

Producción de etanol a partir de residuos amiláceos y lignocelulósicos

Primera fase 1: caracterización química del bagazo de caña, de la yuca raíz sin cáscara y del residuo fibroso de la palma africana como fuentes potenciales en la producción de etanol carburante por vía biotecnológica

Amleto León Téllez

Producción de etanol a partir de residuos amiláceos y lignocelulósicos

Amleto León Téllez
Escuela de Ciencias Naturales e Ingeniería
Facultad de Ingeniería en Energía
e-mail: amleto@unab.edu.co

Resumen

El presente trabajo se centra en la caracterización química de los componentes del bagazo de caña, del residuo fibroso de la palma africana y de la yuca con materia prima potencial para la producción de etanol carburante por vía biotecnológica. Los residuos amiláceos y lignocelulósicos señalados fueron seleccionados de acuerdo con la disponibilidad y abundancia dentro de las empresas agroindustriales de la región analizadas.

En el proceso de la obtención de aceite de palma se generan 0.7 toneladas de residuo por tonelada de fruto de palma procesada, generando unas 370.000 toneladas por año de residuo fibroso potenciales para el tratamiento a alcohol carburante, igualmente por cada tonelada de azúcar que se obtiene de la caña se derivan 5 toneladas de bagazo, con un alto potencial para la conversión, vía química y microbiológica a etanol. En relación con la yuca se encontró un potencial de 100.000 toneladas de residuo amiláceo por año para conversión a alcohol carburante, de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis del contenido de almidón en la yuca que está del orden del 80%, se pueden obtener unos 240.000 metros cúbicos de etanol, resultando ser el residuo con mayor posibilidad de conversión a alcohol carburante.

Se encontró que los residuos fibrosos de la palma africana, en principio no son aptos para la producción de etanol, por



poseer un alto contenido de lignina, que es la que dificulta la fase de hidrólisis para la obtención de azúcares fermentables. Mientras que el bagazo de caña de azúcar por su composición química, buen porcentaje de celulosa, hemicelulosa y baja en lignina, resulta ser un precursor ideal para la obtención de hidrolizados de polisacáridos.

Palabras claves:

Bioetanol, etanol, residuo lignocelulósico y amiláceo, biocombustibles, almidón de yuca, fermentación etanólica, hidrólisis enzimática.

Introducción

El etanol carburante se conoce hoy en día como un combustible renovable por su procedencia agrícola y tiene un gran valor desde el punto de vista ambiental. El proceso de transformación parte de la elaboración de una biomasa, término que se define como toda la materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales procedentes de su transformación natural o artificial.

El etanol carburante disminuye la contaminación producida por los automóviles, especialmente los gases de efecto invernadero, responsables del calentamiento de la tierra. El proyecto, evitará la emisión en Colombia de seis millones de toneladas al año de Bióxido de Carbono o CO₂.

En términos generales, los alcoholes como carburantes son menos contaminantes, no sólo en las emisiones que surgen del vehículo, sino también en todo el ciclo, desde cuando son producidos hasta cuando son quemados.

El uso del etanol trae beneficios ecológicos, económicos y sociales, por lo tanto es importante desarrollar tecnologías para una producción que permita satisfacer la demanda a precios accesibles. Por todo lo anterior, es necesario tener herramientas y criterios que le permitan a nuestro país tomar las decisiones adecuadas y planear una estrategia

que asegure el desarrollo, la autonomía y el equilibrio con el medio ambiente.

El gobierno colombiano consciente de este aspecto, elaboró la Ley 693 de 2001 (septiembre 19) por la cual se dictan normas sobre el uso de alcoholes carburantes, se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo, y se dictan otras disposiciones. Dicha Ley reza así en su artículo primero: "A partir de la vigencia de la presente ley, las gasolinas que se utilicen en el país en los centros urbanos de más de 500.000 habitantes tendrán que contener componentes oxigenados tales como alcoholes carburantes, en la cantidad y calidad que establezca el Ministerio de Minas y Energía, de acuerdo con la reglamentación sobre control de emisiones derivadas del uso de estos combustibles y los requerimientos de saneamiento ambiental que establezca el Ministerio del Medio Ambiente para cada región del país".

