

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA

BIOINGENIERÍA



**“APROVECHAMIENTO DE LAS VAINAS DE MEZQUITE PARA LA
PRODUCCIÓN DE ALCOHOL, EMPLEANDO HONGOS EN LA HIDRÓLISIS DE
COMPUESTOS LIGNINOCELULÓSICOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOINGENIERO PRESENTA:

ENRIQUE CAMPOS GRAJEDA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO AMÍLCAR SOLÍS DOMÍNGUEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ASENETH HERRERA MARTÍNEZ

MEXICALI, B.C., A 25 DE MAYO DE 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi padre **Enrique Campos Campos** de quien estoy orgulloso y que desde arriba ha estado cuidándome tanto como a toda mi familia, y que en todo momento ha permanecido en nuestras mentes y permanecerá durante el resto del tiempo.

A mi madre **Celia Grajeda Rosales** por habernos sacado adelante a **Mis Hermanos** y a mí, por haberme criado, educado y ser un claro ejemplo de que siempre se puede lograr lo que se quiere, por hacerme compañía siempre y darme ánimos, por darme consejos valiosos, compartir su alegría y por su apoyo incondicional.

A mis tíos **Víctor Manuel Campos Campos** y **María Dolores Martínez Espinoza**, más que mis tíos son mis segundos padres, quienes me brindaron hogar, apoyo moral y económico no solo durante mi trayectoria profesional si no en todo momento de mi vida, y por hacer posible la terminación de mis estudios impulsándome siempre hacia adelante.

Al **Dr. Fernando A. Solís Domínguez** y a la **Dra. Aseneth Herrera Martínez**, ambos por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado compartiéndome sus conocimientos, por haberme permitido realizar este proyecto mostrándome el camino de la investigación, y por apoyarme y asesorarme con paciencia cada vez que lo necesité.

A **Mis Amigos Luz, Lupita, Ana, José, Alejandra, Najla, Manuel, Marla** del Laboratorio de Investigación de Biotecnología UABC, por aliviar con alegría aquellos momentos de estrés y preocupación, por su compañía durante el desarrollo de este proyecto y por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar.

A **José Rodrigo Rosales León** por su apoyo con la determinación de celulasas en los hongos utilizados en este proyecto.

A la **Dra. M. Socorro Romero Hernández** y a la **Ing. Luz Estela Salazar Escalante** por el apoyo con la determinación de nitrógeno y proteínas totales en el Instituto de Ingeniería de la UABC.

A la **Facultad de Ingeniería**, al **Programa de Bioingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California** y a todos los **Docentes** que me brindaron sus conocimientos y me permitieron formarme como profesionista en sus instalaciones y por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

RESUMEN

El árbol de mezquite, *Prosopis sp.* se encuentra distribuido en gran parte de México, concentrándose mayormente en el norte del país. En la ciudad de Mexicali, y sobre todo en sus alrededores, el árbol de mezquite se encuentra disperso abarcando grandes áreas por lo que, pueden obtenerse fácilmente enormes cantidades de vainas para su aprovechamiento. En este proyecto se aprovecharon las vainas de *Prosopis sp.* recolectadas en las áreas verdes cercanas a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus Mexicali para su estudio en la producción de alcohol por su contenido de azúcares hidrolizables.

Fueron calculados los azúcares tanto reductores como totales presentes, además de la concentración de proteína y el contenido de fibra cruda en la harina de mezquite previamente al tratamiento térmico y posterior a éste. Se inocularon diferentes cepas fúngicas productoras de celulasas en la harina de mezquite para hidrolizar la biomasa lignocelulósica y obtener más azúcares presentes, obteniendo como concentración máxima 49.84 g/100 g en azúcares totales, que fueron fermentados por cepas bacterianas y por la levadura ampliamente estudiada *Saccharomyces cerevisiae*, que produjo una concentración máxima de 126.38 g/L de bioetanol. Finalmente se obtuvo que la flamabilidad del bioetanol producido resulta de mayor calidad comparado con la flamabilidad de la gasolina PEMEX Premium debido a que esta última genera humos visibles y residuos sólidos peligrosos.

El enfoque principal de este trabajo fue el aprovechamiento del residuo agrícola para su uso como fuente renovable para la producción de un combustible ecológico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Mezquite	3
2.2. Importancia de la producción de bioetanol.....	4
2.3. Síntesis de azúcares	6
2.4. Biomasa lignocelulósica	6
2.4.1. Descripción de los componentes lignocelulósicos	8
2.4.2. Almidón	9
2.5. Fermentación alcohólica.....	10
3. ANTECEDENTES	12
3.1. La levadura	12
3.1.1. Descubrimiento de la producción de alcohol.....	12
3.2. Primeros usos del mezquite	12
3.2.1. Experimentos con mezquite.....	13
3.3. Principales países productores de etanol.....	13
3.4. Materiales lignocelulósicos	14
3.5. Optimización de azúcares para la producción de etanol.....	15
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general.....	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. HIPÓTESIS	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1. Recolección de mezquite	18
7.2. Pretratamientos del mezquite.....	18
7.2.1. Pretratamiento físico.....	18
7.3. Determinación de azúcares reductores y totales	18
7.3.1. Estandarización de la solución de Fehling.....	18

7.3.2. Preparación de la solución clarificada	19
7.3.3. Determinación de azúcares reductores	20
7.3.4. Determinación de azúcares totales.....	20
7.4. Determinación de fibra cruda y cenizas.....	21
7.5. Determinación de proteína total.....	23
7.6. Reactivación de microorganismos	25
7.7. Pruebas bioquímicas	25
7.7.1. Agar hierro de Kligler.....	25
7.7.2. Caldo Base Rojo de Fenol	25
7.8. Producción de alcohol con levadura	26
7.8.1. Tratamiento del mezquite	26
7.8.2. Lavado celular	26
7.8.3. Inóculo de células	27
7.9. Escalamiento del proceso	27
7.10. Prueba de producción de alcohol con bacterias	28
7.11. Determinación de la enzima celulasa en hongos, para la hidrólisis enzimática del mezquite.....	28
7.12. Hidrólisis enzimática	28
7.12.1. Producción de alcohol después de la hidrólisis enzimática.....	29
7.13. Obtención del alcohol	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
8.1. Caracterización del mezquite.....	31
8.1.1. Contenido de azúcares reductores y totales.....	31
8.1.2. Contenido de fibra cruda y cenizas.....	32
8.1.3. Contenido de proteína total.....	33
8.2. Hidrólisis de la muestra	33
8.3. Morfología de las cepas bacterianas y fúngicas estudiadas	34
8.4. Pruebas bioquímicas	39
8.5. Producción de celulasas en los hongos utilizados para la hidrólisis del mezquite ...	40
8.6. Rendimiento en la producción de alcohol	41

8.6.1. Producción de alcohol por fermentación con bacterias	41
8.6.2. Producción de alcohol por fermentación con levadura.....	41
8.6.3. Producción de alcohol por fermentación con levadura en la muestra hidrolizada con hongo	41
8.7. Alcohol versus gasolina.....	43
9. CONCLUSIONES	45
10.BIBLIOGRAFÍA	46
11.ANEXOS	53
11.1.Medio YPD.....	53
11.2.Agar CMC	53
11.3.Licor de Fehling.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de la gasolina y del bioetanol.....	5
Tabla 2. Ejemplos de tratamientos a materiales lignocelulósicos	7
Tabla 3. Descripción morfológica de los aislados bacterianos.....	35
Tabla 4. Descripción morfológica de los aislados fúngicos	38
Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas	39
Tabla 6. Concentraciones de bioetanol obtenidas por fermentación de biomاسas	42
Tabla 7. Comparación de la combustión entre alcohol y gasolina	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Prosopis juliflora</i>	3
Figura 2. Vaina madura de <i>Prosopis juliflora</i>	4
Figura 3. Representación del complejo lignocelulósico.....	9
Figura 4. Proceso generalizado de la glucólisis.....	10
Figura 5. Fórmulas desarrolladas de la glucosa y fructosa.....	11
Figura 6. Cambio de coloración de la solución Fehling en ebullición, por titulación con solución diluida de glucosa.....	19
Figura 7. Representación esquemática para el procedimiento de análisis de fibra cruda y cenizas	22
Figura 8. Muestra de mezquite carbonizada a 130°C y cambio de coloración con aumento gradual de temperatura	23
Figura 9. Cambio de coloración del ácido bórico por recepción del destilado en matraz receptor.	24
Figura 10. Cambio de coloración en la solución destilada por titulación con HCl 0.1N	24
Figura 11. Biorreactor de tipo batch estático.....	27
Figura 12. Alcohol destilado de la fermentación de la mezcla de mezquite con <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 13. Contenido de azúcares en la harina de mezquite	31
Figura 14. Contenido de fibra cruda y cenizas en la harina de mezquite	32
Figura 15. Contenido de nitrógeno y proteína total en la harina de mezquite.....	33
Figura 16. Aumento de azúcares totales presentes en la harina de mezquite por hidrólisis enzimática con hongos productores de celulasas	34
Figura 17. Hongo creciendo sobre carboximetil celulosa. El halo de decoloración junto al hongo demuestra la presencia de celulasas capaces de degradar a la celulosa.....	40
Figura 18. Producción de alcohol con <i>S. cerevisiae</i> en mezcla de mezquite tratada e hidrolizada con hongo H2.....	42
Figura 19. Combustión de bioetanol de mezquite (izquierda), alcohol comercial (centro) y gasolina (derecha).....	43
Figura 20. Residuos de la combustión del bioetanol (derecha) y de la gasolina (izquierda)44	

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fuentes alternas de energía renovable ha surgido como una necesidad a causa de la acelerada disminución de reservas mundiales de petróleo por la generación de combustibles en gran cantidad, los precios internacionales del petróleo, la tensa situación política en las más grandes áreas de producción de petróleo, la preocupación por el alto nivel de contaminación y calentamiento global. Desarrollando fuentes alternas de energía, como es el caso del etanol, se espera que cada vez exista menos contaminación, (Medina et al., 2011; Castaño et al. 2011).

La utilización de biomasa proveniente de los residuos o desechos agrícolas, es una posible opción para desarrollar fuentes alternas de energía. Debido a que la biomasa posee una excelente versatilidad y teniendo la ventaja principal de ser renovable, una gran variedad de especies de plantas pueden encargarse de proporcionar una inagotable cantidad de materia prima para el desarrollo de estas fuentes de energía. Con las constantes innovaciones tecnológicas, se han desarrollado nuevas metodologías con las que se podrán producir combustibles renovables (Utrilla, 2004).

El etanol es un combustible que puede producirse por vía sintética mediante la hidratación catalítica del etileno (Chaves, 2006), o también a partir de una gran variedad de plantas, y debido a la utilización de biomasa rica en azúcares para la fermentación, a este etanol se le conoce como bioetanol. La variación de su calidad dependerá del producto agrícola utilizado y del rendimiento entre el combustible consumido y el generado en dicho proceso (Monbiot, 2008).

Entre las ventajas más destacables de usar bioetanol como fuente de combustible renovable se encuentran el que puede ser producido y almacenado fácilmente, es biodegradable, se reducen las emisiones de los gases invernaderos en un 40 – 80% comparado con los emitidos por los carburantes fósiles, contribuyendo así a la mejora de la calidad del aire en zonas urbanas. Además, no es cancerígeno, no contamina el agua, y en mezcla con gasolina aumenta el octanaje del combustible y promueve una mejor combustión. Por consecuencia se puede decir que el bioetanol es amigable con el ambiente si se compara con el resto de los carburantes (Guerra et al., 2008), y como combustible para motor es mejor por

tener un octanaje superior al de la gasolina y una presión de vapor más baja, lo cual significa una menor flamabilidad. Esto reduce el número y gravedad de incendios en los vehículos (Moreira y Goldemberg, 1999).

En México los éteres de terbutilo son muy utilizados como aditivos en mezclas con la gasolina, en específico MTBE (metil terbutil éter), pero el problema de utilizar este tipo de sustancias es que producen compuestos recalcitrantes imposibles de degradar química o biológicamente, que con el tiempo se acumulan en los mantos freáticos y se vuelven cancerígenos en concentraciones de partes por millón. Aquí es donde el bioetanol toma importancia al ser introducido como sustituto de estos aditivos (Utrilla, 2004).

Este tema aún se encuentra sujeto a una fuerte polémica porque algunos lo califican como un recurso energético potencialmente sostenible que ofrece ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición a los combustibles provenientes de los fósiles, mientras que para otros es el responsable de grandes deforestaciones y del aumento del precio de los alimentos, al suplantar selvas y terrenos agrícolas para su producción, dudando además de su rentabilidad energética (Monbiot, 2008).

En nuestro país, la necesidad de realizar cambios en el sector energético ha ido aumentando de manera preocupante debido a la mala implementación de las reformas y reglamentos afines por parte del gobierno, aquí es donde destaca la importancia de ir en la búsqueda de soluciones alternativas que permitan el desarrollo de sistemas eficientes relacionados a la producción y consumo de energía, incluso implementar proyectos para nuevas fuentes de energía y no limitarse únicamente al cambio de políticas y reglamentos de explotación de las fuentes de energía no renovables que aún quedan (Vázquez y Dacosta, 2007).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mezquite

El mezquite de nombre científico *Prosopis sp* es una planta tropical perenne (Figura 1) que se desarrolla mayormente en los climas cálidos y regiones áridas y semi-áridas, es nativo de América Central y América del Sur pero se ha extendido hasta América del Norte. Se considera materia prima viable para procesos fermentativos debido a su bajo costo y su producción de frutos llamados vainas, que en su etapa madura (Figura 2) presentan un alto contenido de azúcares hidrolizables que generan muchos compuestos incluyendo el etanol (da Silva et al., 2011).

La producción de vainas por árbol puede variar desde unos 15 kg hasta 20 kg dependiendo tanto de las condiciones del lugar donde se desarrolle el arbusto como la disponibilidad de humedad, además del sistema de cultivo y de la especie (INECC, 2007).

