Ventajas del etanol como carburante 49

3.12.4. Producción mundial de alcohol carburante 52

4. DISEÑO METODOLOGÍCO 54

4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN 54

4.2. UNIVERSO Y LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO 54

4.3. VARIABLES 54

4.3.1. Variables independientes 54

4.3.2. Variables dependientes 54

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS 55

4.5. PROCEDIMIENTO 55

4.5.1. Extracción de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8. 55

4.5.2. Hidrólisis enzimática 56

4.5.2.1. Montaje de los biorreactores para la hidrólisis 56

4.5.2.2. Proceso de licuefacción 56

4.5.2.3. Proceso de sacarificación 57

4.5.3. Fermentación alcohólica 58

4.5.3.1. Preparación del inóculo 58

4.5.3.2. Proceso de fermentación 58

4.5.4. Evaluación del rendimiento 59

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES 60

5.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA 60

5.2. PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA 61

5.2.1. Grados brix variedad Venezolana 61

5.2.2. Equivalentes de dextrosa variedad Venezolana 62

5.2.3. Grados brix variedad MTAI 8 64

5.2.4. Equivalentes de dextrosa variedad MTAI 8 65

5.3. PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA 66

5.3.1. Grados brix variedad Venezolana 66

5.3.2. Crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* variedad Venezolana 68

5.3.3. Variación de la concentración de etanol durante el proceso de fermentación variedad Venezolana 69

5.3.4. Grados brix variedad MTAI 8 70

5.3.5. Crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* variedad MTAI 8 71

5.3.6. Variación de la concentración de etanol durante el proceso de fermentación variedad MTAI 8 72

5.4. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL 73

6. CONCLUSIONES 79

7. RECOMENDACIONES 81

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 82

ANEXOS 94

LISTA DE GRÁFICAS

Pag

Gráfica 1. Grados brix durante el tiempo de hidrólisis de la variedad Venezolana a diferentes concentraciones de harina 62

Gráfica 2. Equivalentes de Dextrosa (E.D) durante el tiempo de hidrólisis de la variedad Venezolana a diferentes concentraciones de harina 63

Gráfica 3. Grados brix durante el tiempo de hidrólisis de la variedad MTAI 8 a diferentes concentraciones de harina 64

Gráfica 4. Equivalentes de Dextrosa durante el tiempo de hidrólisis de la variedad MTAI 8 a diferentes concentraciones de harina. 66

Gráfica 5. Grados brix durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 67

Gráfica 6. Variación del logaritmo del número de microorganismos (MO) durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 68

Gráfica 7. Concentración de etanol (% v/v) durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 69

Gráfica 8. Grados brix durante el tiempo de fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 71

Gráfica 9. Variación del logaritmo del número de microorganismos (MO) durante el tiempo de fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 72

Gráfica 10. Concentración de etanol (% v/v) durante el tiempo de

fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v. 73

Gráfica 11. Medias para el rendimiento de las variedades Venezolana y MTAI 8 76

Grafica 12. Rendimientos litros de alcohol / tonelada de yuca de las variedades Venezolana y MTAI 8, para diferentes humedades de yuca fresca. 77

Grafica 13. Rendimientos litros de alcohol / tonelada de yuca para las variedades MTAI 8 y Venezolana en las diferentes concentraciones de harina. 78

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Área, producción y rendimiento en la producción de yuca de cinco paises de mayor producción en América latina. 2006.	26
Tabla 2. Producción de yuca en Sucre en los periodos 2002 – 2006.	26
Tabla 3. Contenido de materia seca (%) y rendimiento por hectárea (Ton) de las variedades y clones élites que se siembran en Sucre y Córdoba.	30
Tabla 4. Distribución del área sembrada en Sucre con yuca para uso industrial, por variedad y porcentaje año 2006.	31
Tabla 5. Propiedades de la amilosa y amilopéctina.	34
Tabla 6. Oferta de etanol en Colombia.	51
Tabla 7. Futuras plantas de etanol en Colombia.	51
Tabla 8. Producción mundial de alcohol etílico año 2004 y 2006	53
Tabla 9. Dosis enzimática de pectinex® Ultra SP-L.	57
Tabla 10. Dosis enzimática de Termamyl® 120 L, Tipo L.	57
Tabla 11. Dosis enzimática de AMG 300L.	58
Tabla 12. Porcentajes de humedad y contenidos de materia seca de las variedades de yuca MCOL 2215 y MTAI 8.	60
Tabla 13. Rendimientos en litros de etanol / tonelada de harina de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8.	73
Tabla 14. Análisis de varianza para el rendimiento de las variedades Venezolana y MTAI 8.	74
Tabla 15. Contraste de múltiples rangos según bloque	74
Tabla 16. Medias por mínimos cuadrados para rendimiento con 95%	

de intervalos de confianza y contraste de múltiples rangos según yuca Venezolana y MTAI 8. 75

LISTA DE FIGURAS

Pag

Figura 1. Variedad CORPOICA – TAI. 28

Figura 2. Variedad MCOL 2215 (Venezolana). 29

Figura 3. Estructura de la amilosa. 34

Figura 4. Estructura de la amilopéctina. 35

Figura 5. Enzimas degradadoras del almidón. 40

Figura 6. Obtención de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8 55

LISTA DE ANEXOS

Pag

Anexo A. Fichas técnicas de las enzimas pectinex® Ultra SL-P, Termamyl® 120, tipo L y AMG 300 L, de la Novo Nordisk. 95

Anexo B. *Saccharomyces cerevisiae* y nutrientes empleados en los Inóculos para las variedades Venezolana y MTAI 8 96

Anexo C. Resúmenes estadístico de los grados brix durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana. 97

Anexo D. Resúmenes estadísticos de los equivalentes de dextrosa (E.D) durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana. 100

Anexo E. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8. 103

Anexo F. Resúmenes estadísticos de los equivalentes de dextrosa (E.D) durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8. 106

Anexo G. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana. 109

Anexo H. Resúmenes estadísticos del logaritmo del número de microorganismos durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana. 112

Anexo I. Resúmenes estadísticos de la producción de etanol (% v/v) durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana. 115

Anexo J. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8. 118

Anexo K. Resúmenes estadísticos del logaritmo del número de microorganismos durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8. 121

Anexo L. Resúmenes estadísticos de la producción de etanol (% v/v) durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8. 124

RESUMEN

El presente trabajo contiene los resultados obtenidos al evaluar los rendimientos a etanol a partir de harina de yuca (*Manihot esculenta*) aislada de las variedades MCOL 2215 o Venezolana y MTAI 8, las cuales se hidrolizan vía enzimática empleando pectinex Ultra® SP – L, Termamy® 120 Tipo L (licuefacción) y AMG 300 L (sacarificación) adaptando beackers de 1000 ml como biorreactores con un volumen de reacción de 500 ml y concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v, de tal forma que se produzcan azúcares fermentables que son sometidos a fermentación anaeróbica por acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* Para esto se utilizó un diseño experimental con un único factor categórico aleatorizado en cuatro bloques y en seis niveles, para un total de 24 ejecuciones. La yuca presentó 64,5% de humedad en base húmeda (b.h) para la variedad Venezolana y de 67,9% para MTAI 8, mientras que la humedad de las harinas fueron de 9,53% y 7,58% respectivamente. En la etapa de seguimiento de la hidrólisis se obtuvieron equivalentes de dextrosa para MTAI 8 hasta 75; 89 y 100% a concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v respectivamente, mientras que para la variedad MCOL 2215 fueron del 100% en las tres concentraciones. La evaluación del rendimiento a etanol permitió determinar que la variedad MTAI 8 al 10% p/v muestra el mayor rendimiento de alcohol, con 689,5 litros / tonelada de harina, mientras que la variedad Venezolana al 16% p/v el menor con 397,4 litros de alcohol / tonelada de harina.

Palabras claves: Hidrólisis, enzimas, fermentación, etanol, almidón.

ABSTRACT

This work contains the results obtained to assess yields to ethanol from cassava flour (*Manihot esculenta*) isolated from the varieties MCOL 2215 or Venezuelan MTAI 8, which is an enzyme hydrolyzed using pectinex® Ultra SP-L, Termamyl® 120 Type L (liquefaction) and AMG 300 L (saccharification) adapting beackers 1000 ml as bioreactors with a reaction volume of 500 ml and concentrations of flour 10; 13 and 16% w/v, so that they occur fermentable sugars that are subject to action by anaerobic fermentation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. For this experimental design was used with a single factor categorical randomized into four blocks and six levels, for a total of 24 performances. Cassava presented 64,5% of humidity on wet basis (b.h) from to Venezuelan variety and of 67.9% from to MTAI 8, while the humidity of the meals were 9.53% and 7.58% respectively. In the follow-up phase were obtained by hydrolysis dextrose equivalent to MTAI 8 until 75; 89 and 100% at concentrations of 10 flour; 13 and 16% w / v respectively, while for the variety MCOL 2215 they wereg 100% in the three concentrations. The performance evaluation to determine that the ethanol allowed MTAI 8 to 10% w/v shows the greatest return of alcohol, with 689,5 liters / tonne of flour, while the variety Venezuelan to 16% w/v with the lowest 397,4 liters of alcohol / tonne of flour.

Key Words: Hydrolysis, enzymes, fermentation, ethanol, starch.

INTRODUCCION

En el ámbito de América Latina y el Caribe, Colombia es el tercer productor de yuca; siendo La Costa Atlántica la región donde se concentra la mayor producción nacional, y el departamento de Sucre el más importante después de Bolívar y Córdoba (FAO, 2006; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006) gracias a que presenta condiciones medioambientales favorables para el desarrollo de este cultivo, el cual conforma un renglón importante en la economía agrícola del departamento y base alimenticia de la población más vulnerable puesto que se cultiva y comercializa en todos sus municipios. Esto conlleva a que el área cultivada de este tubérculo en el departamento sea muy significativa, cifra representada en 18.500 hectáreas para el año 2007, con una producción de 237.500 toneladas aproximadamente. Dentro de los municipios de mayor área de cultivo se encuentran: Corozal, San Juan de Betulia, San Antonio de Palmito, Los Palmitos y Ovejas, siendo las variedades que más se cultivan la MCOL 2215 ó Venezolana y la MTAI 8 (Ortega, 2007).

El mercado más importante para la yuca es el consumo humano, seguida por su utilización en la alimentación animal, ya sea mediante el consumo directo de las raíces frescas o en forma de concentrados después de su procesamiento industrial. Además de sus raíces se extrae el almidón, el cual es utilizado en la industria textil, alimentaria, tintorería, pegantes, entre otros (CCI, 1999).

A pesar que en nuestro departamento se presenta una alta producción de yuca, todavía no se han realizado proyectos de investigación encaminados a utilizar este tubérculo como materia prima en la obtención de alcohol combustible.

La no existencia de información de rendimientos reales (Litros de alcohol producido / Kilogramo de harina de yuca) en la producción de alcohol etílico a partir de las diferentes variedades de yuca que se cultivan en la Costa Atlántica, especialmente en el departamento de Sucre, crea una incertidumbre

en los inversionistas e investigadores que quieran realizar estudios para el montaje de un proyecto de una planta industrial para la producción de biocombustible, que es una de las regiones con mayor potencialidad en el cultivo de este tubérculo.

Los resultados obtenidos son de gran importancia debido a que nos permite suministrar información tanto a la comunidad industrial como a la comunidad productora acerca de cuales variedades se obtiene mayor producción de etanol con el fin de incentivar su cultivo, y que sirvan como referente para compararlas con otras materias primas como es el caso de la caña de azùcar, maíz, entre otras. Esta información contribuiría también con los programas de reducción de emisiones de gases contaminantes en las ciudades mediante la utilización de biocombustibles, de los cuales Colombia hace parte con el acuerdo de Kyoto.

La Cumbre de Kyoto (1993), concluyó con la adopción del Protocolo de Kyoto, el cual plantea la adopción de una serie de medidas encaminadas a la reducción de emisiones de gases de invernadero por los 39 países industrializados, incluidos los de la antigua URSS, Obligando a limitar las emisiones conjuntas de seis gases (CO_2, CH_4, N_2O, compuestos perfluorocarbonados (PFC), compuestos hidrofluorocarbonados (HFC) y hexafluoruro de azufre) para el período 2008–2012, con una reducción global acordada del 5,2% para los países industrializados (Higueras, 2004).

En Colombia, de acuerdo con la ley 693 de Septiembre 19 de 2001 sobre alcoholes carburantes, a partir de septiembre de 2005, será obligatoria la mezcla en un 10% de éste carburante con los combustibles de origen fósil. Esto con el fin de reducir las emisiones contaminantes del medio ambiente y causantes del efecto invernadero (Diario Oficial del Estado. 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los rendimientos en litros de etanol / kilogramo de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 ó Venezolana y MTAI 8, utilizando las enzimas Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120 L Tipo L, AMG 300 L y la levadura *Saccharomyces cerevisiae.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el rendimiento de la harina de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8.
- Producir un hidrolizado a partir de la hidrólisis enzimática de la harina de yuca de las variedades MCOL 2215 ó Venezolana y MTAI 8 mediante el uso de pectinex® Ultra SP- L, Termamyl® 120 L Tipo L, y AMG 300 L.
- Determinar la cantidad de etanol producida a partir de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 ó Venezolana y MTAI 8 durante el proceso de fermentación alcohólica con levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES DE LA YUCA

La yuca pertenece a la familia *Euphorbiaceae,* constituida por unas 7200 especies. Un género muy importante de esta familia es *Manihot*, al que pertenece la yuca, y se encuentra distribuido desde el suroeste de Estados Unidos (33°N) hasta Argentina (33°S). Naturalmente, sólo se encuentran especies del *manihot* en América, y existe un reconocimiento muy generalizado de que este cultivo se originó en América Tropical, específicamente en el nordeste de Brasil. Se han descrito alrededor de unas 98 especies asignadas a este género, de las que sólo la yuca (*Manihot esculenta crantz)* tiene relevancia económica y es cultivada. La yuca es un arbusto perenne, monoica de ramificación simpodial y con variaciones en la altura de la planta que oscilan entre 1 y 5 m, aunque la altura máxima generalmente no excede los 3 m (Ceballos y De la Cruz, 2004).

En el sur del continente, la yuca se conoce como mandioca, nombre que recibe también en Brasil. El nombre en ingles (cassava) puede haberse derivado de la palabra *casabi* que entre los indios Arawak significa raíz. Actualmente, la yuca es un cultivo muy importante en regiones tropicales del mundo (latitudes menores a los 30°), que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m. Si bién, el principal producto económico son sus raíces, las hojas de la yuca también tienen un excelente potencial y son extensivamente utilizadas en África y Asía, ya sea para la alimentación humana o animal. La yuca es el cuarto producto básico más importante después del arroz, trigo y maíz, y es un componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas (FAO/FIDA, 2000).

La cosecha de yuca puede realizarse entre el octavo y duodécimo mes después de la siembra, dependiendo de las condiciones agroecológicas del cultivo, del manejo cultural y la variedad utilizada. Lo anterior, a su vez determina los rendimientos por área del cultivo, en el ámbito mundial, se sitúa

alrededor de 9 ton/ha, aunque existen regiones con producciones superiores a las 30 ton/ha. En Colombia, el promedio oscila entre 8 y 13 ton/ha aunque existen plantaciones en que el rendimiento está entre 20 y 30 ton/ha. Es de notar que el CIAT cuenta con variedades y paquetes tecnológicos para producir yuca dulce o amarga, con rendimientos iguales o superiores a las 20 ton/ha. El tipo de variedad determina el uso final de la yuca, si es para consumo humano en fresco siempre se usa una variedad dulce con bajo contenido de cianuro, en tanto que si es para uso industrial o para transformación se pueden usar variedades amargas, siempre que sean procesadas de una manera adecuada (CCI, 1999).

3.2 TAXONOMÍA

La ubicación taxonómica de la yuca es:

División:	*Espermatophyta*
Subdivisión:	*Angiospermae*
Clase:	*Dicotiledoneae*
Subclase:	*Archiclamydea*
Orden:	*Geranielaes O Euphorbiales*
Familia:	*Euphorbiaceae*
Subfamilia:	*Crotonidae*
Tribu:	*Manihoteae*
Genero:	*Manihot*
Especie:	*Esculenta crantz*

(Domínguez, 1996).

La yuca es uno de los cultivos más importantes del trópico. La producción mundial se ha estimado en 120 millones de ton/año; mientras que la producción anual de materia seca llega a 42 millones de toneladas. Aproximadamente un 80% de la producción se usa para consumo humano, constituyendo la fuente principal de carbohidratos para más de 500 millones de personas que habitan en los países en desarrollo. El otro 20% de la producción es usado para la alimentación animal y procesamientos industriales. Para el año 2002 en

América Latina, el área de yuca fue de 2.579.165 ha y la producción superó los 33 millones de toneladas (FAO, 2004)

Colombia es el tercer país productor de yuca en América del Sur, después de Brasil y Paraguay con una producción de 1.848.000 toneladas. En Colombia se cultiva yuca en los departamentos de Meta, Cauca, Norte de Santander, Santander y la Costa Atlántica (CCI, 1999). En la tabla 1, se presenta la producción de yuca en América Latina en el año 2006.

Tabla 1. Área, producción y rendimiento en la producción de yuca de cinco países de mayor producción en América Latina 2006.

País	Área (ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/ha)
Brasil	1905725	24774425	13
Paraguay	263860	3694040	14
Colombia	217623	2013793	9,2
Perú	84200	976720	11,6
Bolivia	40500	486000	12

Fuente: FAO, 2006.

El departamento de Sucre en los ultimo años se ha mantenido en el tercer lugar en cuanto a producción de yuca se trata, es así que para el año 2006 tiene una participación de un 9.4% del total Nacional. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2006). En la tabla 2, se muestra la producción de yuca en el departamento de Sucre en los periodos 2002 – 2006.

Tabla 2 .Producción de yuca en Sucre en los periodos 2002-2006.

Año	2002	2003	2004	2005	2006
Área cultivada (ha)	16222	15513	15902	16237	18135
Producción (Ton)	131730	150150	173002	186925	209412
Rendimiento (kg/ha)	8120,5	9679	10879	11500	11500

Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2006).

En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) existe una colección de más de 1.000 variedades recolectadas en todo el mundo. En Colombia las

variedades más conocidas incluyen la Manihot ICA P–12, ICA 24–3, CMC 40, CMC 76, CM 507–37, MCOL 2215(Venezolana), ICA Negrita, Chiroza y la ICA Catumare, entre otras (CCI, 1999).

Las nuevas variedades opcionales para la producción y desarrollo agroindustrial de la yuca en la región Caribe tenemos: Corpoica Gines, Corpoica Orense, Corpoica Tai y Corpoica Verónica; las cuales son fruto de un trabajo colaborativo entre el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), a través del proyecto financiado por el Departamento Internacional para el Desarrollo del Reino Unido (CORPOICA/CIAT, 2005).

3.3 VARIEDAD CORPOICA-TAI.

3.3.1 Origen de la Variedad: esta variedad (liberada en Tailandia como RAYONG 60, en 1986), fué introducida con el código MTAI 8 por el CIAT en 1987. Este clon proviene del cruzamiento realizado en Tailandia, entre la variedad colombiana MCOL 1684 y la variedad regional Rayong 1. El nombre TAI hace alusión a las iniciales del país de donde se hizo la introducción (Tailandia) y por que dicho nombre se ha popularizado entre los agricultores que han participado en el proceso de evaluación en las diferentes pruebas comerciales que se establecieron en la región Caribe (CORPOICA/CIAT, 2005)

3.3.2 Características morfológicas: esta variedad es de porte medio a alto, alcanzando una altura promedio de 2 m, con tallo de color verde grisáceo, cuya corteza (colénquima) es de color verde claro y su epidermis de color crema. Bajo condiciones de la Costa Atlántica, el tallo ramifica a los 1,2 m y en condiciones de Urabá a 0.9 m. Las hojas son de color verde claro con ápices pubescentes verde oscuros y los peciolos con manchas rojizas en el extremo distal y proximal. Su cogollo es de color verde morado con pubescencia y sus raíces de color blanca a crema con corteza de color blanca o crema y pulpa crema, cuya forma es cónica cilíndrica con pedúnculo corto, son amargas por su alto contenido de cianuro en la pulpa. Esta variedad presenta resistencia

moderada a los insectos trips, el barrenador de la yuca (Chilomima) y el ácaro verde del cogollo. A la enfermedad conocida como chamusquina, quemazón, seca o bacteriósis, presenta susceptibilidad moderada, por lo que se recomienda para ambientes secos de la región Caribe. (CORPOICA/CIAT, 2005). En la figura 1, se muestra la morfología de la planta y sus raices.

Figura 1.Variedad CORPOICA – TAI. A: Planta; B: Raíz.

3.4 VARIEDAD MCOL 2215 (VENEZOLANA).

3.4.1 Origen de la Variedad: la variedad Venezolana es nativa de la Costa Norte de Colombia y en el banco de germoplasma del CIAT es conocida como MCOL 2215. El nombre de Venezolana se debe a que antiguamente había transhumancia de campesinos entre Colombia y Venezuela, los campesinos colombianos trajeron semillas de Venezuela las cuales otros las habían llevado desde Colombia (CIAT-ICA, 1991).

3.4.2 Características morfológicas: esta variedad es de porte medio a alto, alcanzando una altura promedio de 2 m, con tallo de color café. Bajo condiciones de la Costa Atlántica, es de poca ramificación, haciéndolo a la altura de 1 m. Los peciolos son de color verde y su cogollo es de color morado con pubescencia intermedia y lóbulo central de forma lanceolada. Sus raíces son de forma cilíndrica de color oscuro con pedúnculo intermedio, corteza de color rosada y pulpa blanca. Son dulces por su bajo contenido de cianuro en la pulpa, por lo cual su principal uso es el consumo humano en fresco. Esta

variedad es susceptible a la bacteriósis, pudrición seca de raíz y tallo, al barrenador de la yuca (Chilomima) y al superalargamiento. Presenta resistencia intermedia a los insectos trips, y es susceptible a los ácaros (CIAT-ICA, 1991).

3.4.3 Rendimiento y calidad de las raíces: la variedad Venezolana se puede asociar con otros cultivos (ñame, maíz, fríjol, etc.). En evaluaciones realizadas en fincas de agricultores se obtuvo que bajo diferentes sistemas de cultivo y en cosechas de siete a ocho meses presentó un rendimiento de hasta 16 ton/ha. Esta variedad presenta un bajo contenido de ácido cianhídrico, alto contenido de almidón (32%) y muy buena calidad culinaria (CIAT-ICA, 1991). En la figura 2, se muestra la morfología de la planta y sus raices.

Figura 2. Variedad MCOL 2215 (Venezolana). A: Planta; B: Raíz.

3.5 RENDIMIENTO DE RAÍCES FRESCAS (Ton/ha) Y CONTENIDO DE MATERIA SECA (%) DE LAS VARIEDADES VENEZOLANA Y MTAI.

Según los resultados de los ensayos regionales y para el caribe húmedo (Departamentos de Sucre y Córdoba, principalmente) en el periodo 2001-2002, los contenidos de materia seca (%) de las variedades MTAI y Venezolana fueron del 31,98% y 34,99% respectivamente, con un rendimiento de raíces frescas de 24,67 ton/ha para MTAI y 17,21 ton/ha para la variedad Venezolana (CIAT, 2002).

Estudios realizados por el CIAT en el departamento de Sucre desde 1996-2006, reportan que la MTAI presentó un rendimiento de 27 ton/ha y un contenido de materia seca de 32,22%, mientras que la variedad Venezolana presentó en promedio un rendimiento de 14 ton/ha y un contenido de materia seca de 34,9% (Ortega, 2006). En la tabla 3, se muestran los rendimientos y contenidos de materia seca de las variedades y clones que se cultivan en los departamentos de Sucre y Córdoba.

Tabla 3. Contenido de materia seca (%) y rendimiento por hectárea (Ton) de las variedades y clones élites que se siembran en Sucre y Córdoba.

RAN-KING	VARIEDAD	RAÍZ (Ton/ha)	RAN-KING	VARIEDAD	M. SECA (%)	RANKING COMBIANADO
1	SM2775-2	38.51	1	SM1438-2	37.16	SM2772-5
2	SM2772-5	30.83	2	NEGRITA	36.72	GINES
3	GINES	28.99	3	ROJITA	35.40	SM1411-5
4	SM1411-5	27.75	4	CARIBEÑA	35.07	VERÓNICA
5	VERÓNICA	27.21	5	VENEZOLANA	34.90	M TAI
6	M TAI	27.00	6	CAISELI	34.55	SM1438-2
7	SM1438-2	26.65	7	COSTEÑA	34.40	SM1511-6
8	COLOMBIANA	24.54	8	ORENSE	34.30	CAISELI
9	SM1511-6	24.46	9	SM1511-6	33.98	
10	CAISELI	24.03	10	VERÓNICA	33.83	
11	SUCREÑA	24.00	11	SM2772-5	33.73	
12	CARIBEÑA	22.93	12	SM1433-4	33.64	
13	SM1433-4	22.61	13	SM1411-5	33.59	
14	COSTEÑA	22.17	14	GINES	33.56	
15	P-12	21.50	15	P-12	32.71	
16	NEGRITA	20.35	16	M TAI	32.22	
17	ROJITA	19.62	17	SUCREÑA	31.78	
18	ORENSE	18.77	18	COLOMBIANA	31.00	
19	VENEZOLANA	14.00	19	SM2775-2	30.00	

Fuente: Ortega, 2007.

Este estudio incluye siembras y cosechas en diferentes épocas del año. Según estos resultados las variedades que aparecen en la última columna, serían los más indicados para un proyecto industrial.

La yuca es una fuente alimenticia básica y un producto con posibilidades de expansión en Colombia y muchas zonas tropicales; su adaptabilidad a las difíciles condiciones del suelo (acidez e infertilidad) y al clima le permiten ser un sustento seguro y un ingreso para familias de escasos recursos, asentadas en tierras marginales sin otra alternativa de producción agrícola. La yuca cumple esa función entre la gente pobre, no sólo del campo, si no también de las grandes ciudades (Gottret y Raymond, 2000).

3.6 PRODUCCIÓN DE YUCA INDUSTRIAL EN SUCRE

La producción de yuca industrial en el periodo 2007 fué de 3502 hectáreas, obteniéndose un total de 98800 toneladas. Los municipios con mayor área sembrada fueron San Marcos y Buena Vista (Ortega, 2007). En cuanto al predominio de las variedades de yuca sembrada, la MTAI 8 fue la más cultivada. En la tabla 4, se muestra la distribución del área sembrada de yuca para uso industrial por variedad y porcentaje en el departamento de Sucre, durante el periodo del 2006.

Tabla 4. Distribución del área sembrada en Sucre con yuca para uso industrial, por variedad y porcentaje año 2006.

RANKING	MATERIAL	HECTAREAS	%
1	MTAI 8g	978	50.75
2	SM 1433-4	300	15.57
3	P-12	232	12.04
4	VERÓNICA	120	6.23
5	NEGRITA	90	4.67
6	GINES	70	3.63
7	COSTEÑA	40	2.08
8	SUCREÑA	30	1.56
9	MVEN 25	20	1.04
10	COLOMBIANA	20	1.04
11	ROJITA	15	0.78
12	SM 1438-4	12	0.62
		1927	**100**

Fuente: Ortega, 2006.