El etanol se puede producir a partir de 3 principales tipos de materias primas: Materias ricas en sacarosa como la caña de azúcar, la melaza y el sorgo dulce. Materias ricas en almidón como los cereales (maíz, trigo y cebada, entre otros) y los tubérculos como la yuca, camote, papa, malanga, etc. Materias ricas en celulosa como la madera y los residuos agrícolas como en nuestro caso bagazo de caña y residuo fibroso de la palma africana.

Desde el punto de vista técnico, la caña de azúcar es una de las materias primas más atractivas. Lo anterior se debe a que los azúcares que contiene se encuentran en una forma simple de carbohidratos fermentables. No obstante, avances en pretratamiento químico de desechos celulósicos, lignocelulósicos y amiláceos para la conversión biológica de las moléculas resultantes (tales como azúcares) son el objetivo principal para reducción de costos.

En Colombia existen amplias extensiones de tierra que en la actualidad se usan para el cultivo de caña de azúcar, pero que se destina a la fabricación de panela, producto de bajo valor agregado y poca rentabilidad para la población

campesina que deriva su sustento de este producto. Con la producción de etanol carburante se agregaría valor al producto final mejorando los ingresos de los trabajadores involucrados en la cadena.

En nuestro país se proyecta toda una industria alrededor del jugo azucarado de la caña de azúcar que busca construir doce plantas industriales o biorefinerías de alta tecnología en el país, que producirían 2,5 millones de litros por día de etanol anhidro, para mezclarlo al nivel del 10 por ciento en volumen con las gasolinas. De esta forma se requerirían cerca de 150.000 hectáreas de caña de azúcar, lo que significa la generación de alrededor de 170.000 empleos permanentes entre directos e indirectos, principalmente de campesinos. Las zonas agroindustriales estarían ubicadas en la Costa Norte, Antioquia, Santanderes, Boyacá, Cundinamarca, Valle del Cauca, Eje Cafetero, Hulla, Nariño, Llanos Orientales y Putumayo, y en general el Piedemonte de nuestras cordilleras.

Alrededor de las zonas de cultivo de caña de azúcar, se construirán las biorrefinerías donde se produciría el alcohol antes de transportarlo a las plantas de abasto cercanas a los principales centros de consumo o ciudades capitales y menores. Allí se mezclará el etanol con la gasolina antes de llevarla en carrotaques a las estaciones de servicio.

El empleo del etanol es una alternativa que permitirá disminuir y sustituir la utilización de derivados del petróleo como energéticos.

De acuerdo con lo anterior, la atención del gobierno fundamentalmente está centrada en la producción de etanol a partir de azúcares simples, nuestra investigación busca generar información acerca de la utilización de azúcares complejos, para la bioproducción de etanol, como lo son los almidones, las celulosas, hemicelulosas y ligninas de residuos agroindustriales existentes en la región.

La industrialización de la producción de etanol a partir de residuos amiláceos y lignocelulósicos traerá como consecuen-

cia la apertura de nuevas fuentes de trabajo, tanto en las instalaciones del proceso como en las zonas de cultivo. Además en la producción de etanol a partir de residuos amiláceos, se pueden obtener productos intermedios elaborados durante el bioproceso tales como proteína unicelular, glucosa libre y preparados de actividad enzimática comprobada, los cuales constituyen compuestos de alto valor añadido, también *los residuos no hidrolizables* (de yuca o de sustancias amiláceas), que pueden utilizarse como alimentos balanceados y materia prima para la producción de biogás.

Para tal fin se han planteado los siguientes objetivos, separados en dos fases:

FASE 1.

-Seleccionar e identificar las principales industrias agroindustriales y alimenticias que generan residuos amiláceos y lignocelulósicos existentes en la región.