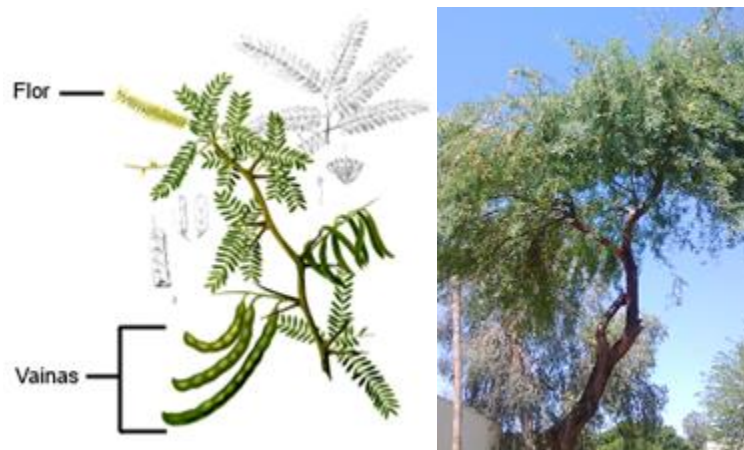


Figura 1. *Prosopis juliflora* (Adaptado de Blanco, 1883).

Debido a su amplio rango ecológico, a pesar de soportar sequías y presentar preferencia por los climas cálidos, puede desarrollarse en lugares con temperaturas entre 20 a 29 °C, con precipitaciones que oscilan entre los 900 y 1200 mm anuales, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2200 m, tienen preferencia por las llanuras y los bajíos, mayormente se desarrollan sobre suelos profundos (Rodríguez et al., 2014).

El género *Prosopis* posee 44 especies que pertenecen a la familia de las leguminosas que crecen en forma de árboles o arbustos espinosos en zonas con suelos áridos, resisten sequías y son altamente resistentes a la salinidad por sus grandes longitudes radiculares que

profundizan en el suelo (Tudge, 2006). Sus frutos son legumbres que varían de tamaño, forma, coloración y contenido de compuestos dependiendo de la especie (Román, 2016).



Figura 2. Vaina madura de *Prosopis juliflora*.

Entre otros usos del mezquite están el campo medicinal en donde es usado para combatir la disentería, como problemas de colitis o afecciones en el intestino y enfermedades en los ojos; su madera es muy utilizada para construcción en zonas rurales por poseer una alta dureza y durabilidad. En el área artesanal es muy utilizada para construir muebles para vivienda como closets, cajones, estantes, mesas y sillas (INECC, 2007). Destaca por sus propiedades ecológicas ya que tiene una gran capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico y por consecuencia mejora la fertilidad del suelo además de controlar la erosión y proporciona alimento y refugio a la fauna silvestre (Román, 2016).

Estas características le dan al mezquite una gran importancia para ser introducido como cultivo domesticado con las propiedades de disminuir la erosión de los suelos en las regiones áridas y semi-áridas así como la desertificación. Actualmente en México las especies *P. juliflora*, *P. glandulosa*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipina*, *P. palmeri* y *P. laevigata* se encuentran cubriendo una superficie total de aproximadamente el 12.7% del país y mayormente posicionados en la zona norte (Román, 2016).

2.2. Importancia de la producción de bioetanol

En el siglo XVII se introdujo en la región noreste de Brasil la caña de azúcar, alcanzando una producción de 273 millones de toneladas en el año 1996. Se produjeron 13.5 millones de toneladas de azúcar y 13.9 millones de litros de etanol, el cual, la mayor parte de este es usado de dos maneras, como oxigenante y a la vez potenciador del octanaje de la gasolina (mezcla de 22% de alcohol y 0.4% de agua) que tiene efectos positivos en el rendimiento del

motor y en las emisiones; y en motores de etanol puro en forma de etanol hidratado (Moreira y Goldemberg, 1999). Es importante mencionar que el octanaje es el valor de la capacidad antidetonante que poseen los combustibles con la finalidad de reducir las probabilidades de explosión en motores de combustión interna, es por eso que este juega un papel importante en la calidad del combustible (Barroso, 2013).

El etanol desempeña un trabajo excelente como combustible de motor ya sea en mezcla o puro debido a que tiene un número de octano que excede al de la gasolina y una presión de vapor mucho más baja que produce una menor emisión de evaporación proponiendo una notable reducción en el índice de incendios y explosiones en automóviles, junto a esto, la reducción de las emisiones de gases contaminantes producidos por la combustión de la gasolina. Además su proceso de producción implica también un notable decremento en la generación de contaminantes en comparación con el combustible obtenido a partir de fósiles (Moreira y Goldemberg, 1999). En la tabla 1 se puede observar una comparación entre las principales características de la gasolina típica y el etanol, demostrando que este último tiene más ventajas sobre aquella.

Tabla 1. *Propiedades de la gasolina y del bioetanol* (Horta et al., 2008).

Parámetro	Unidad	Gasolina	Etanol
Poder calorífico inferior	kJ/kg	43.500	28.225
	kJ/litro	32.180	22.350
Densidad	kg/litro	0.72 – 0.78	0.792
Octanaje (<i>Research Octane Number</i>)	–	90 – 100	102 – 130
Octanaje (<i>Motor Octane Number</i>)	–	80 – 92	89 – 96
Calor latente de vaporización	kJ/kg	330 – 400	842 – 930
Relación aire/combustible estequiométrica		14.5	9.0
Presión de vapor	kPa	40 – 65	15 – 17
Temperatura de ignición	°C	220	420
Solubilidad en agua	% en volumen	~ 0	100

Antes de que comenzara el Programa Brasileño de Alcohol, cuando la gasolina era el único combustible en uso, las emisiones de monóxido de carbono eran más altas de 50 g/km conducido y habían sido reducidas hasta menos de 5.8 g/km en 1995. Las concentraciones de plomo en el ambiente de la Región Metropolitana de Sao Paulo cayeron desde 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1978, hasta menos de 0.10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1991, según la CETESB (la Compañía Medioambiental del estado de Sao Paulo) está muy por debajo del estándar de calidad del aire de 1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Goldemberg, 2008).

El uso de etanol puro en motores de combustión tiene un inconveniente, el cual es un incremento en las emisiones de aldehído en comparación con la gasolina, y aunque esto aún se encuentra en discusión, las emisiones de acetaldehído producidas por la combustión del etanol siguen siendo menos agresivas para salud humana y el medio ambiente que el formaldehído producido por la gasolina (Goldemberg, 2008).

2.3. Síntesis de azúcares

El azúcar es un carbohidrato natural que puede ser encontrado en frutas y vegetales. Todas las plantas verdes generan azúcares en forma de celulosa mediante la fotosíntesis. Las plantas tienen la capacidad de absorber el CO_2 atmosférico, el cual es oxidado con ayuda de agua y nutrientes obtenidos por las raíces, llevando a cabo una serie de reacciones que resultan en azúcares y la liberación de agua y oxígeno a la atmósfera como productos finales por acción de la luz solar, produciendo además almidón como reserva de energía (Mathews et al., 2002; Taiz y Zeiger, 2006).

2.4. Biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa es el más abundante y principal componente de la pared celular de árboles y plantas, la cual a su vez está conformada por tres componentes de naturaleza polisacárida: celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 3), que son producidos por la fotosíntesis (Cuervo et al., 2009). El porcentaje de constitución de cada uno de estos componentes variará dependiendo del tipo de planta o árbol. Los rangos para la madera generalmente son celulosa: 38 – 50%, hemicelulosa: 23 – 32% y lignina: 15 – 25% (Chávez y Domine, 2013).

A los materiales con alto contenido lignocelulósico se les considera como materia prima viable para la producción de etanol. Para poder obtener los azúcares a partir de estos materiales, es necesario realizar procesos previos de degradación de componentes. Primero se necesita realizar un pretratamiento para la reducción de tamaño de la muestra (tabla 2) y así favorecer la hidrólisis de los compuestos. Después continúa la hidrólisis de la muestra, en la cual se generan azúcares monoméricos derivados de la celulosa, hemicelulosa y, aunque no es un componente lignocelulósico, del almidón. Esta hidrólisis puede ser llevada a cabo por vías químicas que incluyen el uso de reactivos ácidos o alcalinos, o bien por vía enzimática (Medina et al., 2011), la cual resulta ventajosa comparada con la vía ácida o alcalina debido a su baja toxicidad, bajo costo y baja corrosión, además de no haber formación de subproductos inhibitorios durante la hidrólisis cuyas reacciones son consideradas amigables con el ambiente (Sarkar et al., 2012).

Tabla 2. Ejemplos de tratamientos a materiales lignocelulósicos (Medina et al., 2011).

Métodos	Procedimientos	Referencia
Pulverizado mecánico	Molienda	Sun y Cheng, 2002
Pirólisis	Temp > 300 °C	Yu y Zhang, 2003
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260 °C, P = 0.69-4.85 MPa por unos segundos o minutos y liberación de presión hasta presión atmosférica	Söderströmet al., 2003
Agua líquida caliente	Agua caliente a presión T = 170-230 °C, 1-46 min	Lynd et al., 2002
Explosión de fibra con amoníaco	1-2 Kg de amoníaco/kg de material seco 90 °C/30 min	Chundawat et al., 2007
Explosión con CO₂	4 kg de CO ₂ /kg de material P = 5.62 MPa	Sun y Cheng, 2002
Ozonólisis	Ozono a temperatura y presión ambiente	Sun y Cheng, 2002
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ 1-5% (T = 120-160 °C 1 MPa)	Rodríguez-Chong et al., 2004
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ 10-30%, ácido paracético 21-60%, (T = 170-190 °C)	Teixeira et al., 1999
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h/60 °C	Sun y Cheng, 2002
Organosolventes	Solventes orgánicos y su mezcla con 1% H ₂ SO ₄ y HCl	Lynd et al., 2002

2.4.1. Descripción de los componentes lignocelulósicos

La celulosa es un biopolímero de alto peso molecular formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces β -glucosídicos en el carbono 1 y el carbono 4 (Medina et al., 2011), y sumado a su larga estructura lineal con puentes de hidrógeno en los grupos hidroxilo, hace que sea insoluble en agua. Es una fibra vegetal cuyo aspecto ante el microscopio es muy parecido a un cabello, con grosores y longitudes dependientes del tipo del vegetal al que pertenezca. Estas fibras en conjunto, compactadas y enlazadas entre sí proporcionan la rigidez a los vegetales (Cruz, 2014). En las cadenas de celulosa se encuentran dos diferentes grupos terminales en sus extremos. En uno de estos está presente un grupo no reductor donde se encuentra una estructura de anillo cerrada, en el otro se encuentra un grupo reductor con una estructura alifática y un grupo carbonilo. La biosíntesis controlada de celulosa permite la disposición de largas cadenas lineales que pueden alinearse lado a lado creando fibras de gran resistencia mecánica y como consecuencia su resistencia a la tracción es comparable con el acero (Festucci-Buselli et al., 2007).

Por otra parte, la hemicelulosa es de bajo peso molecular y tiene cadenas laterales cortas que constan de diferentes azúcares que son polímeros fáciles de hidrolizar. Su estructura con carbohidratos complejos contiene polímeros como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y grupos acetilo. En la madera dura, el componente predominante de la hemicelulosa es el xilano, mientras que en la madera blanda el componente predominante es el glucomanano. La hemicelulosa funciona como conexión entre las fibras de celulosa y lignina proporcionando así una mayor rigidez al complejo lignocelulósico (Hendriks y Zeeman, 2008).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado que brinda rigidez, impermeabilidad, soporte estructural, protección a la celulosa y hemicelulosa (Oliva, 2003; Cuervo et al., 2009), resistencia ante ataques microbianos y estrés oxidativo. Está conformada por tres unidades diferentes de fenilpropano que se encuentran unidos por diferentes tipos de enlaces. Es visualmente inactiva e insoluble en agua; su degradación es muy complicada (Hendriks y Zeeman, 2008). No puede darse una definición precisa de la lignina dado que su naturaleza es estar relacionada con múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular porque la composición y estructura de la lignina

varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Chávez y Domine, 2013).

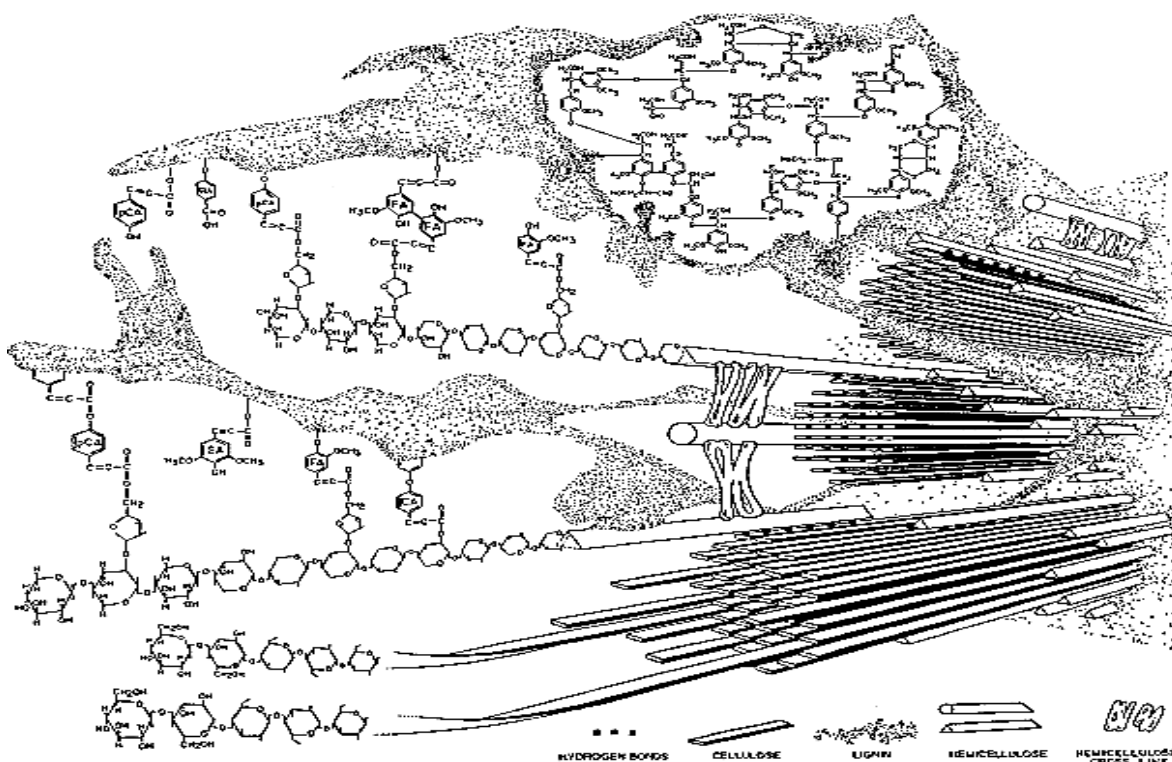


Figura 3. Representación del complejo lignocelulósico (Bidlack et al., 1992).