El producto industrial más importante elaborado con base en la yuca es el almidón, que se usa en las industrias alimenticias, textil y en la fabricación de

papeles y adhesivos, aunque también tiene un potencial en la producción de dextrosa y múltiples derivados, sin contar con su potencial para producir alcohol, como se ha hecho en Brasil para sustituir el petróleo (CCI, 1999).

3.7 El ALMIDÓN.

El almidón es el principal carbohidrato de reserva de todas las plantas superiores, en algunos casos esto explica su alto contenido como el 70% del material vegetal seco o deshidratado. Esto ocurre en la forma de gránulos insolubles en agua. El tamaño y la forma de los gránulos son a menudo característicos de las especies de plantas de las cuales ellos son extraídos (Prasanna, 2005).

Los gránulos de almidón están organizados en regiones amorfas y cristalinas. En el almidón de tubérculos y raíces, las regiones cristalinas están compuestas solamente de amilopéctina, mientras la amilosa está presente en regiones amorfas. Mientras la amilopéctina es soluble en agua, la amilosa y el gránulo de almidón mismo son insolubles en agua fría. Cuando el almidón se calienta en agua, los gránulos del almidón primero se hinchan alcanzando un punto de hinchazón irreversible. Este proceso es llamado gelatinización. Durante este proceso la amilosa sale del gránulo y causa incremento en la viscosidad. De nuevo con un incremento en la temperatura se alcanza el máximo de hinchazón de los gránulos y se incrementa la viscosidad. Finalmente los gránulos se rompen dando una completa suspensión viscosa coloidal. El subsecuente enfriamiento de la concentrada suspensión coloidal da como resultado la formación de un gel elástico. Durante la retrogradación la sustancia cambia de un estado disuelto a un estado asociado. La retrogradación es causada primeramente por la amilosa. La amilopéctina debido a su alta organización ramificada, es menos propensa a la retrogradación (Dijkhuizen, *et, al.,* 2002). El proceso de retrogradación es irreversible, calentando el gel no hay disolución de nuevo. Dependiendo de las propiedades, la solubilización completa del almidón está entre 70°C y 105°C (Dijkhuizen, *et al.,* 2004).

La producción mundial total de almidón, está estimada entre 25 a 45 millones de toneladas por año. Después de los azucares más simples (sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa), el principal carbohidrato que los vegetales superiores sintetizan a partir de la fotosíntesis es el almidón (Daiuto, *et al.,* 2001).

Los diferentes almidones presentan propiedades diferentes y son utilizados en la industria de alimentos con diferentes propósitos, tales como nutricional, tecnológico, funcional, sensorial y estético. El almidón es la materia prima más barata y abundante, principalmente en la alimentación humana, siendo constituido por una mezcla de dos polisacáridos; amilosa y amilopéctina, en proporciones que varían de acuerdo a la especie vegetal fuente del almidón. (Ribeiro y Seravalli, 2004).

3.7.1 Estructura y composición del almidón: el almidón es un polímero de glucosa**.** Un polímero es una molécula muy larga construida por simples unidades repetidas (unidades de monómeros). Cada polímero individual es construido por unidades llamadas monómeros. La unidad de monómero del almidón es la glucosa, de esta manera el almidón es un polímero de glucosa (Kohl, 2003).

El almidón está compuesto de α-glucanos amilosa, el cual tiene enlaces α-1-4 y es lineal y amilopectina, la cual tiene un esqueleto de enlaces glicosídicos α-1-4 y cadenas unidas por α-1-6, está abundantemente presente en las semillas, tubérculos y raíces de plantas similares al arroz, maíz, trigo, papa y yuca (Dijkhuizen, *et al.,* 2004). También está presente en varios residuos de procesamiento de alimentos (Doelle, *et al.,* 1999). En la tabla 5 se puede observar algunas propiedades de la amilosa y la amilopéctina.

Tabla 5. Propiedades de la amilosa y amilopéctina

Polisacárido	Amilosa	Amilopéctina
Peso molecular (Da)	50000 - 200000	100000 a varios millones
Enlaces glicosídicos	α-1,4	α-1,4; α-1,6
Susceptibilidad a la retrogradación	Alta	Baja
Productos de la acción de β-amilasa	Maltosa	Maltosa y β-dextrinas
Productos de la acción de amiloglucosidasa	D-glucosa	D-glucosa
Estructura molecular	Lineal	Ramificada

Fuente: Fennema, 2000.

3.7.1.1 Amilosa: la amilosa es un polímero lineal constituído por debajo de 6000 unidades de glucosa, unidas por enlaces glicosídicos α- 1,4. El número de residuos de glucosa es indicado con el término DP (grado de polimerización), el cual varía con el origen. La amilosa de papa por ejemplo, o de almidón de yuca tiene un DP de 1000 a 6000, mientras la amilosa de almidón de maíz tiene un DP que varía de 200 a 1200. La proporción de amilosa presente en el almidón puede variar entre 0 – 75%, pero un típico valor es de 20 – 25%. (Ball, *et al.,* 1998). En la figura 3, puede apreciarse la estructura de la amilosa.

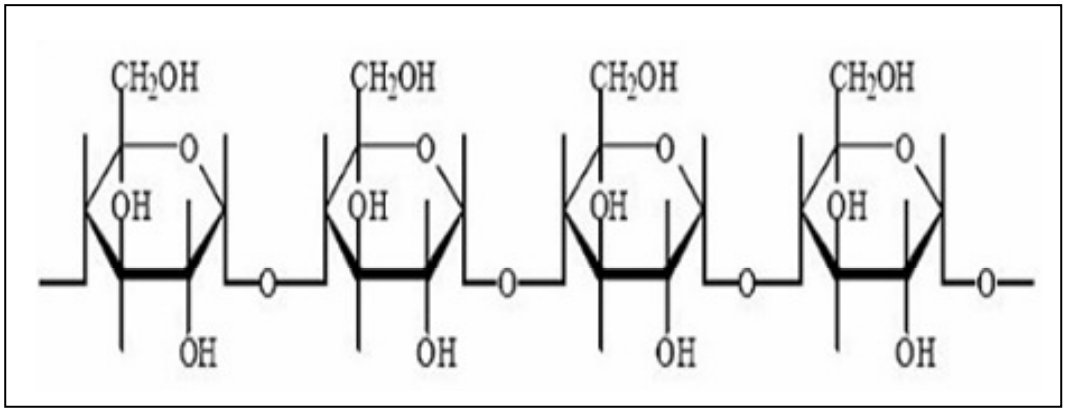


Fig 3. Estructura de la amilosa

Fuente**:** Matuda, 2004.

3.7.1.2 Amilopectina: la amilopectina puede estar contenida entre el 75% y 85% de la mayoría de los almidones. Su peso molecular en exceso es de 10^7 - 10^8 Da y tiene una estructura ramificada compuesta de cadenas de alrededor de 20 a 25 residuos de glucosa unidos por enlaces α-1-4. La amilopectina, la

cual es ramificada por enlaces α-1-6, puede contener de 4% a 5% de enlaces α-1-6 D- glicosídicos. En solución acuosa las amilopectinas son relativamente estables debido a las moléculas ramificadas y no es posible formar agregados compactos. No hay una relación aparente entre el número límite de viscosidad y el grado de polimerización (Prasanna, 2005).

La molécula completa de amilopéctina contiene una proporción de 2 millones de unidades de glucosa, así existe la molécula en forma natural. El modelo mayormente aceptado de la estructura de la amilopéctina es el modelo de racimo. En el cual las cadenas están ordenadas en racimos sobre la cadena principal (Ball, *et al.,* 2000). La estructura de la amilopéctina puede observarse en la figura 4.

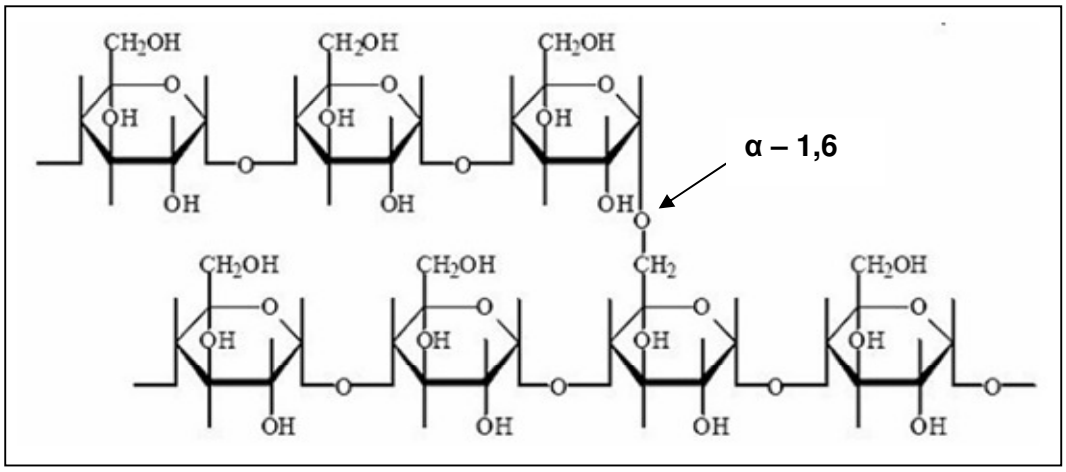


Fig 4. Estructura de la amilopéctina.
Fuente: Matuda, 2004.

3.8 HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN

La hidrólisis del almidón puede ser llevada acabo usando ácidos o enzimas como catalizadores. La hidrólisis enzimática tiene varias ventajas:

- Es más específica, por lo tanto muy pocos productos se forman y hay un rendimiento más alto. Las condiciones para la hidrólisis enzimática son más leves, por lo tanto los estados de refinamiento para remover el desecho y el color es mínimo.

- La hidrólisis enzimática de almidón ha sido practicada a escala por mucho años y está remplazando gradualmente el proceso tradicional de hidrólisis ácida (Prasanna, 2005).

La conversión enzimática de todo el almidón incluye gelatinización, lo cual involucra la disociación de los gránulos de almidón formando una suspensión viscosa, licuefacción lo cual involucra una hidrólisis parcial y una menor viscosidad y sacarificación, involucrando la producción de glucosa y maltosa. La gelatinización se logra por calentamiento del almidón en agua, el cual sólo es soluble a altas temperaturas, lo cual depende del origen del almidón (Rakshit, 1998).

En la industria del alcohol combustible esta hidrólisis es llevada acabo por dos enzimas diferentes, la endo-enzima α –amilasa y la exo-enzima glucoamilasa. Las α–amilasas atacan al azar los enlaces α -1,4 glucosídicos produciendo pequeñas moléculas de longitud variable llamadas dextrinas. Las α-amilasas no son capaces de hidrolizar las uniones α-1,6 y las gluco-amilasas aunque capaz de hidrolizar las uniones, no es muy eficiente en esta hidrólisis y rompen estas uniones muy lentamente. Esto generalmente no significa un problema por que la inmensa mayoría de los enlaces glucosídicos, son enlaces α-1,4 .Sin embargo ocasionalmente la adición de enzimas, como puede ser la adición de glucoamilasas que hidrolizan selectivamente los enlaces α-1,6 es un esfuerzo de hacer más rápido el proceso de fermentación (Kolh, 2003).

De los dos componentes del almidón, la amilopectina presenta gran resistencia a los sistemas hidrolíticos por enzima. Esto es debido a los residuos que involucran un enlace α-1,6-glicosídicos en el punto de ramificación el cual constituye cerca del 4-6% de la glucosa presente. La mayoría de las enzimas hidrolíticas son específicas para uniones α-1,4-glucosídicas. Sin embargo las uniones α-1,6-glucosídicas deben ser también clivadas para completar la hidrólisis de amilopectina a glucosa. Las enzimas comerciales usadas para la hidrólisis industrial del almidón son producidas por *Bacillus amylocuefaciens y Bacillus licheniformis.* Ellos difieren principalmente en su tolerancia a altas

temperaturas, la termamyl retiene más actividad por enzima de 110℃ en presencia del almidón que la α –amilasa de *Bacillus amylocuefaciens* (Chaplín, 2004). Las enzimas que hidrolizan el almidón comprenden el 30% de las enzimas mundiales (Dijkhuizen, *et al.,* 2002).

Los hidrolizados de almidón de equivalentes de dextrosa (E.D) inferior a 20 se denominan maltodextrinas, y se compone de una mezcla de sacáridos, oligosacáridos y polisacáridos con amplia distribución en pesos moleculares. Ya como productos terminados, se encuentran disponibles en polvo o soluciones concentradas. Productos con E.D mayores se conocen como jarabes (Díaz, *et al.,* 2002).

En el estudio cinético de la hidrólisis enzimática del almidón de papa, Castellanos y colaboradores (2004), obtuvieron una producción máxima de equivalentes de dextrosa de 86%, utilizando las enzimas BAN-AMG-Promozyme a una concentración de sustrato del 30% p/v. Benavides (1983) obtuvo valores de E.D del 95%, hidrolizando la harina de arroz, empleando concentraciones del 30% p/v. Caro (1986) alcanzó valores de E.D de 81% para la sacarificación del almidón de yuca a concentraciones del 30% p/v y Chica (1996) logró rendimientos de 85-90% hidrolizando almidón de papa a concentraciones de 24 – 40% p/v, todos ellos utilizando únicamente AMG. La Novo Nordisk presenta valores de E.D de 95 – 98 para la sacarificación del almidón de yuca.

3.9 LAS ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores orgánicos producidas por células vivas que gobiernan las reacciones químicas en los procesos vitales. Una vez elaborada por una célula una enzima podrá actuar independientemente en las condiciones apropiadas en que fueron mantenidas. Una de las principales características de las enzimas es su especificidad sobre el substrato. Las enzimas actúan sobre un número muy limitados de compuestos y no tienen efectos sobre otros (Aquaroni, *et al.,* 2001).

Las enzimas son muy largas, son un complejo de moléculas (proteínas) que actúan rápidamente, facilitando una reacción muy precisa químicamente. El índice en que una partícula enzimática causa una reacción o se produce es relativa a su actividad. La actividad específica de una enzima en un momento dado es altamente dependiente de un número de parámetros diferentes. Si las temperaturas son significativamente por encima de la optima, la matriz de la proteína puede irreversiblemente modificarse o si no desnaturalizarse y destruir la enzima con toda su actividad enzimática. Cuando el pH cambia más allá del valor máximo o mínimo, la desnaturalización química puede ocurrir. Esta desnaturalización química tiene el mismo efecto como la desnaturalización esperada por el alto calor causando la destrucción de la enzima y pérdida de toda su actividad. Las enzimas generalmente tienen un significado costo asociado con los grandes esfuerzos hechos por la industria de ajustar todos los parámetros relevantes para maximizar su efectividad, mientras minimizan costos (Kolh, 2003).

En biotecnología, las enzimas son de extrema importancia y la mayoría provienen de microorganismos. El mercado mundial de las enzimas es grande, siendo éstas producidas por microorganismos que fueron seleccionados en la naturaleza, y generalmente modificados genéticamente para una producción más eficiente y para actuar en procesos que pueden ser realizados a temperaturas más elevadas y en otras condiciones de estrés (Azevedo, *et al.,* 2001).

Unas 20 compañías de Europa, Japón y Estados Unidos realizan la producción de enzimas, pero el mercado es dominado por tres de ellas: Novo Nordisk (Dinamarca) con el 50% de las ventas a nivel mundial, seguida por Gist Brocades (Holanda) y Rhom and Haas (Alemania). En América Latina exísten empresas productoras de enzimas en México, Brasil, Argentina y Uruguay, muchas de las cuales son subsidiarias de empresas transnacionales, como es el caso de Pfizer en México y Brasil y Novo Nordisk en Brasil. En Colombia no hay producción de enzimas a escala industrial, siendo importadas de diversos países de Europa, también de Japón, Estados Unidos, Canadá y México. La

importación de enzimas en Colombia se hace en su mayor parte a través de representantes o casas comerciales, pero algunas industrias de cervecería, molinería y lácteos hacen importación directa de las enzimas que requieren (Artime, 2005).

3.9.1 Las amilasas: las amilasas son una clase de enzimas capaces de digerir los enlaces glicosídicos del almidón, estas pueden ser derivadas de muchos orígenes. Las amilasas están presentes en todos los organismos vivos, pero varían en actividad, específicamente según los requerimientos de especie a especie, y aún de tejido a tejido en algunos organismos (Starch Hydrolysis, 2000).

Las endoamilasas son capaces de cortar los enlaces α- 1,4 glicosídicos presentes en la parte interna de las cadenas de amilosa o amilopéctina. Esta es encontrada en una variedad de microorganismos pertenecientes a las archaea tal como las bácterias (Mohan, *et al.,* 2000).

Los productos finales de la acción de la α-amilasa son oligosacáridos con una larga variación, con una configuración alfa y limite de dextrinas la cual constituye la cadena de oligosacáridos. Las exoamilasas cortan exclusivamente enlaces α-1,4 glicosídicos, tales como las β-amilasas (EC 3.2.1.2) o cortan ambos tipos de enlaces α-1,4 y α-1,6 glicosídicos como la amiloglucosidasa o glucoamilasa (EC 3.2.1.3) y α-glucosidasa (EC 3.2.1.20). Las exoamilasas actúan sobre los residuos externos de glucosas de la amilosa o amilopéctina produciendo así solamente glucosa (glucoamilasa y α - glucosidasa**)** (Dijkhuizen*, et al.,* 2002).

Las enzimas α-amilasas y amiloglucosidasas parcialmente purificadas exiben máxima actividad a bajos pH entre 4.5-6.0, presentando gran estabilidad sobre condiciones ácidas (pH 4.0-7.0). Una máxima actividad ocurre a temperaturas entre 50-60℃, presentando estabilidad por más de 10 horas a 55℃ (Lima, *et, al.,* 1999). En la figura 5, puede observarse los sitios específicos de corte de algunas enzimas degradadoras del almidón.

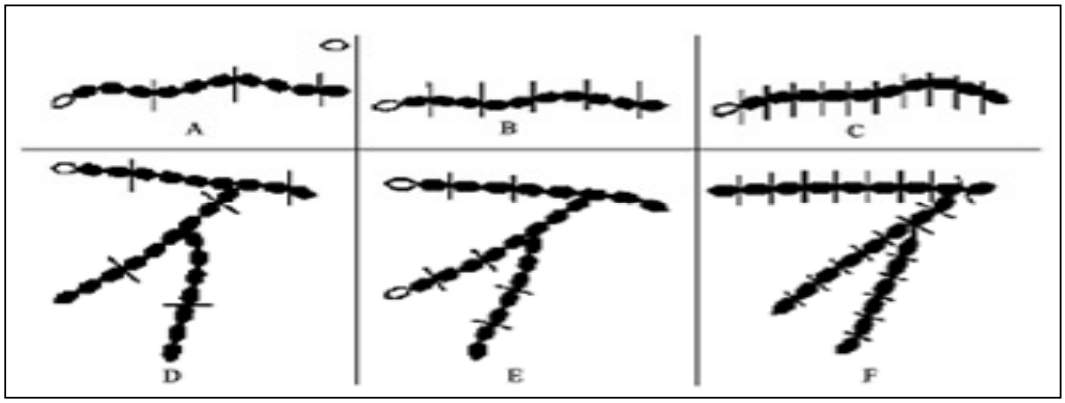


Figura 5. Enzimas degradadoras del almidón.

Terminal no reductor Unidades de glucosa

_____ Punto de ataque en los enlaces por la amilasa

A. Degradación de amilosa por α-amilasa con formación de dextrinas.
B. Degradación de amilosa por β-amilasa con formación de maltosa.
C. Hidrólisis de amilosa por glucoamilasa con formación de glucosa.
D. Degradación de amilopéctina por α-amilasa con formación de dextrinas.
E. Degradación de amilopéctina por β-amilasa con formación de maltosa.
F. Degradación de amilopéctina por glucoamilasa con formación de glucosa.

Fuente: Vitti, 2001.

3.9.1.1 Las 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 una α-amilasa sobre la fracción de amilosa de almidón, procede en dos etapas. Inicialmente, tiene una rápida degradación de la amilosa para dar maltosa y maltotriosa. En la segunda fase, más lenta ocurre hidrólisis de los oligosacáridos, formando glucosa y maltosa como productos finales. La acción sobre la amilopéctina produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas límites y oligosacáridos de cuatro o más residuos de glucosa, todos con enlaces

glicosídicos α-1,6. Diferentes enzimas producen diferentes dextrinas. El peso molecular de las α-amilasas está alrededor de 50000 Daltons, cada molécula contiene un ión Ca++, que se encuentra fuertemente unido a la enzima y que sólo puede ser removido a pH bajo por el uso de agentes quelantes. La completa remoción del Ca++ conlleva a la pérdida total de la actividad. El Ca++ no participa directamente en la formación del complejo enzima sustrato pero mantiene la molécula de enzima en la configuración óptima para máxima actividad y estabilidad (Artime, 2005).

Las enzimas termoestables, las cuales han sido aisladas de muchos organismos termófilos han encontrado un número de aplicaciones comerciales por su habilidad inherente a la termoestabilidad (Cassidy, *et al.,* 2001). Las ventajas en esta área han sido posibles con el aislamiento de un largo número de microorganismos termófilos benéficos de diferentes zonas ecológicas y la subsecuente extracción de sus enzimas (Chaudhary, *et al.,* 2001).

Dos tipos distintos de α- amilasas termoestables son viables comercialmente y usadas extensivamente en la tecnología del procesamiento de almidón.
La amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, fue la primera α- amilasa licuefante utilizada a gran escala. Mas tarde una enzima más estable al calor de *Bacillus licheniformis* fue introducida comercialmente (Prasanna, 2005).

3.9.1.2 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, varia de acuerdo con la fuente fúngica de 48000 a 90000 Daltons (Akbarzadeh, *et al.,* 2006).

3.9.1.3 Aplicaciones de las amilasas: las amilasas tienen gran importancia en biotecnología, presentando un amplio campo de aplicaciones. Las enzimas amilolíticas son utilizadas en la industria de panificación, para dar a estos productos un volumen mayor. En la producción de glucosa y fructosa, las amilasas son usadas para hidrolizar las moléculas de almidón. En al industria del papel, se utilizan las amilasas para proteger el papel contra daños mecánicos y su acabado final. Las amilasas también son utilizadas en alimentos para bebe y adicionadas a los cereales para bajar su viscosidad, y en la fábrica de cerveza para producir cerveza clara (Akbarzadeh, *et al.,* 2006).

3.9.2 Las pectinasas: las pectinasas son enzimas que actúan sobre sustancias pécticas, las cuales son estructuralmente polisacáridos presentes en la laminilla media y la pared celular primaria de plantas superiores (Chitradon, *et al.,* 2007).

Las pectinasas son ampliamente usadas en el procesamiento de jugos de frutas (extracción y clarificación), extracción de aceites vegetales, procesamiento de bebidas alcohólicas y una variedad de aplicaciones, en la industria de alimentos (Dörnenburg y Lang, 2000; Beg*, et al.,* 2002; Dayanand y Patil, 2006).

Cuando se agregan pectinasas, la viscosidad disminuye y las partículas pueden eliminarse fácilmente, centrifugando el líquido o filtrándolo. Este mecanismo produce un líquido con una presentación más atractiva para el consumidor. En los extractos comerciales de pectinasas usados para la fabricación de jugos de frutas coexisten tres enzimas: la pectinliasa, la poligalacturonasa y la pectinesterasa. Estas enzimas en combinación hidrolizan a la pectina, que es un polisacárido constituido principalmente de ácido galacturónico que se encuentra parcialmente metoxilado. De tal manera que las

pectinliasas actúan sobre la pectina; las pectinesterasas eliminan los grupos metoxilo y la poligalacturonasa actúa sobre la pectina una vez que ésta ha sido desmetilada (Magaña y Montes, 2002).

El uso de enzimas complementarias como pectinasas en el proceso de hidrólisis de harina de yuca es una alternativa para aumentar el rendimiento del proceso para que pueda tornarse económicamente viable en la obtención de etanol (Cereda y Magali, 2004).

Muchas enzimas utilizadas de diferentes maneras son producidas por hongos. Entre ellos tenemos β-glucanasas, celulasas, catalasas, glucosaoxidasas, lactasas, lipasas, pectinasas, reninas y ligninasas (Azevedo, *et al.,* 2001).
La pectinex® Ultra SP-L es un producto enzimático pectolítico altamente activo, producido por una cepa seleccionada de *Aspergillus aculeatus*. El producto enzimático contiene actividad pectolítica y diversas actividades hemicelulíticas y es capaz de degradar las paredes celulares de las plantas (Novo, 2002).

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

Existen básicamente tres tipos de pectinasas : pectin esterasa, (desesterificante o desmetoxilante, remueve los grupos metil éster; las despolimerizantes (incluye las enzimas hidrolíticas y las liasas) y las protopectinasas (Pastore y Uenojo, 2007).

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

3.9.2.2 Pectinasas despolimerizantes

- **Hidrolasas:** estas incluyen las polimetilgalacturonasas (PMG), que hidrolizan polimetil galacturonatos a oligometilgalacturonatos por corte de los

enlaces α-1,4 pudiendo ser exo o endo-PMG y las poligalacturonasas (PG), que hidrolizan enlaces α-1,4 glicosídicos entre dos residuos de ácido galacturónico. Esta es la mejor enzima con función hidrolítica, pudiendo presentar acción endo (hidrolasas internas) u exo (hidrolasas secuenciales).

- **Liasas:** también llamadas transamilanasas, rompen enlaces glicosídicos resultando en galacturonatos, y pueden ser pectina liasas, la cual cataliza la eliminación β entre dos residuos de acido galacturónico mas o menos esterificados, o péctato liasa que rompen enlaces α-1,4 de ácido péctico de modo endo o exo por transaminacion.

3.9.2.3 Protopectinasas: estas enzimas solubilizan protopectina, formando pectina soluble altamente polimerizada. Con base a sus aplicaciones son de dos tipos:

- **Protopéctinasa tipo A**, que rompe sitios internos de ácido poligalacturónico.

- **Protopéctinasa tipo B**, que rompe sitios externos de las cadenas de polisacáridos que pueden estar conectadas a cadenas de ácidos poligalacturónicos constituyente de las paredes celulares (Pastore y Uenojo, 2007).

3.10 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Los procesos fermentativos que conducen a productos de utilidad cotidiana, resultan de gran importancia para la humanidad debido a su amplio uso, ya sea de forma directa como medicamentos o alimentos, o de forma indirecta como materiales para la industria farmacéutica, alimenticia o química. La creciente lista de nuevos productos comerciales derivados de la fermentación y el incremento de la demanda para su utilización, han intensificado la búsqueda de nuevos conocimientos sobre la tecnología de estos bioprocesos. El proceso fermentativo es uno de los primeros aporte de la humanidad para la obtención de productos biotecnológicos y se desarrolló empíricamente en el antiguo

Egipto según testimonios que datan del año 2000 A.C. A pesar de su uso milenario, no ha perdido perspectiva por cuanto constituye aun un modo de producción de vital interés. La fermentación es un proceso mediante el cual la levadura convierte azúcares en alcohol, CO_2 y otros metabolitos secundarios, regido químicamente por la ecuación establecida por el químico francés Joseph-Louis Gay Lussac en 1815 (Fajardo, *et al.,* 2000).