-Caracterizar fisicoquímicamente los residuos amiláceos y lignocelulósicos de tres empresas agroindustriales previamente seleccionadas, mediante técnicas analíticas de aislamiento y cuantificación de la celulosa, hemicelulosa, lignina y demás extractivos como lo son; el contenido de proteína, grasa, carbohidratos solubles y el contenido total de sales presente.

FASE 2.

-Evaluar las diferentes técnicas de hidrólisis para convertir el almidón, la hemicelulosa y celulosas obtenidas hasta la forma de azúcares reductores fermentables.

-Diseñar, evaluar y poner en marcha un biorreactor para la fermentación anaeróbica de los azúcares a etanol.

METODOLOGÍA

Para la realización del primer objetivo se hizo un estudio detallado de las industrias agropecuarias y de alimentos que son fuentes potenciales de generación de residuos amiláceos y lignocelulósicos, acudiendo las fuentes bibliográficas nacionales e internacionales bajo los criterios de precio, origen y disponibilidad, abundancia, producción, toxicidad, potencial de conversión y pretratamiento de los potenciales residuos.

También se realizaron visitas de campo a las industrias agropecuarias y de alimentos para recoger datos directamente de la fuente.

Se seleccionaron y visitaron las siguientes industrias representativas de la región:

MOLINO DE ORIENTE S.A.

SALSAMENTARIA SANTANDER LTDA. SALSAN LIMITADA

GAVASSA & CIA. LTDA.

TOSTADORA DE CAFE BON-AMI LIMITADA

INDAGRO LIMITADA

ICOPAN LIMITADA

AVIMOL S.A.

MOLINOS SAN MIGUEL LTDA.

CARNES Y SALSAMENTARIA BAVIERA LTDA.

INDUSTRIA HARINERA DE SANTANDER LIMITADA

COMERCIALIZADORA INTERNACIONAL SANTANDEREANA DE ACEITES S.A.

NEO FRUT LTDA

PIPE'S PRODUCTOS ALIMENTICIOS LIMITADA

PROCESAMIENTO, TRILLA Y COMERCIALIZACION DE ARROZ Y SUBPRODUCTOS DEL ARROZ.

Las industrias señaladas **no** cumplieron con el perfil en cuanto a calidad, abundancia y disponibilidad de residuos amiláceos y lignocelulósicos..

Se procedió por tanto a buscar aquellas industrias que por sus antecedentes se sabía que son potenciales generadoras de residuos amiláceos y/o lignocelulósicos: Las industrias agroindustriales fueron: La Industria de la Palma Africana, la Industria de la Caña de Azúcar y la Industria de La Yuca.

Se realizó una visita y toma de muestras de residuos a Palmas Oleaginosas Bucarelia en Puerto Wilches, donde se tomaron muestras de residuo fibroso de la palma africana.

Se obtuvieron muestras de Residuos de Bagazo Caña en la región de la Hoya del Río Suárez, específicamente de Oiba.

Se recolectaron muestras de Yuca, de variedad típica de la Plaza de mercado Central para un análisis bromatológico.

Se realizó un estudio del Estado del Arte de la Palma Africana, La Caña de Azúcar y de la Yuca en cuanto a su origen, taxonomía, condiciones de cultivo, composición química, producción, comercialización y principales usos industriales.

La caracterización fisicoquímica de los diferentes residuos amiláceos y lignocelulósicos se realizaron teniendo en cuenta los componentes fundamentales de un alimento y/o forraje o tejido vegetal, como se muestra en la figura siguiente:

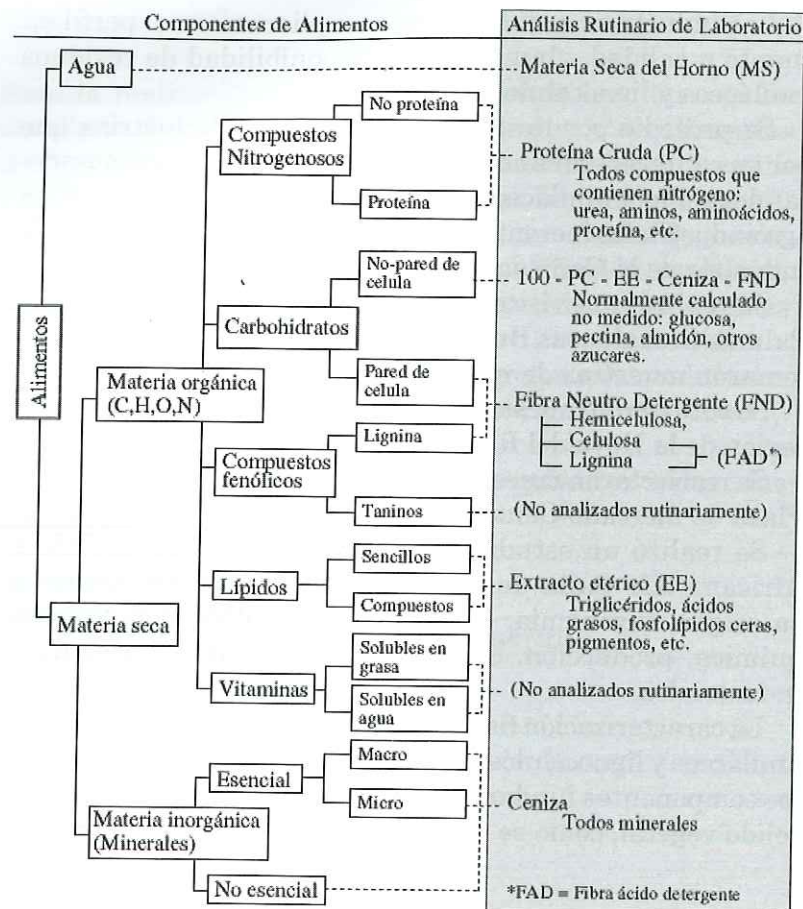


FIGURA 1. Componentes de los alimentos y del material vegetal objeto de estudio.

Determinación de nitrógeno y proteína La determinación de nitrógeno total se realizará por el método de Kjeldahl, el contenido de proteína resulta de multiplicar el nitrógeno total por 6.25 (Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980.)

Determinación de grasas. La determinación de grasas se realizará por el Método de 7056 de la Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980.

Determinación de carbohidratos. La determinación de carbohidratos se realizará por el Método sugerido por Whistler Roy L. en Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. IV. Los carbohidratos resultan de restarle al total los porcentajes de fibra, humedad, cenizas, grasas y proteínas.

Determinación de Fibra Detergente Neutra. El análisis de Fibra Detergente Neutra (FDN) abarca a todos los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa, y lignina). La determinación de FDN se realizó por el Método de 7061 de la Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980.

Determinación de la Fibra Detergente Ácida (FDA): Corresponde a la pared celular del tejido vegetal, menos la hemicelulosa, la FDA representa el porcentaje de celulosa más la lignina. La determinación de FDA se realizó por el Método de 7069 de la Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980.

Determinación de la Lignina detergente ácida (LDA): Compuesto indigestible que reduce la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa. La LDA, representa el porcentaje de lignina en el tejido vegetal. La determinación de LDA se realizó por el Método de 7072 de la Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980. La hemicelulosa se calcula por diferencia considerando los valores de la FDN, FDA y la LDA.

Determinación del Extracto No Nitrogenado ENN: Se encuentran en el contenido celular y se pueden dividir en: a) azúcares simples y sus conjugados activos para el meta-

bolismo intermedio (glucosa, fructosanos) y b) sustancias de reservas (almidón, sacarosa). Su determinación Normalmente se saca por diferencia según la siguiente ecuación: $ENN = 100 - (FDN + Proteína + Grasa + Cenizas)$.

Determinación Humedad y Cenizas La determinación de humedad y cenizas se realizará por los Métodos 7003 y 7009 de la Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1980.

Determinación de la relación NPK. (Nitrógeno, Fósforo y Potasio) Según Metodología recomendada por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Métodos Analíticos del laboratorio de Suelos y Standard Methods 4500-N, 4500-P, 3500K.

Aislamiento del almidón. La extracción del almidón de la yuca se realizó de acuerdo a los siguientes pasos: (Wistler, R. 64).