2.4.2. Almidón

El almidón no es un componente del material lignocelulósico, pero al igual que la celulosa, puede ser utilizado para la obtención de alcohol mediante su descomposición en azúcares monoméricos. Es un polisacárido muy abundante que se encuentra naturalmente como reserva en la mayoría de los vegetales y está compuesto por unidades monoméricas de glucosa, siendo muy diferente en cuanto a sus propiedades debido a la configuración de sus enlaces glucosídicos. Cuando el almidón se rompe se liberan las unidades de glucosa que pueden ser utilizadas por las células principalmente como fuente de carbono y reserva de energía (Madigan et al., 2009).

2.5. Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso biológico catabólico de oxidación incompleta en ausencia de oxígeno cuyo producto final es un compuesto orgánico (Delgado et al., 2014), y es llevada a cabo por microorganismos como levaduras, entre ellas la más conocida y utilizada en la industria alimenticia *Saccharomyces cerevisiae* y algunos tipos de bacterias (García, 2009), en el cual ocurre una glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof, que es el proceso en el que una molécula de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) se degrada transformándose en dos moléculas de ácido pirúvico, además de producir energía en forma de ATP y $NADH_2$ (Mathews et al., 2002) (véase Figura 4). Desde este punto divergen diferentes vías metabólicas que conducen a la síntesis de una variedad de productos finales (García, 2009).

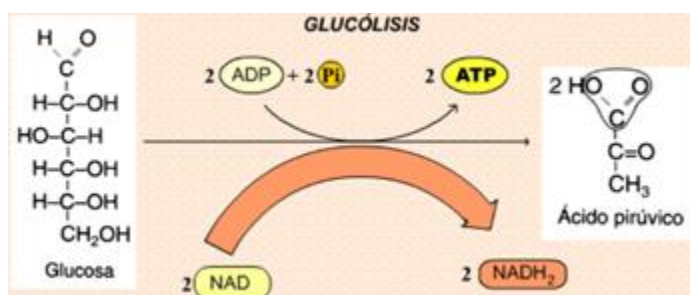
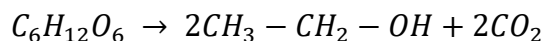


Figura 4. Proceso generalizado de la glucólisis (Raisman y Gonzalez, 2004).

En el caso de la fermentación alcohólica, partiendo del ácido pirúvico, el cual obtenido de la glucólisis es descarboxilado proporcionando acetaldehído, y este último se reduce a etanol gracias a la participación del $NADH_2$ (Delgado et al., 2014), y dióxido de carbono como productos finales por acción de las levaduras en ausencia de oxígeno. Dicha transformación se representa con la ecuación:



La transformación puede parecer sencilla estequiométricamente, pero el proceso molecular que se lleva a cabo resulta más complejo, debido a que las levaduras además de utilizar los azúcares para convertirlos en alcohol y CO_2 , junto con nutrientes adicionales, los utilizan para su propia reproducción (Vázquez y Dacosta, 2007).

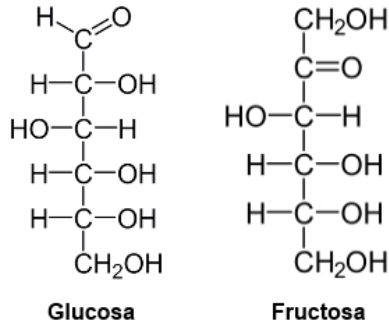


Figura 5. Fórmulas desarrolladas de la glucosa y fructosa.

Durante la fase estacionaria, en el proceso de fermentación los azúcares son mayormente consumidos al igual que la cantidad de nitrógeno disponible debido a que este es utilizado como nutriente esencial por las células para realizar el transporte de las moléculas de glucosa y fructosa (Figura 5) a través de la síntesis de proteínas, que en parte resulta ser la razón por la cual, la actividad metabólica de las células es reducida y como consecuencia comienza a ralentizarse el proceso de fermentación. Por otra parte, la constante producción de alcohol eleva el grado de toxicidad para las propias células, impidiendo gradualmente un óptimo proceso fermentativo (Dumont et al., 2008).

3. ANTECEDENTES

3.1. La levadura

Las bebidas alcohólicas fermentadas han sido producidas desde hace miles de años a.C. en la época prehistórica por el hombre sin darse cuenta del proceso fermentativo que estaban llevando a cabo, y está comprobado por las representaciones gráficas que se han encontrado talladas en piedra. Así como en la producción de vino, cerveza y pan se utilizaban de una manera empírica las levaduras (ArgenBio, 2007), los microorganismos unicelulares más importantes y ampliamente utilizados en la industria capaces de realizar fermentaciones transformando los azúcares en alcohol, los cuales, hasta la fecha han resultado muy útiles dado que aún se siguen utilizando para tales propósitos (Madigan et al., 1999).

3.1.1. Descubrimiento de la producción de alcohol

Al proceso en el que los azúcares son transformados en alcohol más dióxido de carbono mediante la acción de las levaduras en condiciones anaeróbicas se denomina “fermentación alcohólica” y fue descubierto por el padre de la microbiología Louis Pasteur en 1856, quien en 1857 demostró ante la Academia de Ciencias en Paris, que las levaduras eran las causantes de dicha fermentación (Dubos, 1950; Lois y Segal, 2010). En el mismo año, en Lille, Francia un productor de alcohol, M. Bigo, intentaba producir etanol a partir de la caña de azúcar quien por sus fallidos intentos solicitó ayuda a Pasteur, este accedió y se dio cuenta que había producido en algunos casos etanol y en otros ácido láctico en lugar de etanol, encontrando una gran cantidad de levaduras en el etanol y una gran cantidad de bacterias en el ácido láctico (ArgenBio, 2007; Lois y Segal, 2010).

3.2. Primeros usos del mezquite

El mezquite fue un recurso crucialmente valioso para los primeros pobladores de las regiones áridas y semiáridas, por los usos que cada pueblo le dio. Los pueblos cazadores y recolectores, casi todos ellos nómadas, utilizaron al mezquite principalmente como alimento, combustible, sombra, para la elaboración de juguetes y utensilios y como planta medicinal (Román 2016).

Entre los años 1800 y 1900, se le encontraron diferentes usos, tales como; alimentación del ganado doméstico, elaboración de carbón, flora para la explotación de abejas, extracción de gomas y material de vivienda (INECC, 2007).

La propagación exitosa de *Prosopis juliflora* en Brasil data de 1947 al introducir el mezquite para su aprovechamiento como especie domesticada por completo. De la misma forma había sido introducido en Hawái y en las islas cercanas en el año 1828 para ser difundido rápidamente debido a sus múltiples usos, de tal manera que se le ha considerado en las islas como el árbol más valioso de todos los introducidos en esas zonas, expresado económicamente (INECC, 2007).

3.2.1. Experimentos con mezquite

Además de los usos más comunes del mezquite como los mencionados anteriormente, se han realizado diversos estudios como el aislamiento de un antiparasitario y antimicrobiano, un alcaloide de indolizidina llamado Delta 1,6-juliprosopina, además de otras indolizidinas análogas conocidas, a partir de las hojas de *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*, por Rahman et al., 2011. Zappala et al., 2014, utilizaron *Prosopis pubescens* como hiperacumulador de cobre en suelos contaminados con este metal pesado, mediante fitoextracción, logrando una gran acumulación de cobre en las raíces y una baja cantidad en los tallos y cotiledones, sin embargo, demostraron que a mayor tiempo de exposición al cobre, más células muertas habrá en las raíces. George et al., 2015, utilizaron *Prosopis glandulosa* como tratamiento crónico por vía oral en ratas, para evaluar su efecto antiinflamatorio y reparador del músculo esquelético después de una lesión por contusión, comparado con un tratamiento convencional utilizando diclofenaco, obteniendo que ambos tratamientos estuvieron asociados con la supresión de la respuesta de neutrófilos a la lesión por contusión, sin embargo, el tratamiento crónico con *P. glandulosa* propició una recuperación muscular más efectiva, mientras que el diclofenaco tubo efectos inhibitorios en la reparación.

3.3. Principales países productores de etanol como biocombustible

El bioetanol es el biocombustible con mayor producción mundial, del que se elaboraron más de 40.000 millones de litros durante el año 2004 en todo el mundo (García, 2009).

En los últimos años ha surgido un creciente interés a nivel global por desarrollar biocombustibles a causa de problemas de energía. En 1975 Brasil comenzó a desarrollar fuentes alternativas de energía debido a la crisis de los setentas, el principal producto y que hasta la fecha ha sido muy utilizado por las industrias Brasileñas a través de programas institucionales del gobierno es la caña de azúcar para producción de bioetanol. A principios de los años 2000, Brasil produjo 15,066 millones de litros y Estado Unidos 13,351 millones de litros utilizando el almidón de maíz como producto principal, lo que los convierte en los mayores productores de bioetanol a nivel mundial (García 2009; Vázquez, 2015).

Algunos de los países que conforman la Unión Europea se encuentran desarrollando proyectos para la producción de biocombustibles a partir de aceites vegetales, paja de trigo, cebada, cereales y algunos residuos forestales, por otra parte, China emplea sorgo dulce, mandioca y arroz (Vázquez, 2015).

3.4. Materiales lignocelulósicos

Durante muchos siglos la celulosa ha servido como un material de construcción, principalmente en forma de madera intacta, fibras textiles como algodón y lino, o en forma de papel o cartón. Ha sido utilizada como precursor de modificaciones químicas incluso antes de que su naturaleza polimérica fuera reconocida y entendida. El estudio de la química de la celulosa como polímero se remonta a los experimentos fundamentales de Staudinger en los años 1920s y 1930s con la acetilación y desacetilación de la celulosa; estos experimentos dieron como resultado el concepto de reacciones poliméricas análogas. Para 1838, Payen reconoció la celulosa como una sustancia definitiva y propuso tal nombre para referirse a ella (Klemm et al., 1998).

Debido a la importancia que representan los materiales celulósicos y su gran potencial de aplicación, se han realizado diversos estudios sobre la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares, tal es el caso de Seki et al., 2015, quienes utilizaron la celulosa contenida en la saliva del ganado para degradar celulosa, logrando obtener una concentración máxima de azúcares reductores de 0.259 mg/ml. Sarkar et al., 2012, reportaron algunos tipos de pretratamientos, tanto físicos como fisicoquímicos, químicos y biológicos, para la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre los pretratamientos físicos que utilizaron están, reducción mecánica de tamaño, pirólisis, microondas e irradiación con haz

de electrones. Los fisicoquímicos son autohidrólisis o explosión de vapor, agua líquida caliente, explosión de fibra de amoníaco y explosión de CO₂. Entre los químicos se encuentran hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, oxidación húmeda e hidrólisis con organosolventes y finalmente en el pretratamiento biológico está la hidrólisis enzimática.

3.5. Optimización de azúcares para la producción de etanol

Gomes et al., 2011, reportaron la producción de etanol a partir de vainas de mezquite utilizando la bacteria *Zymomonas mobilis* en cultivo estático con una producción máxima de etanol de 165 g/L. Se ha hipotetizado que los microorganismos del rumen de las vacas podrían ser una opción para la producción de etanol ya que están adaptadas a vivir en condiciones limitadas de oxígeno (Khon y Seon-Woo, 2015). Blanco et al., 2012, recomiendan el uso de fuentes nitrogenadas, específicamente de sulfato de amonio para reducir el tiempo de la fermentación etanólica. Se ha propuesto la hidrólisis enzimática del substrato para obtener azúcares disponibles a partir de la hidrólisis de la celulosa o hemicelulosa utilizando bacterias de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces*, así como hongos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola* y *Schizophillum*, todos estos por su capacidad de producir la enzima celulasa (Sarkar et al., 2012). En este trabajo se estudiaron cuatro aislados de hongos para determinar su capacidad en la hidrólisis enzimática de la celulosa de las vainas de mezquite, así como aislados bacterianos para realizar la fermentación. Los aislados bacterianos y fúngicos utilizados en este proyecto se obtuvieron de un suelo con condiciones elevadas de sales.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en muchas regiones de nuestro país el mezquite es considerado como maleza indeseable o planta maligna debido a que tiene la capacidad de propagarse rápidamente, formar matorrales impenetrables y representar agresividad y competencia con otras especies (Rodríguez et al., 2014), pero esto es causado por la falta de control sobre ellos. Sin embargo, el mezquite posee propiedades que resultan ser muy benéficas y que están siendo desperdiciadas de forma masiva. Un ejemplo está en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus Mexicali, donde se encuentran actualmente 177 árboles de mezquite produciendo en su totalidad un promedio de 3 toneladas de vainas cada año, cantidad que no está siendo aprovechada. Otro caso es el valle de Mexicali, en donde una enorme cantidad de vainas producidas cada temporada de verano por los mezquites son recolectadas únicamente para ser trasladadas a los basureros y otra cantidad solo es degradada en el suelo propio del lugar donde en muchos casos las semillas contenidas en las vainas germinan, en esta parte es donde radica el descontrol sobre los mezquites.

Como enfoque principal estas vainas pueden ser utilizadas para producir bioetanol mediante fermentación alcohólica por su alto contenido de azúcares. Lo que esta investigación pretende demostrar es que el mezquite más que considerarse como un vegetal maligno y ser desperdiciado como es el caso en Mexicali y sus alrededores, tiene grandes oportunidades en la industria, por ejemplo en la producción de alcohol y un impacto positivo en el medio ambiente ya que es capaz de disminuir la erosión de los suelos mediante la fijación, contribuyendo así a la mejora ambiental, lo que lo convierte en recurso biótico muy valioso.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Producir bioetanol como fuente de energía renovable a partir del azúcar de la vaina de mezquite por fermentación alcohólica de bacterias y *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la muestra de mezquite mediante análisis fisicoquímicos de alimentos.
- Hidrolizar el material lignocelulósico de las vainas de mezquite empleando hongos.
- Realizar el proceso de producción de bioetanol utilizando bacterias fermentadoras de azúcares y *S. cerevisiae*.

