

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EFECTIVIDAD DE MICROORNISMOS NATIVOS EN
RELACIÓN A *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum*
ATCC 27405 Y *Zymomonas mobilis* PARA LA PRODUCCIÓN
DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE SANDÍA
“*Citrullus lanatus*” A ESCALA PILOTO”.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ALEXANDRA ELIZABETH ANGULO VALENCIA

SANGOLQUÍ, 23 de Noviembre del 2010

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

ALEXANDRA ELIZABETH ANGULO VALENCIA

**COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

ING. RAFAEL VARGAS

SECRETARIO ACADÉMICO

Abogada. Vanessa Andrade

SANGOLQUÍ, 23 de Noviembre del 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ALEXANDRA ELIZABETH ANGULO VALENCIA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

23 de Noviembre del 2010

Dr. Darwin Rueda

Bioquímica. Elena Mafla

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

Declaro que:

]

El proyecto de grado denominado “EFECTIVIDAD DE MICROORNISMOS NATIVOS EN RELACIÓN A *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 Y *Zymomonas mobilis* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE SANDÍA “*Citrullus lanatus*” A ESCALA PILOTO”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 23 de Noviembre del 2010

Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

AUTORIZACIÓN

Yo, Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “EFECTIVIDAD DE MICROORNISMOS NATIVOS EN RELACIÓN A *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 Y *Zymomonas mobilis* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE SANDÍA “*Citrullus lanatus*” A ESCALA PILOTO”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 23 de Noviembre del 2010

Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

DEDICATORIA

Es un honor poder dedicarles este logro a los seres que forman parte de mi vida, al ser omnipotente, Dios, guiador de mi vida y fuente de inspiración por darme la oportunidad de vivir y regalarme una familia maravillosa. Con mucho cariño principalmente a mi madre la Sra. Lourdes Valencia y mi padre Rodrigo Angulo que me dieron la vida especialmente usted mamita querida que ha estado conmigo en todo momento, por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos enseñanzas y amor. Gracias por todo papi y mamita por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me llevo un año hacerlo es para ustedes, por ser la primera hija aquí está todo lo que ustedes me brindaron, solamente les estoy devolviendo lo que ustedes me dieron al principio.

A mis hermanos Lady, Jessica y Cristian gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi sobrinita Isabelita quien es la luz de mis ojos.

A mis tíos Victoria y Gonzalo ya que me dieron cariño, son los que han velado por mí, son a ellos a quien les debo todo durante este tiempo de carrera universitaria, horas de consejos, de regaños, de reprimendas de tristezas y de alegrías de las cuales estoy muy segura que las han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgullosa.

Todos ustedes quienes siempre han sido un ejemplo de lucha, superación, generosidad y sencillez. Ellos forman parte de mi vida y todos mis éxitos.

Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

AGRADECIMIENTO

Quedan cortas las palabras para expresar todas aquellas sensaciones de gratitud hacia Dios, por el conocimiento, la guía, y la voluntad de superación y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre Lourdes Valencia, quien con gran sacrificio, junto a mis hermanos: Lady, Jessica y Cristian han permitido que haya logrado cumplir esta meta.

A mi sobrinita bella: Isabelita tú me has traído alegría desde que naciste, por ser mi aliento y voluntad para terminar este trabajo.

A mi padre Rodrigo Angulo por brindarme los recursos necesarios para lograr terminar mi carrera universitaria.

A mis tíos Victoria Valencia y Luis Núñez por alentarme a cumplir con mis metas y apoyarme durante el tiempo que viví con ustedes de todo corazón mil gracias.

Al Dr. Darwin Rueda y a la Bioquímica Elena Mafla por su asesoría, que con sus admirables conocimientos, me ofrecieron confianza al ser incondicionales en todo momento.

Un agradecimiento especial a todo el personal del IASA I, que me colaboraron sin ponerme ningún impedimento, al contrario, me han brindado siempre su apoyo.

A mis amigas, Nataly, Cory, Pauli, Lore, Ange, por su amistad incondicional, sinceridad, por estar conmigo en los buenos momentos y darme fuerza en los malos.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Alexandra Elizabeth Angulo Valencia

Índice de Contenidos

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	vii
Índice de Contenidos	vi
Índice de Tablas	x
Índice de cuadros	xi
Índice de figuras	xii
Índice de Anexos	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación	3
1.3. Objetivos	7
1.3.1. Objetivo General.....	7
1.3.2. Objetivos Específicos	7
1.4. Marco Teórico.....	8
1.4.1. La Sandía	10
1.4.1.2. Cultivo de la sandía.....	14
1.4.1.3. Componentes activos de la fruta	15
1.4.1.4. Licopeno	16
1.4.1.5. Carbohidratos	18
1.4.1.5.1. Tipos de Carbohidratos.....	19
1.4.1.6. Glucosa	20
1.4.1.7. Fibra Alimentaria	23
1.4.1.7.1. Fibra Dietética	24
1.4.1.8. Betacaroteno (Provitamina A).....	25
1.4.1.8.1. Vitaminas	27
1.4.1.8.2. Minerales	28

1.4.1.9.	Corteza de la sandía	29
1.4.1.9.1.	L- citrulina	29
1.4.1.10.	Enzimas	31
1.4.1.11.	Pigmentos.....	32
1.4.1.12.	Ácidos	33
1.4.2.	Etanol.....	33
1.4.2.2.	Fuentes de Biomasa	35
1.4.2.3.	Cultivos y Residuos Agrícolas	37
1.4.2.3.1.	Residuos Forestales	38
1.4.3.	Cultivos Energéticos.....	38
1.4.3.2.	Otras Fuentes de Biomasa	39
1.4.3.3.	Microorganismos de interés	39
1.4.3.3.1.	<i>Zymomonas mobilis</i>	40
1.4.3.3.2.	Hábitat.....	41
1.4.3.3.3.	Necesidades Nutricionales	42
1.4.3.3.4.	Efecto de la Temperatura	43
1.4.3.3.5.	Efecto del etanol.....	43
1.4.3.3.6.	Efecto del Oxígeno	44
1.4.4.	<i>Clostridium</i> sp.....	45
1.4.4.2.	<i>Clostridium thermocellum</i>	45
1.4.5.	<i>Aspergillus niger</i>	46
1.4.5.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	49
1.4.5.2.	<i>Leuconostoc</i>	51
1.4.5.3.	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	51
1.4.6.	Etapas del proceso de producción de etanol.	54
1.4.6.1.	Hidrólisis	54
1.4.6.1.1.	Hidrólisis enzimática	55
1.4.6.2.	Fermentación.	57
1.4.6.3.	Balance de energía.....	62
1.4.6.4.	Destilación.....	63
1.4.6.4.1.	Destilación a vacío.....	65
1.4.6.5.	Refractometría	66
1.4.6.6.	Cromatografía	68
1.4.6.6.1.	Cromatografía de gases.....	69

1.5.	Hipótesis	72
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	73
2.1	Participantes	73
2.2.	Zona de Estudio	73
2.2.1.	Fase de campo	73
2.2.2	Fase de laboratorio	75
2.3	Período de tiempo de investigación	75
2.4	Diseño	76
2.4.1	Análisis estadístico	78
2.4.1.1.	Fase de hidrólisis	78
2.4.1.2.	Fase de Fermentación	79
2.4.1.3.	Variables	79
2.5	Procedimientos	80
2.5.1	Materiales	80
2.5.2.	Metodología	82
2.5.2.1.	Fase de Campo	82
2.5.2.1.1.	Selección de residuos de sandía	82
2.5.2.1.2.	Colección del material vegetal	82
2.5.2.2.	Fase de Laboratorio	83
2.5.2.2.1.	Tratamiento del Material Vegetal	83
2.5.2.2.2.	Aislamiento de microorganismos	84
2.5.2.2.3.	Aislamiento de <i>Aspergillus</i>	85
2.5.2.2.4.	Identificación y caracterización	85
2.5.2.2.5.	Preparación del inóculo	86
2.5.2.2.6.	Conteo de las Unidades formadoras de colonias de <i>Aspergillus niger</i> y <i>fumigatus</i> en Cámara de Neubauer	87
2.5.2.2.7.	Mantenimiento de cepas	89
2.5.2.2.8.	Determinación de la Actividad Fermentativa Bacteriana	89
2.5.2.2.9.	Aislamiento de <i>Leuconostoc dextranicum</i>	90
2.5.2.2.9.1.	Pruebas Bioquímicas	90
2.5.2.2.9.2.	Preparación del inóculo	91
2.5.2.2.10.	Aislamiento de <i>Zymomonas mobilis</i>	91
2.5.2.2.10. 1.	Pruebas Bioquímicas para <i>Zymomonas mobilis</i>	92
2.5.2.2.10. 2.	Preparación del inóculo	94
2.5.2.2.10. 3.	Estándar de turbidez para preparación del inóculo	95

2.5.2.2.11.1. Reconstitución de la cepa <i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	96
2.5.2.2.11.2. Preparación del inóculo	96
2.6. Obtención de residuos de sandía	97
2.6.2. Determinación de azúcares reductores	97
2.6.2. Preparación de la muestra.....	97
III. RESULTADOS	104
3.1. Aislamiento de hongos a partir de Residuos de Sandía	104
3.1.2. Identificación de los aislamientos	105
3.1.3. Caracterización morfológica de <i>Aspergillus fumigatus</i>	105
3.1.4. Caracterización morfológica de <i>Aspergillus niger</i>	106
3.2. Cuantificación de la Biomasa de <i>Aspergillus niger</i> y <i>A. fumigatus</i>	108
3.3. Identificación Microscópica de las bacterias en estudio.	109
3.4. Pruebas Bioquímicas de Cepas en estudio	111
3.5. Estimación de la población bacteriana de <i>Zymomonas mobilis</i> y <i>Leconostoc dextranicum</i> en UFC ml ⁻¹ a partir de las absorbancias	116
3.6. Determinación de azúcares reductores presentes en los residuos de sandía	120
3.7. Evaluación General de la concentración de Glucosa presente en sandía en la etapa de hidrólisis bajo la acción de los microorganismos.	121
3.8. Determinación de la concentración de de azúcares reductores en la fase Hidrolítica	122
3.9. Análisis de la etapa de Fermentación-Destilación.....	129
3.10. Cuantificación de etanol por Picnometría	130
IV. DISCUSIÓN	132
V. CONCLUSIONES	141
VI. RECOMENDACIONES	142
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	144

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Residuos de <i>Citrullus lanatus</i> , partes a estudiar y extracto a evaluar.	83
Tabla 2.2 Pruebas bioquímicas realizadas para autenticar las cepas de estudio.	93
Tabla 3.1. Características morfológicas de las especies estudiadas.	108
Tabla 3.2. Unidades formadoras de colonias por ml (UFCml ⁻¹) de tres aislamientos de <i>A. fumigatus</i> y <i>A. niger</i> en una dilución de 10 ⁻¹	109
Tabla 3.3. Características microscópicas de las colonias y resultados de las Tinciones Gram de los microorganismos en estudio.	110
Tabla 3.4. Características morfológicas de las colonias, tipos de actividad lipolítica y resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos en estudio.	112
Tabla 3.5. Estimación de la población bacteriana en UFC ml ⁻¹ a partir de las absorbancias obtenidas a 540 nm.	118
Tabla 3.6. Determinación de glucosa. Hidrólisis del mosto de sandía, 7 días, condiciones anaeróbicas, (25, 30, 35)° C. Cepas nativas y control.	122
Tabla 3.7. Análisis de varianza para los grados brix de la sandía en la etapa de hidrólisis bajo la acción de los microorganismos y tres niveles de temperatura, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.	123
Tabla 3.8. Efecto de los microorganismos sobre los grados brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.	124
Tabla 3.9. Efecto de la Temperatura sobre los grados Brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.	125
Tabla 3.10. Efecto conjunto de los microorganismos y la Temperatura sobre los grados Brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.	126
Tabla 3.11. Análisis de variancia para el volumen de destilación de la sandia en la etapa de fermentación.	129
Tabla 3.12. Volumen destilado de sandía en la etapa de fermentación para cada tratamiento.	130
Tabla 3.13. Determinación de porcentaje de Etanol por picnometría. Fermentación del mosto de sandía, 8 días, condición anaeróbica, (25; 30; 35) ° C. cepas nativas y Testigos.	131

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1. Clasificación científica de la Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>)	10
Cuadro 1.2. Clasificación de la sandía según sus características físicas, en Ecuador	11
Cuadro 1.3. Parámetros físicos para el cultivo de Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>)	15
Cuadro 1.4. Materias primas para la producción de bioetanol.....	36
Cuadro 1.5. Clasificación taxonómica de <i>Zymomonas mobilis</i>	41
Cuadro 1.6. Parámetros cinéticos de <i>Z. mobilis</i> y <i>S. carlsbergensis</i> a partir de 250 g/l de glucosa y la producción de etanol en cultivo por lotes	42
Cuadro 1.7. Clasificación taxonómica de <i>Clostridium thermocellum</i>	46
Cuadro 1.8. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus niger</i>	47
Cuadro 1.9. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus fumigatus</i>	49
Cuadro 1.10. Clasificación taxonómica	52
Cuadro 1.11. Clasificación de métodos cromatográficos en columna.....	71
Cuadro 2.1. Factores en Estudio	76
Cuadro 2.2. Tratamientos	76
Cuadro 2.3. Tratamientos	77

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructura química del licopeno	17
Figura 1.2. Clases de Carbohidratos (Alexandra Angulo, Quito, Junio, 2010)	19
Figura 1.3. Estructura química de la glucosa.....	20
Figura 1.4. Reacción química de la glucosa	23
Figura 1.5. Disposición en cinta plana de la cadena de celulosa	25
Figura 1.6. Estructura química del betacaroteno	26
Figura 1.8. Materias primas para la producción de bioetanol. (Alexandra Angulo, Quito, Junio, 2010).....	37
Figura 1. 9. Características fenotípicas de <i>Zymomonas</i> (Alexandra Angulo, Quito, Agosto, 2010)	40
Figura 1.10. <i>Zymomonas mobilis</i>	41
Figura 1.11. <i>Clostridium thermocellum</i>	46
Figura 1.12. A) Cabezas conidiales (globosas). B) Colonias en placas petri con esporulación.....	47
Figura 1.13. A) Colonias de <i>A. fumigatus</i> B) conidófora de <i>A. fumigatus</i>	50
Figura 1.14. Metabolismo heterofermentativo de la glucosa	53
Figura 1.15. Hidrólisis ácida (Alexandra Angulo, Quito, Julio, 2010).....	55
Figura. 1.16. Mecanismo de acción de las enzimas.....	56
Figura. 1.17. Mecanismo de <i>S. cereviceae</i> en la fermentación alcohólica	60
Figura. 1.18. Mecanismo de fermentación alcohólica	60
Figura. 1.19. Tipos de destilación.....	64
Figura. 1.20. Equipo de destilación simple	64
Figura. 1.21. Equipo de destilación al vacío	65
Figura. 1.22. Refracción de un rayo luminoso a través de un líquido	67
Figura. 1.23. Diagrama de un cromatógrafo de gases	71
Figura 2.1 Localización geográfica de la localidad El Bachillero, en el Cantón Tosagua. Fuente: Google Maps, 2009.....	74
Figura 2.2. Fisonomía de los cultivos de sandía en la Finca El Membrillo a 100 m.s.n.m. (Alexandra Angulo; Manabí, Junio, 2010)	74
Figura 2.3 Esquema de los tratamientos empleados en el Modelo experimental para la obtención de bioetanol. (Alexandra Angulo; Quito, Agosto, 2010)	80

Figura 2.4 Recolección de <i>Citrullus lanatus</i> en cultivos en hileras. (Alexandra Angulo; Man abí, Junio, 2010)	83
Figura 2.5 Obtención de cultivos puros.	84
Figura 2.6. A) Colonias de <i>A. niger</i> y B) Colonias de <i>A. fumigatus</i> (Alexandra Angulo; Quito, Abril, 2010).....	86
Figura 2.7. (A) <i>A.niger</i> , y (B) <i>A. fumigatus</i>	87
Figura 2.8. Adición de la diluciones de <i>A. niger</i> y <i>A. fumigatus</i> en la cámara de Neubauer.	88
Figura 2.9. Campos de Cámara de Neubauer con el lente de 40x.....	88
Figura 2.10 Cepas de estudio. A) <i>Leuconostoc dextranicum</i> . B) <i>Zymomonas mobilis</i> . C) <i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405.....	90
Figura 2.11. Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i>	92
Figura 2.12 Proceso de obtención de etanol a partir de residuos de sandía, bajo la acción de microorganismos nativos, <i>A. niger</i> ; <i>Z.mobilis</i> y <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405.	103
Figura 3.1. A) Colonia de <i>Aspergillus niger</i> ; B) Colonia de <i>Aspergillus fumigatus</i>	104
Figura 3.2. Estructuras vegetativas de <i>A. fumigatus</i> observadas en microscopio de luz.	106
Figura 3.3. Estructuras vegetativas de <i>A. niger</i> observadas en un microscopio de luz.	107
Figura 3.4. A) UFC ml ⁻¹ de <i>A. fumigatus</i> y B) UFC ml ⁻¹ de <i>A. niger</i> en cámara de Neubauer.	108
Figura 3.5 Micrografía con microscopio con lente 100X de <i>Z. mobilis</i>	110
Figura 3.6 Micrografía con microscopio con lente 100X de <i>L. dextranicum</i>	111
Figura 3.7 Micrografía con microscopio con lente 100X de <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	111
Figura 3.8 Características macroscópicas observadas en el Estereomicroscopio de A) <i>Z.mobilis</i> , B) <i>L. dextranicum</i> y C) <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405.....	113
Figura 3.9. A) Prueba de la Catalasa en <i>Zimomonas mobilis</i> . B) Prueba de Oxidasa en <i>Zimomonas mobilis</i>	113
Figura 3.10. Prueba de Indol en <i>Zimomonas mobilis</i>	114
Figura 3.11. A) Test de Nitratos en <i>Zimomonas mobilis</i> . B) Prueba de Agar Tween 80 ..	114
Figura 3.12. A) Prueba de la Catalasa en <i>Leuconostoc dextranicum</i> . B) Prueba de Oxidasa en <i>Leuconostoc dextranicum</i>	115
Figura 3.13. Test de Nitratos en <i>Leuconostoc dextranicum</i>	115
Figura 3.14. Estándares de la escala MacFarland	116
Figura 3.15. Curva de calibración de los estándares de la escala MacFarland.....	117
Figura 3.16 Velocidad de crecimiento de <i>L. dextranicum</i>	119
Figura 3.17 Velocidad de crecimiento de <i>Z. mobilis</i>	119

Figura 3.18 Concentración de azúcares reductores presentes en los residuos de sandía...	120
Figura 3.19 Curva de calibración de la concentración de glucosa por absorbancia producida a 546 nm.	121
Figura 3. 20. Actividad de los microorganismos sobre los grados brix en sandía durante la etapa de hidrólisis.	124
Figura 3.21. Acción de la temperatura sobre los grados brix en sandía durante la etapa de hidrólisis.	125
Figura 3.22. Actividad en conjunto de los microorganismos y temperaturas sobre los grados brix en sandía en la etapa de hidrólisis.	126
Figura 3.23. Efecto de la temperatura sobre los grados brix en el Microorganismo M2: <i>Aspergillus fumigatus</i>	127
Figura 3.25. Efecto de la temperatura sobre los grados brix en el Microorganismo M1: <i>Leuconostoc dextranicum</i>	128

Índice de Anexos

3. ANEXOS.....	151
3.1. ANEXO A.....	151
3.1.1. Rutas Metabólicas de los microorganismos en estudio	151
3.2. ANEXO B.....	152
3.2.1. Medio de cultivo para aislamiento de <i>Aspergillus</i>	152
3.2.2. Medio de cultivo para aislamiento de <i>L. dextranicum</i> y <i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	152
3.2.2.1. Preparación del inóculo	153
3.2.3. Medio de cultivo para aislamiento de <i>Z. mobilis</i>	153
3.2.3.1. Preparación del inóculo	153
3.3. ANEXO C	153
3.3.1. Método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	153
3.3.2. Elaboración de la curva de calibración:.....	154
3.4. ANEXO D.....	155
3.4.1. Resultado de las cromatografías de las muestras de etanol obtenido de los diversos tratamientos.	155
3.4.2. Cromatogramas de las muestras de etanol obtenidas de los diferentes tratamientos.	158
3.4.3. Resultado de las Pruebas Bioquímicas por el Test de Identificación Api.....	159

RESUMEN

El cultivo de sandía es muy importante en nuestro país donde la especie dominante es "*Citrullus lanatus*", la que es comúnmente utilizada gracias a sus propiedades nutricionales, sin embargo existen grandes pérdidas de este producto alimenticio alrededor de un 20% de la cosecha debido a que el producto es altamente perecible. El objetivo de este trabajo fue medir la eficiencia de microorganismos nativos en relación a *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas mobilis* para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía "*Citrullus lanatus*" a escala piloto. La materia prima se sometió a un proceso de trituración para la posterior etapa de hidrólisis sometido a diferentes temperaturas (25,30 y 35) ° C bajo la acción de los microorganismos nativos *A. fumigatus* y *L. dextranicum*, posteriormente se realizó la fermentación del mosto utilizando cepas controles de *Z. mobilis* y *C. thermocellum* ATCC 27405. Al mosto obtenido durante la hidrólisis se le realizaron pruebas fisicoquímicas como grados brix refractométrico, azúcares reductores, pH; las cuales permitieron determinar la cantidad de carbohidratos presentes en la materia prima. Finalmente el producto obtenido fue sometido a destilación al vacío con el fin de aumentar el grado de pureza del etanol y poder caracterizarlo por medio de pruebas físicas como picnometría y cromatografía de gases. Según la cromatografía de gases, se encontró la presencia de etanol como compuesto mayoritario y además determino un rendimiento de 27.62 %, por parte de las cepas nativas, comparado con los rendimientos de etanol obtenidos a partir de *Z. Mobilis* del 11.62% y *C. thermocellum* de 3.10%. El análisis de estos datos, demuestran las ventajas de la utilización de microorganismos nativos frente *A. niger* *Z. mobilis*, y *C. thermocellum*, en procesos de hidrólisis y fermentación

ABSTRACT

The watermelon crop is very important in our country where the dominant species is "*Citrullus lanatus* ", which is commonly used because of its nutritional properties, but there are large losses of this food product by about 20% of the crop due to the product is highly perishable. The aim of this study was to measure the efficiency of native microorganisms in relation to *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 and *Zymomonas mobilis* for the production of bioethanol from waste watermelon "*Citrullus lanatus*" pilot scale. The raw material is subjected to a grinding process for the later stage of hydrolysis under different temperatures (25.30 and 35) °C under the action of native microorganisms *A. fumigatus* and *L. dextranicum* then are fermented wort using control strains of *Z. mobilis* and *C. thermocellum* ATCC 27405. All must obtained during hydrolysis physicochemical tests were performed as degrees brix refractometer, reducing sugars, pH, which used to quantify the amount of carbohydrates present in the raw material. Finally, the product obtained was subjected to vacuum distillation to increase the grade of purity and to characterize through physical evidence such as pycnometry and gas chromatography. According to gas chromatography, was the presence of ethanol as a major constituent and also a yield of 27.62%, by the native strains, compared to yields of ethanol obtained from *Z. Mobilis* and 3.10% *C. thermocellum*. Analysis of these data, demonstrating the benefits of using native microorganisms against *A. niger* *Z. mobilis*, and *C. thermocellum* in hydrolysis and fermentation processes.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

El uso de combustibles de origen fósil como motor energético mundial, sus altos costos, agotamiento, sus efectos en el calentamiento global y contaminación urbana atribuido a su combustión, están siendo las fuerzas motivadoras para realizar investigaciones sobre el uso de fuentes alternativas de energía, especialmente aquellas que se derivan de la biomasa.

En la actualidad existen una serie de factores de naturaleza internacional que justifican la necesidad del avance tecnológico hacia el uso sostenible de la biomasa (residuos agrícolas) como energía renovable.

El compromiso en la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) ratificado internacionalmente en el Protocolo de Kyoto (celebrada en 1997 y que entró en vigor el 16 de febrero del 2005) de llegar a un acuerdo para reducir las emisiones de estos gases (sobre todo de CO₂) durante el periodo comprendido desde 2008 al 2012 en un 5.2% respecto a los niveles emitidos en el año de 1990 (año base) (Lozano, 2009 & Inga, 2009)

La dependencia de la sociedad mundial de los recursos fósiles es muy elevada, alcanzando un valor del 80% de la energía primaria consumida en el año 2004. En Europa y

España, este consumo es del 79% y del 83% para el año 2006, respectivamente (Lozano, 2009)

La tendencia al ascenso del precio del barril de petróleo y otros combustibles fósiles; la elevada demanda de recursos fósiles como el petróleo, gas natural y el carbón por países como China e India, ha provocado la disminución de las reservas de combustibles fósiles y las restricciones en el suministro de estos recursos por los principales países productores e industrializadores, repercuten en el mercado internacional hacia el alza de precios. Este hecho ha abierto el debate de la autosuficiencia energética respecto a la dependencia de los recursos petrolíferos (Lozano, 2009)

En el Ecuador la sobre explotación de crudo y la industrialización del petróleo ha venido formando la base de nuestra economía al costo de agotar y degradar nuestros recursos naturales.

Además de que se han presentado varias emergencias sanitarias provocadas por la sobre explotación de crudo debido a los efectos nocivos sobre el ambiente amazónico tales como la pérdida de su biodiversidad, contaminación del suelo y de cuencas hidrográficas, ocasionando el deterioro en la salud de los habitantes, especialmente en los colonos de las zonas productoras de petróleo.

1.2. Justificación

Actualmente el calentamiento global afecta a todo el planeta, en particular a nuestro entorno natural por el empleo de combustibles fósiles y la industrialización del petróleo.

Ecuador al ser un país petrolero no ha dirigido esfuerzos mayoritarios para encontrar nuevas fuentes de energías renovables; solamente en los últimos años se están implementando nuevas energías como la eólica y solar. Ya que las fuentes de petróleo no son inagotables, por lo que se está comenzando a investigar métodos de producción de biocombustibles con materias primas propias de nuestro país.

A pesar de que el Ecuador comenzó a exportar el petróleo amazónico desde 1972, fecha desde la cual se han extraído más de 4000 millones de barriles de petróleo y nuestro país ha recibido cerca de 90.000 millones de dólares por esto, aún así seguimos siendo un país Tercermundista.

Por el contrario, hemos producido una continua deforestación amazónica, que ha afectado nuestros ecosistemas, provocando pérdidas de agua en la Sierra ecuatoriana y en el resto del país; por lo que las nubes amazónicas son cada vez menos compactas y esto conduce a una reducción del caudal de agua lluvia.

Ahora, que podemos observar las consecuencias a largo plazo, producidas por años de explotación y abuso de los recursos naturales, es de suma importancia que empecemos a conservar nuestras selvas amazónicas, con proyectos como el de Yasuní ITT, que es una zona con una enorme diversidad de flora y fauna, tanto así que en un solo árbol del Yasuní, puede existir un mayor número de especies de escarabajos nativos que en toda Europa. En una hectárea del Yasuní, hay más árboles nativos que en toda América del Norte; razón por la cual se lo conoce como “refugio del pleistoceno”.

Extraer el petróleo del Yasuní no solo afectaría la biodiversidad, sino que provocaría una emisión de unas 410 toneladas de CO₂, ya que este es un petróleo pesado, que tiene un elevado contenido de azufre; el cual debe ser descontaminado.

Como casi todos los países que han pretendido desarrollarse en base a la exportación de petróleo y a los recursos minerales, han transitado por una senda muy compleja, de destrucción y degradación natural. El proyecto Yasuní ITT, basado en los mecanismos creados por el protocolo de Kyoto; procura objetivos de acuerdos internacionales debido a la búsqueda de protección de la biodiversidad de la Amazonía, a cambio de una remuneración económica por los países desarrollados.

Además, Ecuador, con esos créditos, financiaría proyectos de reforestación, proyectos para el desarrollo de energías alternativas renovables como los biocombustibles y otros.

Es necesario emplear fuentes de energía renovable y limpia como los biocombustibles ya que éstos disminuirían el impacto ambiental que ha ocasionado la industrialización del petróleo y el mal manejo de los recursos naturales en nuestro país. Entre éstos biocombustibles, está el bioetanol, que genera una combustión más completa y con menores residuos de contaminación al no presentar plomo y azufre, con lo que se conseguiría disminuir los gases de efecto invernadero (CO , CO_2 , H_2S , SO_2 , SO_3 , H_2O , etc.), además se lograría la reducción indirecta de las emisiones de gases contaminantes al ambiente, evitando así la progresión del cambio climático y el calentamiento global.

Conjuntamente con los beneficios ambientales la producción de bioetanol generaría una gran cantidad de puestos de trabajo en el sector agrícola debido a que se aprovecharían los residuos y rechazos que se obtienen de las cosechas de sandía. Por lo tanto no presentaría ninguna repercusión en los recursos alimentarios de las poblaciones, ya que solamente se utilizarían los desechos mencionados, para la obtención de bioetanol como energía limpia.

A pesar de estas ventajas, América Latina, a excepción de Brasil, ha hecho poco por explotar su potencial en etanol. Esto es cierto incluso en países que gastan grandes cantidades de dinero en la importación de combustible, una clasificación que incluye a toda Centroamérica y el Caribe a excepción de Trinidad y Tobago. En Ecuador, gran exportador de petróleo, existen estudios que han demostrado que adoptar una mezcla de un 10% de etanol para la gasolina de consumo ahorraría cerca de 33 millones de dólares al año, cantidad que hoy se gasta para importar gasolina y aditivos. A pesar de ello, la producción de bioetanol en Ecuador es todavía insignificante.

En el país se podría producir a gran escala bioetanol gracias a que cuenta con aproximadamente 1513 has. sembradas con el cultivo de sandía en la costa, de las cuales serían aprovechadas las de segunda mano o rechazo como fuente de materia prima para la producción de bioetanol lo cual daría al Ecuador una fuente energética propia, barata, renovable que empujaría al progreso de nuestro país. Cabe recalcar que la especie *Citrullus lanatus* es altamente fermentativa, ya que por cada kilogramos de fruta se obtiene el 50% de etanol.

La sustitución de la gasolina por bioetanol en la actualidad es un problema económico antes que técnico, para revertir esto es necesario buscar mejores alternativas biotecnológicas más eficientes y económicas.

A partir de la presente investigación se podrían optimizar las técnicas mediante programas de producción a nivel industrial, con la finalidad de abaratar aún más los costos de producción y que puedan competir con los productos obtenidos tradicionalmente y a la vez mejorar la calidad del ambiente; elevando el mercado del sector agrícola de productos tradicionalmente utilizados como maíz, caña de azúcar y de biocombustibles en el país.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- ☞ Medir la eficiencia de microorganismos nativos en relación a *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas mobilis* para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía "*Citrullus lanatus*" a escala piloto.

1.3.2. Objetivos Específicos

- ☞ Aislar e identificar microorganismos nativos (bacteria y hongo) a partir de residuos de sandía "*Citrullus lanatus*".
- ☞ Estudiar la concentración de carbohidratos totales y fermentables de sandía.
- ☞ Evaluar la efectividad de *Aspergillus niger* con relación a los microorganismos nativos (bacteria y hongo) en la fase de hidrólisis.
- ☞ Comparar la efectividad de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas mobilis* con el microorganismo nativo (bacteria) en la fase de fermentación.
- ☞ Obtener y determinar la concentración de bioetanol del producto derivado de la fermentación a escala piloto.

1.4. Marco Teórico

La sandía, "*Citrullus lanatus*.", es uno de los principales productos agrícolas cultivados en el Ecuador teniendo una producción de alrededor de 23638 tm en zonas de clima cálido. Las provincias con mayor producción son Manabí, con 51.42%, Los Ríos, con 44.19%, la provincia del Guayas con 3.07% y Galápagos que cuenta con una participación de 1.32% en el 2007 (PROFIAGRO, 2007).

El consumo per cápita de la sandía en el Ecuador es de 2.16 kg, aprovechando cerca del 50% de la fruta; el otro 50%, que está constituido por la corteza, semillas, entre otros, es eliminado. Por ende existe una gran cantidad de pérdidas de este producto alimenticio. En las exportaciones de sandía aproximadamente un 20% de estas se desechan ya que los países no las reciben por presentar falencias sanitarias e imperfecciones en su morfología, por lo cual existe una gran cantidad de desperdicios que tienen características físico-químicas y caloríficas, los residuos de sandía pueden ser una materia prima para la producción de biocombustibles y de productos químicos alternativos a los producidos a partir de recursos no renovables (petróleo) (PROFIAGRO, 2007).

Los residuos de la sandía contienen entre el 7 y 10% de azúcares fermentables como celulosa, pectinas, glucosa, fructuosa, sacarosa y polisacáridos (conjunto de moléculas de azúcar unidas entre sí) que una vez fermentados y llevados a estrictos procesos de destilación, dan lugar a alcoholes de gran pureza, idóneos para su uso en motores de explosión (Azúcar de caña, 2009).

Frente a este panorama el etanol, obtenido a partir de azúcares, almidones o material celulósico surge como una alternativa al ser usado como sustituto de la gasolina, en los motores de encendido, disminuyendo la dependencia energética además de los beneficios sociales derivados de su producción.

La combinación de etanol en un 85% y de gasolina en un 15% reduce un 80% la contaminación producida por los vehículos ya que un vehículo que utiliza gasolina emite 180 g de CO₂ por kilómetro recorrido, mientras que con el uso de bioetanol esas emisiones se reducen a 70 g; por este motivo el desarrollo del combustible a partir de desechos de sandía no sólo tendría efectos ambientales positivos, sino que daría una salida económica al sector agrícola de la sandía (FEDGLP, 2007).