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2CH_3CH_2OH.$$

En algunos casos, la fermentación es realizada aprovechando la flora microbial normal presente en los alimentos; en otros, son adicionados cultivos de microorganismos específicos, llamados cultivos iniciadores (Caplice y Fitzgerald, 2000).

Las levaduras son microorganismos eucariotes que cuando se encuentran en un medio rico en azucares, proliferan y producen grandes cantidades de alcohol y CO_2. 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 gliceraldehido 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 CO_2 (Madigan, *et al.,* 1997).

3.11 *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un

periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Covarrubias, *et al.,* 2004).

El microorganismo más utilizado para la obtención de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando dos moles del compuesto portador de energía en los seres vivos, el adenosín trifosfato (ATP), por cada mol de hexosa consumida (Claassen, *et al.,* 1999), además de dos moles de etanol. Cualquier proceso microbiano debe ser monitoreado para asegurar que se está realizando adecuadamente. En la mayoría de los casos es necesario no sólamente medir el crecimiento de la levadura y formación de producto, si no también controlar otros factores como pH, temperatura, concentración de biomasa y producto (Barboza, *et al.,* 2001).

3.12 ETANOL

El Etanol conocido también como Alcohol Etílico, es un líquido incoloro de fórmula CH_3CH_2OH (también expresado como C_2H_5OH), inflamable, de olor y sabor agradable, miscible en agua en todas las proporciones y con la mayoría de disolventes orgánicos; su punto de ebullición es de 78,1℃. Es un componente fundamental de las bebidas alcohólicas, se utiliza también como disolvente, limpiador, combustible, en la fabricación de acetaldehído, perfumes,

pinturas, barnices y explosivos y como intermedio en síntesis orgánicas de diversos compuestos (ácido acético, éter, butadieno, etc.) (Chávez, 2003).

El etanol funde a una temperatura de -114,1℃ y posee una densidad de 0,789 g/ml a 20℃. Gracias a su bajo punto de fusión el etanol es un fluido muy utilizado en termómetros, para medir temperaturas inferiores a - 40℃ y como anticongelante en radiadores de automóviles. Como la molécula de etanol contiene oxígeno permite una combustión más completa en los motores, lo que resulta en una disminución de monóxido de carbono. Por otro lado como es obtenido a partir de plantas que aprovechan la energía del sol es considerado como una fuente de energía renovable (Duarte, 2000).

3.12.1 Orígenes de los biocombustibles: la utilización de los biocarburantes no es ninguna novedad. Hace más de un siglo que Rudolf Diésel diseñó el motor que lleva su nombre, y lo hizo pensando en el aceite de cacahuate como combustible. Con este aceite realizó las pruebas de su prototipo. Sin embargo, el petróleo era más barato y estaba disponible, de modo que la utilización de los aceites vegetales para los que fué pensado quedó en el olvido hasta nuestros días. Algo similar ocurrió con el primer diseño de Henry Ford; su primer automóvil, el Model T (1908), tenía previsto utilizar etanol como combustible. Prueba de ello es que entre 1920 y 1924 la Standard Oil Company comercializó un 25% de etanol en la gasolina vendida en el área de Baltimore. La suerte corrida por este biocarburante fué la misma a la del aceite de cacahuate de Rudolf Diésel; subió el precio del maíz, lo que unido a las dificultades de almacenamiento dieron al traste con la iniciativa. Poco después de este fracaso, el gurú de la automoción, junto a diversos expertos intentaron reflotar el etanol y construyeron una planta de fermentación en Atchinson (kansas), con capacidad para producir 38000 litros diarios. Esta funcionó durante la década de los 30 y más de 2000 gasolineras del medio oeste sirvieron durante este período un etanol elaborado a partir de maíz que recibía el nombre de “Gasol”. Hasta que la feroz competencia del petróleo terminó por acabar con la segunda tentativa de Ford. En 1973 se produjo una fuerte crisis petrolífera motivada por la cuarta guerra árabe-israelí. En muy poco tiempo se

dobló el precio de la gasolina, que había permanecido estable durante cinco años. Poco después, en 1979, y como respuesta a la primera crisis, comenzó a comercializarse en EE.UU, la mezcla de gasolina y bioetanol. Fué precisamente la American Oil Company, junto con otras empresas punteras, la que empezó a vender esta gasolina diluida. Sin embargo quien mejor aprendió la lección fué Brasil, que en 1975 inició el proyecto Proalcohol, cuyo objetivo comenzó siendo la sustitución total de los combustibles fósiles por el etanol de caña de azúcar (Rico, 2006).

3.12.2 Obtención de etanol: se obtiene sintéticamente a partir del etileno por hidratación catalíca por una reacción de adición de acido sulfúrico e hidrólisis posterior. Se produce etanol también por fermentación de productos naturales ricos en hidratos de carbono tales como caña de azúcar, papa, yuca, maíz, sorgo, arroz, trigo, banano, centeno, otros cereales y productos con alto contenido de almidón. Los cultivos microbianos tales como las levaduras, operando en ausencia de O_2 (anaeróbica), convierten los carbohidratos en una mezcla etanol y CO_2 (Chávez, 2003).

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Levaduras}} 2C_2H_5OH + 2CO_2\,(g)$$

González y Molina (2006), estudiaron la hidrólisis enzimática y la fermentación de la papa (*Solanum tuberosum*), a fin de determinar las mejores condiciones para producir alcohol, quienes en el seguimiento del proceso de fermentación alcanzaron una concentración máxima de alcohol de 10,33% v/v. El rendimiento de etanol del proceso fue de 94,5 litros de etanol/tonelada de papa, utilizando una concentración de 20% p/v de sustrato. León, *et al.*, (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 y a una concentración de almidón del 18 % p/v, mediante hidrólisis química con HCl 0,1 N y fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae.* Bringhenti y Cabello (2005), obtuvieron una concentración de etanol del 9,76% v/v a partir de residuos del proceso de obtención de harina y almidón de yuca usando una

concentración del 18% p/v y enriquecido con un 12% de melaza residual del proceso de producción de sacarosa de caña de azúcar. Bringhenti, *et al.,* (2006), en el estudio de la fermentación alcohólica de sustrato amiláceo hidrolizado enriquecido con melaza de caña, obtuvieron concentraciones de etanol del 1,6% v/v; 2% v/v; 2,4% v/v; 3,6% v/v y 4% v/v a partir de un hidrolizado de almidón residual de harina de yuca del 10% p/v, enriquecido con concentraciones de melaza de caña del 5; 10; 15 y 20% v/v respectivamente, en un volumen de reacción de 500 ml, usando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. 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.* Grisales, *et al.,* (2001). En el diseño de un proceso de producción de etanol anhidro a partir de jugo de caña, obtuvieron una concentración de 6 - 8% v/v de etanol. El jugo de caña contenía una composición de 14% de sólidos solubles (14 grados brix) y en la fermentación el microorganismo utilizado fue *Saccharomyces cerevisiae.* López, (1998). En el estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa, utilizando cuatro sustratos a partir de banano maduro, obtuvo un rendimiento de etanol de 73,16 litros/ton de banano maduro. Vong, (1996). En el estudio de la producción de etanol mediante la fermentación de tres sustratos diferentes obtenidos a partir del banano, obtuvo un rendimiento de 71,3 litros/ton de banano verde.

3.12.3 Ventajas del etanol como carburante: desde el origen de los motores de combustión interna, la utilización de alcoholes como carburante ha sido un tema de investigación que nunca se ha abandonado y que actualmente cobra interés por la capacidad de los alcoholes de contribuir a reducir los problemas medioambientales de contaminación local o regional y el efecto invernadero (Villena, 2003). El uso del etanol como oxigenante representa varias ventajas:

- ✓ Mayor contenido de oxígeno (menor cantidad de aditivo requerido).
- ✓ Mayor octanaje, no es tóxico, reduce más las emisiones de CO y no contamina las fuentes de agua (Kwong y Thomas, 2001).

Actualmente hay varios países que avanzan aceleradamente en el desarrollo e implementación de sus programas nacionales de uso del etanol con fines carburantes, entre los que están los siguientes según la fuente de origen del alcohol utilizado: América Central (Caña de Azúcar), Australia (Caña de Azúcar), Brasil (Caña de Azúcar), Canadá (Granos), Colombia (Caña de Azúcar y Yuca), China (Granos y Caña de Azúcar), EUA (Granos, Remolacha Azucarera), India (Caña de Azúcar), Japón (Importará el producto), Perú (Caña de Azúcar), Sudáfrica (Caña de Azúcar), Tailandia (Caña de Azúcar y Yuca), Unión Europea (Remolacha Azucarera y Granos) (Maloney, 2003).

En Colombia, de acuerdo con la ley 693 de septiembre 19 de 2001 sobre alcoholes carburantes a partir de septiembre de 2005, será obligatoria la mezcla en un 10 por ciento de este carburante con los combustibles de origen fósil. Esto con el fin de reducir las emisiones contaminantes de medio ambiente y causantes del efecto invernadero (Diario Oficial del Estado, 2001).

El gobierno, a través del Ministerio de Minas, decidió que la norma por lo pronto sólo entrará en vigencia en Bogotá, Cali, Medellín y sus áreas metropolitanas, así como la zona centro occidental (Pereira, Buga, Mariquita y Manizales). Barranquilla, Cartagena y Bucaramanga entrarán en septiembre de 2006. Para cumplir con este requerimiento de ley, se necesitaría incrementar la superficie sembrada con caña de azúcar en 150000 hectáreas, lo que se sumaría a las 200000 hectáreas ya existentes. Además, en Colombia hay 230000 hectáreas sembradas con caña para la elaboración de panela. A finales de diciembre de 2005, en Colombia se consumían 335 barriles diarios de alcohol carburante. Para finales del 2006, se espera alcanzar, 4520 barriles diarios de alcohol. Las fuentes para el bioetanol serán caña de azúcar, maíz, yuca, sorgo o biomasa (celulosa). En la tabla 6, se muestra la oferta de etanol en Colombia para el año 2006 (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

Tabla 6. Oferta de etanol en Colombia.

DESTILERÍA	CAPACIDAD (L/dia)	Fecha de entrada
Incauca	300000	Octubre 2005
Ingenio Provincia S.A	250000	Octubre 2005
Manuelita*	200000	Marzo 2006
Mayagüez	150000	Febrero 2006
Ingenio Risaralda	75000 – 100000	Febrero 2006

Fuente: Ministerio de Minas y Energía. Colombia. 2006.

*Ampliará la producción a 300000 litros por día.

Para satisfacer las nuevas demandas, se ha planificado la construcción de 9 nuevas plantas de etanol. Las principales se registran en la tabla 7.

Tabla 7. Futuras plantas de etanol en Colombia.

DESTILERÍA	CAPACIDAD (L/dia)	Materia prima	Fecha de entrada
Petrotesting S.A	30000	Yuca	Diciembre 2006
Alcohol S.A	100000 - 300000	Caña	2008
Maquiñagro	300000	Remolacha	2008
Ingenio Sicarare	100000	Yuca	2008

Fuente: Ministerio de Minas y Energía. Colombia. 2006.

Se calcula que las necesidades diarias del país para poder cumplir con los porcentajes que por ley se determinó en cuanto a consumo de biocombustible mezclado con la gasolina se aproxima a los 2'500000 litros diarios. En estos momentos, de este biocombustible con las plantas generadoras del Valle del Cauca es de 1'300000 litros. La Costa Atlántica aún no tiene producción y por ello se debe montar rápidamente la planta en Sucre para abarcar la demanda de la región que se calcula en unos 100000 litros diarios de alcohol carburante. Las plantas para que sean rentables se pueden montar con producciones calculadas en 25000 litros diarios. Para Sucre se contempla una generadora de 100000 – 300000 litros de alcohol carburante al día (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006).

El impulso que se le dio al alcohol carburante en Colombia como combustible está sustentado en tres aspectos básicos: oxigenación de la gasolina motor, sustitución de combustibles de origen fósil y reactivación de la agricultura. Se ha establecido que el uso del 10% de etanol con gasolina permite disminuir en 27% las emisiones de monóxido de carbono en carros nuevos, 45% en carros típicos colombianos de 7-8 años de uso y 20% de hidrocarburos no quemados a la atmósfera, con las positivas consecuencias para la salud humana y ambiental (FEDEPALMA, 2005).

De igual manera, es importante para solventar las deficiencias de hidrocarburos, que paulatinamente evidencian síntomas de desabastecimiento de petróleo, lo que pone al país en expectativas de convertirse en importador del bien. Asímismo, por la posibilidad de aumentar el empleo rural, especialmente en aquellas regiones deprimidas de Colombia (Mojica y Paredes, 2004).

Brasil es el país que más ha experimentado con la mezcla de alcohol y gasolina, aumentando su proporción hasta un valor del 25%, como se ve en la siguiente progresión:

- 1977, 4.5%
- 1979, 15%
- 1981, 20%
- 1985, 22%
- 1998, 25%
- Desde el año 2002 entre el 20 y el 25%.

Otros países que utilizan estas mezclas son Nicaragua, EEUU, Colombia, Argentina, Australia e India (García y García, 2006).

3.12.4 Producción mundial de alcohol carburante: según datos de F.O. Licht, la producción mundial de etanol en 2004 fue cerca de 41000 millones de litros (Renewable Fuels Association, 2005). En promedio el 37% del etanol producido mundialmente corresponde al alcohol carburante, el 17% a alcohol

para bebidas y el 10% es alcohol industrial. Brasil y EE.UU contabilizan el 73% de la producción mundial (12600 y 10666 millones de litros en 2003, respectivamente), aunque este porcentaje está cambiando constantemente debido a la dinámica del mercado mundial de este biocombustible (Cardona y Sánchez, 2005). En la tabla 8 se puede observar la producción mundial de etanol en los años 2004 y 2006.

Tabla 8. Producción mundial de alcohol etílico año 2004 y 2006.

Periodo 2004		**Periodo 2006**	
País	**Millones de litros**	**País**	**Millones de litros**
Brasil	15098,37	EE.UU	20000,00
EE.UU	13379,98	Brasil	16455,69
China	3648,74	China	3797,46
India	1748.67	India	1898,73
Francia	828,91	Francia	8860,75
Otros	2161,01	Otros	7341,777
Total	40764,45	Total	50506,32

Fuente: Renewable Fuels Association, 2006.

4. DISEÑO METODOLOGÍCO

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

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

4.2 UNIVERSO Y LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto se desarrolló en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja, en la ciudad de Sincelejo – Sucre – Colombia, a los 9° 18' de latitud Norte y 75° 23' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich, a una altitud de 212 metros sobre el nivel del mar (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1998), con la harina de yuca (*Manihot esculenta*) de las variedades MCOL 2215 (Venezolana) y MTAI 8 recolectadas en el municipio de Corozal (Sucre).

4.3 VARIABLES

4.3.1 Variables independientes

- Concentración de harina: 10, 13 y 16 % p/v
- Variedades: MCOL 2215 (Venezolana) y MTAI 8

4.3.2 Variables dependientes

- Equivalentes de dextrosa
- Grados brix
- Rendimiento (Litros de etanol / Kilogramos de harina)

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se utilizó un diseño experimental Único factor Categórico Aleatorizado. 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 un nivel de confiabilidad del 95%.

4.5 PROCEDIMIENTO

4.5.1 Extracción de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8.

La obtención de la harina de la yuca de las variedades se realizó de acuerdo a los pasos de la figura 6, determinándose el rendimiento en cada variedad.

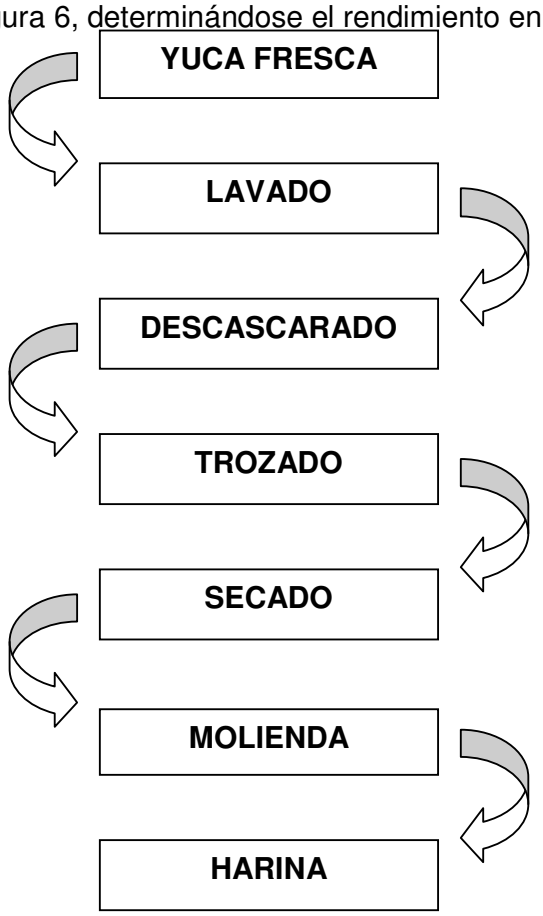


Figura 6. Obtención de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8.

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

Durante la hidrólisis se efectuaron mediciones de los grados brix mediante refractómetro ausJENA DDR 783243 (0-30%), al igual que de azucares reductores a través de la técnica del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (Miller,1959), determinándose los Equivalentes de Dextrosa (E.D), durante el tiempo de residencia de cada reacción, 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.

4.5.2.1 Montaje de los biorreactores para la hidrólisis: se utilizó un baño termostatado con control de temperatura (termostato de circulación tipo V15c). Los ensayos se montaron en beacker de 1000 ml adaptados como biorreactores con un volumen de reacción de 500 ml, cuyas concentraciones de las soluciones de harina de yuca fueron del 10%; 13% y 16% p/v, agregando previamente como cofactor enzimático 35 ml de solución de $CaCl_2$ a 70 ppm, con agitación constante de 250 rpm, realizando 4 ensayos por cada concentración de harina de yuca de las variedades MCOL 2215 (Venezolana) y MTAI 8.

4.5.2.2 Proceso de licuefacción: el proceso se llevó acabo empleando las enzimas Pectinex ultra SP-L y Termamyl® 120 Tipo L.

➢ **Pectinex Ultra SP-L:** se agregó la enzima pectinex® Ultra SP-L en volúmenes, como se muestra en la tabla 9 después de haber ajustado el pH a 4.5 y la temperatura a 35℃ (condiciones óptimas para la enzima), con agitación constante de 250 rpm. Seguidamente se efectuaron mediciones de los grados brix, al igual que de azucares reductores determinándose los Equivalentes de Dextrosa (E.D), cada 15 minutos, durante un tiempo de residencia de 1 hora.

Tabla 9. Dosis enzimática de pectinex® Ultra SP-L.

Parámetros	[M COL 2215] p/v			[M TAI 8] p/v		
	10%	13%	16%	10%	13%	16%
Dosis enzima (ml)	4.6	6.0	7.4	4.7	6.1	7.6

➢ **Termamyl® 120 L, Tipo L:** culminado el tiempo de actividad de la enzima pectinex® Ultra SP-L, se procedió a aumentar la temperatura hasta 90 ℃ y ajustar el pH a 6.5, usando para ello volúmenes de NaOH 1N. Seguidamente se adicionó la enzima Termamyl® 120 L, Tipo L, en volúmenes como lo muestra la tabla 10, para un tiempo de residencia de 2 horas, manteniendo agitación constante de 250 rpm.

Tabla 10. Dosis enzimática de Termamyl® 120 L, Tipo L.

Parámetros	[M COL 2215] p/v			[M TAI 8] p/v		
	10%	13%	16%	10%	13%	16%
Dosis enzima (µl)	33	42.9	52.8	33.6	43.6	53.7

Durante este tiempo se efectuaron mediciones de los grados brix, al igual que de azucares reductores determinandose los Equivalentes de Dextrosa cada 20 minutos.

4.5.2.3 Proceso de sacarificación: para este proceso se utilizó la enzima Amiloglucosidasa (AMG 300 L).

➢ **AMG 300 L:** en este proceso se disminuyó la temperatura hasta 60℃ y el pH fué ajustado a 4.5 con una solución de HCl 1N, con agitación constante de

250 rpm, después se agregó AMG 300 L (amiloglucosidasa) en volúmenes como se aprecia en la tabla 11, para un tiempo de residencia de 4 horas.

Tabla 11. Dosis enzimática de AMG 300 L.

Parámetros	[M COL 2215] p/v			[M TAI 8] p/v		
	10%	13%	16%	10%	13%	16%
Dosis enzima (ml)	2.33	3.03	3.37	2.37	3.0	3.8

Durante este tiempo se efectuaron mediciones de los grados brix, al igual que de azucares reductores, determinándose los Equivalentes de Dextrosa cada 30 minutos.

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

4.5.3.1 Preparación del inóculo: para el proceso de fermentación alcohólica se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* Se preparó un medio de cultivo de 250 ml para cada una de las concentraciones de harina de yuca de las variedades MCOl 2215 y MTAI 8 con un tiempo de anticipación de 24 horas, el cual contenía como nutrientes esenciales: Urea, $MgCl_2$, NaCl, $NaHPO_4$, $CaCO_3$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ (Ver anexo B).

4.5.3.2 Proceso de fermentación: culminado el proceso de hidrólisis enzimática, se procedió a bajar la temperatura de los biorreactores hasta la ambiental y se midió el pH con el fin de asegurar las condiciones de trabajo de *Saccharomyces cerevisiae,* manteniendo una agitación constante de 150 rpm. Seguidamente se dividió el inóculo preparado inicialmente en cuatro volúmenes iguales, los cuales fueron adicionados a cada uno de los bioreactores.

Al finalizar el proceso de fermentación se llevó a cabo la filtración del mosto, utilizando para ello una bomba de vacio acoplada a un erlenmeyer con desprendimiento lateral, midiéndose el volumen filtrado y su respectiva concentración de etanol (%v/v).

4.5.4 Evaluación del rendimiento: para evaluar el rendimiento se empleó un diseño con un único factor categórico aleatorizado en cuatro bloques y en seis niveles, para un total de 24 ejecuciones. Se realizó un análisis de varianza, una prueba de múltiples rangos y una gráfica de medias, todo con un nivel de confiabilidad del 95%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

5.1 OBTENCIÓN DE LA HARINA

Se obtuvieron 18,98 kg de harina a partir de 50 Kg de yuca fresca de la variedad Venezolana, para un rendimiento del 37,96%, mientras que para la variedad MTAI 8, se obtuvieron 17,28 kg de harina, a partir de 50 kg de yuca fresca, para un rendimiento del 34,56%. Los resultados obtenidos de materia seca, porcentaje de humedad de la yuca y harina se registran en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentajes de humedad y contenidos de materia seca de las variedades de yuca MCOL 2215 y MTAI 8.

Variedad	MCOL 2215	MTAI 8
Yuca fresca (g)	1000	1000
Cutícula (g)	27,5726	33,582
Yuca sin cutícula (g)	972,4274	966,418
Harina (g)	393	348
% Humedad yuca fresca	64,5	67,9
% Materia seca	35,5	32,1
% Humedad harina	9,53	7,58

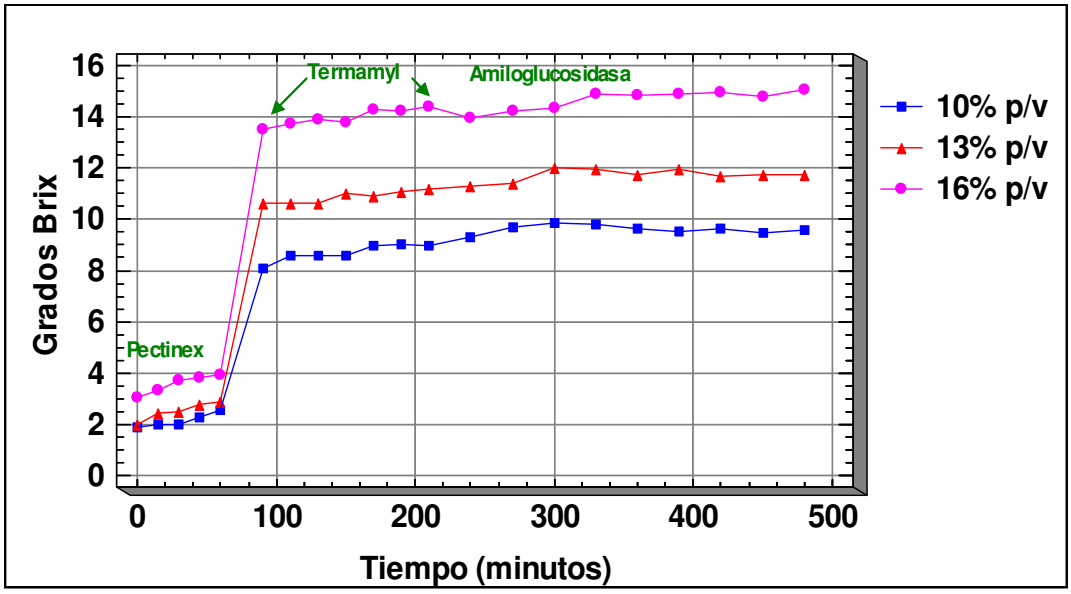
Se puede observar que la variedad de yuca que menor humedad presentó fue la variedad Venezolana, por lo que el rendimiento de harina de ésta fue mayor que el obtenido en la variedad MTAI 8. Los resultados sobre el contenido de materia seca y humedad de las dos variedades se acercan a los publicados por Lima y Marcondes (1979) quienes reportaron un contenido de materia seca y humedad del 36% y 64% respectivamente; además concuerdan con los resultados obtenidos y publicados por el CIAT en los ensayos realizados en los departamentos de Sucre y Córdoba en el periodo 2001 - 2002; los cuales fueron del 34,99% y 65% para la variedad Venezolana y del 31,98% y 68,02% para la variedad M TAI 8, asimismo a los publicados por esta misma entidad en los estudios realizados en el departamento de Sucre durante el periodo 1996 - 2006, en los que fueron reportados contenidos de materia seca y humedad para la variedad Venezolana del 34,9% y 65,1%, mientras que para la variedad MTAI 8 estos fueron del 32,22% y 67,78%.

En cuanto a la humedad de la harina, Venturi y Cereda (1993), Vilpoux (1997) reportaron un porcentaje de humedad del 12,85%. La harina de las variedades Venezolana y MTAI 8, presentaron unas humedad del 9,53% y 7,58 respectivamente, los cuales se encuentran dentro del rango de las humedades reportadas por Magali y Tavares (2005), en la caracterización fisico-química de harina de mandioca de diferentes localidades del Brasil, donde estudiaron 15 variedades de yuca encontrando humedades que oscilan entre 3,1% y 11,57%. Además estas humedades están de acuerdo con el límite establecido por la legislación de Colombia y Brasil, las cuales establecen un porcentaje máximo de humedad del 14%.