6. HIPÓTESIS

Los aislados de hongos nativos provenientes de un ambiente salino tienen capacidad para hidrolizar la celulosa de las vainas de mezquite mejorando la producción de bioetanol por fermentación alcohólica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Recolección de mezquite

La recolección de mezquite se llevó a cabo en las áreas verdes junto al edificio principal de la Facultad de Ingeniería de la UABC, campus Mexicali, en verano, temporada en la cual las plantas de mezquite liberan sus vainas maduras mostrando un color amarillo claro. Se recolectaron aproximadamente 25 kg de vainas de mezquites y se almacenaron en una zona seca para evitar la absorción de humedad y facilitar el pretratamiento físico.

7.2. Pretratamientos del mezquite

7.2.1. Pretratamiento físico

Las vainas de mezquite fueron sometidas a una reducción mecánica de tamaño para obtener harina de mezquite. Este proceso rompe la matriz de celulosa y con esto se disminuye el grado de cristalinidad de celulosa transformándose en celulosa amorfa mejorando la eficiencia del procesamiento enzimático (Sarkar et al., 2012).

Las vainas de mezquite secas se molieron en un molino metálico (Waring 33BL79) pequeño de alta velocidad con aspas de acero. La materia prima molida se vertió en un tamizador de malla metálica con poros de 2 mm de apertura para separarla del resto de la materia de tamaño superior. La harina obtenida del tamizado se almacenó en un lugar seco dentro de bolsas de plástico para evitar la invasión de insectos.

7.3. Determinación de azúcares reductores y totales

La cuantificación de azúcares reductores y totales en la muestra de mezquite previamente pretratada físicamente, se llevó a cabo según el método de Lane-Eynon e indicado por la norma oficial mexicana NMX-F-312-1978.

7.3.1. Estandarización de la solución de Fehling

Se preparó una solución diluida de glucosa de 50 mg/ml y se vertió en una bureta. Se colocaron en un matraz 5 ml de solución Fehling A, 5 ml de solución Fehling B, 3 gotas de azul de metileno al 1%, 20 ml de agua destilada y perlas de ebullición. Al ebullición la solución Fehling se procedió a titular con la solución de glucosa dejándola caer lentamente a razón de

1 gota cada 5 segundos. La titulación se detuvo al tornarse rojiza la solución de Fehling (Figura 6).



Figura 6. Cambio de coloración de la solución Fehling en ebullición, por titulación con solución diluida de glucosa.

Durante la titulación, la solución de Fehling siempre se mantuvo en ebullición. La estandarización se realizó por triplicado para obtener un gasto promedio y así obtener el Factor Fehling, el cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Factor Fehling (FF)} = \frac{\text{Gasto en titulación}}{10 \text{ ml}} \times \frac{0.5 \text{ g de glucosa}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mg de glucosa}}{1 \text{ g de glucosa}}$$

7.3.2. Preparación de la solución clarificada

Se pesaron 10 g de muestra tamizada de mezquite (harina de mezquite) y se colocaron en un matraz aforado de 250 ml. Se aforó con etanol al 70%, se mezcló hasta homogeneizar y se dejó reposar 10 minutos. Se filtró la mezcla utilizando papel poroso (Brew Rite), se obtuvieron 200 ml del filtrado los cuales se almacenaron a 4 °C durante 24 horas.

Posteriormente, de la solución filtrada se tomó una alícuota de 25 ml, se colocó en un matraz Erlenmeyer y se añadieron 50 ml de agua destilada. Se mezcló y se agregaron unas gotas de acetato de plomo al 30% hasta formar un precipitado. Se filtró y al filtrado se le adicionó cantidades pequeñas de oxalato de amonio para eliminar el exceso de acetato y se formó un precipitado blanco. Se mezcló y se filtró nuevamente. El filtrado final quedó totalmente transparente. Este se vertió en la bureta para titular.

7.3.3. Determinación de azúcares reductores

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 5 ml de solución Fehling A, 5 ml de solución Fehling B, 3 gotas de azul de metileno al 1%, 20 ml de agua destilada y perlas de ebullición. Se colocó el matraz en ebullición y se procedió de la misma manera que en la estandarización. La titulación se realizó con la solución clarificada y se detuvo hasta apreciarse el tono rojizo. El porcentaje de azúcares reductores en la harina de mezquite se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Azúcares reductores} = \frac{FG \times 100 \times \text{Factor de dilución}}{G \times FF}$$

Donde FF es el factor Fehling, FG es el factor glucosa que es igual a 0.05, factor de dilución es el volumen de aforo inicial y G es el gasto en la titulación.

7.3.4. Determinación de azúcares totales

En un matraz Erlenmeyer se colocó una alícuota de 25 ml de solución clarificada y se le adicionó 5 ml de HCl 1:1. La mezcla se calentó a 70 °C durante 5 minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se agregó cuidadosamente NaOH 6N hasta obtener un pH 8.2 mientras se agitaba para mantener homogénea la solución. Se transfirió a un matraz aforado de 100 ml y se aforó con agua destilada. Se mezcló y se colocó en la bureta para titular.

En un matraz se agregó 5 ml de Fehling A, 5 ml de Fehling B, 3 gotas de azul de metileno, 20 ml de agua destilada y perlas de ebullición. La titulación se realizó de la misma manera que en la estandarización. El porcentaje de azúcares totales se calculó utilizando la misma fórmula que en los azúcares reductores y la sacarosa restando los reductores a los totales:

$$\% \text{ Azúcares totales} = \frac{FG \times 100 \times \text{Factor de dilución}}{G \times FF}$$

$$\% \text{ Sacarosa} = (\% \text{ Azúcares totales} - \% \text{ Azúcares reductores}) \times 0.95$$

Se utilizó la prueba estadística T-Student para determinar la significancia ($p \leq 0.05$) de la variación entre la harina tratada y la original (Ver sección 7.8.1).

7.4. Determinación de fibra cruda y cenizas

La determinación de fibra cruda se realizó según la norma mexicana NMX-F-090-S-1978 para la determinación de fibra cruda en alimentos.

Se pesaron 2 g de harina de mezquite y se transfirieron al matraz balón de fondo plano del equipo de extracción Soxhlet junto con un agitador magnético. Se añadieron 200 ml de H₂SO₄ al 1.25% y se colocó el matraz sobre la plancha de calentamiento con agitación. Luego de ensamblar el equipo de extracción Soxhlet se calentó la solución a reflujo al mismo tiempo que se agitaba para mantenerla homogénea en todo momento. La solución se mantuvo en ebullición y agitación por 30 minutos. Se retiró el matraz y se filtró la solución con un sistema de filtración acoplando a una bomba de vacío (Robinair) a un matraz kitasato con embudo Buchner que requiere papel filtro redondo (Whatman #2) con retención de partículas de 8 µm.

El material retenido sobre el filtro se lavó con agua destilada caliente hasta que alcanzó un pH muy cercano al neutro. Posteriormente el material neutralizado se colocó en el matraz del equipo de extracción Soxhlet, junto con el agitador magnético y se añadieron 200 ml de NaOH al 1.25%. Nuevamente se ensambló el equipo de extracción y se procedió de igual forma como en la digestión ácida. Luego de 30 minutos de digestión alcalina bajo reflujo, se retiró el matraz del condensador y se filtró de igual forma que en la digestión ácida utilizando el mismo tipo de filtro para reducir la probabilidad de pérdida de residuo. Se lavó el residuo retenido en el filtro con agua destilada caliente hasta que el pH se neutralizó, luego se le realizó un lavado con etanol y se transfirió todo el contenido del filtro a una cápsula de porcelana. La cápsula se colocó en una estufa (QL 10 Lab Oven) a 130 °C durante dos horas para secar la muestra y llevarla a peso constante.

Posteriormente se colocó la cápsula en un desecador de vidrio para enfriar a temperatura ambiente. Se registró el peso de la muestra en la balanza analítica (Mettler Toledo). Luego de pesar, se colocó en una mufla (Thermolyne ELED FB1410M) a 600 °C durante 30 minutos para destruir toda materia orgánica. Al finalizar, se colocó en el desecador para enfriar a temperatura ambiente y se registró el peso en la balanza analítica (Mettler Toledo) (Figura 7). El contenido de fibra cruda corresponde a la pérdida de peso después de la incineración.

Se utilizó la prueba estadística T-Student para determinar la significancia ($p \leq 0.05$) de la variación entre la harina tratada y la original.

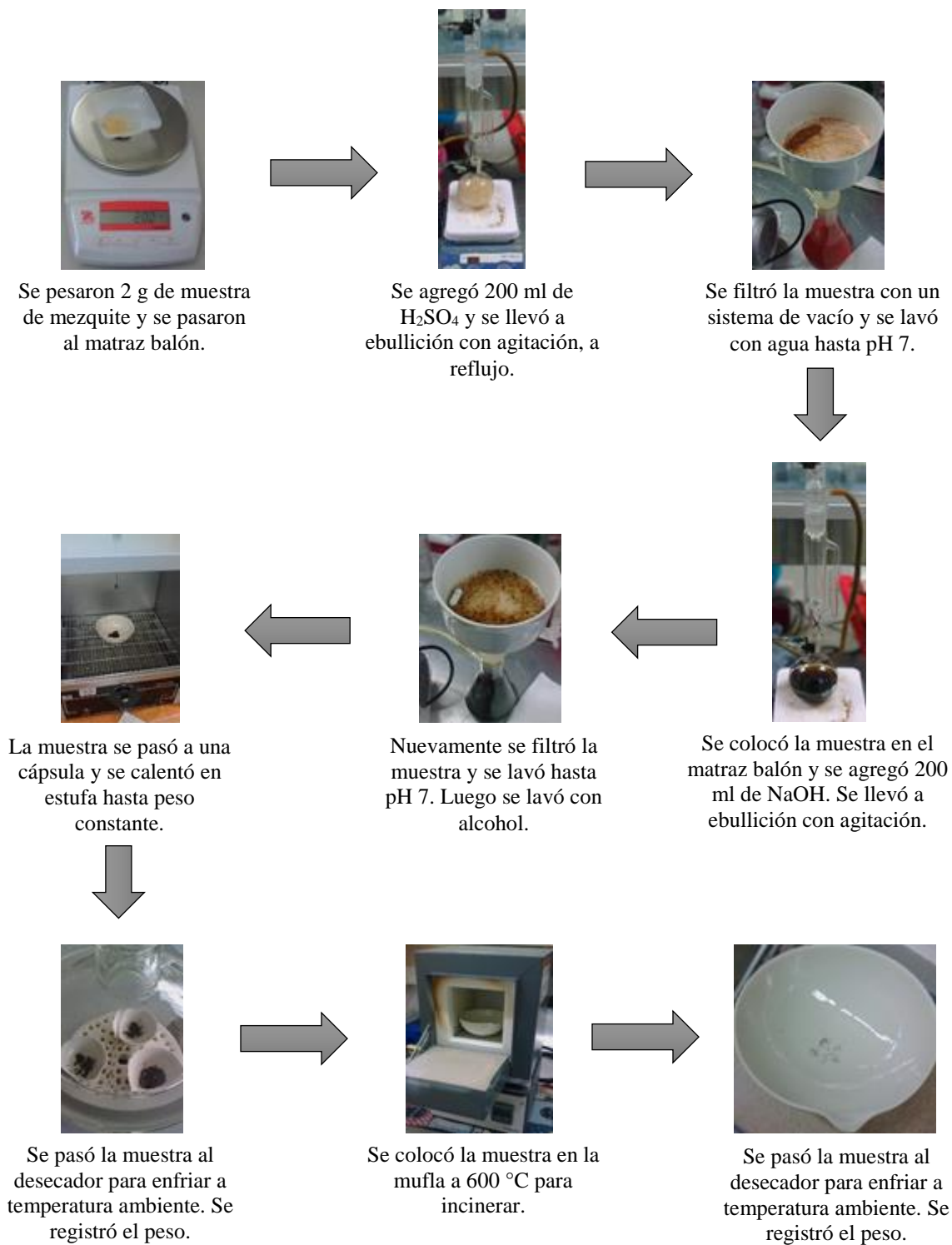


Figura 7. Representación esquemática para el procedimiento de análisis de fibra cruda y cenizas.

7.5. Determinación de proteína total

Se determinó el contenido de nitrógeno y proteína total a la muestra de mezquite según el método de Kjeldahl indicado por la norma mexicana NMX-F-068-S-1980 para la determinación de proteínas.

Se pesó 1 g de harina de mezquite y se vertió en un matraz de digestión Kjeldahl. Se le añadieron 2 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 g de Na_2SO_4 , 25 ml de H_2SO_4 al 97% y perlas de ebullición. Se colocó en la parrilla de calentamiento del extractor Kjeldahl (Labconco) y se calentó a 130 °C hasta que se carbonizó la muestra, luego se fue aumentando la temperatura gradualmente hasta que la muestra se tornó de un color azul claro a causa de la reacción entre los reactivos mediante la aplicación de calor (Figura 8).



Figura 8. *Muestra de mezquite carbonizada a 130°C y cambio de coloración con aumento gradual de temperatura.*

Al alcanzar la coloración azul clara de la totalidad de la muestra, se detuvo el aumento de temperatura y se continuó calentando a 300 °C durante 30 minutos más. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se le agregaron 450 ml de agua desionizada y 75 ml de NaOH 1:1 lentamente para evitar una reacción violenta. Se agitó hasta homogeneizar y se colocó en el destilador Kjeldahl (Labconco). Como receptor se colocó un matraz con 50 ml de ácido bórico al 2% y unas gotas del indicador Shiro Tashiro. Se destiló un volumen de 250 ml, que cambió su coloración de morado a verde con las primeras gotas del destilado (Figura 9). Se utilizó la prueba estadística T-Student para comparar estadísticamente ($p \leq 0.05$) los tratamientos con la harina tratada y la harina original o sin tratar.