Los productos obtenidos a partir de fuentes reciclables, tales como los residuos agroindustriales, han merecido un interés creciente, debido a que permiten disminuir el impacto ambiental y los costos en el tratamiento y disposición de dichos residuos en las industrias.

En países como Brasil, Paraguay, Guatemala y España, entre otros, se está trabajando en la obtención de bioetanol, y en este tema en particular se necesita fuentes viables de obtención de biocombustibles, como serían los desechos de sandía, ya que en países como Estados Unidos, Japón y Alemania, se están probando los primeros motores modificados para la utilización del bioetanol como combustible (Flores, 2006).

En este estudio se aprovechó los desechos agrícolas de sandía variedad Glory Jumbo de la Provincia de Manabí, para la obtención de etanol por medio de procesos de hidrólisis y fermentación, evitando la utilización de productos alimenticios.

1.4.1. La Sandía

La sandía (*Citrullus lanatus*), también conocida como patilla, melón de agua o melancia, es uno de los frutos de mayor tamaño de cuantos se conocen y puede alcanzar hasta los 10 kilos de peso. Es el fruto de la sandiera, planta de la familia de las *Cucurbitáceas*, que incluye unas 850 especies de plantas herbáceas que producen frutos generalmente de gran tamaño y protegidos por una corteza dura (PROFIAGRO, 2007).

Cuadro 1.1. Clasificación científica de la Sandía (*Citrullus lanatus*)

Clasificación científica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Citrullus</i>
Especie	<i>C. lanatus</i>

Fuente: Profiagro, 2007

Citrullus lanatus es originaria de África tropical y su cultivo se remonta desde hace siglos a la ribera del Nilo, desde donde se extendió a numerosas regiones bañadas por el

mar Mediterráneo. Los pobladores europeos fueron quienes la llevaron hasta América, donde su cultivo se extendió por todo el continente. Hoy en día es una de las frutas más extendidas por el mundo, y los principales países productores son: Turquía, Grecia, Italia, España, China y Japón (BOTANICAL-ONLINE, 2010) Se tiene constancia de más de cincuenta variedades de sandía, que se clasifican en función de la forma de sus frutos, color de la pulpa, color de la piel, peso, período de maduración, etc. Genéticamente existen dos tipos de sandías: Sandías diploides o con semillas: son las variedades cultivadas tradicionalmente, que producen semillas negras o marrones de consistencia leñosa. Según la forma de sus frutos encontramos: Frutos alargados: de corteza verde con bandas de color más claro llamadas melonas. Destacan los tipos Klondike y Charleston Gray (PROFIAGRO, 2007).

Cuadro 1.2. Clasificación de la sandía según sus características físicas, en Ecuador

Clasificación de la sandía en base a sus características		
Presencia de semilla	Diploides	
Sin semilla	Triploides	
Tipo de fruto	Sugar Baby	Redonda de piel verde oscura y carne roja.
	Crimson Sweet	Redonda ligeramente alargada con la piel a rayas
	Ice-Box	Frutos muy redondos pequeños, la corteza verde claro con rayas, y la pulpa (roja o amarilla)
	Charleston Grey	Frutos alargados gris-verde con nervaduras o jaspeado más oscuro

Fuente: Profiagro, 2007

Su fruto es grande, en pepónide, carnoso y jugoso (más del 90% de la sandía es agua), con numerosas semillas, casi esférico, verdoso en su exterior, pulpa de color rosado rojo por el antioxidante licopeno un componente de gran capacidad que previene el envejecimiento, aunque hay variedades con pulpa de color anaranjado y amarillo intenso, además contiene betacaroteno; generalmente de sabor dulce muy apreciada por ser refrescante y rica en agua y sales; se consume en fresco o en forma de zumos. De las semillas se obtiene altos contenidos de vitamina E, las cuales se han utilizado en medicina natural, también tienen usos alimenticios se las consume tostadas y los subproductos como cáscaras presenta altos contenidos de L-citrulina este fitonutriente ha sido ampliamente investigado y utilizado en nuevos productos farmacéuticos. Los desperdicios de esta fruta son empleados para la elaboración de piensos para animales.

Entre los cultivares de sandías más comúnmente utilizadas en el país se menciona la sandía 'Royal charleston', 'Glory Jumbo', 'Charleston Gray', 'Crimson Sweet' y algunas variedades criollas de sandía (INIAP, 2010).

Planta anual herbácea, de porte rastrero o trepador presenta tallos herbáceos de color verde, recubiertos de pilosidad que se desarrollan de forma rastrera, pudiendo trepar debido a la presencia de zarcillos bífidios o trífidios, alcanzando una longitud de 4 - 6 metros (BOTANICAL-ONLINE, 2010)

Hojas con el haz suave al tacto, envés muy áspero y con nerviaciones muy pronunciadas. El nervio principal se ramifica en nervios secundarios que se subdividen para dirigirse a los últimos segmentos de la hoja, imitando la palma de la mano (PROFIAGRO, 2007).

Las sandías cultivadas al aire libre florecen entre finales de primavera y principios de verano, por lo que los frutos están en su punto óptimo de sabor a lo largo de todo el verano y principios del otoño. No obstante, la sandía se cultiva en invernadero, por lo que es fácil disponer de ejemplares a lo largo de todo el año (PROFIAGRO, 2007)

Forma: El fruto o sandía, que botánicamente se denomina "pepónide" formada por 3 carpelos fusionados con receptáculo adherido, que dan origen al pericarpio, puede tener forma redondeada, ovalada o cilíndrica, achatada por los extremos (BOTANICAL-ONLINE, 2010)

Tamaño y peso: Es uno de los mayores frutos que se producen con un tamaño de hasta 30 centímetros de diámetro, y aunque pueden alcanzar un peso de hasta 15 ó 20 kilogramos, las destinadas al comercio suelen pesar entre 3 y 8 kilos. Las sandías se calibran con un número, según el peso de las piezas: 6 (piezas de 1,5 a 2,4 kilos), 5 (piezas de 2,5 a 3,2 kilos), 4 (piezas de 3,3 a 4,2 kilos) y 3 (piezas de 4,3 a 5,5 kilogramos) (Canales *et al.*, 2003).

Color: Su corteza es lisa, dura y de unos 2 - 4 centímetros de grosor, su color varía entre verde oscuro, verde claro o amarillo, e incluso puede tener motas de color amarillento, grisáceo o verde claro. En su interior se encuentra la pulpa con una coloración rojiza o rosada muy atractiva, existen variedades con pulpa de color amarillo intenso e incluso anaranjado. En la pulpa de algunas variedades se encuentran diseminadas numerosas semillas negras, marrones o blancas (Canales *et al.*, 2003).

Sabor: La pulpa tiene una textura acuosa, porosa, muy jugosa y también presenta diferentes colores (rojo, rosado o amarillo), las semillas pueden estar ausentes (frutos triploides) o mostrar tamaños y colores variables (negro, marrón o blanco), dependiendo del cultivar. Es refrescante y por lo general tiene un delicioso sabor dulce. El contenido calórico es bajo, y además del efecto refrescante es depurativo y ligeramente laxante debido a la celulosa que contiene por lo que también debe consumirse con precaución (Canales *et al.*, 2003).

1.4.1.2. Cultivo de la sandía

La sandía es menos exigente en temperatura, siendo los cultivares triploides más exigentes que los normales, presentando además mayores problemas de germinabilidad. Cuando se trata de sandías injertadas aumenta la resistencia tanto al frío como al calor. Cuando las diferencias de temperatura entre el día y la noche son de 20-30°C, se originan desequilibrios en las plantas: en algunos casos se abre el cuello, los tallos y el polen producido no es viable. La humedad relativa óptima para la sandía se sitúa entre 60 % y el 80 %, siendo un factor determinante durante la floración.

Los suelos adecuados para la producción de sandía son los suelos bien drenados, ricos en materia orgánica y fertilizantes.

Cuadro 1.3. Parámetros físicos para el cultivo de Sandía (*Citrullus lanatus*)

Parámetros		
Temperaturas	Desarrollo óptimo	23 – 28° C
	Detención de la vegetación	11 – 13° C
Humedad relativa óptima	(60 – 80)%	
Duración del	90 a 150 días.	
Cultivo a cosechar	11-14 semanas después de sembrar	

Fuente: Profiagro, 2007

1.4.1.3. Componentes activos de la fruta

- ? Vitamina E o alfatocoferol
- ? Licopeno.
- ? Betacaroteno (provitamina A)
- ? Vitamina C
- ? Vitaminas del grupo B: piridoxina (vitamina B6), Niacina (Vitamina B3), Vitamina B1, y Vitamina B2.
- ? Minerales: Magnesio, Potasio, Sodio, Hierro, y Fosforo.

- ? Agua
- ? Hidratos de carbono
- ? Glucosa (dextrosa)
- ? Fructuosa
- ? Sacarosa
- ? Maltosa
- ? Fibra
- ? Calcio
- ? Ácido fólico, aspártico, pantoténico, glutámico, Ácidos grasos saturados, Á. grasos monoinsaturados, y Á. grasos polinsaturados.
- ? Proteínas.
- ? L- citrulina (corteza)
- ? Arsénico (corteza)
- ? Celulosa (corteza)

Fuente: BOTANICAL-ONLINE, 2010

1.4.1.4. Licopeno

La prevención de diversas enfermedades causadas por la degeneración de tejidos debida al oxígeno altamente reactivo, han llevado a la búsqueda e investigación de sustancias con alto potencial antioxidante, como el licopeno, el cual se encuentra en tomates, toronjas rojas, sandías y pimientos rojos, es el principal componente responsable de su característico color rojo profundo (Puente & Velázquez, 2007).

Los carotenoides son compuestos solubles en lípidos, y son los encargados de dar color a los frutos y vegetales; entre los más importantes para el organismo se tiene al licopeno, el cual además de ser un importante indicador de la calidad de los alimentos por su actividad antioxidante y antiproliferante (Puente & Velázquez , 2007), presenta una estructura química de cadena abierta con once dobles enlaces conjugados, de estructura sencilla con una cadena alifática formada por cuarenta átomos de carbono (Puente & Velázquez ., 2007).

Este compuesto posee propiedades antioxidantes y se cree que actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo, uno de los responsables de las enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento.

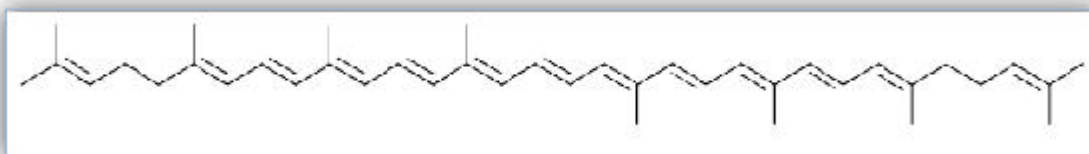


Figura 1.1. Estructura química del licopeno

Fuente: Wikipedia, 2008

La sandía es uno de los pocos alimentos ricos en licopeno, un carotenoide que tiene dos veces más capacidad antioxidante que el β -caroteno in vitro (Edwards *et al.*, 2003). Según los investigadores, casi 92% de la sandía es agua, pero el restante 8% es rico en licopeno.

La presencia de licopeno le ha dado una popularidad reciente a la sandía como alimento saludable. Existen estudios que han demostrado que el licopeno ayuda a proteger contra algunos tipos de cáncer. Debido a que la fruta contiene mucha agua entrega más nutrientes, incluyendo fibra y vitaminas A y C, y pocas calorías (TU SALUD, 2009)

Investigaciones sobre la biodisponibilidad del licopeno se han centrado sobre productos de tomate. Otras fuentes naturales de licopeno incluyen la guayaba, toronja roja, sandía, sin embargo su aportación de licopeno en la dieta es limitada. La concentración de licopeno en la sandía es de 4868µg/100g 40% más alto que el del tomate 3025ug/100g, no obstante, aún no hay datos sobre la biodisponibilidad del licopeno que contiene la sandía (Edwards *et al.*, 2003).

1.4.1.5. Carbohidratos

Los carbohidratos, glúcidos o hidratos de carbono, son biomoléculas ternarias, relativamente simples constituidas de carbono, hidrogeno y oxígeno, pero también pueden presentar otros átomos. Los hidratos de carbono, químicamente son polihidroxialdehídos o polihidroxiacetonas o productos derivados de ellos por oxidación, reducción, sustitución o polimerización. Muchos tienen fórmula $(CH_2O)_n$, que daba a entender, en su origen, que se trata de “hidratos de carbono” (Tovar, 2002).

Estas biomoléculas son las más abundantes en la naturaleza son particularmente de origen vegetal, los glúcidos proceden de la actividad fotosintética de los vegetales; son estas biomoléculas la base de todo el equilibrio trófico o alimenticio de la materia viva

(Tovar, 2002). El almidón, la lactosa y la sucrosa (azúcar corriente) son carbohidratos digeribles por los humanos y ellos junto con la D- glucosa y la D-fructuosa proporcionan casi el 70 – 80 % de las calorías en la dieta humana (Tovar, 2002).

1.4.1.5.1. Tipos de Carbohidratos

Basándose en su complejidad estructural los carbohidratos se presentan en varias formas de compuestos: Monosacáridos, Oligosacáridos y Polisacáridos (Tovar, 2002)

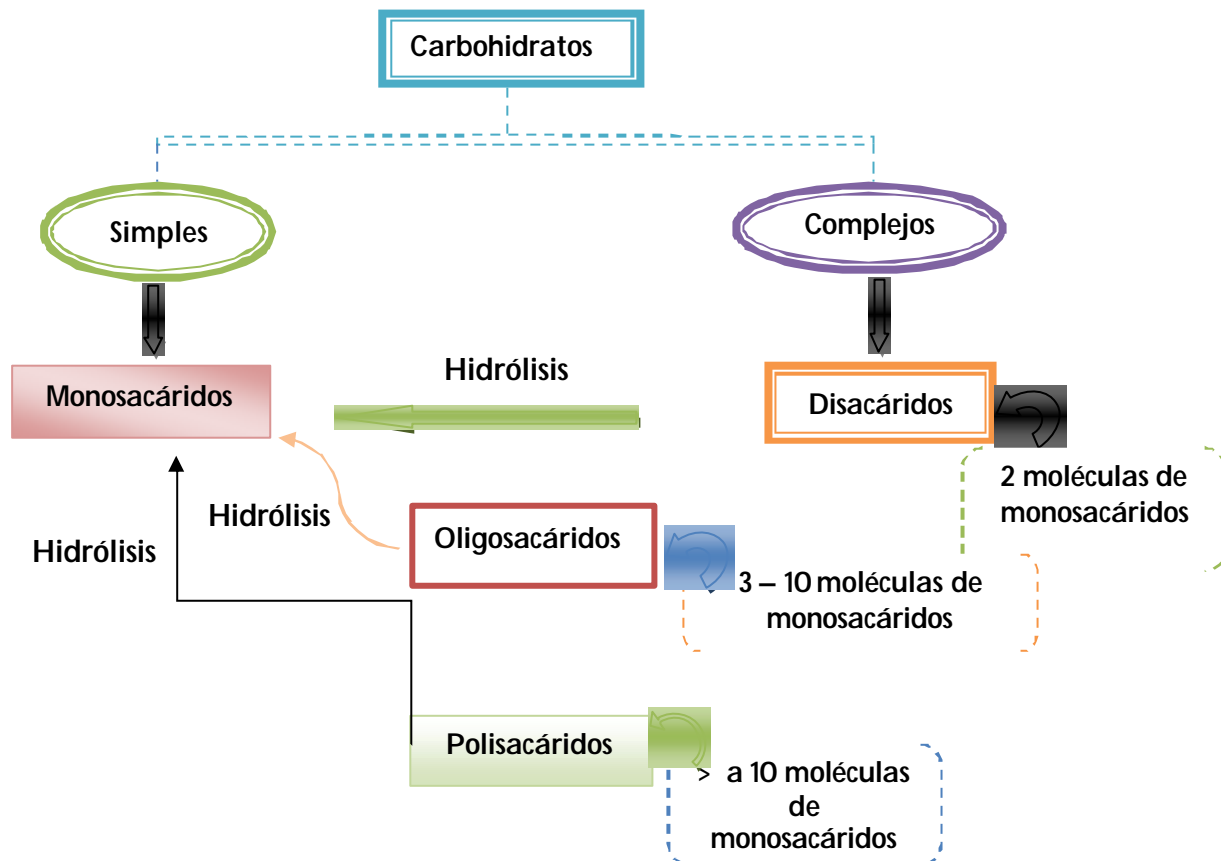


Figura 1.2. Clases de Carbohidratos (Alexandra Angulo, Quito, Junio, 2010)

Fuente: Tovar, 2002

1.4.1.6. Glucosa

La glucosa o dextrosa, es un monosacárido con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$, la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos $-OH$ y $O=$. Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y una aldosa, por el grupo carbonilo que está en el extremo de la molécula (Sierra *et al*, 2009). Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel.

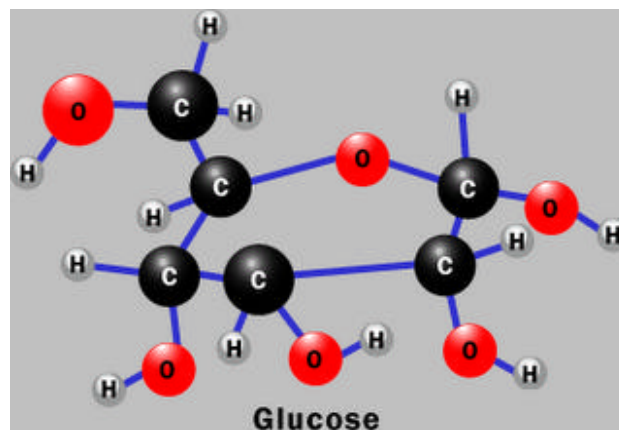


Figura 1.3. Estructura química de la glucosa

Fuente: Tovar, 2002

Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de glucosa (a menudo con fructosa), que puede ser extraída y concentrada para hacer un azúcar alternativo. Pero a nivel industrial, tanto la glucosa líquida (jarabe de glucosa) como la dextrosa (glucosa en polvo) se obtienen a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de cereales (generalmente trigo o maíz) (Sierra *et al*, 2009).

La aldohexosa glucosa posee dos enantiómeros, si bien la D- glucosa es predominante en la naturaleza. En terminología de la industria alimentaria suele denominarse **dextrosa** (término procedente de “glucosa dextrorrotatoria”) (Sierra *et al*, 2009).

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno (Sierra *et al*, 2009).

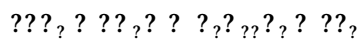
En su forma D-Glucosa, sufre una ciclación hacia su forma hemiacetálica para dar sus formas furano y pirano (D- glucofuranosa y Dglucopiranososa) que a su vez presentan anómeros¹ alfa y beta. Estos anómeros no presentan diferencias de composición estructural, pero si diferentes características físicas y químicas. La D-(+)-glucosa es uno de los compuestos más importantes para los seres vivos, incluyendo a los seres humanos (Sierra *et al*, 2009).

¹ *Anómero*: como los isómeros de los monosacáridos de más de 5 átomos de carbono que han desarrollado una unión hemiacetálica, lo que les permitió tomar una estructura cíclica y determinar 2 diferentes posiciones para el ion hidroxilo (α o β).

En su forma β-D-glucopiranososa, una molécula de glucosa se une a otra gracias a los -OH de sus carbonos 1-4 para formar celobiosa a través de un enlace β, y al unirse varias de estas moléculas, forman celulosa (Sierra *et al*, 2009).

La glucosa ingresa a la célula por medio de un proceso de transporte mediado por moléculas de membrana que pertenecen a la familia de proteínas llamadas GLUT (por las siglas en inglés, Transportador de glucosa). La síntesis y activación de dichas proteínas es regulada por la hormona insulina, y por el receptor de insulina (Sierra *et al*, 2009).

Los organismos fotoautótrofos, como las plantas, sintetizan la glucosa en la fotosíntesis a partir de compuestos inorgánicos como agua y dióxido de carbono, según la reacción:



Los seres heterótrofos, como los animales, son incapaces de realizar este proceso y toman la glucosa de otros seres vivos o la sintetizan a partir de otros compuestos orgánicos. La glucosa puede sintetizarse a partir de otros azúcares, como fructosa o galactosa. Otra posibilidad es la síntesis de glucosa a partir de moléculas no glucídicas, proceso conocido como gluconeogénesis. Hay diversas moléculas precursoras, como el lactato, el oxalacetato y el glicerol.

También existen ciertas bacterias anaerobias que utilizan la glucosa para generar dióxido de carbono y metano según esta reacción:

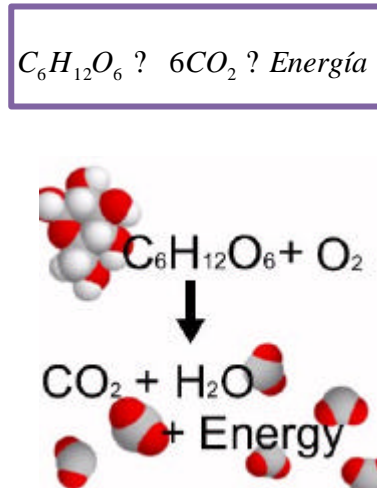


Figura 1.4. Reacción química de la glucosa
Fuente: Tovar, 2002

1.4.1.7. Fibra Alimentaria

Nombre que se aplica a las partes estructurales de los tejidos vegetales que no son dirigidas por las enzimas digestivas humanas, aunque sean parcialmente metabolizadas por las bacterias del intestino para formar ácidos grasos de cadena corta que proporcionan una fuente de energía (Tovar , 2002)

Comprende: {
Celulosa
Hemicelulosa
Lignina
Pectina
Gomas

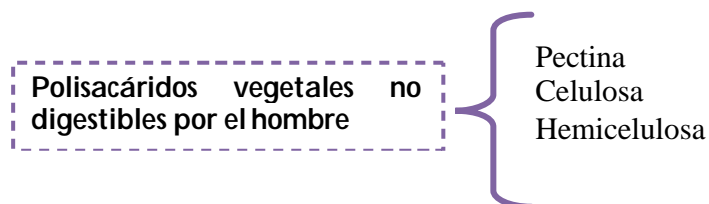
1.4.1.7.1. Fibra Dietética

Material de la pared celular de vegetales, frutas, cereales, granos que resiste la digestión de las enzimas y demás secreciones digestivas humanas. La fibra es degradada mediante la fermentación por las bacterias del intestino grueso (Tovar, 2002)

Según su solubilidad hay 2 tipos de fibra dietéticas.

- ✍ Insoluble: Celulosa, hemicelulosa, lignina. Ej. Salvado de trigo, lentejas, arvejas, verduras.
- ✍ Soluble: pectinas, gomas, algunas hemicelulosas. Ej. Verduras, leguminosas, frutas.

Todos los vegetales contienen los dos tipos de fibra dietética soluble e insoluble, pero en cada uno predomina una de las dos (Tovar, 2002)



Celulosa: Compuesto orgánico más abundante de la tierra.
Componente esencial de la pared de las células vegetales.

La celulosa es un polímero lineal formado por unidades de D- glucosa unidas por enlaces β (1- 4) glucosídicos (Fig. 1.5), con un peso molecular promedio de 400000, que corresponde aproximadamente a un mínimo de 3000 unidades de glucosa (Tovar, 2002)

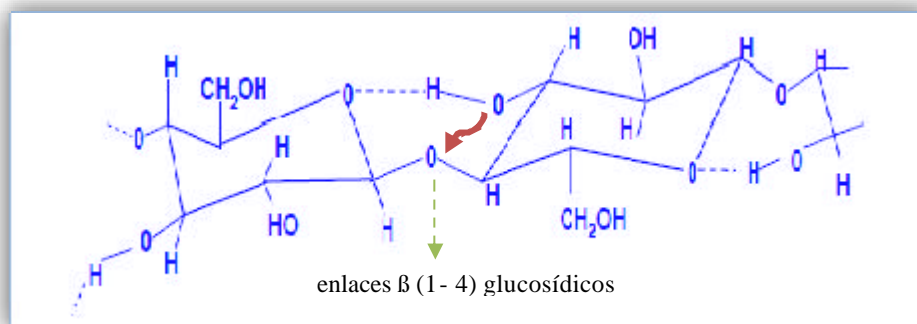


Figura 1.5. Disposición en cinta plana de la cadena de celulosa

Fuente: Tovar, 2002

1.4.1.8. Betacaroteno (Provitamina A)

El betacaroteno pertenece a la familia de sustancias químicas naturales conocidas como carotenos o carotenoides. Los científicos han identificado cerca de 600 carotenos diferentes. Ampliamente encontrados en las plantas, los carotenos (junto con otro grupo de sustancias químicas, los bioflavonoides) dan el color a las frutas, verduras y otras plantas (BOTANICAL-ONLINE, 2010)

Este ingrediente benéfico presente en la sandía y otras frutas y vegetales es conocido como fitonutriente, una mezcla que ocurre en forma natural que es bioactiva, o capaz de reaccionar con el cuerpo humano para provocar reacciones saludables (Fish *et al*, 2009).

Es el carotenoide más abundante en la naturaleza y el más importante para la dieta humana, por lo que da su nombre a todo un grupo de compuestos bioquímicos. Su estructura fue determinada en 1930 por Paul Karrer, trabajo que le otorgo el Premio Nobel de Química, ésta fue la primera vez en la historia en la que la estructura de una vitamina o pro-vitamina era identificada (BOTANICAL-ONLINE, 2010)

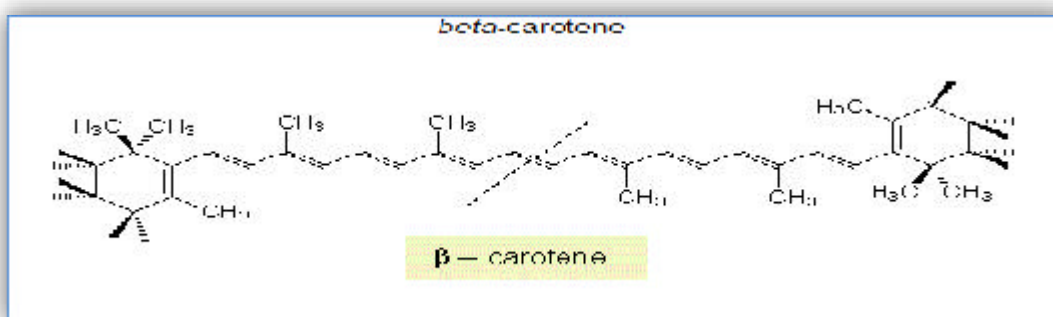


Figura 1.6. Estructura química del betacaroteno

Fuente: Martínez, 2003

El espectro de absorción del β -caroteno muestra dos picos de absorción entre los 400 nm y 500 nm, correspondiente al azul y verde, por lo que la luz roja-anaranjada-amarilla que refleja le proporciona su color característico (Wikipedia, 2010).

Los betacarotenos son precursores de la vitamina A, se trata de pigmentos vegetales de color amarillo (albaricoque), naranja (si es el de la zanahoria), color rojo (de la sandía, tomates) sin embargo este compuesto también está presente en otras verduras de hoja verde o verdes oscuras como las espinacas o el brócoli que, una vez ingeridos, se

transforman en el hígado y en el intestino delgado en vitamina A. Son compuestos antioxidantes que favorecen a la no aparición del cáncer especialmente de pulmón, boca y estomago. Además de su función preventiva, se ha comprobado cómo estos principios pueden además inhibir el crecimiento de células cancerosas, ya que actúan atrapando radicales libres y moléculas de oxígeno libre; de ahí su efecto protector. Ofrece protección frente a la radiación solar (fotoprotectora), favoreciendo la producción de melanina (BOTANICAL-ONLINE, 2010).

1.4.1.8.1. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos esenciales para reacciones metabólicas específicas que no pueden sintetizar las células de los tejidos del hombre a partir de metabolitos simples. Muchas actúan como coenzimas o partes de enzimas y se encargan de promover reacciones químicas esenciales (Prieto & Iboden, 2002).

La sandía aporta una cantidad discreta de vitamina C (10 mg/100 g) con propiedades antioxidantes la cual colabora en la formación del colágeno de la piel y en la regeneración de tejidos., además que por su escasa energía y alta digestibilidad se puede tomar en cantidades altas; además de que contribuye con 4 veces más vitamina A que la naranja, contiene también vitaminas E y del grupo B destacándose la piridoxina (vitamina B6) cuya labor principal dentro del organismo es regular el sistema nervioso. Otra vitamina que contiene es la niacina (vitamina B3) esencial para las células productoras de energía,

ayudando a conservar los niveles bajos de colesterol, disminuir la hipertensión, preservar el aparato digestivo y proporcionar un buen estado de la piel (Prieto & Iboden, 2002).

1.4.1.8.2. Minerales

Existen en el cuerpo y en los alimentos principalmente en forma iónica, estos tienen muchas funciones importantes, tanto en forma de iones disueltos en los líquidos corporales, como de constituyentes de compuestos esenciales (Prieto & Iboden, 2002). El equilibrio de iones y minerales en los líquidos corporales regula la actividad de muchas enzimas. En algunos casos los minerales son constituyentes estructurales de los tejidos corporales (Prieto & Iboden, 2002).

Cabe destacar que la sandía contiene cantidades mínimas de calcio y de hierro, además de que su aporte de magnesio es importante para la constitución de los huesos, sistema nervioso; posee suficiente potasio que contrarresta al sodio y aumenta la capacidad de eliminar agua sobrante del organismo por la orina. Por la gran cantidad de minerales que presenta esta fruta explica las virtudes que tiene la misma para reponer pérdidas de sales minerales (Martínez, 2003).

1.4.1.9. Corteza de la sandía

1.4.1.9.1. L- citrulina

La citrulina es un compuesto que interviene en el ciclo de la urea. Se forma por transferencia del grupo carbamilo proveniente del anhídrido del ácido fosfórico al grupo d-amino de la ornitina. La enzima ornitina transcarbamoilasa es también mitocondrial (Edwards *et al.*, 2003)

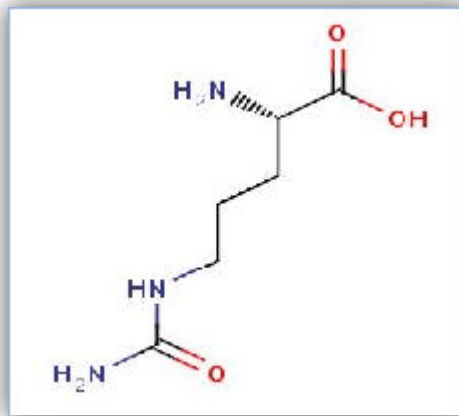


Figura 1.7. Estructura química de L - citrulina

Fuente: Wikipedia, 2010

La citrulina se difunde desde la mitocondria al citosol, donde continúa el resto del ciclo de la urea (bvsCuba, 2010).

La citrulina se produce a partir del carbamil fosfato y el aminoácido ornitina. Actúa en este caso la enzima ornitina transcarbamilasa que al igual que la carbamil fosfato sintetasa se localiza en la matriz mitocondrial (bvsCuba, 2010).

La citrulina formada sale al exterior de la mitocondria donde se produce la incorporación del segundo nitrógeno requerido para la formación de urea. Esto ocurre en dos etapas, primeramente la enzima arginino succínico sintetasa une a la citrulina con una molécula de ácido aspártico formando el ácido arginino succínico (bvsCuba, 2010).

Por otra parte, es una sustancia que tiene la capacidad de producir un relajamiento de los vasos capilares. Además, al ser convertida por el metabolismo en un aminoácido “arginina” produce efectos beneficiosos en el corazón, en el sistema circulatorio y beneficia el sistema inmunológico (bvsCuba, 2010). En esta fruta, se encuentra en mayores concentraciones en la corteza de la sandía.

Además, la producción adicional de óxido nítrico asociada a la arginina que se cree ayuda a mejorar el flujo sanguíneo, podría a su vez ayudar a tratar la angina, la hipertensión y otros problemas cardiovasculares. Los científicos creen que la sandía tiene otros beneficios como ayudar al ciclo de la urea a retirar amoniaco y otros desechos tóxicos del organismo.

1.4.1.10. Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de las diferentes reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo de los seres vivos. Para que se produzca una determinada reacción, es necesaria la presencia de un determinado enzima, y la mayor o menor cantidad de éste suele modificar la velocidad de la reacción controlada.

Las enzimas tienen numerosas aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas. Se utilizan para transformación y producción de aromas y de productos intermedios. Se emplean varias enzimas microbianas en la industria de alimentos tales como la α y β amilasas, proteasas, invertasa, pululanasa, glucosa- isomerasa, dextranasa, lipasa, lactasa, amiloglucosidasa, glucosa - oxidasa, pectinasa, celulasas, hemicelulasas y otras. También se emplean en la industria del vino para tratar los mostos y como resultado de la pectólisis se obtiene más volumen de producto con excelente calidad de brillo y mejor aroma (Grevechoba *et al*, 2006).