5.2 PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

5.2.1 Grados brix variedad Venezolana.

Los grados brix obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) para las concentraciones de harina del 10;13 y 16 % p/v se muestran en la gráfica 1, donde se puede observar que estos aumentaron desde 2 grados brix, hasta un valor aproximado de 10 y 12 para las concentraciones del 10% y 13% p/v respectivamente, mientras que en la concentración del 16% p/v se obtuvo un mayor porcentaje de sólidos solubles, ya que este aumento se presentó desde un valor inicial de 3 grados brix, hasta un valor de 15 al final del proceso, notándose claras diferencias en los valores máximos, lo cual se debe a la diferencia en las concentraciones y a la acción efectiva de las enzimas en cada una de ellas. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo C.



Gráfica 1. Grados brix durante el tiempo de hidrólisis de la variedad Venezolana a diferentes concentraciones de harina.

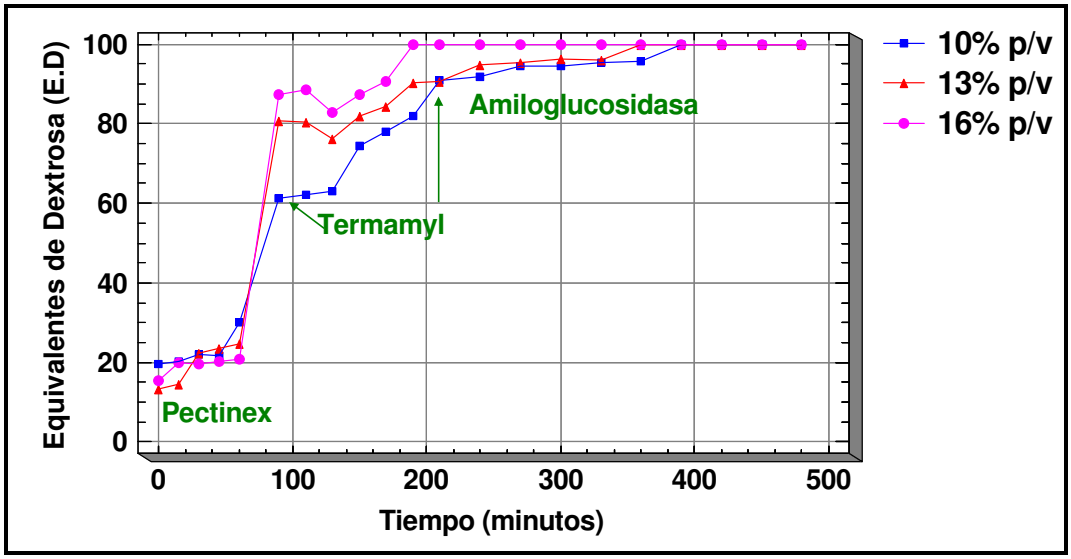
Durante el tiempo de actividad de la enzima Pectinex ultra SP-L, se presenta un leve incremento del porcentaje de sólidos solubles en las diferentes concentraciones, el cual oscila entre 2 y 4 grados brix, esto se debe a que esta enzima actúa sobre las sustancias pépticas presentes en la harina.

También puede apreciarse el aumento significativo de los grados brix en cada una de las concentraciones a partir del tiempo de acción enzimática de la termamyl® 120 L, lo que demuestra la gran afinidad de esta enzima por el sustrato y su acción dextrinizante. Al adicionar la enzima AMG se puede observar un pequeño aumento de los grados brix, donde el valor máximo obtenido se presenta entre los 300 – 330 minutos, lo cual corresponde a 1-1.5 horas de haberse iniciado el proceso de sacarificación. Después de este tiempo se puede notar que no hay un aumento significativo de éstos.

5.2.2 Equivalentes de dextrosa (E.D) variedad Venezolana.

En la gráfica 2, se muestran los valores de equivalentes de dextrosa obtenidos durante el tiempo de hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10, 13 y 16% p/v notándose valores máximos de E.D de 100 para las tres

concentraciones, lo cual se debe a la acción efectiva de las enzimas en cada una de ellas. También se observa que al adicionar la pectinex se presenta un leve aumento de los E.D, mientras que durante el tiempo de acción de la termamyl se puede notar un aumento significativo de éstos, obteniéndose los valores máximos de 100 E.D durante la actividad de la AMG. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo D.

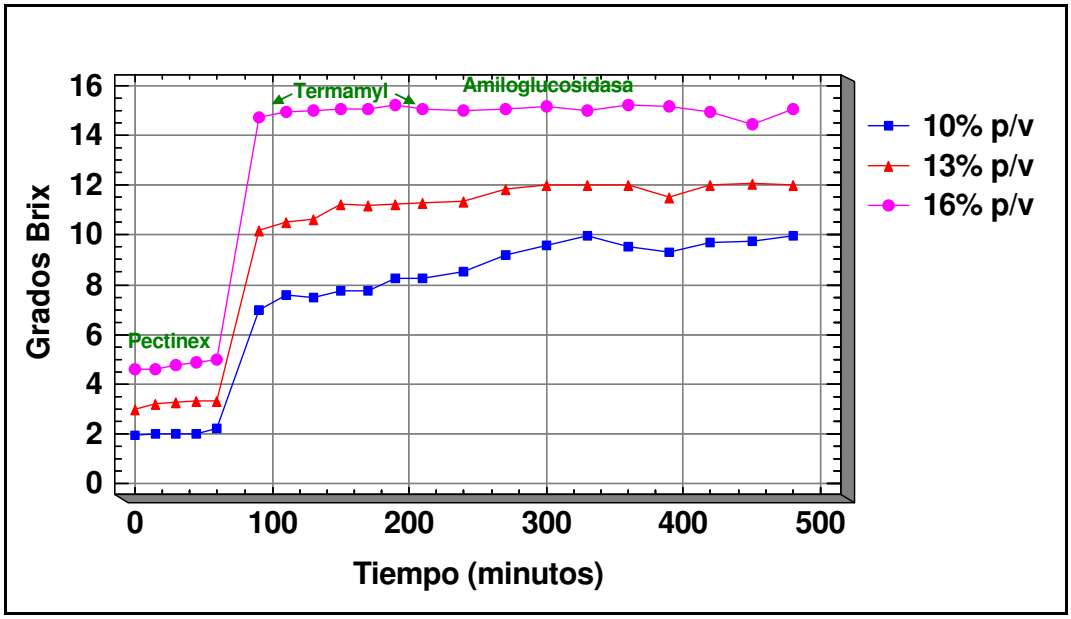


Gráfica 2. Equivalentes de Dextrosa (E.D) durante el tiempo de hidrólisis de la variedad Venezolana a diferentes concentraciones de harina.

Estos resultados están por encima a los reportados por la Novo Nordisk la cual reporta valores de E.D del 95 al 98 para la hidrólisis de almidón de yuca. Asimismo a los publicados por Castellanos y colaboradores (2004) en el estudio cinético de la hidrólisis enzimática del almidón de papa los cuales obtuvieron E.D de 86 utilizando las enzimas BAN-AMG-Promozyme a una concentración de sustrato del 30% p/v. También a los de Benavides (1983), quien obtuvo valores del 95%, hidrolizando la harina de arroz; a los reportados por Caro (1986), quien obtuvo valores de 81% para la sacarificación del almidón de yuca y a los de Chica (1996), quien logró rendimientos de 85-90% hidrolizando almidón de papa, utilizando todos ellos únicamente AMG.

5.2.3 Grados brix variedad MTAI 8.

Los grados brix obtenidos durante la hidrólisis enzimática a concentraciones de harina del 10,13 y 16 % p/v de la variedad MTAI 8 se muestran en la gráfica 3, donde se puede observar que la concentración con mayor producción de sólidos solubles fue la del 16% p/v, con un valor inicial de 4.5 grados brix y uno final de 15, mientras que la concentración con menor producción de éstos fue la del 10% p/v mostrando valores entre 2 y 10. Los valores de los grados brix de las diferentes concentraciones de harina de la variedad MTAI 8, presentan claras diferencias en los valores máximos al final del proceso como sucedió en la variedad Venezolana. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo E.



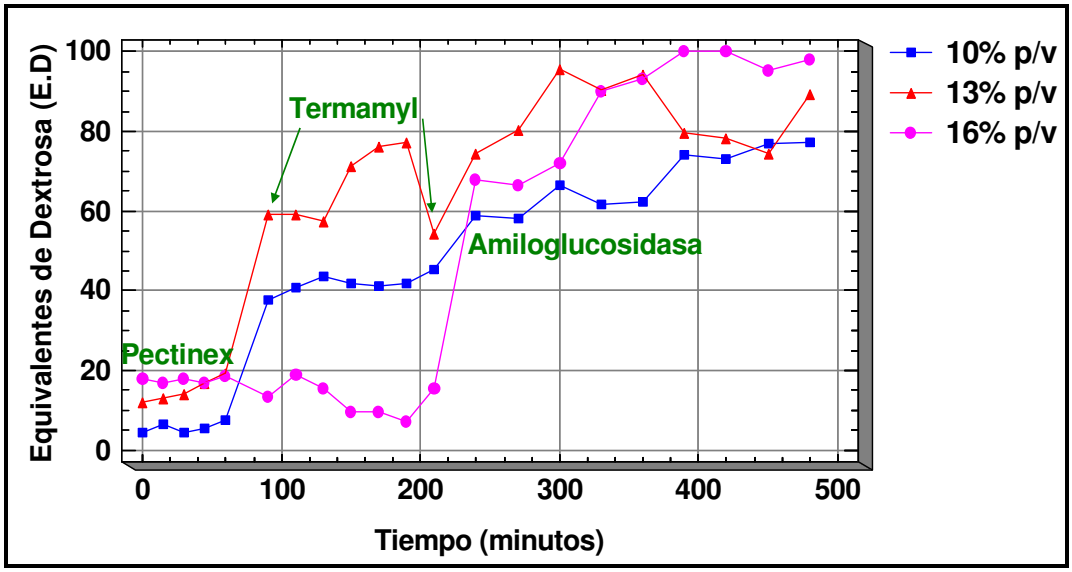
Gráfica 3. Grados brix durante el tiempo de hidrólisis de la variedad MTAI 8 a diferentes concentraciones de harina.

Al igual que en la variedad Venezolana, durante el tiempo de actividad de la Pectinex, se presenta un leve incremento del porcentaje de sólidos solubles en las diferentes concentraciones, un aumento significativo de éstos a partir del tiempo de acción enzimática de la termamyl, y un pequeño aumento al adicionar la enzima AMG, donde el valor máxima obtenido se encuentra también entre los 300 – 330 minutos. Después de este tiempo no hay un

aumento considerable. Por otra parte comparando las gráficas 1 y 3, se puede apreciar que durante la hidrólisis enzimática de las dos variedades, los máximos valores de grados brix alcanzados a iguales concentraciones de harina son muy parecidos. Así a concentraciones del 10% p/v se alcanzó un valor de 9,5 en la variedad Venezolana y de 10 para MTAI 8, a concentraciones del 13% p/v un valor de 11,5 y 12 respectivamente, mientras que para la concentración de 16% p/v se obtuvo un valor de 15 en ambas variedades.

5.2.4 Equivalentes de dextrosa (E.D) variedad MTAI 8.

Como se ilustra en la gráfica 4, los valores de equivalentes de dextrosa presentan un aumento general durante el tiempo de hidrólisis, apreciándose que en las concentraciones de harina del 10 y 13% p/v se alcanzó un valor de E.D de 77 y 89 respectivamente, mientras que la concentración del 16% p/v, mostró un valor máximo de 100, observándose además que durante el transcurso de hidrólisis, al igual que en variedad Venezolana, se presenta un leve aumento de éstos al adicionar la pectinex, un incremento sustancial en las concentraciones de 10 y 13% p/v durante el tiempo de acción de la termamyl, alcanzándose los valores máximos al final del proceso durante la actividad de la AMG. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo F.



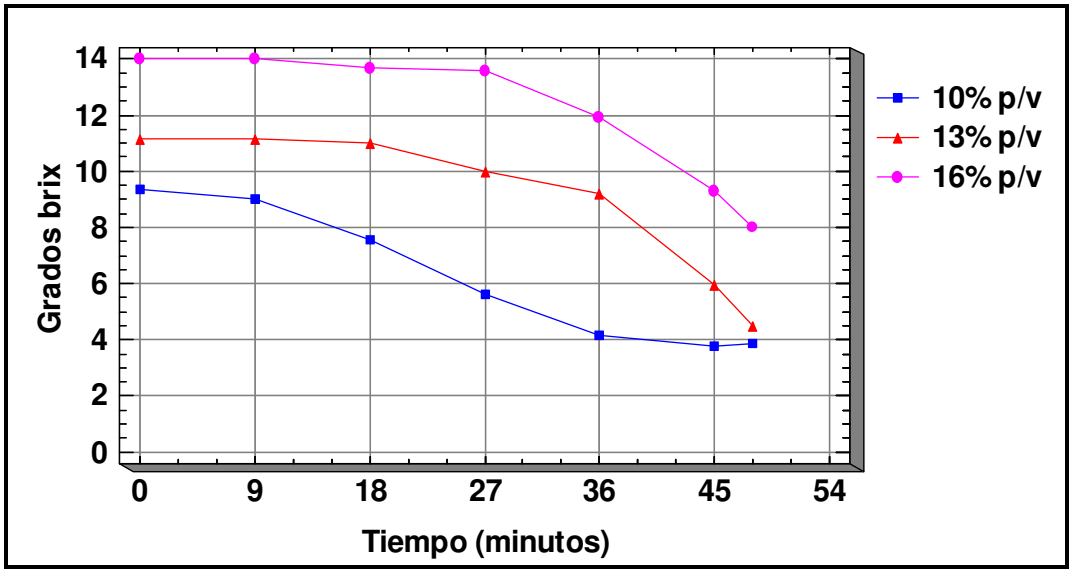
Gráfica 4. Equivalentes de Dextrosa durante el tiempo de hidrólisis de la variedad MTAI 8 a diferentes concentraciones de harina.

Al igual que en las concentraciones de las variedad Venezolana, el valor máximo de E.D obtenido en la concentración del 16 % p/v de MTAI 8, está por encima de los datos reportados por la Novo Nordisk para la sacarificación del almidón de yuca, quienes recomiendan usar AMG y promozyme para alcanzar valores de ED de 95, y a los de Benavides (1983) hidrolizando la harina de arroz. Para el caso de la concentración del 13% p/v, este valor estuvo por encima de los de Caro (1986) y Castellanos, *et al.,* (2004); mientras que los alcanzados en la concentración del 10% p/v, estuvieron por debajo de los publicados por los autores citados anteriormente, como también por los de Chica (1996), quien logró rendimientos de 85 – 90%.

5.3 PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

5.3.1 Grados brix variedad Venezolana.

El comportamiento de los grados brix durante el proceso de fermentación de las concentraciones de harina de yuca del 10; 13 y 16% p/v se ilustra en la gráfica 5, observándose una disminución de éstos hasta valores de 4; 4.5 y 8 respectivamente. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo G.

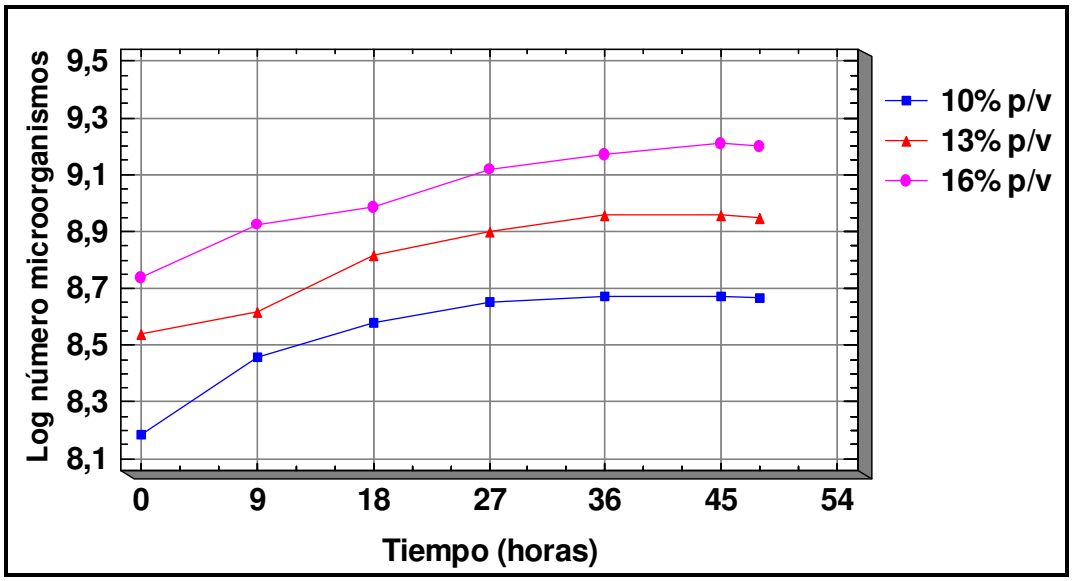


Gráfica 5. Grados brix durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v.

Se puede observar que las concentraciones del 10% y 13% p/v presentaron una mayor disminución de los productos hidrolizados, esto demuestra una fermentación más completa a lo largo de todo el proceso, en comparación con la concentración del 16 % p/v, lo cual se debe a que los efectos osmóticos por las altas concentraciones de sólidos solubles incrementan las presiones osmóticas lo que conlleva un incremento de etanol intracelular, lo cual da como resultado un decremento de las enzimas Intracelulares que intervienen en la producción de etanol, pues se ha demostrado que las membranas citoplasmáticas y de varios organelos son el blanco principal para la inhibición por etanol (Ingram y Buttke, 1984). El alcohol ocasiona alteraciones en la organización y permeabilidad de las mismas al afectar su composición lipídica y el funcionamiento de proteínas de membrana involucradas en el transporte de azúcares y aminoácidos (Aguillera y Benítez, 1986). Estos cambios en la permeabilidad, causan la fuga de cofactores, coenzimas y nucleótidos (Mizoguchi, 1998). La pérdida de estas biomoléculas, esenciales para la actividad de enzimas involucradas en la glicólisis y producción de alcohol, son suficientes para explicar el efecto inhibitorio del mismo.

5.3.2 Crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* variedad Venezolana.

El crecimiento celular durante el tiempo de fermentación para las concentraciones del 10%,13% y 16% p/v se presenta en la gráfica 6, donde se puede apreciar un crecimiento celular más acentuado durante las primeras 27 horas de fermentación, esto se debe a que durante este tiempo las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol.

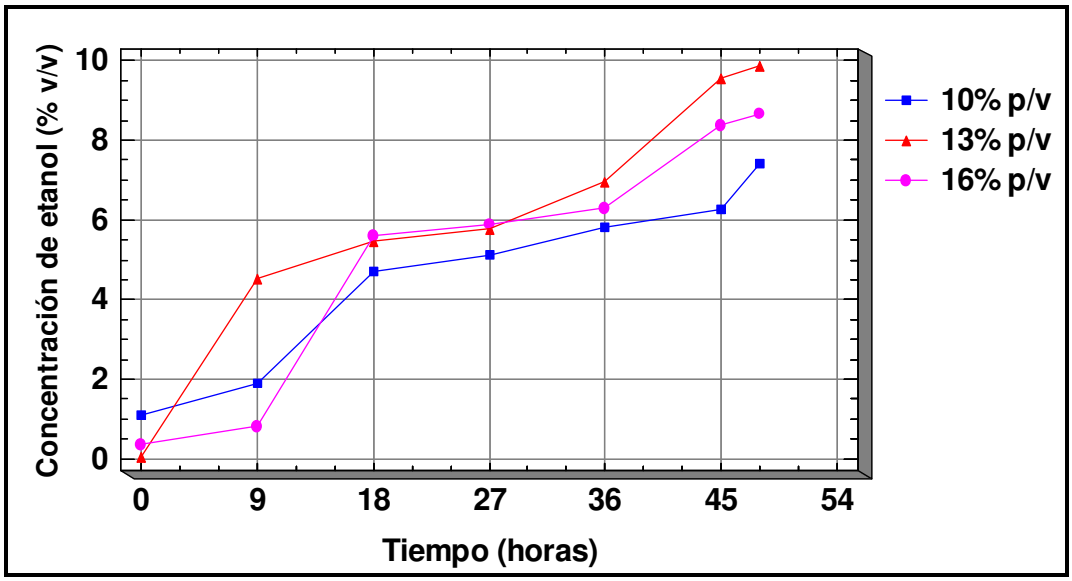


Gráfica 6. Variación del logaritmo del número de microorganismos (MO) durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v.

Asimismo se puede notar que las concentraciones presentaron un crecimiento celular parecido, lo cual se ve representado en el incremento del porcentaje del número de microorganismos a lo largo del proceso en cada una de ellas, los cuales fueron de 32,7%; 38,7% y 34,7% para las concentraciones de 10; 13 y 16% p/v respectivamente. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo H.

5.3.3. Variación de la concentración de etanol durante el proceso de fermentación variedad Venezolana.

La producción de etanol durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de harina de yuca del 10%, 13% y 16% p/v de la variedad Venezolana se representan en la gráfica 7, observándose una concentración final de etanol de 7,4% v/v; 9,8% v/v y 8,6% v/v, respectivamente. También se puede apreciar que en las tres concentraciones de harina, la mayor producción de etanol se presentó en el transcurso de las primeras 27 horas, debido a que durante este tiempo las células alcanzan su mayor crecimiento. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo I.



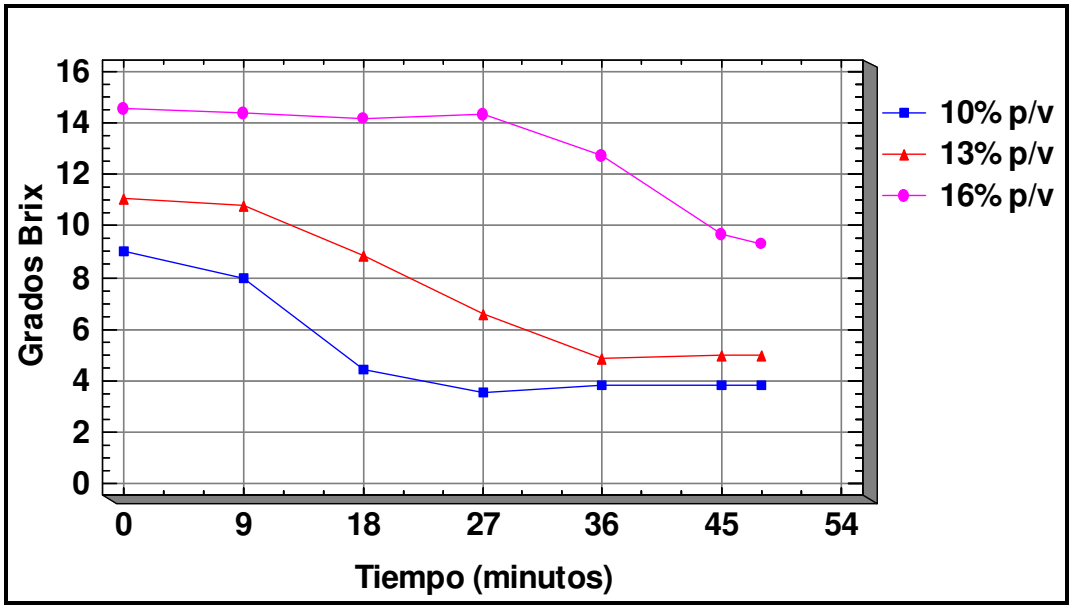
Gráfica 7. Concentración de etanol (% v/v) durante el tiempo de fermentación de la variedad Venezolana a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v.

Se puede notar que el porcentaje de etanol obtenido en la concentración de harina del 16% p/v es menor al alcanzado en la del 13% p/v, lo cual se debe a un menor consumo de los productos de la hidrólisis por parte de *Saccharomyces cerevisiae* en esta concentración. Esto se ve reflejado en la poca disminución de los grados brix durante el proceso de fermentación, lo cual se explica por los efectos osmóticos causados por la alta concentración de sólidos solubles.

Los resultados obtenidos en la concentración del 10% p/v, se asemejan a los publicados por Grisales, *et al.,* (2001), quienes obtuvieron una concentración de 6 - 8% v/v de etanol a partir de jugo de caña, el cual contenía una composición de 14% de sólidos solubles, pero están por debajo de los reportados por González y Molina (2006), quienes alcanzaron una concentración del 10,33% v/v y un rendimiento de 94,5 litros de etanol / tonelada de papa, utilizando una concentración de 20% p/v; a los de Bringhenti y Cabello (2005), quienes obtuvieron una concentración de etanol del 9.76% v/v a partir de residuos del proceso de obtención de harina y almidón de yuca usando una concentración del 18% p/v y enriquecido con un 12% de melaza residual y a los de Assis, (2007), en el estudio para la cuantificación de alcohol a partir de harina de batata donde alcanzó una concentración de etanol del 9.4% v/v y un rendimiento de 129 litros/ton de raíz; estando por encima de 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*.* Para el caso de la concentración del 13% p/v, el valor de etanol alcanzado se asemeja a los reportados por Bringhenti y Cabello (2005) y Assis, (2007), estando por encima de los publicados por León, *et al.,* (2005) y Grisales, *et al.,* (2001), pero por debajo a los de González y Molina (2006). Mientras que en la concentración del 16% p/v fueron superiores a los de Grisales, *et al.,* (2001) y León, *et al.,* (2005) e inferiores a los de Bringhenti y Cabello (2005); González y Molina (2006) y Assis, (2007).

5.3.4. Grados brix variedad MTAI 8.

Al igual que en la variedad Venezolana, los grados brix experimentan una disminución durante el proceso de fermentación, registrándose al final valores de 3,9; 5 y 9,3 para las concentraciones de 10; 13 y 16% p/v respectivamente. Esto se ilustra en la gráfica 8. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo J.

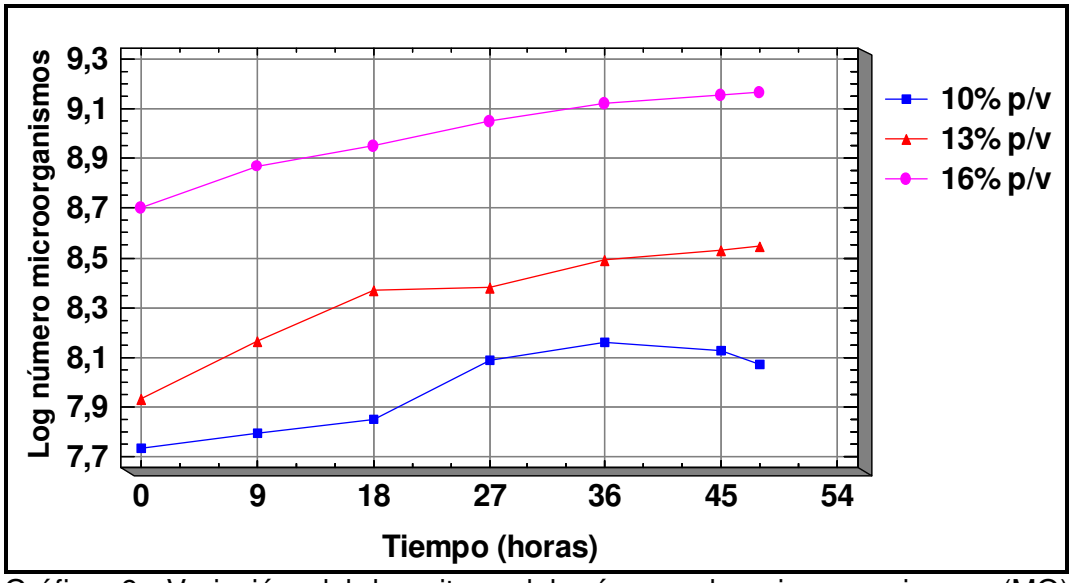


Gráfica 8. Grados brix durante el tiempo de fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v.