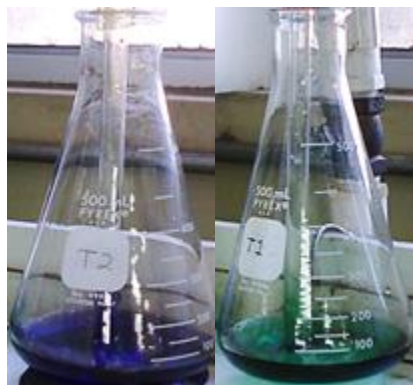


Figura 9. Cambio de coloración del ácido bórico por recepción del destilado en matraz receptor.

El matraz receptor se retiró y se tituló con HCl 0.1N, mientras se mantuvo en agitación con agitador magnético. La titulación se detuvo al tornarse el volumen de color verde a morado nuevamente (Figura 10). El porcentaje de nitrógeno y proteínas se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

Donde: V es el volumen del HCl gastado, N es la normalidad del HCl, m es la masa de la muestra en gramos, 0.014 es el miliequivalente del nitrógeno y 6.25 es el factor para las leguminosas.



Figura 10. Cambio de coloración en la solución destilada por titulación con HCl 0.1N.

7.6. Reactivación de microorganismos

Las cepas bacterianas se tomaron del banco de cepas del laboratorio de Investigación de Bioingeniería y se resembraron en placas con medio Reasoner's 2 agar (R2A) modificado con 12% de NaCl (relación P/P) a un pH 8, para trabajar con colonias recién activadas. Se agregó dicha cantidad de NaCl al medio de cultivo, para proporcionar a los microorganismos un ambiente con condiciones de salinidad similar al ambiente de donde fueron aislados (Saldaña, 2016).

7.7. Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas a las 46 cepas bacterianas aisladas utilizando dos medios de cultivo para identificar aquellas con capacidad de fermentar carbohidratos.

7.7.1. Agar hierro de Kligler

Se prepararon en tubos de ensayo por duplicado agar hierro de Kligler para cada bacteria previamente aislada. Se inoculó por picadura en el fondo del medio y por estriado sobre la superficie inclinada. Las pruebas fueron incubadas en una estufa de cultivo (ECOSHEL) a 35 °C durante 48 horas.

La fermentación de glucosa indica una superficie roja y un fondo amarillo; alcalino y ácido respectivamente. La fermentación de lactosa y glucosa indican una superficie y fondo amarillos. La ausencia de fermentación de carbohidratos se indica sin cambios de color en el medio. La producción de sulfuro de hidrógeno indica la formación de un precipitado negro. Las fracturas o burbujas en el medio indican producción de gas.

7.7.2. Caldo Base Rojo de Fenol

Se prepararon 25 ml de caldo R2A modificado con 12% de NaCl (relación P/P) y pH 8 para cada aislado bacteriano. Se inoculó la bacteria en el caldo y se colocó en incubación con agitación oscilatoria de 200 rpm y 35 °C durante 24 horas. Se preparó caldo base Rojo de Fenol en tubos de ensayo por duplicado para cada bacteria, adicionando 7 g de sacarosa por cada litro de medio preparado y una campana Durham por cada tubo. Una vez crecida la bacteria en Caldo R2A, se inoculó por duplicado en los tubos, agregando 50 µl (1 gota

aproximadamente) de la suspensión del cultivo puro. Se incubaron en estufa a 35 °C durante 24 horas.

La reacción positiva a la fermentación de sacarosa se indica con un cambio de color de rojo a amarillo en el medio. La presencia de burbujas dentro de la campana Durham indica producción de gas.

7.8. Producción de alcohol con levadura

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la prueba de producción de alcohol con harina de mezquite para hacer comparativos posteriores con un blanco negativo y algunos tipos de cepas bacterianas. *S. cerevisiae* se reactivó en medio de cultivo extracto de levadura, peptona, dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés, yeast extract peptone dextrose) con pH 6.8 manteniéndose en incubación con agitación a 200 rpm durante 24 horas a 35 °C.

7.8.1. Tratamiento del mezquite

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 100 ml de agua destilada. Se fueron agregando lentamente 30 g de harina de mezquite mientras se agitaba. Se preparó por duplicado (M_0 y M_1) y ambos matraces recibieron tratamiento térmico en Baño María (VWR) a 50 °C durante 1 hora. La mezcla de uno de los dos matraces (M_0) se transfirió uniformemente a tubos Falcon de 15 ml y se colocaron en la centrífuga (CIVEQ 80-2) para centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se colectó en un matraz (M_2) y la biomasa en otro (M_3), teniendo así tres tratamientos distintos: M_1 , M_2 y M_3 . A los tres matraces se les agregó 5 g/L de oxalato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) y 2 g/L de fosfato de potasio (KH_2PO_4) como fuentes de nitrógeno y fósforo respectivamente. Se esterilizaron en autoclave (Tuttnauer Brinkmann 2540M) por 15 minutos a 121 °C y se dejaron reposar 1 día a temperatura ambiente. A la par de los tratamientos, se preparó un blanco negativo en las mismas condiciones e incluyendo los mismos parámetros.

7.8.2. Lavado celular

El caldo de cultivo puro de *S. cerevisiae* se transfirió a tubos Falcon y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregó agua destilada estéril

a los paquetes celulares, se agitaron un poco y se volvieron a centrifugar con los mismos parámetros. El paso anterior se repitió tres veces.

7.8.3. Inóculo de células

Los paquetes celulares se diluyeron con agua destilada estéril. Se les ajustó la densidad óptica a una absorbancia (A)=1 con longitud de onda (λ)=540 nm para obtener aproximadamente 1×10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) en el espectrofotómetro (SmartSpec Plus). Se inoculó la cantidad de UFCs antes mencionada en cada uno de los tres tratamientos M_1 , M_2 y M_3 , para observar cuál de estos tratamientos es más efectivo en la producción de alcohol. Se incubaron a 35 °C durante 72 horas con agitación manual de 2 minutos cada 24 horas y en condiciones anaeróbicas, empleando Pickl-It como válvula de escape de CO_2 (Figura 11).



Figura 11. *Biorreactor de tipo batch estático.*

7.9. Escalamiento del proceso

Se determinó mediante el olfato que el tratamiento M_1 (ver sección 7.8.1.) fue el más efectivo debido a la intensidad del olor a alcohol al ser comparados cada uno contra el blanco negativo, al cual no se le inoculó levadura. Se repitió el proceso de producción de alcohol, esta vez escalado a 500 ml de medio y solamente utilizando el tratamiento M_1 . Los parámetros de adición de levadura y de incubación fueron los mismos.

7.10. Prueba de producción de alcohol con bacterias

Del total de bacterias analizadas, se seleccionaron solamente aquellas que mostraron la capacidad de fermentar sacarosa y fueron sometidas al proceso de fermentación alcohólica por duplicado, cada una siguiendo la metodología descrita en la sección 7.8 realizando solo el tratamiento M₁. Su incubación fue a 35 °C durante 96 horas con agitación manual de 2 minutos cada 24 horas y en ausencia de oxígeno.

7.11. Determinación de la enzima celulasa en hongos, para la hidrólisis enzimática del mezquite

Se realizaron ensayos en cajas de Petri para determinar los aislados fúngicos capaces de producir celulasas. Se utilizó el agar carboximetilcelulosa (Agar CMC, Kasana et al., 2008), en el cual se probaron cuatro aislados fúngicos, identificados como H1, H2, H3 y H4 (López, 2016). Los aislados fúngicos fueron cultivados en agar dextrosa y papa (PDA) antes de cultivarse en el agar CMC. Después de sembrar los aislados fúngicos en el medio CMC, se dejó incubar por 20 h a 35 °C, posteriormente las cajas Petri con los hongos fueron inundadas con Gram's Iodine durante 3 minutos aproximadamente. Posteriormente, se retiró el exceso del líquido y se volvieron a incubar las muestras durante cuatro horas. El agar CMC presentó una coloración rojiza y la prueba positiva para la producción de celulasa se detectó a través de un halo claro alrededor del hongo.

7.12. Hidrólisis enzimática

A la mezcla de mezquite, previamente esterilizada, se le realizó un tratamiento biológico con el objetivo de hidrolizar los compuestos lignocelulósicos y obtener una mayor cantidad de azúcares, inoculando cuatro aislados fúngicos, identificados como H1, H2, H3 y H4 (López, 2016).

Se sembraron los aislados fúngicos provenientes del banco de cepas del laboratorio de Bioingeniería en medio de cultivo PDA modificado con 12% (P/P) de NaCl y un pH de 8. Se incubaron a 40 °C durante 7 días. Se prepararon 2 mezclas de harina de mezquite para cada hongo (un total de 8) escaladas a 500 ml, se les agregaron 5 g/L (NH₄)₂C₂O₄ y 2 g/L de KH₂PO₄ como fuentes de nitrógeno y fosfato respectivamente y se esterilizaron en autoclave.

Los hongos que crecieron en PDA se utilizaron para obtener esporas e inocular las mezclas de mezquite:

Bajo condiciones de esterilidad, a la placa con el hongo se agregaron pequeñas perlas de ebullición y 5 ml de agua destilada estéril. La placa se agitó cuidadosamente con movimientos elípticos para que las perlas pudieran desprender las esporas. Se tomó la solución de esporas de la placa Petri y se transfirió a un contenedor estéril. Para determinar el número de esporas por cada mililitro de inoculante se tomaron 5 μ l de solución de esporas y se mezclaron con 5 μ l de colorante azul de tripano al 0.4%. La mezcla se colocó en una lámina para muestras de doble cámara (BioRad) y se insertó en el contador de células (TC-20 Automated Cell Counter, BioRad). El contador arrojó automáticamente la cantidad de células vivas.

Se inocularon aproximadamente 1.61×10^5 esporas/ml en las mezclas preparadas previamente por duplicado. Se incubaron a 40 °C durante 10 días para hidrolizar compuestos lignocelulósicos. Se agitaron manualmente por 2 minutos cada 24 horas para homogeneizar la mezcla. Se esterilizaron las mezclas nuevamente para eliminar los hongos. Se tomó una cantidad suficiente de muestra sólida de la pasta de mezquite después de esterilizarla y se cuantificaron los azúcares presentes después de la hidrólisis mediante el método de Lane-Eynon.

7.12.1. Producción de alcohol después de la hidrólisis enzimática

Se utilizó la mezcla en la que se hidrolizó mayor cantidad de azúcares para inocular la levadura *S. cerevisiae* a partir de la suspensión del cultivo puro. Se incubó a 35 °C durante 72 horas en ausencia de oxígeno con agitación manual de 2 minutos cada 24 horas.

7.13. Obtención del alcohol

Para obtener el alcohol fermentado, el medio se colocó a destilar utilizando el equipo de extracción Soxhlet (Pyrex), calentando en parrilla eléctrica (IKA C-MAG) a 80 °C para la evaporación del etanol cuyo punto de ebullición es de 78.37 °C. El proceso de destilación se detuvo al notar que el volumen destilado se mantenía estable (Figura 12).



Figura 12. *Alcohol destilado de la fermentación de la mezcla de mezquite con *S. cerevisiae*.*

El volumen del alcohol obtenido se midió con una probeta (Kimax Kimble) y se almacenó en pequeños contenedores de vidrio a 4 °C para evitar pérdidas de volumen. Para corroborar la producción de alcohol, al producto obtenido se le hizo la prueba de combustión que consistió en encenderle fuego a 500 μ l del producto. Después del destilado se tomó muestra de la mezcla sólida de residuos de mezquite para cuantificar la cantidad de azúcares restantes después de la producción de alcohol y así calcular el rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$) con la siguiente fórmula:

$$Y_{(p/s)} = \frac{g \text{ de producto sintetizado}}{g \text{ de sustrato consumido}}$$

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Caracterización del mezquite

8.1.1. Contenido de azúcares reductores y totales

Se realizó la prueba de Lane-Eynon para determinar los azúcares reductores y totales a la harina de mezquite. A partir del gasto de la solución clarificada, se calculó la cantidad de azúcares reductores y totales. El proceso se realizó a la harina antes y después del tratamiento térmico (original y tratada respectivamente) (véase sección 7.8.1).

Mientras el gasto en la titulación de la solución Fehling resulte menor, la concentración de azúcares disponibles será mayor. Esto indica que hay una mayor concentración de azúcares en la muestra original (Figura 13).

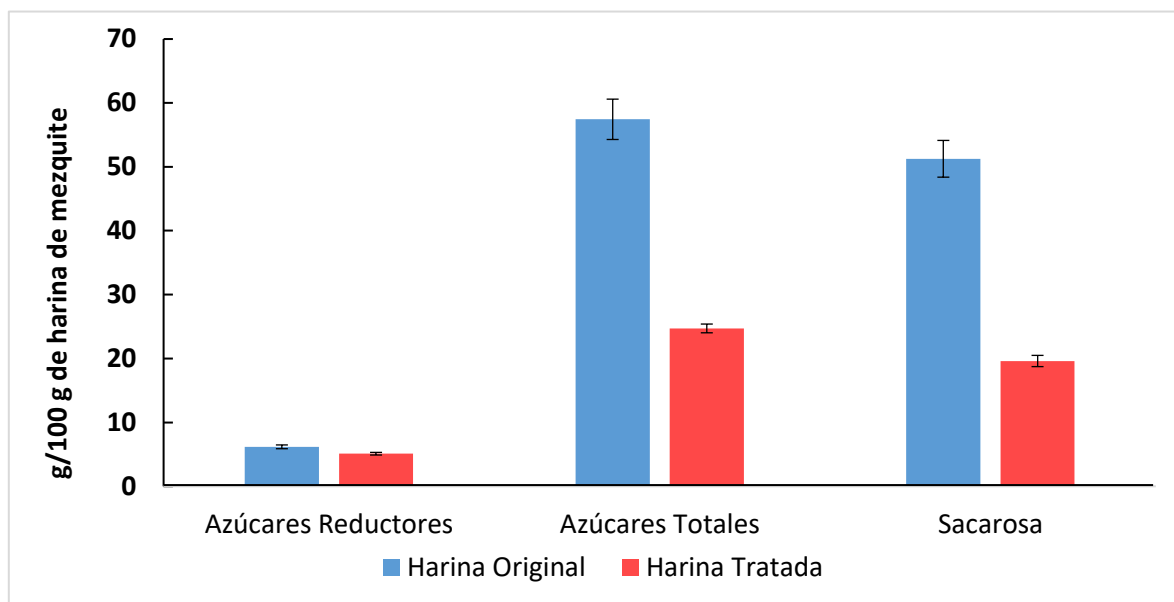


Figura 13. *Contenido de azúcares en la harina de mezquite.*

Durante el proceso del tratamiento térmico la concentración de azúcares disponibles tanto reductores como totales tuvieron una disminución significativa estadísticamente ($p < 0.05$), teniendo como promedios en la harina original* 6.17 g/100 g de reductores y 57.43 g/100 g de totales, en la harina tratada térmicamente 5.10 g/100 g de reductores y 24.71 g/100 g de totales; resultados que superan mínimamente a los reportados por da Silva et al., (2011) en los cuatro aspectos (en harina original 4.6 g/100 g de reductores y 56.5 g/100 g de totales;

en harina tratada 3.99 g/100 g de reductores y 16.1 g/100 g de totales), siendo el más distanciado el dato de azúcares totales en harina tratada.

