

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS
EL PRADO**

**TEMA
OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
RESIDUOS DE NARANJA “*Citrus sinensis*”
PROVENIENTES DEL PROCESO AGROINDUSTRIAL
EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR**

**AUTORES
Diego Albán
David Freire**

**INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

2009

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS
EL PRADO**

**TEMA
OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
RESIDUOS DE NARANJA “*Citrus sinensis*”
PROVENIENTES DEL PROCESO AGROINDUSTRIAL
EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR**

**AUTORES
Diego Manuel Albán Villagómez
David Alejandro Freire Marín**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**QUITO - ECUADOR
2009**

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE
NARANJA “*Citrus sinensis*” PROVENIENTES DEL PROCESO
AGROINDUSTRIAL EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR**

Diego Manuel Albán Villagómez

David Alejandro Freire Marín

REVISADO Y APROBADO

.....

**Ing. Patricia Falconí
DIRECTOR DE CARRERA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR**

**Dra. Elena Mafla
CODIRECTOR**

**Ing. Jaime Villacís
BIOMETRISTA**

**Abg. Carlos Orozco
SECRETARIA ACADEMICA**

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE
NARANJA “*Citrus sinensis*” PROVENIENTES DEL PROCESO
AGROINDUSTRIAL EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR**

Diego Manuel Albán Villagómez

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL
DE CALIFICACION DEL INFORME TECNICO.**

CALIFICACIÓN FECHA

**Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR**

**Dra. Elena Mafla
CODIRECTOR**

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON
PRESENTADAS EN ESTA SECRETARIA.**

**Abg. Carlos Orozco
SECRETARIO ACADEMICA**

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE
NARANJA “*Citrus sinensis*” PROVENIENTES DEL PROCESO
AGROINDUSTRIAL EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR**

David Alejandro Freire Marín

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL
DE CALIFICACION DEL INFORME TECNICO.**

CALIFICACIÓN FECHA

**Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR**

**Dra. Elena Mafla
CODIRECTOR**

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON
PRESENTADAS EN ESTA SECRETARIA.**

**Abg. Carlos Orozco
SECRETARIO ACADEMICA**

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este proyecto de investigación.

A mis padres, que con su amor, sabiduría y paciencia han sabido guiarme cada día e inculcar en mí, valores y principios para que sea una persona de bien.

A mi hermano, quien con su preocupación y ayuda me han apoyado siempre.

A mis amigos, quienes han compartido conmigo una gran etapa de mi vida.

A mis familiares, por el cariño y aprecio que siempre me han demostrado.

A mis maestros que han compartido sus conocimientos y sabiduría durante este proceso de formación.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado primeramente a Dios que me ha dado la fortaleza para terminar este proyecto de investigación.

A mis queridos padres, que con su amor y sabiduría han inculcado en mí valores y principios para que cada día sea una persona mejor.

A mis hermanos, que siempre estuvieron a mi lado cuando lo necesité.

A toda mi familia, que con su preocupación y aprecio, me han apoyado siempre en todas las metas que me he trazado en la vida.

A mis queridos amigos, quienes han compartido conmigo gratos momentos a lo largo de mi vida estudiantil.

David Freire M.

AGRADECIMIENTO

A mi madre, porque gracias a ella hoy soy lo que soy.

A mi padre, que por sus sabios consejos he conseguido culminar este sueño.

A hermano Jaime, por creer en mí y estar siempre a mi lado

A mi familia, por ser mi apoyo y darme fuerzas en los momentos difíciles.

A mis amigos, por darme una mano siempre que la situación lo ameritaba

Al Dr. Darwin Rueda y Bioq. Elena Mafla, por las enseñanzas y conocimientos impartidos para el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. Jaime Villacis por haber colaborado en este proyecto.

A todos aquellos que de alguna u otra forma participaron en mi formación académica.

Diego Albán V..

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fuerza de seguir adelante.

A mi madre y padre, que con su apoyo he llegado a cumplir mis sueños.

A Lorena, Wladimir y Santiago, mis hermanos queridos, que nunca me dejaron solo.

A mis buenos amigos, por estar conmigo y ayudarme cuando lo necesité.

Al Dr. Darwin Rueda y Bioq. Elena Mafla, por guiarme con su sabiduría en el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Ing. Jaime Villacis por haberme ayudado en este proyecto.

Al Ing. Pablo Landázuri y Dr. Carlos Chiriboga por su guía en esta investigación.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por ayudarme con la prestación de equipos y laboratorios necesarios para este trabajo.

A todos aquellos que de alguna u otra forma participaron en mi formación académica.

David Freire M.

AUTORÍA

Las ideas expuestas en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones son de exclusiva responsabilidad de los autores.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. LA NARANJA	4
2.1.1. Componentes activos (fruto)	5
2.1.2. Cáscara de naranja	5
2.1.2.1. Carbohidratos	5
2.1.2.2. Enzimas	7
2.1.2.3. Pigmentos	7
2.1.2.4. Ácidos	7
2.2. ETANOL	7
2.3. ÁCIDO ACÉTICO	8
2.4. FUENTES DE BIOMASA	10
2.4.1. Cultivos y residuos agrícolas	10
2.4.2. Residuos forestales	10
2.4.3. Cultivos energéticos	10
2.4.4. Otras fuentes de biomasa	11
2.5. MICROORGANISMOS DE INTERÉS	11
2.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.5.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	12
2.5.3. <i>Aspergillus sp.</i>	13

2.5.3.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	13
2.5.3.2.	<i>Aspergillus niger</i>	15
2.5.3.3.	<i>Aspergillus ochraceus</i>	16
2.5.4.	Pruebas de identificación de microorganismos	18
2.5.4.1.	Tinción de Gram	18
2.5.4.1.1.	Protocolo	18
2.5.4.2.	Prueba de catalasa	19
2.5.4.2.1.	Método del porta objetos	20
2.5.4.2.2.	Método del tubo de ensayo	21
2.5.4.3.	Prueba de la oxidasa	21
2.5.4.3.1.	Método en placa directa	22
2.5.4.3.2.	Método indirecto sobre papel	22
2.6.	ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL	23
2.6.1.	Preparación de la solución de nutrientes	23
2.6.2.	Hidrólisis enzimática	25
2.6.3.	Fermentación	26
2.6.4.	Balance de energía	29
2.7.	DESTILACIÓN	30
2.7.1.	Aparato de destilación	31
2.7.2.	Destilación al vacío	32
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	33
3.2.	MATERIALES	33
3.2.1.	Materiales y Equipos	33

3.2.2.	Reactivos	33
3.2.3.	Sales minerales	34
3.2.4.	Sustancias orgánicas	34
3.2.5.	Otros materiales	34
3.3.	MÉTODOS	35
3.3.1.	Aislamiento de microorganismos	35
3.3.1.1.	Aislamiento de <i>Aspergillus</i>	35
3.3.1.2.	Medio de cultivo	36
3.3.1.3.	Preparación del inóculo	37
3.3.1.4.	Aislamiento de <i>Zymomonas mobilis</i>	37
3.3.1.5.	Medio de cultivo	39
3.3.1.6.	Preparación del inóculo	40
3.3.2.	Obtención de residuos de naranja.	41
3.3.2.1.	Determinación de los componentes de la materia prima.	41
3.3.2.2.	Pre-tratamiento de los desechos.	42
3.3.3.	Hidrólisis	43
3.3.4.	Filtración	47
3.3.5.	Fermentación	48
3.3.6.	Destilación	52
3.3.7.	Análisis económico	55
IV.	RESULTADOS	56
4.1.	COMPOSICIÓN DE LA MATERIA PRIMA.	56
4.2.	ESPECIE DE ASPERGILLUS MÁS EFECTIVO EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS.	56

4.3.	ESPECIE DE ASPERGILLUS MÁS APROPIADO PARA PROCESO DE FILTRACION.	57
4.4.	MICROORGANISMO MÁS EFECTIVO EN LA OBTENCIÓN DE ALCOHOL.	58
4.5.	BACTERIA MÁS EFECTIVA PARA LA OBTENCION DE ALCOHOL.	59
4.6.	TRATAMIENTO MÁS EFECTIVO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL CON LA MAYOR CONCENTRACION PROMEDIO.	60
4.7.	TRATAMIENTO MÁS ECONÓMICO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL.	61
V.	DISCUSIÓN	63
5.1.	ANÁLISIS DE LOS RESIDUOS DE NARANJA	63
5.2.	PRE-TRATAMIENTO.	63
5.3.	HIDRÓLISIS.	64
5.4.	FILTRACIÓN	65
5.5.	FERMENTACIÓN	66
5.6.	DESTILACIÓN	67
5.7.	ANÁLISIS ECONÓMICO	69
VI.	CONCLUSIONES.	70
VII.	RECOMENDACIONES.	72
VIII.	RESUMEN.	74
IX.	SUMARIO	75
X.	BIBLIOGRAFÍA	76
XI.	ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág.
Cuadro 1.	Composición físico-química de la cáscara de naranja	6
Cuadro 2.	Porcentaje de grados brix en el proceso de hidrolisis.	46
Cuadro 3.	Cantidad obtenida de la filtración versus la cantidad destilada	51
Cuadro 4.	Concentración de etanol realizada por cromatografía de gases	53
Cuadro 5.	Concentración de etanol de cada tratamiento obtenido con el picnómetro	54
Cuadro 6.	Informe de análisis bromatológico proximal de residuos de naranja variedad valencia, OSP, Ecuador, 2009.	56
Cuadro 7.	Porcentaje promedio de grados brix de muestras de residuos de naranja en el proceso de hidrólisis con <i>Aspergillus sp.</i>, IASA I, Ecuador, 2009.	57
Cuadro 8.	Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad filtrada de líquido fermentable, IASA I, Ecuador, 2009.	58
Cuadro 9.	Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad de alcohol obtenida de cada tratamiento, IASA I, Ecuador, 2009.	59
Cuadro 10.	Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad de etanol obtenida de cada bacteria, IASA I, Ecuador, 2009.	60
Cuadro 11.	Concentraciones de etanol alcanzados de cada tratamiento en el proceso de destilación, IASA I, Ecuador, 2009.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág.
Figura 1.	Oxidación del Etanol .	10
Figura 2.	<i>A. fumigatus</i> (a) Cabeza y vesícula (b) Colonias	15
Figura 3.	<i>A. niger</i> (a) Micrografía (b) Colonia	16
Figura 4.	<i>A. ochraceus</i> (a) Cabeza y vesícula (b) Colonias	17
Figura 5.	(a) <i>Escherichia coli</i> Bacteria Gram negativa	
	(b) <i>Clostridium perfringens</i> Bacteria Gram positivas	19
Figura 6.	Cadena productiva del Etanol carburante.	28
Figura 7.	Conversión de ácido pirúvico en etanol	29
Figura 8.	<i>A. niger</i>	35
Figura 9.	<i>A. ochraceus</i>	35
Figura 10.	<i>A. fumigatus</i>	36
Figura 11.	(a) <i>A. niger</i> (b) <i>A. ochraceus</i> (c) <i>A. fumigatus</i>	36
Figura 12	Izquierda <i>A. ochraceus</i> , centro <i>A. fumigatus</i> y derecha <i>A. niger</i>	37
Figura 13.	Cultivo de <i>Z. mobilis</i> en jugo de manzana.	38
Figura 14.	Prueba de Oxidasa negativa sin presencia de color.	38
Figura 15.	: Prueba de Catalasa (Presencia de burbujeo, CO ₂)	39
Figura 16.	Tinción Gram de <i>Z. mobilis</i>	39
Figura 17.	Cultivo de <i>Z. mobilis</i>	40
Figura 18.	Purificación <i>Z. mobilis</i>	40
Figura 19.	Medio líquido de proliferación masiva	41
Figura 20.	Residuos de naranja de despulpadora	42

Figura 21.	(a) Trituración de residuos (b) Material triturado	43
Figura 22.	Esquema de biorreactor para la hidrólisis	44
Figura 23.	Biorreactor para la hidrólisis	44
Figura 24.	Brixómetro.	46
Figura 25.	Filtración del mosto a través del tamiz de 600 milimicras	48
Figura 26.	Fermentación de líquido	49
Figura 27.	Equipo de destilación al vacío	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°		Pág.
Anexo 1.	GLUCOLISIS	86
Anexo 2.	ANALISIS BROMATOLÓGICO PROXIMAL DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES	87
Anexo 3.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA ESTANDAR	88
Anexo 4.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₁ (<i>S. cerevisiae</i>)	89
Anexo 5.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₁ (<i>Z. mobilis</i>)	90
Anexo 6.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₂ (<i>S. cerevisiae</i>)	91
Anexo 7.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₂ (<i>Z. mobilis</i>)	92
Anexo 8.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₃ (<i>S. cerevisiae</i>)	93
Anexo 9.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₃ (<i>Z. mobilis</i>)	94
Anexo 10.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₄ (<i>S. cerevisiae</i>)	95
Anexo 11.	CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₄ (<i>Z. mobilis</i>)	96
Anexo 12.	COTIZACIÓN MATERIALES Y REACTIVOS	97

I. INTRODUCCIÓN

La naranja, "*Citrus sinensis L.*", es uno de los principales productos agrícolas cultivados en el Ecuador teniendo una producción de alrededor de 150000 tm en zonas de clima cálido. Las provincias con mayor producción son Manabí, con 86000 tm y Los Ríos, con 57000 tm. En la Sierra, en cambio, la producción alcanzó 51000 tm y en la provincia de Bolívar alcanzó una producción de 40706 tm en el 2007 (EL HOY, 2008).

El consumo per cápita de la naranja en el Ecuador es de 4.14 kg, y se aprovecha cerca del 50% de la fruta; el otro 50%, que está constituido por cáscaras, semillas, entre otros, es eliminado. Por lo cual existe una gran cantidad de desechos que podrían tener un alto potencial para la utilización en otras áreas como la obtención de biocombustibles (EL HOY, 2008).

Los restos de la naranja contienen una gran cantidad de pectinas, celulosa y polisacáridos (conjunto de moléculas de azúcar unidas entre sí) que una vez fermentados y llevados a estrictos procesos de destilación, dan lugar a alcoholes de gran pureza idóneos para su uso en motores de explosión (EL MUNDO, 2007).

La combinación de etanol en un 85% y de gasolina en un 15% reduce un 80% la contaminación producida por los vehículos ya que un vehículo que utiliza gasolina emite 180 g de CO₂ por kilómetro recorrido, mientras que con el uso de bioetanol esas emisiones se reducen a 70 g; por este motivo la promoción del combustible a

partir de desechos de naranja no sólo tendría efectos ambientales positivos, sino que daría una salida económica al sector de la naranja (FEDGLP, 2007).

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

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

En este estudio se aprovechó los desechos agroindustriales de la naranja variedad valencia de la Provincia de Bolívar, para la obtención de etanol por medio de procesos de hidrólisis y fermentación, evitando la utilización de productos alimenticios.

1.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Generar un protocolo de obtención efectivo de bioetanol a partir de residuos de naranja "*Citrus sinensis L.*" provenientes del proceso agroindustrial.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los componentes de la materia prima mediante un análisis bromatológico.
- Realizar el pre-tratamiento de los desechos de la naranja para convertir celulosa, celobiosa y pectina en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas producidas por el hongo *Aspergillus sp.*
- Inocular *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* como diferentes ensayos para la fermentación de carbohidratos producto de la hidrólisis de desechos.
- Obtener bioetanol realizando destilación al vacío del producto obtenido de la fermentación.
- Determinar mediante cromatografía de gases la concentración de bioetanol de cada tratamiento.
- Determinar el tratamiento más económico para la extracción de bioetanol.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA NARANJA.

El naranjo (*Citrus sinensis*) es un árbol frutal del género *Citrus*, que forma parte de la familia de las *Rutáceas*. Su fruto es la naranja dulce, es un fruto *globoso u oval de 6-9 cm. de diámetro, con la corteza poco rugosa de color naranja. Pulpa sin vesículas oleosas. Semillas blancas* (WIKIPEDIA, 2008).

Originario de zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo, que desde allí fueron llevadas al norte de África y el sudeste de Europa y posteriormente fueron traídas a América por los europeos alrededor del año 1500.

Sus frutos se consumen en fresco o en forma de zumos. De las flores se obtienen aceites esenciales utilizados en perfumería, también tienen usos medicinales y los subproductos como cáscaras y bagazo son utilizados en la elaboración de piensos para animales.