-Lavado: Con el fin de retirar tierra y otras impurezas .

- Rallado: Se hace con el fin de desintegrar las células para dejar libre el almidón.

- Tamizado: Que consiste en colar la pulpa que ya ha sido rallada, lavándola con agua abundante, para separar el almidón de la fibra 10 mL H₂O/g, el tamiz corresponde a un tamaño de grano de 0.1 mm.

El almidón es arrastrado por el agua a través del tamiz y la fibra permanece en éste, con la cual se logra separarlo.

-Sedimentado: Consiste en decantar la lechada que sale del tamiz para separar los gránulos del agua. También sirve para retirar de los gránulos de almidón partículas de fibra y otros materiales indeseables, los cuales se separan por decantación.

-Secado: Tanto el almidón como la fibra se secan en una estufa a 40°C de temperatura y durante 24 horas.

Determinación de Amilosa y Amilopectina La determinación de amilosa y amilopectina se realiza por el Método sugerido por Lilo B y Gilbert M. en Methods in Carbohydrate Chemistry. La amilosa es separada del almidón mediante

fraccionamiento con 1-butanol donde se precipita por centrifugación a 3000 rpm por 15min. La fracción de amilopectina gel es lavada y centrifugada varias veces con NaCl al 1%.

Resultados

Tabla 1. Análisis bromatológico básico del bagazo de caña, como potencial para la producción de etanol

*Los porcentajes están expresados en base seca.

PARÁMETRO	Humedad Total %	Proteína %	Grasa %	Fibra %	Ceniza %	E.N.N. %	Valor Calórico Kcal/100g
MUESTRA N°1	70.3	10.5	4.4	48.0	5.0	32.1	210.0
MUESTRA N°2	63.2	9.6	2.2	46.9	4.9	36.4	203.8
MUESTRA N°3	65.3	8.5	3.2	50.2	5.4	32.7	193.6
PROMEDIO	66.2	9.5	3.2	48.4	5.1	35.2	202.5

Tabla 2. Análisis bromatológico básico del residuo fibroso de la palma africana, como potencial para la producción de etanol

PARÁMETRO	Humedad Total %	Proteína %	Grasa %	Fibra %	Ceniza %	E.N.N. %	Valor Calórico Kcal/ 100g
MUESTRA DE RESIDUO FIBROSO							
MUESTRA N°1	6.2	14.5	25.0	45.0	4.0	11.5	329.0
MUESTRA N°2	5.4	10.5	18.0	52.0	7.1	12.4	253.6
MUESTRA N°3	5.7	9.8	16.4	50.4	7.8	15.6	249.2
PROMEDIO	5.8	11.6	19.8	49.1	6.3	13.2	277.3

Tabla 3. Análisis bromatológico básico de la yuca raiz sin cáscara, como potencial para la producción de etanol

PARÁMETRO	Humedad Total %	Proteína %	Grasa %	Fibra %	Ceniza %	E.N.N. %	Valor Calórico Kcal/ 100g
MUESTRA DE YUCA RAIZ SIN CASCARA							
MUESTRA N°1	64.8	0.80	0.22	0.92	0.91	87.5	355.2
MUESTRA N°2	63.7	0.72	0.18	0.71	0.85	86.8	351.7
MUESTRA N°3	68.2	0.92	0.27	1.23	0.94	85.4	347.7
PROMEDIO	65.5	0.81	0.22	0.95	0.90	86.5	351.5

Tabla 4. Promedios del análisis bromatológico básico del bagazo de caña, de la yuca raíz sin cáscara y del residuo fibroso de la palma africana como potenciales para la producción de etanol

PARÁMETRO	Humedad Total %	Proteína %	Grasa %	Fibra %	Ceniza %	E.N.N. %	Valor Calórico Kcal/ 100g
MUESTRA							
BAGAZO DE CAÑA	66.2	9.5	3.2	48.4	5.1	35.2	202.5
YUCA, RAÍZ SIN CÁSCARA	65.5	0.81	0.22	0.95	0.90	86.5	351.5
RESIDUO FIBROSO DE LA PALMA	5.8	11.6	19.8	49.1	6.3	13.2	277.3

Tabla 5. Análisis de almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina del bagazo de caña, de la yuca raíz sin cáscara y del residuo fibroso de la palma africana como potenciales para la producción de etanol

PARÁMETRO	Almidón %	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
MUESTRA				
BAGAZO DE CAÑA	2.3	38.5	34.4	5.0
YUCA, RAÍZ SIN CÁSCARA	84.0	2.8	0.80	0.12
RESIDUO FIBROSO DE LA PALMA	0.10	44.5	28.0	25.0

Análisis de resultados

El análisis bromatológico del bagazo de la caña de azúcar muestra porcentajes de fibra y carbohidratos solubles (ENN) importantes para nuestro propósito de producir etanol vía fermentación de los azúcares reductores obtenidos previa hidrólisis de los polisacáridos del bagazo, los altos contenidos de proteína y cenizas, en promedio 9.5 y 5.1 respectivamente, presuponen buena fuente de nitrógeno y sales, fundamentales en los procesos de transformación de los azúcares a etanol por vía microbiana.

El porcentaje promedio de carbohidratos solubles de las muestras de bagazo analizadas son significativamente altos, lo que lo hace aún más atractivo como precursor de etanol.

La fibra total del bagazo, que está distribuida en los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina, muestran va-

lores significativos para la celulosa y hemicelulosa y valores bajos en lignina, lo cual indica que la posibilidad de hidrólisis es alta, como es bien sabido cuando se tienen porcentajes altos de lignina las hidrólisis son muy difíciles.

En relación con el residuo fibroso de la palma africana, se encontraron altos contenidos de proteína grasa y fibra, lo que en principio es bueno como precursor de hidrolizados de carbohidratos, pero al discriminar la fibra, se encontró con porcentajes muy altos de lignina lo que indica un alto grado de dificultad hidrolítica, la lignina eclipsa o interfiere en la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa.

Los resultados del análisis de la yuca raíz sin cáscara, nos muestra alto contenido de carbohidratos, diferentes a los carbohidratos de la fibra, representados por la ENN (Extracto No Nitrogenado = almidón, pectina y otros azúcares) que fue del orden del 86.5 en promedio, representado fundamentalmente por el porcentaje de almidón, para nuestros propósitos nos resulta significativamente importante, toda vez que, el ENN es de fácil fraccionamiento hidrolítico, generando así concentraciones altas de azúcares reductores totales con alto potencial de conversión a etanol por acción de las levaduras especializadas para tal efecto.

Conclusiones

-De acuerdo con el estudio preliminar, las empresas de la región, es decir, de Bucaramanga y su área metropolitana no poseen residuos amiláceos y/o lignocelulósicos abundantes y disponibles para efectos de someterlos a tratamiento para uso potencial en la producción de alcohol carburante.

-Las empresas agroindustriales del orden regional y nacional con residuos amiláceos y/o lignocelulósicos como posibles precursores de bioetanol son: La Industria de la Palma Africana, la Industria de la Caña de Azúcar y la Industria de La Yuca.

-Por cada tonelada de fruto de palma procesada para obtener aceite de palma crudo se generan 0.7 toneladas de residuos, si consideramos la producción del 2002, según Fedepalma, de 528.400 toneladas, estamos hablando de unas 370.000 toneladas de residuo fibroso potenciales para el tratamiento a alcohol carburante.

-Por cada tonelada de azúcar que se obtiene de la caña se derivan 5 toneladas de bagazo, si consideramos la estadísticas de Cenicaña de 2 millones de toneladas de azúcar producidas en el 2002, tenemos entonces alrededor de 10 millones de toneladas de bagazo, igualmente potenciales para la conversión, vía química y microbiológica a etanol.

-De acuerdo con el Ministerio de Agricultura, Colombia en el 2001 produjo 2 millones de toneladas de yuca, en 180.000 ha de cultivo, de las cuales se desperdician alrededor del 5%, lo que corresponde a 100.000 toneladas de yuca, con un valor potencial muy alto para producir etanol.

-De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis del contenido de almidón en la yuca que está del orden del 80%, se tienen entonces 80.000 toneladas de almidón que teóricamente se pueden obtener unos 240.000 metros cúbicos de etanol.

-El residuo fibroso de la palma africana, en principio no es apto para la producción de etanol, por poseer un alto contenido de lignina, que es la que dificulta la fase de hidrólisis para la obtención de azúcares fermentables.

-El bagazo de caña de azúcar por su composición química, buen porcentaje de celulosa, hemicelulosa y baja en lignina, resulta ser un precursor ideal para la obtención de hidrolizados de polisacáridos.

-Los resultados de la caracterización de la yuca muestran un alto contenido de almidón, que es de fácil hidrólisis, si la comparamos con la hidrólisis de la celulosa o la hemicelulosa, esto quiere decir, que en la yuca tenemos un potencial superior para la bioproducción de etanol.

Bibliografía

1. Abouzied. M. M., Reddy, A. C., Direct Fermentation of Potato Starch to Ethanol by Cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*., *Appl. Environ. Microbiol.* 52(5), 1055-1059 (1986).
2. Aibara, S., Yamashita H., Morita, Y., Molecular Shape and Packing in Crystals of Soybean Alpha-Amylase., *Agric. Biol. Chem.*, 48(6), 1575-1579 (1984).
3. Alexander, N. J., Genetic Manipulation of Yeast for Ethanol Production from Xylose. *Food technol.*, 40 p. 99-103, (1989).
4. AOAC. Oficial Methods of Analysis of the Association Oficial Analitica Chemist. De. Sidney William. 1984.
5. Ballesteros M., Martínez J. y Carrasco J. Obtención de Bioalcohol. *Ingeniería Química. Madrid España Febrero 1994.*
6. Ballesteros, R. *Revista Coyuntura Colombiana, Centro de Estudios Ganaderos y Agrícolas N°54 de Diciembre de 1995.*
7. Ballesteros, I.; Oliva, J.M.; Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 91-93, p. 237-252. 1998
8. Ballesteros, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, 2001, vol.161, p: 29-34.
9. Ballesteros, M. Biocombustibles para el transporte. *Tecnologías Energéticas e Impacto Ambiental. McGraw-Hill, 2001, p. 357-370.*
10. Banerjee, M., Debnath, S., Majumdar, S. K., Production of Alcohol from Starch by Direct Fermentation., *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 831-834 (1988).
11. Bucholz, S. E. y M. M. Dooley. Growth of *Zymomonas* on Lactose. *J. Ind. Microbiol.*, 4, pp. 19-27, (1992).
12. Buzás, Zs., Dallmann, K., Szajáni, B., Influence of pH on the Growth and Ethanol Production of Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells., *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 882-884 (1989).
13. Carrizales, V., Producción de Enzimas Extracelulares en Cultivo Semisólido. *Biotecnología de Enzimas, UNAM, 1983.*
14. Cohen, Georges. *Microorganismos y Biología Molecular. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1977*
15. Demain A, and Solomon N. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1986.*
16. El-Aassar, S. A., Omar, S. H., Gouda, M. K., Ismail, A. M., Abdel-Fattah, A. F., Purification of α -Amylase from *Bacillus lentus* cultures., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 312-314 (1992).
17. Escalante H. Humberto. Aislamiento y purificación de amilasa alfa y beta a partir de un extracto enzimático de *Manihot Sculenta*, Tesis de Grado, Ingeniería Química. UIS, 1987.
18. Fabre, F. A UV supersensitive mutant in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec. Gen. Genet.*, 110:134-143, 1981.
19. Farahnak, F. et al., Construction of Lactose Assimilating and High Ethanol Producing Yeast by Protoplast Fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 5, p. 362-367, (1992).
20. Fujii, M., Homma, T., Taniguchi, M., Synergism of alpha Amylase and Glucoamylase on Hydrolysis of Native Starch Granules., *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 910-915 (1988).
21. García G. Mariano, Quintero R. Rodolfo y López M. Agustín; *Biotecnología Alimentaria. Limusa Noriega Editores. Mexico, 1993.*
22. Godfrey, T. y Reichelt, J. *Industrial Enzymology, The Nature Press, 1983.*
23. Graber M., Combes D., Action Pattern of Alpha-Amylase from *Aspergillus oryzae* in Concentrated Media., *Biotechnol. Bioeng.* 36, 12-18 (1990).
24. Goulter, P. R., Potter, O. E., The Rate at Which Starch Becomes Suceptible to Hydrolysis by Enzymes., *Ind. Eng. Chem.*, 13(4), 324-327 (1984).
25. Grosz, R., Stephanopoulos, G., *Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by Saccharomyces cerevisiae. I: Mathematical Model of Cellular Energetics and Catabolism.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1030-1040 (1999).
26. Guerrero R. *Diagnóstico de la Fertilidad del Suelo. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Bogotá. 1980.*
27. Hao, L. CH., Fulmer, E. Y., Underkofler, I. A., Alcoholic Fermentation of Corn., *Industrial and Engineering Chemistry*, 35(7), 814-818 (1993).-
28. Hobley, T. J., Pamment, N. B., Differences in Response of *Zymomonas mobilis* and *Saccaromyces cerevisiae* to Change in Extracellular Ethanol Concentration., *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 155-158 (1994).
29. Hong, J. and Lee, C. K. Unsteady-state operation of continuous fermentor for enhancement of cell mass production. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 187 (1987)

30. Hyun, H. H., Zeikus, J. G., *Simultaneous and Enhanced Production of Thermostable Amylases and Ethanol from Starcha by Colcultures of Clostridium thermosulfurogenes and Clostridium thermohydrosulfuricum.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5), 1174-1181 (1985).
31. Kato, Y., Mikuni, K., Hara, K., Hashimoto, H., Nakajima, T., Kobayashi, S., Kainuma, K., *The Structure of High Molecular Weight Dextrins Obtained from Potato Starch by Treatment with Bacillus macerans Enzyme.*, *J. Ferment. Technol.*, 66 (2), 159-166 (1990).
32. Kim Hock; Lynda Ferguson and Carlton Constance. *Conversion of Cassava Starch to Biomass, Carbohydrates, and Acids by Aspergillus niger.* *J. Appl. Biochem.* 80-90 (1984).
33. Manzanares, P. *Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica: una opción cercana.* *Infopower*, 2000, vol. 31, p: 99-109. 1997
34. Negro, M.J.; Ballesteros, M. *Effect of particle size on steam explosion pretreatment of herbaceous agricultural wastes.* In *1st Conference on Biomass for Energy and Industry.* James & James (Science Publishers), 2001. p. 414-417. 1996
35. Nielson, J. *Rapid determination of Starch: An index to maturity in starchy vegetables,* *Industrial & Engineering Chemistry (Analytical Edition)* 15 (3), 1963.
36. Prentis, S. *Biotecnología,* Biblioteca Científica Salvat, Salvat Editores, (1986).
37. Quintero R. Rodolfo, *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones.* Ed. Alambra. Mexico, 1981.
38. *Standard Methods for the Examination of Water, Wastewater and Soil.* American Public Health Association. 18Th Edition 1992. Washington DC.
39. Whistler Roy L., Bemiller James N. "STARCH": *Chemistry and Technology.* Academic Press. 1984
<http://www.baff.nu/start.cfm>
<http://www.bcentral.com/resources/news.asp?LID=33028>
<http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2002/020415.es.htm>
<http://www.sagarpa.gob.mx/Forma/documentos/ingenio03.htm>
<http://www2.safagava.edu/webciencia/COCH3.html>
http://www.mct.gov.br/clima/espan/comunic_old/bagaco02.htm
<http://cipres.cec.uchile.cl/~mderout/Taller2.html>

Efecto doppler de una fuente sonora con movimiento armónico simple

Ligia Beleño Montagut, Ing. Luis A. Prada
Martínez, Jáder E. Guerrero Bermúdez,