La cantidad de azúcares de la que se partió es de la cantidad resultante en la harina tratada, ya que de no llevar a cabo el tratamiento térmico, el cual incluye la esterilización (en autoclave a 121 °C y 17 lb/in² por 15 minutos), la harina estaría contaminada con microorganismos no deseados impidiendo así que el microorganismo de interés realice su función durante el proceso de fermentación alcohólica además de que se obtendrían datos desacertados.

*La harina original se refiere a la harina de mezquite sin tratamiento alguno.

8.1.2. Contenido de fibra cruda y cenizas

Se determinó la cantidad de fibra cruda contenida en la harina de mezquite previo al tratamiento térmico y después de este (Figura 14) para determinar cómo influye sobre la materia orgánica presente en la harina.

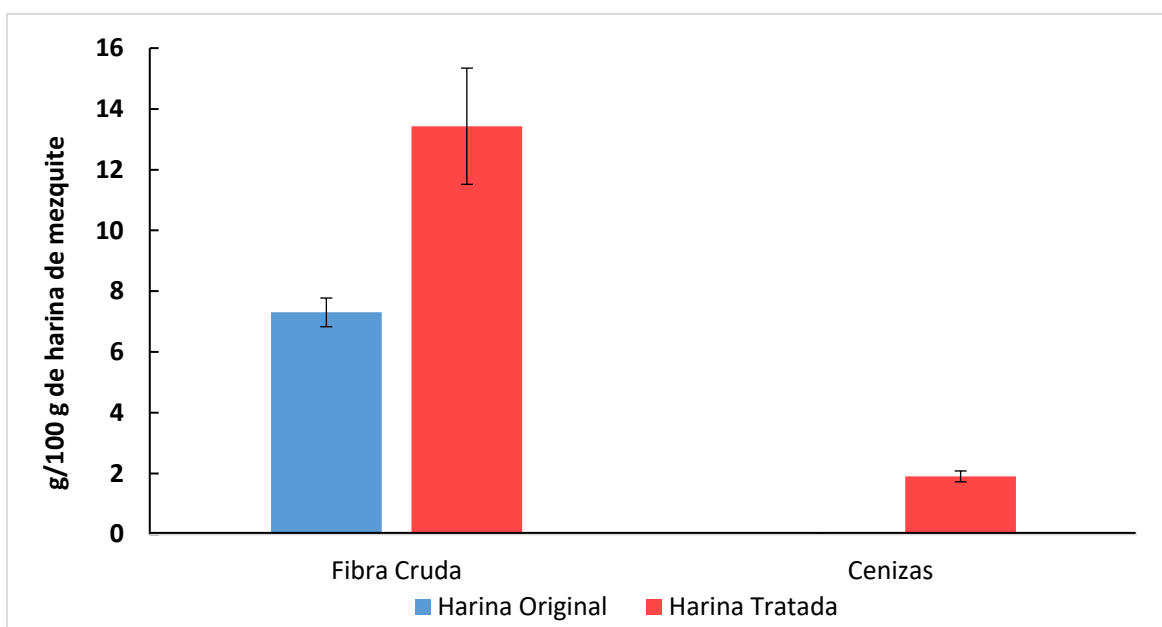


Figura 14. *Contenido de fibra cruda y cenizas en la harina de mezquite.*

Al contrario de la disminución que sucede con los azúcares después del tratamiento térmico, la fibra cruda sufre un aumento significativo estadísticamente ($p=0.0057$), al igual que las cenizas, teniendo un promedio de fibra cruda de 7.30 g/100 g y 13.43 g/100 g en

harina original y tratada respectivamente. Para cenizas los valores promedio son de 0.013 g/100 g y 1.90 g/100 g en harina original y tratada respectivamente.

8.1.3. Contenido de proteína total

Mediante el método de Kjeldahl para la determinación de nitrógeno y proteínas totales se obtuvieron los siguientes resultados en la harina de mezquite antes y después del tratamiento térmico a partir del gasto en la titulación con HCl 0.1N (Figura 15).

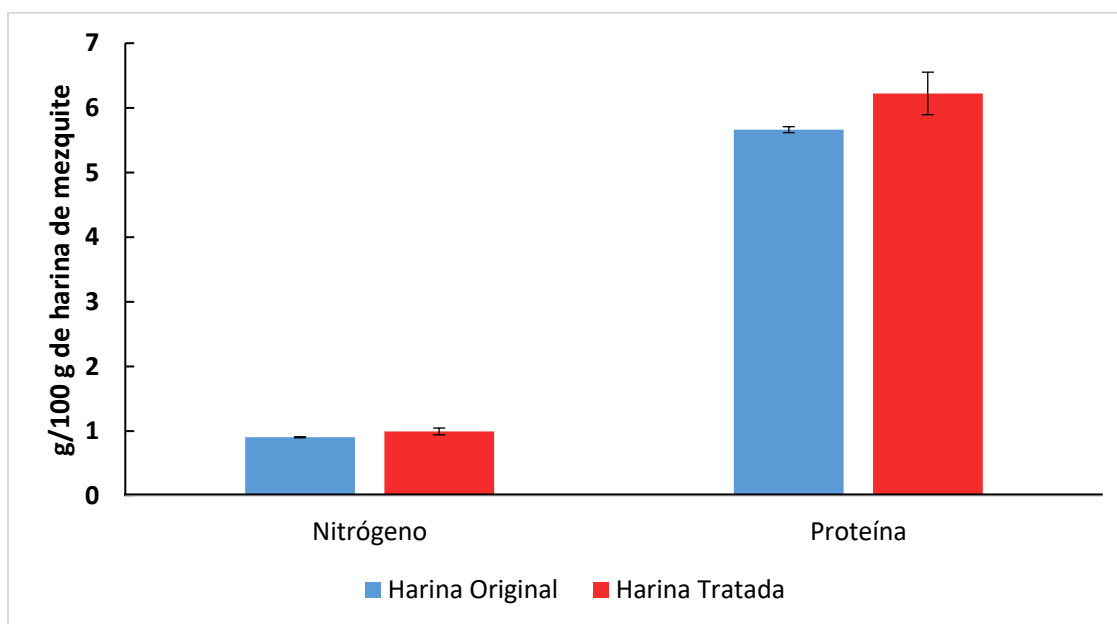


Figura 15. *Contenido de nitrógeno y proteína total en la harina de mezquite.*

Al igual que en la determinación de fibra cruda, el tratamiento térmico influye de manera positiva en el contenido de proteína en la harina, aunque resultó muy pequeño se alcanza a percibir un aumento significativo estadísticamente ($p=0.0432$) en la concentración de nitrógeno y de proteína siendo un promedio de 0.9967 g/100 g y 6.22 g/100 g respectivamente en las réplicas con la harina tratada térmicamente y 0.991 g/100 g y 5.66 g/100 g para nitrógeno y proteína respectivamente en la harina original.

8.2. Hidrólisis de la muestra

La hidrólisis enzimática con los hongos hizo posible la obtención de una mayor cantidad de azúcares de la harina de mezquite (Figura 16). Las cantidades variaron según el hongo utilizado.

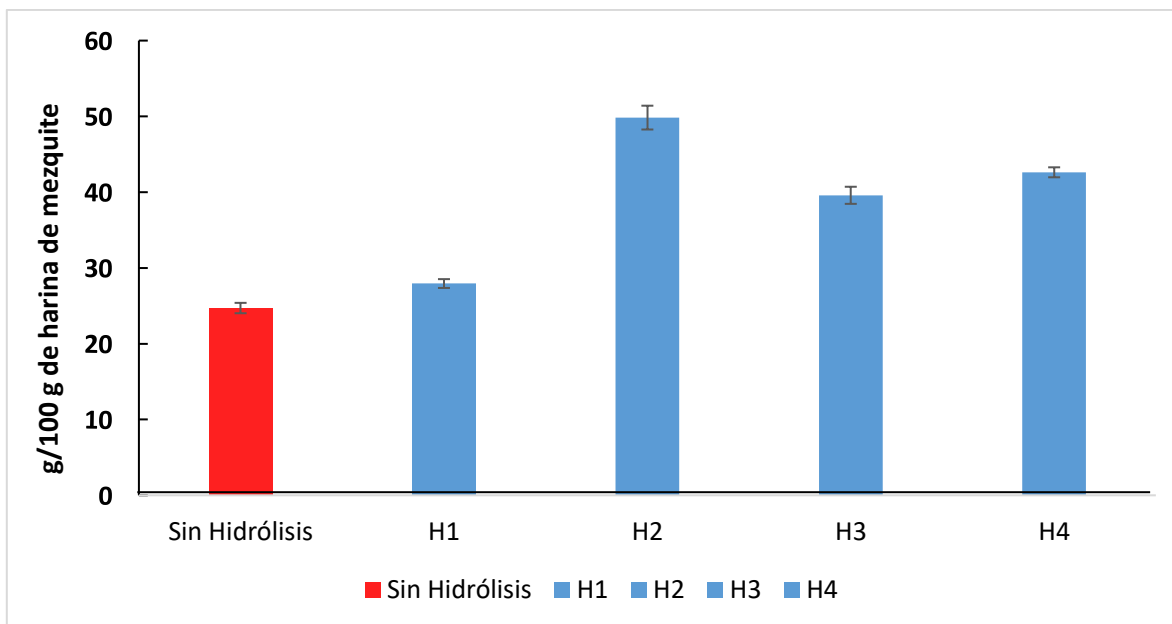


Figura 16. *Aumento de azúcares totales presentes en la harina de mezquite por hidrólisis enzimática con hongos productores de celulasas.*

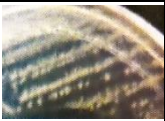

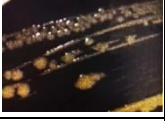






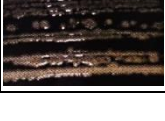
Se logró aumentar la concentración de azúcares totales disponibles en la harina mezquite inoculando los microorganismos fúngicos en la harina tratada comparado con los resultados de azúcares totales en la harina tratada (sin hidrólisis), en donde no hubo hidrólisis enzimática (ver Figura 13).






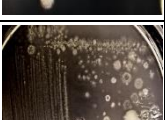



El hongo menos efectivo para hidrolizar azúcares fue H1, el cual solo incrementó mínimamente la cantidad de azúcares obteniendo un promedio de 27.94 g/100 g de harina de mezquite, mientras que el hongo H2 resultó el más apto para este proceso duplicando la cantidad de azúcares en la muestra de mezquite hasta un promedio de 49.84 g/100 g. Respecto al pH de la muestra de mezquite, en todo momento se mantuvo estable con valores entre 5 – 5.1.





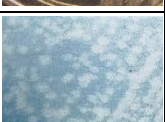
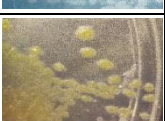








8.3. Morfología de las cepas bacterianas y fúngicas estudiadas

Las tablas 3 y 4 presentan la descripción morfológica de los 46 aislados bacterianos utilizados en las pruebas bioquímicas y los 4 aislados fúngicos empleados en la hidrólisis enzimática, respectivamente. Las bacterias se cultivaron en agar R2A con pH 8 y los hongos en PDA con pH 8.

Tabla 3. Descripción morfológica de los aislados bacterianos (López, 2015; Saldaña, 2016).

Descripción morfológica						
Bacteria	Foto	Forma	Elevación	Borde	Color	Aspecto
A		Rizoide	Elevada	Rizado	Amarillo	Húmedo y viscoso
B		Circular	Monticular	Entero	Blanco	Seco
E		Irregular	Plana	Ondulado	Amarillo	Húmedo
F		Irregular	Monticular	Entero	Blanco	Seco
H		Circular	Monticular	Entero	Amarillo	Seco
J		Circular	Elevada	Entero	Rosa	Húmedo
L		Circular	Elevada	Entero	Amarillo	Húmedo
M		Circular	Monticular	Entero	Blanco	Seco
N		Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Seco
Q1		Rizoide	Sin elevación	Ondulado	Beige	Húmedo
Q2		Filamentosa	Sin elevación	Filamentoso	Beige	Seco
Q4		Circular	Monticular	Entero	Marrón	Húmedo

Q5		Circular	Sin elevación	Entero	Beige	Húmedo
R3		Circular	Monticular	Entero	Blanco	Húmedo
R4		Circular	Sin elevación	Ondulado	Café	Seco
S1		Rizoide	Sin elevación	Filamentoso	Beige	Seco
S2		Rizoide	Sin elevación	Filamentoso	Beige	Húmedo
S3		Filamentosa	Sin elevación	Ondulado	Beige	Húmedo
U1		Irregular	Elevada	Ondulado	Blanco	Húmedo
V5		Circular	Plana	Rizado	Beige	Húmedo
I		Circular	Elevada	Entero	Blanco	Gomoso
II		Circular	Pulvinada	Entero	Blanco	Gomoso
III		Irregular	Elevada	Entero	Blanco	Pastoso
IV		Circular	Plana	Entero	Blanco	Duro
V		Irregular	Convexa	Entero	Blanco	Gomoso
VI		Irregular	Elevada	Entero	Blanco	Pastoso

VII		Circular	Plana	Entero	Blanco	Duro
X		Circular	Plana	Entero	Blanco	Pastoso
XI		Irregular	Convexa	Entero	Blanco	Gomoso
XII		Irregular	Convexa	Ondulado	Semi transparente	Pastoso
XIII		Circular	Elevada	Entero	Amarillo	Semi duro
XIV		Irregular	Elevada	Entero	Amarillo	Pastoso
XV		Circular	Convexa	Entero	Semi amarillento	Duro
XVI		Irregular	Plana	Entero	Blanco	Gomoso
XVII		Circular	Elevada	Entero	Blanco	Gomoso
XVIII		Irregular	Umbulada	Ondulado	Semi transparente	Gomoso
XX		Circular	Plana	Entero	Blanco	Pastoso
XXI		Irregular	Plana	Entero	Amarillo	Semi duro
XXII		Circular	Elevada	Entero	Blanco	Gomoso
XXIII		Circular	Pulvinada	Entero	Naranja opaco	Gomoso







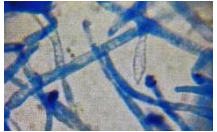
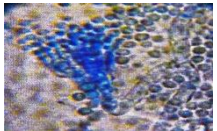

XXV		Irregular	Plana	Entero	Blanco	Gomoso
XXVI		Circular	Convexa	Entero	Blanco	Gomoso
XXVIII		Circular	Convexa	Entero	Blanco	Gomoso
XXX		Circular	Elevada	Entero	Amarillo	Semi duro
XXXI		Circular	Elevada	Entero	Amarillo	Semi duro
XXXIV		Irregular	Elevada	Enero	Blanco	Gomoso

Tabla 4. Descripción morfológica de los aislados fúngicos (López, 2015).