Entre los cultivares de cítricas más comúnmente utilizadas en el país se menciona la naranja ‘Valencia’, la ‘Washington Navel’, ‘Pinneapple’ y algunas variedades criollas de naranja (ENCARTA, 2001).

2.1.1. Componentes Activos (fruto):

- Hesperidina.
- Pectina.
- Ácidos: Ácido acético (toda la planta), ascórbico, cítrico, ferúlico, glutamínico, linoleico, oxálico, serina, etc. (Fruto)
- Aminoácidos: Arginina, alanina, asparagina, histidina, serina, prolina (fruto).
- Alcaloides: Betaina, (fruto).
- Azúcares: “fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa”, (fruto).
- Esencias: Limonera (fruto).
- Vitaminas: Rivo flavina (B2), tiamina (B1), carotina (A), B6, ácido ascórbico (C), (fruto).
- Minerales y metales: Aluminio, calcio, bario, cadmio, cobre, cromo, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc (fruto).
- Proteínas.

(BOTANICAL-ONLINE, 2008)

2.1.2. Cáscara de Naranja:

2.1.2.1. Carbohidratos

El nivel de carbohidratos en los residuos de la cáscara de naranja es del 80.8%. Según los carbohidratos identificados son pectinas del 30-50%, azúcares (sacarosa,

fructosa, glucosa), hemicelulosa, del 10-20% y celulosa del 20-40%, (Essilfie, 1985).

En el cuadro número 1 Demain y Solomon (1986) indican que la cantidad de proteína encontrada en la cáscara de naranja es del 62.7% esto se debe a la variedad de naranja con que se realizó en los diferentes estudios ya que cada variedad de naranja posee diferente grosor en el endocarpio (Demain y Solomon. 1986 citado por Arrollo y Alexis, 2004).

Cuadro 1: Composición Físico-Química de la Cáscara de Naranja ((Demain y Solomon. 1986 citado por Arrollo y Alexis, 2004))

Componentes Principales (%)	Materia Seca	90,00
	Proteína	6,00
	Carbohidratos	62,70
	Grasas	3,40
	Fibra	13,00
	Cenizas	6,90
Minerales (%)	Calcio	2,00
	Magnesio	0,16
	Fósforo	0,10
	Potasio	0,62
	Azufre	0,06
Vitaminas (mg/kg)	Colina	770,00
	Niacina	22,00
	Ac. Pantoténico	14,96
	Riboflavina	22,20
Aminoácidos (%)	Arginina	0,28
	Cistina	0,11
	Lisina	0,20
	Metionina	0,11
	Triptófano	0,06

2.1.2.2. Enzimas

Entre las enzimas de la cáscara que han sido aislados en estado puro son, acetil esterasa, peroxidasa, phosphatasa y pectinesterasa (Essilfie, 1985).

2.1.2.3. Pigmentos

Los pigmentos dominantes en la cáscara de la naranja son carotenoides que se producen en los cromoplastos en flavedo de las células. Aproximadamente el 60% del total de carotenoides de color naranja están en la cáscara (Essilfie, 1985).

2.1.2.4. Ácidos

El principal componente de acidez en los residuos de la cáscara de naranja es el ácido cítrico, además de pequeñas cantidades de ácido tartárico, málico y oxálico. Estos ácidos orgánicos se han encontrado en la cáscara en forma de sal, lo que explica la razón por la cual el pH de la cáscara es de 5. En las variedades Navel y Valencia se ha registrado un pH de 4,6 (Essilfie, 1985).

2.2. ETANOL

El etanol es un alcohol que puede producirse por fermentación de productos azucarados. Concretamente, el proceso de producción del bioetanol es muy similar a la fermentación de bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino entre otras (Colina, 2000).

Actualmente se utiliza el etanol para mezclarlo con la gasolina. Las concentraciones de etanol varían generalmente entre 5 y 10%, pero pueden alcanzar hasta 85% para los vehículos pol carburantes especialmente diseñados para utilizar gasolina o una mezcla con alto contenido de etanol llamada "E85" (Marco, 2004).

El bioetanol se produce a partir de materiales con biomasa celulósica, abarcando este término toda la materia orgánica de origen vegetal, incluyendo también los materiales procedentes de su transformación natural o artificial. La biomasa puede provenir de varios tipos de cultivos (Colina, 2000).

2.3. ÁCIDO ACÉTICO.

Resultado de la oxidación del alcohol etílico a ácido o fermentación acética. Su fórmula es: $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$.

En boca se percibe como un sabor que recuerda el vinagre. Esta presente en las botellas con el corcho mal colocado o en mal estado. Normalmente se considera que un vino se ha estropeado cuando contiene 1,4 gramos de ácido acético por litro.

El ácido acético presente en el vino puede deberse a varios procesos químicos:

Se produce como un subproducto del final de la fermentación al transformarse parte del alcohol etílico debido a la acción de las Acetobacter, un género de bacterias aeróbicas, que transforman el etanol primero en acetaldehído y luego en ácido acético.

La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre los 28 y los 30°C.

El proceso es:

Etanol + oxígeno + bacterias = Acetaldehído = Acido Acético + Acetato de etilo (Figura 1)

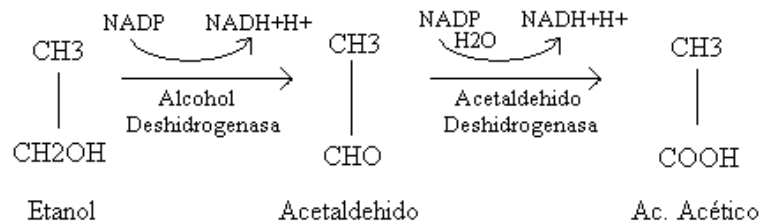


Figura 1 Oxidación del Etanol (Nelson y Cox, 2005).

Por esta razón es conveniente que el nivel de oxígeno sea bajo en esta etapa de la fermentación para que no actúen las bacterias.

- También puede aparecer por la degradación del ácido cítrico combinado con las lactobacterias del vino.
- Y también por la degradación de los azúcares del mosto.

El ácido acético está presente en el vinagre hasta en un 5%. En este caso se favorece el proceso de fermentación acética, (Diccionario del vino, 2005-2009).

2.4. FUENTES DE BIOMASA

2.4.1. Cultivos y Residuos Agrícolas

En este apartado se pueden incluir la caña de azúcar, la remolacha, trigo, maíz, cebada, cardo, sorgo dulce, etc. También se incluyen residuos agrícolas como restos de aceitunas, cascarilla de arroz, cáscara de frutos, etc. (Colina, 2000).

2.4.2. Residuos Forestales

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

2.4.3. Cultivos Energéticos

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

Las ventajas que tienen este tipo de cultivos son que pueden producirse en terrenos agrícolas no necesarios para alimentos y pastos. Además también se pueden plantar a lo largo de las riberas de los ríos, alrededor de lagos, en espacios entre otros

establecimientos agrícolas, bosques naturales o también en áreas pantanosas, (Colina, 2000).

2.4.4. Otras Fuentes de Biomasa

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

2.5. MICROORGANISMOS DE INTERÉS

2.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Es la más utilizada para la fermentación de azúcares a etanol ya que fermenta eficientemente los azúcares de seis carbonos a etanol. Pero la planta además de hexosas como la glucosa, también tiene pentosas como la xilosa. En azúcares de cinco carbonos, esta levadura no los puede utilizar como fuente de carbono.

Esto se traduce en una disminución del rendimiento del proceso ya que una parte de los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica no puede transformarse en etanol. Para fermentar pentosas hay que utilizar microorganismos separados, esto requiere dos tanques de fermentación distintos, uno para pentosas y otro para hexosas, aumentando el coste del proceso.

Algunos estudios se han basado en modificar el metabolismo de la levadura introduciéndole genes de otra levadura distinta que utiliza de forma natural las pentosas como fuente de carbono para que convierta la xilosa a etanol.

Como el interés mundial en la utilización del bioetanol como fuente de energía renovable aumenta cada vez más, se han estimulado estudios de coste y eficacia de los procesos industriales para la producción de bioetanol. Se han hecho investigaciones para obtener organismos fermentantes eficientes, substratos baratos de fermentación y condiciones ambientales óptimas para que la fermentación ocurra (FUNDEC, 2008).

2.5.2. Zymomonas mobilis

Se ha descubierto que hay una bacteria llamada *Z. mobilis* que tiene ventajas sobre *S. cerevisiae* en cuanto a productividad y tolerancia a etanol.

Sin embargo, la bacteria *Z. mobilis* también tiene el problema de que no fermenta los azúcares de cinco carbonos.

Los estudios que se han hecho son parecidos a los de *S. cerevisiae*. Se ha probado en modificar el metabolismo de *Z. mobilis* introduciéndole los genes necesarios para que pueda utilizar las pentosas (FUNDEC, 2008).

2.5.3. Aspergillus sp.

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Carrillo, s.f.).

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz, 1989).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos (Carrillo, s.f.).

2.5.3.1. *Aspergillus fumigatus*

Es un hongo filamentoso con conidióforos cortos (300 x 3-8 μm), de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar y sin ramificaciones. Nacen de una

célula base del micelio, ensanchando al final en una vesícula amplia, coronada de esterigmas en forma de redoma (20 a 30 μm de diámetro). Esterigmas (6-8 μm) de una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular y cubren parcialmente la superficie de la vesícula. Conidios verdes oscuros, unicelulares, redondos o seudoesféricos (2-3 μm de diámetro) formando cadenas largas que no se ramifican y permanecen unidos formando columnas (200 a 400 μm de longitud).

Colonias (Figura 2) de crecimiento rápido, planas, vellosas, compactas, blancas al comienzo, toman rápidamente un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado y consistente. La superficie muestra algunos pliegues y mechones vellosos blancos. Dorso incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. Su crecimiento es más rápido a 37 °C.

A. fumigatus es un saprobio cosmopolita que se ha aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materiales orgánicos en descomposición.

La especie es termotolerante y es capaz de crecer entre los 12 y los 57 °C. Es capaz de crecer en atmósferas que contengan un 100% de N y tolera atmósferas capnófilas in vitro (10% de CO₂). También es capaz de soportar una pasteurización a 63 °C durante 25 min. y provoca un calentamiento del heno y el maíz alterado que alcanzan una alta temperatura (50 °C).

Este hongo produce un importante número de metabolitos específicos que poseen efectos antibióticos y tóxicos, como esfingofunginas, espinulosina,

ferricrocina, festuclavina, filostina, fumagilina, fumiclavina, fumifungina, fumigacina (o ácido helvólico), fumigatina, fumitoxinas, fumitremorgina, fusígeno, gliotoxina, tripacidina, triptoquivalinas, verrucologeno (Pontón *et. al.*, 2002).

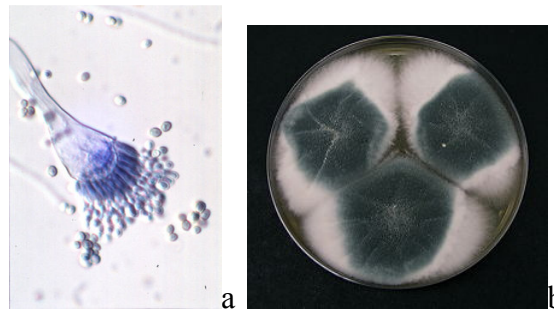


Figura 2 *A. fumigatus* (a) Cabeza y vesícula (b) Colonias

2.5.3.2. *Aspergillus niger*

Esta especie tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. A diferencia de otras especies, los reportes de *A. niger* (Figura 3) en el trópico no superan el 50% del total reportado, sin embargo se reconoce que es más común en regiones cálidas.

Es un hongo con hifas bien desarrolladas, profusamente ramificadas, hialinas y septadas. Como regla general las células son multinucleadas.

El micelio joven produce conidioforos en abundancia que surgen solitarios a partir de las hifas somáticas. Los conidióforos hialinos o pigmentados, son largos, erectos, cada uno terminando en una cabeza bulbosa llamada vesícula. Las vesículas son subsféricas, con 20-100 μm de diámetro. Un gran número de células

conidiogénicas se producen en la superficie de la vesícula multinucleada a medida que esta se desarrolla, por lo que se observan como cabezas conidiales radiadas. Métula presente y su tamaño es dos veces el tamaño de las fiálides. Las células conidiogénicas, sean primarias o secundarias, son típicas fiálides. A medida que las fiálides alcanzan la madurez, comienzan a producir conidios, uno tras otro, en cadenas. Los conidios son globosos, ornamentados, de color marrón, con paredes rugosas y con 3,5-5,0 μm de diámetro. Los conidios se forman en el extremo de las fiálides tubulares.

Como los conidióforos y los conidios se producen abundantemente, su color es predominante en la pigmentación de la colonia, apareciendo negras o marrón, (Useche *et. al.*, 2007).

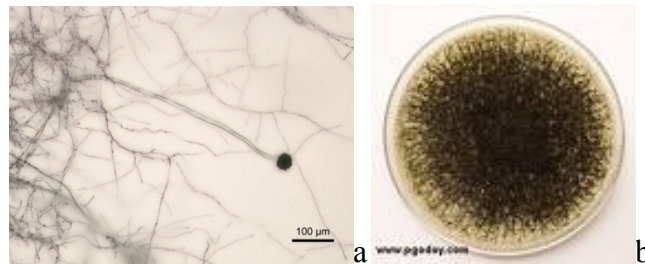


Figura 3: *A. niger* (a) Micrografía (b) Colonia

2.5.3.3. *Aspergillus ochraceus*

Es un hongo que presenta colonias con crecimiento limitado, es denominado “ochraceous” o rueda pulidora y presenta una pigmentación de colonia anaranjada o amarillenta (Figura 4_b).

Microscópicamente presenta cabezas conidiales radiadas, fraccionándose en varias columnas con la edad (Figura 4_a).

El pedúnculo del conidióforo es de color marrón, con una longitud comúnmente de 1.0 a 1.5 mm. Posee vesículas esféricas, delgadamente amuralladas con un diámetro de 35 a 50 μm . Las células conidiogénicas, sean primarias o secundarias, son biseriadas. La métula está cubriendo la vesícula entera. Posee conidias esférica a subesféricas, con una dimensión de 2.5 a 3.5 μm de diámetro, lisamente amuralladas. El esclerotio es de color rosado a vino-púrpura irregular en el fondo con una dimensión de hasta 1 mm de diámetro.

Las colonias crecen en solución de agar Czapeck con un crecimiento limitado llegando a un diámetro de colonia de 3 cm en el tiempo de 10 días a 2 semanas a una temperatura de 24 a 26 °C (MycoBank, 2000).

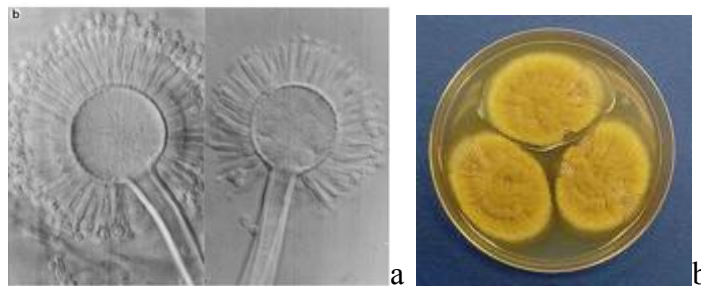


Figura 4: *A. ochraceus* (a) Cabeza y vesícula (b) Colonias

2.5.4. Pruebas de Identificación de Microorganismos

2.5.4.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram o coloración Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta (Figura 5_a) y Bacteria Gram negativa (Figura 5_b) a las que se visualizan de color rosa.

2.5.4.1.1. Protocolo

- Recoger muestras
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Este tinte (al final del procedimiento) dejará de color morado solo a las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua.
- Agregar lugol y esperar 30 segundos

- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol acetona y esperar 15 s
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina y esperar 1 min. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.
- Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión

(WIKIPEDIA, 2009).

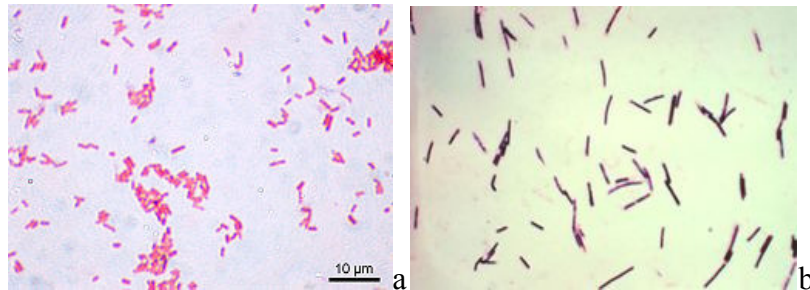


Figura 5: (a) Escherichia coli Bacteria Gram negativa (b) Clostridium perfringens Bacteria Gram positivas

2.5.4.2. Prueba de Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es Streptococcus.

Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

Streptococcus (-) de Micrococcus (+) y/o Staphylococcus (+). Bacillus (+) de Clostridium (-).

Lysteria monocytogenes (+) y/o Corynebacterium (+, con las excepciones de C.pyogenes y C.haemolyticum, ambos -) de Erysipelothrix (-)

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo dos técnicas:

2.5.4.2.1. Método del Portaobjetos (recomendado)

Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.

Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

2.5.4.2.2. Método del Tubo de Ensayo

Agregar 1ml de H₂O₂ al 30% directamente a un cultivo puro de agar en slant densamente inoculado.

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Precauciones: Si se utilizan para esta prueba cultivos procedentes de agar sangre, se debe tener la precaución de no retirar algo de agar con el asa al retirar la colonia ya que los eritrocitos del medio contienen catalasa y su presencia dará un falso resultado positivo (Cortés, 2002).

2.5.4.3. Prueba de la Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno (ver prueba de la catalasa) que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para:

- Identificar todas las especies de Neisseria (+)
- Diferenciar Pseudomonas de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto dimetilo (reactivo de Gordon y McLeod), pero es más caro. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

2.5.4.3.1. Método en placa directa

Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.

Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

2.5.4.3.2. Método indirecto sobre papel

Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri.

Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.

Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.

La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos (Cortés, 2002).

Para la producción de etanol se han utilizado tanto bacterias como levaduras. Entre estas últimas tenemos la más estudiada y utilizada, *S. cerevisiae* que en condiciones aeróbicas y en altas concentraciones de glucosa crece bien pero produce poco, en condiciones anaerobias por el contrario el crecimiento es lento.

2.6. ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

El proceso consta de tres etapas, cada una de las cuales debe ser optimizada:

- 1) Preparación de la solución de nutrientes
- 2) Hidrólisis
- 3) Fermentación
- 4) Balance de energía

(Mosquera, 2008).

2.6.1. Preparación de la Solución de Nutrientes

Se utilizan tres tipos de substratos:

- Raíces que contienen almidón, tubérculos o granos:

En cuanto al almidón de raíces, la planta tropical más importante es *Manihot esculenta*, de la que se obtiene harina de yuca, mandioca o de tapioca. Debido a que *S. cerevisiae* no tiene amilasas, el almidón debe ser hidrolizado. Las raíces primero se muelen, se exprimen y se desecan. El almidón se licua por ebullición a presión y luego se hidroliza enzimáticamente.

El grano que contiene almidón puede ser arroz, maíz, mijo y patatas entre otros. El grano puede ser utilizado entero o como en el caso del maíz triturado, el cual se empapa durante varias horas a 40-50° C, luego se tritura y se licua.

En plantas modernas se utilizan procesos continuos de licuefacción y sacarificación en los que primero se realiza una inyección de vapor (durante 3 minutos a 150° C) y luego un vacío para refrigerar. Durante el proceso se añaden alfa amilasas:

- Antes del calentamiento para reducir la viscosidad que se produce después del proceso de remojo.
- Después del calentamiento y del enfriamiento para la producción de glucosa (también se le añaden glucoamilasas).
- Melazas, jugo de caña de azúcar o de la remolacha

Las melazas son un subproducto de la cristalización del azúcar. Sin embargo tiene mejor utilidad como alimento animal o en otras fermentaciones.

Las melazas se obtienen de la remolacha calentando en agua rodajas de la misma.

En el caso de la caña de azúcar, el jugo se libera utilizando prensas. El residuo del prensado de los tallos de la caña se llama Bagazo, el 80% del cual puede ser quemado como fuente de energía en el proceso de destilación y el 20% restante puede ser fermentado después de la hidrólisis química.

Madera o residuos desechables del procesamiento de la misma.

La madera no ha sido utilizada todavía en la producción comercial de etanol pero tiene una gran importancia debido a la gran cantidad de residuos de madera disponibles.

Durante la producción de papel a partir de coníferas, se obtiene el líquido sulfítico residual que contiene hexosas fermentables. Sin embargo, este líquido cuando proviene de árboles de hoja caduca, no puede ser utilizado para procesos comerciales debido a la gran cantidad de azúcar en forma de pentosas, (Mosquera, 2008).

2.6.2. Hidrólisis Enzimática

La transformación de la celulosa, pectina, y otros azúcares presentes en el residuo de la fruta por vía enzimática, implica la acción de un sistema multienzimático, el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas:

Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa.

De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, los rendimientos que se obtienen utilizando hongos son superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos, principalmente de las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Streptomyces* (Villaseñor, 2007).

2.6.3. Fermentación

El proceso químico de producción de bioetanol se basa simplemente en una fermentación, que es un cambio químico en las sustancias de naturaleza orgánica llevado a cabo por la acción de enzimas. Lo que ocurre en una fermentación es que las sustancias orgánicas complejas se transforman en otras simples (Colina, 2000).

Como es el caso de la glucosa, que producto de la glucólisis (Anexo 1), se obtiene el piruvato que es transformado a acetaldehído y carbono dióxido por la piruvato descarboxilasa. Finalmente el acetaldehído es reducido por la enzima alcohol deshidrogenasa para producir etanol (Mosquera, 2008. Figura 6).

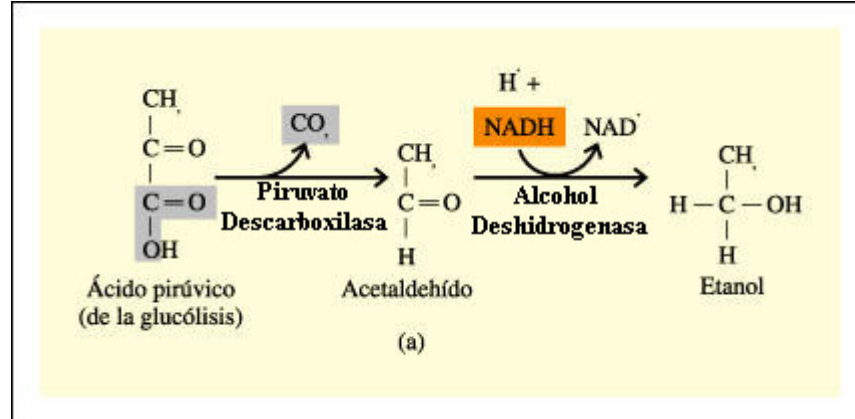


Figura 6: Conversión de Acido Pirúvico en Etanol (Carrasco, 2005)

El tipo de fermentación más importante es la fermentación alcohólica, en la que los azúcares simples como por ejemplo la glucosa se convierten en alcohol etílico y dióxido de carbono.

Ejemplos de fermentaciones alcohólicas pueden ser la elaboración de bebidas alcohólicas como cerveza, vino, whisky, y también se están produciendo actualmente a escala comercial mediante distintas fermentaciones, productos como la glicerina, propanona, butanol o ácido butírico.

La fermentación alcohólica es llevada a cabo mayoritariamente por levaduras, ya que una de las características más conocida de las levaduras es su capacidad para fermentar los azúcares para la producción de etanol. Las levaduras se han utilizado a lo largo de la historia para fermentar azúcares del arroz, del trigo, cebada y del maíz para producir bebidas alcohólicas y también en la industria panadera.

La mayoría de las levaduras que se cultivan son del género *Saccharomyces*. Concretamente la especie *S. cerevisiae* es una de las más utilizadas ya que participa en muchas de las fermentaciones que se mencionaron.

La diferencia es que cuando se termina de utilizar un lote de levadura destinado a la fabricación de pan, a usos médicos o a la fabricación de alimentos, el medio de cultivo en el que han crecido las levaduras se desecha.

Sin embargo, en la elaboración de bebidas alcohólicas y alcoholes industriales, el medio de cultivo es el producto final y en este caso son las propias levaduras las que se desechan o se pueden utilizar como pienso o alimento de animales, (Colina, 2000).

En la investigación de laboratorio con microorganismos pueden utilizarse productos químicos puros para la obtención de medios de cultivo. Pero en las fermentaciones industriales (Figura 7) se utilizan frecuentemente, por motivos económicos, sustratos muy complejos. La consecuencia de esto para el desarrollo de las cepas y el control de la fermentación son los siguientes:

- Es obligatorio un medio de cultivo óptimamente equilibrado para conseguir la máxima producción.
- La composición de los medios de cultivo debe ser constantemente adaptada al proceso de fermentación.

- En las fermentaciones de prueba en el laboratorio, debe examinarse tanto el rendimiento del producto como la recuperación del mismo.
- Si la represión catabólica o la represión por fosfato no pueden ser eliminadas por optimización de los nutrientes del medio o por manejo adecuado de la fermentación, deben utilizarse como cepas de producción mutantes.

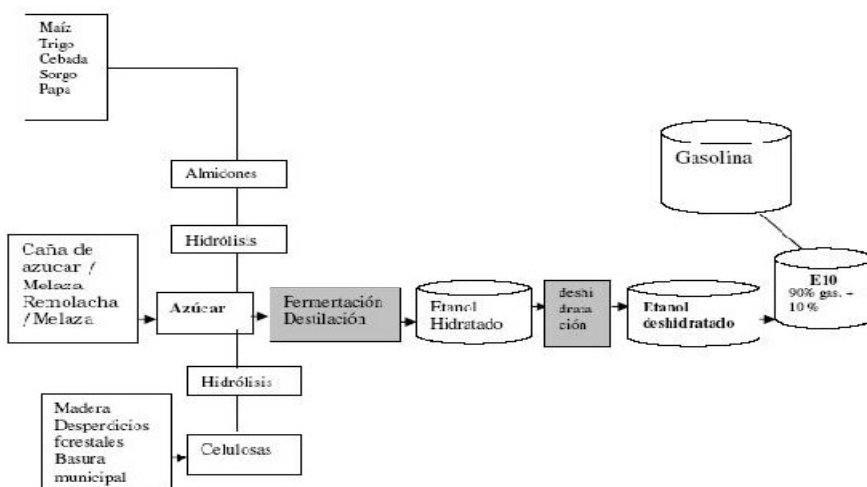


Figura 7: Cadena productiva del Etanol carburante (IICA, 2004).

2.6.4. Balace de Energía

Puesto que el etanol se produce como fuente de energía, el balance de energía del proceso total determina su viabilidad económica. La etapa de recuperación del producto, la destilación del etanol, es la que exige mayor energía de todo el proceso. Por ello, las mejoras en el proceso de destilación tendrán mayor influencia en el éxito del proceso total que las mejoras en la propia fermentación. Si el rendimiento de energía del etanol producido se relaciona con el aporte total de energía de las

distintas etapas del proceso, existe un balance aproximado o una pérdida neta de energía. Esto demuestra la importancia de optimizar al máximo todas las etapas del proceso (Mosquera, 2008).

2.7. DESTILACIÓN

Proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. El objetivo principal de la destilación es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles. En la evaporación y en el secado, normalmente el objetivo es obtener el componente menos volátil; el componente más volátil, casi siempre agua, se desecha. Sin embargo, la finalidad principal de la destilación es obtener el componente más volátil en forma pura. Por ejemplo, la eliminación del agua de la glicerina evaporando el agua, se llama evaporación, pero la eliminación del agua del alcohol evaporando el alcohol se llama destilación, aunque se usan mecanismos similares en ambos casos.

Si la diferencia en volatilidad (y por tanto en punto de ebullición) entre los dos componentes es grande, puede realizarse fácilmente la separación completa en una destilación individual. El agua del mar, por ejemplo, que contiene un 4% de sólidos disueltos (principalmente sal común), se puede purificar con facilidad evaporando el agua, y condensando después el vapor para recoger el producto: agua destilada. Para la mayoría de los propósitos, este producto es equivalente al agua pura, aunque en

realidad contiene algunas impurezas en forma de gases disueltos, siendo la más importante el dióxido de carbono.

Si los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla sólo difieren ligeramente, no se puede conseguir la separación total en una destilación individual. Un ejemplo importante es la separación de agua, que hierve a 100° C, y alcohol, que hierve a 78,5° C (a nivel del mar)¹. Si se hierve una mezcla de estos dos líquidos, el vapor que sale es más rico en alcohol y más pobre en agua que el líquido del que procede, pero no es alcohol puro. Con el fin de concentrar una disolución que contenga un 10% de alcohol (como la que puede obtenerse por fermentación) para conseguir una disolución que contenga un 50% de alcohol (frecuente en el whisky), el destilado ha de volver a destilarse una o dos veces más, y si se desea alcohol industrial (95%) son necesarias varias destilaciones (José, 2008).

2.7.1. Aparato de Destilación

Técnicamente el término alambique se aplica al recipiente en el que se hierven los líquidos durante la destilación, pero a veces se aplica a todo el aparato, incluyendo la columna fraccionadora, el condensador y el receptor en el que se recoge el destilado. Este término se extiende también a los aparatos de destilación destructiva o craqueo. Los alambiques de laboratorio están hechos normalmente de vidrio, pero los industriales suelen ser de hierro o acero.

¹Tomado de: Mosquera, M. 2008. Obtención de Etanol Anhidro a Partir de Materiales Feculentos de Producción Nacional: Maíz (*Zea mays*) y Yuca (*Manihot esculenta crantz*). Tesis. Ingeniería Biotecnología. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Biotecnología - ESPE

En los casos en los que el hierro podría contaminar el producto se usa a menudo el cobre, y los alambiques pequeños para la destilación de whisky están hechos por lo general de vidrio y cobre. A veces también se usa el término retorta para designar a los alambiques (José, 2008).

2.7.2. Destilación al Vacío

Un método para destilar sustancias a temperaturas por debajo de su punto normal de ebullición es hacer el vacío parcial en el alambique. Por ejemplo, la anilina puede ser destilada a 100° C extrayendo el 93% del aire del alambique. Este método es tan efectivo como la destilación por vapor, pero más caro. Cuanto mayor es el grado de vacío, menor es la temperatura de destilación. Si la destilación se efectúa en un vacío prácticamente perfecto, el proceso se llama destilación molecular. Este proceso se usa normalmente en la industria para purificar vitaminas y otros productos inestables. Se coloca la sustancia en una placa dentro de un espacio en el que se ha hecho el vacío y se calienta. El condensador es una placa fría, colocada tan cerca de la primera como sea posible. La mayor parte del material pasa por el espacio entre las dos placas, y por lo tanto se pierde muy poco (José, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, Hacienda el Prado y en los laboratorios de la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales y equipos

El equipo y los materiales de laboratorio utilizados fueron: autoclave, estufa, cámara de flujo laminar, estereoscopio, equipo de destilación al vacío semi-micro, refractómetro, microondas, cromatógrafo, bomba de vacío, balanza analítica, balanza digital, agitador magnético, cámara fotográfica, cajas petri, frascos de vidrio 150ml, tubos de ensayo, pipetas, vasos de precipitación, mechero, pinzas, aguja de disección, aza de platino, manta térmica, Erlenmeyers, papel parafilm, vidrio reloj, tamiz, tijeras, cuchillo, papel toalla, papel aluminio y horno eléctrico.

3.2.2. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: Kovacs, agua oxigenada al 30%, azul de metileno, violeta de genciana y lugol.

3.2.3. Sales minerales

Las sales minerales utilizadas fueron: Cloruro de potasio, Sulfato ferroso heptahidratado, Nitrato de sodio y Sulfato de magnesio heptahidratado, Fosfato dipotásico, Tetraciclina, Papa Agar Dextrosa y Bactopeptona.

3.2.4. Sustancias orgánicas

Dentro de las sustancias orgánicas se utilizó: Pulpa de Manzana, Residuos de Naranja, Sacarosa, Agar y Extracto de levadura.

3.2.5. Otros materiales

Dentro de otros materiales se utilizó: Membrana de nylon, Baldes con tapa de 9 litros, botellas de 3 litros, mangueras de suero, pistola de silicón, barras de silicón, alambre, calentador a gas, termómetro ambiental, tanque de gas y cubeta plástica.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Aislamiento de microorganismos

3.3.1.1. Aislamiento de Aspergillus

Las cepas de *A. niger* (Figura 8), *A. ochraceus* (Figura 9) y *A. fumigatus* (Figura 10) fueron aisladas del ambiente de los laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército.



Figura 8: *A. niger*



Figura 9: *A. ochraceus*



Figura 10: *A. fumigatus*

Para su identificación (Figura 11) se tomó en cuenta las claves de Carrillo del libro Los Hongos de los Alimentos y Forrajes.



Figura 11: (a) *A. niger* (b) *A. ochraceus* (c) *A. fumigatus*

3.3.1.2. Medio de cultivo

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

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

3.3.1.3. Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de esporas en solución líquida de Czapek (sin agar) con antibiótico evitando así la contaminación bacteriana, se las incubó durante 15 días a una temperatura de 27 °C en estufa. (Figura 12).



Figura 12: Izquierda *A. ochraceus*, centro *A. fumigatus* y derecha *A. niger*.

3.3.1.4. Aislamiento de *Zymomonas mobilis*

La cepa de *Z. mobilis* fue aislada en un medio a base de jugo de manzana, en frascos de 40 ml a temperatura ambiente durante 7 días en condiciones de microaerofilia (Figura 13).

Z. mobilis fue identificada a través de pruebas de catalasa, pruebas de oxidasa y tinción Gram.



Figura 13: Cultivo de *Z. mobilis* en jugo de manzana.

Z. mobilis en la prueba de oxidasa (Figura 14) dio un resultado negativo y la prueba de catalasa (Figura 15) fue positivo confirmando de esta manera lo mencionado por Cortes (2009), además se realizó una prueba de tinción Gram (Figura 16) complementaria en la que se confirmó que son Gram negativas.

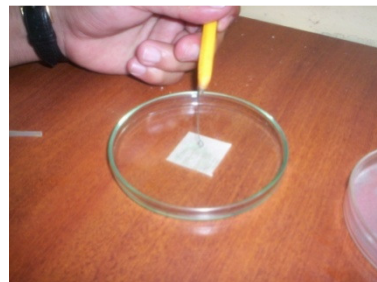


Figura 14: Prueba de oxidasa negativa sin presencia de color.



Figura 15: Prueba de catalasa (presencia de burbujeo, CO₂)

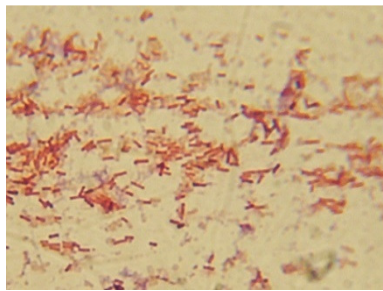


Figura 16: Tinción Gram de *Z. mobilis*

3.3.1.5. Medio de cultivo

El medio de aislamiento (Figura 17) se elaboró con 200 g de manzanas provenientes de huertos sin prácticas fitosanitarias, y se aforó a 250 ml con agua destilada estéril. El jugo obtenido se filtró y se colocó en frascos de 50 ml con una capacidad de reacción de 25 ml, a estos frascos se les tapó con papel aluminio para evitar la contaminación ambiental.

El medio de crecimiento (Figura 21) utilizado para el aislamiento fue a base de: Extracto de levadura 10 g/L; Agar agar 15 g/L, Bactopeptona 10 g/L y Manzana 200 g/L.

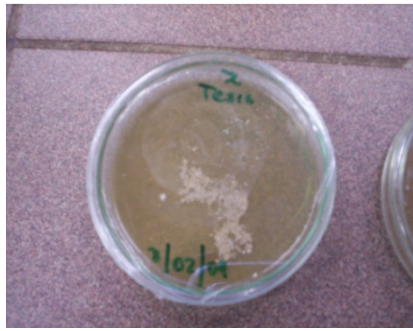


Figura 17: Cultivo de *Z. mobilis*

El medio de cultivo para purificaciones utilizado para el crecimiento de *Z. mobilis* (Figura 18), correspondió al medio utilizado en el medio de cultivo de *Aspergillus*.



Figura 18: Purificación *Z. mobilis*

3.3.1.6. Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de colonias correspondiente a un medio enriquecido que contuvo: 5g Bactopeptona, 5g de Dextrosa y 5g de Cloruro de Sodio (Figura 19), y se lo incubó a una temperatura de 37°C durante 7 días (Vieira, 2006).

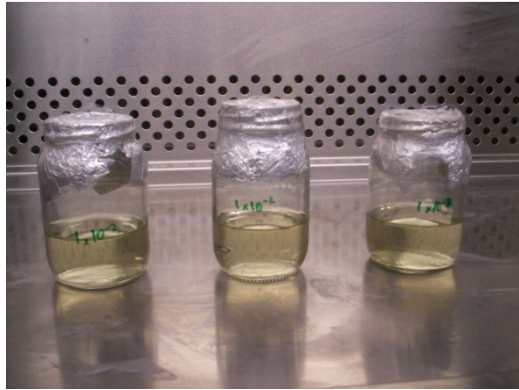


Figura 19: Medio líquido de proliferación masiva.

3.3.2. Obtención de residuos de naranja.

3.3.2.1. Determinación de los componentes de la materia prima.

De los desechos obtenidos de la procesadora (Figura 20) se tomó una muestra de 1 kg y se la envió al laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, en donde se realizó un examen bromatológico proximal de azúcares totales y reductores.

Con los resultados obtenidos se determinó que la muestra tuvo el 17,75% de azúcares totales de los cuales el 2,6% son azúcares reductores o fermentables.



Figura 20: Residuos de naranja de despulpadora

3.3.2.2. Pre-tratamiento de los desechos.

Los desechos de naranja se los trituró en un molino de motor, desmenuzándolos en pequeños trozos (Figura 21), facilitando así las operaciones posteriores. Una vez triturados los desechos se tomó una muestra de 10 g para calcular la cantidad de materia seca; para esto se sometió la muestra a una temperatura de 150° durante 30 minutos determinando así que el material contenía el 77,4% de humedad de esta manera se pudo calcular la cantidad de materia seca que se procesó para cada unidad experimental. Posteriormente se pesó 500 g de materia seca (2,2 kg de residuos triturados) para cada unidad experimental.



Figura 21: (a) Trituración de residuos (b) Material triturado

3.3.3. Hidrólisis

Para el proceso de hidrólisis se montó biorreactores de 8000 ml para cada unidad experimental. En cada biorreactor se colocó 500 g de materia seca y una solución minerales de 60 g de nitrato amónico, 4 g de fosfato potásico y 4 g de sulfato de magnesio por kg de materia seca (Lequerica, 1980; Hernández, 1975).

Los biorreactores se fabricaron en base a lo sugerido por Mosquera (2008), es decir que cada biorreactor tuvo 2 mangueras, una para el escape de gases el cual debía estar conectado a una trampa de CO₂ y la otra para la toma de muestras como se indica en la Figura 22. Además los fermentadores fueron sellados con silicona y parafilm para mantener las condiciones anaerobias del proceso (Figura 23).

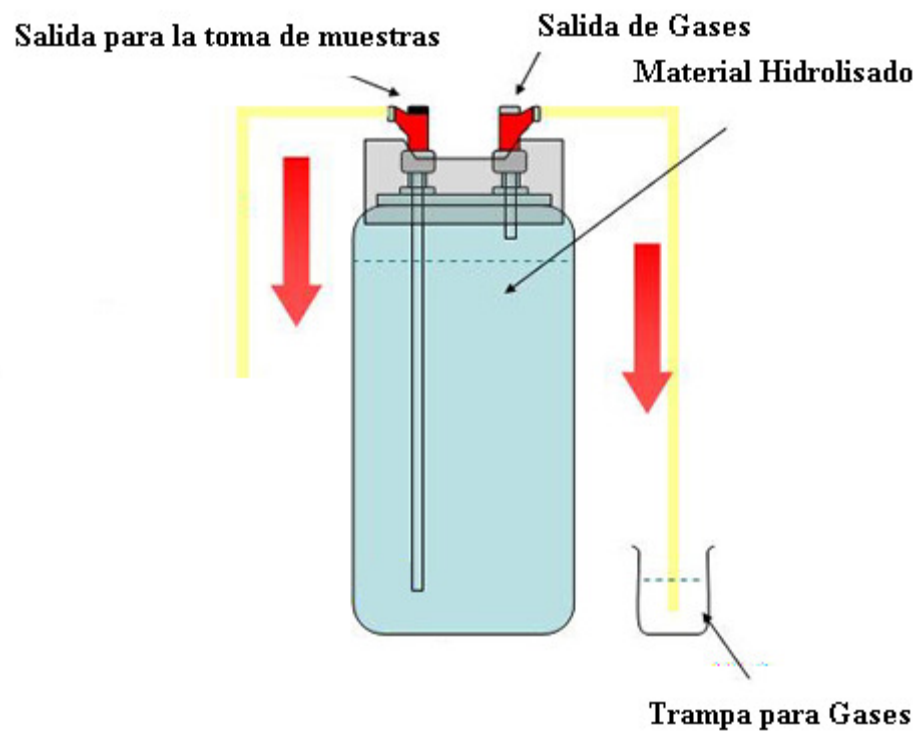


Figura 22: Esquema de biorreactor para la hidrólisis.



Figura 23: Biorreactor para la hidrólisis.

En cada unidad experimental se inoculó una de las cepas aisladas de *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. fumigatus* obteniendo así tres tratamientos con tres repeticiones. Y el tratamiento testigo que no se inoculó ningún tipo de microorganismo, para evaluar la hidrólisis de cada tratamiento.

Se decidió trabajar con *Aspergillus* porque produce las enzimas como Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa, exoglucanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para producir glucosa y endopoligalacturonasa que ataca los enlaces α -(1,4) que unen a las unidades de ácido D-galacturónico (UCLM, 2007).

Este hongo también presenta crecimiento rápido y abundante durante las primeras 48 horas, tiempo en el cual empieza su actividad produciendo gran cantidad de pectinasas, por lo que se degrada rápidamente la pectina presente en los residuos de naranja (Trejo-Hernández *et. al.*, 1994).

El proceso de hidrólisis se lo realizó a temperatura ambiente, para mejorar el proceso de hidrólisis se realizó agitación manual durante los días que duró este proceso, para aumentar el crecimiento de las cepas inoculadas.

Se utilizó un brixómetro o refractómetro (Figura 24). Para determinar el porcentaje de azúcares fermentables en cada biorreactor. Estos datos fueron tomados cada 48 horas aproximadamente, los cuales se detallan en el Cuadro 2:

Cuadro 2: Porcentaje de grados brix en el proceso de hidrolisis.

Tratamiento	Repetición	Grados Brix						
		06/03	09/03	11/03	13/03	16/03	18/03	20/03
1	1	5,1	6	6	5,8	5,8	6	5,8
1	2	5,2	5	6,2	5,4	6	5	5,2
1	3	5	6	6	7,2	5,8	5,6	5,2
2	1	5	5	6,2	6,2	6,8	6	6,2
2	2	5,1	5,8	5,2	6,2	5,6	5,4	5,6
2	3	5,2	5	6	6	6	5,2	5,6
3	1	5,2	6	5	5,4	6,2	6	6,2
3	2	5,2	5	5,8	6,6	6,4	6,6	6
3	3	5,1	5	5,8	6,2	5,4	5,2	5,2
T	1	6,2	6	6	5,6	4,4	6	5,4

Tratamiento 1 cepa de *A. ochraceus* tratamiento 2 *A. niger* y el tratamiento 3 con la cepa de *A. fumigatus*



Figura 24: Brixómetro.

Para comparar la capacidad de hidrólisis de cada tratamiento se realizó un análisis de varianza utilizando el siguiente modelo matemático:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = Variable aleatoria

μ = Media general

τ_i = Efecto de i-esimotratamiento

e_{ij} = Error experimental

3.3.4. Filtración

Una vez culminada la fase de hidrólisis se prosiguió a realizar la filtración, recolectando la parte líquida del mosto, este proceso se lo realizó en dos etapas: En la primera se filtró el material a través de una membrana nylon para retirar las partículas de mayor tamaño. En la segunda el líquido recolectado en la primera etapa se lo filtró por un tamiz de 600 milimicras (Figura 25) obteniendo así una buena calidad de material fermentable en cada una de las unidades experimentales.



Figura 25: Filtración del mosto a través del tamiz de 600 milimicras.

3.3.5. Fermentación

En la etapa de fermentación se midió y dividió en cantidades iguales a cada una de las repeticiones para comparar la capacidad de fermentación que posee tanto *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

Para *S. cerevisiae* se preparó un medio de activación con 40g de sacarosa, 250 cm³ de agua elevada a 35 °C para 175 g. de levadura (Levapan). Una vez activada la levadura se inoculó una concentración aproximada de 0,5 a 1 g de levadura por L de material fermentable (Mosquera, 2008), inoculando a la mitad del líquido fermentable recolectado de cada tratamiento.

Para *Z. mobilis* se utilizó el material aislado en laboratorio, utilizando 20ml. del inóculo preparado para cada unidad experimental designada para dicha bacteria.

Una vez realizada la siembra en el material fermentable se colocó este material a una temperatura de 30° C para lograr un buen desarrollo de *S.cerevisiae* y de *Z. mobilis* (Vieira, 2006). Este proceso duró 8 días, periodo en el cual, se realizó agitación manual durante 5 minutos cada día (Figura 26).

La fermentación se llevó a cabo en reactores de 3000 ml de capacidad, los tapones de los reactores tuvieron una salida para la evacuación de los gases, conectada a una trampa de agua para la liberación de CO₂ (Mosquera ,2008).

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



Figura 26: Fermentación de líquido

Para comparar la capacidad de síntesis y la cantidad de fermento de cada tratamiento se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo matemático:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = Variable aleatoria

μ = Media general

τ_i = Efecto de i-esimotratamiento

e_{ij} = Error experimental

Además se realizó pruebas de comparación de medias de Tukey al 5% y prueba de normalidad y homocedasticidad para verificar los supuestos del análisis de varianza.

Para realizar dicho análisis de varianza se tomó en cuenta la cantidad de mosto que entró a fermentar en cada unidad experimental y lo que se obtuvo de la misma como se detalla en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Cantidad obtenida de la filtración versus la cantidad destilada

Tratamiento	Repeticiones	Bacteria	Cant. Filt (ml.)	Cant. Obt. del Dest. (ml.)
1	1	Zymomonas	1362,5	5,5
1	2	Zymomonas	1815	10,3
1	3	Zymomonas	1380	4,3
2	1	Zymomonas	1610	12,4
2	2	Zymomonas	1465	10
2	3	Zymomonas	1885	21,3
3	1	Zymomonas	1325	12,2
3	2	Zymomonas	1315	9,3
3	3	Zymomonas	1360	12,7
T	1	Zymomonas	835	3,9
1	1	Saccharomyces	1362,5	6,5
1	2	Saccharomyces	1815	6,1
1	3	Saccharomyces	1380	10,1
2	1	Saccharomyces	1610	10,5
2	2	Saccharomyces	1465	9
2	3	Saccharomyces	1885	12,5
3	1	Saccharomyces	1325	5,2
3	2	Saccharomyces	1315	4,4
3	3	Saccharomyces	1360	5,2
T	1	Saccharomyces	835	3,7

3.3.6. Destilación

Se utilizaron dos destiladores de tipo semi-micro (Figura 27), para lo cual fue necesario establecer la temperatura de ebullición del etanol que presentó cada equipo, ya que se trabajó con dos bombas de vacío diferentes, por lo que se tomó una muestra de etanol absoluto (95%) y se lo destiló tomando datos de temperatura de cada uno, en el primero la temperatura fue de 42°C, mientras que en el segundo fue de 59°C.

Una vez determinada la temperatura de ebullición se destiló cada una de las unidades experimentales, y se recolectó el alcohol en envases herméticos para su posterior análisis.

Con el alcohol obtenido se realizaron corridas de cromatografía de gases a una repetición de cada tratamiento, incluyendo a los testigos tanto de *S. cerevisiae* como de *Z. mobilis* (Cuadro 4).

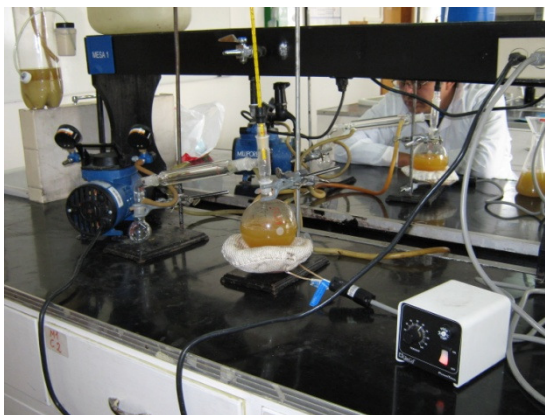


Figura 27: Equipo de destilación al vacío.

Cuadro 4: Concentración de etanol realizada por cromatografía de gases

Tratamiento	Bacteria	Concentración
T	Saccharomyces	14,51
T	Zymomonas	18,05
1	Saccharomyces	20,82
1	Zymomonas	12,17
2	Saccharomyces	30,32
2	Zymomonas	13,46
3	Saccharomyces	21,63
3	Zymomonas	10,09

Para determinar la concentración de etanol de todas las unidades experimentales, se utilizó el método del picnómetro, pero por la baja cantidad de alcohol recolectada no se realizó a todas las muestras; los datos recolectados se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Concentración de etanol de cada tratamiento obtenido con el picnómetro

Trat.	Rep.	Bacteria	Peso (g.)	Volumen (ml.)	Densidad (g/ml)	Concentración (%)
1	1	Zymomonas	2,068	2	—	—
1	2	Zymomonas	4,536	5	0,9072	51,65
1	3	Zymomonas	1,98	2	—	—
2	1	Zymomonas	4,555	5	0,911	50,66
2	2	Zymomonas	4,544	5	0,9088	51,65
2	3	Zymomonas	4,535	5	0,907	52,15
3	1	Zymomonas	4,546	5	0,9092	51,65
3	2	Zymomonas	4,557	5	0,9114	50,66
3	3	Zymomonas	4,537	5	0,9074	52,65
T	1	Zymomonas	2,067	2	—	—
1	1	Saccharomyces	4,534	5	0,9068	52,65
1	2	Saccharomyces	4,518	5	0,9036	53,65
1	3	Saccharomyces	4,517	5	0,9034	53,65
2	1	Saccharomyces	4,519	5	0,9038	53,65
2	2	Saccharomyces	4,52	5	0,904	53,65
2	3	Saccharomyces	4,531	5	0,9062	52,65
3	1	Saccharomyces	2,065	2	—	—
3	2	Saccharomyces	2,054	2	—	—
3	3	Saccharomyces	2,06	2	—	—
T	1	Saccharomyces	1,02	1	—	—

Al no realizar esta prueba a todas las unidades experimentales se decidió efectuar una comparación con los análisis obtenidos de la cromatografía de gases.

3.3.7. Análisis económico

Se utilizó el análisis de presupuesto parcial de Perrin et. al., (1976) para la valoración de la rentabilidad de los diferentes tipos de microorganismos, considerando los costos variables de cada tratamiento, así como los costos en cada fase de pre-tratamiento, de fermentación y de destilación.

IV. RESULTADOS

4.1.COMPOSICIÓN DE LA MATERIA PRIMA.

Los resultados del análisis de la muestra enviada al Laboratorio de Alimentos de la Universidad Central (OSP), indicaron 17,75% de azúcares totales (Cuadro 6), de los cuales el 2,6% son azúcares reductores o fermentables. (ANEXO 2).

Cuadro 6. Informe de análisis bromatológico proximal de residuos de naranja variedad valencia, OSP, Ecuador, 2009.

Parámetros	Unidad	Resultado	Método
Azúcares totales	g/100g	17.75	MAL-53
Azúcares reductores	g/100g	2.60	MAL-53

4.2. ESPECIE DE ASPERGILLUS MÁS EFECTIVO EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS.

Al analizar el porcentaje de grados brix en las diferentes muestras de material en el proceso de hidrólisis se determinó que no existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.9993$). Al realizar la prueba de Duncan al 5 % tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje promedio de grados brix de muestras de residuos de naranja en el proceso de hidrólisis con *Aspergillus sp.*, IASA I, Ecuador, 2009.

Tratamiento	° Brix
T₁ (<i>A. ochraceus</i>)	5.68±0,11 A
T₂ (<i>A. niger</i>)	5.68±0,12 A
T₃ (<i>A. fumigatus</i>)	5.69±0,12 A
T₄ (Testigo)	5.66±0,23 A
CV	9,56
P	0,9993

4.3. ESPECIE DE ASPERGILLUS MÁS APROPIADO PARA PROCESO DE FILTRACION.

La cantidad de líquido fermentable obtenida mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.0001$). El tratamiento T₂ (muestra hidrolizada con *A. niger*) presentó mayor cantidad de líquido fermentable que los tratamientos T₄ (muestra hidrolizada sin la inoculación de microorganismos) y T₃ (muestra hidrolizada con *A. fumigatus*) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad filtrada de líquido fermentable, IASA I, Ecuador, 2009.

Tratamiento	Cantidad Filtrada
T₁ (<i>A. ochraceus</i>)	1519,17 \pm 93,61 B C
T₂ (<i>A. niger</i>)	1653,33 \pm 77,90 C
T₃ (<i>A. fumigatus</i>)	1333,33 \pm 8,63 B
T₄ (Testigo)	835,00 \pm 0,00 A
CV	11,65
P	0,0001

4.4. MICROORGANISMO MÁS EFECTIVO EN LA OBTENCIÓN DE ALCOHOL.

En el Cuadro 9 se puede apreciar que existieron diferencias significativas en la cantidad de alcohol obtenida de cada tratamiento ($p= 0,0235$), la mayor cantidad obtenida fue del tratamiento T₂ (Material hidrolizado con *A. niger*). Mientras que los tratamientos T₄ (material hidrolizado sin la inoculación de microorganismos externos) y T₃ (material hidrolizado con *A. ochraceus*) fueron los tratamientos que presentaron menor cantidad de etanol.

Cuadro 9. Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad de alcohol obtenida de cada tratamiento, IASA I, Ecuador, 2009.

Tratamiento	Cantidad Obtenida
T₁(<i>A. ochraceus</i>)	7,13 \pm 1,02 A
T₂(<i>A. niger</i>)	12,62 \pm 1,82 B
T₃(<i>A. fumigatus</i>)	8,17 \pm 1,53 A B
T₄ (Testigo)	3,80 \pm 0,10 A
CV	40,46
P	0,0235

4.5. ENSAYO MÁS EFECTIVO PARA LA OBTENCION DE ALCOHOL.

Para la fermentación se utilizó *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* en cada ensayo Cuadro 10, en donde se puede apreciar que no existieron diferencias significativas en la obtención de etanol ($p=0.1970$). Al realizar la prueba de Duncan al 5 % tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 10. Promedio (\pm) del error estándar de la cantidad de etanol obtenida de cada bacteria, IASA I, Ecuador, 2009.

Ensayo	Cantidad Obtenida
Saccharomyces	7.32 A
Zymomonas	10.19 A
CV	23.15
P	0.1970

4.6. TRATAMIENTO MÁS EFECTIVO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL CON LA MAYOR CONCENTRACION PROMEDIO.

Al realizar una corrida de cromatografía de gases (ANEXOS 3 - 11) de cada uno de los tratamientos (Cuadro 11), se pudo determinar que el ensayo fermentado con *S. cerevisiae* presentó mayor concentración de etanol. Dentro de este ensayo el tratamiento T₂ (Material hidrolizado con *A. niger*) fue el que alcanzó mayor concentración de etanol (30,32%).

Cuadro 11. Concentraciones de etanol alcanzados de cada tratamiento en el proceso de destilación, IASA I, Ecuador, 2009.

Tratamiento	Microorganismo	Concentración (%)
T₁ (<i>A. ochraceus</i>)	Saccharomyces	20,82
T₁ (<i>A. ochraceus</i>)	Zymomonas	12,17
T₂ (<i>A. niger</i>)	Saccharomyces	30,32
T₂ (<i>A. niger</i>)	Zymomonas	13,46
T₃ (<i>A. fumigatus</i>)	Saccharomyces	21,63
T₃ (<i>A. fumigatus</i>)	Zymomonas	10,09
T₄ (Testigo)	Saccharomyces	14,51
T₄ (Testigo)	Zymomonas	18,05
Corrida Estándar		7,85

4.7. TRATAMIENTO MÁS ECONÓMICO EN LA OBTENCIÓN DE ETANOL.

Al realizar el análisis económico el tratamiento T₂ Saccharomyces (Materia hidrolizado con *A. niger* y fermentado con *S. cerevisiae*) presentó mayor beneficio bruto. Mientras que los tratamientos T₄ Zymomonas (Tratamiento hidrolizado sin la inoculación de microorganismo y fermentado con *Z. mobilis*) y T₁ Zymomonas (Tratamiento hidrolizado con *A. ochraceus* y fermentado con *Z. mobilis*) fueron los tratamientos de menor beneficio bruto. (Cuadro 12)

Cuadro 12. Análisis económico de los tratamientos en estudio

Trat.	Microorganismo	Costos Variables \$	Producción (Its)	Costo Comercia l (\$/lt)	Beneficio Bruto \$
1	Saccharomyces	0,22	0,001658295	0,60	0,000994977
2	Saccharomyces	0,22	0,003404351	0,60	0,002042611
3	Saccharomyces	0,22	0,001123242	0,60	0,000673945
4	Saccharomyces	0,20	0,000565126	0,60	0,000339076
1	Zymomonas	0,21	0,000858305	0,60	0,000514983
2	Zymomonas	0,21	0,002063867	0,60	0,00123832
3	Zymomonas	0,21	0,0012108	0,60	0,00072648
4	Zymomonas	0,19	0,000741	0,60	0,0004446

V. DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DE LOS RESIDUOS DE NARANJA

Tomando en cuenta que cada variedad de naranja difiere en la cantidad de azúcares presentes en la cáscara, fue necesario realizar un análisis bromatológico proximal, para determinar la cantidad de azúcares totales y reductores que posee la variedad valencia, proveniente de la provincia de Bolívar. La muestra enviada al Laboratorio de Alimentos de la Universidad Central, OSP, (Cuadro 6) mostró un 17,75% de azúcares totales y un 2,6% de azúcares reductores, que al comparar con lo mencionado en el trabajo realizado por Essilfie (1985), indica un 10 al 20% de azúcares totales, corroborando los resultados obtenidos.

Al tener una cantidad baja de azúcares reductores se dificulta el proceso de fermentación alcohólica, por este motivo se sometió este material a un proceso de hidrólisis que permita el desdoblamiento de carbohidratos en azúcares reductores, como es el caso de la pectina, que según Essilfie (1985), está presente entre el 30 y el 50 % de los residuos.

5.2. PRE-TRATAMIENTO.

Para someter a un proceso de hidrólisis, los residuos de naranja deben ser tratados para que el agente pueda actuar con facilidad, por este motivo se trituró el material para aumentar la superficie de contacto de los microorganismos y el sustrato y, de esta forma mejore su acción en el proceso. Como indica Bustamante *et. al.*,

(2008) en el trabajo “OBTENCION DE BIOPROTEINA A PARTIR DE BAGAZO DE NARANJA (*Citrus sinensis*) CON *Aspergillus niger*”, además de realizar el proceso de trituración se recomienda un desamargado de la cáscara con sal muera (2% NaCl), para lo cual se realizó una prueba con resultados bajos, puesto que al momento que se ejecutó el lavado se perdió los azúcares presentes en los desechos y el NaCl quedó impregnado en los residuos. Esto no permitió el desarrollo de *Aspergillus* bloqueando el proceso de hidrólisis. Culminada la prueba correspondiente se realizó únicamente el proceso de trituración

5.3.HIDRÓLISIS.

Tomando en cuenta que existen diferentes tipos de hidrólisis se decidió realizar la hidrólisis enzimática por presentar costos más bajos y sus resultados son muy confiables. Para esto se utilizaron tres especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*); ya que este hongo tiene la capacidad de producir enzimas Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa (UCLM, 2007) y también produce pectinasas que desdoblan la pectina (Trejo-Hernández *et. al.*, 1994), que es uno de los componentes de mayor abundancia en la cáscara de naranja (30-50% . Essilfie 1985).

En este proceso se observó la actividad enzimática mediante el uso del refractómetro, ya que al existir un incremento de azúcares se pudo evidenciar que las diferentes especies de *Aspergillus* estaban desdoblando las cadenas de pectina y celulosa del mosto. Al analizar el Cuadro 7, en el proceso de hidrólisis no existieron diferencias significativas ya que el refractómetro no mide la presencia ciertos tipos

de azúcares como es el caso del ácido galacturónico (azúcar ácido fermentable) producto de la hidrólisis de la pectina; sin embargo el porcentaje de azúcares que se encontraron en el mosto (azúcares reductores 5,6%) fueron superiores a las del análisis bromatológico proximal (azúcares totales 17,76% y azúcares reductores 2,6%) (Cuadro 6), este incremento justifica el proceso realizado con cualquiera de las especies del hongo *Aspergillus*.

5.4.FILTRACIÓN

Este proceso se lo realizó por la cantidad de sólidos que presentó el mosto, esto se debe a fragmentos de la cadena de celulosa que no pudieron ser degradados en la hidrólisis enzimática.

Los resultados que se obtuvieron fueron distintos en cada tratamiento como se puede observar en el Cuadro 8, en donde el tratamiento T₂ (hidrolizado con *A. niger*) produjo mayor cantidad de dicho líquido (1653,33 ml) por el rápido y abundante crecimiento que presentó *A. niger* en el mosto, siendo así que a partir de las primeras 48 horas empieza su actividad produciendo gran cantidad de pectinasas que degrada rápidamente la pectina presente en los residuos. Como se lo menciona en el trabajo realizado en México por el Instituto de Micología Neotropical Aplicada (Trejo-Hernández *et. al.*, 1994).

También es importante que el líquido fermentable no permanezca mucho tiempo expuesto al ambiente por seguridad evitando así que agentes externos no

controlados empiecen el proceso de fermentación a ácido acético. Por ello para su transporte se almacenó en botellas plásticas de las que se podía extraer el aire.

Cabe señalar que el material sólido recolectado en este proceso puede ser utilizado como inóculo inicial para realizar compostaje, ya que este material es rico en microorganismos degradadores (*Aspergillus sp*, levaduras, etc.) de materia orgánica, cerrando el ciclo y aprovechando al máximo estos residuos.

5.5.FERMENTACIÓN

Para someter al proceso de fermentación el mosto se podría esterilizar para eliminar el riesgo de presencia de microorganismos o restos de sustancias enzimáticas que pudieran impedir el normal desarrollo de los microorganismos fermentadores, lo que no es recomendable puesto que al alcanzar los 121° C (temperatura de esterilización) se podrían degradar los azúcares reductores o sus derivados.

Los resultados obtenidos en este proceso no fueron los esperados por no existir diferencias significativas entre los dos microorganismos utilizados en la fermentación (*S. cerevisiae* y *Z. mobilis*) (Cuadro 10), como se menciona en la investigación titulada “Producción de etanol a partir de yuca “*Manihot esculenta*” utilizando *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*” en la que aseguran tener mejores resultados con *Z. mobilis*, sin embargo no se menciona que para obtener los resultados esperados es necesario co-inmovilizar *A. niger* para que el aprovechamiento de azúcares pueda llegar a 50 g/L, mientras que lo normal es de 14 a 30 g/L. (Nowak y Roszak, 1997).

Por otro lado tampoco se analiza el sinergismo que producen *A. niger* con *S. cerevisiae* al encontrarse en un mismo sustrato (Useche *et. al.*, 2003); por lo que al realizar un análisis detallado (Cuadro 9) se determinó que el tratamiento T₂ (hidrolizado con *A. niger*) generó un promedio de 12.62 ml de alcohol mayor al producido por los dos *Aspergillus* restantes estudiados, eso también se debe a la gran capacidad de hidrólisis que posee *A. niger*, como lo mencionado por Trejo-Hernandez en 1994, indicando que *A. niger* produce gran cantidad de pectinasas ayudando muy eficientemente a hidrolizar pectina. Además mientras más descende el pH en el mosto mayor es el crecimiento de *A. niger* impidiendo el crecimiento de otros microorganismos (Bustamante Z, 2008).

5.6.DESTILACIÓN

Para realizar la fase de destilación se optó por utilizar equipos de destilación semi-micro, ya que la cantidad de alcohol recolectada fue baja y al utilizar equipos más grandes el alcohol se perdería por fugas a lo largo del sistema.

Además se generó un vacío en este equipo para bajar el punto de ebullición del etanol, evitando así pérdidas por evaporación, debido a la pequeña cantidad de alcohol prevista en el proceso de fermentación por la baja concentración de azúcares reductores (5,6%) detallados en el Cuadro 2. Cabe señalar que la destilación al vacío se la realizó porque la investigación fue a semi-microescala. A nivel industrial esta destilación elevaría los costos.

Una vez realizada la destilación, se determinó la concentración de etanol por medio de cromatografía de gases, por ser la mejor opción por su alta precisión. El

método por picnómetro se descartó, debido a su poca precisión y a las cantidades bajas recolectadas, lo que impidió calcular la concentración de etanol con métodos tradicionales como el alcoholímetro.

Por motivos de alto costo económico y carencia de servicios de laboratorio en otras instituciones, se decidió tomar una muestra por tratamiento de cada ensayo para realizar la prueba de cromatografía, por este motivo al no tomar en cuenta las repeticiones no se realizó un análisis de varianza, optando por efectuar una comparación directa de los resultados obtenidos.

Al observar el Cuadro 11 se determinó que al interactuar *A. niger* con *S. cerevisiae* se obtiene mejores resultados en su concentración, esto se debe a que al co-cultivarse *A. niger* con *S. cerevisiae* incrementa la producción de etanol, como se indica en el Catalogo de la Biodiversidad de Colombia (Useche *et. al.*, 2003). Además al comparar estos resultados con los obtenidos en la fase de fermentación, estos no se corroboran con lo mencionado en la investigación “Producción de etanol a partir de yuca “*Manihot esculenta*” utilizando *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*”, cuyos resultados difieren a los obtenidos en esta investigación, como se mencionó anteriormente, es necesario co-inmovilizar a *A. niger* para obtener buenos resultados con *Z. mobilis*; mientras tanto esta bacteria no se recomienda para trabajar con residuos de naranja por no ser compatible con *Aspergillus* durante el proceso de hidrólisis, ya que incluso después del proceso *Aspergillus* continúa hidrolizando el sustrato.

5.7. ANÁLISIS ECONÓMICO

Los costos de esta investigación fueron elevados (Cuadro 12) en comparación con extracciones de etanol que ya se están realizando en Estados Unidos con maíz o en Brasil con caña de azúcar (Beltrán, 2009). Se debe tomar en cuenta que la fermentación a partir de residuos del proceso de industrialización de la naranja, no debe compararse con la obtención de etanol a partir de productos para uso industrial o de consumo, ya que los residuos de naranja son desechos.

La metodología utilizada en esta investigación, no pone en riesgo la seguridad alimentaria por la utilización de materiales que contribuyen a la contaminación ambiental. El uso de estos desechos tiene un doble propósito que es generar un combustible alternativo y producir una biomasa apta para alimentación animal o compostaje y posible medio de recuperación de materia orgánica y otros nutrientes para el suelo.

También es importante indicar que no se debe tender a la utilización de grandes extensiones de terreno para la obtención de biocombustibles, como es el caso del piñón o del maíz, ya que el Ecuador es un país agrícola (participación del 10,2% en el PIB, según el Banco Central del Ecuador, 2009) y con una rica biodiversidad, la misma que no debe ser afectada por la implementación de mono cultivos orientados para esta finalidad.

VI. CONCLUSIONES.

Los residuos de naranja variedad Valencia, tienen un 17,76% de azúcares totales y 2,6% de azúcares reductores, porcentaje muy bajo que al someter a hidrólisis incrementó al 5,6% de azúcares reductores.

El pre-tratamiento fue más eficiente cuando se trituraron los residuos de naranja, ya que se amplió la superficie de contacto del microorganismo con la pectina.

En la hidrolización de los residuos de naranja, *A. niger* fue el microorganismo que mayor cantidad de celulosa, celobiosa y pectina pudo transformar en azúcares fermentables por su actividad enzimática que empieza desde las 48 horas de ser inoculado.

El material sólido recolectado en el proceso de filtración puede ser utilizado como inóculo inicial para compostaje, ya que este material es rico en microorganismos degradadores y residuos de carbohidratos hidrolizados que aceleran este proceso.

En los procesos de fermentación y destilación el tratamiento que mayor cantidad de etanol generó fue el hidrolizado con *A. niger* y fermentado con *S. cerevisiae*, gracias al sinergismo que presentan estos microorganismos.

El método de destilación al vacío es el más apropiado para recolectar pequeñas cantidades de alcohol, debido a que al bajar el punto de ebullición del etanol se evita la pérdida por evaporación.

La cromatografía de gases es el método más apropiado en la determinación de concentración de alcohol por su alta precisión en pequeños volúmenes y por la eficacia en la separación de los componentes analizados.

El tratamiento T₂ (hidrolizado con *A. niger* y fermentado con *S. cerevisiae*) fue el que mayor concentración de alcohol extrajo de los residuos de naranja, por ende fue el que mayor beneficio bruto presentó.

La utilización de los desechos de naranja producto de la industrialización de la misma es una alternativa para la elaboración de biocombustible por utilizar recursos difíciles de tratar, evitando así la utilización de productos alimenticios.

La importancia de trabajar con materiales de desecho, como son los residuos de naranja, es no atentar contra la soberanía alimentaria ni contra el medio ambiente, ya que la cantidad de desechos generados en procesos industriales son difíciles de tratar.

VII. RECOMENDACIONES.

Buscar metodologías que permitan eliminar el pericarpio, manteniendo intacto el mesocarpio que es la materia prima fermentable, para aumentar la capacidad de hidrólisis de *A. niger* y por ende el rendimiento de bioalcohol con *S. cerevisiae* o *Z. mobilis*.

Utilizar el pericarpio retirado para la extracción de aceites esenciales, aplicables en otras áreas como cosmetología (cremas), gastronomía, agrícola (repelentes), etc.

Realizar investigaciones con otro tipo de microorganismos capaces de hidrolizar celulosa, celobiosa y pectina y así obtener mayores cantidades de azúcares fermentables.

Realizar estudios para co-inmovilización de *A. niger* que permitan mejorar la producción de etanol al utilizar *Z. mobilis*

En el marco de la soberanía alimentaria debería aplicarse una política de estado con la finalidad de regular la implementación de grandes áreas de cultivo destinadas para la producción de biocombustibles, como medio de protección de la biodiversidad y la seguridad alimentaria.

Para fines de obtener bioalcohol a partir de otros desechos de tipo agrícola, debe propenderse a buscar materiales que contengan alto contenido de pectina en el mesocarpio, como es el caso del maracuyá (*Passiflora incarnata*) melón (*Cucumis melo*) granadilla (*Passiflora quadrangularis*), etc.

El uso de estos desechos tiene un doble propósito que es generar un combustible alternativo y producir una biomasa apta para alimentación animal o compostaje y posible medio de recuperación de materia orgánica y otros nutrientes para el suelo cerrándose así el ciclo de este cultivo.

La implementación de estos sistemas productivos alternativos generaría mayor fuente de empleo e ingresos tanto para el pequeño productor como para el industrial.

VIII. RESUMEN.

La naranja es una de las principales frutas cultivadas en el Ecuador, de la cual el 50% es aprovechado y el otro 50%, (cáscaras, semillas, etc.) es eliminado; por lo tanto existe gran cantidad de desechos con alto potencial para la obtención de etanol.

El objetivo principal de este estudio fue generar un protocolo de obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja, provenientes del proceso agroindustrial.

Para esto se realizó un análisis de azúcares totales y reductores de residuos de naranja, variedad Valencia; posteriormente los residuos fueron triturados y sometidos a hidrólisis, para lo cual se colocó 2.2 kg de material en biorreactores y después se inoculó 3 cepas de hongos del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. ochraceus* y *A. fumigatus*), una en cada biorreactor con 3 repeticiones, permaneciendo 15 días; luego el material hidrolizado se lo filtró y dividió en dos para someterlos a fermentación en biorreactores por 8 días, la mitad con *S. cerevisiae* y la otra mitad con *Z. mobilis*; y a continuación, se destiló este líquido al vacío y por medio de cromatografía de gases se determinó la concentración de etanol de cada tratamiento.

Los azúcares totales y azúcares reductores del análisis inicial fueron del 17,75% y 2,6% respectivamente; este último se incremento a 5,6%, ya que en la hidrólisis las 3 cepas de hongos actuaron similarmente, pero *A. niger* fue el que mayor cantidad de celulosa, celubiosa y pectina transformó en azúcares fermentables; y en la fermentación y destilación el tratamiento 2 (*A. niger* con *S. cerevisiae*) obtuvo mayor concentración de etanol.

Se concluye que *A. niger* fue el hongo que en la hidrólisis aumentó más los azúcares fermentables y en la fermentación *A. niger* con *S. cerevisiae* produjeron mayor cantidad de etanol por demostrar un sinergismo favorable entre ellos.

IX. SUMARIO

Orange is one of the main fruits grown in Ecuador, of which 50% is used and 50%, (skins, seeds, etc..) It's eliminated, so there are plenty of high-potential waste for the ethanol yield.

The main objective for this study was to generate a protocol to obtain bioethanol from orange waste obtained in an agroindustrial process.

For this an analysis of total sugars and reducing ones of Valencia variety orange waste was performed, then the waste was crushed and subjected to hydrolysis, for which was placed 2.2 kg of material in bioreactors and after that 3 strains of fungus of the genus *Aspergillus* (*A. niger*, *A. ochraceus* and *A. fumigatus*) where inoculated, one in each bioreactor with 3 replications, staying 15 days. Then the hydrolyzed material was leaked and divided in two, to be subjected to fermentation in bioreactors for 8 days, the half with *S. cerevisiae* and the other half with *Z. mobilis*, and the liquid was distilled in vacuum. The concentration of ethanol for each treatment was determinate using a gas chromatographer.

Total sugars and reducing ones of the first analysis were 17.75% and 2.6% respectively, the latter will increase to 5.6% as in the hydrolysis of 3 strains of fungi acted similarly, but *A. niger* was that much cellulose pectin and celubiosa transformed into fermentable sugars, fermentation and distillation in treatment 2 (*A. niger* and *S. cerevisiae*) obtained higher ethanol concentration.

It can be conclude that *A. niger* was the fungus that grown in the hydrolysis more fermentable sugars in the fermentation, and *A. niger* and *S. cerevisiae* produced more ethanol demonstrating a positive synergism among themselves.

X. BIBLIOGRAFÍA

Arroyo, O y Alexis, G. 2004. Capítulo 2: Producción de Enzimas Pectinasas por Actinomyceetos en Cultivo Sumergido Utilizando Pectina y Cáscara de Naranja (en línea). Sistema de Bibliotecas SISBIB. Consultado 04 abr. 2008. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibVirtual/tesis/Salud/Arroyo_O_A/cap2.htm

BiodieselSpain. 2007. Potencial de biodiesel en Brazil (en línea). España. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en: <http://www.biodieselspain.com/2007/03/02/potencial-del-biodiesel-en-brasil/>

BOTANICAL-ONLINE. 2008. El Naranja, Propiedades Medicinales (en línea). Consultado 19 feb. 2008. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalstarongercastella.htm>

Banco Central del Ecuador, 2009. PRODUCTO INTERNO BRUTO POR CLASE DE ACTIVIDAD ECONOMICA (en línea). Ecuador. Consultado 15 jul. 2009. Disponible en: <http://www.bce.fin.ec/frame.php?CNT=ARB0000955>.

Bustamante Z., Galindo E., Huanca M. y Ballesteros F s.f. OBTENCION DE BIOPROTEINA A PARTIR DE BAGAZO DE NARANJA (*Citrus sinensis*) CON *Aspergillus niger* Programa Fármacos, Alimentos y Cosméticos, (PROFAC), Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón (en línea). Bolivia. Consultado el 9 de jun. del 2008. Disponible en: <http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/downloads/49.pdf>.

Cairo M. A. 2007. Aceite esencial a partir de la corteza del limón (*Citrus limonium*).
Monografias.com (en línea). Consultado 17 feb. 2008. Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos12/aceitesc/aceitesc.shtml#RSUM>

Carrillo L. s.f. Los hongos de los Alimentos y Forrajes. Clave de Identificación
Aspergillus sp. (en línea) Argentina. Consultado el 23 de jun. del 2008. Disponible
en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/10htextoclave.pdf>

Carrasco J., 2005, Biología 2005, Capítulo 8: Glucólisis y respiración. (en línea)
España. Consultado el 23 de jun. del 2008. Disponible en: <http://biologia-jct.iespana.es/curtis/libro/c8d.htm>

Carrillo L. s.f. Los hongos de los Alimentos y Forrajes. *Aspergillus sp.* (en línea)
Argentina. Consultado el 23 de jun. del 2008. Disponible en:
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf>

Carrillo L. s.f. Los hongos de los Alimentos y Forrajes. Técnicas y medios de cultivo
de *Aspergillus sp.* (en línea) Argentina. Consultado el 23 de jun. del 2008.
Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/03htextotecnicas.pdf>

Clausen R. 2007. Restauración metabólica en la agricultura cubana. Cerrando la
brecha (en línea). Consultado 19 feb. 2008. Disponible en:
<http://www.estudiosecologistas.org/documentos/reflexion/Desdesarrollo/Restauracion%20metabolica%20en%20Cuba.pdf>

Colina, A. 2000. Obtención de Fuentes Alternativas de Energía. Universidad de Salamanca, España (en línea). Consultado 19 feb. 2008. Disponible en: <http://pdf.rincondelvago.com/bioetanol.html>

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

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

Diario El Hoy. 2008. Naranja: dulce sabor que hace falta (en línea). Quito, Ecuador. Consultado el 22 de mar. del 2008. Disponible en: http://www.hoy.com.ec/NotiDinero.asp?row_id=288036

Diccionario del vino 2005-2009. Acido Acético (en línea). Consultado el 22 may. del 2009. Disponible en: <http://www.diccionariodelvino.com/index.php/acido-acetico/>

Enciclopedia Microsoft Encarta. 2001. "Naranja árbol." Microsoft Corporation. Consultado 19 feb. 2008.

Enciclopedia Wikipedia, La enciclopedia libre. 2008. "Citrus × sinensis."(en línea). España. Consultado 17 feb. 2008. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Citrus_x_sinensis#Sistem.C3.A1tica

Enciclopedia Wikipedia, La enciclopedia libre. 2009. Tinción de Gram (en línea). España. Consultado 7 may. 2009. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_de_Gram

Essilfie, R. 1985. Protein Upgrading of Orange Peel Waste for Stock Feed by Solid Substrate Fermentation Tesis. Master of Applied Science in Food Science. Richmond – Australia. Faculty of Food and Environmental Sciences. of University of Western Sydney, Hawkesbury, 14, 16-17 p.

Federación Española de Asociaciones Provinciales de Empresas Distribuidoras de gases licuados del petróleo (FEDGLP). 2007. Investigan producir bioetanol a partir de residuos de cítricos que podrá utilizarse en vehículos con motores flexibles (en línea). España. Consultado el 22 de mar. del 2008. Disponible en: <http://www.fedglp.org/investigan-producir-bioetanol-a-partir-de-residuos-de-citricos-que-podra-utilizarse-en-vehiculos-con-motores-flexibles>

[Flores](#) A. 2006. Cáscaras cítricas podrían ser una fuente potencial del etanol, Unated States Department Of Agriculture (USDA) (en línea). Estados Unidos. Consultado el 22 de mar. del 2008. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2006/060406.es.htm>

Fundamentos de la Biomasa. 2001. Tema 3: Fuentes De Energía de la Biomasa, (2): Los Cultivos Energéticos (en línea). España. Consultado 22 mar. 2008. Disponible en: http://fjarabo.quimica.ull.es/BioMaster/Temario/Archivos/Tema3_RES.pdf

Fundación Ecológica De Colombia (FUNDEC). 2008. Obtención de fuentes alternativas de energía – Bioetanol – Microorganismos de interés (en línea). Colombia. Consultado el 9 de jun. del 2008. Disponible en: <http://www.fundacionecologicadecolombia.org/BIOETANOL%20MICROORGANISMOS.htm>

Fungal Databases Nomenclature and Species Banks Online Taxonomic Novelties Submission (Mycobank). 2000. *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. 1877 (en línea) Estados Unidos. Consultado el 6 de may. del 2009. Disponible en: <http://www.mycobank.org/Mycotaxo.aspx?Link=T&Rec=190223>

García, J.M., La borda, J.A. 2007. Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol Madrid: citme, CEIM (en línea). España. Consultado el 22 de may. del 2008. Disponible en: http://www.madridmasd.org/informaciónidi/biblioteca/Publicación/doc/VT/vt4_Biocarburantes_líquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2004. Análisis de estudios de cadena Etanol (en línea). Nicaragua. Consultado el 27 de may. de 2008. Disponible en: http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Cadena_Etanol.pdf.

José J. 2008. La destilación. Laboratorio de Química (en línea). Consultado el 23 de jun. de 2008. Disponible en: <http://labquimica.wordpress.com/2008/05/18/la-destilacion/>

Kozakiewicz Z. 1989. Aspergillus species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.

La Prensa. 2007. Jatropha Curcas, Piñón o Tempate (en línea). Nicaragua. Consultado 22 mar. 2008. Disponible en: <http://www-ni.laprensa.com.ni/archivo/servicios/blog/?p=436>

López-Cózar J. 2007. La naranja mecánica, Diario El Mundo (en línea). España. Consultado el 22 de mar. del 2008. Disponible en: <http://www.elmundo.es/suplementos/natura/2007/12/1173481206.html>

Lucha Contra el Cambio Climático. 2007. Las naranjas también pueden mover tu coche (en línea). España. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en: <http://www.frenaelcambioclimatico.com/blog/?p=218>

Marco, Ch. 2004. Etanol: Un Biocombustible Para El Futuro. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar DIECA. Consultado 18 abr. 2008. Disponible en: <http://www.infoagro.go.cr/Agricola/tecnologia/ETANOL.pdf>

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

Nelson D., Cox M. 2005. Principios de la Bioquímica (LEHNINGER), Editorial Omega, S.A, 4ª Edición, 256 p..

Nowak J., Roszak H. 1997. Co-immobilization of *Aspergillus niger* and *Zymomonas mobilis* for ethanol production from starch (en línea). Polonia. Consultado el 5 de jul. Del 2009 Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2815527>

Oleas, M. 1981. Estudio Comparativo de la Obtención de Etanol a partir de Plátano y Yuca. Tesis Ingeniería Química; Quito: Universidad Central del Ecuador.

Saunt J. 1992, Variedades de cítricos del mundo, Editorial Sinclair. Valencia, España. 83p.

Pontón J. Moragues M. Gené J. Guarro J. Quindós G. 2002. Revista Iberoamericana de Micología (Rev. Ibero Micol.). Hongos y actinomicetos alergénicos (en línea). España. Consultado el 6 de may. del 2009. Disponible en: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/022.PDF>

Suszkiw J. 2007. ¡Manzanas Para Ti, Naranjas Para Tu Auto!. Servicio de Investigación Agrícola (en línea). Estados Unidos. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/kids/transportation/story1/sp.biofuelframe.htm>

Trejo-Hernández M. R., Oriol E., López-Canales A., Roussos S., Viniestra-González G. y Raimbault M., 1994. PRODUCCION DE PECTINASAS DE *Aspergillus niger* POR FERMENTACIÓN SÓLIDA SOBRE SOPORTE. Instituto de Micología

Neotropical Aplicada (en línea) México. Consultado 1 jul. 2009. Disponible en:
http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_35-36/40203.pdf.

Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM). 2007. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA (en línea). España. Consultado 9 jun. del 2008. Disponible en:
<http://www.uclm.es/profesorado/jvillasenor/esp/ingbioq/hidr%C3%B3lisis%20enzimatica.pdf>

Useche Y., Peña Venegas C., Cardona Vanegas G. 2003. *Aspergillus Níger* Tiegh (1867) Catalogo de la Biodiversidad de Colombia (en línea). Colombia. Consultado el 6 de may. del 2009. Disponible en:
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=546&method=displayAAT>

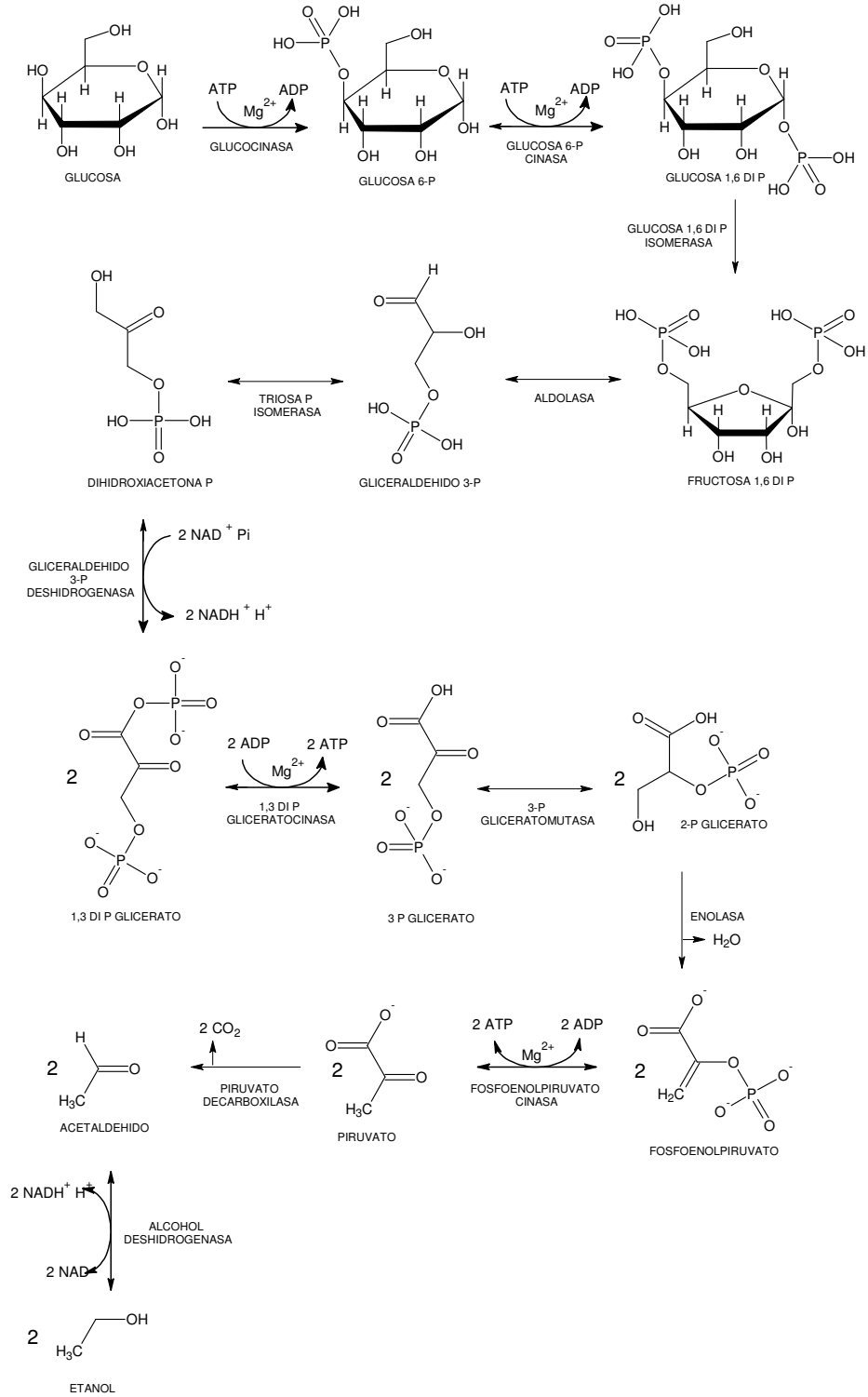
Vásquez, C. Ruiz, C. Arango, D. Caicedo, R. Sánchez, M. Ríos, L. Restrepo G. 2006. Producción de etanol absoluto por destilación extractiva con efecto salino. Universidad de Antioquia.

Villaseñor J. 2007. Universidad de Castilla - La Mancha (UCLM). HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE CELOBIOSA (en línea). España. Consultado 9 may. del 2009. Disponible en:
<http://www.uclm.es/profesorado/jvillasenor/esp/ingbioq/hidr%C3%B3lisis%20enzimatica.pdf>

Yáñez X., Lugo L. y Parada D. 2006. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca. Universidad de Pamplona. (en línea). Colombia. Consultado 19 feb. 2008. Disponible en:
http://portales.unipamplona.edu.co:8094/unipamplona/hermesoft/portal/home_1/rec/arc_20608.pdf.

X. ANEXOS

ANEXO 1: GLUCÓLISIS



ANEXO 2: ANALISIS BROMATOLÓGICO PROXIMAL DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES.



**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS "OSP"
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
LABORATORIO DE ALIMENTOS
INFORME DE RESULTADOS**



INF-LAB-AL-13445
ORDEN DE TRABAJO No 21730

SOLICITADO POR:	Diego Albán
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	Monjas Alma Lojana Calle K
MUESTRA DE:	Residuos de Naranja
DESCRIPCIÓN:	Residuos de Naranja
LOTE:	-----
FECHA DE ELABORACIÓN:	-----
FECHA DE VENCIMIENTO:	-----
No. DE MUESTRAS:	1
FECHA DE RECEPCIÓN:	22/10/2008
HORA DE RECEPCIÓN:	11:11
FECHA DE ANÁLISIS:	23,24/10/2008
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	27/10/08
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	Sólido
Contenido encontrado: ½ Kilo	Contenido declarado: ½ Kilo
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

INFORME

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO
*Azúcares Totales	g/100 g	17.75	MAL-53
*Azúcares Reductores	g/100 g	2.60	MAL-53



"Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE"
No OAE LE 1C 04-002



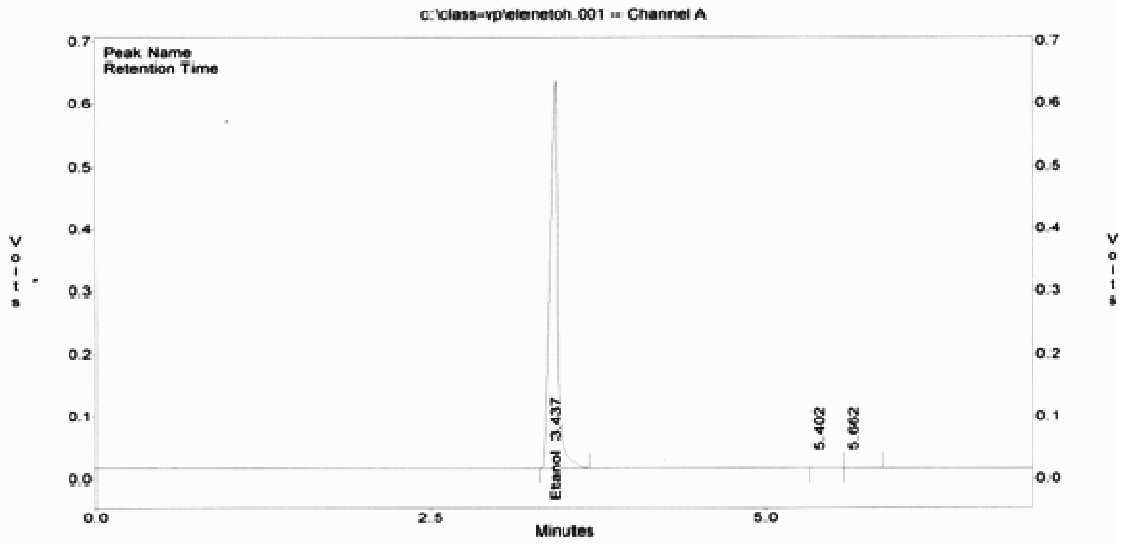
Bladimir Acosta
Dr. Bladimir Acosta
LABORATORIO DE ALIMENTOS

IMPORTANTE PARA EL USUARIO: Exija el original. La Facultad no se responsabiliza por documentos fotocopiados
Dirección: Francisco Viteri s/n y Gato Sobral / Telefax directo: 3216-740 Troncal: 502-262 502-456 Ext. 18
E - mail: bacosta-osp@facquimuce.edu.ec Quito - Ecuador RAL-4.1-05

ANEXO 3: CORRIDA CROMATOGRÁFICA ESTANDAR

**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL CIA. LTDA.**

File : c:\class-vp\elenetoh.001
 Method : c:\class-vp\methods\lavon002.met
 Sample ID : elenetoh.001
 Acquired : Apr 30, 2009 16:49:48
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:11



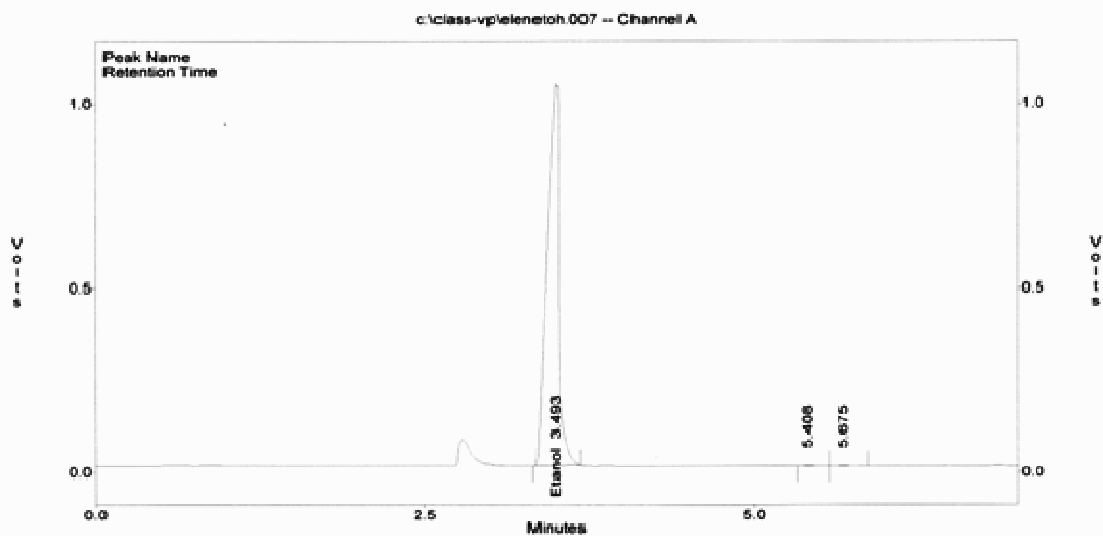
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.44	2521957.0	7.85
2		5.40	1223.0	0.00
3		5.66	340.0	0.00
Totals :			2523520.0	7.85

ANEXO 4: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₁ (*S. cerevisiae*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.007
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.007
 Acquired : Apr 30, 2009 17:39:44
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:18



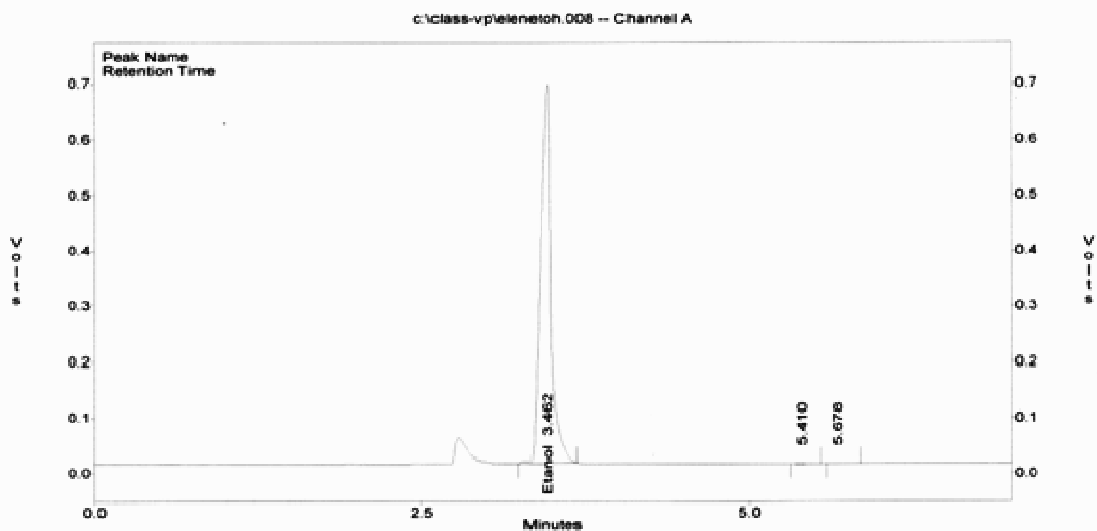
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.49	6790079.0	20.82
2		5.41	2728.0	0.00
3		5.68	1671.0	0.00
Totals :			6794478.0	20.82

ANEXO 5: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₁ (*Z. mobilis*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.008
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.008
 Acquired : Apr 30, 2009 17:48:08
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:19



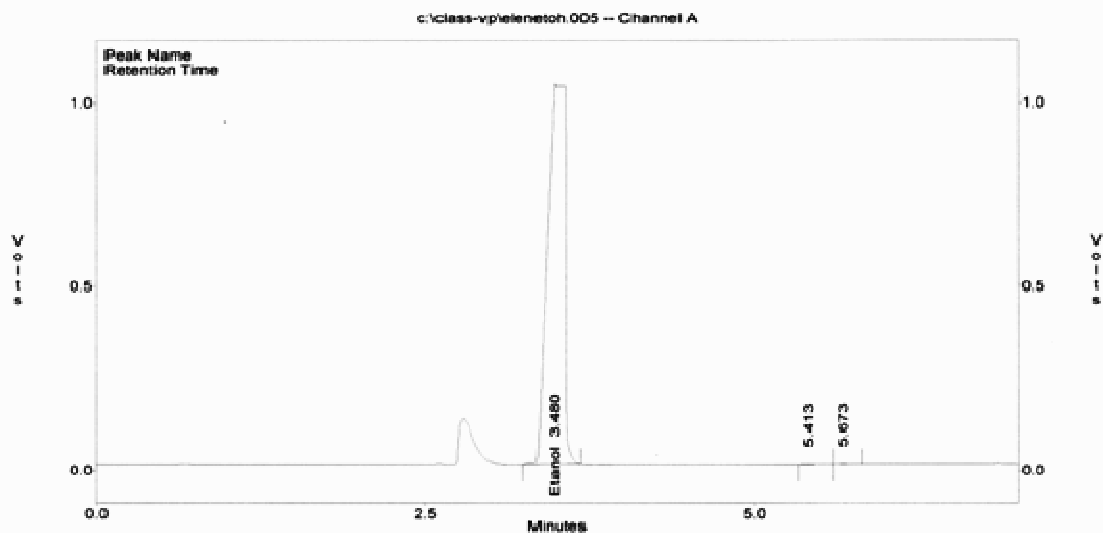
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.46	3968680.0	12.17
2		5.41	1410.0	0.00
3		5.68	364.0	0.00
Totals :			3970454.0	12.17

ANEXO 6: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₂ (*S. cerevisiae*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.005
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.005
 Acquired : Apr 30, 2009 17:23:02
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:15



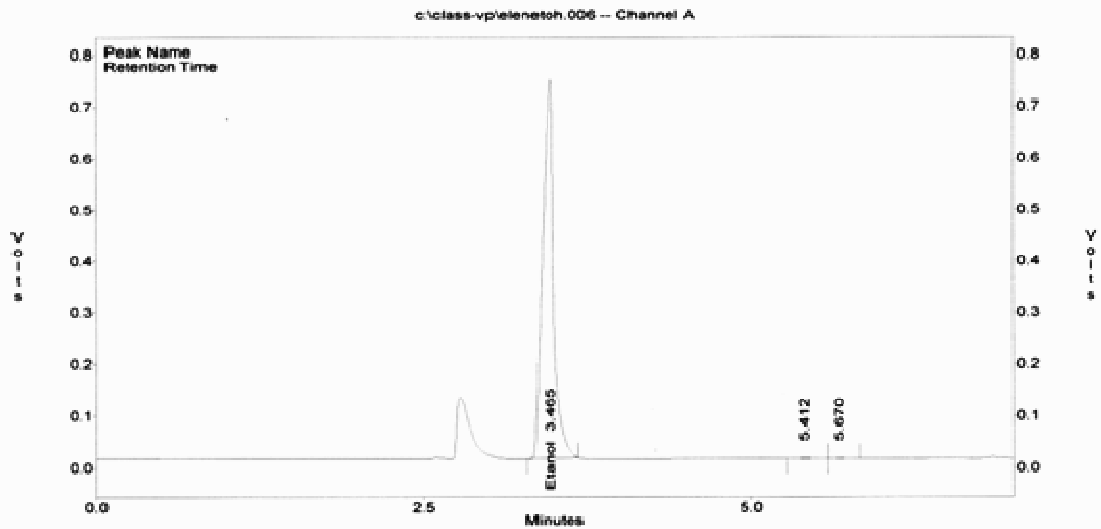
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.48	9887429.0	30.32
2		5.41	2984.0	0.00
3		5.67	3985.0	0.00
Totals :			9894398.0	30.32

ANEXO 7: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₂ (*Z. mobilis*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.006
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.006
 Acquired : Apr 30, 2009 17:31:23
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:17



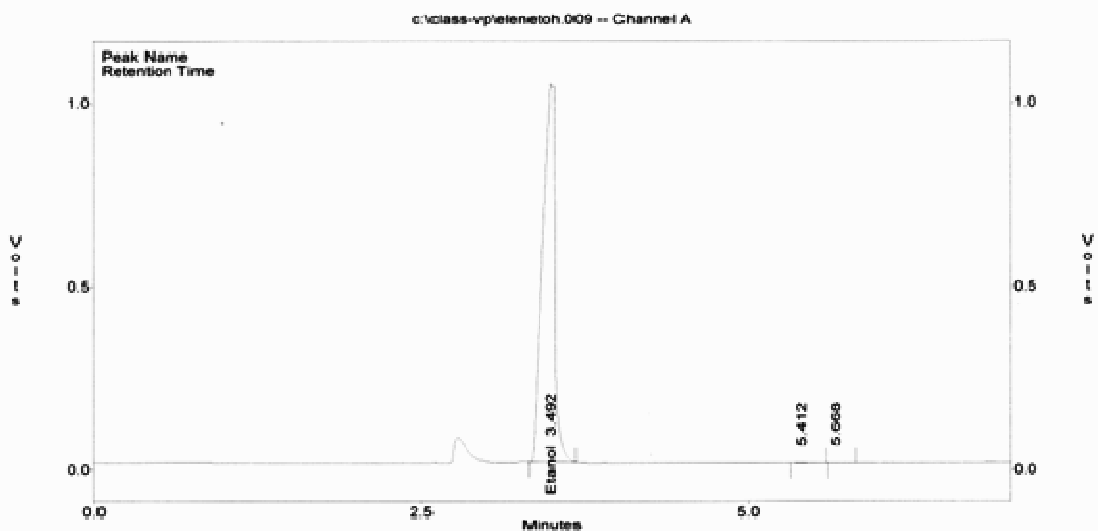
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.47	4391373.0	13.46
2		5.41	1704.0	0.00
3		5.67	1338.0	0.00
Totals :			4394415.0	13.46

ANEXO 8: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₃ (*S. cerevisiae*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.009
Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
Sample ID : elenetoh.009
Acquired : Apr 30, 2009 17:56:32
Printed : Apr 30, 2009 18:12:21



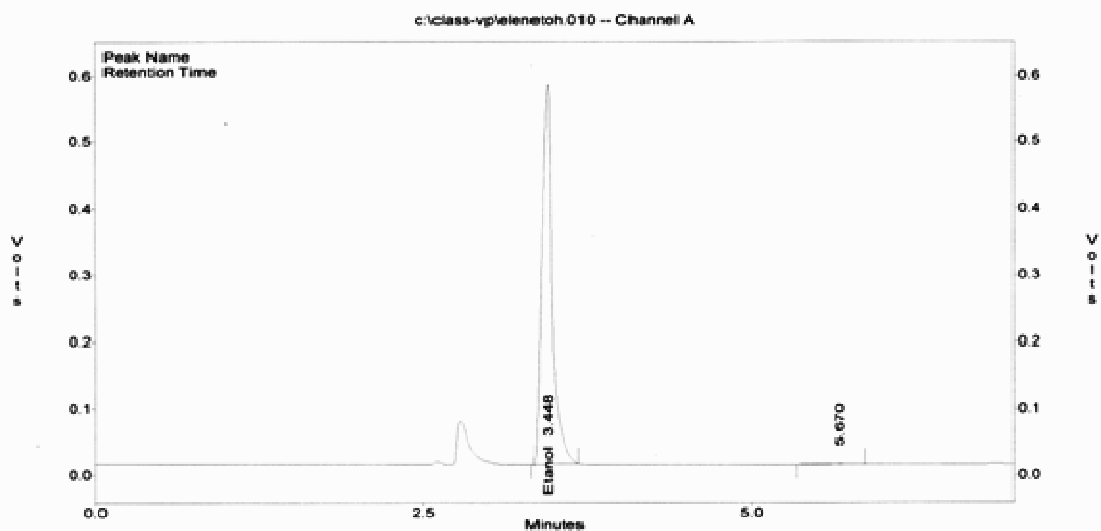
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.49	7055890.0	21.63
2		5.41	2149.0	0.00
3		5.67	405.0	0.00
Totals :			7058444.0	21.63

ANEXO 9: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₃ (*Z. mobilis*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.010
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.010
 Acquired : Apr 30, 2009 18:23:42
 Printed : Apr 30, 2009 18:33:32



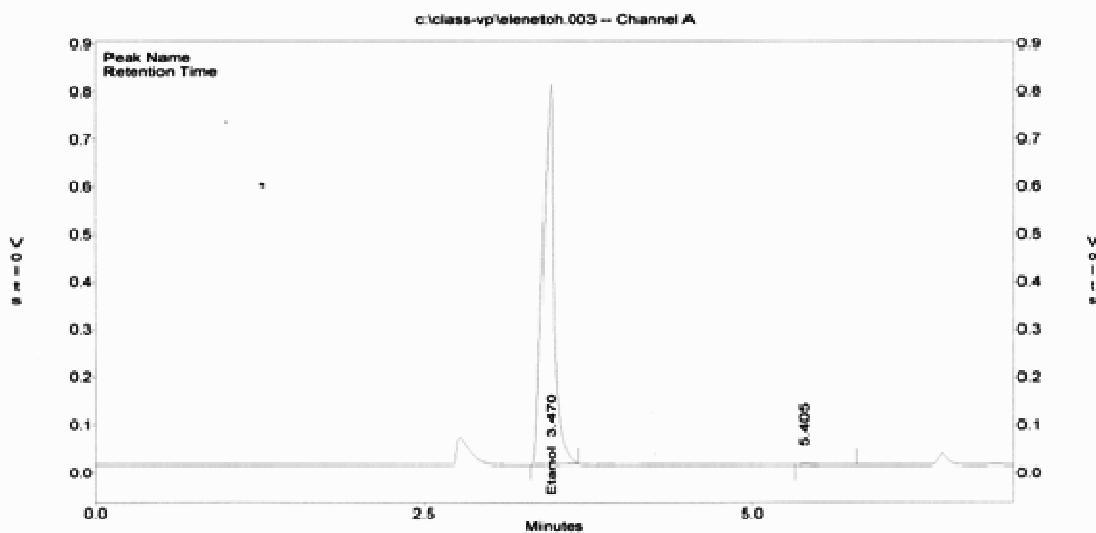
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.45	3291769.0	10.09
2		5.67	3174.0	0.00
Totals :			3294943.0	10.09

ANEXO 10: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₄ (*S. cerevisiae*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.003
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.003
 Acquired : Apr 30, 2009 17:06:23
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:13



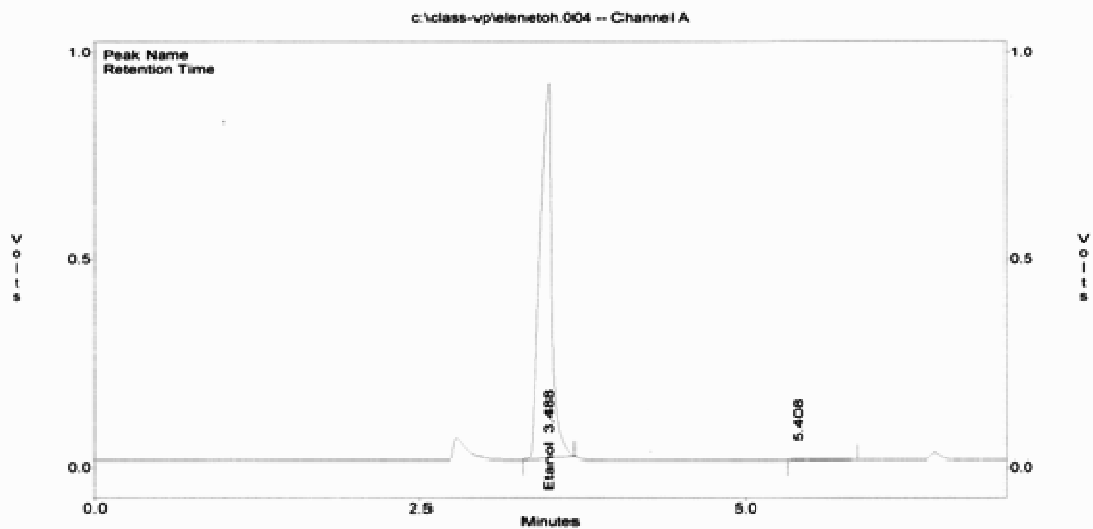
Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.47	4733809.0	14.51
2		5.41	10495.0	0.00
Totals :			4744304.0	14.51

ANEXO 11: CORRIDA CROMATOGRÁFICA T₄ (*Z. mobilis*)

CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES CENTROCESAL CIA. LTDA.

File : c:\class-vp\elenetoh.004
 Method : c:\class-vp\methods\avon002.met
 Sample ID : elenetoh.004
 Acquired : Apr 30, 2009 17:14:41
 Printed : Apr 30, 2009 18:12:14



Channel A Results

Pico No.	Nombre	Time	Area	% Etanol
1	Etanol	3.49	5887805.0	18.05
2		5.41	15161.0	0.00
Totals :			5902966.0	18.05

ANEXO 12: COTIZACIÓN MATERIALES Y REACTIVOS

JR - REPRESENTACIONES

Equipos para la Enseñanza de Laboratorio Industrial Vidrieria ,Soporteria
Reactivos Quimicos Equpos Medicos, Productos de Limpieza en general

FECHA: Quito 29 de Junio del 2009		PROFORMA:	573
DIRECCION: Hacienda el Prado Valle de los Chillos		TELEFONO:	2-697-496
Sres: David Freire		RUC: 1709208779001	
CANTIDAD	DESCRIPCION	PRECIO UNT.	PRECIO TOTAL
1	Agar Agar DIPCO 500g	\$128,00	\$128,00
1	Agar Papa Dextrosa 500g DIPCO	\$ 97,00	\$ 97,00
1	Aceite de Inmerción 100ml CARGAIS	\$ 39,00	\$ 39,00
1	Bacto Peptona 500g DIPCO	\$126,00	\$ 126,00
10	Cajas Petry 100x15 PENTRY Q	\$ 1.96	\$ 19.60
1	Cloruro de Potacio 500g MALL	\$ 28,00	\$ 28,00
1	Cloruro de Sodio x1kg JT-BEYKER	\$ 29,00	\$ 29,00
10	Cajas de cubre objetos 22x22 x100u	\$ 3.10	\$ 31,00
1	Estracto de Levadura 500g DIPCO	\$ 97,00	\$ 97,00
1	Fosfato de Potacio Monobasico x1Kg MALL	\$ 69,00	\$ 69,00
1	Fosfato de Potacio Dibasico x1Kg MALL	\$ 69,00	\$ 69,00
1	Agua oxigenada x4Lts	\$ 9,00	\$ 9,00
1	Nitrato de Amonio x1kg MERCK	\$156,00	\$ 156,00
1	Nitrato de Sodio x 1kg MALL	\$110,00	\$ 110,00
1	Sacarosa 500g MALL	\$ 47,00	\$ 47,00
1	Safranina 25g MERCK	\$ 110,00	\$ 110,00
1	Sulfato Ferroso 500g FISHER	\$ 69,00	\$ 69,00
1	Sulfato de Magnecio Heptahidratada 500g MALL	\$ 48,00	\$ 48,00
10	Tubos de ensayo 16x150mm PYREX	\$ 1,30	\$ 13,00
	CONDICIONES:		
	FORMA DE PAGO: CONTADO CONTRA ENTREGA		
	TIEMPO DE ENTREGA: INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA		
	DE CONFIRMADA LA ORDEN DE COMPRA		
	OFERTA VALIDA: 30 DIAS		
JR - REPRESENTACIONES		VALOR NETO	\$ 1.294,60
FIRMA AUTORIZADA		IVA 12%	\$ 155,35
		TOTAL	\$ 1449,95

Dirección:Fco Olmos y Acema No33(Barrio San Visente)Telf: 3191078 Cel:095867856