Además se puede observar que las concentraciones de harina que presentaron una mayor disminución de grados brix corresponden a la del 10% y 13% p/v, en comparación con la concentración del 16% p/v; al igual que lo ocurrido en la variedad Venezolana.

5.3.5 Crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* variedad MTAI 8.

El crecimiento celular durante el tiempo de fermentación para las concentraciones del 10%,13% y 16% p/v se ilustra en la gráfica 9, donde se puede apreciar un incremento poblacional de los microorganismos a medida que avanza el proceso, presentándose un mayor crecimiento en las primeras 27 horas, igual a lo sucedido en la variedad Venezolana. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo K.

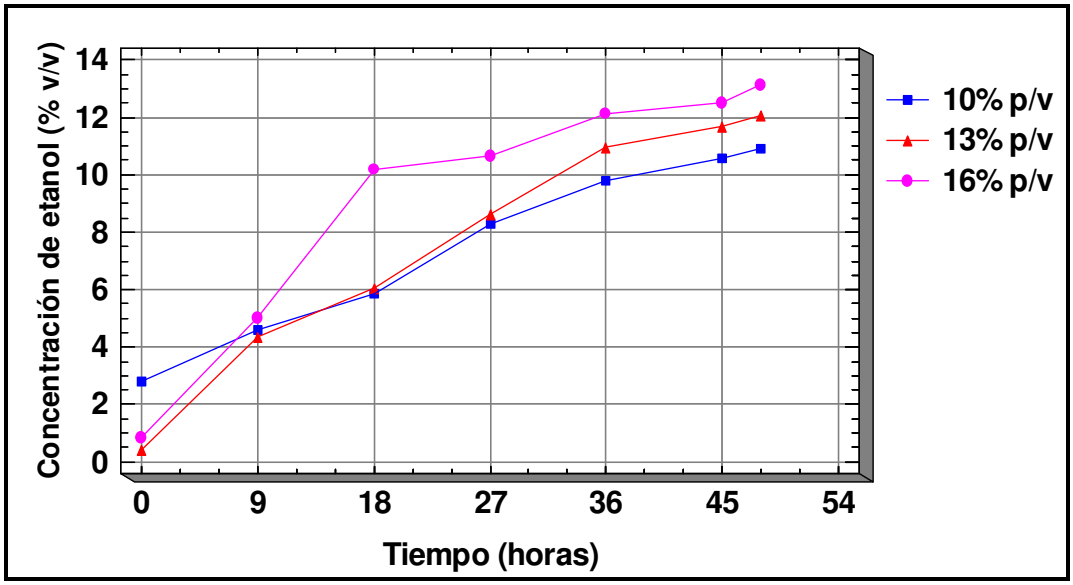


Gráfica 9. Variación del logaritmo del número de microorganismos (MO) durante el tiempo de fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y 16% p/v.

Asimismo se puede notar que la concentración del 10% p/v, fue la que presentó un mejor crecimiento, el cual se inició con $5,5x10^7$ microorganismos/ml alcanzando un valor máximo de $1,1x10^8$, representando un porcentaje de incremento del 46,31%, en comparación con las concentraciones de 13 y 16% p/v, cuyos incrementos fueron del 24,25% y 34,37%. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo K.

5.3.6. Variación de la concentración de etanol durante el proceso de fermentación variedad MTAI 8.

La producción de etanol durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de harina de yuca del 10%, 13% y 16% p/v de la variedad MTAI 8 se representan en la gráfica 10, observándose una concentración final de etanol de 10,9% v/v; 12% v/v y 13% v/v, respectivamente, donde se puede apreciar que en las tres concentraciones de harina, al igual que en la variedad Venezolana la mayor producción de etanol se presentó en el transcurso de las primeras 27 horas. Los resúmenes estadísticos de los valores graficados se detallan en el anexo L.



Gráfica 10. Concentración de etanol (% v/v) durante el tiempo de fermentación de la variedad MTAI 8 a concentraciones de harina de 10; 13 y16% p/v.

Estos porcentajes de etanol están por encima de los obtenidos por Grisales, *et al.,* (2001); León, *et al.,* (2005); Bringhenti y Cabello (2005); González y Molina (2006) y Assis, (2007).

5.4 EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL.

Para evaluar el rendimiento de etanol de las variedades de yuca, se utilizó un diseño experimental con un único factor categórico en 6 niveles divididos en cuatro bloques completamente al azar. Los resultados del rendimiento se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Rendimientos en litros de etanol / tonelada de harina de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8.

Variedad de Yuca	Concentración de harina (p/v)	Rendimiento (litros de etanol / tonelada de harina).
Venezolana	16%	397,406
Venezolana	13%	541,5
MTAI 8	16%	552,761
MTAI 8	13%	585,727
Venezolana	10%	590,5
MTAI 8	10%	689,5

En la tabla 14, se puede observar el análisis de varianza para el rendimiento el cual muestra un p-valor de 0,0056, lo que demuestra una diferencia estadísticamente significativa según yuca, encontrándose diferencias entre variedades y concentraciones. Por otra parte no se observan diferencias significativas según los bloques, siendo homogéneos, lo que minimiza el error experimental de los resultados los cuales se detallan en la tabla 15.

Tabla 14. Análisis de varianza para el rendimiento de las variedades Venezolana y MTAI 8.

Análisis de la Varianza para Rendimiento - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Yuca	234593,0	5	46918,7	5,23	0,0056
B:BLOQUE	13457,3	3	4485,77	0,50	0,6881
RESIDUOS	134655,0	15	8976,97		
TOTAL (CORREGIDO)	382705,0	23			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 15. Contraste de múltiples rangos según bloque

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

BLOQUE	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4	6	550,627	15,0076	X
1	6	554,436	15,0076	X
3	6	555,516	15,0076	X
2	6	577,684	15,0076	X

Contraste	Diferencias	+/- Límit
1 - 2	-23,2483	61,2013
1 - 3	-1,07992	61,2013
1 - 4	3,8093	61,2013
2 - 3	22,1684	61,2013
2 - 4	27,0576	61,2013
3 - 4	4,88922	61,2013

* indica una diferencia significativa.

Para observar las diferencias entre variedades y concentraciones se hizo necesario la aplicación de una prueba de múltiples rangos, utilizando para ello el método de Tukey. Los resultados se registran en la tabla 16.

Tabla 16. Medias por mínimos cuadrados para rendimiento con 95% de intervalos de confianza y contraste de múltiples rangos según yuca Venezolana y MTAI 8.

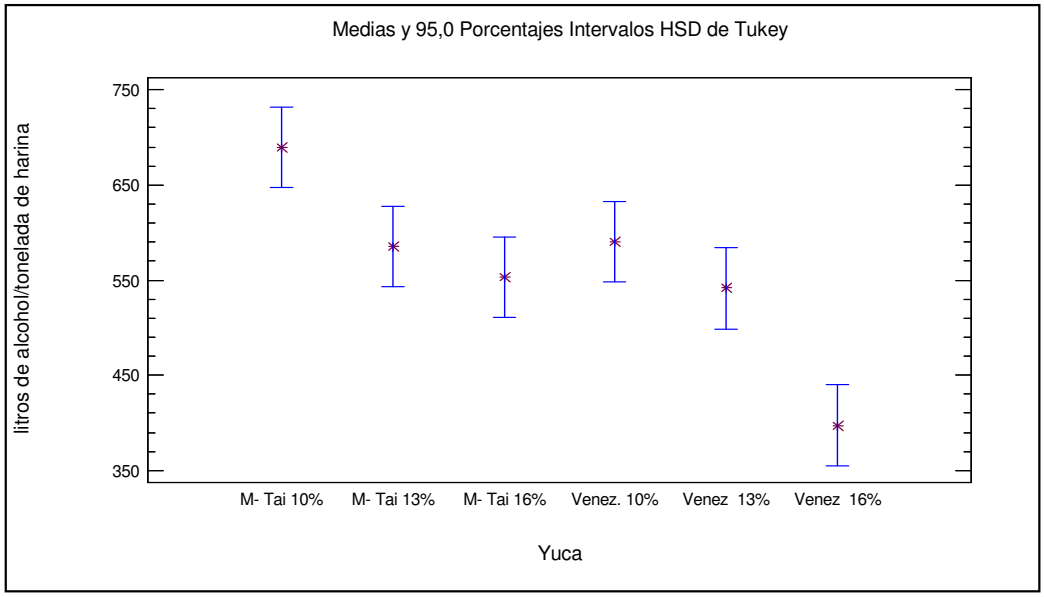
Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Yuca	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Venezolana 16%	4	397,406	18,3805	X
Venezolana 13%	4	541,5	18,3805	X
M- Tai 16%	4	552,761	18,3805	X
M- Tai 13%	4	585,727	18,3805	X
Venezolana 10%	4	590,5	18,3805	X
M- Tai 10%	4	689,5	18,3805	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
M- Tai 10% - M- Tai 13%	*103,773	84,6561
M- Tai 10% - M- Tai 16%	*136,739	84,6561
M- Tai 10% - Venezolana 10%	*99,0	84,6561
M- Tai 10% - Venezolana 13%	*148,0	84,6561
M- Tai 10% - Venezolana 16%	*292,094	84,6561
M- Tai 13% - M- Tai 16%	32,9657	84,6561
M- Tai 13% - Venezolana 10%	-4,77303	84,6561
M- Tai 13% - Venezolana 13%	44,227	84,6561
M- Tai 13% - Venezolana 16%	*188,321	84,6561
M- Tai 16% - Venezolana 10%	-37,7387	84,6561
M- Tai 16% - Venezolana 13%	11,2613	84,6561
M- Tai 16% - Venezolana 16%	*155,355	84,6561
Venezolana 10% - Venezolana 13%	49,0	84,6561
Venezolana 10% - Venezolana 16%	*193,094	84,6561
Venezolana 13% - Venezolana 16%	*144,094	84,6561

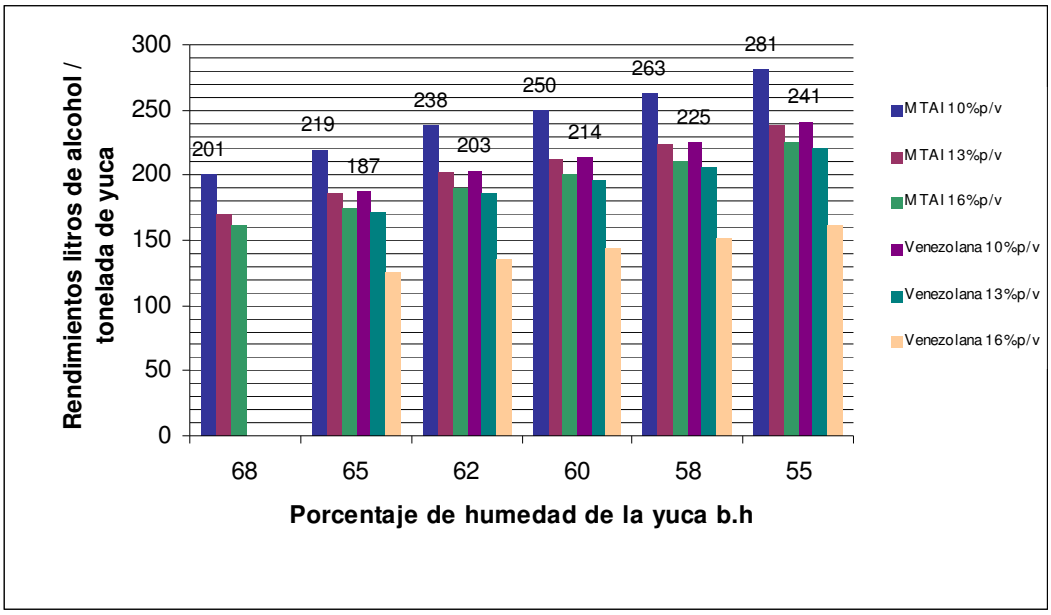
* indica una diferencia significativa.

En la tabla 16, el asterisco indica que las medias para el rendimiento muestran diferencia estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Se reflejan cuatro bloques homogéneos; también se observa que la media de la variedad MTAI 8 al 10% p/v muestra el mayor rendimiento con 689,5 litros de alcohol / tonelada de harina y la variedad Venezolana al 16% p/v el menor con 397,4 litros de alcohol / tonelada de harina, tal como lo muestra la gráfica 11.



Gráfica 11. Medias para el rendimiento de las variedades Venezolana y MTAI.

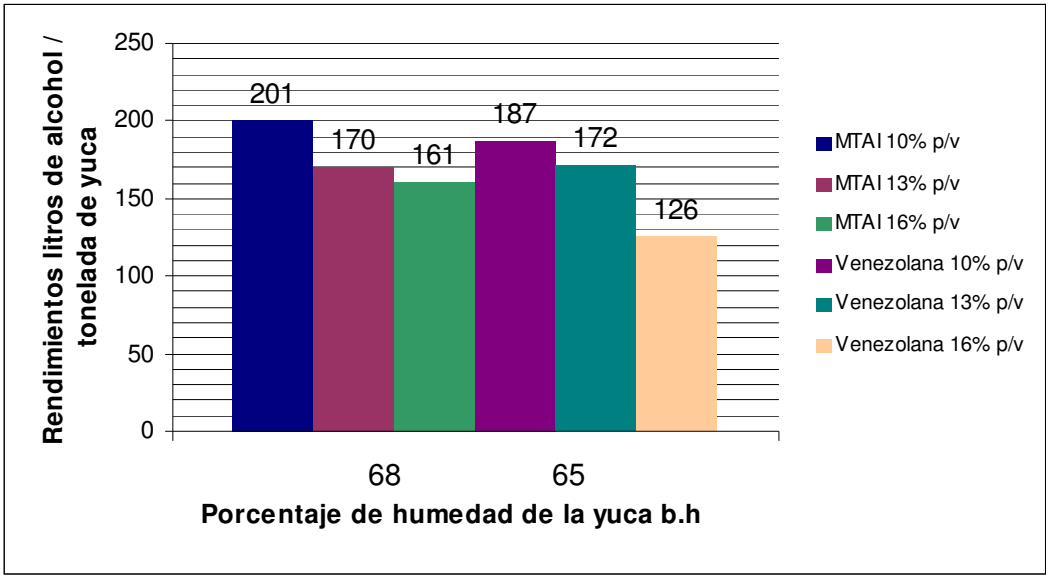
En la gráfica 12, se observa la extrapolación de los rendimientos en litros de alcohol obtenidos por tonelada de harina de yuca a toneladas de yuca fresca, para diferentes grados de humedad de la materia prima. Para humedades del 68 y 65% b.h que son los promedios de las humedades de yuca fresca que se presentan en el departamento de Sucre para la variedad MTAI 8 y MCOL 2215 respectivamente, la MTAI presenta los mayores rendimientos con 201 litros de etanol / tonelada de yuca cuando la concentración de harina es del 10% p/v y el menor, la Venezolana al 16% p/v con 126 litros de etanol / tonelada de yuca, de lo que se deduce que al aumentar la concentración de harina durante todo el proceso de obtención de alcohol, existe una disminución de la eficiencia en el proceso de fermentación que se ve reflejada en la cantidad de azucares reductores que no son utilizados y que de alguna manera interfieren en la velocidad de transferencia del sustrato hacia las levaduras, creando condiciones no aptas para que estas trabajen en forma óptima hacia la producción de alcohol.



Gráfica 12. Rendimientos litros de alcohol / tonelada de yuca de las variedades Venezolana y MTAI 8, para diferentes humedades de yuca fresca.

El rendimiento de MTAI 8 al 10% p/v está por encima de los reportados por González y Molina (2006), quienes estudiaron la hidrólisis enzimática y la fermentación de papa (*Solanum tuberosum*), obteniendo un rendimiento de 94,5 litros de etanol / tonelada de papa, utilizando una concentración de 20% p/v de sustrato; a los de Assis, (2007), en el estudio para la cuantificación de alcohol a partir de harina de batata, donde obtuvo un rendimiento de 129 litros de etanol / tonelada de raíz; asimismo a los de López, (1998), en el estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa, utilizando cuatro sustratos a partir de banano maduro, donde obtuvo un rendimiento de etanol de 73,16 litros de etanol / tonelada de banano maduro y a los de Vong, (1996), en el estudio de la producción de etanol mediante la fermentación de tres sustratos diferentes obtenidos a partir del banano, donde alcanzó un rendimiento de 71,3 litros de etanol / tonelada de banano verde.

En gráfica 13, se observan los rendimientos para las variedad de yuca MTAI 8 y Venezolana hacia la producción de alcohol a humedades promedios de yuca del 68 y 65% b.h, vislumbrando rendimientos entre 126 a 201 litros de alcohol / tonelada de yuca.



Grafica 13. Rendimientos litros de alcohol / tonelada de yuca para las variedades MTAI 8 y Venezolana en las diferentes concentraciones de harina.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Las variedades de yuca Venezolana y MTAI 8, presentaron porcentajes de humedad del 64,5% y 67,9%, valores que están alrededor de los determinados por el CIAT en el departamento de Sucre.

- ✓ El porcentaje de humedad de la harina de las variedades Venezolana y MTAI 8, los cuales fueron del 9,53 y 7,58% están dentro del límite establecido por la legislación de Colombia y Brasil, los cuales establecen un porcentaje máximo del 14%.

- ✓ En la hidrólisis enzimática de la harina de las variedades MCOL 2215 y MTAI 8, se presentó un aumento sustancial de los grados brix y de los equivalentes de dextrosa durante el tiempo de reacción de la Termamyl, esto demuestra su afinidad por el sustrato y acción dextrinificante.

- ✓ Durante la hidrólisis enzimática de la harina en ambas variedades después de un tiempo de 300 minutos, no se justifica seguir la reacción ya que la producción de sólidos solubles no aumenta considerablemente.

- ✓ Tanto en la variedad Venezolana como en la MTAI 8, la máxima velocidad de producción de alcohol se presentó en el transcurso de las primeras 27 horas del proceso de fermentación, que corresponde al periodo en el cual se muestra una rápida reproducción de los microorganismos.

- ✓ Al aumentar la concentración de harina, se incrementan los azucares disponibles al final del proceso de fermentación, los cuales no son utilizados representando una pérdida de materia prima y una disminución del rendimiento hacia la producción de alcohol.

- ✓ Mediante el uso de la Pectinex como enzima complementaria, se observan buenos rendimientos de alcohol en ambas variedades a concentraciones de harina del 10% p/v, los cuales posiblemente disminuirían si se emplearan

únicamente Termamyl y AMG, ya que no estaría presente una enzima que ataque a la celulosa y a las pectinas.

- ✓ La variedad de yuca que alcanzó el mayor rendimiento de alcohol fue la MTAI 8 con 201 litros de etanol / tonelada de yuca fresca a una concentración de harina del 10% p/v, mientras que el menor lo presentó la Venezolana con 126 litros de etanol / tonelada de yuca a una concentración de sustrato del 16 % p/v.

- ✓ La variedad MTAI 8 puede ser seleccionada para la producción de alcohol, ya que presenta rendimientos por encima de 180 litros de etanol / tonelada de yuca fresca.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Es pertinente seguir investigando con concentraciones de harina de yuca mas bajas, ya que los mejores rendimientos de alcohol se obtuvieron a concentraciones de sustrato del 10% p/v, de esta forma se evitaría un desaprovechamiento de la materia prima que no es transformada en alcohol durante la fermentación a concentraciones mayores.
- ✓ Es importante utilizar para la producción de alcohol variedades amargas de alto rendimiento y no dulces que se puedan emplear en la sostenibilidad de la seguridad alimentaria de los habitantes de la región.
- ✓ Se recomienda la MTAI 8 como una variedad a tener en cuenta por su potencialidad en la producción de alcohol, además de ser la variedad industrial más cultivada en el departamento y presentar un buen rendimiento de raíces frescas.
- ✓ Realizar la hidrólisis enzimática de la harina utilizando otro conjunto de enzimas amilolíticas.
- ✓ Evaluar el rendimiento de alcohol con otras enzimas que trabajan sin calentamiento como la Stargen.
- ✓ Desarrollar trabajos de investigación para evaluar los procesos de obtención de alcohol a nivel piloto.
- ✓ Implementar proyectos de investigación donde se pueda determinar el consumo de energia involucrado en la producción de alcohol a partir de yuca.
- ✓ Es necesario desarrollar métodos que permitan evaluar el rendimiento energético en la producción de alcohol carburante de estas variedades de yuca, y que sirvan de referente con otras materias primas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

AQUARONI, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. 2001. Tecnología de fermentaciones. Sao Paulo: Edgar Blücher, Vol 1. pp 285.

ARTIME, R. 2005. Aplicaciones de las Enzimas. Universidad de Salamanca. pp 1-35.

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

AZEVEDO, J. L,; BARROS, N. M,; SERAFINI, L. A. 2001. Biotecnología de Agricultura y de Agroindustria. Guaíba Agropecuaria. pp 463

BALL, S,; BULÉON, A,; COLLONNA, P,; PLANCHOT, V. 1998. Starch granules: structure and biosyntesis. J. Biol. Macromol. Vol 23. pp 85-112.

BALL, S. G,; JAMES, M. G,; MORELL, M. K,; MYERS, A .M. 2000. Recent progress towards understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. pp 989-997.

BARBOZA. C, J. E.; BAUTISTA. J, M.; GARCÍA. O, L.; PARRA. N, L. A. 2001. El agave tequilaza weber y la producción de tequila. Acta Universitaría. Dirección de Investigación y postgrado. Universidad de Guanajuato. Vol 11. pp 26-34.

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

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

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

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

CAPLICE, E,; FITZGERALD, G. F. 2000. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. International journal of food Microbiology. Vol 50. pp 131-149.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. Interciencia. Vol 30. pp 671-678.

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

CASSIDY, C.; DEMIRIJAN, D.; MORIS, F. 2001. Enzymes from estremophiles. Curr. Opin. Chem. Boil. Vol 5. pp 144-151.

CASTELLANOS, O.; GONZÁLEZ, G.; PARDO, M.; RIVERA, P. 2004. Estudio cinético de la hidrólisis enzimática del almidón de papa. Revista Ingeniería e Investigación. Universidad Nacional de Colombia. No 54. pp 65-84.

CCI, 1999. Corporación Colombiana Internacional. Inteligencia de mercados; Perfil del producto: yuca. Boletín SIPSA. Colombia. No 6. pp 1-44.

CEBALLOS, H.; DE LA CRUZ, G. 2004. Taxonomía y Morfología de la yuca. En: La Yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. CIAT, CLAYUCA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo y FENAVI. Cali.

CEREDA, M.; MAGALI, L. 2004. Avaliacao Técnico Económica da producao de etanol de farelo de mandioca, utilizando pectinase como enzima complementar. Energia na Agricultura. Brasil. Vol 13. pp 1-14.

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.

CHÁVEZ, M. 2003. Producción de Alcohol Carburante (Etanol) en Costa Rica: Consideraciones Sobre su Potencial Real de Uso. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. pp 1-29.

CHAUDHARY, K.; KOHILU, U.; NIGAM, P.; SINGH, D. 2001. Thermostable alkaliphilic and cellulose free xylanases production by thermoactinomyces thalophilus subgroup C. Enzyme Microb. Technol. Vol 28. pp 606-610.

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

CHITRADON, L.; PUNSUVON, V.; SIRIACHA, P.; SITTIDILOKRATNA, C.; SUTHIRAWUT, S.; VAITHANOMSAT, P. 2007. Screening of pectinase producing bacteria and their efficiency in biopulping of paper mulberry bark. Science Asia. Vol 33. pp 131-135.

CIAT-ICA. 1991. ICA-Costeña: Nueva variedad de yuca de alta producción para la Costa Atlántica. Plegable divulgativo No 232.

CIAT. 2002. Investigación y desarrollo para la yuca industrial en seis polos estratégicos de Colombia. Reporte técnico de actividades 2001-2002. pp 1-113.

CIAT. 2007. Área sembrada con yuca industrial, rendimientos por hectárea y producción por municipios en el departamento de Sucre. pp 1-2.

CLAASSEN, P.; DE BRIES, S. S.; LÓPEZ CONTRERAS, A. M.; SIJTSMA, L.; STAMS. A, J. M.; VAN LIER, J. B.; VAN NIEL, E. W. J.; WEUSTRUIS, R. A. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carries. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 52. pp 741-755.

CORPOICA/CIAT. 2005. Nuevas variedades de yuca para uso industrial en la región caribe colombiana. Córdoba. pp 1-16

COVARRUBIAS, A. A,; FOLCH, J. L,; GARAY, A,; LLEDIAS, F. 2004. La respuesta a estrés en la levadura Saccharomyces cerevisiae. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol 46.No 1-2. pp 24-46.

DAIUTO, E,; DEMIATE, I,; FRANCO, C. 2001. Propriedades gerais do amido. Coordenadota Marne Pascoli Cereda. Campinas: Fundacao Cargill. Vol 1. pp 224.

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

DIARIO OFICIAL DEL ESTADO. 2001. Ley 693/2001 de 19 de septiembre. Normas sobre el Uso de Alcoholes Carburantes. Diario No 44.564, de 27-09-01.

DÍAZ, A; FILELLA, M; VELÁSQUEZ, M. 2002. Estudio de la Modificación Vía Enzimática de Almidón de Yuca para la Obtención de Maltodextrinas. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol 4. pp 78-88.

DIJKHUIZEN, L,; EUVERINK, G. J. W,; KAPER, T,; VAN DER MAAREL, M.J.E.C; 2004. Exploring and Exploiting Starch-Modifying Amylomaltases from Thermophiles. Biochemical Society Transactions. Vol 32. pp 279-282.

DIJKHUIZEN, L,; LEEMHUIS, H,; UITDEHAAG, J,; VAN DER MAAREL, M,; VAN DER VEEN, B. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal Biotechnology. Vol 94. pp 137-155.

DOELLE, H. W,; JIN, B,; PATEL, B,; VAN LEEUWEN, H. J,; YU, Q. 1999. Production of fangal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligoesporus* from starch processing wastewater. Process Biochemistry. New York, Vol 34. pp 59-65.

DOMÍNGUEZ. M, C. E. 1996. Yuca: Investigación, producción y utilización. PNUD-CIAT. Palmira, Valle. pp 29-31.

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

DUARTE, I. 2000. Monitorizacao de un Processo de Fermentacao Alcohólica em Continuo. II Seminario. Universidad de Coimbra. Brasil. pp 1-23.

FAJARDO, M.; LORENZO, D. M.; PEREZ. M, J.C.; RISCOS. R, C. A. 2000. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel de *Apis mellifera*. Estación Experimental Apícola. Cuba. pp 1-10.

FAO. 2004. Manejo de la biotecnología para pequeños productores. Estudio de caso en el Perú. pp 1-62.

FAO. 2006. Producción de cultivos primarios. Datos agrícolas de FAOSTAT. pp 123 -151.

FAO/FIDA. 2000. Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Roma, Italia. pp 59.

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

FEDEPALMA. 2005. Colombia entra en la era de los Biocombustibles. Boletín informativo No 397. El Palmicultor. pp 14-17.

FENNEMA, O. 2000. Química de los alimentos. Zaragoza. Acribia. pp 550

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

GARCIA. L, J. A.; GARCIA. C, J. M. 2006. Biocarburantes líquidos: biodisel y bioetanol. Centro de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME).Universidad Rey Juan Carlos. España. pp 1-125.

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

GOTTRET, M. V.; RAYMOND, M. 2000. An Analisys of a Cassava Integrated Research and Development Approach: Has it Really Contributed to Poverty Alleviation? Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. pp 1-33.

GRISALES, P. A.; RIOS, L. A.; TRIANA, M. 2001. Diseño de un proceso de producción de etanol anhidro a partir de jugo de caña. Escuela de Ingeniería Química. Universidad del Valle. pp 1-10.

HIGUERAS, M. 2004. Protocolo de Kioto: Situación actual y perspectivas. España. pp 1-15.

INGRAN, A;, BUTTKE, T. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv MIcrob. Physiol. Vol 25. pp 253-300.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 1998. Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento de Sucre. Ministerio de hacienda y crédito público. Santa Fé de Bogotá. pp 27-71.

KOHL, S. 2003. Technical Connections: Cooking Mash. Ethanol Today. pp 44-45.

KWONG, A.; THOMAS, V. 2001. Ethanol as Lead Replacement: Phasing Out Leaded Gasoline in Africa. Energ. Police. Vol 29. pp 1133-1143.

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.

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

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

LÓPEZ, C. 1998. Estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa, utilizando cuatro sustratos a partir de banano maduro. Tesis de

Licenciatura para la obtención del titulo de Licenciado en Ingeniería Química. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José de Costa Rica.

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

MAGALI, L.; TAVARES, D. L. 2005. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. Ciênc. agrotec. Lavras. Vol 30 pp 1-9.

MAGAÑA, P. I,; MONTES, H. M. C. 2002. Enzimas con aplicación industrial. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avances y Perspectiva. Vol 21. pp 279-282.

MALONEY, W. 2003. Fuel Ethanol as a World Commodity?. Seminario internacional de alcohol carburante Cali. pp27.

MATUDA, T. G. 2004. Analise termica da massa de pao frances durante os processos de congelamento e descongelamento: Optimizacao de uso de aditivos. Dissertacao (Maestrado em ergenharia quimical). Escola politecnica da Universidade de Sao Paulo.

MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. Vol 31. pp 426-428.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2005. Mezcla de etanol y gasolina arrancará en menos ciudades. El Tiempo, Bogotá.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Área, Producción y Rendimientos. Observatorio Agrocadenas Colombia. pp 1-3

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Plata para planta de alcohol carburante. El Meridiano de Sucre. pp 3C.

MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA DE COLOMBIA. 2006. Unidad de planeamiento minero y energético: los biocombustibles en Colombia. Seminario OLADE. Brasilia.

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

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

MOJICA, A,; PAREDES, J. 2004. El cultivo de la caña panelera y la agroindustria panelera en el departamento de Santander. Centro Regional de Estudios Económicos. Bucaramanga. pp 1-26.

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

ORTEGA, S. E. 2006. Documento Experiencias y Resultados del Programa Nacional de Yuca. Informes anuales presentados al CIAT. pp 1-25

ORTEGA, S. E. 2007. Área sembrada con yuca industrial, rendimiento por hectárea y producción por municipio. Informes anuales presentados al CIAT. pp 1-2

ORTEGA, S. E. 2007. Estudio sobre el contenido de materia seca (%) y rendimiento por hectárea (Ton) de las variedades y clones elites que se siembran en los departamentos de Sucre y Córdoba. Trabajo realizado por el CIAT en seis municipios de Sucre y cinco de Córdoba (1996-2006). pp 1-5

ORTEGA, S. E. 2007. Información personal. Investigador I del CIAT, para el departamento de Sucre y Córdoba.

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

PRASANNA, A. 2005. Amylases and Their Applications. African Journal of Biotechnology. Vol 4. pp 1525-1529.

RAKSHIT, S. K. 1998. Utilization of starch industry wastes. In: Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. Blackie Academic and Professional. London.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. 2005. Homegrown for the homeland. Etanol industry Outlook. Disponible en internet: URL: http://www.ethanolrfa.org/outlook2005.html

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Argentina. pp 1–8.

RIBEIRO, E. P,; SERAVALLI, E. A. G. 2004. Química de Alimentos. Edgar Blucher. Sao Paulo. pp 184.

RICO, J. 2006. Biocarburantes en el transporte. Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía (IDEA). Madrid. Vol 7. pp 1-96.

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

VENTURI. F, W. G. ; CEREDA, M. P. 1993. Filtracao de mostos cervejeiros producidos a partir de fécula y fharinas de mandioca. Revista Brasileira de Mandioca. Vol 12. pp 69-74.

VILLENA, M. 2003. Alcohol Carburante: Experiencia Europea. Seminario Internacional de Alcohol Carburante. Cali. pp 47.

VILPOUX, O. 1997. Coordinations verticales entre entreprises transformatrices de manioc et producteurs agricoles, au sud du Brésil. Tesa de Doctorado Economia Industraul. Institut National Polytecnique de Lorraine, unite de formation et recherche en génie des systemes industriels, nancy. pp 233.

VITTI, P. 2001. Biotecnología Industrial: Biotecnología en la producción de alimentos. Sao Paulo. Vol 4. pp 365-380.

VONG TOSÍ, A. 1996. Estudio de la producción de etanol mediante la fermentación de tres sustratos diferentes obtenidos a partir del banano verde. Tesis de Licenciatura para la obtención del titulo de Licenciado en Ingeniería Química. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José de Costa Rica.

WINNICK. 1984. Determinación de etanol en la sangre. Cámara de Winnick.

ANEXOS

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

➢ Enzima pectinex® Ultra SL-P.

Aplicaciones:	➢ Industria alimenticia: tratamientos de pulpa de frutas tejidos vegetales, extracción de aceite vegetales. ➢ Industria de fermentaciones: Procesamiento de bebidas alcohólicas.
Características:	➢ Apariencia: líquido con olor típico de los productos fermentados. ➢ Color: pardo ➢ Densidad: g/ml.
Propiedades según los proveedores:	➢ Actividad: 26,00 PG/ml (pH 3,5 y 20 °C).
Parámetros óptimos:	➢ pH ~ 4,5. ➢ Temperatura: 30 °C.

➢ Enzima termamyl® 120 L, tipo L.

Aplicaciones:	➢ Industria alimenticia: almidón, alcohol, azúcar y cerveza. ➢ Industria de fermentaciones: vitaminas, aminoácidos, antibióticos, etc. ➢ Industria textil y adhesivos.
Características:	➢ Apariencia: líquido no viscoso de grado alimenticio. ➢ Color: marrón oscuro ➢ Densidad: 1,20 – 1,25 g/ml
Propiedades según los proveedores:	➢ Actividad: 120, KNU/g (1 KNU: cantidad de enzima que rompe 5,26 g de almidón por hora, avalado por el método estándar de Novozymes A/S).
Parámetros óptimos:	➢ pH: 6,5 ➢ Temperatura: 90 – 105 °C. ➢ Calcio: 50 – 70 ppm.

➢ Enzima AMG 300L.

Aplicaciones:	➢ Industria alimenticia: producción de glucosa y fructosa, bajar la viscosidad de los cereales, en alimentos para bebé. ➢ Industrial del papel: protección contra daños mecánicos. ➢ Industria de fermentaciones: producción de cerveza clara.
Características:	➢ Apariencia: líquido. ➢ Color: marrón. ➢ Densidad: 1,2 g/ml.
Propiedades según los proveedores:	➢ Actividad: 1 Unidad Novo Amiloglucosidasa (AGU): Cantidad de enzima que hidroliza 1µmol de maltosa / minuto a condiciones estándar.
Parámetros óptimos:	➢ pH ~ 4,5. ➢ Temperatura: 60 °C.

Anexo B. *Saccharomyces cerevisiae* y nutrientes empleados en los Inóculos para las variedades Venezolana y MTAI 8.

- **Variedad MCOL 2215 (Venezolana).**

Levadura y Nutrientes	**Concentración de harina**		
	10% p/v	**13% p/v**	**16% p/v**
	Peso (g)		
Saccharomyces cerevisiae	2.1856	2.8412	3.4976
Urea	11.912	15.4856	19.0592
$MgCl_2$	0.428	0.5564	0.6848
NaCl	0.0544	0.0704	0.0868**
$NaHPO_4$	2.1808	2.8348	3.4892
$CaCO_3$	0.1388	0.1804	0.222
$FeSO_4$	0.1864	0.242	0.298
$MnSO_4$	0.004	0.0052	0.0064

- **Variedad MTAI 8.**

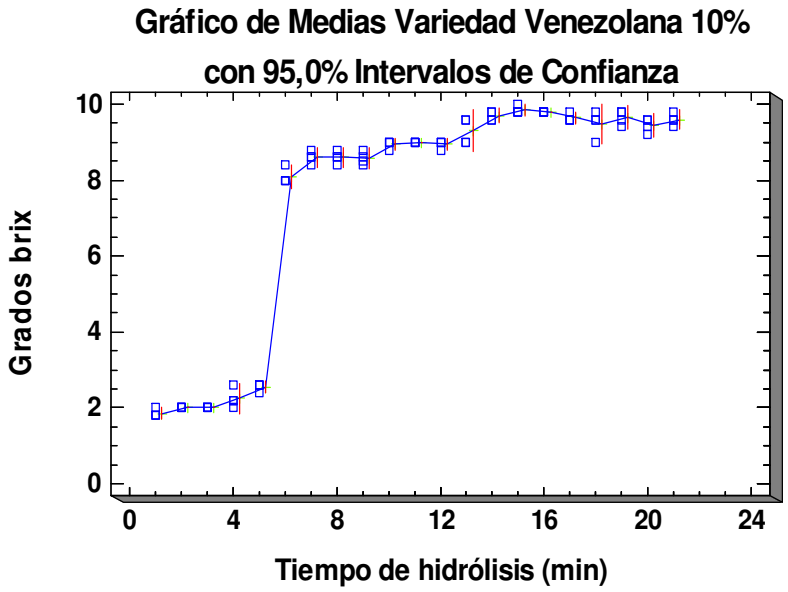
Levadura y Nutrientes	**Concentración de harina**		
	10% p/v	**13% p/v**	**16% p/v**
	Peso (g)		
Saccharomyces cerevisiae	2.24	2.912	3.584
Urea	12.224	15.8912	19.5584
$MgCl_2$	0.4392	0.5708	0.7024
NaCl	0.056	0.0728	0.0896
$NaHPO_4$	2.236	2.9068	3.5776
$CaCO_3$	0.14	0.178	0.224
$FeSO_4$	0.188	0.244	0.3008
$MnSO_4$	0.004	0.0052	0.0064

Anexo C. Resúmenes estadístico de los grados brix durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana.

➢ Grados brix concentración 10% p/v.

Resúmenes Estadísticos

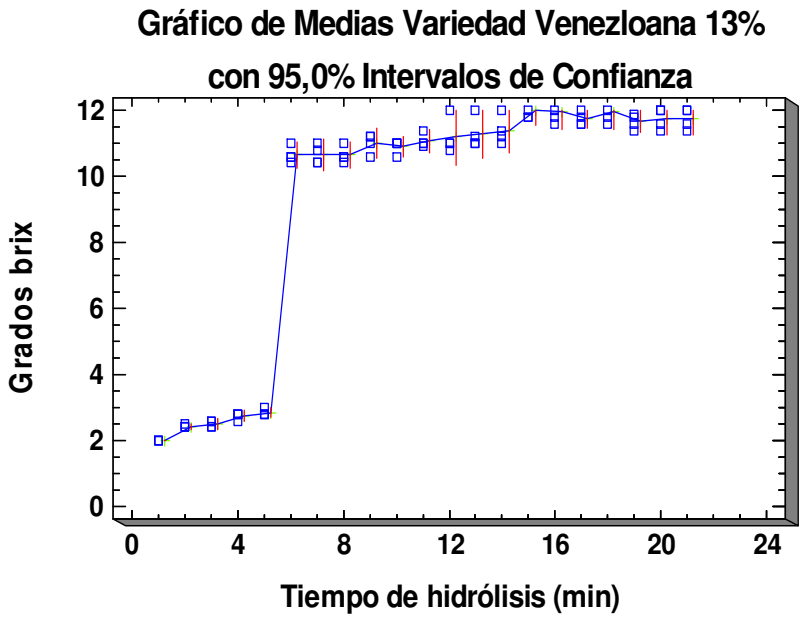
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	1,85	1,8	0,1	0,2
2	4	2,0	2,0	0,0	0,0
3	4	2,0	2,0	0,0	0,0
4	4	2,25	2,2	0,251661	0,6
5	4	2,55	2,6	0,1	0,2
6	4	8,1	8,0	0,2	0,4
7	4	8,6	8,6	0,163299	0,4
8	4	8,6	8,6	0,163299	0,4
9	4	8,575	8,55	0,170783	0,4
10	4	8,95	9,0	0,1	0,2
11	4	9,0	9,0	0,0	0,0
12	4	8,95	9,0	0,1	0,2
13	4	9,3	9,3	0,34641	0,6
14	4	9,7	9,7	0,11547	0,2
15	4	9,85	9,8	0,1	0,2
16	4	9,8	9,8	0,0	0,0
17	4	9,65	9,6	0,1	0,2
18	4	9,5	9,6	0,34641	0,8
19	4	9,65	9,7	0,191485	0,4
20	4	9,45	9,5	0,191485	0,4
21	4	9,6	9,6	0,163299	0,4
Total	84	7,52024	9,0	3,0708	8,2



➢ Grados brix concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

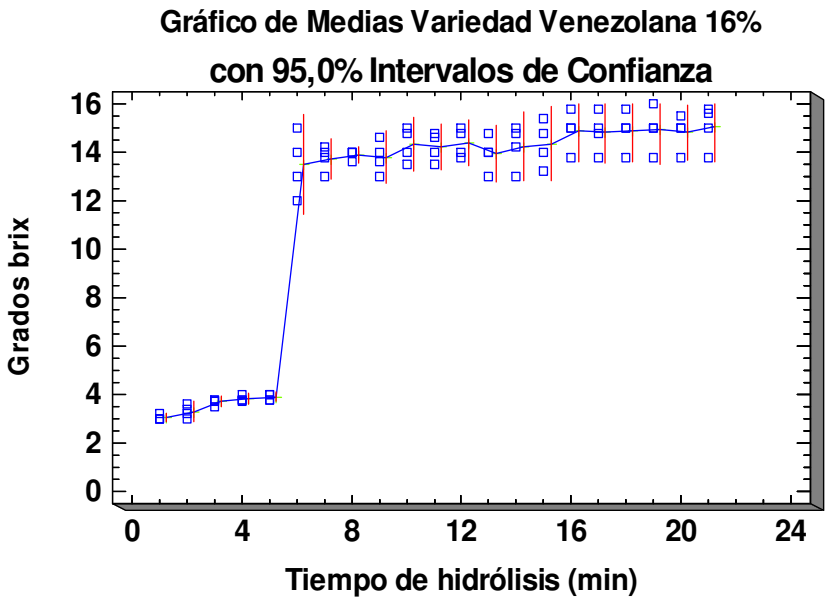
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	2,0	2,0	0,0	0,0
2	4	2,425	2,4	0,05	0,1
3	4	2,5	2,5	0,11547	0,2
4	4	2,75	2,8	0,1	0,2
5	4	2,85	2,8	0,1	0,2
6	4	10,65	10,6	0,251661	0,6
7	4	10,65	10,6	0,3	0,6
8	4	10,65	10,6	0,251661	0,6
9	4	11,0	11,1	0,282843	0,6
10	4	10,9	11,0	0,2	0,4
11	4	11,075	11,0	0,221736	0,5
12	4	11,2	11,0	0,541603	1,2
13	4	11,3	11,1	0,476095	1,0
14	4	11,4	11,3	0,432049	1,0
15	4	12,0	11,9	0,282843	0,6
16	4	11,95	11,9	0,341565	0,8
17	4	11,75	11,7	0,191485	0,4
18	4	11,95	11,9	0,341565	0,8
19	4	11,675	11,7	0,221736	0,5
20	4	11,75	11,8	0,3	0,6
21	4	11,75	11,8	0,3	0,6
Total	84	9,24643	11,0	3,82504	10,4



➢ Grados brix concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	3,05	3,0	0,1	0,2
2	4	3,3	3,3	0,258199	0,6
3	4	3,7	3,75	0,141421	0,3
4	4	3,825	3,8	0,125831	0,3
5	4	3,9	3,9	0,11547	0,2
6	4	13,5	13,5	1,29099	3,0
7	4	13,75	13,9	0,525991	1,2
8	4	13,9	14,0	0,2	0,4
9	4	13,8	13,8	0,6733	1,6
10	4	14,325	14,4	0,699405	1,5
11	4	14,225	14,3	0,590903	1,3
12	4	14,4	14,4	0,588784	1,2
13	4	13,95	14,0	0,737111	1,8
14	4	14,25	14,5	0,9	2,0
15	4	14,35	14,4	0,957427	2,2
16	4	14,9	15,0	0,824621	2,0
17	4	14,85	14,9	0,822598	2,0
18	4	14,9	15,0	0,824621	2,0
19	4	14,95	15,0	0,9	2,2
20	4	14,825	15,0	0,722842	1,7
21	4	15,05	15,3	0,9	2,0
Total	84	11,7952	14,0	4,69547	13,0

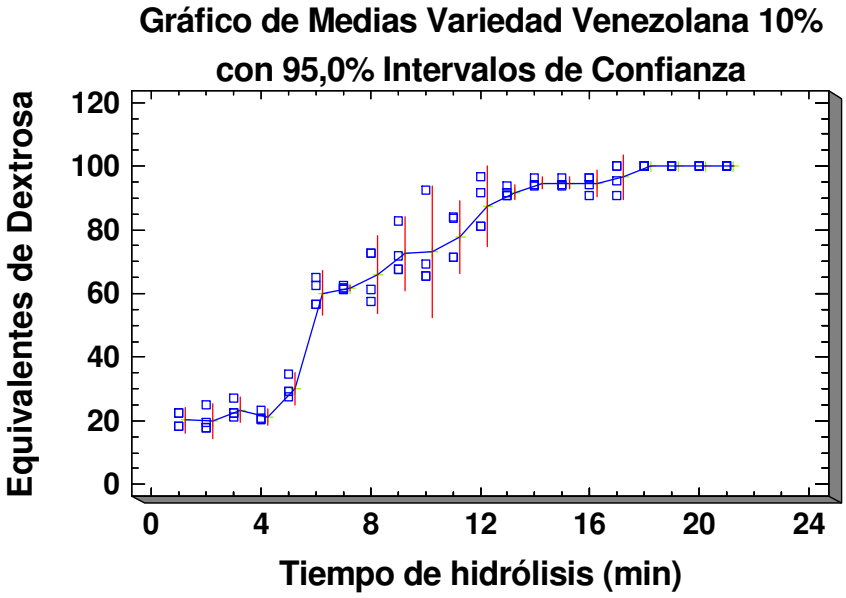


Anexo D. Resúmenes estadísticos de los equivalentes de dextrosa (E.D) durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana.

- **Equivalentes de dextrosa concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

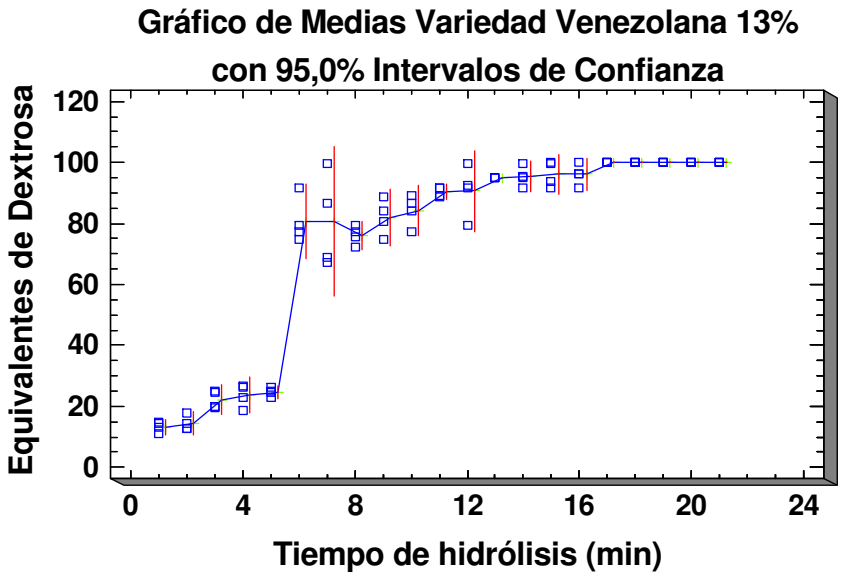
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	20,2636	20,2875	2,51465	4,40285
2	4	19,9328	18,5968	3,32453	7,01689
3	4	23,3642	22,5551	2,50811	5,70144
4	4	21,2162	20,5005	1,51129	3,09091
5	4	30,159	29,1771	3,18407	7,2881
6	4	60,1955	59,5946	4,29183	8,43854
7	4	61,7885	61,5845	0,55803	1,23915
8	4	65,9212	66,7893	7,74001	14,9155
9	4	72,4512	69,7097	7,2727	15,4102
10	4	73,1387	67,3828	12,943	26,9235
11	4	77,5806	77,4882	7,17343	12,6068
12	4	87,5755	86,2468	7,9416	15,8893
13	4	91,7827	91,1786	1,4834	3,12707
14	4	94,6721	94,1426	1,19065	2,5026
15	4	94,6721	94,1426	1,19065	2,5026
16	4	94,4679	95,2977	2,6627	5,62967
17	4	96,5445	97,6773	4,39811	9,1768
18	4	100,0	100,0	0,0	0,0
19	4	100,0	100,0	0,0	0,0
20	4	100,0	100,0	0,0	0,0
21	4	100,0	100,0	0,0	0,0
Total	84	70,7489	81,9287	29,9632	82,2395



➢ Equivalentes de dextrosa concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

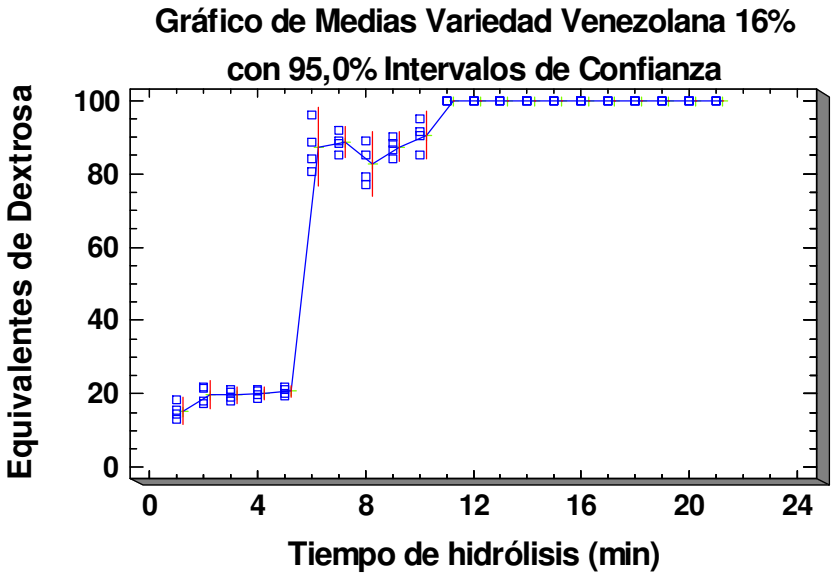
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	13,3558	13,6918	1,57397	3,56014
2	4	14,4606	13,718	2,39897	5,23735
3	4	22,2205	22,1029	3,00111	5,6232
4	4	23,6389	24,5917	3,64057	7,93439
5	4	24,6994	24,8071	1,28235	3,05027
6	4	80,6829	78,225	7,58824	17,1084
7	4	80,5101	77,6783	15,3869	32,2581
8	4	76,0584	76,3286	2,94965	6,98519
9	4	81,9966	82,4157	5,90057	13,9816
10	4	84,2518	85,3449	5,14796	11,9794
11	4	90,2767	90,4218	1,65479	3,12681
12	4	90,7155	92,0552	8,3916	20,19
13	4	94,8176	94,8176	0,0	0,0
14	4	95,3095	95,0361	3,19512	7,77585
15	4	96,2493	96,6511	4,12451	8,30496
16	4	96,0984	96,3511	3,40549	8,30856
17	4	100,0	100,0	0,0	0,0
18	4	100,0	100,0	0,0	0,0
19	4	100,0	100,0	0,0	0,0
20	4	100,0	100,0	0,0	0,0
21	4	100,0	100,0	0,0	0,0
Total	84	74,5401	91,6932	32,0401	88,7602



➢ Equivalentes de dextrosa concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	15,2977	15,0095	2,26826	5,34486
2	4	19,7612	19,8251	2,39074	4,53424
3	4	19,67	19,8035	1,48426	3,30531
4	4	20,1287	20,364	1,10546	2,31839
5	4	20,7267	20,7284	1,0107	2,28114
6	4	87,3715	86,41	6,71836	15,6458
7	4	88,6069	88,8034	2,70613	6,56914
8	4	82,6798	82,2034	5,4675	11,9742
9	4	87,3286	87,4584	2,54536	5,89403
10	4	90,502	90,8683	4,12459	9,98
11	4	100,0	100,0	0,0	0,0
12	4	100,0	100,0	0,0	0,0
13	4	100,0	100,0	0,0	0,0
14	4	100,0	100,0	0,0	0,0
15	4	100,0	100,0	0,0	0,0
16	4	100,0	100,0	0,0	0,0
17	4	100,0	100,0	0,0	0,0
18	4	100,0	100,0	0,0	0,0
19	4	100,0	100,0	0,0	0,0
20	4	100,0	100,0	0,0	0,0
21	4	100,0	100,0	0,0	0,0
Total	84	77,7178	100,0	33,4619	87,0866

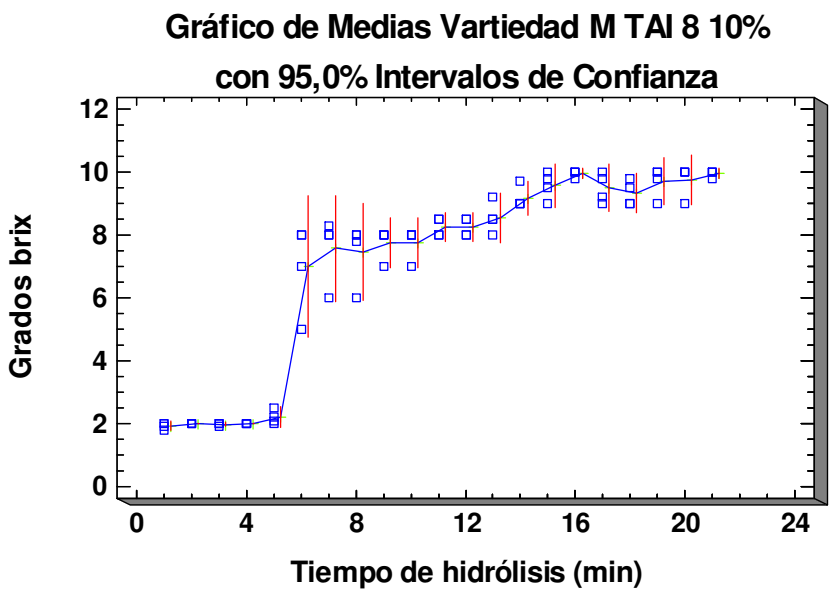


Anexo E. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8.

➢ Grados brix concentración 10% p/v.

Resúmenes Estadísticos

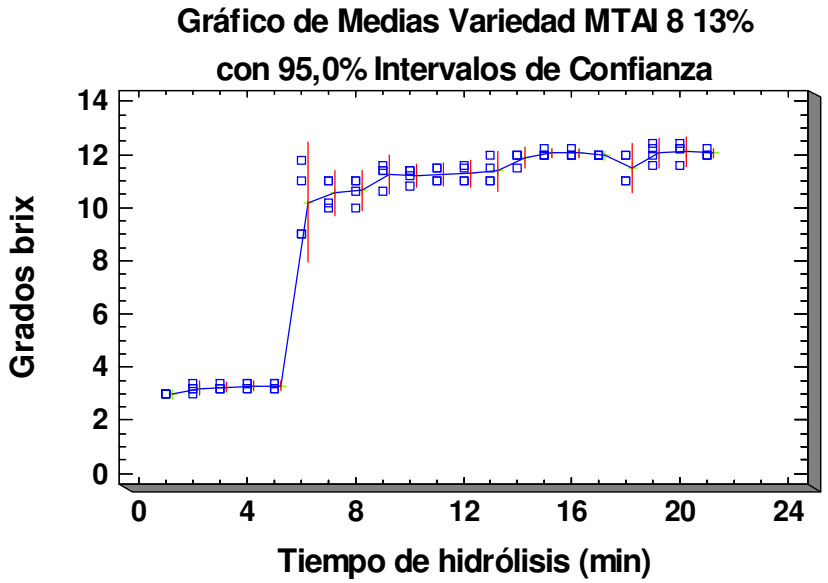
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	1,925	1,95	0,0957427	0,2
2	4	2,0	2,0	0,0	0,0
3	4	1,975	2,0	0,05	0,1
4	4	2,0	2,0	0,0	0,0
5	4	2,2	2,15	0,216025	0,5
6	4	7,0	7,5	1,41421	3,0
7	4	7,575	8,0	1,05948	2,3
8	4	7,45	7,9	0,971253	2,0
9	4	7,75	8,0	0,5	1,0
10	4	7,75	8,0	0,5	1,0
11	4	8,25	8,25	0,288675	0,5
12	4	8,25	8,25	0,288675	0,5
13	4	8,55	8,5	0,493288	1,2
14	4	9,175	9,0	0,35	0,7
15	4	9,575	9,65	0,434933	1,0
16	4	9,95	10,0	0,1	0,2
17	4	9,5	9,5	0,476095	1,0
18	4	9,325	9,25	0,394757	0,8
19	4	9,7	9,9	0,476095	1,0
20	4	9,75	10,0	0,5	1,0
21	4	9,95	10,0	0,1	0,2
Total	84	7,12381	8,0	3,03278	8,2



➢ Grados brix concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

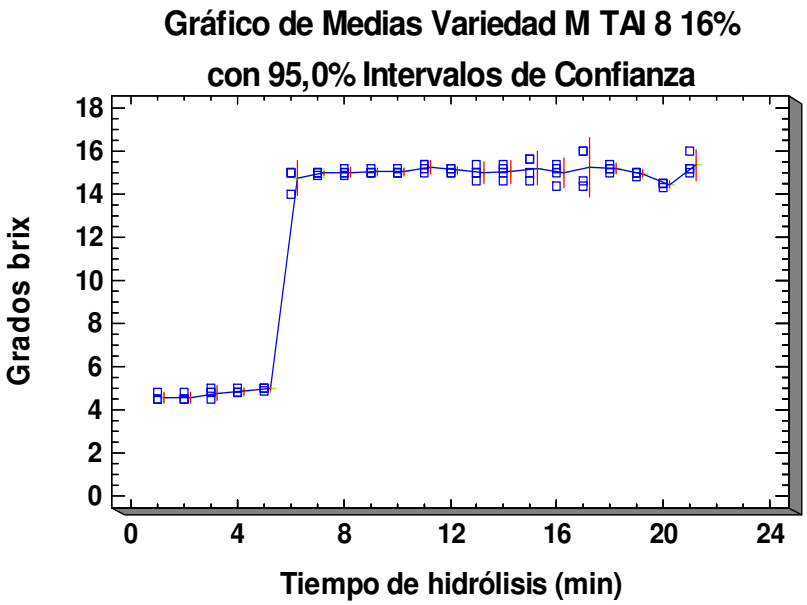
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	3,0	3,0	0,0	0,0
2	4	3,2	3,2	0,163299	0,4
3	4	3,25	3,2	0,1	0,2
4	4	3,3	3,3	0,11547	0,2
5	4	3,3	3,3	0,11547	0,2
6	4	10,2	10,0	1,42361	2,8
7	4	10,55	10,6	0,525991	1,0
8	4	10,65	10,8	0,472582	1,0
9	4	11,25	11,4	0,443471	1,0
10	4	11,2	11,3	0,282843	0,6
11	4	11,25	11,25	0,288675	0,5
12	4	11,275	11,25	0,320156	0,6
13	4	11,375	11,25	0,478714	1,0
14	4	11,875	12,0	0,25	0,5
15	4	12,05	12,0	0,1	0,2
16	4	12,05	12,0	0,1	0,2
17	4	12,0	12,0	0,0	0,0
18	4	11,5	11,5	0,57735	1,0
19	4	12,05	12,1	0,341565	0,8
20	4	12,1	12,2	0,34641	0,8
21	4	12,05	12,0	0,1	0,2
Total	84	9,49881	11,3	3,59449	9,4



➢ Grados brix concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	4,575	4,5	0,15	0,3
2	4	4,575	4,5	0,15	0,3
3	4	4,775	4,8	0,206155	0,5
4	4	4,85	4,8	0,1	0,2
5	4	4,975	5,0	0,05	0,1
6	4	14,75	15,0	0,5	1,0
7	4	14,975	15,0	0,05	0,1
8	4	15,025	15,0	0,125831	0,3
9	4	15,05	15,0	0,1	0,2
10	4	15,05	15,0	0,1	0,2
11	4	15,25	15,3	0,191485	0,4
12	4	15,1	15,1	0,11547	0,2
13	4	15,0	15,0	0,326599	0,8
14	4	15,05	15,1	0,341565	0,8
15	4	15,2	15,3	0,489898	1,0
16	4	15,0	15,1	0,432049	1,0
17	4	15,25	15,3	0,869866	1,6
18	4	15,2	15,2	0,163299	0,4
19	4	14,95	15,0	0,1	0,2
20	4	14,45	14,5	0,1	0,2
21	4	15,35	15,2	0,443471	1,0
Total	84	12,5905	15,0	4,42225	11,5

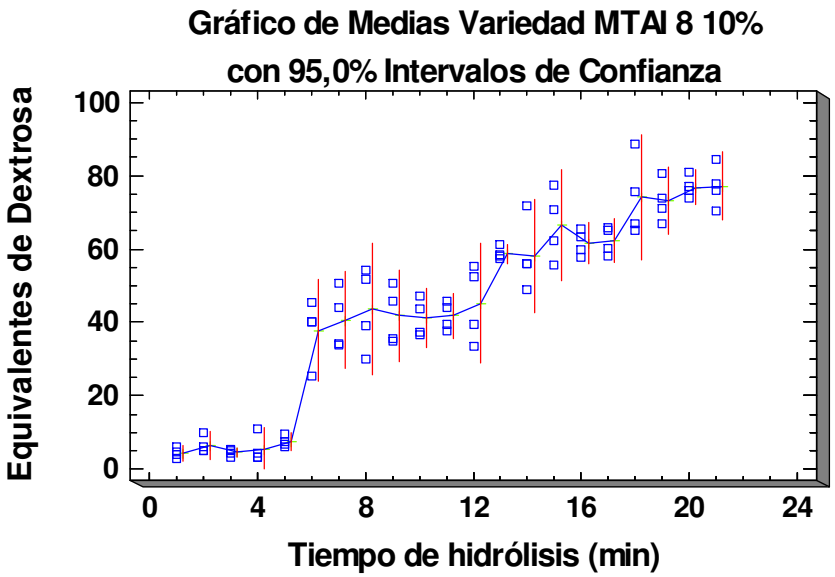


Anexo F. Resúmenes estadísticos de los equivalentes de dextrosa (E.D) durante la hidrólisis enzimática de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8.

➢ Equivalentes de dextrosa concentración 10% p/v.

Resúmenes Estadísticos

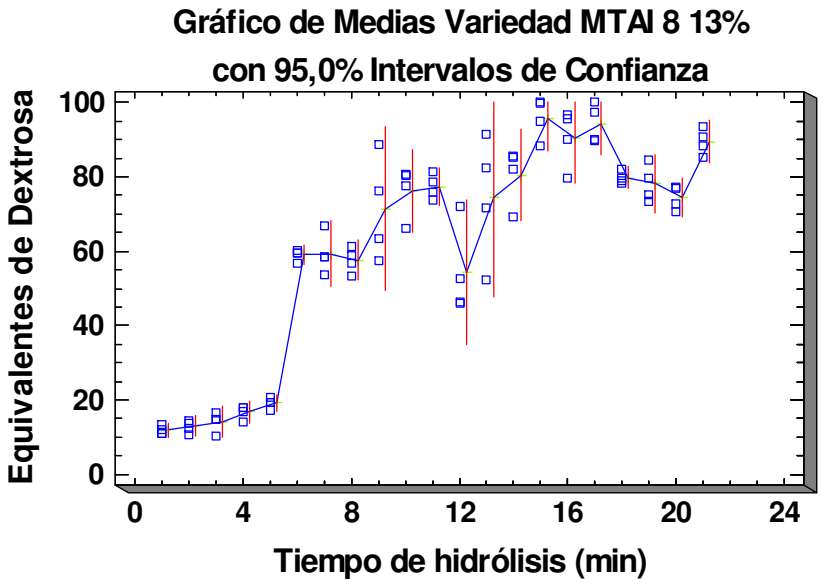
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	4,34094	4,29626	1,24349	3,02108
2	4	6,50702	5,5911	2,40453	5,19419
3	4	4,476	4,61778	0,8267	1,91164
4	4	5,36686	3,67196	3,78038	7,8567
5	4	7,4978	7,17163	1,52141	3,50849
6	4	37,8321	40,1854	8,66625	20,1569
7	4	40,6635	39,0916	8,23229	17,0737
8	4	43,7012	45,3542	11,355	24,2416
9	4	41,7408	40,6847	7,89202	15,9509
10	4	41,1475	40,4607	5,12486	10,6
11	4	41,7867	41,7514	3,7952	7,95615
12	4	45,2213	45,953	10,3495	21,7833
13	4	58,7447	58,2554	1,6673	3,82386
14	4	58,1261	55,9666	9,65466	22,8466
15	4	66,4765	66,5133	9,50166	21,6963
16	4	61,5196	61,5375	3,48836	7,80062
17	4	62,2925	62,6603	3,7437	7,44042
18	4	74,0915	71,2192	10,7222	23,4512
19	4	73,0991	72,4162	5,71778	13,5638
20	4	76,8763	76,3964	2,94223	7,00698
21	4	77,2109	76,858	5,78795	13,9997
Total	84	44,2247	47,9982	25,6151	85,8143



➢ Equivalentes de dextrosa concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

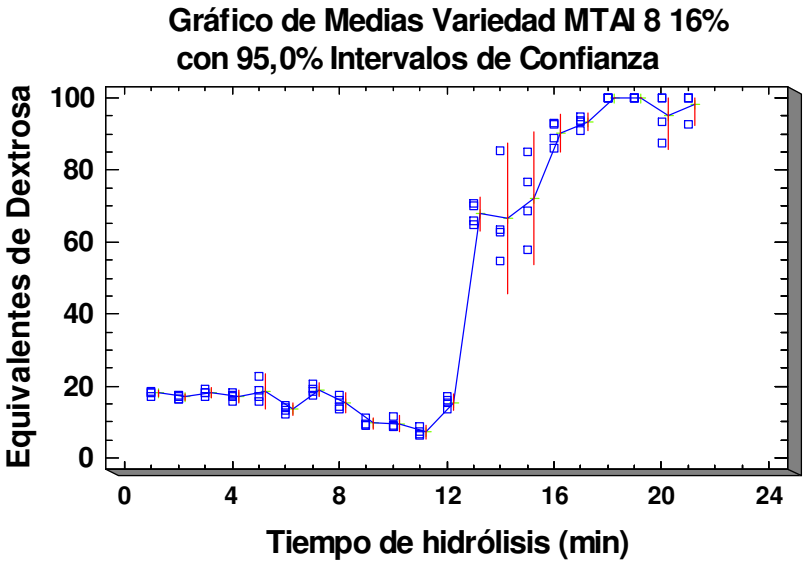
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	11,8618	11,531	1,29948	2,75198
2	4	12,8934	13,1492	1,74418	3,9305
3	4	14,1256	14,8646	2,64428	6,12739
4	4	16,7283	17,3717	1,77636	3,83336
5	4	19,1517	19,2733	1,34653	3,28018
6	4	59,0299	59,5809	1,57018	3,51549
7	4	59,3459	58,5413	5,49913	13,2755
8	4	57,5854	57,8588	3,35838	7,89052
9	4	71,4612	69,8694	13,8335	30,9906
10	4	76,1499	78,976	6,89706	14,6536
11	4	77,3935	77,2514	3,2056	7,41206
12	4	54,214	49,4586	12,1748	25,8407
13	4	74,4461	76,9919	16,8423	39,13
14	4	80,486	83,63	7,74388	16,4682
15	4	95,7373	97,3798	5,54485	11,8106
16	4	90,4741	92,8222	7,77425	16,9207
17	4	94,3058	93,7085	5,18825	10,1938
18	4	79,7758	79,3349	1,78093	4,06901
19	4	78,1676	77,4031	4,93909	11,0837
20	4	74,3206	74,8558	3,25044	6,58817
21	4	89,4521	89,5336	3,57401	8,40781
Total	84	61,2908	71,714	28,9703	89,6772



➢ Equivalentes de dextrosa concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	17,9931	18,2313	0,620206	1,36143
2	4	16,9164	16,8111	0,55009	1,14205
3	4	18,0467	18,0841	0,879061	2,14699
4	4	17,0434	17,285	1,03364	2,36619
5	4	18,5401	17,8565	3,02276	6,93323
6	4	13,5484	13,6014	1,10108	2,54726
7	4	18,9393	18,8907	1,19492	2,85684
8	4	15,3699	15,1393	1,82655	3,98437
9	4	9,69276	9,36201	0,958461	2,11873
10	4	9,4883	8,89103	1,38709	2,93625
11	4	7,2027	6,85454	1,13277	2,51561
12	4	15,4687	15,6071	1,49875	3,58297
13	4	67,8713	67,8764	2,94674	5,98147
14	4	66,5193	63,0371	13,1797	30,7413
15	4	72,0701	72,7281	11,5414	27,0634
16	4	90,1885	90,8256	3,31323	7,02092
17	4	93,2201	93,5246	1,52492	3,6293
18	4	100,0	100,0	0,0	0,0
19	4	100,0	100,0	0,0	0,0
20	4	95,2347	96,7268	6,01787	12,5149
21	4	98,1349	100,0	3,73016	7,46031
Total	84	45,7852	18,5077	37,2897	93,7069

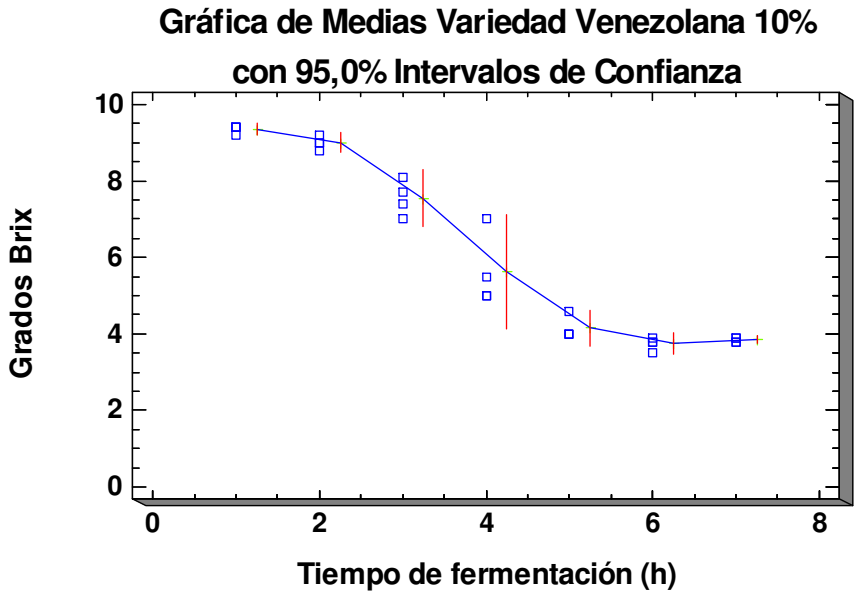


Anexo G. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana.

- **Grados brix concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

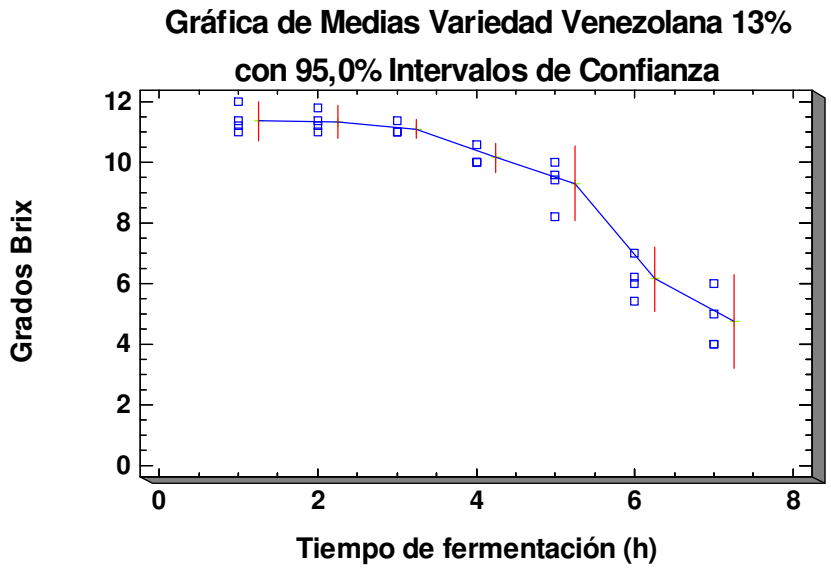
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	9,35	9,4	0,1	0,2
2	4	8,95	8,9	0,191485	0,4
3	4	7,375	7,2	0,518813	1,1
4	4	5,5	5,0	1,0	2,0
5	4	4,15	4,0	0,3	0,6
6	4	3,85	3,85	0,057735	0,1
7	4	3,825	3,8	0,05	0,1
Total	0	3,44899E-307	4,45048E-308	4,45028E-308	3,449E-307



➢ Grados brix concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

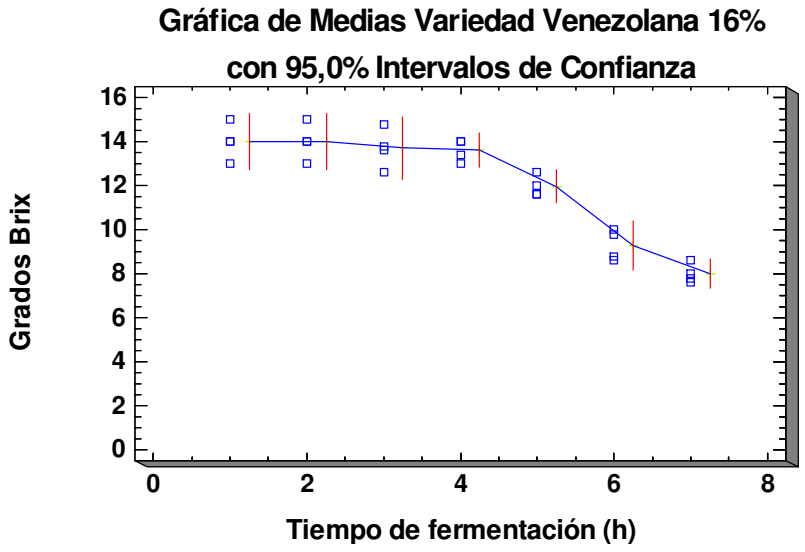
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	11,4	11,3	0,432049	1,0
2	4	11,35	11,3	0,341565	0,8
3	4	11,1	11,0	0,2	0,4
4	4	10,15	10,0	0,3	0,6
5	4	9,3	9,5	0,774597	1,8
6	4	6,15	6,1	0,660808	1,6
7	4	4,75	4,5	0,957427	2,0
Total	0	3,44899E-307	4,45048E-308	4,45028E-308	3,449E-307



➢ Grados brix concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	14,0	14,0	0,816497	2,0
2	4	14,0	14,0	0,816497	2,0
3	4	13,7	13,7	0,90185	2,2
4	4	13,6	13,7	0,489898	1,0
5	4	11,95	11,8	0,472582	1,0
6	4	9,3	9,3	0,702377	1,4
7	4	8,0	7,9	0,432049	1,0
Total	0	3,44899E-307	4,45048E-308	4,45028E-308	3,449E-307

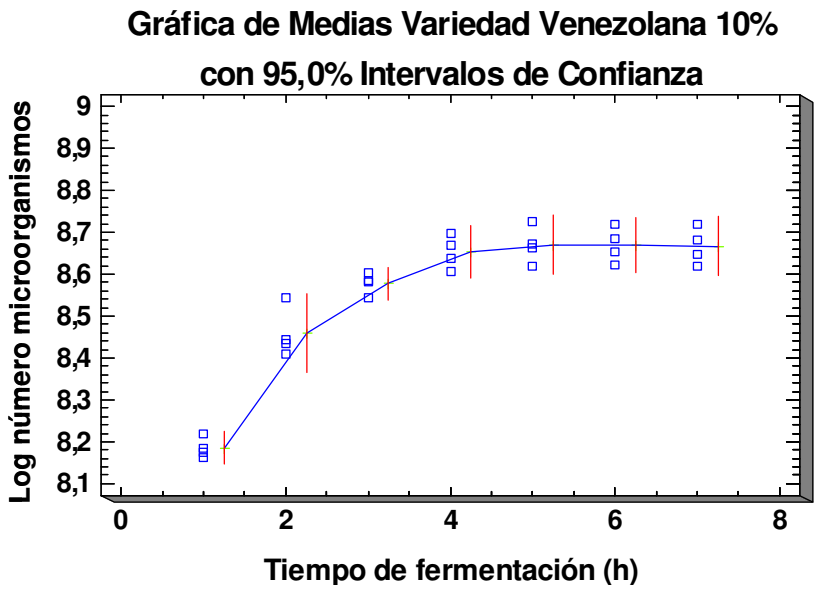


Anexo H. Resúmenes estadísticos del logaritmo del número de microorganismos durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana.

- **Crecimiento de microorganismos concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

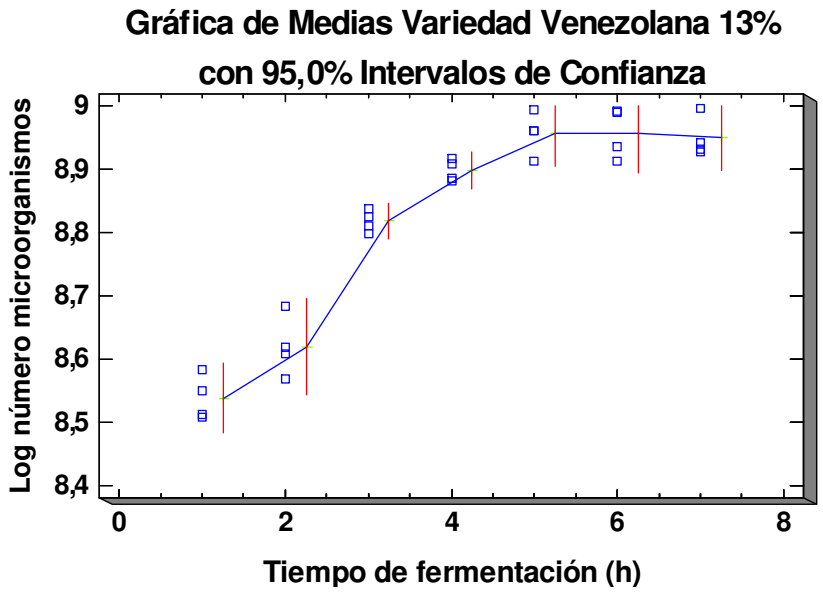
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	8,18482	8,17968	0,024257	0,0571656
2	4	8,45837	8,43931	0,0587838	0,133291
3	4	8,57784	8,58262	0,02442	0,0579919
4	4	8,65313	8,65414	0,0386622	0,0893381
5	4	8,66981	8,66743	0,0444507	0,108272
6	4	8,66971	8,66875	0,041142	0,094837
7	4	8,66634	8,66358	0,0442264	0,102111
Total	0	5,41117E-312	1,38796E-309	3,02541E-306	2,122E-313



➢ Crecimiento de microorganismos concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

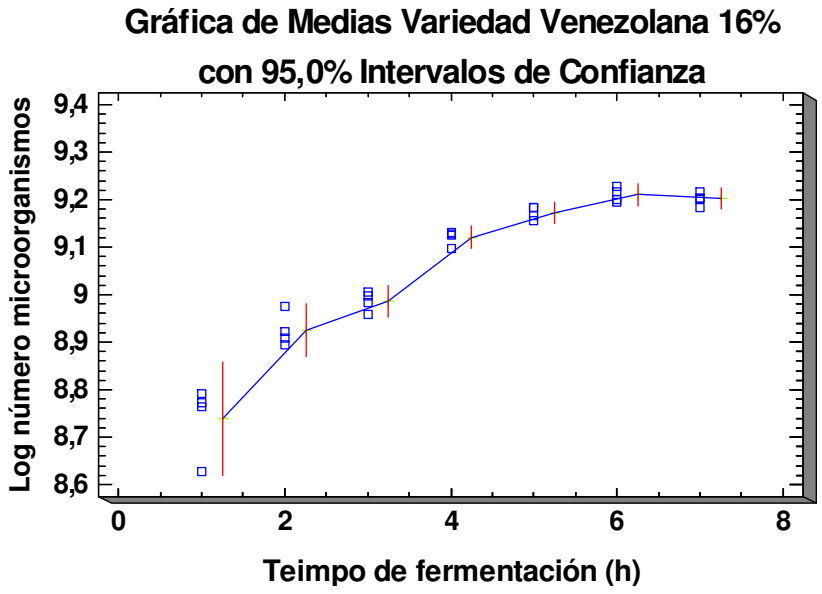
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	8,53832	8,53106	0,0350793	0,0741017
2	4	8,6193	8,61275	0,0478686	0,115296
3	4	8,81805	8,81866	0,0173006	0,039659
4	4	8,89801	8,89678	0,0178846	0,0368664
5	4	8,95747	8,96142	0,0338063	0,0820493
6	4	8,95741	8,96295	0,0395754	0,0787383
7	4	8,94971	8,93699	0,0318872	0,0685908
Total	0	5,41117E-312	1,38796E-309	3,02541E-306	2,122E-313



➢ Crecimiento de microorganismos concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	8,73879	8,76806	0,0744595	0,162248
2	4	8,92481	8,91573	0,035112	0,080797
3	4	8,98656	8,99119	0,0206147	0,0469287
4	4	9,12039	9,12588	0,0147987	0,0324935
5	4	9,1721	9,17492	0,0141834	0,0294051
6	4	9,20999	9,20878	0,014964	0,0333724
7	4	9,20181	9,20256	0,0139735	0,0341602
Total	0	5,41117E-312	1,38796E-309	3,02541E-306	2,122E-313

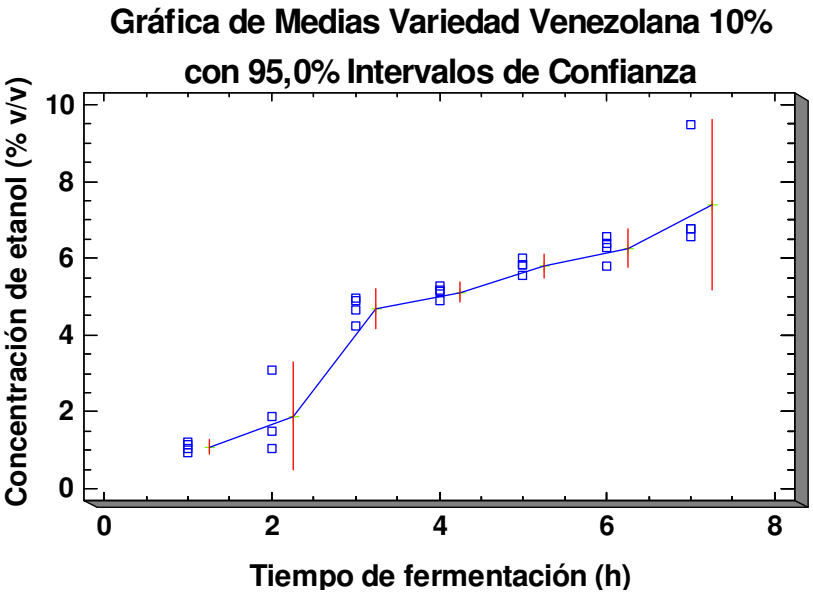


Anexo I. Resúmenes estadísticos de la producción de etanol (% v/v) durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad Venezolana.

- **Producción de etanol concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

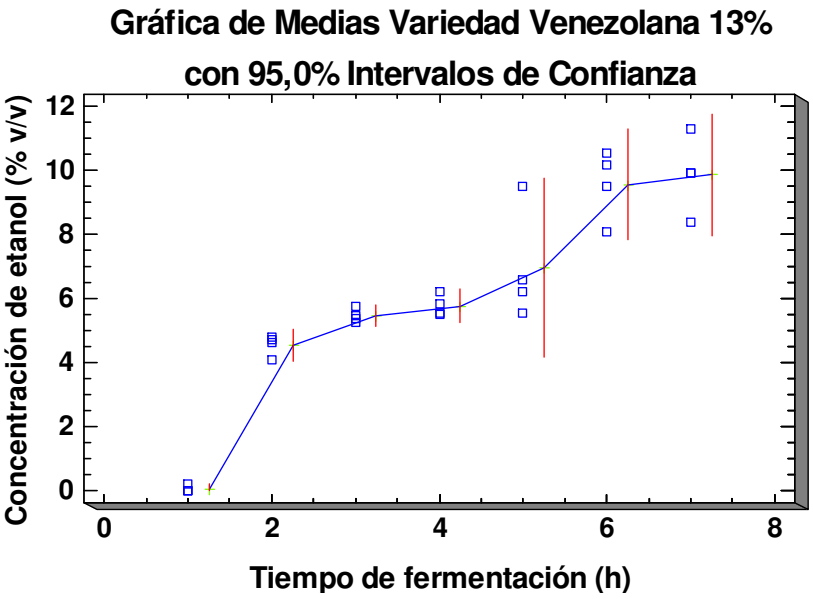
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	1,081	1,081	0,121353	0,282
2	4	1,88	1,692	0,885132	2,068
3	4	4,68825	4,7705	0,335373	0,752
4	4	5,11125	5,1465	0,159961	0,376
5	4	5,8045	5,828	0,193786	0,47
6	4	6,26335	6,345	0,318869	0,7402
7	4	7,4025	6,768	1,39715	2,914
Total	0	5,41117E-312	1,38796E-309	3,02541E-306	2,122E-313



➢ Producción de etanol concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

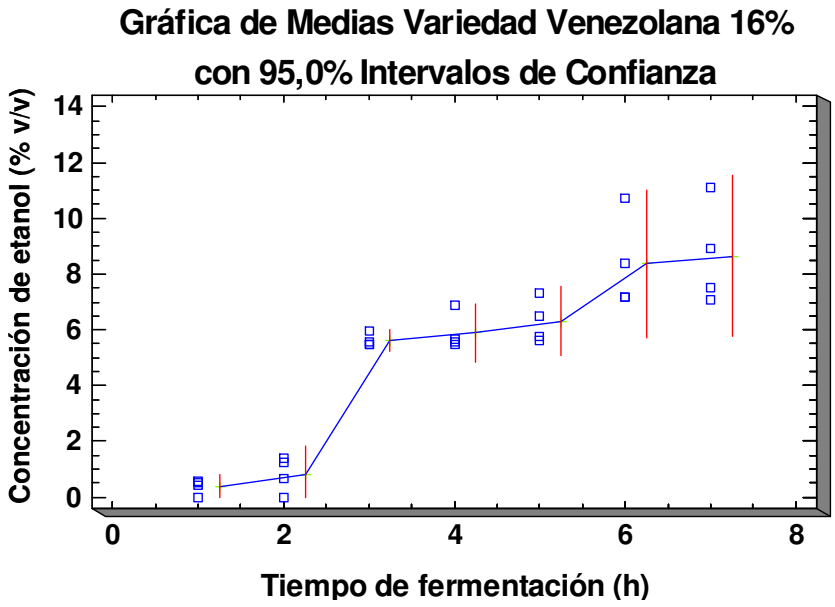
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	0,047	0,0	0,094	0,188
2	4	4,54725	4,653	0,314994	0,705
3	4	5,452	5,405	0,203063	0,47
4	4	5,76925	5,687	0,324209	0,705
5	4	6,956	6,392	1,74513	3,948
6	4	9,5645	9,823	1,07554	2,444
7	4	9,87	9,917	1,19087	2,914
Total	0	4,85634E-300	5,29268E-315	1,59098E-314	5,01215E50



➢ **Producción de etanol concentración 16% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	0,376	0,47	0,25743	0,564
2	4	0,8272	0,9494	0,638647	1,41
3	4	5,60475	5,499	0,246843	0,517
4	4	5,88675	5,6165	0,6573	1,41
5	4	6,30975	6,1335	0,7755	1,692
6	4	8,366	7,7785	1,6617	3,525
7	4	8,648	8,225	1,81463	4,042
Total	0	4,85634E-300	5,29268E-315	1,59098E-314	5,01215E50

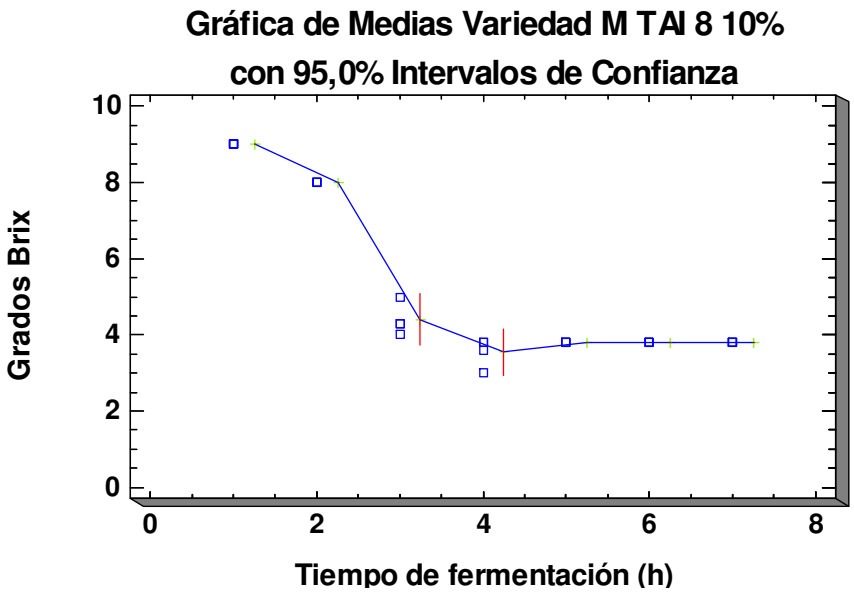


Anexo J. Resúmenes estadísticos de los grados brix durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8.

- **Grados brix concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

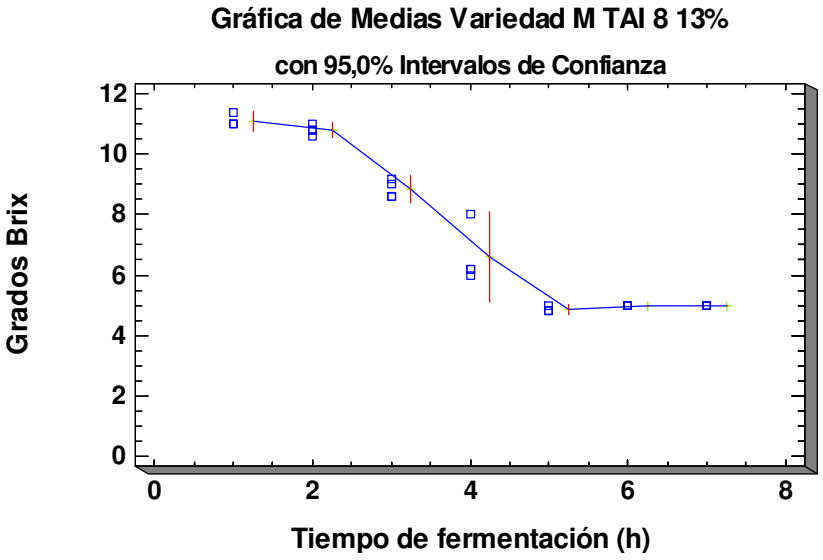
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	9,0	9,0	0,0	0,0
2	4	8,0	8,0	0,0	0,0
3	4	4,4	4,3	0,424264	1,0
4	4	3,55	3,7	0,378594	0,8
5	4	3,8	3,8	0,0	0,0
6	4	3,8	3,8	0,0	0,0
7	4	3,8	3,8	0,0	0,0
Total	28	5,19286	3,8	2,1693	6,0



➢ Grados brix concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

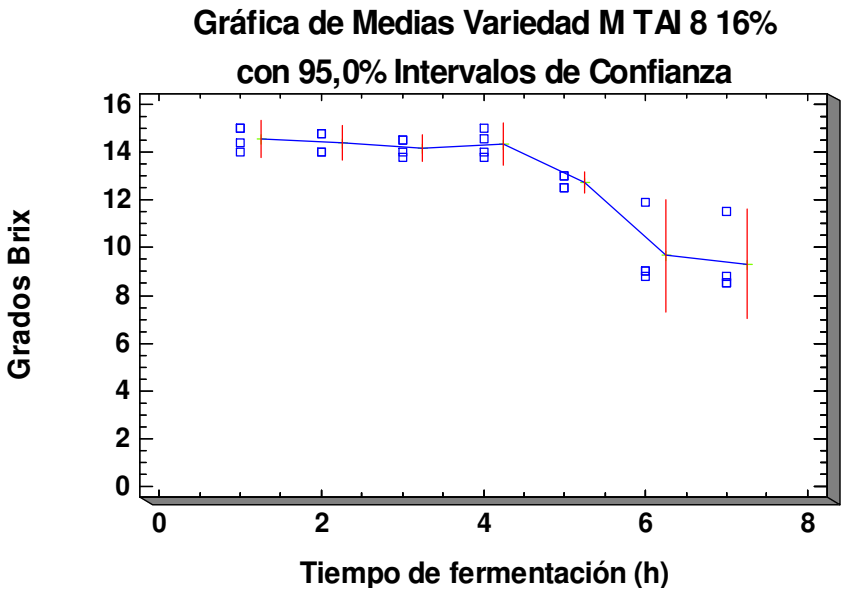
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	11,1	11,0	0,2	0,4
2	4	10,8	10,8	0,163299	0,4
3	4	8,85	8,8	0,3	0,6
4	4	6,6	6,2	0,938083	2,0
5	4	4,85	4,8	0,1	0,2
6	4	5,0	5,0	0,0	0,0
7	4	5,0	5,0	0,0	0,0
Total	28	7,45714	6,2	2,63248	6,6



- **Grados brix concentración 16% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	14,6	14,7	0,489898	1,0
2	4	14,4	14,4	0,46188	0,8
3	4	14,2	14,25	0,355903	0,7
4	4	14,35	14,3	0,550757	1,2
5	4	12,75	12,75	0,288675	0,5
6	4	9,675	9,0	1,48633	3,1
7	4	9,325	8,65	1,45688	3,0
Total	28	12,7571	13,9	2,30835	6,5

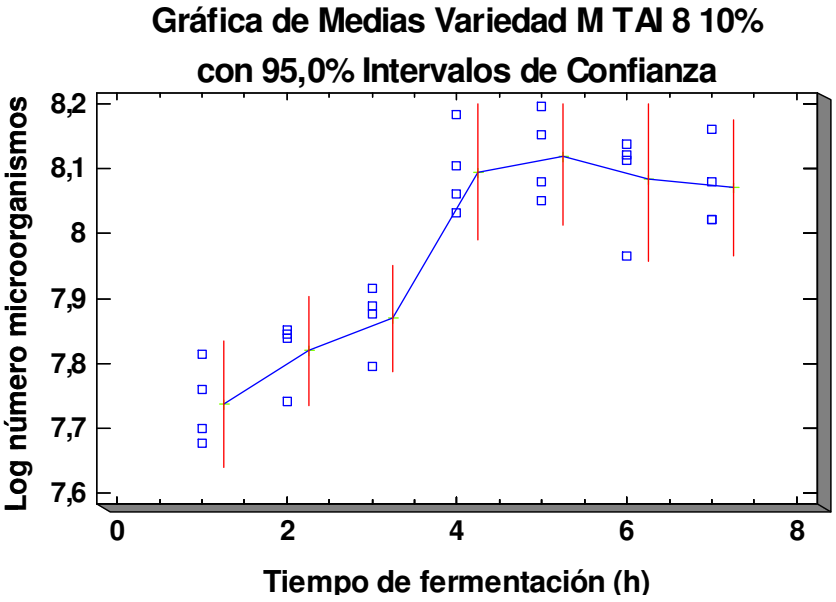


Anexo K. Resúmenes estadísticos del logaritmo del número de microorganismos durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8.

- **Crecimiento de microorganismos concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

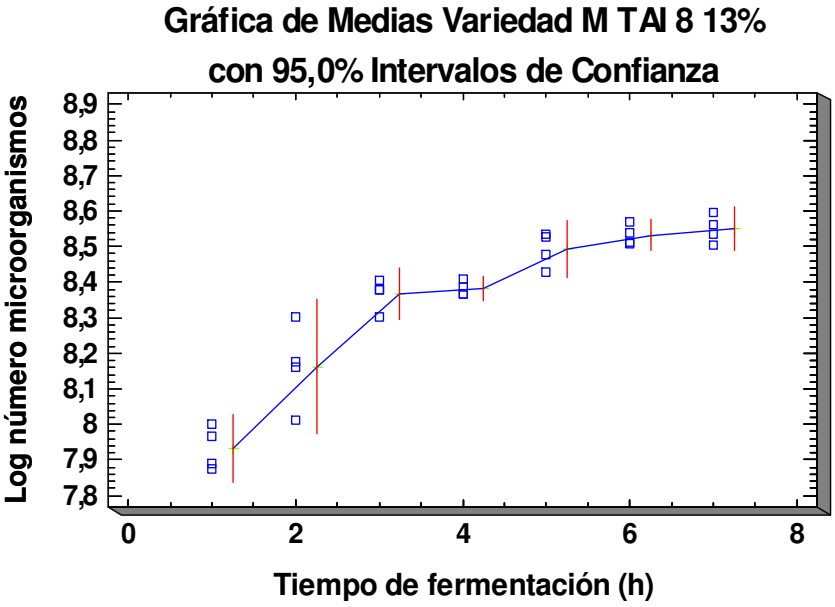
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	7,73706	7,72932	0,0615353	0,13622
2	4	7,81889	7,84197	0,0525975	0,110896
3	4	7,86917	7,88218	0,0517918	0,120574
4	4	8,09522	8,0831	0,0661371	0,151861
5	4	8,12036	8,1165	0,0671351	0,146128
6	4	8,08515	8,11808	0,0799815	0,172161
7	4	8,07073	8,05019	0,0663205	0,140179
Total	28	7,97094	8,02119	0,158993	0,520587



➢ Crecimiento de microorganismos concentración 13% p/v.

Resúmenes Estadísticos

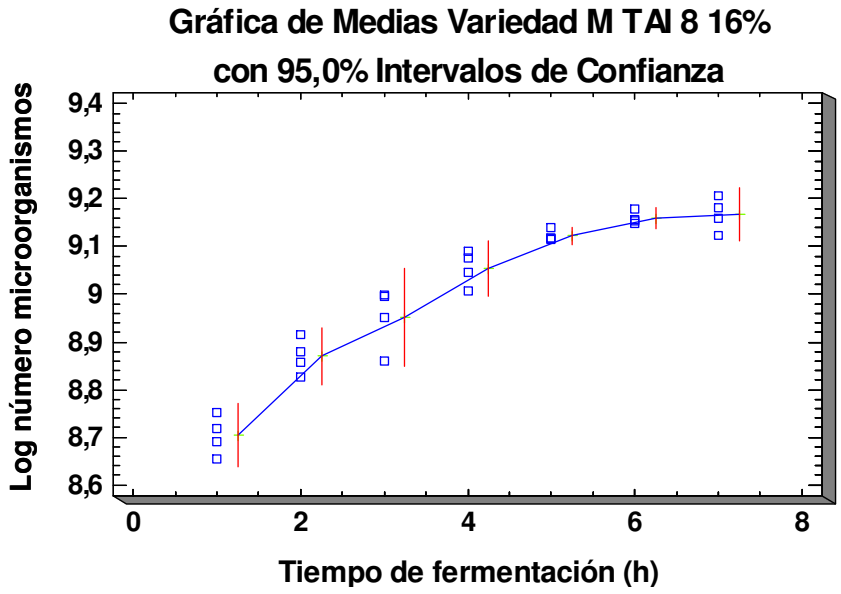
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	7,93263	7,92772	0,0601477	0,124939
2	4	8,1623	8,16873	0,118901	0,290306
3	4	8,367	8,38021	0,0456966	0,10551
4	4	8,38208	8,37557	0,0209821	0,0443543
5	4	8,49184	8,5027	0,0501332	0,107337
6	4	8,53161	8,52485	0,0276848	0,059672
7	4	8,54968	8,54848	0,0390248	0,0914471
Total	28	8,34531	8,39563	0,218541	0,721536



➢ Crecimiento de microorganismos concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	8,70339	8,70414	0,0419344	0,0988359
2	4	8,86981	8,86836	0,0380164	0,0903791
3	4	8,9514	8,97318	0,0643189	0,138575
4	4	9,05453	9,06043	0,0371985	0,0843209
5	4	9,12272	9,11851	0,0110583	0,0243139
6	4	9,15971	9,15533	0,0132918	0,0297578
7	4	9,16753	9,16939	0,0353807	0,0836481
Total	28	9,00416	9,06043	0,166216	0,554287

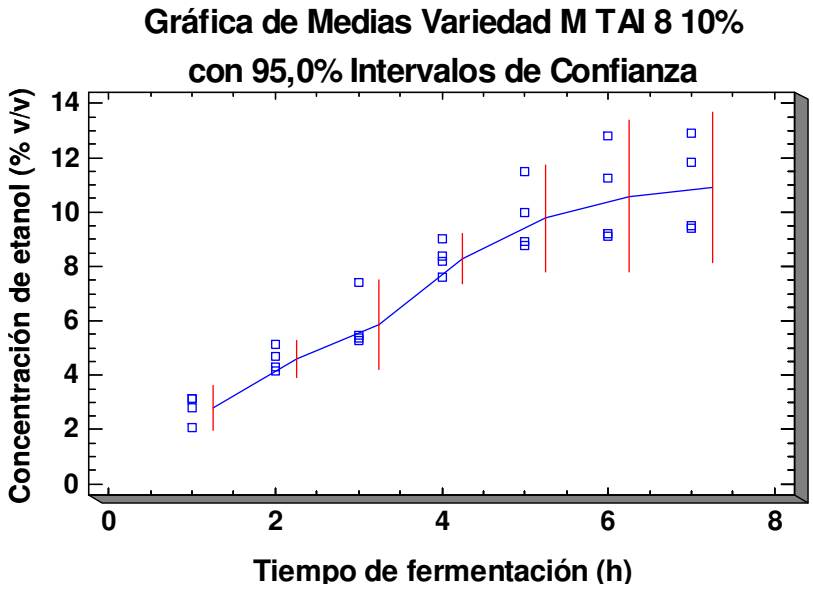


Anexo L. Resúmenes estadísticos de la producción de etanol (% v/v) durante la fermentación alcohólica de las concentraciones de harina del 10; 13 y 16% p/v de la variedad MTAI 8.

- **Producción de etanol concentración 10% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

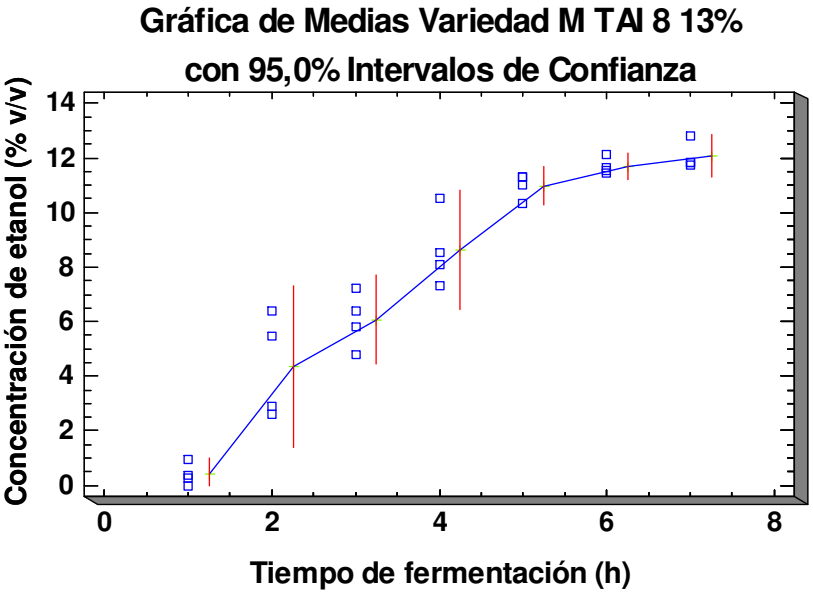
Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	2,7915	2,9745	0,50962	1,081
2	4	4,5825	4,512	0,421256	0,94
3	4	5,875	5,405	1,03684	2,162
4	4	8,2955	8,272	0,581358	1,41
5	4	9,78775	9,447	1,2366	2,679
6	4	10,5868	10,2225	1,75999	3,666
7	4	10,904	10,669	1,73497	3,478
Total	28	7,54614	8,272	3,16004	10,81



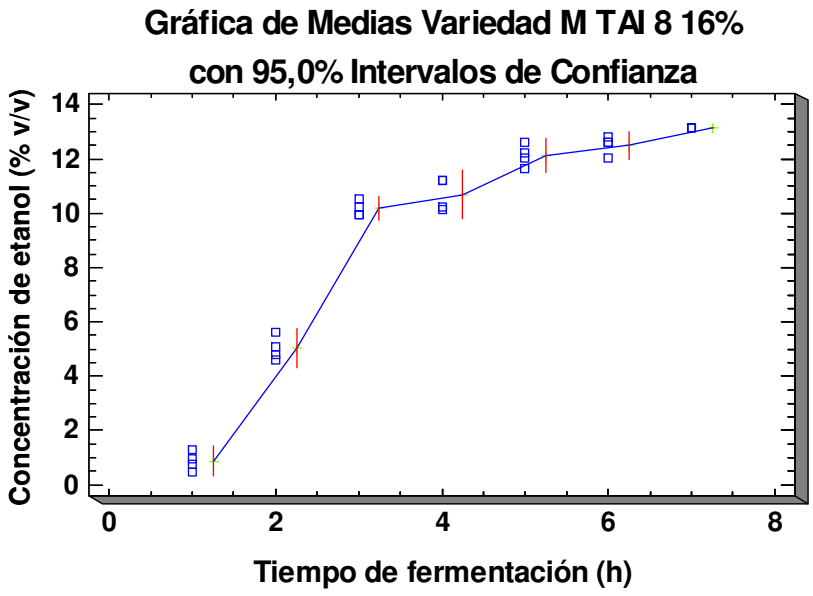
➢ **Producción de etanol concentración 13% p/v.**

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	0,4	0,33	0,394293	0,94
2	4	4,345	4,18	1,86221	3,76
3	4	6,0575	6,105	1,02441	2,44
4	4	8,62	8,315	1,36267	3,19
5	4	10,9725	11,135	0,443274	0,94
6	4	11,6875	11,605	0,303466	0,7
7	4	12,0525	11,84	0,486852	1,03
Total	28	7,73357	8,315	4,19748	12,78



➢ Producción de etanol concentración 16% p/v.

Resúmenes Estadísticos

Fila	Recuento	Media	Mediana	Desviación Típica	Rango
1	4	0,8695	0,846	0,354842	0,846
2	4	5,029	4,935	0,450808	1,034
3	4	10,17	10,1	0,26808	0,56
4	4	10,6875	10,71	0,569876	1,03
5	4	12,1225	12,125	0,391525	0,94
6	4	12,4975	12,59	0,324281	0,75
7	4	13,16	13,16	0,0	0,0
Total	28	9,21943	10,85	4,31671	12,69