Hongo	Foto	Esporas	Forma de hifas	Estructuras fúngicas
H1		Conidias	Cenocíticas	Conidióforo
H2		Esporangiósporas	Cenocíticas	Zoosporangio
H3		Conidias	Septada uninucleada	Conidióforo
H4		Esporangiósporas	Septada uninucleada	Esporangióforo

8.4. Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas a los 46 aislados bacterianos mostrados en la tabla 5, para determinar cuáles eran capaces de fermentar azúcares, producir gas y sulfuro de hidrógeno.

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas.

Aislado bacteriano	Agar hierro de Kligler			Caldo Rojo de Fenol	
	Glucosa	Lactosa	Sulfuro de hidrógeno	Sacarosa	Gas
A	-	-	-	++	+
B	+	-	-	++	-
E	+	-	-	++	+
F	+	-	-	++	-
H	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-
L	+	-	-	++	+
M	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-
Q1	-	-	-	++	-
Q2	-	-	-	++	-
Q4	-	-	-	-	-
Q5	-	-	-	+	-
R3	-	-	-	+	-
R4	++	-	-	+	-
S1	-	-	-	+	-
S2	-	-	-	+	-
S3	++	-	-	+	-
U1	-	-	-	+	-
V5	+	+	+	-	-
I	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-
V	+	-	-	-	-
VI	-	-	-	-	-
VII	-	-	-	-	-
X	-	-	-	-	-
XI	-	-	-	-	-
XII	-	-	-	++	-
XIII	-	-	-	++	-
XIV	-	-	-	-	-
XV	-	-	-	-	-
XVI	+	-	+	+	-
XVII	-	-	-	++	-
XVIII	-	-	-	++	-
XX	-	-	-	-	-
XXI	-	-	-	-	-

XXII	-	-	-	-	-
XXIII	-	-	-	-	-
XXV	-	-	-	-	-
XXVI	-	-	-	-	-
XXVIII	+	-	-	+	-
XXX	+	-	-	-	-
XXXI	+	-	-	-	-
XXXIV	+	-	+	+	-

(El signo (-) indica resultados negativos para fermentación o producción, el signo (+) indica resultados positivos, doble signo (++) indica resultados positivos en menor tiempo).

Los resultados de las pruebas bioquímicas muestran que 21 cepas bacterianas son capaces de fermentar la sacarosa, de las cuales 11 lo hacen en un tiempo más eficiente. Se obtuvieron 13 fermentadoras de glucosa y 1 de lactosa, lo cual resulta de gran importancia en la producción de bebidas alcohólicas y productos que surgen de la fermentación de azúcares por ejemplo el alcohol ya sea su uso como antiséptico o biocombustible.

Se encontraron solamente 3 aislados microbianos productores de gas y 3 productores de sulfuro de hidrógeno.

8.5. Producción de celulasas en los hongos utilizados para la hidrólisis del mezquite

Los hongos H1, H2, H3 y H4 que crecieron sobre carboximetil celulosa produjeron celulasas, lo cual se apreció por una decoloración alrededor de cada hongo (Figura 17). La degradación de la celulosa muestra que estos hongos pueden hidrolizar a la celulosa del mezquite para hacer más disponibles los azúcares para la fermentación.

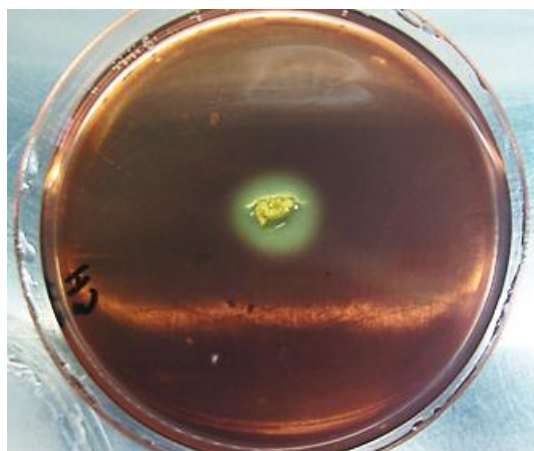


Figura 17. Hongo creciendo sobre carboximetil celulosa. El halo de decoloración junto al hongo demuestra la presencia de celulasas capaces de degradar a la celulosa.

8.6. Rendimiento en la producción de alcohol

8.6.1. Producción de alcohol por fermentación con bacterias

La fermentación llevada a cabo con las bacterias no resultó favorable como se esperaba. De las 21 bacterias sometidas a la fermentación alcohólica solamente dos, las cuales fueron E y F, la primera identificada en un 85% como *Pantoea agglomerans* (López, 2015) y la segunda sin identificar, ambas teniendo la capacidad de crecer en ambientes con pH entre 5 y 11, lograron producir una cantidad mínima de alcohol que no pudo ser recuperado mediante la destilación con el equipo Soxhlet. A pesar de que no se recuperó alcohol, sí hubo una pequeña producción, lo cual se apreció con el olor característico del alcohol.

8.6.2. Producción de alcohol por fermentación con levadura

Los resultados se tomaron a partir del proceso de fermentación escalada, donde la cantidad de alcohol obtenido fue de 108.47 g/L en promedio, con una densidad de 0.849 g/ml. La harina de mezquite mantuvo un pH 5 – 5.1. El rendimiento del producto con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$) de la fermentación resultó de 0.52. En la figura 19 se puede observar la combustión del alcohol obtenido.

8.6.3. Producción de alcohol por fermentación con levadura en la muestra hidrolizada con hongo

Después de los 10 días de hidrólisis enzimática de la muestra con el hongo H2, más 72 horas de fermentación con *S. cerevisiae*, se obtuvo una producción de alcohol más baja de lo esperado, siendo una concentración promedio de 126.38 g/L que puede ser comparable con los valores citados por algunos autores (Tabla 6), sin embargo, esta concentración resultó significativamente mayor ($p=0.0369$) al valor mencionado en la sección 8.5.2. El rendimiento $Y_{(p/s)}$ de la fermentación fue de 0.51. En la figura 18 se muestra la comparación de los volúmenes obtenidos.

El pH de la mezcla se mantuvo estable de 5 – 5.1, cercano al considerado óptimo para fermentación por da Silva *et al.* 2010 quien sugiere pH 5.4 – 5.5 y pH 5 considerado por McLellan *et al.* 1999.

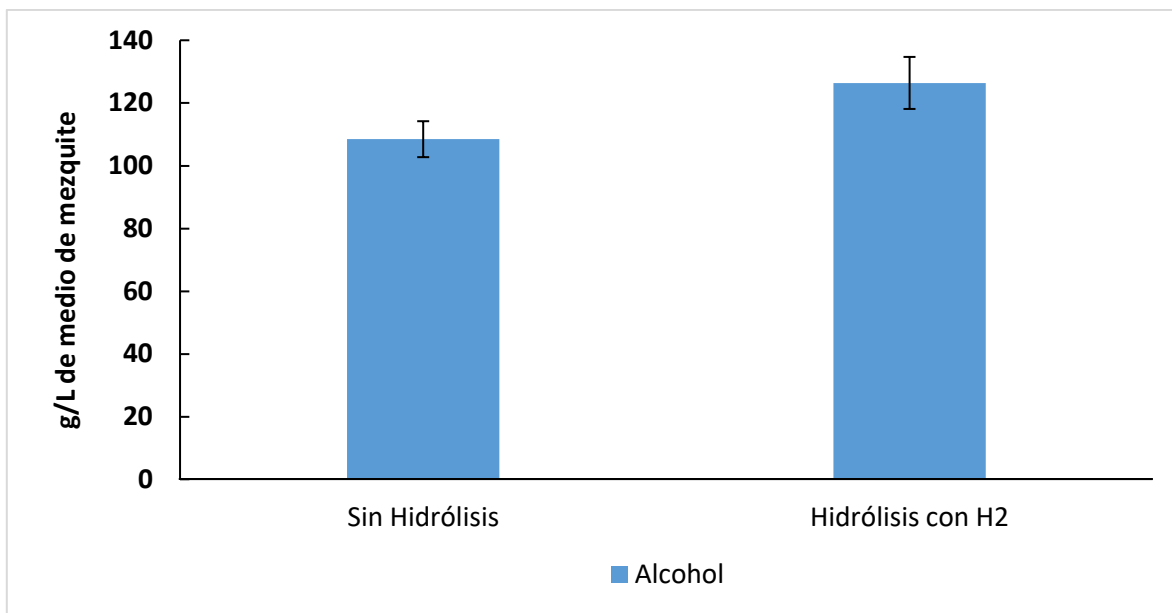


Figura 18. Producción de alcohol con *S. cerevisiae* en mezcla de mezquite tratada e hidrolizada con hongo H2.

Tabla 6. Concentraciones de bioetanol obtenidas por fermentación de biomasas.

Biomasa	Agente fermentador	Cantidad de bioetanol (g/L)	Referencia
Mezquite (<i>P. juliflora</i>)	<i>Z. mobilis</i>	165	da Silva et al., 2011
Mezquite (<i>P. juliflora</i>)	<i>Z. mobilis</i>	141.1	da Silva et al., 2010
Sorgo dulce	<i>S. cerevisiae</i>	120.68	Laopaiboon et al., 2009
Sorgo dulce	<i>S. cerevisiae</i>	120.28	Laopaiboon et al., 2007
Yuca	<i>STARGEN™ 001</i>	115.50	Castaño et al., 2011
Caña de azúcar	<i>S. cerevisiae</i>	90	Paiva et al., 1996
Caña de azúcar	<i>S. cerevisiae</i>	76.28	Babu et al., 2012
Trigo	<i>S. cerevisiae</i>	56.5	Erdei et al., 2010
Alga roja (<i>Gelidium elegans</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	55	Yanagisawa et al., 2013
Mezquite (<i>P. juliflora</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	44.32	da Silva et al., 2010
Papa	<i>S. cerevisiae</i>	32.52	Izmirlioglu y Demirci, 2015
Naranja	<i>S. cerevisiae</i>	13.98	Tejeda et al., 2010
Piña	<i>S. cerevisiae</i>	1.22	Tejeda et al., 2010

8.7. Alcohol versus gasolina

Se comparó la combustión del bioetanol obtenido, producido a partir de la fermentación con la biomasa de *Prosopis sp.* y la levadura *S. cerevisiae*, contra la combustión de la gasolina PEMEX Premium con un nivel de octanaje de 92 (Figura 19). Además se incluyó la comparación de la combustión del alcohol etílico comercial marca PROTEC con 70° (Tabla 7). La temperatura de los tres combustibles fue de 25 °C.



Figura 19. Combustión de bioetanol de mezquite (izquierda), alcohol comercial (centro) y gasolina (derecha).

Tabla 7. Comparación de la combustión entre alcohol y gasolina.

Aspecto	Bioetanol de mezquite	Alcohol etílico comercial	Gasolina Pemex Premium
Cantidad	500 µL	500 µL	500 µL
Color de flama*	10% naranja, 90% azul	50% naranja, 50% azul	90% naranja, 10% azul
Estabilidad de flama	Estable	Estable	Inestable
Humos/Vapores visibles	No	No	Bastante humo negro
Duración de la combustión	25 segundos	27 segundos	13 segundos
Olor de la combustión	Característico del alcohol, débil	Sin olor	Penetrante, fuerte
Residuos	150 µL de agua	150 µL de agua	Sólidos negros y amarillos

(*Los porcentajes de color de la flama representan aproximaciones visuales con variaciones de $\pm 10\%$).

La combustión del bioetanol resulta física y ambientalmente superior a la combustión de la gasolina debido al siguiente análisis:

- El color anaranjado de la flama de la gasolina indica que no está sucediendo una combustión completa, en cambio la combustión con flama azul es más completa e intensa, por lo tanto, genera más poder calorífico y una menor cantidad de contaminantes (Martínez, 1992).
- La duración de la combustión del alcohol es superior, indicando que el rendimiento de este es más eficiente.
- Los residuos generados por la gasolina son partículas sólidas, mientras que el residuo del alcohol es agua (Figura 20).

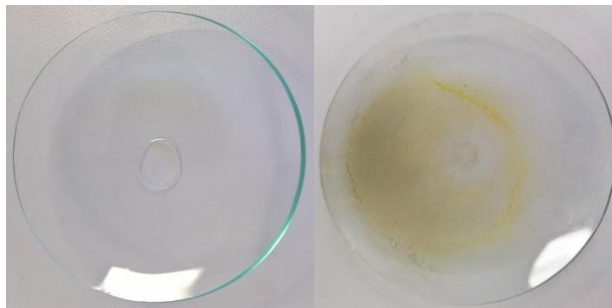


Figura 20. *Residuos de la combustión del bioetanol (derecha) y de la gasolina (izquierda).*

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que el mezquite, del género *Prosopis sp.*, es materia viable para la producción de alcohol mediante sus frutos, los cuales contienen grandes cantidades de azúcares que fueron fermentados por la levadura *S. cerevisiae* produciendo bioetanol como producto final. Esto convierte al mezquite, un residuo agrícola, en un recurso potencialmente valioso en la industria alcohólica, ya sea para producción de bebidas alcoholizadas, antisépticos o biocombustibles a partir de esta fuente renovable. Se demostró además que el uso de los microorganismos fúngicos provenientes de un entorno salado, son efectivos para hidrolizar la biomasa lignocelulósica, ya que a partir de esta biomasa se logró aumentar la cantidad de azúcares presentes en la harina de mezquite después de ser sometida al tratamiento térmico, pues estos azúcares fueron utilizados por el microorganismo fermentador fabricando una mayor cantidad de bioetanol en comparación con la harina que no fue hidrolizada.