Celulasas y hemicelulasas: Se utilizan para hidrolizar las paredes celulares de las frutas o vegetales; obteniendo una licuefacción total, mejorando el rendimiento del zumo y la extracción del color; además se evita el enturbiamiento de los concentrados de zumo de fruta (Gavilanes, 2004)

Alfa-amilasa: De origen Fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*), de cereales y del páncreas (Lopatinsky, 2008)

La alfa-amilasa cataliza la hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (amilopectina) del almidón, rompiendo enlaces 1,4 interiores (endoamilasa) para formar una mezcla de dextrinas; por ello se la conoce como enzima dextrinogénica (mezcla de amilodextrina, eritrodextrina, acrodextrina y maltodextrina) con poca producción de maltosa (Lopatinsky, 2008)

Por su acción, el alfa-amilasa provee de fragmentos menores que pueden ser utilizados por la enzima beta-amilasa. La enzima alfa-amilasa requiere de un activador como por ejemplo, cloruro de sodio; es sensible a una acidez elevada y se vuelve inactiva a pH 3,3 o a pH menor a 0°C por 15 min (Lopatinsky, 2008). El pH óptimo de acción está dentro del rango 5-7, siendo de 6,5 para la alfa amilasa bacteriana y pancreática. La enzima es resistente al calor, pues a 70°C conserva un 70% de su actividad. Actúa sobre almidones crudos y gelatinizados (Lopatinsky, 2008)

1.4.1.11. Pigmentos

Los pigmentos dominantes en la pulpa de la sandía son carotenoides que se producen en los cromoplastos de las células. Aproximadamente el 70% del total de carotenoides de color sandía están en la pulpa por la abundancia de licopeno y betacaroteno pigmentos orgánicos de la familia de los carotenoides cuyo color varía de amarillo pálido a rojo intenso (BOTANICAL-ONLINE, 2010).

La coloración de la cascara de la sandía se debe por la presencia de luz, pero es solo una propiedad fisiológica de las plantas que implica la fotosíntesis y acumulación de clorofila en presencia de luz (BOTANICAL-ONLINE, 2010).

1.4.1.12. Ácidos

Los principales ácidos presentes en los residuos de la sandía son: ácido fólico, además de pequeñas cantidades de ácido pantoténico, aspártico, glutámico, ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos polinsaturados. Estos ácidos orgánicos se han encontrado en la fruta, lo que explica la razón por la cual el pH de la cáscara es de 5 (BOTANICAL-ONLINE, 2010).

1.4.2. Etanol

El alcohol etílico o etanol cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ es un producto químico obtenido a partir de dos procesos de elaboración: la fermentación o descomposición de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o biomasa, y la destilación, consistente en la depuración de las bebidas fermentadas (Cadena Agroalimentaria; 2004).

Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa, incluyendo también los materiales procedentes de su transformación natural o artificial. La biomasa puede provenir de varios tipos de cultivos. Las plantas crecen gracias

al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa de la planta (Colina, 2000).

El proceso químico de producción de bioetanol se basa simplemente en una fermentación, que es un cambio químico en las sustancias de naturaleza orgánica llevado a cabo por la acción de enzimas. Lo que ocurre en una fermentación es que las sustancias orgánicas complejas se transforman en otras simples (Masera *et al.*, 2006)

El etanol; no sólo es el producto químico orgánico sintético más antiguo empleado por el hombre, sino que también tiene innumerables aplicaciones como: bebidas fermentables para consumo humano como vinos, aguardiente, vodka, ron, brandy, etc. En la industria se emplea en una serie de procesos como: disolución de la nitrocelulosa, disolvente de colorantes en las industrias alimenticias y textil; disolvente de resinas; jabón; aceites, ceras, etc.; y oxidación en la fabricación de ácido acético, vinagre, acetaldehído, además se utiliza como solvente (Monsalve *et al.*, 2006). Actualmente se utiliza para mezclarlo con la gasolina, para mejorar sus propiedades, se recomienda una mezcla en proporción del 10 al 15% ya que se logra un índice de octano entre 70 – 75, mayor que el de la gasolina sin mezclar. Las mezclas de etanol - gasolina permite aumentar la compresión en el motor, con menor recalentamiento, dando un funcionamiento más regular por lo que se puede utilizar a un mayor número de revoluciones (Monsalve *et al.*, 2006).

Por lo que hoy en día es el biocombustible más importante, producto 100% renovable obtenido a partir de cultivos bioenergéticos y biomasa. El etanol carburante es utilizado para oxigenar la gasolina, permitiendo una mejor oxidación de los hidrocarburos y reduciendo las emisiones de monóxido de carbono, compuestos aromáticos y compuestos orgánicos volátiles a la atmósfera. El uso de alcohol etílico como combustible no genera una emisión neta de CO₂ sobre el ambiente debido a que el CO₂ producido en los motores durante la combustión y el proceso de obtención del etanol, es nuevamente fijado por la biomasa mediante el proceso de fotosíntesis (Cardona *et al.*, 2006)

1.4.2.2.Fuentes de Biomasa

Entre los cultivos bioenergéticos más usados para la producción de etanol la caña de azúcar es la materia prima más utilizada en países tropicales tales como Brasil e India. En Norte América y Europa el etanol carburante se obtiene del almidón presente en el maíz y los cereales.

La producción de bioetanol se consigue a partir de la fermentación de mostos azucarados, para cuya obtención existen tres vías posibles:

- a) Directamente a partir de biomasa azucarada, es decir, productos agrícolas ricos en azúcares, tales como la remolacha, caña de azúcar y maíz, etc.
- b) Mediante hidrólisis convencional (moderada y enzimática) de biomasa amilácea de productos agrícolas ricos en almidón, tales como los cereales y la patata. Mediante el proceso de hidrólisis se consigue aflorar los azúcares,

glucosa y fructosa, que formarán parte del mosto azucarado (García & Rondo, 2009).

- c) Mediante hidrólisis fuerte (ácida o enzimática) de biomasa lignocelulósica de productos agrícolas que contienen celulosa, como son las materias de origen leñoso.

Las dos primeras vías son las más empleadas en la actualidad pues son procesos perfectamente conocidos por las industrias agrarias. Por el contrario, la tercera está aún presentándose en fase de desarrollo, como la gran alternativa de producción de bioetanol en el futuro, dado el bajo precio de la biomasa lignocelulósica en relación a la biomasa azucarada y amilácea (Masera *et al.*, 2006)

Cuadro 1.4. Materias primas para la producción de bioetanol

<i>Azúcares simples</i>	<i>Caña de azúcar</i>	
	<i>Melazas</i>	
	<i>Remolacha</i>	
	<i>Sorgo dulce</i>	
	<i>Jugos de frutas</i>	
<i>Almidones</i>	<i>Maíz</i>	} <i>Hidrólisis enzimática</i> <i>(amilasa)</i>
	<i>Yuca</i>	
	<i>Trigo</i>	
	<i>Cebada</i>	
	<i>Papa</i>	
<i>Celulosas</i>	<i>Madera</i>	} <i>Hidrólisis ácida</i> <i>Hidrólisis enzimática</i>
	<i>Residuos orgánicos</i>	
	<i>Papel</i>	
	<i>Residuos urbanos</i>	

Fuente: Modificado de Cadena Agroindustrial, 2004

1.4.2.3. Cultivos y Residuos Agrícolas

Las principales fuentes actuales de producción de bioetanol a nivel mundial son: caña de azúcar, remolacha, trigo, maíz, cebada, yuca, sorgo dulce, etc. También se incluyen residuos agrícolas como restos de aceitunas, cascarilla de arroz, cáscara de frutos, etc. (Colina, 2000).

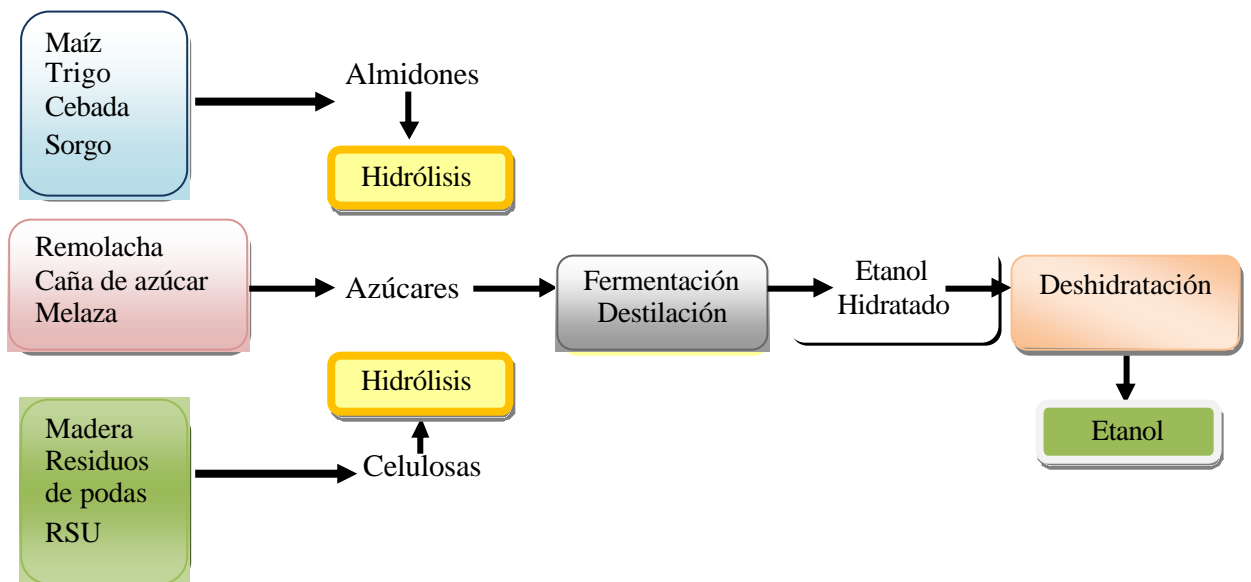


Figura 1.8. Materias primas para la producción de bioetanol. (Alexandra Angulo, Quito, Junio, 2010).

1.4.2.3.1. Residuos Forestales

Son procedentes de poda, limpiezas, madera subutilizada como el serrín, árboles comerciales imperfectos, etc., también árboles no comerciales que necesiten ser desechados de bosques superpoblados, con peligro de incendio o en mal estado de salud (Colina, 2000).

1.4.3. Cultivos Energéticos

Son aquellos desarrollados específicamente para combustible. Comprenden árboles de rápido crecimiento, arbustos y pastos. Suelen utilizarse por ejemplo álamos híbridos, sauces, eucaliptos, etc.

Las ventajas que tienen este tipo de cultivos son que pueden producirse en terrenos agrícolas no necesarios para alimentos y pastos. Además también se pueden plantar a lo largo de las riberas de los ríos, alrededor de lagos, en espacios entre otros establecimientos agrícolas, bosques naturales o también en áreas pantanosas, (Colina, 2000).

1.4.3.2. Otras Fuentes de Biomasa

Por ejemplo se pueden transformar química o biológicamente determinadas especies vegetales, algas y algunos hongos usados para convertirlos en biocombustibles (etanol o metanol) y emplearlos como sustitutos o complementos del gasóleo o gasolina, (Colina, 2000).

1.4.3.3. Microorganismos de interés

Dentro de los microorganismos de interés como alternativa para la producción de bioetanol, se encuentra: *Zymomonas mobilis* (Zm), *Penicilium*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* ssp, *Hongos seta*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Neurospora crassa*, etc., los cuales por su consumo rápido de glucosa en procesos de fermentación mantienen valores de pH alrededor de 4 en el medio evitando así la contaminación bacteriana por lo que han despertado interés desde la década de los 30 (Matiz *et al*, 2002).

En los primeros intentos se utilizaban levaduras del género, *Saccharomyces*, para la producción de etanol, en la actualidad sigue siendo el microorganismo más utilizado por las industrias de fermentación alcohólica, en parte por el trabajo realizado de mejora genética a lo largo del tiempo.

1.4.3.3.1. *Zymomonas mobilis*

Debido a su morfología y al hecho de metabolizar su sustrato por la vía Entner-Doudoroff (Ver Anexo A), la bacteria ha sido clasificada dentro de la familia de las *Pseudomonadaceae*.

Utilizando los criterios taxonómicos relacionados con más de cuarenta cepas, Swings y DeLey propusieron una nueva clasificación que reagrupa a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*. La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie *mobilis*. Algunas características fenotípicas del género *Zymomonas* se resume en la Figura 1.9.

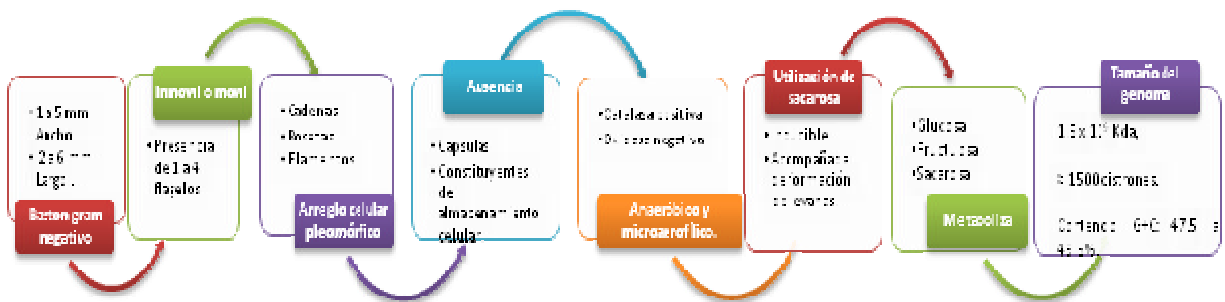


Figura 1. 9. Características fenotípicas de *Zymomonas* (Alexandra Angulo, Quito, Agosto, 2010)

Cuadro 1.5. Clasificación taxonómica de *Zymomonas mobilis*

Clasificación			
Reino	Bacteria		
Filo	Proteobacteria	Familia	Sphingomonadaceae
Clase	Alpha	Género	Zymomonas
	Proteobacteria		
Orden	Sphingomonadales	Especie	Z. mobilis
		Nombre binomial	<i>Zymomonas mobilis</i>

Fuente: Matiz *et al*, 2002

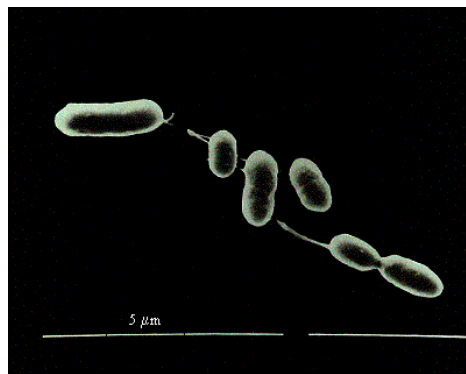


Figura 1.10. *Zymomonas mobilis*

Fuente: Matiz *et al*, 2002

1.4.3.3.2. Hábitat

Forma parte de la micro flora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales. Algunas bacterias de este género se han aislado como contaminantes durante la producción de sidra y de cerveza (Matiz *et al*, 2002).

1.4.3.3.3. Necesidades Nutricionales

Es una bacteria quimiorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio, y en algunos casos por la biotina. El nitrógeno necesario para su crecimiento puede proporcionársele por medio de sales minerales, aminoácidos o péptidos. Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azufre, potasio y magnesio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc.) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentran en estado de trazas en las sales utilizadas para la preparación del medio de cultivo (Matiz *et al.*, 2002)

Cuadro 1.6. Parámetros cinéticos de *Z. mobilis* y *S. carlsbergensis* a partir de 250 g/l de glucosa y la producción de etanol en cultivo por lotes

	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. carlsbergensis</i>
μ (1/h)		
q_g (g/gh)	0.13	0.055
q_p (g/gh)	5.5	2.1
$Y_{x/g}$ (g/g)	2.5	0.87
$Y_{p/g}$ (g/g)	0.029	0.033
Etanol máx (g/l)	0.47	0.44
	102	108

Fuente: Matiz et al, 2002

Este cuadro resume los resultados obtenidos en un estudio comparativo de la producción de etanol por *Z. mobilis* y la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* (*S. pastorianus*) a partir de un medio con concentraciones elevadas de glucosa. Estos resultados muestran algunas propiedades interesantes que deben ser tomadas en consideración para la elección del microorganismo utilizado para la producción de alcohol.

Algunas de las ventajas de *Z. mobilis* sobre la levadura son:

- ◆ Velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de alcohol elevadas.
- ◆ Mayor productividad volumétrica de etanol.
- ◆ Rendimiento de etanol superior y rendimiento de biomasa inferior.
- ◆ No necesita aporte de oxígeno.
- ◆ Mayores posibilidades de manipulación genética (Matiz., *et al.* 2002).

1.4.3.3.4. Efecto de la Temperatura

Aunque *Zymomonas mobilis* es capaz de crecer en una gama de temperaturas de 25 a 45°C, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35°C. La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición y la fluidez de la membrana celular. A altas temperaturas la fluidez disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados. El aumento de la temperatura induce la acumulación del etanol en el interior de las células, lo que amplifica su efecto inhibitorio (Matiz *et al.*, 2002).

1.4.3.3.5. Efecto del etanol

Tiene un efecto muy importante sobre la composición de la membrana celular. Estudios realizados sobre el efecto del etanol adicionado al medio del cultivo y del producido por *Zymomonas mobilis* mostraron que en ambos casos su efecto inhibitorio es más importante sobre el crecimiento que sobre su producción (Matiz *et al.*, 2002).

1.4.3.3.6. Efecto del Oxígeno

Aunque *Z.mobilis* puede crecer en aerobiosis, el oxígeno tiene un efecto negativo sobre la producción de etanol. Este induce la formación de subproductos de la fermentación. Aparentemente el efecto inhibitor del oxígeno está ligado a la concentración de los sustratos (Matiz A *et al.*, 2002).

En el grupo de las bacterias, *Zymomonas mobilis* se ha convertido en objeto creciente de estudio en estos años debido a su conjunto de ventajas potenciales:

- ◆ Tolerancia osmótica a concentraciones superiores de azúcar con un máximo de 400g/l. Mientras que en el caso de las levaduras, el límite de azúcar es de 1g/l.
- ◆ Tolerancia relativamente mayor al etanol con un máximo de 130g/l. El etanol es inhibitorio a altas concentraciones y la tolerancia al alcohol de levaduras y bacterias es crítica para obtener rendimientos altos. A medida que aumenta la concentración de etanol, la velocidad de crecimiento disminuye hasta que se inhibe completamente la propia biosíntesis del etanol. Sin embargo, la levadura es más sensible al etanol producido endógenamente que al que se añade del exterior al sistema de fermentación.
- ◆ Mayor velocidad de crecimiento. Los datos a escala laboratorio son los siguientes:
 - 0.27 micras para *Zymomonas mobilis*
 - 0.13 micras para la levadura

- ◆ El metabolismo anaerobio de los carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía de Entner Doudoroff en la que se produce solo un mol de ATP por mol de glucosa utilizada. Esto se traduce en una reducción de la cantidad de glucosa que se convierte en biomasa en lugar de etanol (Romero, 2008)

1.4.4. *Clostridium* sp.

Es un género de bacterias anaerobias, bacilos gram positivas, parásitas y saprófitas algunas de ellas, esporulan, y son móviles, en general por intermedio de flagelos peritricos. Toman la forma de fósforo, palillo de tambor o huso de hilar, de ahí su nombre griego "Klostro", que significa huso de hilar. Crecen a temperatura de 37°C y a un pH entre 7 y 7,4, de modo que son fácilmente inactivadas a pH ácido o básico, como el ácido estomacal, el de limpiadores y desinfectantes como el cloro e incluso el pH de ácidos orgánicos encontrados en el zumo de limón, por ejemplo. Son fermentadoras de azúcares, aspecto que resulta de utilidad en la diferenciación de las especies (Demain *et al.*, 2005).

1.4.4.2. *Clostridium thermocellum*

Es una bacteria termófila anaerobia, crecen a temperatura de 30°C - 60° C; degrada la celulosa y los fermentos de la glucosa resultante, celobiosa, y celodextrinas dando mayor producción de etanol debido a sus capacidades celulolíticas y etanologenic (Anexo A), Esto la hace útil para convertir la biomasa en una fuente de energía utilizable. La degradación de la celulosa es realizada por la bacteria en su parte extracelular llamada celulosoma, que contiene casi 20 subunidades catalíticas (Demain *et al.*, 2005)

Cuadro 1.7. Clasificación taxonómica de *Clostridium thermocellum*

Clasificación			
Dominio	Bacteria		
Filo	Firmicutes	Familia	Clostridiaceae
Clase	Clostridia	Género	Clostridium
Orden	Clostridiales	Especie	<i>C. thermocellum</i>
		Nombre binomial	<i>Clostridium thermocellum</i>

Fuente: Demain *et al.*, 2005

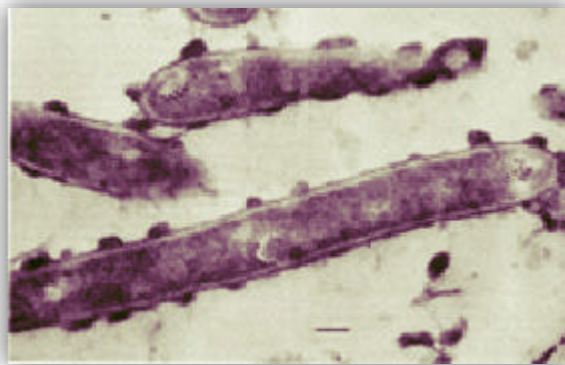


Figura 1.11. *Clostridium thermocellum*

Fuente: Demain *et al.*, 2005

1.4.5. *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia *moniliaceae*, orden *moniales*, clase *hyphomicetes*, filum *deuteromycota*.

Las características de *Aspergillus niger* son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro purpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas (Sáez *et al*, 2002)

Cuadro 1.8. Clasificación taxonómica de *Aspergillus niger*

Clasificación			
Dominio	Eucharya		
Subdominio	Fungi	Familia	Moniliaceaea
División	Eumycota	Orden	Moniliales
Subdivisión	Deuteromycotina	Género	Aspergillus
		Especie	<i>Niger</i>

Fuente: Chacon, 2002

Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas (Sáez *et al*, 2002)

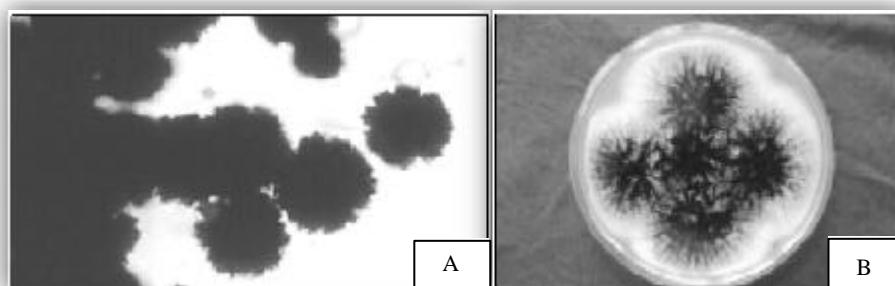


Figura 1.12. A) Cabezas conidiales (globosas). B) Colonias en placas petri con esporulación

Fuente: Sáez *et al*, 2002

Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o en dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas (Sáez *et al*, 2002).

Las vesículas son subesféricas, con 20-100 μm de diámetro. Un gran número de células conidiogénicas se producen en la superficie de la vesícula multinucleada a medida que esta se desarrolla, por lo que se observan como cabezas conidiales radiadas. Métula presente y su tamaño es dos veces el tamaño de las fiálides.

Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos o con estribaciones longitudinales marcadas.

Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café. (Sáez *et al*, 2002) Las células conidiogénicas, sean primarias o secundarias, son típicas fiálides.

A medida que las fiálides alcanzan la madurez, comienzan a producir conidios, uno tras otro, en cadenas. Los conidios son globosos, ornamentados, de color marrón, con paredes rugosas y con 3,5-5,0 μm de diámetro. Los conidios se forman en el extremo de las fiálides tubulares.

1.4.5.1. *Aspergillus fumigatus*

Hongo filamentoso con conidióforos cortos (300 x 3-8 µm), de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin cerrar y sin ramificaciones. Nacen de una célula base del micelio, ensanchando al final en una vesícula amplia, coronada de esterigmas en forma de vasija (20 a 30 µm de diámetro).

Esterigmas (6-8 µm) de una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular y cubren parcialmente la superficie de la vesícula. Conidios verdes oscuros, unicelulares, redondos o pseudoesféricos (2-3 µm de diámetro) formando cadenas largas que no se ramifican y permanecen unidos formando columnas (200 a 400 µm de longitud) (Rev Iberoam Micol, 2002).

Cuadro 1.9. Clasificación taxonómica de *Aspergillus fumigatus*

Clasificación			
Reino	Fungi		
Filo	Ascomycota	Familia	Trichocomaceae
Clase	Eurotiomycetes	Género	Aspergillus
Orden	Eurotiales	Especie	A. fumigatus
		Nombre binomial	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Fuente: Chacon, 2002

Colonias de crecimiento rápido (Figura 2.10), planas, vellosas, compactas, blancas al comienzo, toman rápidamente un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado y consistente. La superficie muestra algunos pliegues y mechones vellosos blancos. Dorso incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. Su crecimiento es más rápido a 37 °C (Rev Iberoam Micol, 2002).

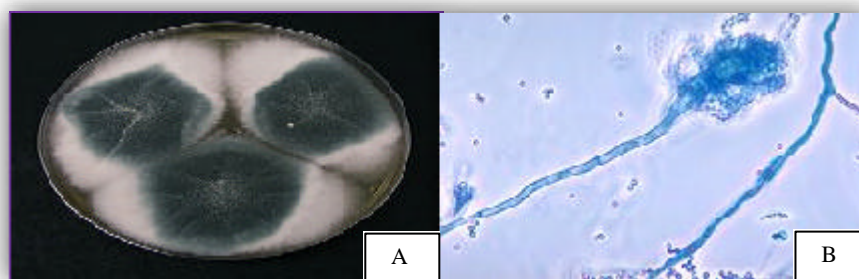


Figura 1.13. A) Colonias de *A. fumigatus* B) conidófora de *A. fumigatus*

Fuente:Wikipedia, 2010

A. fumigatus es un saprobio cosmopolita que se ha aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materiales orgánicos en descomposición (Rev Iberoam Micol, 2002). La especie es termotolerante y es capaz de crecer entre los 12 y los 57 °C; en atmósferas que contengan un 100% de N y tolera atmósferas capnófilas in vitro (10% de CO₂). También es capaz de soportar una pasteurización a 63 °C durante 25 min y provoca un calentamiento del heno y maíz alterado alcanzando una temperatura de 50 °C (Rev Iberoam Micol, 2002).

Este hongo produce un importante número de metabolitos específicos que poseen efectos antibióticos y tóxicos, como esfingofunginas, espinulosina, ferricrocina, festuclavina, filostina, fumagilina, fumiclavina, fumifungina, fumigacina (o ácido helvólico), fumigatina, fumitoxinas, fumitremorgina, fusígeno, gliotoxina, tripacidina, triptoquivalinas, verrucologeno (Pontón *et. al.*, 2002).

1.4.5.2. *Leuconostoc*

Los leuconostocs son bacterias lácticas mesófilas heterofermentativas, producen ácido láctico de tipo D (-) y son incapaces de hidrolizar la arginina. El género *Leuconostoc* (*Ln.*) comprende cuatro especies: *Ln. mesenteroides*, *Ln. paramesenteroides*, *Ln. lactis* y *Ln. oenos*. La especie *Ln. mesenteroides* incluye, a su vez, tres subespecies: *mesenteroides*, *cremoris* y *dextranicum*.

1.4.5.3. *Leuconostoc dextranicum*

Bacteria Gram positiva, quimiorganotrófica y aerobia facultativa. Su morfología es principalmente esférica y se encuentran en pares o cadenas cocos. Estas bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* se consideran lactacidobacterias de amplio conocimiento y utilidad en la industria alimenticia por sus propiedades fermentadoras y para la generación de compuestos odoríferos (Bou *et al*, 2004). Estas cocáceas o cocobacilos grampositivos no esponjados, ovoides, a menudo forman cadenas; son microaerófilos con grandes exigencias nutricionales para su crecimiento en medios de

cultivo y pertenecen a la familia *Streptococcaceae*. En la naturaleza se encuentran en gran variedad de ecosistemas vegetales (Bou *et al*, 2004).

Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina y catalasa-negativos (lo cual los distingue de *Staphylococcus*). Son heterofermentativos, capaces de producir dextrano a partir de la sacarosa.

Cuadro 1.10. Clasificación taxonómica

Clasificación de <i>Leuconostoc dextranicum</i>			
Reino	Bacteria	Orden	Lactobacillales
Filum	Firmicutes	Familia	Noctuoidea
Clase	Bacilo	Género	Lactococcus
Especie	Dextranicum	Nombre Científico	<i>L. dextranicum</i>

Fuente: Flanzky, 2004

La mayoría de las cepas en cultivo líquido aparecen como cocos, se producen solos o en parejas o en cadenas cortas, sin embargo, la morfología puede variar según las condiciones de crecimiento, las células crecidas en glucosa o en medios sólidos pueden tener una morfología alargada en forma de varilla. Las células son Gram positivos, asporogenous y no móvil (Bou *et al*, 2004). En condiciones de microaerofilia, la fermentación se lleva a cabo por la vía heteroláctica; la glucosa y otros azúcares (hexosas) se convierten en cantidad equimolar de D-lactato, etanol y CO₂ a través de una combinación de la hexosa monofosfato y la vía de pentosa fosfato (Anexo A). Otras vías metabólicas incluyen la conversión

de citrato de diacetilo, acetoína y la producción de dextranos y levano a partir de sacarosa (Cock *et al*, 005)

Heteroláctica: Se produce una mezcla de productos finales, entre los que se encuentran lactato, acetato, etanol y CO₂. Es característica de bacterias del género *Leuconostoc* y de algunas de *Lactobacillus*. La fermentación heteroláctica se produce cuando la glucosa se transforma en piruvato por una vía compuesta por las primeras reacciones en la vía del fosfogluconato, pero que utilizan NAD⁺ en lugar de NADP. El rendimiento energético es la mitad que el de la vía EMP, se produce una sola molécula de piruvato por mol de glucosa y el resto de la molécula es transformado en acetato (o etanol) y CO₂.

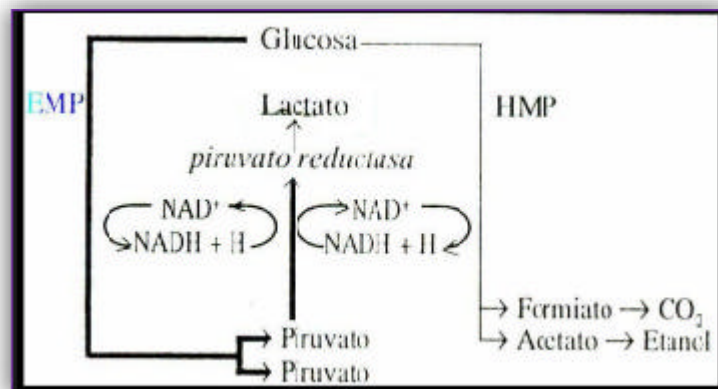


Figura 1.14. Metabolismo heterofermentativo de la glucosa

Fuente: Flanzy, 2004

1.4.6. Etapas del proceso de producción de etanol.

1.4.6.1.Hidrólisis

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

????????????????

Con la finalidad de transformar las moléculas de celulosa, mezclas complejas concentradas de hemicelulosa y lignina en azúcares fermentables los cuales son asimilados por las bacterias o levaduras, la celulosa es sometida a un proceso de hidrólisis mediante el cual ocurre un desdoblamiento ya sea por un exceso de agua o por la presencia de una pequeña cantidad de fermento o ácido. De acuerdo a lo anterior la hidrólisis puede ser ácida (ácidos concentrados y diluidos) o enzimática (Miliarium, 2004).

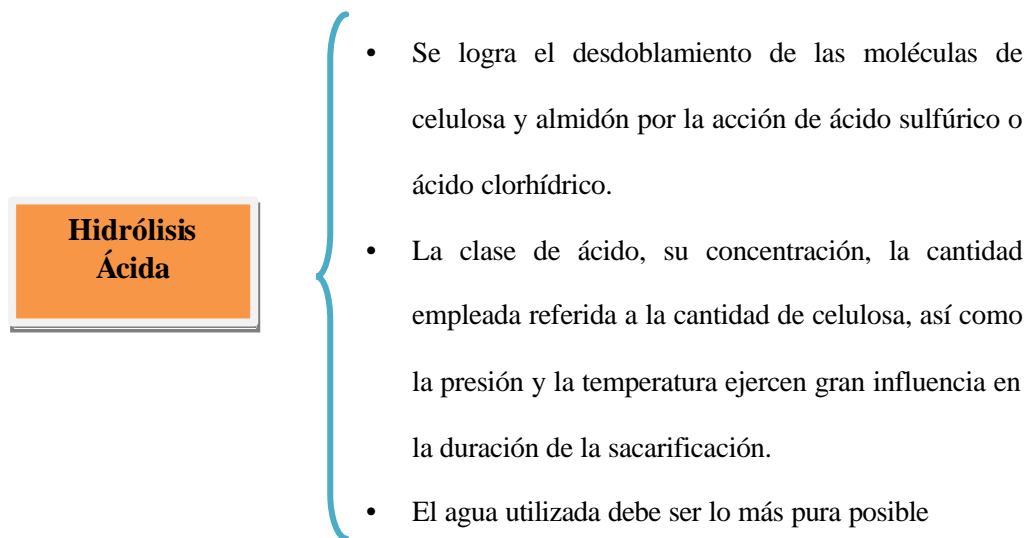


Figura 1.15. Hidrólisis ácida (Alexandra Angulo, Quito, Julio, 2010)

1.4.6.1.1. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas, ejerciendo un efecto catalítico hidrolizante, es decir rompen la celulosa, lignina, hemicelulosa y otros azúcares presentes en las frutas. La celulosa es degradada por las celulasas a azúcares, que pueden ser fermentadas por levaduras o bacterias para la producción de etanol (Cabanillas & Rojas, 2008).

El proceso consiste en descomponer la celulosa y la hemicelulosa del residuo en azúcares sencillos y transformarlos en etanol mediante fermentación. En primer lugar se debe realizar un pre tratamiento del residuo, cuyo objetivo es alcanzar los mejores resultados en las etapas de hidrólisis y fermentación. Este sistema multienzimático, constituido básicamente por tres enzimas: Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-

glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Cabanillas & Rojas, 2008).

De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, se encuentran los hongos capaces de conseguir rendimientos superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos, principalmente de las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Penicillium* (Cabanillas & Rojas, 2008).



Figura. 1.16. Mecanismo de acción de las enzimas
Fuente: Bioiberica, 2010

Como resultado del pre tratamiento se obtiene una disolución de azúcares provenientes de la ruptura de la hemicelulosa y un residuo sólido constituido principalmente por la celulosa del residuo original.

La hidrólisis enzimática es el único proceso de hidrólisis en el que se obtiene un elevadísimo grado de aminoácidos libres y biológicamente activos. Además en relación a la hidrólisis química presenta mayor rendimiento, no necesita utilizar agentes químicos y genera menores costos de equipamiento (Cabanillas & Rojas, 2008).

1.4.6.2. Fermentación.

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

La fermentación es un proceso anaeróbico de oxidación incompleta que realiza la transformación de moléculas complejas en sencillas, la fermentación típica es llevada a cabo por las levaduras, algunos metazoos y protistas también capaces de realizarla (Wikipedia, 2010).

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

Ésta etapa del proceso se realiza por medio de bacterias fermentativas, levaduras, bacterias ácido lácticas y algunos hongos que se encargan de procesar los hidratos de carbono, en éste caso la fermentación de la glucosa liberada a partir de la celulosa, así como la de los azúcares procedentes de la hemicelulosa que se han liberado durante los pretratamientos anteriores (Suarez, 2008).

La fermentación más ampliamente conocida es la escisión de glucosa para formar etanol y CO₂, en especial predominante en levaduras. Las levaduras utilizan las mismas reacciones del mecanismo Embden – Meyerhof hallado en animales para producir piruvato. El piruvato es descarboxilado en levaduras por una enzima que utiliza pirofosfato de tiamina como coenzima. El derivado hidroximetiltiamina intermedio se descompone para liberar acetaldehído al medio, el cual es entonces reducido por NADH a etanol (Restrepo *et al*, 2007).

Cabe subdividir el mecanismo anaerobio de la glucosa en estas etapas:

- a) Fosforilación inicial
- b) Síntesis de glucógeno
- c) Conversión en triosa
- d) Etapa oxidativa
- e) Formación del lactato o etanol

Según H. Palacio se presenta las reacciones que son base de la fermentación alcohólica en un esquema, con las enzimas que rigen cada reacción, a veces llamado esquema de Embden- Meyerhof (Restrepo *et al*, 2007).

La glucosa y otros azúcares experimentan fosforilación obligada como primer paso del metabolismo. Esta fosforilación es catalizada por una subclase de un grupo de enzimas, las “quinasas irreversibles”; el producto de la reacción de ATP y glucosa en presencia de la cinasa adecuada y Mg^{++} es glucosa-6-fosfato, la irreversibilidad de esta reacción se explica por la formación de un éster fosfato a expensas del enlace de fosfato rico en energía, este paso es importante porque a partir de la glucosa-6-fosfato se generan muchas rutas metabólicas (Restrepo *et al*, 2007).

La formación de ácido láctico, producto terminal del metabolismo anaerobio de la glucosa va precedida de desdoblamiento del esqueleto de la hexosa en triosa. La primera reacción que experimenta la glucosa -6-fosfato, en esta vía metabólica es su conversión en fructosa -6-fosfato, reacción catalizada por la fosfohexosaisomerasa (Manquilef, 2006).

En las células de las levaduras hay una pirucod Descarboxilasa anaerobia que desdobla el ácido piruvico en CO_2 y acetaldehído, el cual se reduce a etanol; el producto terminal de la fermentación alcohólica, por acción de la alcoholdehidrogenasa actúa en sentido inverso.

El NADH necesario para esta reducción proviene de la etapa oxidativa (Restrepo *et al*, 2007).

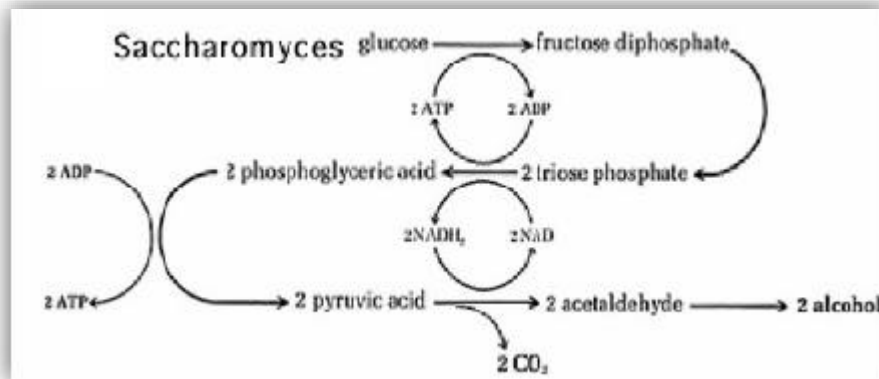


Figura. 1.17. Mecanismo de *S. cereviceae* en la fermentación alcohólica
Fuente: Kenneth, 2008

Los microorganismos (*Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc dextranicum* y *Clostridium thermocellum*) contienen una enzima llamada invertasa, que actúa como catalizador ayudando a transformar los azúcares en glucosa y fructuosa.

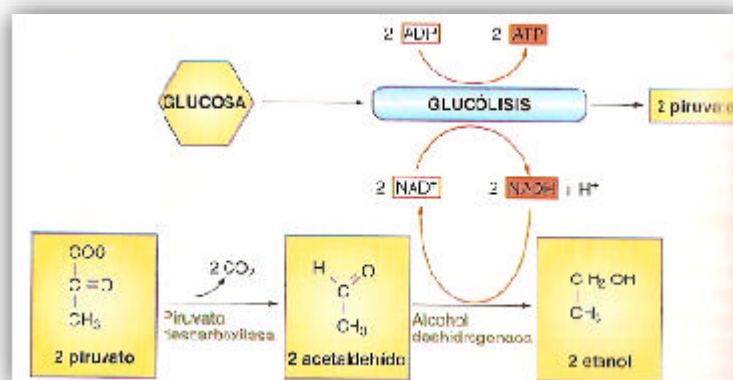
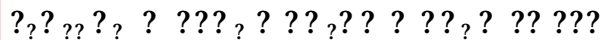


Figura. 1.18. Mecanismo de fermentación alcohólica
Fuente: Molinero, 2009

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

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

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



Esta es la formula típica de la fermentación alcohólica, la cual fue desarrollada por Gay- Lussac; quien describe la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono con producción de 28 calorías, Gay- Lussac obtuvo 23 partes de alcohol, lo cual indica un rendimiento aproximado de 50% de alcohol y 50% de dióxido de carbono (Restrepo & Suarez 2008).

El rendimiento teórico de la fermentación según Gay –Lussac es por 100 g de glucosa se obtendría 48,90% de dióxido de carbono y 51,10% de alcohol etílico.

Sin embargo, el rendimiento práctico que se alcanza en el proceso siempre es menor que el teórico ya que parte del azúcar presente inicialmente, es usada para la nutrición y reproducción de los microorganismos y además, porque siempre se forman aunque en pequeñas cantidades, algunos productos secundarios, tales como los aceites fusel (alcohol n-propílico, isopropílico, n butílico), ácido succínico, glicerina, ácido láctico entre otros (Restrepo & Suarez 2008).

1.4.6.3. Balance de energía

El balance de energía del proceso total determina su viabilidad económica ya que el etanol se produce como fuente de energía. La etapa de recuperación del producto (destilación del etanol), es la que exige mayor energía de todo el proceso. Por ello, las adecuaciones en el proceso de destilación tendrán mayor influencia en el éxito del proceso final que las mejoras en la propia fermentación. Si el rendimiento de energía del etanol producido se relaciona con el aporte total de energía de las distintas etapas del proceso, existe un balance aproximado o una pérdida neta de energía. Esto demuestra la importancia de optimizar al máximo todas las etapas del proceso (Mosquera, 2008).

1.4.6.4. Destilación

Es uno de los métodos más usados en la separación y purificación de líquidos. El objetivo principal de la destilación es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles. El éxito obtenido en el uso de las técnicas de destilación depende de varios factores (Uyazán *et al*, 2008).

Entre éstos se incluye la diferencia de presión de vapor (referido a la diferencia en el punto de ebullición) de los componentes presentes, de la cantidad de muestra, del equipo de destilación, de la posible destilación simultánea de dos componentes, o la formación de azeótropos, y del cuidado que tenga el experimentador (Uyazán *et al*, 2008).

Dado que el proceso de destilación se basa en el hecho de que el vapor procedente de una mezcla líquida es más rico en el componente más volátil, estando la composición controlada por las leyes de Raoult y Dalton, una **destilación simple** no conducirá nunca a la separación completa de las dos sustancias volátiles, excepto cuando la diferencia de volatilidad es muy grande) (Uyazán *et al*, 2008). Por ejemplo, cuando se destila un líquido se separan sus impurezas no volátiles. De hecho, la obtención de agua destilada o la purificación de disolventes orgánicos mediante destilación simple son procesos cotidianos en el laboratorio y en la industria. En algunas ocasiones se pueden separar dos o más líquidos mediante destilación simple siempre que sus temperaturas de ebullición difieran

notablemente (más de 60° C). Existen tres tipos de destilación: simple, fraccionada y a vacío.



Figura. 1.19. Tipos de destilación

Fuente: Uyazán *et al*, 2008

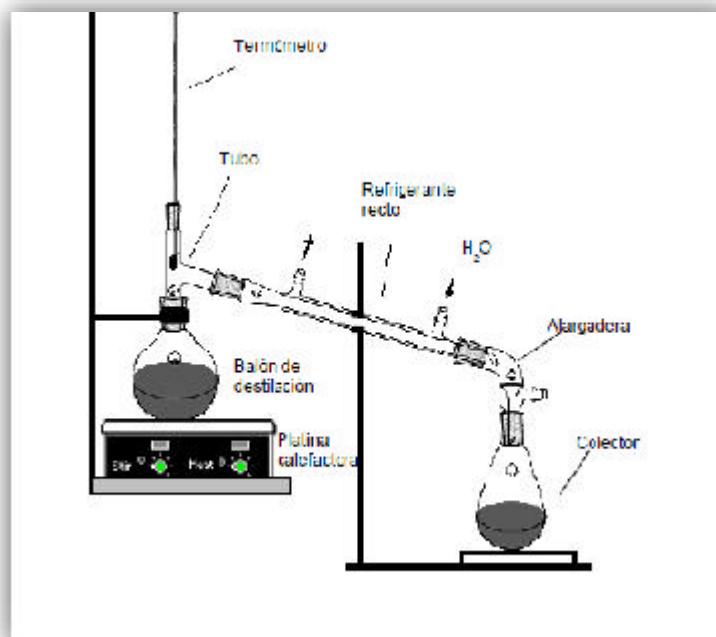


Figura. 1.20. Equipo de destilación simple

Fuente: Uyazán *et al*, 2008

1.4.6.4.1. Destilación a vacío

Se trata de una destilación sencilla o fraccionada según el equipo empleado realizada a presión reducida. No es posible destilar a presión atmosférica ya que muchas sustancias porque se descomponen antes de alcanzar el punto de ebullición normal. Otras sustancias tienen puntos de ebullición tan altos, que su destilación es difícil o resulta no conveniente. Frecuentemente tales líquidos pueden destilarse a presión reducida (Cibex, 2009).

La presión reducida hace que las temperaturas de ebullición sean más bajas, lo que permite separar sustancias con puntos de ebullición elevados y que permitan descomponerse a temperaturas elevadas. Un líquido comienza a hervir a la temperatura a la que su presión de vapor empieza a superar la presión exterior, por esta razón es importante reducir la presión externa (Cibex, 2009).

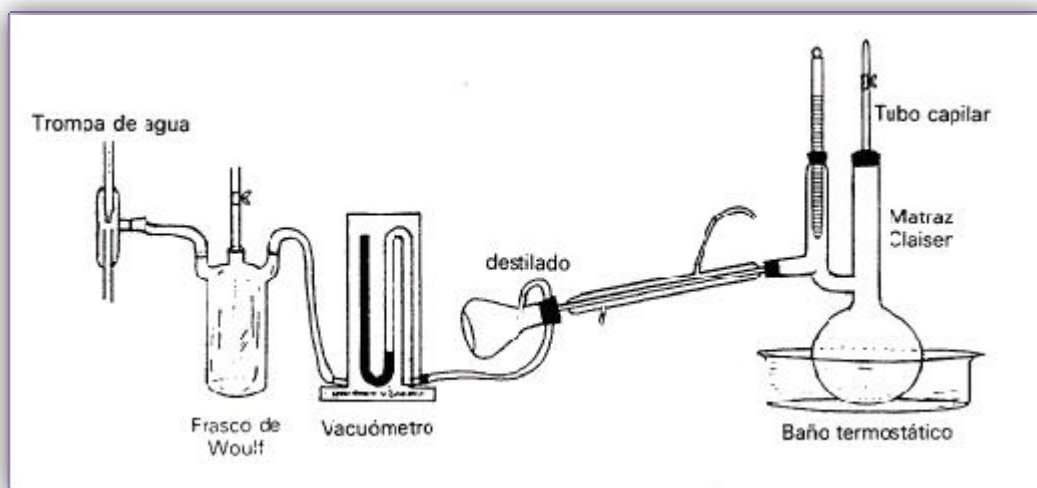


Figura. 1.21. Equipo de destilación al vacío

Fuente: Uyazán *et al*, 2008

1.4.6.5. Refractometría

Cuando la radiación atraviesa un medio transparente, se produce una interacción entre el campo eléctrico de la radiación y los electrones de enlace del medio. Como consecuencia, la velocidad de la propagación del haz es menor que en el vacío (Skoog *et al*; 2001)

La medida relativa de la variación entre dos medios tomando uno fijo como referencia se le conoce como índice de refracción n y en general está expresado con respecto al aire.

El instrumento para medir n , es básicamente un sistema óptico que busca medir el ángulo que se ha desviado por la radiación, utilizando para ello dos prismas: uno fijo de iluminación sobre el cual se deposita la muestra y uno móvil de refracción. Los prismas están rodeados de una corriente de agua termostatzada, ya que la temperatura es una de las variables que afecta a la medida (Skoog *et al*; 2001)

El índice de refracción de una sustancia n_i a una longitud de onda i esta dado por la relación.

$$n_i = \frac{c}{V_i}$$

donde V_i es la velocidad de propagación en el medio y c es la velocidad en el vacío. El índice de refracción de muchos líquidos varía entre 1.3 y 1.8; es de 1.3 a 2.5 o mayor en los sólidos.

El índice de refracción de una sustancia se determina ordinariamente midiendo el cambio en dirección (refracción) de una radiación colimada cuando pasa de un medio a otro.

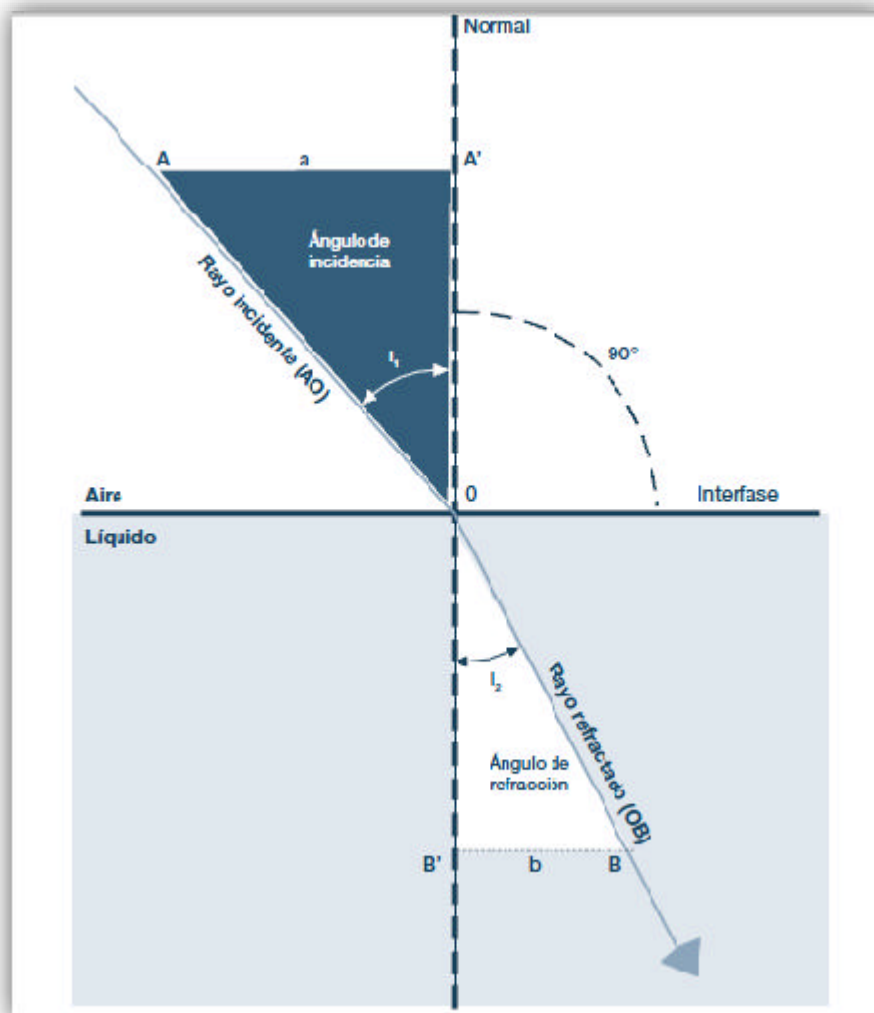
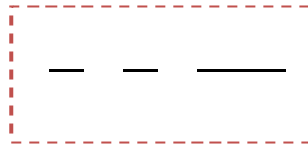


Figura. 1.22. Refracción de un rayo luminoso a través de un líquido
Fuente: Skoog ; 2001.

1.4.6.6.Cromatografía

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observan como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido (Skoog *et al*; 2001. pp 720).

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases.

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se dividen en **Cromatografía de gases**: a) cromatografía gas- líquido (partición), b) cromatografía gas-sólido (adsorción); **Cromatografía de líquidos**: a) *Cromatografía plana*: cromatografía en capa delgada (adsorción) y cromatografía en papel (partición) y b) *Cromatografía en columna*: cromatografía líquido-sólido (adsorción), cromatografía líquido-líquido (partición), cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión (Skoog *et al*; 2001)

Es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan poderoso ni tiene tantas aplicaciones como la cromatografía.

1.4.6.6.1. Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (cromatografía gas- sólido) o un líquido (cromatografía gas- líquido).

En la primera, el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta el soluto y el soporte, que puede ser alúmina, sílica gel, carbón, etc. y en la segunda, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílica, vidrio, etc. y el gas transporta el soluto (Lieberman; 1988).

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito a través de la columna (Skoog *et al*; 2001)

Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, esta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas transportador a lo largo de la columna donde se distribuye entre la fase sólida y líquida. Este proceso de partición o reparto entre ambas fases está definido como el “factor de capacidad” K' determinado bien sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las fases respectivas (Skoog *et al*; 2001).

Cuadro 1.11. Clasificación de métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases (CG)	Gas-líquido	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Partición entre gas y líquido
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción

Fuente: Skoog *et al*; 2001

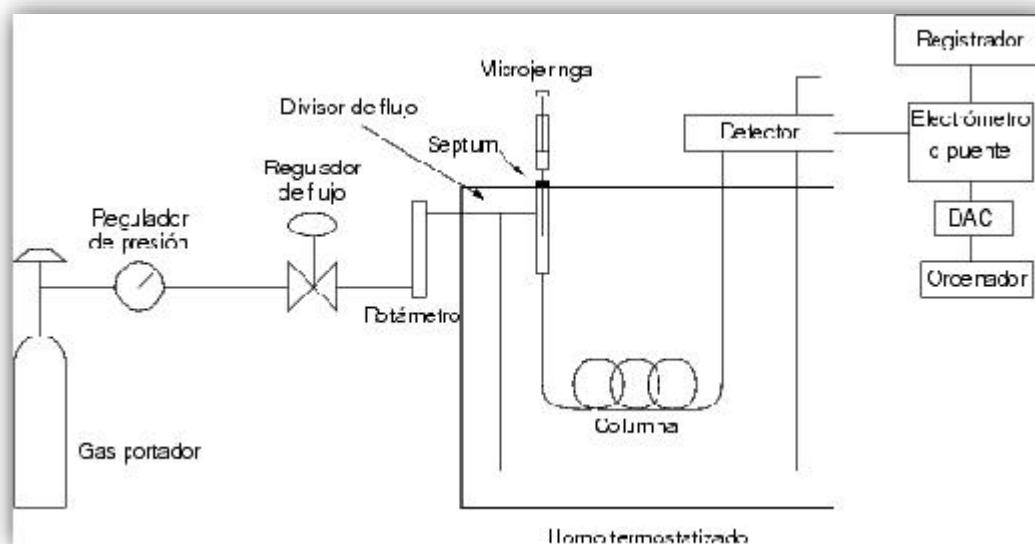


Figura. 1.23. Diagrama de un cromatógrafo de gases

Fuente: Skoog *et al*; 2001

1.5. Hipótesis

1.5.1. *Hipótesis para la fase de Hidrólisis.*

H₀: Los microorganismos nativos (bacteria y hongo) tienen igual o mejor eficiencia que *Aspergillus niger* en la fase de hidrólisis.

1.5.2. *Hipótesis para la fase de fermentación.*

H₀: El microorganismo nativo (bacteria) tiene igual o mejor eficiencia que *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas mobilis* en la fase de fermentación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación se realizó en el Instituto Agropecuario Superior Andino – IASA I, con la colaboración del Dr. Darwin Rueda. y la Bioq. Elena Mafla. En calidad de investigadores.

Adicionalmente se contó con la participación del Dr. Germánico Silva y el Dr. Carlos López MSc., en la cuantificación de etanol que se realizó por medio de cromatografía de gases en los laboratorios del Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL CIA. LTDA. Por otra parte las cepas bacterianas *de Clostridium thermocellum* ATCC 27405 utilizadas en la investigación fueron obtenidas desde los laboratorios de ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION de USA.

2.2. Zona de Estudio

2.2.1. Fase de campo

La fase de campo se efectuó en la localidad de El Membrillo; situada en la Provincia de Manabí, cantón Tosagua, parroquia Bachillero, ubicada entre los 100 m.s.n.m. El cantón Tosagua está localizado al noroeste de la provincia de Manabí, geográficamente se encuentra en las coordenadas: 0° 0' 47'' latitud (Sur); 80° 15' 00'' longitud (Oeste) (Google Maps, 2009).

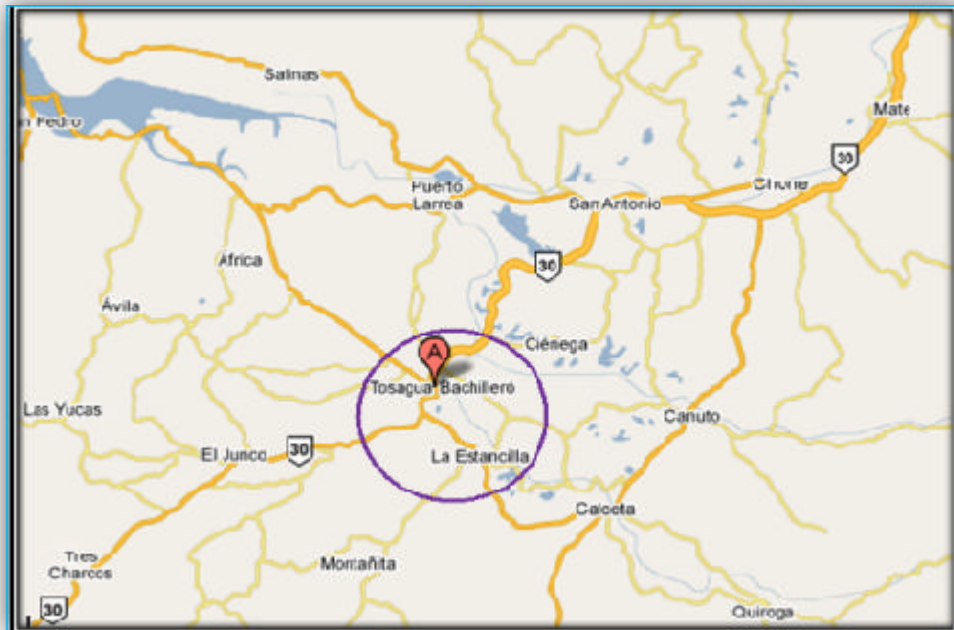


Figura 2.1 Localización geográfica de la localidad El Bachillero, en el Cantón Tosagua.

Fuente: Google Maps, 2009.



Figura 2.2. Fisonomía de los cultivos de sandía en la Finca El Membrillo a 100 m.s.n.m. (Alexandra Angulo; Manabí, Junio, 2010)

2.2.2 Fase de laboratorio

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Agrobiotecnología y de Bioquímica de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA I en la Hacienda el Prado, ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, a 78° 24' 44'' (Oeste) y 0° 23' 20'' (Sur), (ESPE, 2009) y en los laboratorios del Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL CIA. LTDA., localizado en Quito, Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús, a 0°15',0'' (Sur) y 78°35',24'' (Oeste)

2.3 Período de tiempo de investigación

El proyecto se inició en el mes de Enero del 2010 con una fase de campo y fase de laboratorio cuya parte experimental concluyó en Octubre del 2010.

En la fase de campo se estableció la búsqueda y colección de los residuos de sandía, con una duración de 2 semanas.

La fase de laboratorio se desarrolló después de la colecta de los residuos de sandía seleccionadas para el estudio. Comprendió en el acondicionamiento de las muestras vegetales, preparación de extractos acuosos, aislamiento de microorganismos nativos, pruebas bioquímicas, hidrólisis enzimática, fermentación, destilación y cuantificación del bioetanol por cromatografía de gases; en un período aproximadamente de 8 meses.

2.4 Diseño

Se estableció un Diseño experimental DCA en arreglo factorial 2x3+1, para comparar la capacidad de Hidrólisis de cada tratamiento. Donde se tienen dos factores M: tipo de microorganismo y C: temperatura, cada uno con tres niveles.

Cuadro 2.1. Factores en Estudio

M: Microorganismo	C: Temperatura
M_1 (bacteria)	C_1 25° C
M_2 (hongo)	C_2 30° C
	C_3 35° C

Fuente: Com. Pers. Suárez, 2010.

Los datos se analizaron mediante el paquete INFOTAD versión (INFOTAD, 2000). En los Cuadros 2.1; 2.2 y 2.3 se indican los tratamientos a efectuarse para el desarrollo de la presente investigación:

Cuadro 2.2. Tratamientos

$M_1 C_1$
$M_1 C_2$
$M_1 C_3$
$M_2 C_1$
$M_2 C_2$
$M_2 C_3$
Testigo: <i>Aspergillus niger</i>

Fuente: Com. Pers. Suárez, 2010.

Esquema del análisis de varianza

Fuentes de varianza (FV)	Grados de libertad (GL)
Total	20
Tratamientos	(6)
Microorganismos	1
Temperatura (C)	2
T. lineal	1
T. Cuadrático	1
M x C	2
Test vs Resto	1
Error	14

$$CV = \frac{\sqrt{CME}}{\bar{X}}$$

Donde:

CV: Coeficiente de variación

CME: Cuadrado medio experimental

\bar{X} : Media general

Cuadro 2.3. Tratamientos

BC ₁
BC ₂
BC ₃
Testigo 1: <i>C. Thermoacellum</i> ATCC 27405
Testigo 2: <i>Z. mobilis</i>

Esquema del análisis de varianza

Fuentes de varianza (FV)	Grados de libertad (GL)
Total	19
Tratamientos	(4)
Test ₁ vs Resto	1
Test ₂ vs T ₁ , T ₂ , T ₃	1
Temperatura lineal	1
Temperatura Cuadrático	1
Error	15

$$?? ? \frac{?? ??}{?} ? ???$$

Donde:

CV: Coeficiente de variación

CME: Cuadrado medio experimental

\bar{X} : Media general

Se realizó de este modo un modelo experimental de 2 x 3 +1, con 3 repeticiones por tratamiento, con un total de 81 tratamientos (Com. Pers. Suárez, 2010).

2.4.1 Análisis estadístico

2.4.1.1. Fase de hidrólisis

El análisis estadístico se determinó por medio de la Prueba de DMS al 5% para microorganismos; prueba de Duncan al 5% para tratamientos en general y niveles de temperatura, regresión y correlación de los niveles de temperatura con cada variable en estudio para cada microorganismo.

2.4.1.2. Fase de Fermentación

El análisis estadístico para la fase de fermentación se determinó por medio de las pruebas de comparación medias de Duncan al 5% para cada tratamiento, prueba de normalidad y homocedasticidad para verificar los supuestos del análisis de varianza. Además se realizó análisis de varianza donde se tomo en cuenta la cantidad de mosto que entrará a fermentar en cada unidad experimental; regresión y correlación entre las temperaturas con cada una de las variables en estudio (Com. Pers. Suárez, 2010).

Para comparar la capacidad de síntesis, cantidad de fermento y destilación de cada tratamiento se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Donde se tuvo un solo factor que son los niveles de C: temperatura y el microorganismo (bacteria) más eficiente que mas el testigo da un total de cuatro tratamientos.

2.4.1.3. Variables

Las variables planteadas en el presente trabajo contribuyeron en la determinación de la eficiencia de microorganismos nativos, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405, *Zymomonas mobilis*, y *Aspergillus niger* para la obtención de bioetanol.

Variable dependiente: UFC de los microorganismos (Bacteria y Hongo); determinación de la concentración promedio de grados brix de muestras de residuos de sandía en el proceso de hidrólisis y determinación de la concentración y calidad de bioetanol monitoreado con GC.

Variables independientes: Temperatura

En la Figura 2.3 se muestra los tratamientos efectuados en el desarrollo de la presente investigación.

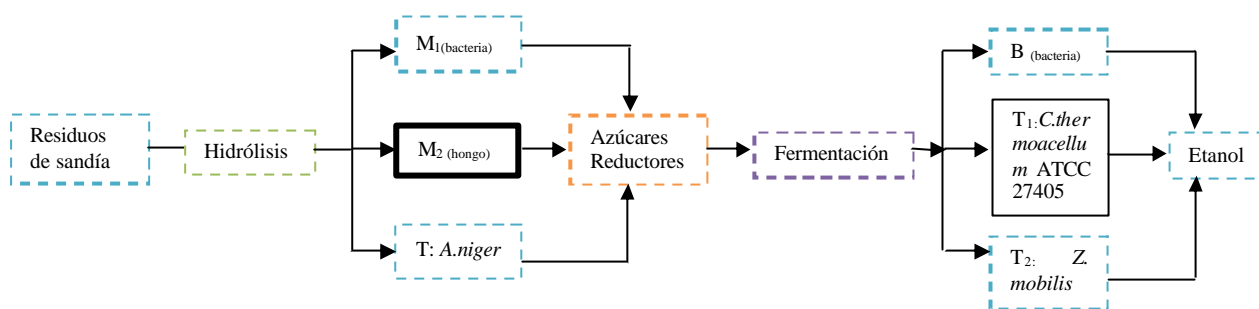


Figura 2.3 Esquema de los tratamientos empleados en el Modelo experimental para la obtención de bioetanol. (Alexandra Angulo; Quito, Agosto, 2010)

2.5 Procedimientos

2.5.1 Materiales

Para la obtención del bioetanol se utilizaron residuos de sandía (*Citrullus lanatus*) y las cepas de *Leuconostoc dextranicum*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*. Los medios de cultivo fueron: Agar nutriente, Papa Agar dextrosa (PDA), Agar caldo de nitratos, Bacto Peptona. Los antibióticos Terramicina y Ciclohexamida 30 mg se emplearon como controles para impedir la proliferación de bacterias contaminantes.

En la preparación de la identificación morfológica de las bacterias nativas (*Leuconostoc dextranicum*) y *Zymomonas mobilis* se empleó los reactivos: Agua bidestilada, Violeta de genciana, Lugol, Safranina, Alcohol al 70%. En la identificación bioquímica de *Zymomonas mobilis* y *Leuconostoc dextranicum* se utilizó: Reactivo de Kovacs, Peróxido de hidrógeno al 30%, adicionalmente se utilizó Tween 80, Caldo triptófano y Kit de nitratos para *Z. mobilis* y Agar Urea para *L. dextranicum*.

Para la identificación morfológica de las cepas nativas (*Aspergillus niger* y *A. fumigatus*) se utilizó los reactivos: Agua bidestilada, Alcohol al 70% y 90% y Lactofenol. De manera general los materiales empleados para este procedimiento fueron: asa de platino, papel filtro Whatman N°1, agitador magnético, parafilm, balanza analítica, plancha de calentamiento, microondas, cámara de flujo laminar, mechero bunsen, guantes de nitrilo, mascarilla, pipetas pasteur 1 ml, jeringas estériles de 2.5 ml, gradillas; además del respectivo material de vidrio como: tubos de ensayo de 10 ml, placas petri de vidrio 100 mm, portaobjetos, pipetas graduadas 10 ml, probetas de 10 ml, 100 ml; vasos de precipitación, matraces erlenmeyers de 100ml y 500ml.

Para los ensayos microbiológicos se emplearon: microscopio, incubadora a 30 y 37°C, estereomicroscopio, balanza analítica, pH metro, agitador Vórtex y estufa para el secado de material de vidrio. El autoclave se empleó para la esterilización de medios de cultivo y material de vidrio.

Los reactivos: Ácido 3-5 DNS, Tartrato de sodio y potasio, Hidróxido de sodio, se utilizaron para la preparación del Reactivo DNS el cual se empleo en la cuantificación de azúcares reductores. El agua destilada se empleó para la preparación del reactivo DNS, solución stock de glucosa y lavado de material. Los materiales empleados fueron: matraz de 250 ml, papel aluminio, balones volumétricos de 1000 ml y 10 ml, probetas 100 ml, agitador magnético y espectrofotómetro.

Los equipos: incubadora a (25°, 30° y 35°) C, botellas plásticas de 5000 ml, equipos de venoclisis, vasos colectores de 200 ml, molino eléctrico y licuadora, fueron utilizados para el acondicionamiento de las muestras vegetales. El destilador y bomba de vacío en la obtención del etanol el cual fue sometido a cuantificación por medio de un cromatógrafo de gases (SHIMADZUY).

2.5.2. Metodología

2.5.2.1. Fase de Campo

2.5.2.1.1. Selección de residuos de sandía

Los frutos de sandía utilizados para el estudio fueron seleccionados tomando en cuenta su representatividad y mal estado para así disminuir los efectos de contaminación que dichos residuos generan en las cuencas hidrográficas y evitar el uso de frutos en buen estado que son destinados para alimentación

2.5.2.1.2. Colección del material vegetal

Los residuos de sandía (*Citrullus lanatus*) del presente estudio se colectaron entre los meses de Junio y Julio del año 2010 en la localidad de El Membrillo, provincia de Manabí, población caracterizada por un clima cálido seco con una temperatura promedio de 26° C, suelos secos, arenosos, pedregosos de naturaleza levemente ácida a 100 m.s.n.m (PROFIAGRO, 2007). La colección del material vegetal se lo realizó en: sembríos de hileras.



Figura 2.4 Recolección de *Citrullus lanatus* en cultivos en hileras. (Alexandra Angulo; Manabí, Junio, 2010)

2.5.2.2. Fase de Laboratorio

2.5.2.2.1. Tratamiento del Material Vegetal

Cada uno de los componentes vegetales fue cuidadosamente seleccionado, las partes del material que se empleó en la preparación del fermento para el aislamiento de microorganismos, ver Tabla 2.1. Se lavó el material vegetal de manera minuciosa, utilizando agua potable, con el propósito de que las impurezas no interfirieran en el estudio. Se eliminó el exceso de agua de las muestras (Com. pers. Rueda, 2010).

Tabla 2.1 Residuos de *Citrullus lanatus*, partes a estudiar y extracto a evaluar.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada	Extracto
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	Pulpa	Extractos acuosos.
		Corteza	

Fuente: Datos de experimentación. (Alexandra Angulo, Quito; Junio, 2010)

2.5.2.2.2. Aislamiento de microorganismos

Se empleó 100 g de cada muestra vegetal (pulpa y corteza) trituradas, las cuales se colocaron en un matraz estéril con 50 ml de agua bidestilada. Se agitó por espacio de 30 min durante 8 días con el propósito de desprender el mayor número de microorganismos.

Posteriormente a partir de esta solución se realizaron diluciones de forma decimal seriada hasta alcanzar una dilución de 10^{-4} en tubos de ensayo de 10 ml de la solución. A partir de las diluciones y tras su correcta homogenización se procedió a la siembra en profundidad, por duplicado (bacterias y hongos) y en estrías (bacterias) en placas de Petri con medios de cultivo específicos para cada grupo de microorganismo estudiado (Figura 2.5).

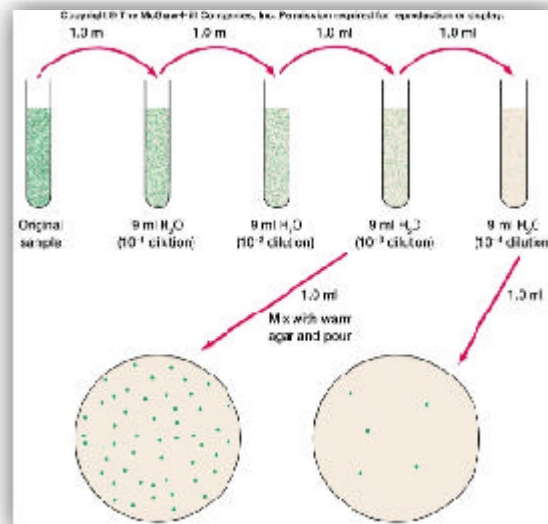


Figura 2.5 Obtención de cultivos puros.

Fuente: Bioservice, 2010

2.5.2.2.3. Aislamiento de *Aspergillus*

Se aislaron las colonias de hongos con características macroscópicas diferentes; se sembraron en cajas de Petri con PDA adicionado con terramicina para inhibir el crecimiento bacteriano (Anexo B), y se incubó a 37° C por 7 días. Una vez que presentó desarrollo de colonias se realizó separación de cepas por diferenciación macroscópica y posteriormente se desarrollaron cultivos monospóricos a fin de obtener cultivos axénicos.

2.5.2.2.4. Identificación y caracterización

Los mohos fueron identificados por el aspecto de las colonias y observación microscópica. Para la observación de las estructuras fúngicas se realizaron microcultivos según la técnica de Koneman (1987) y posteriormente se realizó la observación morfológica en microscopio de luz; aplicando las claves taxonómicas de Gilman (1952) y Carrillo (2008).

Para dicha identificación se tuvo en cuenta características macroscópicas de las colonias de cada cepa, tales como tamaño, color, apariencia, textura, presencia de exudados y pigmentos difusibles en el medio. Microscópicamente se consideró la forma y presencia o ausencia de estructuras tales como conidióforo y células conidiogénicas, fiálides, vesículas, metulas; tamaño, forma, textura y estilo de producción de esporas y características de las hifas tales como pared y presencia o ausencia de septos.

Mediante estas claves taxonómicas se identificó a *A. niger* y *A. fumigatus* (Figura 2.6).

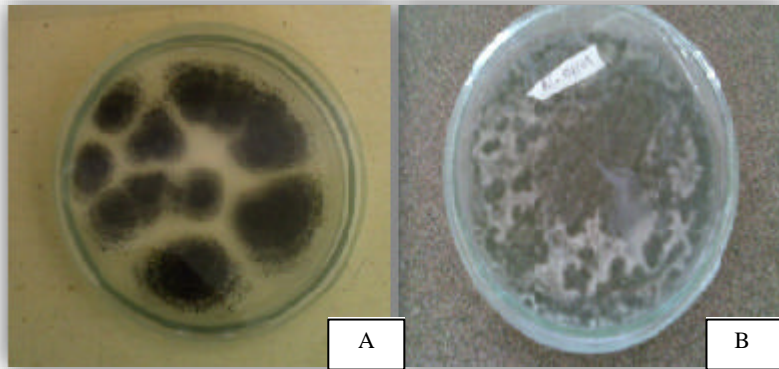


Figura 2.6. A) Colonias de *A. niger* y B) Colonias de *A. fumigatus* (Alexandra Angulo; Quito, Abril, 2010)

2.5.2.2.5. Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de esporas en solución líquida de Czapek (sin agar) con antibiótico (Anexo B), evitando así la contaminación bacteriana, se incubó durante 15 días a una temperatura de 37 °C en estufa. (Figura 2.7).

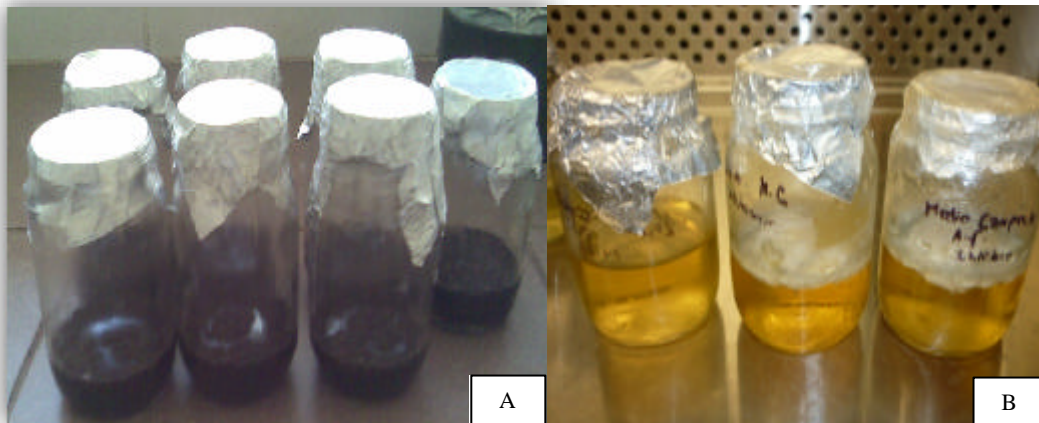


Figura 2.7. (A) *A.niger*, y (B) *A. fumigatus*

2.5.2.2.6. Conteo de las Unidades formadoras de colonias de *Aspergillus niger* y *fumigatus* en Cámara de Neubauer

Se tomó un inóculo del material de *A. niger* y de *A. fumigatus* con asa estéril, se sembró en tubos de vidrio con medio PDA inclinado y en cajas petri, después de 7 días de crecimiento de las nuevas colonias se procedió a agregar a los tubos 1 mL de agua estéril, agitándolos en vortex durante 1 min.

Por último, se tomaron 10 μL de la suspensión para realizar una dilución de 10^{-1} y ejecutar el conteo de conidias en la cámara de Neubauer, estimándose la velocidad de crecimiento, después de 7 días de desarrollo de las colonias; determinando concentraciones de *A. niger* y de *A. fumigatus*.



Figura 2.8. Adición de la diluciones de *A. niger* y *A. fumigatus* en la cámara de Neubauer.

El conteo se realizo con el lente de 40X, donde se visualizo cada uno de los campos, con el lente de 40X cada cuadro se ve de la siguiente manera:

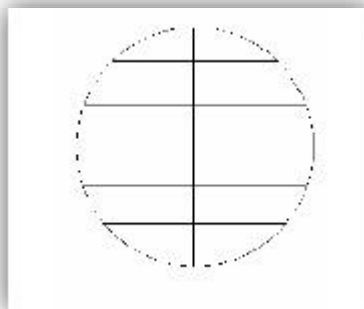


Figura 2.9. Campos de Cámara de Neubauer con el lente de 40x

Los resultados de la velocidad de crecimiento de *Aspergillus niger* y *fumigatus* representado en UFC/ml se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.2.

2.5.2.2.7. Mantenimiento de cepas

Los mohos se inocularon en el medio sintético de Czapek, incubado a 30-34 °C por 5 días y se conservaron a 5 °C.

2.5.2.2.8. Determinación de la Actividad Fermentativa Bacteriana

El microorganismo empleado fue obtenido desde los laboratorios de ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION de USA (*Clostridium thermocellum* ATCC 27405). Las bacterias nativas (*Leuconostoc dextranicum*) fueron aisladas a partir de una muestra de los residuos de sandía y *Zymomonas mobilis* fue aislada de un medio base manzana y son:

- ✍ *Leuconostoc dextranicum*.
- ✍ *Zymomonas mobilis*.
- ✍ *Clostridium thermocellum* ATCC 27405.

Las cepas se conservaron en refrigeración a 4°C en medio Agar-agar. Las mismas fueron ensayadas y cultivadas en medios ideales para su crecimiento. (Com.pers. Caicedo, 2010).

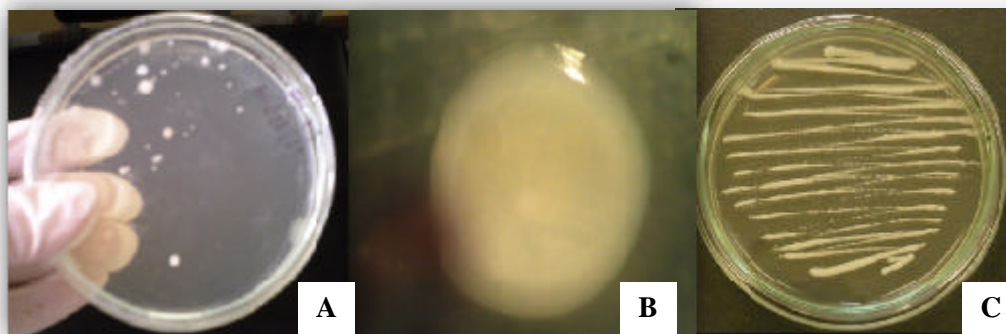


Figura 2.10 Cepas de estudio. A) *Leuconostoc dextranicum*. B) *Zymomonas mobilis*. C) *Clostridium thermocellum* ATCC 27405

2.5.2.2.9. Aislamiento de *Leuconostoc dextranicum*

El aislamiento de *Leuconostoc dextranicum* se realizó por medio de técnicas empleadas en microbiología; a partir del fermento de sandía, descrito en el Numeral 2.5.2.2.2, mediante las diluciones y tras su correcta homogenización se procedió a la siembra por la técnica de microgota; sembrando 0.1 ml de cada dilución en placas de Petri con medio de cultivo a base de Agar-agar con antibiótico ciclohexamida (Anexo B).

2.5.2.2.9.1. Pruebas Bioquímicas

La identificación de *Leuconostoc dextranicum* se llevó a cabo por: Tinción de Gram, actividad de catalasa, oxidasa y reducción de nitratos. Finalmente las colonias, se observaron en el microscopio y se caracterizaron mediante un kit de identificación con pruebas bioquímicas (galerías API).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los microorganismos de estudio se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.4.

2.5.2.2.9.2. Preparación del inóculo

Las cepas del género *Leuconostoc dextranicum* fueron inoculadas en un medio con Bacto peptona; incubado a 37 °C por 48 horas y conservado a 4 °C.

2.5.2.2.10. Aislamiento de *Zymomonas mobilis*

El aislamiento de *Z. mobilis* se llevo a cabo utilizando las técnicas empleadas normalmente en microbiología, a partir de una muestra Medio base manzana, en frascos de 40 ml a temperatura ambiente durante 7 días en condiciones de microaerofilia (Figura 2.11).

En base a esta solución se realizaron diluciones de forma decimal seriada desde 10^{-1} hasta alcanzar una dilución de 10^{-4} . De las diluciones y tras su correcta homogenización se procedió a la siembra por la técnica de microgota; sembrando 5 ml de cada dilución en placas de Petri con medio de cultivo específico para *Z. mobilis* (Anexo B).



Figura 2.11. Cultivo de *Zymomonas mobilis*

Las cajas se incubaron por 72 horas a una temperatura constante de 30°C manteniendo condiciones de microaerofilia. Posteriormente se realizó la purificación de colonias llevado a cabo por medio de pases sucesivos en los mismos medios.

2.5.2.2.10. 1. Pruebas Bioquímicas para *Zymomonas mobilis*

Se aplicó Tinción de Gram para observar la morfología microscópica con el lente de 100x y pruebas bioquímicas en cada una de las bacterias aisladas en este trabajo, a fin de certificar la autenticidad de las cepas seleccionadas. La Tabla 2.2, muestra las pruebas bioquímicas empleadas para *Z. mobilis*.

Tabla 2.2 Pruebas bioquímicas realizadas para autenticar las cepas de estudio.

Microorganismo	Pruebas bioquímicas
<i>Zymomonas mobilis</i>	Catalasa
	Oxidasa
	Indol
	Tween 80
	Test de nitratos

Fuente: Monsalve, 2008.

El procedimiento de aplicación de las pruebas bioquímicas en los microorganismos se efectuó en base a lo propuesto por Monsalve, 2008.

Se sembró el inóculo desde los viales a las cajas de medio agar para las cepas *Z. mobilis* y se llevó a incubación a 30°C por 24h.

Una vez que se observó el crecimiento de las bacterias con las características propias de sus colonias; se procedió a realizar las respectivas pruebas bioquímicas que consistió en tomar dos colonias de las respectivas cepas de *Z. mobilis* y con el asa de siembra se recogió el centro de una colonia pura y se colocó sobre un portaobjetos limpio de vidrio al cual se agregó con una pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo para la prueba de Catalasa. También se realizó la prueba de la Oxidasa la cual se colocó sobre un trozo de papel filtro de 3x3 cm, con ayuda de pipetas Pasteur se añadió reactivo de Kovacs posteriormente se extendió con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado, la reacción de color positiva se produjo en 30 segundos.

Además se ejecuto la prueba de Indol a *Z. mobilis* la cual fue sembrada en un caldo de triptófano por 48h, para posterior detección de Indol se utilizó el reactivo de Kovacs; la prueba bioquímica de Tween 80 se efectuó para evaluar la actividad lipolítica de las cepas, las cepas previamente cultivadas en medio para *Z.mobilis* por 24 h, se transfirieron a Agar Tween 80, se evaluaron diariamente por 5 días incubadas a 30° C. Finalmente se ejecuto el Test de nitratos que sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos, después de su incubación en Caldo de nitratos se añadió los reactivos A y B de Griess-Ilosvay en cantidades iguales 1ml.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los microorganismos de estudio se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.4.

2.5.2.2.10. 2. Preparación del inóculo

El medio de cultivo empleado para medir la proliferación de los microorganismos fue el Medio líquido de Bacto Peptona para las cepas de *Z. mobilis*, *L. dextranicum* y *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. El medio sólido Agar- agar se utilizó únicamente para el mantenimiento de las cepas, a 4° C.

Los medios preparados se utilizaron en un lapso de 7 días después de su preparación y se conservaron a 4°C, en fundas plásticas Ziploc (Prat, 2004). La preparación de los medios de cultivo se adjuntan en el Anexo B.

2.5.2.2.10. 3. Estándar de turbidez para preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó el estándar de la Escala McFarland. Dicho estándar se preparó agregando cloruro de bario (BaCl_2) a una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% obteniendo un precipitado de sulfato de bario (BaSO_4), cada patrón de turbidez representó una concentración bacteriana expresada en un número aproximado de bacterias viables $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$; los cuales permitieron ajustar mediante turbidez, la concentración de los inóculos de *Z. mobilis* y *L. dextranicum*; al equivalente del estándar (Lennette *et al*, 2004), como se muestra en la Figura 3.14.

La densidad óptica de los diez patrones de la escala McFarland se determinó a una longitud de 540 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, seleccionando 3 replicas de los inóculos de 18 - 24 horas hasta 168 horas de los cultivos bacterianos.

Los resultados de los valores de las absorbancias obtenidos de la lectura de la densidad óptica a 540 nm sobre los patrones de turbidez de la escala McFarland, se correlacionaron con los datos de las poblaciones microbianas obtenidas a partir del recuento bacteriano en UFC ml^{-1} , los cuales se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.5.

2.5.2.2.11. Reconstitución de la cepa *Clostridium thermocellum* ATCC 27405

Se emplearon 2 mg del liofilizado de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405, los cuales fueron reconstituidos en 25 ml de caldo nutritivo a base de Bacto peptona con adición de ciclohexamida a concentraciones de 25 mg/ml, respectivamente, por 48 h a 60 °C en condiciones de anaerobiosis; al final se obtuvo una densidad poblacional correspondiente al tubo No. 6 del estándar de MacFarland. El fenotipo de la cepa fue confirmado mediante la siembra de la muestra en caja Petri con Agar-agar, realizando además Tinción Gram.

2.5.2.2.11.2. Preparación del inóculo

Las cepas del género *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 fueron inoculadas en un medio con Bacto peptona; incubado a 60 °C por 48 horas y conservado a 4 °C.

Una vez ajustados los valores de las absorbancias obtenidos de la lectura de la densidad óptica a 540 nm sobre los patrones de turbidez de la escala McFarland de *Leunostoc dextranicum*, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 se procedió a la cuantificación de azúcares reductores presentes en los residuos de sandía para la etapa de obtención de bioetanol.

2.6. Obtención de residuos de sandía.

2.6.2. Determinación de azúcares reductores

Se realizó para determinar la concentración de azúcares reductores totales presentes en los residuos de sandía; y en cada uno de los procesos de hidrólisis a diferentes temperaturas empleadas (25, 30, 35° C) empleando glucosa anhidra como patrón, mediante la técnica del Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS). La preparación del Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) se adjunta en el Anexo C.

Los resultados de la concentración de azúcares reductores presentes en cada tratamiento se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.6

2.6.2. Preparación de la muestra

Se empleó 4000 g de muestra vegetal para cada unidad experimental, las cuales se colocaron en recipientes adecuados para su lavado con agua destilada para retirar el exceso de impurezas. Se trituró en un molino eléctrico y además se licuo por espacio de 3 min.

Una vez triturados los desechos se tomo 500g para calcular la cantidad de materia seca, para lo cual se sometió a la muestra a una temperatura de 150° C durante 30 min

determinado así el porcentaje de humedad que contenía la muestra es de 87,35%; de esta manera se pudo calcular la cantidad de materia seca que se procesó para cada unidad experimental.

Posteriormente se llevo a ebullición con la finalidad de evitar contaminaciones de microorganismos patógenos e iniciar con el proceso de hidrólisis.

Para el proceso de hidrólisis se acopló biorreactores de 5000 ml para cada unidad experimental. En cada biorreactor se colocó 4000 g de materia vegetal, con 40 ml de inóculo (Lequerica, 1980; Hernández, 1975).

Los biorreactores se fabricaron en base a lo sugerido por Mosquera (2008), es decir que cada biorreactor contenía 2 mangueras, una para el escape de gases el cual estuvo conectado a una trampa de CO₂ y la otra para la toma de muestras para cuantificar los azúcares reductores con ayuda del Refractómetro ATAGO. Además los biorreactores fueron sellados con silicona y parafilm para mantener las condiciones anaerobias del proceso.

En cada unidad experimental se inoculó las cepas aisladas de *Leuconostoc dextranicum* y *A. fumigatus* obteniendo así tres tratamientos con tres repeticiones. Y el tratamiento testigo *A. niger* para evaluar la hidrólisis de cada tratamiento por un periodo de 8 días.

El siguiente paso consiste en la conversión de los azúcares en alcohol mediante una fermentación anaeróbica efectuada por *Leuconostoc dextranicum*, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. Estas convierten los azúcares obtenidos como glucosa y fructosa en etanol y dióxido de carbono.

Al igual que en la hidrólisis, estos fermentadores fueron sellados para mantener las condiciones anaerobias del proceso, el pH del mosto fue de 4,5 por lo que no tuvo que ser ajustado.

El etanol conseguido debe ser destilado, ya que viene acompañado con una cantidad considerable de agua, la cual es separada debido a la diferencia entre los puntos de ebullición entre el alcohol y el agua mediante destilación al vacío con la cual se logra destilar alcohol a 30° C. De aquí se obtiene alcohol a una concentración alta, generalmente del 95%, el cual puede ser utilizado desde este entonces como aditivo de la gasolina.

Los resultados de la destilación de alcohol obtenidos de cada tratamiento empleado en la fase de fermentación se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.12

La determinación del grado alcohólico se efectuó por Picnometría, la cual se fundamenta en la medida de la densidad del destilado. La densidad del alcohol se determinó a una temperatura de 20° C, pesando en una balanza analítica el alcohol contenido en un picnómetro volumétrico estándar. La temperatura de la muestra se equilibró en baño maría con termostato (modelo MA-184, Marconi, Sangolquí, Ecuador). Previamente el picnómetro de 5 ml se calibró con agua destilada y alcohol absoluto a la temperatura estudiada.

Además se tomaron las debidas precauciones para evitar pérdidas de alcohol. También se realizó la determinación del contenido alcohólico mediante Cromatografía de Gases.

Los resultados del contenido alcohólico obtenidos de cada tratamiento utilizando Cromatografía de gases y Picnometría se muestran en el capítulo Resultados, Tabla 3.13 y 3.14.

En la Figura 2.12, se indica el proceso de preparación de la muestra.

Pre tratamiento de la biomasa

Recepción de la materia prima



Lavado



Molienda y Licuado



Determinación de glucosa por método del ácido 3-5 DNS.

Cocción



Envasado



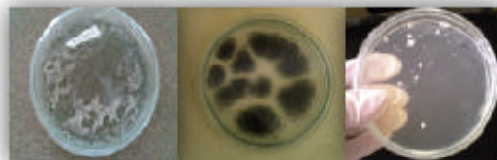
Hidrólisis enzimática

CO₂

Botellas de 5 L con 4000 g de materia vegetal



Azúcares



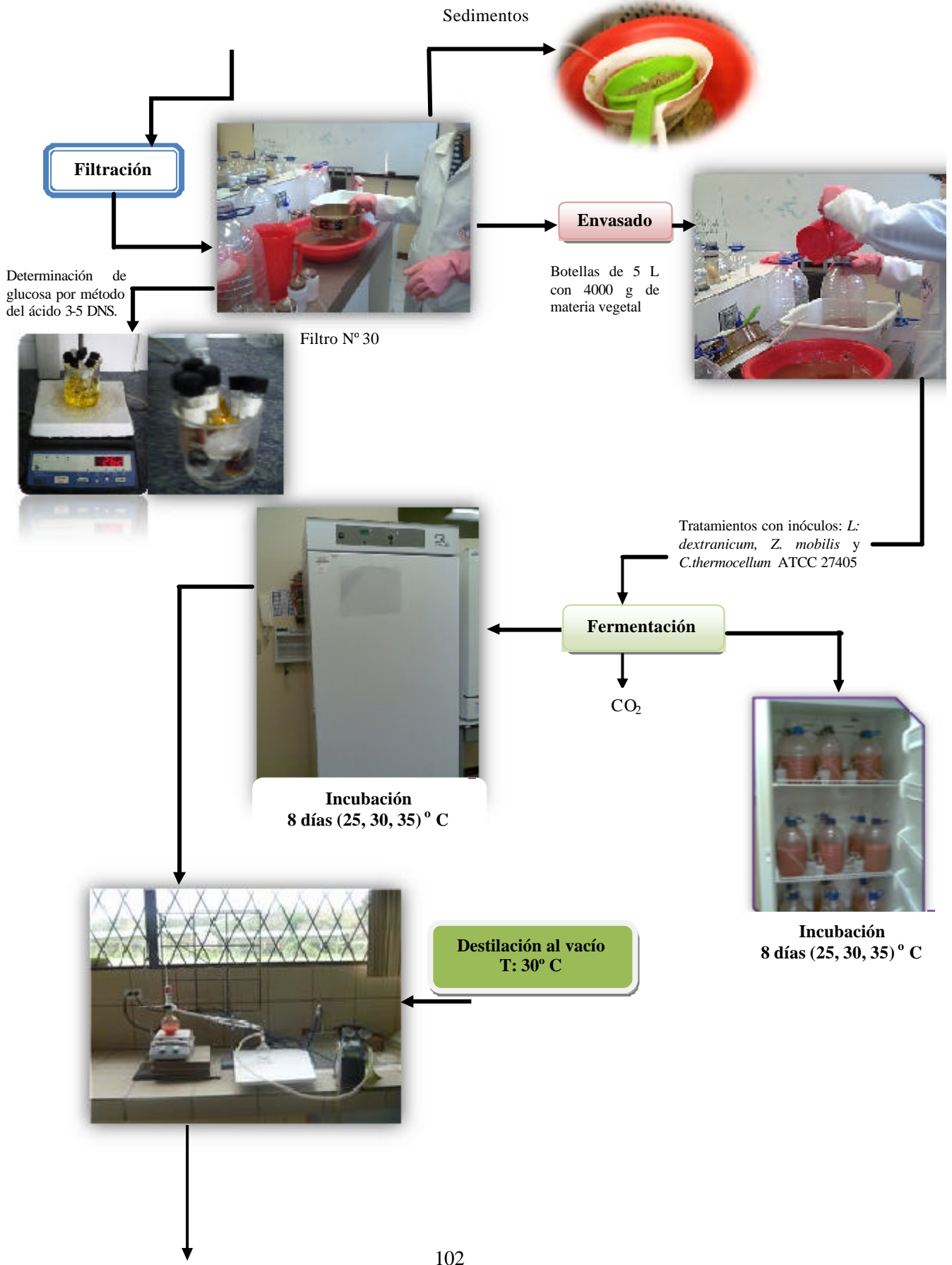
Hidrólisis de las celulosas y de las hemicelulosas causada por los hongos: *A. niger* y *A. fumigatus* y bacterias: *L. dextranicum*



Incubación
8 días (25, 30, 35)° C

Cuantificación de azúcares reductores por Refractometría





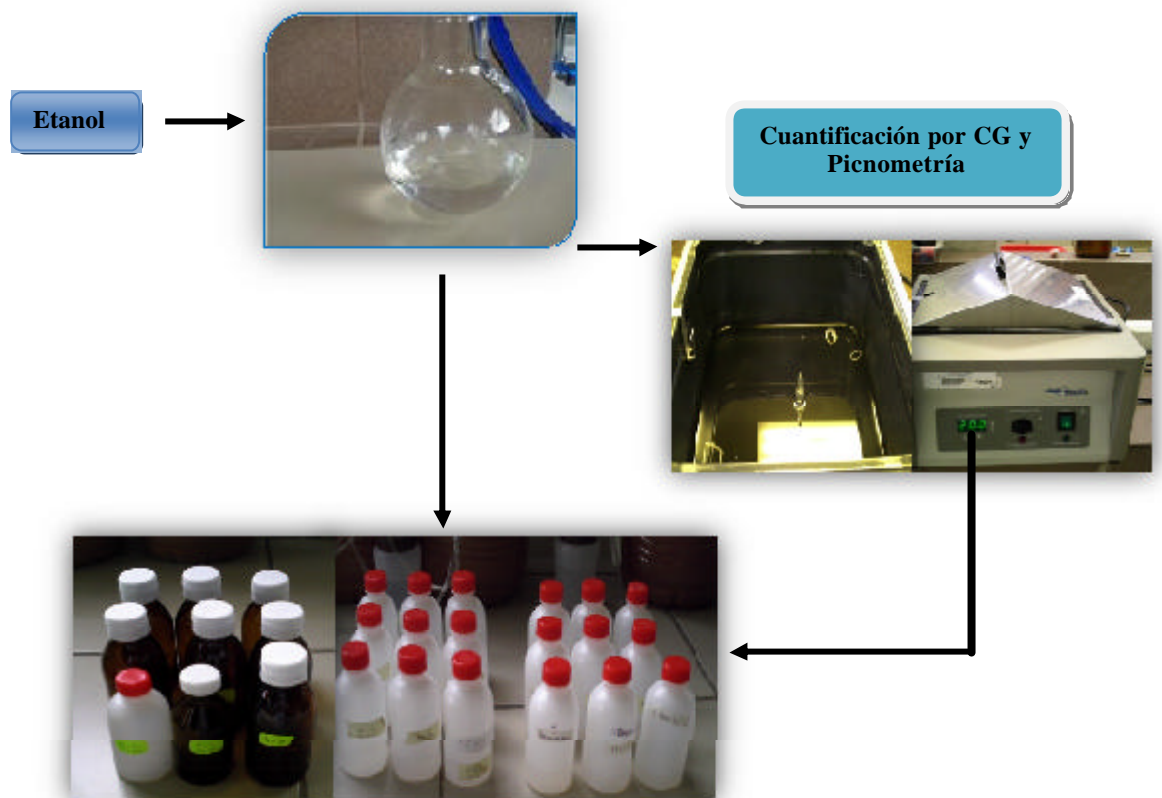


Figura 2.12 Proceso de obtención de etanol a partir de residuos de sandía, bajo la acción de microorganismos nativos, *A. niger*; *Z.mobilis* y *C. thermocellum* ATCC 27405.

III. RESULTADOS

El trabajo experimental que se presenta a continuación, consta de dos etapas: en la primera de ellas se muestra la identificación y determinación de la velocidad de crecimiento de los microorganismos y en la segunda etapa se da a conocer el análisis estadístico para la fase de hidrólisis y fermentación con estos microorganismos, además de las técnicas de cuantificación del etanol obtenido.

3.1. Aislamiento de hongos a partir de Residuos de Sandía

Los aislados fueron identificados como *Aspergillus niger*, y *Aspergillus fumigatus* (Figura 3.1).

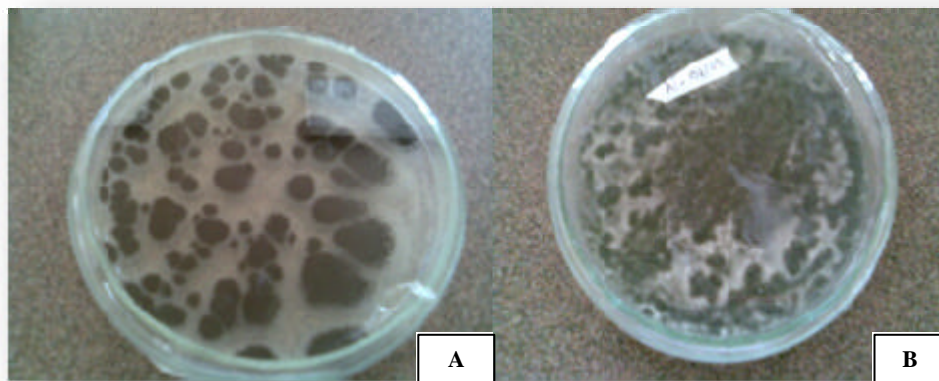


Figura 3.1. A) Colonia de *Aspergillus niger*; B) Colonia de *Aspergillus fumigatus*.

3.1.2. Identificación de los aislamientos

3.1.3. Caracterización morfológica de *Aspergillus fumigatus*

Como resultado de este estudio, a continuación se hace referencia a la caracterización morfológica de los 24 aislamientos analizados y la identificación de las especies fúngicas.

En el caso de los aislamientos (#1, #6 y #12), manifestaron un comportamiento similar en el medio donde se cultivaron (PDA). En las cajas petri con cultivos sobre PDA incubadas a 37°C, en el anverso produjeron colonias de crecimiento rápido (12-14) mm de diámetro al séptimo día de incubación y de color verde grisáceo, a menudo, con una zona radial con bordes regulares de color blanco, los que llegaron a tornarse verde grisáceo con la producción de los conidios para *A. fumigatus*.

Desde el punto de vista morfológico de *A. fumigatus*, las principales características de las estructuras, provenientes de los cultivos sobre PDA, fueron: la producción de cabezas conidiales asimétricas, ramificadas, alargadas y con largas cadenas de conidios. Microscópicamente presentaron conidióforos peniciliados con fialides, lisos, moderadamente largos de 17,5-22 x 2,5-3,16 µm (largo por ancho); ramas de 8-10 x 2,0-2,5 µm y fialides en grupos de tres, con tamaño variable, de 7-7,5 x 2-2,5 µm. Los conidios se observaron lisos y elípticos, con un tamaño de 2,0-2,5, x 2,5-3,0 µm.

En la Figura 3.2 se indica las observaciones microscópicas realizadas en *A. fumigatus*.

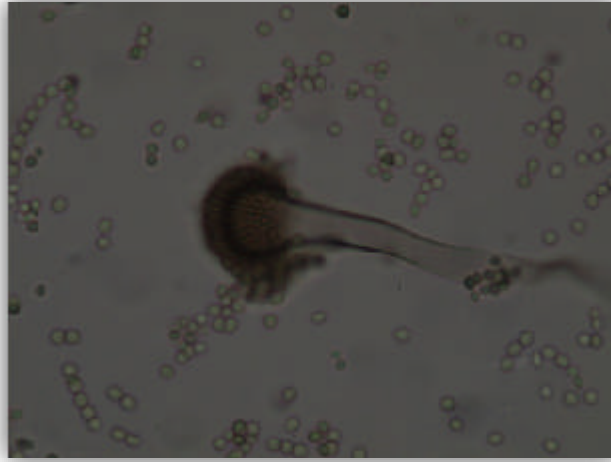


Figura 3.2. Estructuras vegetativas de *A. fumigatus* observadas en microscopio de luz.

3.1.4. Caracterización morfológica de *Aspergillus niger*

Para los aislamientos (#24, #28, #30) al reverso de las colonias generalmente se observaron de color negro con tonalidades amarillas para *A. niger*.

En medio PDA las colonias de estos aislamientos incubadas a 37°C, en el anverso de las cajas petri se observaron globosas de color negro, conidios bien definidos de color negro oscuro, polvoso, de crecimiento radial y alcanzó un diámetro de (20-40) mm al séptimo día de incubación, micelio aéreo y superficial moderadamente abundante.

Por su parte, las estructuras de *A. niger* procedentes de los cultivos en PDA fueron similares a las descritas anteriormente, con la única diferencia de que las cabezas conidiales pueden poseer una o dos ramas.

En la Figura 3.3 se muestra las observaciones microscópicas realizadas en *A. niger*.



Figura 3.3. Estructuras vegetativas de *A. niger* observadas en un microscopio de luz.

La tabla 3.1, resume todas las observaciones realizadas dentro del proceso de autenticación de las cepas de estudio.

Tabla 3.1. Características morfológicas de las especies estudiadas.

Género y Especie	Altura del Conidióforo	Ancho del Conidióforo	Filiades
<i>Aspergillus fumigatus</i>	17,5	22,5	7,5
	17,5	20	7,5
	20	22,5	7,5
	12,5	20	7,5
	20	25	7,5
Promedio <i>Aspergillus niger</i>	17,5	22	7,5
Promedio	20	25,2	8,75
	21,2	27,5	8,75
	22,5	22,7	8,75
	23,5	26,7	8,75
	18,2	23,8	8,75
Promedio	21,1	25,2	8,75

Autor: Alexandra Angulo, 2010.

3.2. Cuantificación de la Biomasa de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*

Los resultados de la velocidad de crecimiento para los tres aislamientos de *A. niger* y *A. fumigatus* se cuantificaron en UFC/ml por medio de la cámara de Neubauer. La Figura 3.4, muestra las observaciones microscópicas realizadas para la cuantificación de UFC ml⁻¹ en *A. niger* y *A. fumigatus*.

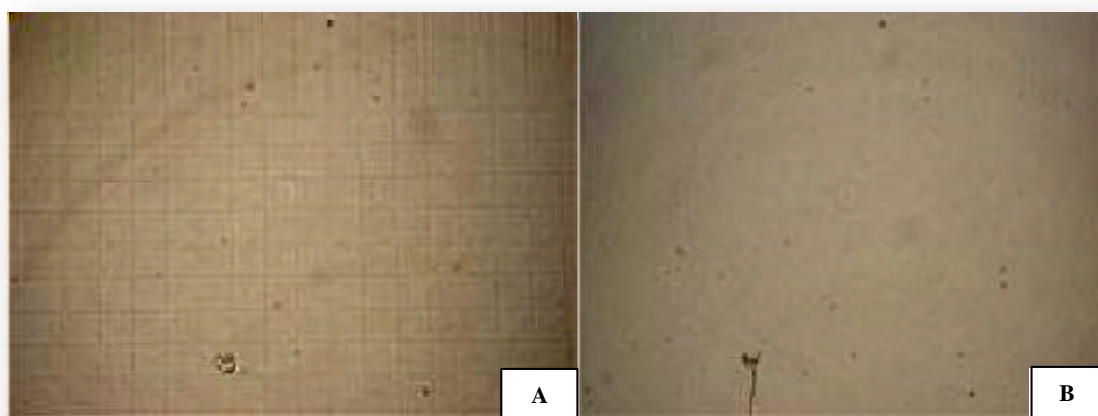


Figura 3.4. A) UFC ml⁻¹ de *A. fumigatus* y B) UFC ml⁻¹ de *A. niger* en cámara de Neubauer.

En donde se utiliza la siguiente ecuación para obtener el número de células por ml.

$$\frac{? \text{ p}????????????}{?????? ???????} ? \frac{? \text{ p}????}{? ? ?}$$

$$\frac{? \text{ p}???? ???? ? ?? ? \text{ p}????????????}{???? ? ??? ? ? ? ? ? ? ?} ? \text{ p}?????? ? ? \text{ p}???????? ? ? \frac{? \text{ p}????}{? ? ?}$$

En la Tabla 3.2 se presenta el promedio de los resultados obtenidos.

Tabla 3.2. Unidades formadoras de colonias por ml (UFCml⁻¹) de tres aislamientos de *A. fumigatus* y *A. niger* en una dilución de 10⁻¹.

Aislamientos	UFC ml ⁻¹			
	R1	R2	R3	Promedio
<i>A. fumigatus</i>	?? ???	?? ???	?? ???	?? ???
<i>A. niger</i>	?? ???	?? ? ???	?? ???	?? ?? ? ???

R1- R2 –R3. Repeticiones

Autor: Alexandra Angulo, 2010.

3.3. Identificación Microscópica de las bacterias en estudio.

Los resultados de la tabla 3.3, detalla la morfología microscópica visualizada por medio de coloración de Gram y observaciones con lente de 100x de *Z. mobilis*, *L. dextranicun* y *C. thermocellum* ATCC 27405.

Tabla 3.3. Características microscópicas de las colonias y resultados de las Tinciones Gram de los microorganismos en estudio.

Microorganismo	Tinción Gram	Forma
<i>Zymomonas mobilis</i>	Negativa	Bacilos Pleomórficos Cadenas Rosetas filamentos
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Positiva	Bacilos Cadenas No forman esporas
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Positiva	Bacilos Forma esporas

Autor: Alexandra Angulo, 2010.

En las Figura 3.5; 3.6 y 3.7 se indican las observaciones microscópicas realizadas en *Z.mobilis*, *L. dextranicum* y *C. thermocellum* ATCC 27405.

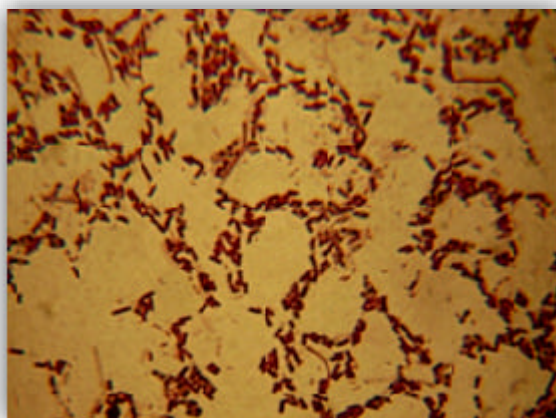


Figura 3.5 Micrografía con microscopio con lente 100X de *Z. mobilis*

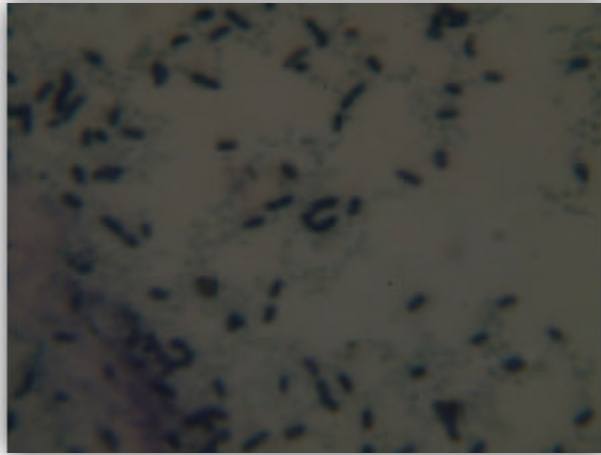


Figura 3.6 Micrografía con microscopio con lente 100X de *L. dextranicum*

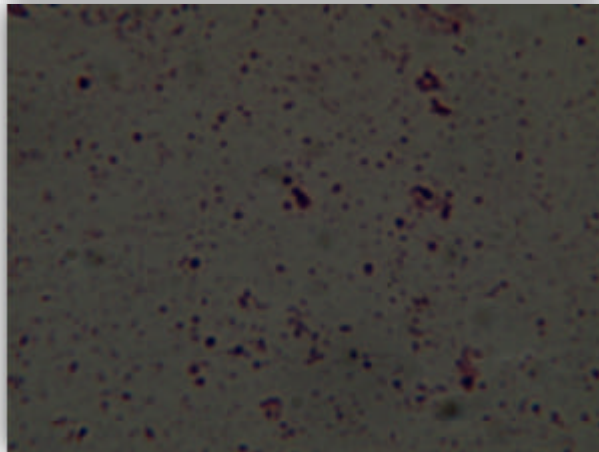


Figura 3.7 Micrografía con microscopio con lente 100X de *C. thermocellum* ATCC 27405

3.4. Pruebas Bioquímicas de Cepas en estudio

La tabla 3.4, resume todas las observaciones realizadas dentro del proceso de autenticación de las cepas de estudio *L. dextranicum* y *Z mobilis*. Se presentan las características morfológicas de las colonias así como la actividad lipolítica presente en Agar Tween 80 para *Z. mobilis*. Finalmente se aprecia los resultados positivos obtenidos

en todas las pruebas bioquímicas realizadas en los dos microorganismos que permite certificar la autenticidad de cada una de las cepas.

Tabla 3.4. Características morfológicas de las colonias, tipos de actividad lipolítica y resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos en estudio.

Microorganismo	Morfología de las colonias		Tipo de actividad lipolítica	Pruebas bioquímicas	Resultado
<i>Zymomonas mobilis</i>	Características	Colonias blancas redondas, convexas	-	Catalasa	Positivo
	Diámetro	1-3 mm		Oxidasa	Negativo
	Tamaño	Mediano		Indol	Negativo
	Borde	Regular		Tween 80	Negativo
	Apariencia	Ligeramente elevada		Test de Nitratos	Negativo
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Características	Colonias blancas redondas		Catalasa	Positivo
	Diámetro	1-2 mm.		Oxidasa	Positivo
	Borde	Regular		Test de Nitratos	Negativo
	Tamaño	Ligeramente mediano			
	Apariencia	Ligeramente elevada			
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Características	Colonias blancas redondas			
	Diámetro	1-2 mm.			
	Borde	Regular			
	Tamaño	Ligeramente pequeño			
	Apariencia	Ligeramente elevada			

Autor: Alexandra Angulo, 2010.

La Figura 3.8, muestran los resultados gráficos de las características macroscópicas observadas en el Estereomicroscopio de *Z.mobilis*, *L. dextranicum* y *C. thermocellum* ATCC 27405.

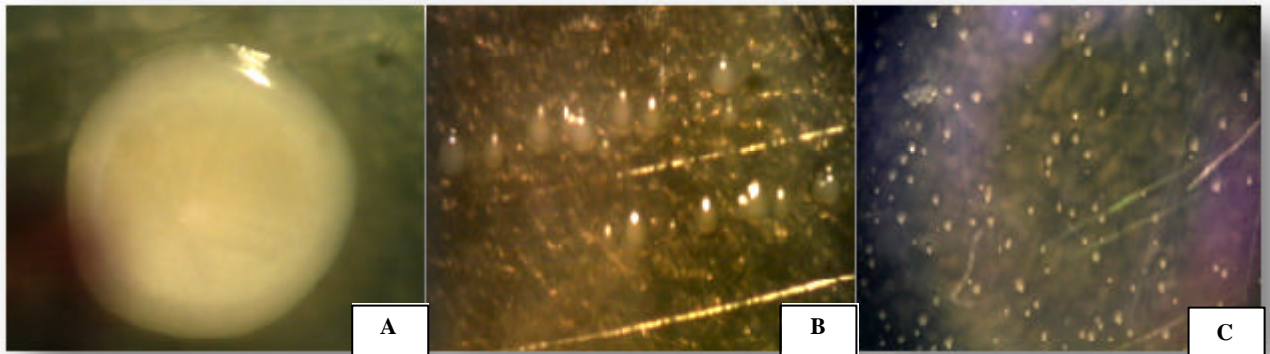


Figura 3.8 Características macroscópicas observadas en el Estereomicroscopio de A) *Z.mobilis*, B) *L. dextranicum* y C) *C. thermocellum* ATCC 27405.

Las Figura 3.9; 3.10; 3.11; 3.12 y 3.13, muestran los resultados gráficos de las pruebas bioquímicas realizadas en *Z.mobilis*, y *L. dextranicum*.

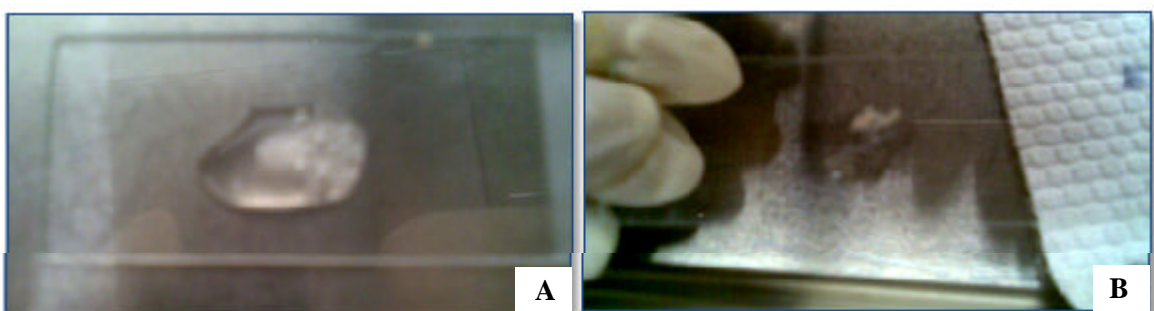


Figura 3.9. A) Prueba de la Catalasa en *Zymomonas mobilis*. B) Prueba de Oxidasa en *Zymomonas mobilis*.

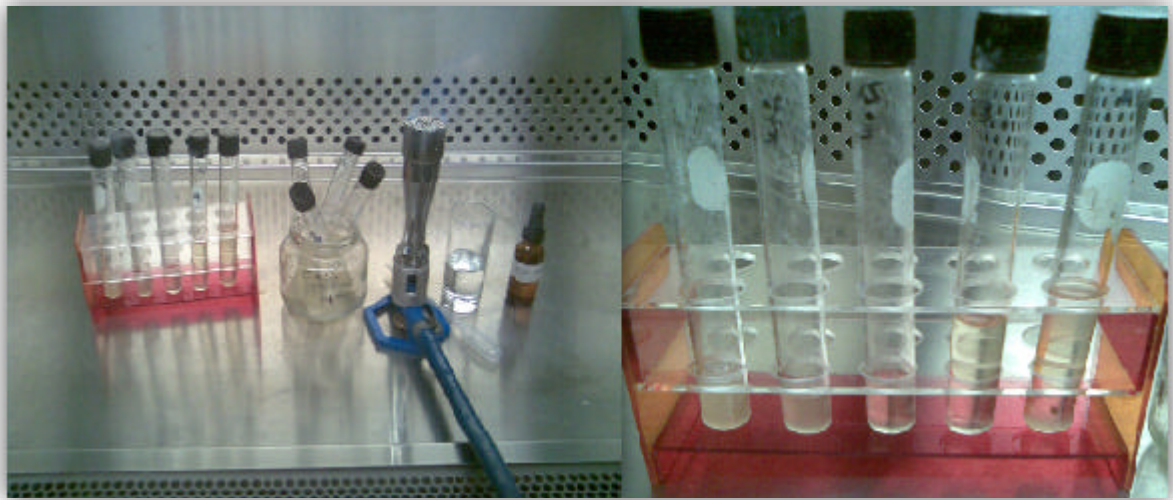


Figura 3.10. Prueba de Indol en *Zymomonas mobilis*.



Figura 3.11. A) Test de Nitratos en *Zymomonas mobilis*. B) Prueba de Agar Tween 80

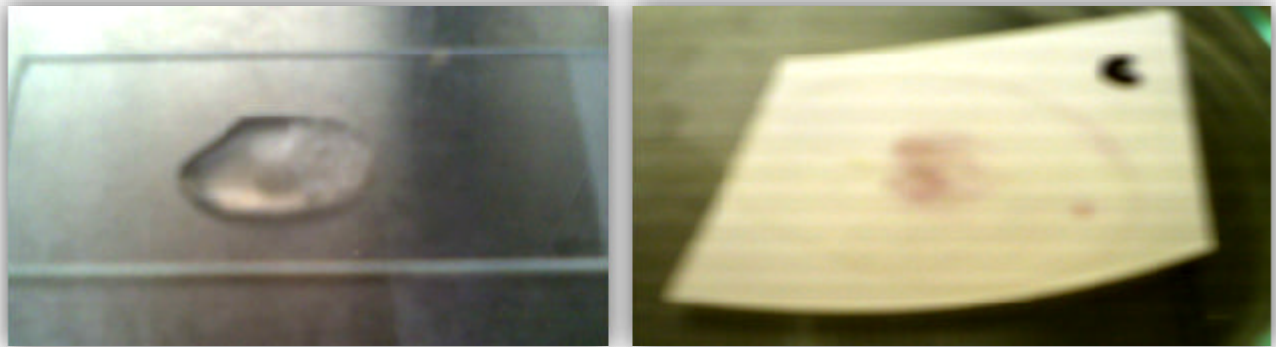


Figura 3.12. A) Prueba de la Catalasa en *Leuconostoc dextranicum*. B) Prueba de Oxidasa en *Leuconostoc dextranicum*.



Figura 3.13. Test de Nitratos en *Leuconostoc dextranicum*.

3.5. Estimación de la población bacteriana de *Zymomonas mobilis* y *Leconostoc dextranicum* en UFC ml⁻¹ a partir de las absorbancias

Los valores de las absorbancias obtenidos de la lectura de la densidad óptica a 540 nm sobre los patrones de turbidez de la escala de MacFarland, se correlacionaron con los datos de las poblaciones microbianas obtenidos a partir del recuento bacteriano en UFC ml⁻¹.



Figura 3.14. Estándares de la escala MacFarland

En la Figura 3.15, se observa la curva de calibración de los estándares de la Escala MacFarland correspondiente hasta el tubo No 7 con una absorbancia de 0,998.

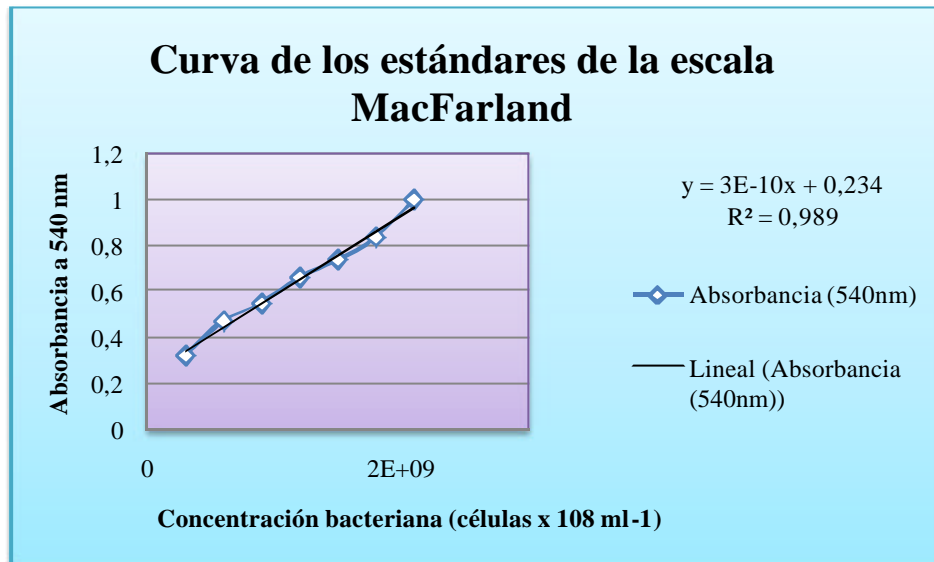


Figura 3.15. Curva de calibración de los estándares de la escala MacFarland.

Los resultados de la estimación de la población bacteriana se resumen en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Estimación de la población bacteriana en UFC ml⁻¹ a partir de las absorbancias obtenidas a 540 nm

Población bacteriana en UFC ml ⁻¹ ? ? ?					
<i>Zymomonas mobilis</i>			<i>Leconostoc dextranicum</i>		
Tiempo (días)	Absorbancia (nm)	Población estimada	Tiempo (días)	Absorbancia (nm)	Población estimada
		Y=3E-10x+0,2344			Y=3E-10x+0,2344
0	0,083	7	0	0,0023	2,1
1	0,41	52	1	0,121	11
2	0,502	82	2	0,151	14
3	0,601	97	3	0,164	15
4	0,628	113	4	0,178	16
5	0,707	128	5	0,185	17
6	0,71	141	6	0,1851	17,1
7	0,714	145	7	0,1856	17,238
8	0,705	143	8	0,1779	16,5
9	0,704	127	9	0,163	15,1
10	0,615	111	10	0,1421	13
11	0,57	93	11	0,09	8

Autor: Alexandra Angulo, 2010.

La evaluación de la densidad poblacional de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 se relacionó con el tubo No. 6 de la escala MacFarland obteniéndose una absorbancia de 0,939 a 540 nm, correspondiente a 2×10^9 UFC/ml.

En las Figuras 3.16 y 3.17 se observa la velocidad de crecimiento de las bacterias *Z. mobilis* y *L. dextranicum*.

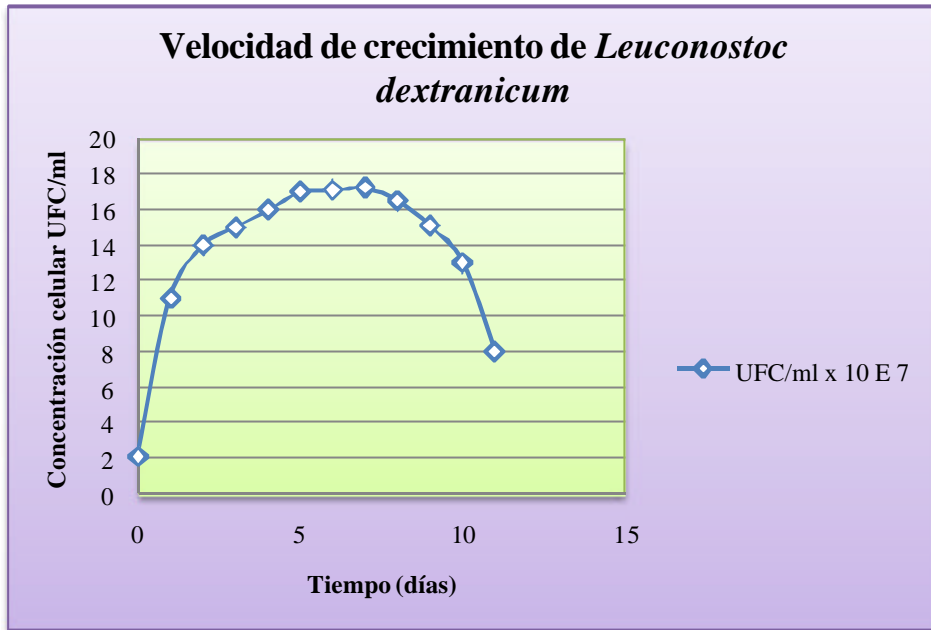


Figura 3.16 Velocidad de crecimiento de *L. dextranicum*

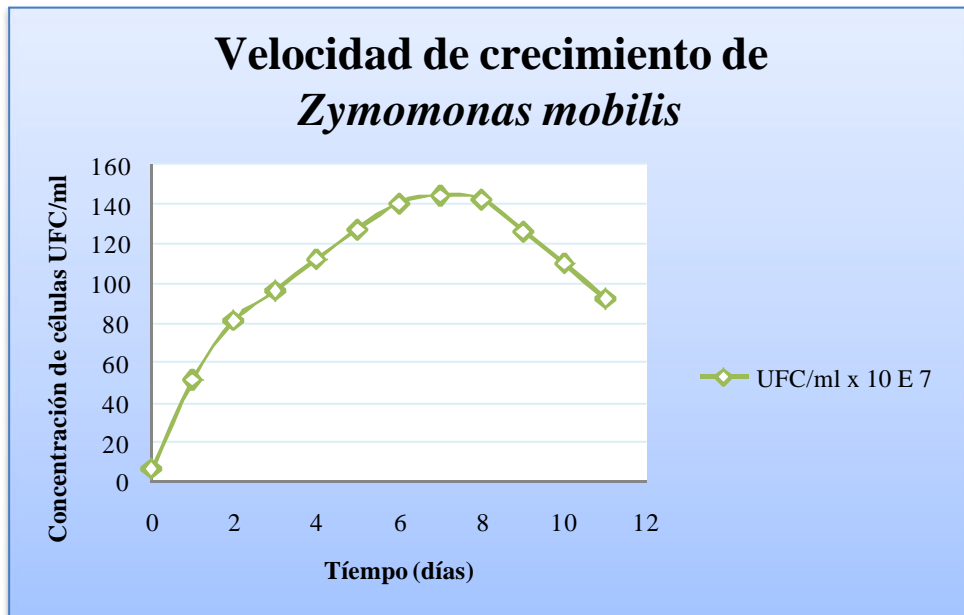


Figura 3.17 Velocidad de crecimiento de *Z. mobilis*.

3.6. Determinación de azúcares reductores presentes en los residuos de sandía

Empleando las técnicas colorimétricas de ácido 3,5 – Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1951; Matiz, 1999) se cuantificó la concentración en g/L de azúcares reductores totales.

Encontrando que al inicio del proceso (materia prima) se presentó la menor cantidad de azúcares a razón de 3,88 g/L lo que demuestra que es un sustrato nutricionalmente enriquecido que favorece el crecimiento de poblaciones microbianas.

El seguimiento de los azúcares reductores, presentes en los residuos de sandía se presenta en la Figura 3.18.

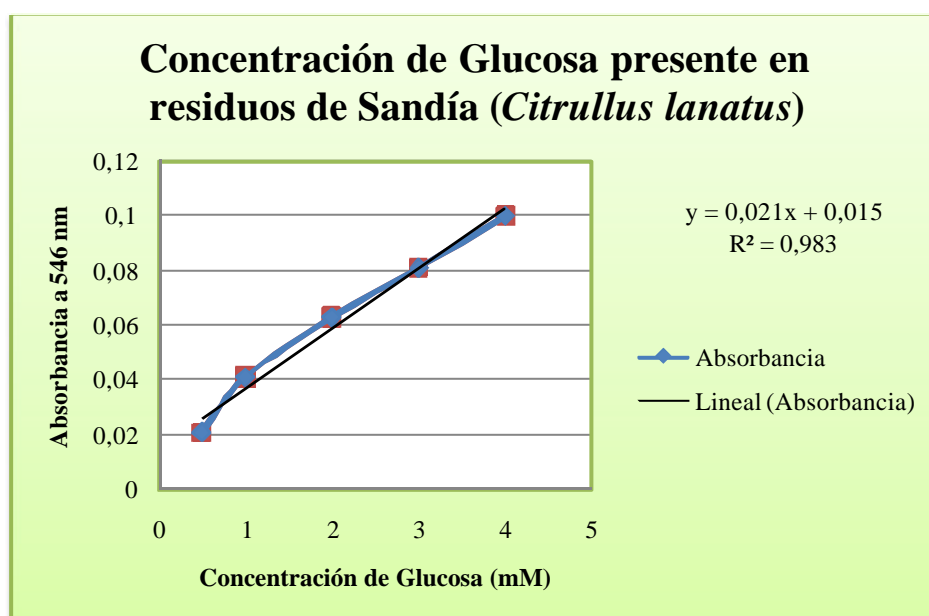


Figura 3.18 Concentración de azúcares reductores presentes en los residuos de sandía.

3.7. Evaluación General de la concentración de Glucosa presente en sandía en la etapa de hidrólisis bajo la acción de los microorganismos.

Durante la etapa de hidrólisis bajo la acción de los diferentes tratamientos, la determinación de azúcares reductores se evaluó a final de cada tratamiento, los cuales se presentan en la Figura 3.19.

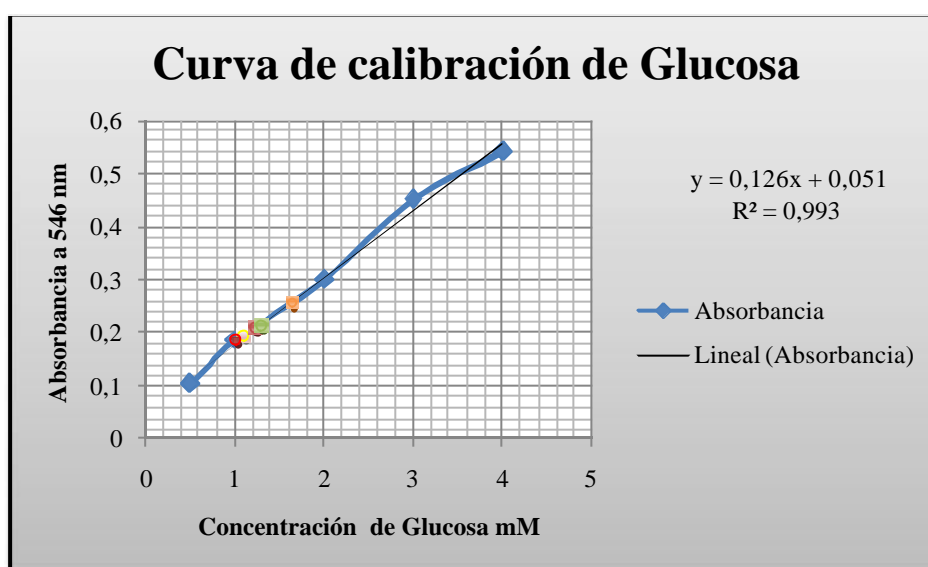


Figura 3.19 Curva de calibración de la concentración de glucosa por absorbancia producida a 546 nm.

Se ejecutó un ajuste de intervalos de confianza para la estimación, logrando obtener una relación lineal como curva de calibración de glucosa, con un coeficiente de correlación de 0.9933. De igual forma se interpolaron los intervalos de las absorbancias obtenidas a 546 nm de los tres tratamientos empleados en la fase de hidrólisis, consiguiendo una relación lineal de esta razón en función de la concentración de glucosa. A partir de esta curva de

calibración se obtiene la concentración de glucosa en g/L para las nueve muestras estudiadas cuyos valores se resumen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Determinación de glucosa. Hidrólisis del mosto de sandía, 7 días, condiciones anaeróbicas, (25, 30, 35)° C. Cepas nativas y control.

Cepa	Concentración (mM)	Concentración (g/L)	Temperatura °C
<i>L.dextranicum</i>	1,24	8,93	25
<i>A.fumigatus</i>	1,25	9,00	25
<i>A.niger</i>	1,55	11,16	25
<i>L.dextranicum</i>	1,182	8,51	30
<i>A.fumigatus</i>	1,25	9,00	30
<i>A.niger</i>	1,24	8,93	30
<i>L.dextranicum</i>	1,18	8,5	35
<i>A.fumigatus</i>	1,11	7,992	35
<i>A.niger</i>	1,25	9,00	35

Control: *A. niger*

3.8. Determinación de la concentración de azúcares reductores en la fase Hidrolítica

Al establecer el análisis de varianza para cada una de las evaluaciones de los grados brix obtenidos en la hidrólisis de los residuos de la sandía bajo la acción de 2 microorganismos y tres niveles de temperatura se detectó diferencias estadísticas a nivel del 1% para tratamientos en cada una de las siete evaluaciones. Los microorganismos y la temperatura se diferenciaron al nivel del 1% en cada una de las siete evaluaciones a excepción de la primera donde la diferencia fue al 5%, manifestando una tendencia lineal significativa al 1% a partir del segundo día.

La interacción fue significativa a nivel del 5% en los días 3 y 6; y, al nivel del 1% en los días 4, 5, 7 por lo tanto los dos factores en estudio actuaron independientemente, en el resto de evaluaciones no fue significativo. El testigo se diferenció a nivel del 5% en el segundo día y a partir del tercer día se diferenció a nivel del 1% hasta el séptimo día (Tabla 3.7).

El promedio de los grados brix se fue incrementando de 7.35 el primer día hasta alcanzar un promedio de 8.38 en el sexto día y decrecer lentamente en la última evaluación a los siete días.

Tabla 3.7. Análisis de varianza para los grados brix de la sandía en la etapa de hidrólisis bajo la acción de los microorganismos y tres niveles de temperatura, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	Cuadrados Medios						
		Evaluaciones Diarias de los grados Brix						
		1	2	3	4	5	6	7
Total	20							
Tratamientos	(6)	0,20 **	0,70 **	0,55 **	0,67 **	0,84**	0,85**	1,05**
Microorganismos	1	0,53 **	1,93 **	0,85 **	1,74 **	2,49**	2,88 **	2,65**
Temperatura (C)	2	0,20 *	0,82 **	0,51 **	0,37 **	0,20**	0,39**	0,54**
T. lineal	1	0,03 ^{ns}	0,91 **	0,85 **	0,65 **	0,40**	0,56**	0,70**
T. Cuadrático	1	0,36 **	0,72 **	0,16 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,22**	0,38**
M x C	2	0,08 ^{ns}	0,14 ns	0,32 *	0,26 **	0,14**	0,06 *	0,08**
Test vs Resto	1	0,12 ^{ns}	0,38 *	0,78 **	1,03 **	1,86**	1,34**	2,43**
Error	14	0,03	0,06	0,07	0,02	0,01	0,01	0,01
X ^o Brix)		7,35	7,64	7,93	8,12	8,34	8,38	8,33
CV (%)		2,39	3,27	3,38	1,94	1,43	1,13	1,31

A.fumigatus presentó un mayor promedio de grados brix a lo largo de cada una de las evaluaciones, diferenciándose estadísticamente mediante la prueba de DMS al 5% (Tabla 3.8 y Figura 3.20).

Tabla 3.8. Efecto de los microorganismos sobre los grados brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.

MICROORGANISMOS	Evaluaciones Diarias de los grados brix						
	1	2	3	4	5	6	7
M ₁ . <i>L. dextranicum</i>	7,14 b	7,26 b	7,63 b	7,72 b	7,84 b	7,88 b	7,81 b
M ₂ . <i>A. fumigatus</i>	7,49 a	7,91a	8,07 a	8,34 a	8,59 a	8,68 a	8,58 ^a

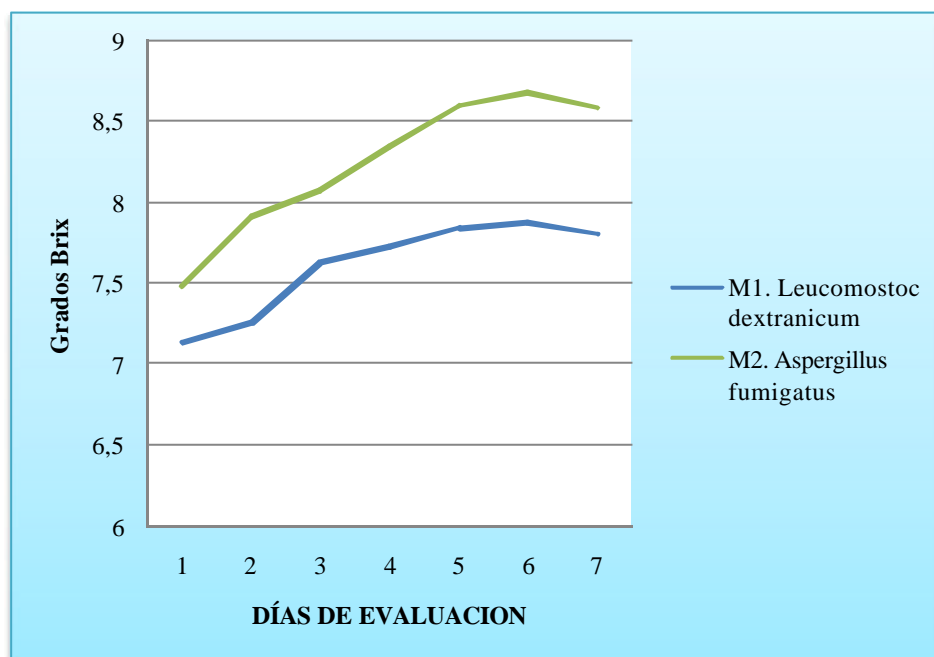


Figura 3. 20. Actividad de los microorganismos sobre los grados brix en sandía durante la etapa de hidrólisis.

Bajo la temperatura de 25 ° C se logró en términos generales alcanzar los mayores promedios de grados brix a lo largo de todas las evaluaciones establecidas (Tabla 3.9 y Figura 3.21).

Tabla 3.9. Efecto de la Temperatura sobre los grados Brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.

TEMPERATURA	Evaluaciones Diarias de los grados brix						
	1	2	3	4	5	6	7
C ₁ 25° C	7,47 a	8,00 a	8,18 a	8,32 b	8,40 a	8,42 a	8,33 a
C ₂ 30° C	7,12 b	7,3 b	7,72 b	7,93 a	8,22 b	8,43 a	8,40 a
C ₃ 35° C	7,37 a	7,45 a	7,65 a	7,85 a	8,03 c	7,98 b	7,85 b

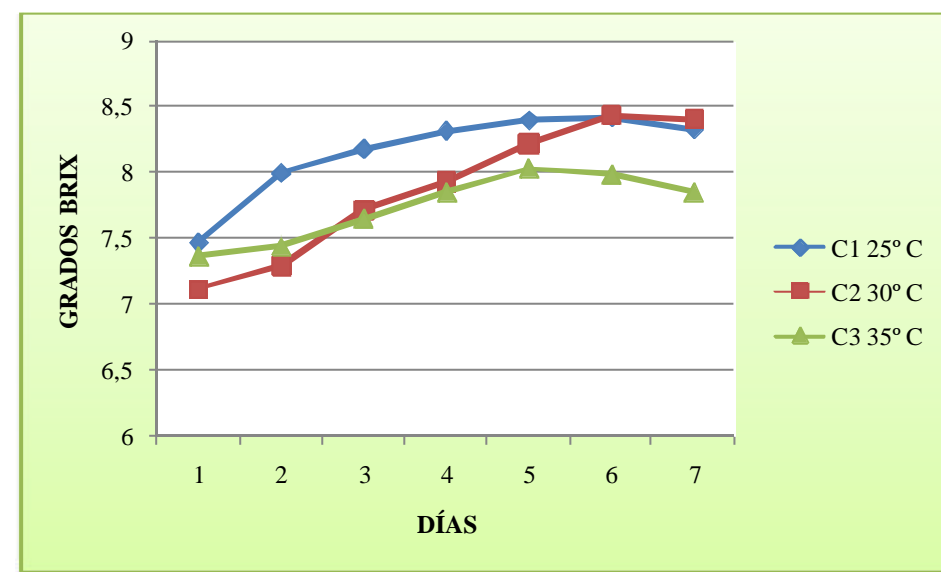


Figura 3.21. Acción de la temperatura sobre los grados brix en sandía durante la etapa de hidrólisis.

Nótese que el testigo fue más funcional pues presentó una mayor cantidad de grados brix en relación al resto de tratamientos dentro de cada una de las evaluaciones a partir del día quinto, pero en las evaluaciones anteriores fue superado por el tratamiento T4 M₂C₁ (Tabla 3.10 y Figura 3.22).

Tabla 3.10. Efecto conjunto de los microorganismos y la Temperatura sobre los grados Brix en sandía en la etapa de hidrólisis, IASA I, Rumiñahui, Pichincha, 2010.

TRATAMIENTOS	Evaluaciones Diarias de los grados brix						
	1	2	3	4	5	6	7
T1 M ₁ C ₁	7,17 d	7,50 bc	7,70 b	7,77 cd	7,87 d	7,97 c	7,87 d
T2 M ₁ C ₂	7,03 d	7,03 d	7,63 b	7,73 d	7,87 d	7,97 c	7,97 cd
T3 M ₁ C ₃	7,23 bcd	7,23 cd	7,57 b	7,67 d	7,80 d	7,70 d	7,60 e
T4 M ₂ C ₁	7,77 a	8,50 a	8,67 a	8,87 a	8,93 a	8,87 a	8,80 b
T5 M ₂ C ₂	7,20 cd	7,57 bc	7,80 b	8,13 b	8,57 b	8,90 a	8,83 b
T6 M ₂ C ₃	7,50 abc	7,67 bc	7,73 b	8,03 bc	8,27 c	8,27 b	8,10 c
T7 TESTIGO	7,53 ab	7,97 b	8,40 a	8,67 a	9,07 a	9,00 a	9,17 a

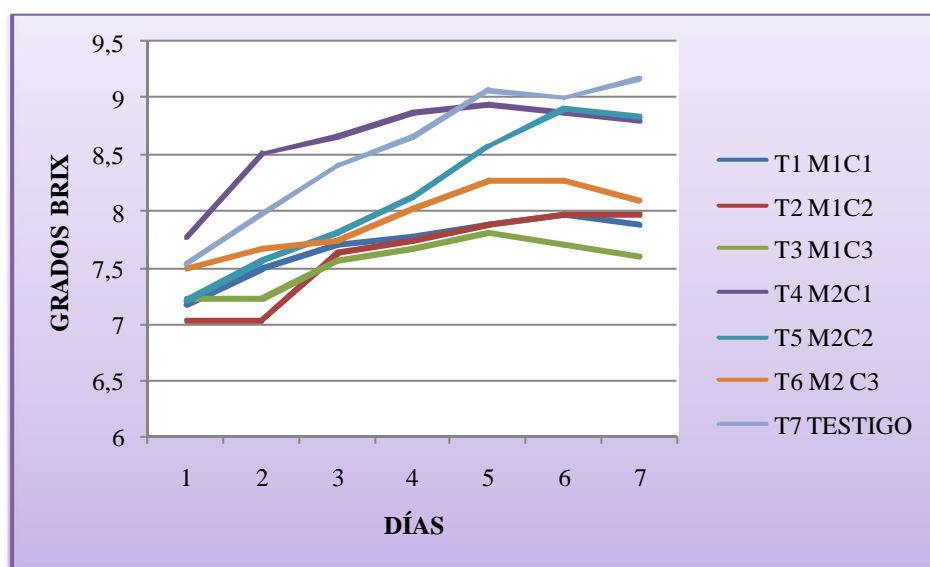


Figura 3.22. Actividad en conjunto de los microorganismos y temperaturas sobre los grados brix en sandía en la etapa de hidrólisis.

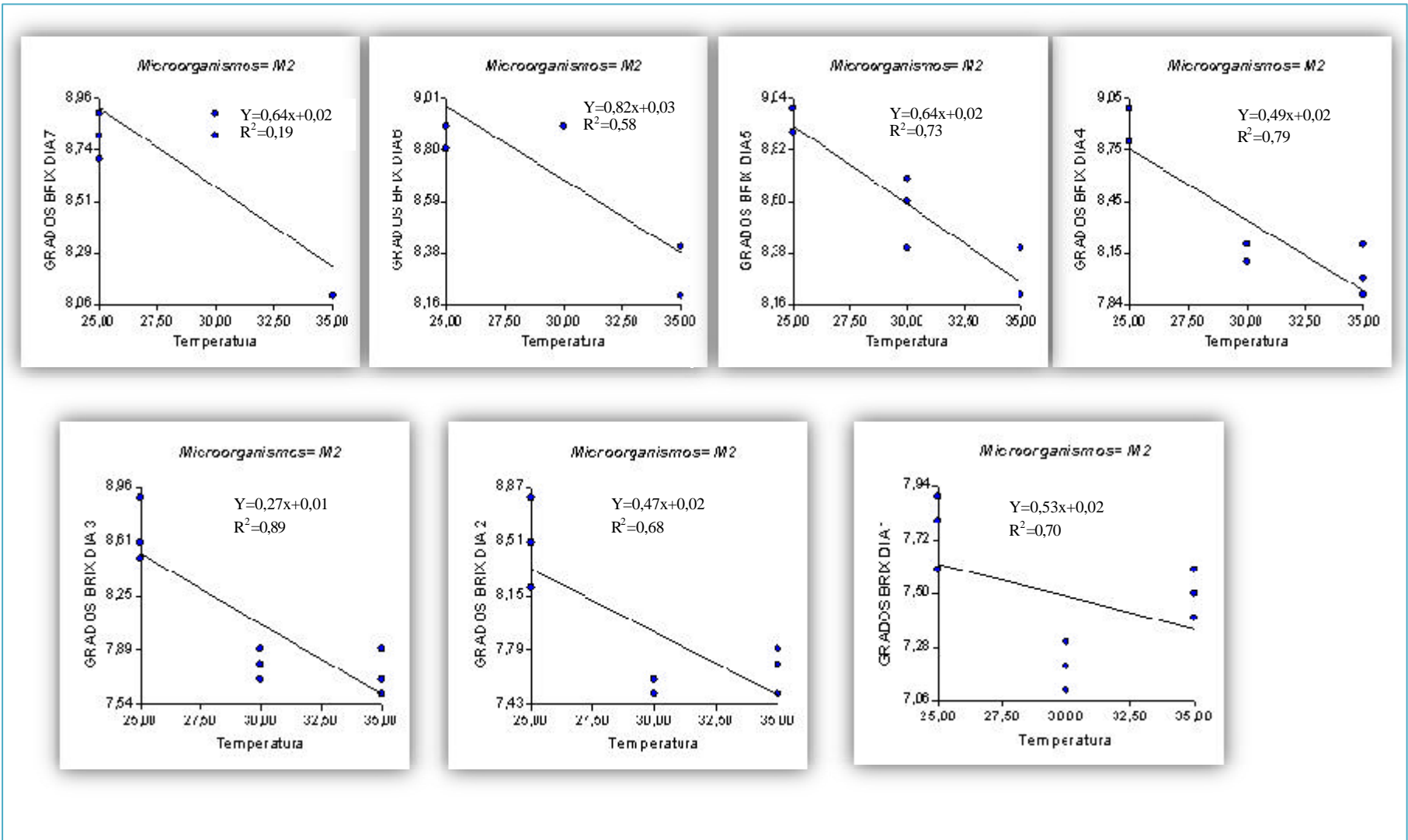


Figura 3.23. Efecto de la temperatura sobre los grados brix en el Microorganismo M2: *Aspergillus fumigatus*

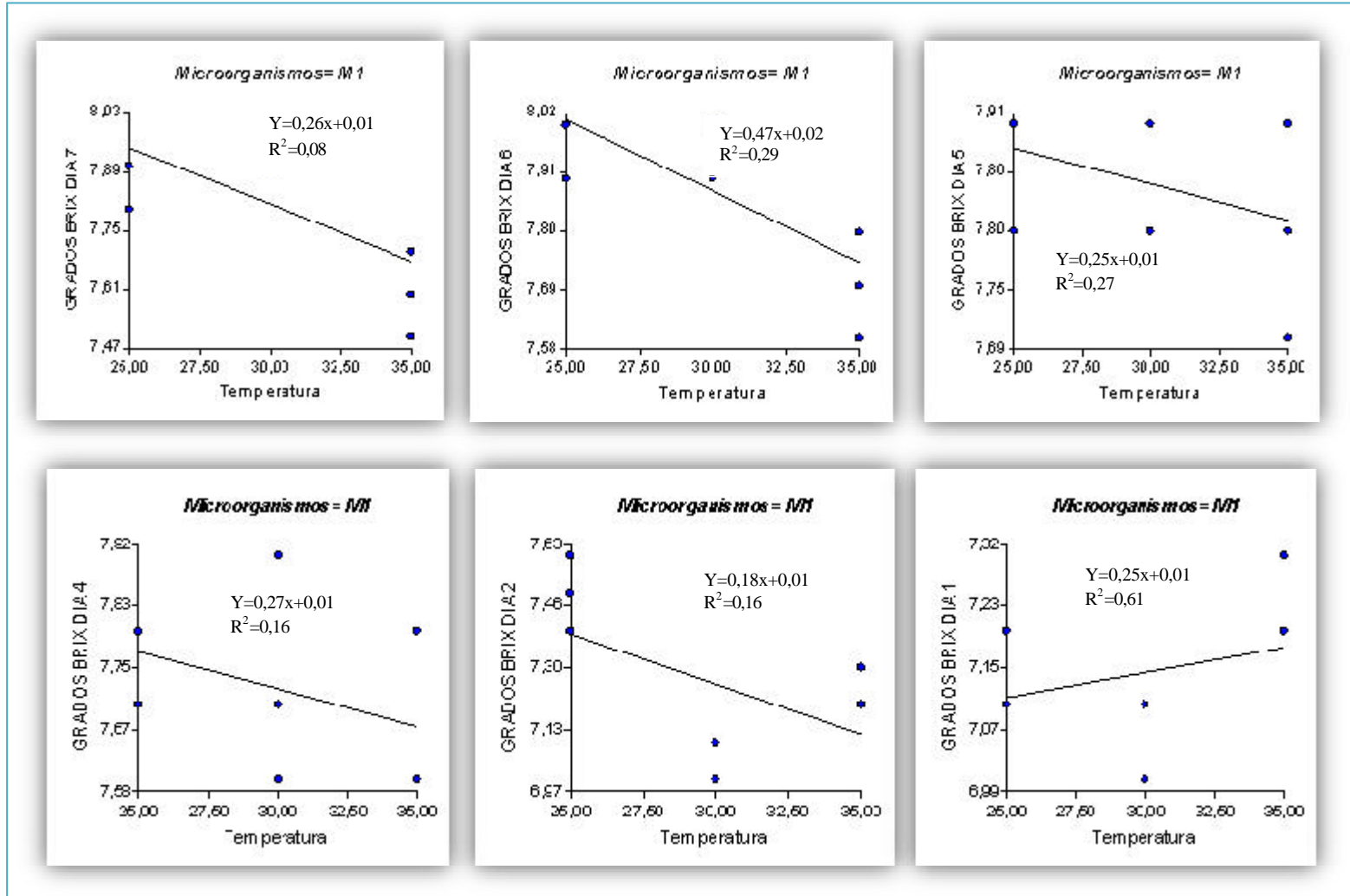


Figura 3.25. Efecto de la temperatura sobre los grados brix en el Microorganismo M1: *Leuconostoc dextranicum*

3.9. Análisis de la etapa de Fermentación-Destilación

Al establecer el análisis de variancia para el volumen de destilación no se encontró diferencias significativas entre tratamientos en las diferentes comparaciones y polinomios ortogonales (Tabla 3.11). El promedio general fue de 15.35, con un coeficiente de variación de 26.45%.

Tabla 3.11. Análisis de variancia para el volumen de destilación de la sandía en la etapa de fermentación.

FUENTES DE VARIANZA	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
TOTAL	19	252.55		
TRATAMIENTOS	(4)	5.30	1.33	0.08 ns
TEST ₁ VS RESTO	1	4.05	4.05	0.25 ns
TEST ₂ VS T ₁ ,T ₂ ,T ₃	1	0.08	0.08	0.01 ns
TEMPERATURA LINEAL	1	0.50	0.50	0.03 ns
TEMPERATURA CUADRÁTICO	1	0.67	0.67	0.04 ns
ERROR	15	247.25	16.48	
̄X			15.35	
CV (%)			26.45	

Sin embargo de no diferenciarse estadísticamente los tratamientos el **T4** TES₁ C. *thermocellum* ATCC 27405 presento el mayor volumen de destilación (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Volumen destilado de sandía en la etapa de fermentación para cada tratamiento.

TRATAMIENTOS	VOLUMEN DESTILADO
T1 BC ₁	15.25
T2 BC ₂	15.50
T3 BC ₃	14.75
T4 TES ₁ <i>C.thermocellum</i>	16.25
T5 TES ₂ <i>Z. moilis</i>	15.00

3.10. Cuantificación de etanol por Picnometría

Se realizaron los siguientes cálculos para determinar el equivalente a la densidad relativa del destilado (Berg 1963).

$$\begin{aligned}
 & \rho_{\text{rel}} = \frac{\rho_{\text{destilado}}}{\rho_{\text{agua}}} \\
 & \rho_{\text{rel}} = \frac{\rho_{\text{destilado}}}{\rho_{\text{agua}}} \\
 & \rho_{\text{rel}} = \frac{\rho_{\text{destilado}}}{\rho_{\text{agua}}} \\
 & \rho_{\text{rel}} = \frac{\rho_{\text{destilado}}}{\rho_{\text{agua}}}
 \end{aligned}$$

$$\rho_{\text{rel}} = \frac{\rho_{\text{destilado}}}{\rho_{\text{agua}}}$$

????????? ??? ?????????? ? ?????????? ?????????????? ?????????? ?????? ??

Este resultado permite determinar % en peso del etanol presente y a partir de este, se obtienen gramos de etanol y rendimiento.

Como se observa en la Tabla 3.13, el mayor porcentaje de etanol fue obtenido por parte de la cepa nativa *Leuconostoc dextranicum* respectivamente en proceso de fermentación a 30° C bajo las mismas condiciones de tiempo donde el porcentaje de etanol presente es de 15,18% y a 35° C se obtuvo un porcentaje de 13,26%; con las cepas control de *Z. mobilis* a la temperatura de 35° C y *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 a 35°C, con valores de 13,09% y 13,21%.

Tabla 3.13. Determinación de porcentaje de Etanol por picnometría. Fermentación del mosto de sandía, 8 días, condición anaeróbica, (25; 30; 35)° C. cepas nativas y Testigos.

Tratamiento	% de Etanol por Picnometría		
	Temperaturas		
	25° C	30 ° C	35 ° C
Bn +Bn	11,38	15,18	13,26
Bn + T ₁	11,384	11,36	13,09
Bn+ T ₂	11,36	11,94	13,21
Af+Bn	11,98	11,95	12,48
Af+T ₁	11,65	11,37	12,47
Af+T ₂	11,87	11,372	12,53
An+Bn	11,38	12,48	12,51
An+T ₁	11,37	11,64	11,94
An+T ₂	11,35	12,47	11,92

Simbolos: Bn, *Leuconostoc dextranicum*; Af, *Aspergillus fumigatus*; An, *Aspergillus niger*.

IV. DISCUSIÓN

El conocimiento empírico y/o popular del uso de los residuos de sandía con fines para energías renovables constituye una base sólida en la búsqueda e identificación de nuevas materias primas que no atenten contra cultivos utilizados principalmente para consumo humano. Varios estudios han validado científicamente la eficacia de numerosos usos de los residuos agrícolas tradicionales utilizados por la gente. Entre las variadas aplicaciones de los residuos vegetales, se incluyen aquellas con finalidad para la producción de bioetanol

Basados en este criterio biotecnológico se evaluó la especie vegetal *Citrullus lanatus* reportadas por los pobladores de la comunidad de El Membrillo, con acción fermentadora.

4.1. Aislamiento de microorganismos e identificación

En los residuos de sandía, se aisló e identificó los microorganismos nativos con la finalidad de incluir la capacidad hidrolítica y fermentadora de las mejores cepas nativas, comparando el porcentaje de etanol obtenido por las bacterias *Z. mobilis* y *C. thermocellum* ATCC 27405.

Dependiendo del tipo de materia prima (cáscara y pulpa) utilizado y de los medios de cultivo empleados para el aislamiento de microorganismos en los residuos de sandía se pudo recuperar más de 3 diferentes tipos de bacterias y hongos; lo cual se corrobora con

los resultados presentados por Galindo (2007) en donde señala que la diversidad microbiológica en la pulpa de sandía es alta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la hidrólisis se realizó por *L. dextranicum* bacilo Gram positivo nativo y los hongos del género *Aspergillus*; la etapa de fermentación alcohólica por *Z. mobilis* bacilo Gram negativo, aislados del medio base manzana y bacilo Gram positivo de *C. thermocellum* ATCC 27405 y por el bacilo Gram positivo (bacterias nativas). Este resultado está asociado con las características iniciales de los residuos de sandía que es líquido fresco no fermentado rico en azúcares que mantiene poblaciones autóctonas con condiciones ambientales y nutricionales apropiadas para su propagación.

Con respecto a la identificación macroscópica y microscópica de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* se observó que las colonias de estos hongos crecen con mayor rapidez en el medio PDA, en el cual se manifestó la coloración negra y gris característica. El tamaño, diámetro, altura de los conidióforos y número de filiales, son similares al estudio realizado por Zambrano y colaboradores (1996), lo cual corrobora lo planteado por Gilman (1957) y CABI (2003) para las dos especies de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*.

En la identificación bioquímica *Zymomonas mobilis*, resultó Catalasa (+), Oxidasa (-), Indo(-), Tween 80(-), y Test de Nitratos(-), en donde los resultados concuerdan con los trabajos reportados por Matiz en el 2000 con la clasificación del género de *Zymomonas* sp; sin embargo en la identificación microscópica de *Leuconostoc dextranicum* se observó bacilos gram positivos que forman cadenas cortas a diferencia de lo descrito por Renouf y colaboradores en el 2006 quienes reportaron que *Leuconostoc dextranicum* (BAL) se manifiesta como cocobacilos gram positivos de cadenas cortas, posee las mismas características en la morfología de sus colonias. En las pruebas de catalasa y oxidasa se obtuvo resultados positivos (Tabla 3.4), a diferencia de lo obtenido mediante el Test de identificación API en donde la Oxidasa y Catalasa fueron negativos, anaerobiosis positiva, citrato positivo Anexo D, lo que concuerda con los reportes descritos por Renouf y colaboradores en el 2006. La diferencia de los resultados obtenidos en la morfología microscópica de *L. dextranicum* se debe a las condiciones de crecimiento presentes en el medio de cultivo; según Bou y colaboradores en el 2004 las células cultivadas en glucosa o sobre medios sólidos pueden tener un alargado en la barra de la morfología formada, lo cual ocurrió en la presente investigación ya que el medio de cultivo sólido y líquido presentó dextrosa como fuente de azúcar.

En la identificación macroscópica y microscópica de *C. thermocellum* ATCC 27405 se observó que el diámetro, borde, coloración, tamaño y apariencia, bacilos gram positivos esporulados coinciden con los resultados obtenidos por Demain en el 2009.

El incremento poblacional (Tablas 3.2 y 3.4) para *A. fumigatus*, *A.niger*, *L.dextranicum*, *Z. mobilis* y *C.thermocellum* ATCC 27405, (Figuras 3.16 y 3.17) se debió a la adición de sustrato fresco rico en carbohidratos y proteínas que reactivan el metabolismo y división celular. Con el consumo y agotamiento constante del sustrato empieza la fase de declinación de los microorganismos lo cual sucede a partir del séptimo y octavo día. Cervantes (2007), manifiesta que la respuesta positiva en las poblaciones se asocia también al aporte de aminoácidos, vitaminas y cofactores esenciales liberados a medida que las células se lisan.

4.2. Hidrólisis

Para determinar la cantidad de azúcares reductores de la variedad Glory Jumbo se utilizo la técnica del ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) Figura 3,18 que al comparar con los datos obtenidos de azúcares reductores (glucosa) en el trabajo realizado por Matiz *et al* (2002), se indica un incremento del 10 al 20% de azúcares totales, corroborando los resultados obtenidos encontrando que al inicio del proceso se presento una cantidad de 3,88 g/L, lo que demuestra que es un sustrato nutricionalmente enriquecido y favorece el crecimiento de las poblaciones microbianas nativas.

En comparación con la hidrólisis acida, *Aspergillus* permitió obtener la mayor cantidad azúcares reductores ya que estos hongos tienen la capacidad de producir enzimas endoglucanasas, que atacan enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa (UCLM, 2007); además de que se empleó a *L. dextranicum* por ser una bacteria nativa ya que es la

responsable de iniciar fermentaciones de verduras y frutas por ser capaz de desdoblar los enlaces de celulosa y lignocelulosa manifestado por (Bou, 2004).

Para la evaluación de azúcares reductores en la etapa de hidrólisis bajo la acción de los tres microorganismos nativos *L. dextranicum*, *A. fumigatus* y *A. niger* (Testigo) en el sustrato a diferentes temperaturas (25; 30 y 35) ° C; se observó la actividad enzimática mediante el uso del refractómetro, en donde se pudo evidenciar que los diferentes microorganismos desdoblaron las cadenas de celulosa y lignina del mosto.

Al existir un incremento de azúcares se pudo evidenciar en el proceso de hidrólisis diferencias significativas por lo que no se descartó ninguno de sus valores, sin embargo el porcentaje de azúcar que se encontró en el mosto (azúcares reductores 8,38) fue superior a los del análisis de la materia prima sin tratamientos, lo que demuestra el incremento de azúcares desdoblados y justifica el proceso realizado con cualquiera de los microorganismos *Aspergillus fumigatus* y *L. dextranicum*. El testigo fue más funcional pues presentó una mayor cantidad de grados brix en relación al resto de tratamientos dentro de cada una de las evaluaciones.

4.3. Fermentación

Los rendimientos de la hidrólisis permitieron a los microorganismos empleados en la etapa de fermentación realizar la conversión de azúcares reductores en etanol. De acuerdo con Cervantes (2007), en el mosto se dan tres tipos de fermentación, ácida, alcohólica y viscosa. La interacción de las tres determina el incremento en los recuentos poblacionales, consumo de azúcares, proteínas y formación de etanol que le dan aspecto viscoso al mosto.

En la obtención de etanol *Z. mobilis* utiliza la ruta metabólica Entner-Doudoroff, *L. dextranicum* utiliza la vía heteroláctica para la obtención de carbono y energía y *C. thermocellum* ATCC 27405 utiliza la ruta de fermentación de acetona butanol para completar el metabolismo energético. El piruvato como producto final de las rutas bioquímicas se convierte a etanol por la acción de la piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. Por otro lado, Cervantes y colaboradores en el 2007, reportaron que las bacterias ácido lácticas como *L. dextranicum* son las responsables de la fermentación viscosa y alcohólica de bebidas fermentadas.

Un resultado interesante fue el incremento de bacilos Gram positivos de *L. dextranicum* por ser bacterias nativas que tienen mayor eficiencia a la temperatura ambiente de 25° C; lo cual se podría correlacionar con el aumento en la viscosidad, cambio físico en el fermento maduro.

Durante el proceso de fermentación se logró concentraciones superiores a las reportadas por Monsalve en el 2006 trabajando sin agitación debido al mayor tiempo de fermentación (8 días) y al pH de 4,5 para todos los tratamientos ya que se evidenció un descenso en la producción de burbujas durante la fermentación por el desprendimiento de CO₂.

4.4. Destilación

En la fase de destilación se utilizó equipos semi-micro, al establecer el análisis de varianza para el volumen de destilación no se encontró diferencias significativas (Tablas 3.11 y 3.12). En el tratamiento con T4 TES₁ *C. thermocellum* ATCC 27405 se logró mayor volumen de destilación. El vacío generado en el equipo tiene la finalidad de bajar el punto de ebullición del etanol, evitando así pérdidas por evaporación, debido a la pequeña cantidad de etanol obtenido en el proceso (Tabla 3.12). Cabe señalar que la destilación al vacío se la realizó porque la investigación fue a escala piloto; este tipo de destilación a nivel industrial elevaría los costos (Restrepo, 2007).

Una vez realizada la destilación, se determinó la concentración de etanol por medio de cromatografía de gases, y por el método del picnómetro. En los análisis realizados mediante cromatografía de gases los valores fueron disminuyendo (Anexo D) conforme se esperaba a lo reportado por Albán & Freire en el 2009 por el sinergismo que se produce entre *A. niger* con *Z.mobilis* por presentarse en el mismo sustrato; ya que al descender el pH en el mosto mayor es el crecimiento de *A. niger* impidiendo el crecimiento de otros

microorganismos según lo reportado por Bustamante en el 2008, por lo que la capacidad fermentativa de *Z. mobilis* disminuye.

A pesar de que *Z. mobilis* y *C. thermocellum* ATCC 27405 tienen la capacidad de consumir más fuentes de carbono en relación a *L. dextranicum* en el sustrato no se aprecia una producción considerable de etanol ($< 11.36\% \pm 0,059\%$) obtenidas mediante picnometría manifestadas en la (Tabla 3.13) para ninguno de los tratamientos fermentados con *Z. mobilis* y *C. thermocellum* ATCC 27405; por el efecto inhibitorio que se produce al trabajar en conjunto con *A. niger* y *A. fumigatus*.

Al realizar la comparación detallada indicada en la (Tabla 3.13) se determinó que con los tratamientos T₁ y T₂ (hidrolizado con *A. niger* y fermentado con *C. thermocellum* ATCC 27405 y *Z. mobilis*) generó un promedio de ($11,78\% \pm 0,059\%$) de alcohol menor al producido por *Aspergillus fumigatus* con los tratamientos T₁ y T₂ (hidrolizado con *A. fumigatus* y fermentado con *C. thermocellum* ATCC 27405 y *Z. mobilis*) obteniéndose un promedio de ($11,87\% \pm 0,059\%$) por lo que la actividad de sinergismo entre estos microorganismos es reflejada al final de este procedimiento. Aunque los tratamientos no mostraron valores muy altos para el porcentaje de alcohol obtenidos por picnometría si confirmaron que el mejoramiento en el control de las variables del proceso incrementa la eficiencia del mismo (Tabla 3.13).

Los porcentajes de etanol obtenidos por cada tratamiento superaron a los obtenidos por Albán & Freire 2009 lo que significa que las condiciones para el tratamiento inicial y el tiempo influyen en la calidad del proceso obteniéndose mediante picnometría el mayor porcentaje para el tratamiento de la cepa nativa *Leuconostoc dextranicum* a 30° C en el proceso de fermentación donde es el 15,18% \pm 0,059% y a 35° C se obtuvo el 13,26% \pm 0,059%; con las cepas control de *Z. mobilis* a la temperatura de 35° C y *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 se alcanzaron valores de 13,09% \pm 0,059% y 13,21% \pm 0,059% resumidas en la (Tabla 3.13)

Finalmente al realizar una comparación entre la cuantificación de etanol por un método específico como la cromatografía de gases y por un método tradicional como picnometría se obtuvieron valores distintos, sin embargo, se resalta las ventajas que podría tener la segunda técnica a pesar de no dar resultados exactos a partir de diferentes muestras del destilado obtenidas. Al realizar una corrida de cromatografía de gases de los tratamientos (Anexo D) se obtuvo una mayor concentración con el tratamiento Bn+Bn (*L. dextranicum*) a 30° C en la etapa de fermentación caracterizado por tener 27.62 % (v/v). Con picnometría se obtuvieron porcentajes de etanol diferentes a los obtenidos mediante cromatografía de gases, resultando ser un método no muy directo ni confiable para la cuantificación de la concentración de etanol debido a que las cantidades del destilado fueron muy pequeñas, además que en el proceso de destilación no se pudo controlar una evaporación adecuada de otros alcoholes presentes como n-propanol y metanol como subproductos del proceso.

V. CONCLUSIONES

- ✍ En *Citrullus lanatus* se identificó a *Leuconostoc dextranicum*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*, como microorganismos nativos presentes en pulpa y cáscara de sandía que tienen capacidad hidrolítica y fermentativa.
- ✍ La concentración de carbohidratos totales y fermentables de los residuos de sandía fue de 3.88 g/L al inicio del proceso.
- ✍ En la hidrólisis enzimática con *A. fumigatus* y *L. dextranicum* en relación a *A. niger*, se produjo una mayor cantidad de azúcares reductores a temperatura de 25° C debido a que *A. fumigatus* tiene mayor eficiencia a dicha temperatura.
- ✍ *L. dextranicum* resultó ser más eficiente que *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas mobilis* ya que a temperaturas entre (25, 30 y 35) °C fue más eficiente en la etapa de fermentación. Debido a que la bacteria nativa *L. dextranicum* presenta mayor sinergismo con *Aspergillus*; a diferencia de *C. thermocellum* ATCC 27405 y *Z. mobilis*.
- ✍ Para la fermentación con *Leuconostoc dextranicum* se logró una máxima concentración de etanol del 27,62% valor que a escala piloto es considerable y a escala industrial se puede llegar a la concentración del 99.9% por la realización de la destilación extractiva salina.
- ✍ Los residuos de sandía son adecuados para la producción de bioetanol ya que ayuda a disminuir el efecto negativo que representa en la actualidad la producción de biocombustibles a base de monocultivos de caña de azúcar y maíz que son productos agrícolas destinados a la alimentación humana y animal.

VI. RECOMENDACIONES

- ✍ Ampliar el estudio de las diversas opciones de residuos agrícolas para la generación de energías renovables, por ser materias primas que garanticen mantener la soberanía alimentaria y diversidad del suministro energético y la posibilidad de obtener servicios de energía sin impacto ambiental.
- ✍ Para obtener mayor concentración de etanol se debe realizar monitoreos constantes de los microorganismos durante la fermentación ya que influye el nivel inicial de microorganismos, afinidad por los sustratos, la disponibilidad de sustrato, la relativa tasa de crecimiento de las especies en estudio que compiten a diferentes temperaturas, la producción de metabolitos antimicrobianos, competencia microbiana por un sustrato limitante como la glucosa o el oxígeno y la interacción entre especies.
- ✍ Controlar y monitorear con intervalos de tiempo más cortos el proceso de fermentación en un biorreactor para controlar las variaciones de concentración de sustrato producto y el desarrollo de microorganismos en el tiempo, y conocer cuál es el punto más adecuado de fermentación, además de realizar una destilación fraccionada para evitar la contaminación del etanol con n-propanol y metanol subproductos de la fermentación y destilación.
- ✍ Realizar una destilación extractiva salina para lograr obtener mayores concentraciones de alcohol.
- ✍ Por ser *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 una bacteria termo resistente se recomienda evaluar la actividad microbiana a temperaturas superiores de 45°C para mejorar el nivel de producción de etanol.
- ✍ Realizar estudios para evitar los riesgos de antagonismo entre *A. niger*, *A. fumigatus*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Z. mobilis* que permitan mejorar la producción de etanol.

- ✍ En base a los resultados obtenidos en esta investigación y en otras similares es importante crear una Norma Oficial Ecuatoriana que documente un protocolo de elaboración de bioetanol más apropiado.

- ✍ Es importante que el mosto no permanezca mucho tiempo expuesto al ambiente por seguridad para evitar que agentes externos no controlados empiecen el proceso de fermentación aerobia y produzcan ácido acético. Por ello para su transporte se almacenó en botellas plásticas de las que se podía extraer el aire.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Albán, D.; Freire, D. (2009). Tesis: Obtención de Bioetanol a partir de residuos de naranja “*Citrus sinensis*” provenientes del proceso Agroindustrial en la Provincia de Bolívar, Ecuador. [Revisión de tesis]. (pp.70-80) . Quito.

Albán, G; Arnao, C.; Mejía, M. (2003). Proyecto de producción de sandía para exportación en la Península de Santa Elena, Ecuador. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/3810>

Aburto, J; Martínez, T y Murrieta, F. (2008). Evaluación Técnico – Económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Tecnología, Ciencia, Educación, enero – junio, año/vol 23 numero 001, Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos, Distrito federal de México. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/482/48223104.pdf>

Anschau, A; Flores M; Carballo, N; Stella, M y Hilbert, J. (2008). Evaluación del potencial de producción de biocombustibles en Argentina, con criterios de sustentabilidad social, ecológica y económica, y gestión ordenada del territorio. El caso de la caña de azúcar y el bioetanol. Argentina. Extraído el 4 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://www.inta.gov.ar/INFO/bioenergia/EGAL_ca%C3%B1a.pdf

Azúcar de caña (2009). Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.perafan.com/azucar/descargar/Comentarios-2009-06-1.pdf>

Ballesteros, M. (2006). Carburantes sin petróleo, Bioetanol España. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/Publicacion/doc/VT/vt4_Biocarbura_ntes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf

Bär, B. (2003). Trabajo de investigación: El biodiesel. España. . Extraído el 4 de Septiembre, 2009, disponible en el sitio web: <http://usuarios.lycos.es/biodieseltr/index.html>.

Betancourt, L; Rincón, G; Machuca, F. (2009). Boletín informativo de Gestión de Conocimiento en el sur occidente colombiano. Mapas de trayectorias tecnológicas para la producción de bioetanol en Colombia hacia el año 2030. Colombia. Extraído el 12 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://geintec.univalle.edu.co/Files/boletin%2016.pdf>

Bryant, C. (2008). Mejorar todavía más la eficiencia de la industria de bioetanol, Nebraska. Extraído el 7 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://www.biotimes.com/en/Articles/2009/September/Documents/September%202009_bioethanol_ES.pdf

Bustamante Z., Galindo E., Huanca M. y Ballesteros F. (2000). Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus niger* Programa Fármacos, Alimentos y Cosméticos, (PROFAC), Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Bolivia. Extraído el 12 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/downloads/49.pdf>.

El Comercio. (2007). Las familias de 20 cantones de Manabí desgranar el maní. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://ww1.elcomercio.com/noticiaEC.asp?id_noticia=138103&id_seccion=6

Canales, R; Sánchez, J; Sánchez. (2003). Cadena Agroalimentaria de sandía, caracterización de los eslabones de la cadena e identificación de los problemas y demandas tecnológicas, México. Extraído el 25 de Septiembre, 2009, del sitio web: www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/sandia.pdf

Cárdenas, G. (2008). Bioetanol a partir de la caña de azúcar en Argentina. Extraído el 29 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.biodiesel.com.ar/download/AapresidBiocombustiblesCardenasXVCongreso150807.pdf>

Carrillo, L. (2004). Los hongos de los alimentos y forrajes. Levaduras. España. Extraído el 3 de Noviembre, 2009, disponible en el sitio web: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf>

Cervantes, M; Pedroza, A (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. México. Extraído el 25 de Septiembre, 2009, del sitio web: www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/sandia.pdf

Colina, A. (2000). Obtención de Fuentes Alternativas de Energía. Universidad de Salamanca, España. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, disponible en el sitio web: <http://pdf.rincondelvago.com/bioetanol.html>

Cortés J. (2002). Prueba de la Catalasa (en línea). Recursos Didácticos para Biología. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/catalasa.htm>

Cortés J. (2002). Prueba de la Oxidasa (en línea). Recursos Didácticos para Biología. Consultado 9 de Septiembre, 2009. Disponible en: <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/oxidasa.htm>

Demain, A.; Newcomb, M.; y Wu. J. (2005). Cellulase, Clostridia, and Ethanol. USA. American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Consultado 9 de Diciembre, 2009. Disponible en: <http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/69/1/124>

Diario El Hoy. (2008). Sandía: dulce sabor que hace falta (en línea). Quito, Ecuador. Consultado el 09 de Octubre del 2009. Disponible en: http://www.hoy.com.ec/NotiDinero.asp?row_id=288036

Duk, K; Joon,O. (2000). A new restriction endonuclease, CthII, from Clostridium thermocellum ATCC 27405. Corea. Consultado el 09 de Enero del 2010. Disponible en http://www.jbmb.or.kr/jbmbonline/23_3/02600802.pdf

FAO. *Food and Agriculture Organization.* (2008). Efectos de los biocombustibles en el medio ambiente. Extraído el 8 de Octubre, 2009, del sitio web: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s05.pdf>

Fish, B.; D. Bruton y Russo, V. (2009). Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production del USDA-ARS, South Central Agricultural Research Laboratory, Lane, OK, USA. Extraído el 8 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/18>

García, JM; García, JA. (2006). Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Universidad de Alcalá, España. Extraído el 16 de Septiembre, 2009, del sitio web:http://www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/Publicacion/doc/VT/vt4_Biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf

García, B. (2003). Obtención de fuentes alternativas de energía Bioetanol. Biotecnología del etanol. Extraído el 4 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi>, España, 2003

Magdalena, A. (2005). Bacterias Pruebas para la Identificación. España. Extraído el 12 de Diciembre, 2009, del sitio web: <http://www.telefonica.net/web2/bir/pdf>

Matiz, A.; Torres, C; y Poutou, R. (2002). Producción de etanol con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis spp.* Universidad de Cordova. Colombia Extraído el 3 de Octubre, 2009, del sitio web: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/693/69370204.pdf>

Masera, O; Rodríguez, N, Lazcano, I; Horta, A ; Macedo, I. (2006). Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México". México. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://www.energia.gob.mx/webSener/res/169/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf

Mosquera, M. 2008. Obtención de Etanol Anhidro a Partir de Materiales Feculentos de Producción Nacional: Maíz (*Zea maiz*) y Yuca (*Manihot esculenta crantz*). Tesis. Ingeniería Biotecnología. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército.10-15P

PROFIAGRO. (2007). Estudio de perfectibilidad. Resumen Sandía. Ecuador. Extraído el 14 de Octubre, 2009, del sitio web: <http://www.profiagro.org/archivos/file/profiagro/descargas/sandia-estudio-prefactibilidad-resumen.pdf>.

Roque, B; & Cabanillas, J. (2008). Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos – cáscaras de arroz (*Oriza sativa*). Perú. Revista virtual REDESMA. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: [http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20\(Rojas%20&%20Cabanillas\).pdf](http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf)

Romero, M; Ramallo, J; y Ploper, L. (2008). Acción inhibitoria de una cepa de *Zymomonas mobilis mobilis* aislada de caña de azúcar sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal de la cancrrosis de los cítricos, España. Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182008000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Skoog, D; West, D; Holler, J; Crouch, S; (2001). Química Analítica. Séptima edición. (pp.550-687)

Taiwán Tunkey Project Association. (2003). Planta de producción de Alcohol etílico.
Extraído el 3 de Septiembre, 2009, del sitio web: <http://www.tpcc.org.tw/index-english.asp>

Tu Salud. (2009). Coma la sandía en diversas recetas, España. Extraído el 3 de
Noviembre, 2009, del sitio web:
http://www.reflejos.com/onlinepdf/20090719/20090719_Ref_p11.pdf

Vergagni,G. (2008). Bioetanol desde el maíz. Estado actual y nuevas Tendencias.
Oportunidades y Desafíos. España. Extraído el 10 de Octubre, 2009, del sitio web:
<http://www.biodiesel.com.ar/download/BioetanolPresFDGV.pdf>Wayne, W.

Vandecasteele, K.; Gaus, I.; Debreuck,W. (2000). HPLC (High-performance Liquid
Chromatography). Analytical Chemistry. Canadá. Extraído el 8 de Noviembre, 2009, del
sitio web: <http://www.analitical.chemistry.com/> H.W. Wilson,Gs

3. ANEXOS

3.1. ANEXO A

3.1.1. Rutas Metabólicas de los microorganismos en estudio

3.1.1.2. Ruta de Entner – Doudoroff para *Z. mobilis*

Ruta de Entner-Doudoroff

- Presente en ciertos Gram-negativos aerobios como *Pseudomonas*.
- Muy rara en hongos
- Relativamente infrecuente como vía de fermentación

3.1.1.3. Ruta de Fermentación para *C. thermocellum* ATCC

Fermentación de acetona-butanol

- Tipo de fermentación llevada a cabo por bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium*.
- Se producen compuestos orgánicos disueltos de gran importancia industrial

3.1.1.4. Ruta de Fermentación para *L. dextranicum*

Ruta de la Fosfoctolasa o de Warburg-Dickens (WD)

Fosfoctolasa

- Es la ruta que siguen ciertas bacterias lácticas (especialmente *Lactococcus/Lactobacillus*)
- Se puede considerar una variante de la ruta de la PF, produciendo en primer lugar acetato (C2), pero consiguiendo, más tarde, una descarboxilación.
- Sin embargo, en la ruta WD la primera fosfoctolasa rompe el azúcar (C6) de lugar a compuestos que conducen a la formación de lactato y a un posterior fermentación heteroláctica.

Fermentación heteroláctica

3.2. ANEXO B

3.2.1. Medio de cultivo para aislamiento de *Aspergillus*.

Para el aislamiento de *Aspergillus niger* y *fumigatus* se utilizó el medio de cultivo Czapek levadura (solución concentrada de sales 10mL, sacarosa 30g, fosfato dipotásico 1g, extracto de levadura 5g, agar agar 15 g aforado a un litro) y Papa Agar Dextrosa (PDA). Se adicionó 0.01 g/L de tetraciclina para inhibir el crecimiento de bacterias en las colonias aisladas.

La solución concentrada de sales del medio Czapek levadura estuvo compuesta de 5g de cloruro de potasio, 5g de sulfato ferroso heptahidratado, 30g de nitrato de sodio y 5g de sulfato de magnesio heptahidratado aforado a 100ml con agua destilada (este medio se lo conservo en refrigeración)

3.2.2. Medio de cultivo para aislamiento de *L. dextranicum* y *C. thermocellum* ATCC 27405

Medio de cultivo Agar- agar 12g por litro con antibiótico ciclohexamida 0,03g para evitar el crecimiento de hongos en las colonias aisladas.

3.2.2.1. Preparación del inóculo

Medio enriquecido a base de 5g Bactopeptona, 5g de Dextrosa y 5g de Cloruro de Sodio.

3.2.3. Medio de cultivo para aislamiento de *Z. mobilis*

Se elaboró con 200 g de manzanas, 250 ml de agua destilada estéril. El jugo obtenido se filtró y se colocó en frascos de 50 ml con una capacidad de reacción de 40 ml, a estos frascos se les tapó con papel aluminio para evitar la contaminación ambiental (Albán & Freire, 2009)

El medio de crecimiento utilizado para el aislamiento fue a base de: Extracto de levadura 10 g/L; Agar agar 15 g/L, Bactopeptona 10 g/L y Manzana 200 g/L.

3.2.3.1. Preparación del inóculo

Medio enriquecido a base de 5g Bactopeptona, 5g de Dextrosa y 5g de Cloruro de Sodio.

3.3. ANEXO C

3.3.1. Método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

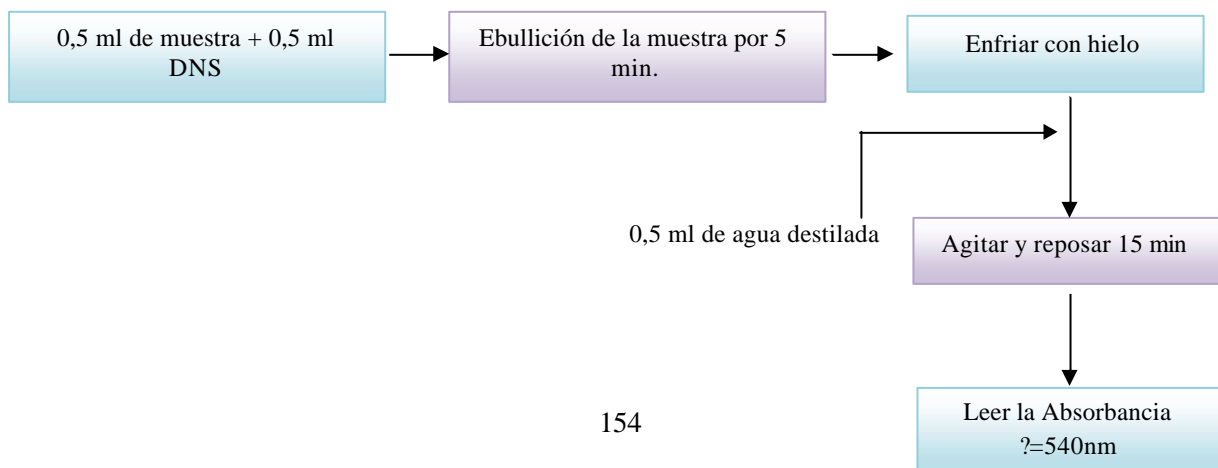
- ✍ Disolver 1.6 g de NaOH en H₂O destilada.
- ✍ Adicionar 30 g de Tartrato de Sodio y Potasio.
- ✍ Adicionar 1 g de DNS
- ✍ Aforar a 100 ml con H₂O destilada

☞ Almacenar en frascos ámbar a 4° C.

Preparar una solución stock de glucosa de 4 gL⁻¹ y almacenarla a 4° C. a partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones conocidas (mM): 0,5; 1; 2; 3 y 4.


3.3.2. Elaboración de la curva de calibración:

- ☞ Tomar 0,5 ml de cada dilución y agregar 0,5 ml de reactivo DNS.
- ☞ Preparar una mezcla blanco por dilución de 0,5 ml de H₂O destilada a 0,5 ml del reactivo de DNS.
- ☞ Agitar todas las muestras.
- ☞ Colocar a ebullición las muestras en baño maría por cinco minutos.
- ☞ Enfriar con hielo.
- ☞ Adicionar 5 ml de H₂O destilada.
- ☞ Agitar y dejar en reposo por 15 minutos.
- ☞ Leer la absorbancia a 546nm.
- ☞ Realizar la curva Absorbancia versus concentración.



3.4. ANEXO D

3.4.1. Resultado de las cromatografías de las muestras de etanol obtenido de los diversos tratamientos.



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

AREA QUIMICA

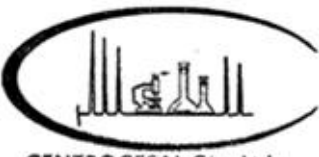
INFORME DE ENSAYO No.: 6031-01-05-10-10-Q

Empresa: Alexandra Angulo
Nombre de representante: Alexandra Angulo
Dirección: Valle de los Chillos
Teléfono: 2865883 **FAX:**
Descripción e identificación de la muestra: Extractos
Contenido declarado: 8mL de cada muestra
No. de Lote: Varios
Fecha de elaboración: na **Fecha de caducidad:** na

Muestreo: ND **Fecha de muestreo:** ND
Fecha de recepción: 05-Oct-10
Fecha de ensayo: 11-Oct-10
Fecha de reporte: 19-Oct-10

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Muestra	Parametro	Método	Unidades	Resultado
Extracto 1 BN+BN T° 25°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	0,12
Extracto BN+BN T° 30°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	27,62
Extracto 1 Af+BN T° 25°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	1,58
Extracto An+Bn T° 30°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	0,42
Extracto 1 BN+BN T° 25°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	11,09
Extracto Bn+Bn T° 35°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	7,89
Extracto Af+BN T° 35°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	3,14
Extracto An+T2 T° 35°C	Etanol	Cromatografía de Gases	g/100mL	3,10



CENTROCESAL Cía. Ltda.

Q. R. Margarita Torres
Responsable de Análisis

Dr. Carlos López M.
Director de Calidad
CENTROCESAL Cía. Ltda.

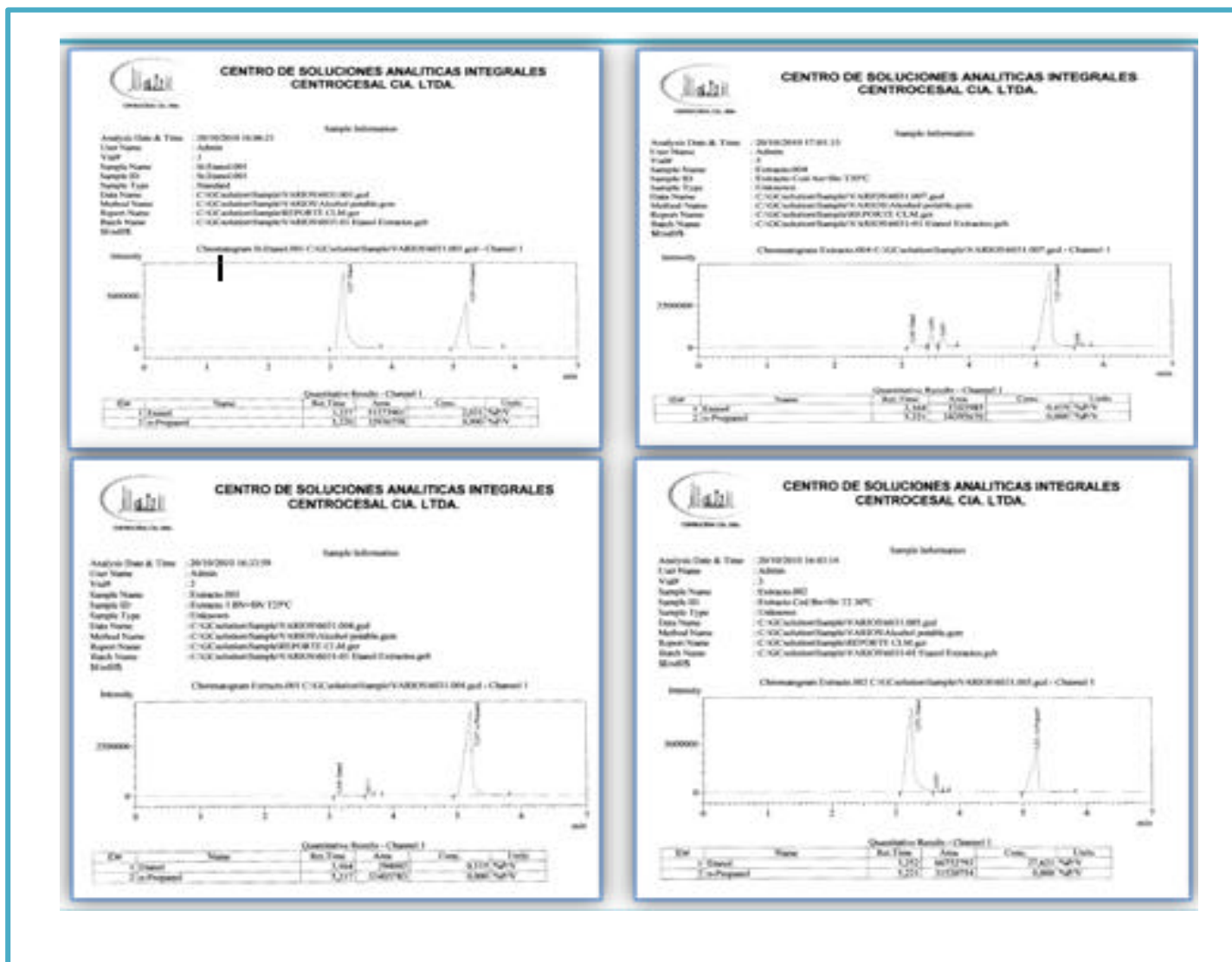
Director Técnico

Notas:
 ND: No declara
 NA: No aplica
 Los resultados reportados son válidos solo para las muestra analizada de este reporte.
 Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
 Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
 INT. INC. S. 19.1

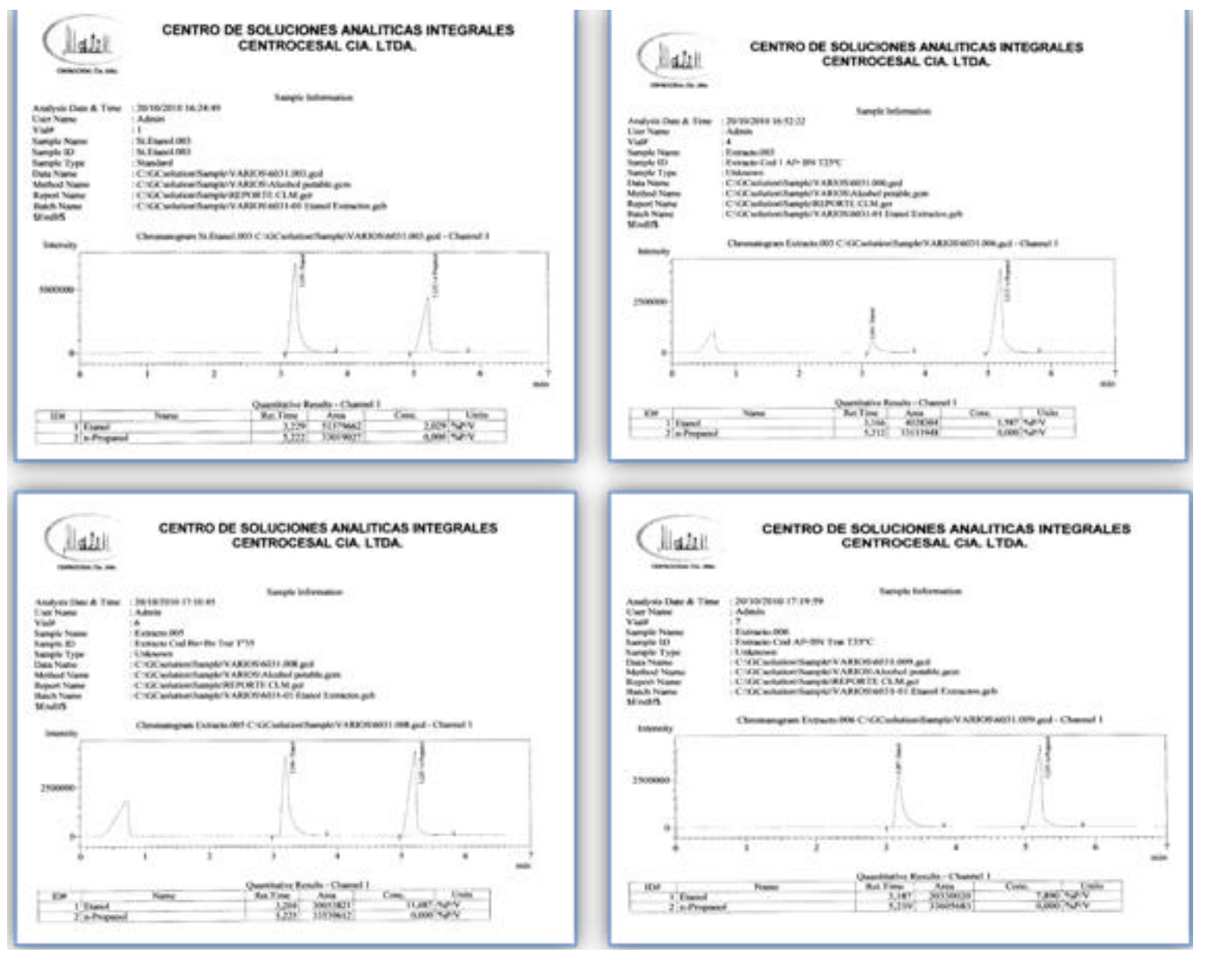
Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América 931-232 y Av. Mariana de Jesús
 Telf: (593 2) 2238342
 Fax: Ext. 182 Celular: 099448872
 e-mail: info@centrocesal.com
 www.centrocesal.com
 QUITO - ECUADOR

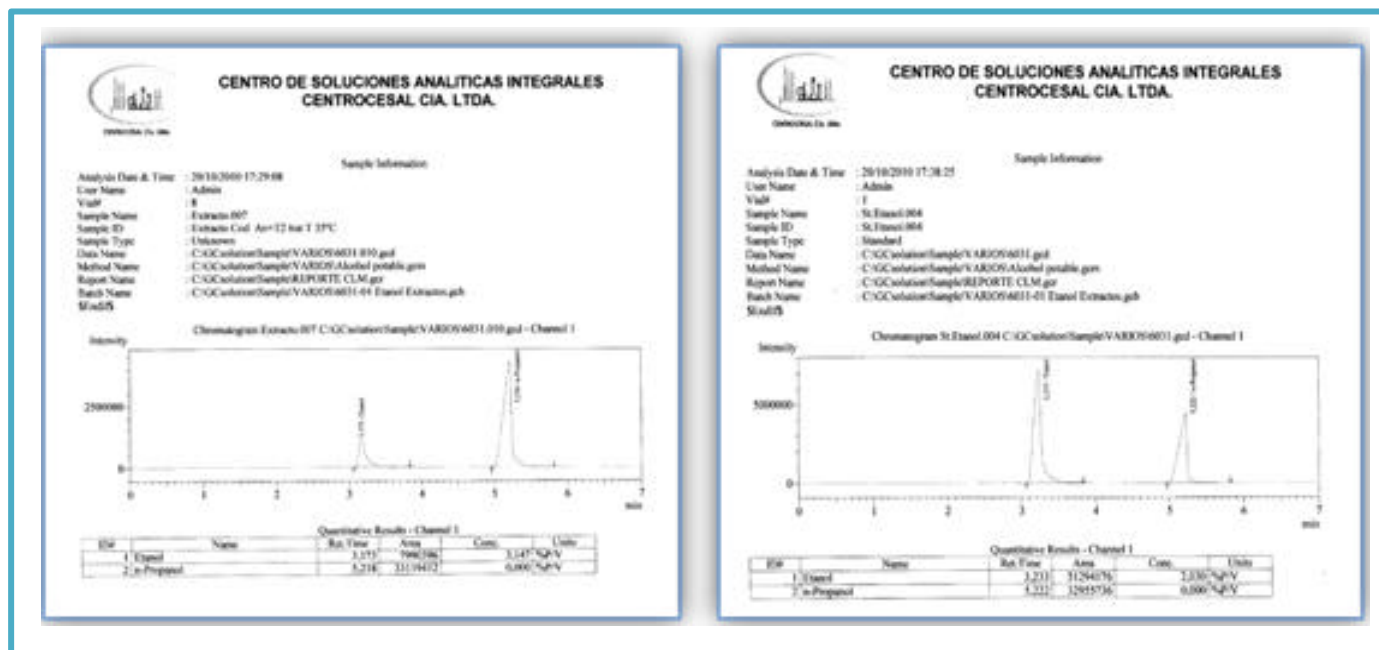
3.4.2. Cromatogramas de las muestras de etanol obtenidas de los diferentes tratamientos.




3.4.2. Cromatogramas de las muestras de etanol obtenidas de los diferentes tratamientos.



3.4.2. Cromatogramas de las muestras de etanol obtenidas de los diferentes tratamientos.



3.4.3. Resultado de las Pruebas Bioquímicas por el Test de Identificación Api



Centro de Investigaciones Microbiológicas y Control de Calidad

Fecha: 20 de Julio de 2010


Saforita
Alexandra Angulo
ESP
Sangolquí

Telefono: 261-5663

REPORTE DE LABORATORIO
REF: 13 07160/2

20/07/2010

apiweb™ - Resultado de identificación



+ + + + + + + + + + + + + + + +																				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	3	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	NH ₄	LOC	ODC	DT	H ₂ S	URE	TD	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	BHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
↑					↑				↑						↑					
+ + + + + + + + + + + + + + + +																				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
MD ₂	N ₂	VOB	MCC	DFU	URP															

REFERENCIA: 13 07160/2

FECHA: 20/07/10

COMENTARIO

CMCC:

Galería

AP20 C M-1

Perfil

62 D 2 0 C 0 5 1

Nota

Taxon significativo	% D	T	Pruebas en contra
<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)	96.9	0.92	
Taxon siguiente	% D	T	Pruebas en contra
<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)	94.1	0.99	LOC 25% OX 50% O ¹² C 97%

Cancel

Imprimir