Ya que la cantidad de azúcares aumentados por hidrólisis enzimática en la harina tratada no igualó a la cantidad de azúcares contenida en la harina original sin hidrolizar, siendo esta aun mayor, habría una producción estimada de 145.69 g de bioetanol/L de medio a partir de la harina original, en caso de haber sido posible su uso sin contaminarse.

Se generan aproximadamente 3 toneladas de vainas de mezquite que se producen únicamente en la unidad central de la UABC campus Mexicali, con lo que podrían producirse aproximadamente 1,512 litros de bioetanol al año en promedio, tomando en cuenta los datos resultantes de este proyecto. A pesar de que esta cantidad a nivel industrial no es suficiente, podría aprovecharse el mezquite del valle de Mexicali, además, existen muchas y grandes zonas en nuestro país las cuales están cubiertas por *Prosopis sp.*, que pudiera aprovecharse para la producción de alcohol a nivel industrial, que reemplazaría gradualmente el combustible proveniente de los fósiles, y con esto reducir significativamente el nivel de contaminación en el ambiente, al igual que lo ha hecho Brasil en los últimos años. Dentro de la misma UABC podría utilizarse el bioetanol producido, para abastecer los distintos laboratorios del área biológica que demandan de alcohol como uso antiséptico.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alba-Lois L., Segal-Kischinevsky C., 2010. “Yeast fermentation and the making of beer and wine”, *Nature Education*, 3(9): 17.
2. ArgenBio, 2007. “Las levaduras y el etanol: bebidas, combustibles y un poco de historia”, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, Enlace digital: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=181>, consultado en diciembre de 2016.
3. Babu N. K., Satyanarayana B., Balakrishnan K., Rao T. R., Rao G. S., 2012. “Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses using newly isolated yeast from toddy sap”, *The Korean Society of Mycology, Microbiology* 40(1): 35 – 41.
4. Barroso Castillo J., 2013. “¿Qué es el octanaje?”, *Cultura Científica, Revista publicada por UAM*.
5. Blanco F. M. (O.S.A.), 1883. “Flora de Filipinas”, Gran edición, Atlas II, p. 392.
6. Blanco P. A., Quicazán S. M., Cuenca Q. M., 2012. “Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel”, *Vitae*, 19: S234 – 236.
7. Castaño Pelaez H., Cardona Betancur M., Mejía Gomez C., Acosta Cárdenas A., 2011. “Producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea”, *Medellín*, No. 169, p. 158 – 166.
8. Chaves Solera M., 2006. “Potencial de producción de etanol carburante en Costa Rica a partir de la caña de azúcar”, *Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar*, p. 10.
9. Chávez-Sifontes M., Domine M. E., 2013. “Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial”, *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4): 15 – 46.
10. Chundawat S. P. S., Venkatesh B., Dale B. E. 2006. “Effect of particle sized based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility”, *Biotechnology and bioengineering*, 96: 219 – 231.
11. Cruz Estrada C., 2014. “Celulosa”, *Química de alimentos I, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*.

12. Cuervo L., Folch J. L., Quiroz R. E., 2009. “Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol”, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Vol. 13, No. 3.
13. da Silva C. G. M, Cardoso Andrade S. A., Pereira Schuler A. R., Leite de Souza E., Montenegro Stamford T.L., 2011. “Production of ethanol from mesquite [*Prosopis juliflora* (SW) D.C.] pods mash by *Zymomonas mobilis* in submerged fermentation”, *Scientia Agricola*, Piracicaba, Brazil, V. 68, p. 124-127.
14. da Silva C. G. M, Cardoso Andrade S. A., Pereira Schuler A. R., Leite de Souza E., Montenegro Stamford T. L., de Araújo J. M., 2010. “Production of ethanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*”, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 13, No. 5.
15. Delgado M. J., Montero A., Rovero L., Suarez M., Navea J., 2014. “Levadura como esponjante de la masa panaria”, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Programa de Ingeniería Agroindustrial.
16. Dubos R. J., 1950. “Louis Pasteur: Freelance of science”, Sixth printing, Little, Brown and Company.
17. Dumont A., Raynal C., Raginel F., Ortiz-Julien A., Suarez C., Heras J. M., 2008. “Capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa”, Lallemand, p. 2502 - 2507.
18. Erdei B., Barta Z., Sipos B., Réczey K., Galbe M., Zacchi G., 2010. “Ethanol production from mixtures of wheat Straw and wheat meal”, *Biotechnology for Biofuels*, 3: 16.
19. Festucci-Buselli R. A., Otoni W. C., Joshi C. P., 2007. “Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants”, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1): 1 - 13.
20. García C., 2009. “Biocombustibles: ¿Energía o alimento?”, Vol. 4, Universidad Autónoma de Barcelona, Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales, p. 77.
21. George C., Smith C., Isaacs A. W., Huisamen B., 2015. “Chronic *Prosopis glandulosa* treatment blunts neutrophil infiltration and enhances muscle repair after contusion injury”, *Nutrients*, 7: 815 – 830.

22. Goldemberg J., 2008. "Biotechnology for biofuels", The Brazilian Biofuels Industry, BioMed Central, University of Sao Paulo.
23. Guerra Millán J. F., Mallén Wiechers C., Struck Garza A., Valera Vega T., 2008. "Producción de bioetanol", Laboratorio de procesos de separación, Universidad Iberoamericana.
24. Hendriks A. T. W. M., Zeeman G., 2008. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass", ELSEVIER, Bioresource technology 100 (2009) 10-18.
25. Horta Nogueira L. A., Seabra J. E., Best G., Leal M. R. L. V., Poppe M. K., 2008. "Bioetanol de caña de azúcar. Energía para el desarrollo sostenible", Primera Edición, Coordinación BNDES y CGEE, Rio de Janeiro.
26. INECC, 2007. "Cultivo" (mezquite), Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Enlace digital: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/72/cultivo.html>, consultado en noviembre de 2016.
27. INECC, 2007. "Usos y propiedades" (mezquite), Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Enlace digital: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/72/usos.html>, consultado en noviembre de 2016.
28. Izmirliglu G., Demirci A., 2015. "Enhanced bio-ethanol production from industrial potato waste by statistical medium optimization", International Journal of Molecular Sciences, 16: 24490 – 24505.
29. Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A., 2008. "A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine", Springer Science, Current Microbiology, 57: 503 – 507.
30. Khon R. A., Seon-Woo K. 2015. "Using the second law of thermodynamics for enrichment and isolation of microorganisms to produce fuel alcohols or hydrocarbons", Journal of Theoretical Biology, 382: 356 – 362.
31. Klemm D., Philipp B., Heinze T., Heinze U., Wagenknecht W., 1998. "Comprehensive cellulose chemistry: Functionalization of cellulose", Vol 2. Weinheim: Wiley-VCH.

32. Laopaiboon L., Naunpeng S., Srinophakun P., Klanrit P., Laopaiboon P., 2009. "Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology. Effects of carbon and nitrogen supplementations", Elsevier, *Bioresource Technology*, 100: 4176 – 4182.
33. Laopaiboon L., Thanonkeo P., Jaisil P., Laopaiboon P., 2007. "Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*", Springer, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1497 – 1501.
34. López Arreguin A. A., 2015. "Bacterias extremófilas y su potencial en la producción de auxinas y metabolitos con actividad tensoactiva", Tesis para grado de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California.
35. Lynd L. R., van Zyl W. H., Pretorius I. S., 2002. "Microbial cellulase utilization: Fundamentals and biotechnology", *Microbiol.* 66: 506 – 577.
36. Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P., 2009. "Brock. Biología de los microorganismos", PEARSON, Duodécima edición.
37. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J., 1999. "Brock. Biología de los microorganismos", PRENTICE HALL, Octava edición.
38. Martínez I., 1992. "Termodinámica básica y aplicada", 1ra. Edición, DOSSAT S. A., Universidad Politécnica de Madrid.
39. Mathews C. K., Van Holde K. E., Ahern K. G., 2002. "Bioquímica", 3ª Edición, Pearson Educación.
40. McLellan P. J., Daugulis A. J., Li J., 1999. "The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*", Department of Chemical Engineering, Queen's University, 15: 667 – 680.
41. Medina M. M. A., Lara F. L., Aguilar C. N., De la Garza T. H., 2011. "Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante", *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, AQM*, Volumen 3, p. 35 - 41.
42. Monbiot G., 2008. "Calor: Cómo parar el calentamiento global", Barcelona RBA.
43. Moreira J. R., Goldemberg J., 1999. "The alcohol program", *Energy Policy*, ELSEVIER, 27: 229-245.

44. Oliva Domínguez J. M., 2003. “Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*”, Departamento de Microbiología III, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, ISBN: 84-669-1709-8.
45. Paiva T. C. B., Sato S., Visconti A. E. S., Castro L. A. B., 1999. “Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast”, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 57 – 58,
46. Rahman A. A., Samoylenko V., Jacob M. R., Sahu R., Jain S. K., Khan S. I., Tekwani B. L., Muhammad I., 2011. “Antiparasitic and antimicrobial indolizidinas from the leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*”, National Institutes of Health, Planta Medica, 77(14): 1639 – 1643.
47. Raisman J. S., Gonzalez A. M., 2004. “Fermentación o La vida sin aire”, Hipertextos del área de biología, Universidad Nacional del Noreste, Enlace digital: <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/met4.htm>, consultado en enero de 2017.
48. Rodríguez-Chong A., Ramírez J. A., Garrote G., Vázquez M., 2004. “Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment”, Journal of Food Engineering, 61: 143-152.
49. Rodríguez Saucedo E. N., Rojo Martínez G. E., Ramírez Valverde B., Martínez Ruiz R., Cong Hermida M., Medina Torres S. M., Piña Ruiz H. H., 2014. “Análisis técnico del árbol de mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd.)”, Universidad Autónoma Indígena de México, Revista Ra Ximhai, Vol. 10, p. 173-193.
50. Román Pérez H., 2016. “Bromatología de la vaina de mezquite (*Prosopis spp.*) como alternativa para consumo sustentable en la comarca lagunera”, Tesis para grado de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
51. Saldaña Robles R., 2016. “Bacterias asociadas a plantas de la laguna La Salada, Baja California y posibles aplicaciones en la industria”, Tesis para grado de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, p. 28.
52. Sarkar N., Kumar G. S., Bennerjee S., Aikat K., 2012. “Bioethanol production from agricultural wastes: An overview”, Renewable Energy, National Institute of Technology, 37: 19 – 27.

53. Seki Y., Kikuchi Y., Kimura Y., Yoshimoto R., Takahashi M., Aburai K., Kanai Y., Ruike T., Iwabata K., Sugawara F., Sakai H., Abe M., Sakaguchi K., 2015. "Enhancement of cellulose degradation by cattle saliva", Public Library of Science ONE, 10(9): e0138902.
54. Söderström J., Pilcher L., Galbe M., Zacchi G. 2003. "Two-step pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production", Biomass and Bioenergy, 24: 475 – 486.
55. Sun Y., Cheng J., 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review" Bioresource Technology, 83: 1 – 11.
56. Teixeira L. C., Linden J. C., Schroeder H. A., 1999. "Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugarcane bagasse to ethanol fuel", Renew, Energy, 16: 1070 – 1073.
57. Tejada L. P., Tejada C., Villabona Á., Alvear M. R., Castillo C. R., Henao D. L., Marimón W., Madariaga N., Tarón A., 2010. "Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña", Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería, Universidad de Cartagena.
58. Tudge C., 2006. "The Secret Life of Trees: How they live and why they matter", Ed. PENGUIN, ISBN-13: 978-0141012933, p. 186.
59. Utrilla Carreri J., 2004. "Evaluación de la sobreexposición de genes del metabolismo central de *Escherichia coli* etanológica usando xilosa como fuente de carbono", Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
60. Vázquez H. J., Dacosta O., 2007. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas", Universidad Nacional Autónoma de México, INGENIERÍA Investigación y Tecnología, vol. VIII. p 249-259.
61. Vázquez Morales O., 2015. "Etanol lignocelulósico, a partir de cascarilla de café, por medio de hidrólisis química-enzimática y fermentación", Tesis para grado de maestría, Universidad Veracruzana.

62. Yanagisawa M., Kawai S., Murata K., 2013. “Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds”, *Landes Bioscience*, 4: 224 – 235.
63. Yu Z., Zhang H. 2003. “Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.* YZ-1 and *Zymomonas mobilis*”. *Biomass and Bioenergy*, 24: 257 – 262.
64. Zappala M. N., Ellzey J. T., Bader J., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J., 2014. “Effects of copper sulfate on seedlings of *Prosopis pubescens* (Screwbean mesquite)”, *National Institutes of Health, International Journal of Phytoremediation*, 16(0): 1031 – 1041.

11. ANEXOS

11.1. Medio YPD

Pesar en relación peso/volumen:

- 1% de extracto de levadura
- 2% de glucosa/dextrosa
- 2% de peptona de caseína

Añadir el volumen de agua destilada requerido con base en los cálculos.

Agitar hasta disolver los solutos.

11.2. Agar CMC

Pesar en relación peso/volumen:

- 0.2% de nitrato de sodio
- 0.05% de sulfato de magnesio
- 0.1% de fosfato dipotásico
- 0.05% de cloruro de potasio
- 0.02% de peptona
- 0.2% de CMC
- 1.7% de agar-agar

Añadir el volumen de agua destilada requerido con base en los cálculos.

Agitar hasta disolver los solutos.

11.3. Licor de Fehling

Se prepara mezclando en cantidades iguales los dos reactivos siguientes:

- Reactivo Fehling A: 34.639 g de sulfato de cobre en 500 ml de agua destilada.
- Reactivo Fehling B: 173 g de tartrato de sodio y potasio, y 50 g de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada.