

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OBTENCIÓN DE BIOETANOL ANHIDRO A PARTIR DE
DESECHOS SÓLIDOS ORGÁNICOS

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

JOHANNA CRISTINA VÁSCONEZ CABRERA

SANGOLQUÍ, ENERO DEL 2010

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

Johanna Cristina Vásconez Cabrera

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADEMICO

Dr. Miguel Ramírez Tello

Sangolquí, Enero del 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. JOHANNA CRISTINA VÁSCONEZ CABRERA como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, Enero del 2010

Luis Cumbal, Ph.D.
DIRECTOR

Ing. Patricia Moreira
CODIRECTORA

REVISADO POR

Ing. Rafael Vargas
DIRECTOR DE LA CARRERA

DEDICATORIA

A lo más valioso en mi vida....

Gracias Mami y Papi, no me equivoco si digo que son los mejores padres del mundo, gracias por darme una carrera para mi futuro. Gracias por todo su esfuerzo, apoyo y por la confianza que depositaron en mi. Gracias por ser mis padres y por siempre dejarme volar tan alto como yo me lo propusiera.

Los quiero mucho con todo mi corazón y este trabajo es para ustedes, por ser la más chica de sus hijas aquí esta lo que ustedes me brindaron, solamente estoy devolviendo lo que ustedes me dieron en un principio.

Y en especial a mi Mamita Inés, que a pesar de que no estas aquí ahora en estos momentos conmigo, se que tu alma si lo esta. Gracias por ser la mujer que me enseñó todo lo bueno que hoy soy, por eso te dedico mi tesis con todo mi corazón. Ten por seguro que jamás te olvidaré.....

Johanna Cristina Vásquez Cabrera

AGRADECIMIENTO

Durante estos años de lucha constante, de gratas vivencias, de momentos de éxitos y también de angustias y desesperanza para poder cumplir mis objetivos y así poder alcanzar uno de mis mas grandes anhelos, culminar mi carrera, los deseos de superarme y de lograr mi meta eran tan grandes que logre vencer todos los obstáculos y es por ello que debo agradecer a quienes en todo momento me llenaron de amor y apoyo, y por sobre todo me brindaron su amistad:

A mi hermana Fernanda, que por ser la mayor me diste el ejemplo, pero nunca es tarde para empezar el deseo del sueño anhelado... Este triunfo lo comparto contigo.

A mis sobrinos: Joshian, Daniela y Mathias, gracias por alegrarme con sus dulces locuras... Los adoro con toda mi alma.

A mis Madres y Padres: Lucía, Silvita, Patricio, Edwin, Nelson y Popi gracias por ser pilares fundamentales en mi vida, dignos de ejemplo de trabajo y constancia, quienes me han brindado todo el apoyo necesario para alcanzar mis metas y sueños, y han estado allí cada día de mi vida, compartiendo los buenos y los malos ratos desde el día en que nací...Los quiero mucho y gracias.

To my dearest american family: Edison, Ramiro, Victor, Rodrigo and Sally thank you very much for being with me I will never forget you. I love you with all my heart.

A mis primos: Mais, Foshi y Erick por estar conmigo y apoyarme siempre en los buenos pero sobre todo en los malos momentos. Y a los más pequeños: Danny, Tefy, Kevin, Brandon, Alex y Alan nunca olviden que siempre estaré con ustedes en cada paso que den en la vida.

A mis grandes amigas, que han sido mas que una familia para mi, con las cuales he compartido tantos momentos, y se que puedo contar con ellas al igual que ellas conmigo, Caro y Chefa, siempre estarán en mi corazón y se que sin su apoyo y compañía no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos: Cristiano, Huguito, Emilio, Diego, Andrés, Santiago y Galito. Y como olvidar a mis amigas, Andre y Majo, por haber compartido tantos momentos de mi vida y por darme aliento para continuar luchando en esta vida que a veces parece terrible, pero recordemos que mientras contemos con nuestros amigos y familiares la vida siempre será hermosa. Gracias por haber llegado a mi vida.

Al Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos durante el transcurso de mi tesis. Al Dr. Aguirre por facilitarme los materiales necesarios para mi investigación y al Dr. Delgado por compartir sus experiencias y conocimientos científicos.

A la Dr. Blanca Naranjo por su apoyo, colaboración y guía. A la Ing. Patricia Moreira por su ayuda y asistencia en la realización de la tesis y al Dr. Cumbal por permitirme aprender de el como investigador.

“Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida. Detrás de cada logro, hay otro desafío. Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo. Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti”.

Johanna Cristina Vásquez Cabrera

INDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE TABLAS.....	XI
LISTADO DE CUADROS.....	XIII
LISTADO DE FIGURAS.....	XIV
LISTADO DE ANEXOS.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco Teórico.....	6
1.4.1.1 Bioetanol.....	6
1.4.1.2 Proceso de producción del Bioetanol.....	7
1.4.1.3 Materias Primas.....	8
1.4.1.4 Acondicionamiento de las materias primas.....	11
1.4.1.5 Hidrólisis.....	11
1.4.1.5.1 Hidrólisis con ácidos concentrados.....	12
1.4.1.5.2 Hidrólisis con ácidos diluidos.....	13
1.4.1.5.3 Hidrólisis enzimática.....	13

1.4.1.6	Fermentación.....	14
1.4.1.7	Destilación.....	16
1.5	Hipótesis.....	19
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		20
2.1	Participantes.....	20
2.2	Zona de estudio.....	20
2.3	Período de tiempo de investigación.....	20
2.4	Diseño experimental y/o estadístico.....	20
2.5	Materiales y Metodología.....	21
2.5.1	Pretratamiento de la materia prima.....	21
2.5.2	El Microorganismo Mucor sp.....	22
2.5.2.1	Selección de Medio líquido para Mucor sp.....	23
2.5.3	Cinética de la fermentación.....	24
2.5.3.1	Hidrólisis.....	25
2.5.3.1.1	Efecto de la iluminación, temperatura y cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis.....	26
2.5.3.2	Fermentación.....	27
2.5.3.2.1	Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación.....	28
2.5.3.3	Destilación.....	30
2.5.3.3.1	Deshidratación.....	31
2.5.4	Producción de bioetanol en pruebas piloto.....	32
2.5.5	Métodos analíticos.....	35
2.5.5.1	Medición de pH y temperatura.....	35
2.5.5.2	Cuantificación de azúcares.....	35

2.5.5.3	Cuantificación de biomasa.....	35
2.5.5.4	Cuantificación de compuestos fermentativos volátiles por cromatografía gaseosa.....	36

CAPITULO 3: RESULTADOS.....39

3.1	Pretratamiento de la materia prima.....	39
3.1.1	Caracterización de la materia prima.....	39
3.2	Microorganismo Mucor sp.	39
3.2.1	Selección de Medio Líquido para Mucor sp.	39
3.3	Hidrólisis.....	41
3.3.1	Efecto de la iluminación sobre la hidrólisis.....	42
3.3.2	Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.....	45
3.3.3	Efecto de la cantidad de biomasa en la hidrólisis.....	48
3.4	Fermentación.....	53
3.4.1	Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación.....	54
3.5	Cinética del protocolo de obtención de bioetanol.....	56
3.6	Destilación.....	57
3.6.1	Deshidratación.....	58
3.7	Producción de bioetanol en pruebas piloto.....	60

CAPITULO 4: DISCUSIÓN.....63

4.1	Selección del medio líquido para Mucor sp.	63
4.2	Hidrólisis.....	64

4.2.1	Efecto de la iluminación sobre la etapa de hidrólisis.....	64
4.2.2	Efecto de la temperatura sobre la etapa de hidrólisis.....	64
4.2.3	Efecto de la cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis.....	65
4.3	Fermentación.....	66
4.3.1	Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación.....	66
4.4	Cinética del protocolo de obtención de bioetanol.....	68
4.5	Destilación.....	71
4.5.1	Deshidratación.....	72
4.6	Producción de bioetanol en pruebas piloto.....	73
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		74
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES.....		76
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA.....		78
ANEXOS.....		86

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo líquido usados.....	23
Tabla 2.2. Composición de la mezcla nutricional empleada para la activación de <i>S. cerevisiae</i> (Mosquera, 2007).....	29
Tabla 3.1 Caracterización de la materia prima empleada en la fase experimental.....	39
Tabla 3.2 Tratamientos para la selección de medio líquido.....	40
Tabla 3.3 ANOVA de la cantidad de biomasa húmeda en la selección del medio de cultivo líquido.....	41
Tabla 3.4 Prueba de Tukey al 5% para la composición de los medios de cultivo.....	41
Tabla 3.5 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x2 (5 valores de tiempo y 2 tipos de luminiscencia).....	42
Tabla 3.6 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis.....	44
Tabla 3.7 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la luminiscencia.....	45
Tabla 3.8 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x3 (5 valores de tiempo y 3 valores de temperatura).....	46
Tabla 3.9 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.....	48
Tabla 3.10 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la temperatura.....	48
Tabla 3.11 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x5 (5 valores de tiempo y 5 cantidades de biomasa).....	49
Tabla 3.12 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis.....	51
Tabla 3.13 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la cantidad de biomasa.....	52
Tabla 3.14 Características finales de la biomasa en la etapa de hidrólisis.....	53
Tabla 3.15 Tratamientos establecidos para la selección del microorganismo para el proceso individual de fermentación.....	54
Tabla 3.16 ANOVA del porcentaje de etanol producido por <i>S. cerevisiae</i> y <i>Mucor sp.</i>	55

Tabla 3.17 Prueba de Tukey al 5% para la comparación entre la producción de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Mucor sp.</i>	55
Tabla 3.18 Características finales en la etapa de fermentación.....	56
Tabla 3.19 Resultados obtenidos en los procesos de destilación, previo a la deshidratación.....	58
Tabla 3.20 Tratamientos deshidratación con sales anhidras.....	59
Tabla 3.21 Resultados obtenidos en el proceso de deshidratación con sales anhidras.....	59
Tabla 3.22 ANOVA del porcentaje de etanol obtenido en el proceso de deshidratación con sales anhidras.....	60
Tabla 3.23 Prueba de Tukey al 5% para la etapa de deshidratación con sales anhidras.	60
Tabla 3.24 Niveles aplicados en la fase piloto.....	61
Tabla 3.25 Rendimiento de los procesos de destilación.....	61

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1. Parámetros utilizados en la Cromatografía de gases empleada para la determinación de compuestos volátiles.....	38
---	----

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Proceso de producción de bioetanol (García, J. M. & García, J. A; 2006).....	8
Figura 1.2: Diferenciación de procesos de producción de bioetanol (García, J. M & García, J. A; 2006).	9
Figura 1.3: Diagrama de punto de ebullición de mezclas etanol-agua. Azeótropo (Kosaric <i>et al</i> , 1987).....	17
Figura 1.4: Secuencia tradicional de la destilación extractiva de etanol (E) – agua (A) con etilenglicol (EG). En paréntesis los principales componentes. (Guala & Campanella, 2006).....	19
Figura 2.1 Residuos sólidos domésticos.....	21
Figura 2.2 Materia prima triturada.....	22
Figura 2.3 A) Hongo <i>Mucor sp.</i> B) Medio PDA.....	22
Figura 2.4 Medio de cultivo: A) Medio 1 B) Medio 2 C) PDA.....	23
Figura 2.5 Incubación bajo agitación.....	24
Figura 2.6 Medio para Hidrólisis.....	25
Figura 2.7 Inoculación.....	25
Figura 2.8 Filtrado.....	27
Figura 2.9 Fermentación.....	28
Figura 2.10 Muestra A) Filtrada B) Centrifugada.....	30
Figura 2.11 A) Equipo de destilación simple B) Destilado.....	30
Figura 2.12 A) Equipo de destilación fraccionada B) Destilado.....	31
Figura 2.13 Deshidratación A) CaCl_2 B) MgCl_2 C) NaCOOCH_3	32
Figura 2.14 A) Agitador mecánico B) Hidrólisis piloto.....	33
Figura 2.15 Fermentación piloto.....	34
Figura 2.16 Medición de A) pH B) Temperatura.....	35
Figura 2.17 Biomasa A) Húmeda B) Seca.....	36
Figura 2.18 Filtrado.....	37
Figura 2.19 Equipo de Cromatografía.....	37
Figura 3.1 Medio de cultivo: A) Medio 1 B) Medio 2 C) PDA.....	40
Figura 3.2 Variación de la cantidad de biomasa húmeda en base a la comparación entre tres medios de cultivo líquidos.....	40

Figura 3.3 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).....	43
Figura 3.4 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).....	43
Figura 3.5 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).....	44
Figura 3.6 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).....	46
Figura 3.7 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).....	47
Figura 3.8 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).....	47
Figura 3.9 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5).....	50
Figura 3.10 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5)..	50
Figura 3.11 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5)..	51
Figura 3.12 Variación del porcentaje azúcares no reductores durante el estudio del efecto de la iluminación, temperatura y cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis.....	52
Figura 3.13 Variación del porcentaje de etanol generado por <i>S. cerevisiae</i> y <i>Mucor sp</i>	54
Figura 3.14 Variación del pH durante la obtención de bioetanol.....	56
Figura 3.15 Variación de temperatura durante la obtención de bioetanol.....	57
Figura 3.16 Variación de etanol y azúcares reductores durante la de obtención de bioetanol.....	57
Figura 3.17 Porcentajes de etanol obtenidos luego de destilación y de la deshidratación en la fase piloto.	62

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: REACTIVO DE FEHLING.....	86
ANEXO B: ESTANDARIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FEHLING.....	87
ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	89
ANEXO D: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES (HIDRÓLISIS).....	92
ANEXO E: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NO REDUCTORES.....	96
ANEXO F: CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.....	99

RESUMEN

La mayoría de la energía eléctrica actualmente se genera quemando combustibles fósiles que causan efectos en el calentamiento global por la emisión de gases de efecto invernadero. Hoy existe una búsqueda continua para obtener combustibles alternativos; combustibles renovables que contaminen menos y sean más baratos. Es en este contexto que el Ecuador, se crea el Consejo Consultivo de Biocombustibles, el cual está incentivando iniciativas científicas enfocadas hacia la producción de etanol con el “Programa de implementación de etanol anhidro”.

En el presente proyecto, se condujeron varios ensayos para evaluar las principales variables que influyen en el proceso de obtención de bioetanol anhidro a través de protocolos alternativos. Se aplicaron diferentes tratamientos en las etapas de hidrólisis que produjo un promedio de azúcares totales de 67,2 g/L, azúcares reductores de 63,5 g/L y azúcares no reductores de 3,7 g/L. En la fermentación se trabajó con *S. cerevisiae* que originó una concentración promedio de etanol de 11,90% (v/v). Para finalizar, la destilación con 0,1 g de CaCl_2/mL se obtuvo una concentración promedio de etanol de 99,63% (v/v).

Los datos obtenidos en los ensayos fueron analizados estadísticamente a fin de trabajar con los tratamientos que presentaron mayor eficiencia productiva, en ensayos piloto de cuatro litros. En los ensayos piloto, se trabajó en la etapa de hidrólisis con 80 g de biomasa, sin luminiscencia a 30° C por 48 horas de incubación, produciendo bajo estas condiciones un promedio de azúcares totales de 65,2 g/L, de azúcares reductores de 62,5 g/L y de azúcares no reductores de 4,2 g/L. En la etapa de fermentación se trabajó con 1,65 g de levaduras y 12,155 g de mezcla nutritiva, produciendo una concentración promedio de etanol de 11,88% (v/v). Finalmente en la etapa de destilación con 0,1 g de CaCl_2/mL , se produjo 23 mL de bioetanol a una concentración promedio de etanol de 99,6% (v/v). El análisis cromatográfico de las muestras reveló la ausencia de otros productos volátiles que se generan en el proceso fermentativo.

ABSTRACT

Most of the electrical energy is now currently generated by burning fossil fuels that cause effects in the global warming effects of the greenhouse gas emissions at high temperatures. Today there is a continuous search for alternative fuels, renewable fuels that pollute less and are cheaper. It is in this context that the Advisory Council on Bio-fuels is created in Ecuador, organism which is encouraging scientific initiatives focused towards the production of ethanol with the “Program for the implementation of anhydrous ethanol.”

In this project, several tests were conducted to assess the main variables that influence the process of obtaining anhydrous ethanol through alternative protocols. Different treatments were applied during the hydrolysis that produced an average of total sugars of 60.2 g/L, of reducing sugars of 61.5 g/L and non-reducing sugars of 4 g/L. The fermentation was conducted with *S. cerevisiae*, which resulted in a mean concentration of 11.90% ethanol (v/v). Finally the distillation with 0.1g CaCl₂/mL, an average concentration of 99,63% ethanol (v/v) was obtained.

Data from the trials were analyzed statistically in order to work with the treatments that showed a higher productive efficiency, in pilot tests of four liters. In the pilot testing, the work on the hydrolysis process was made with 80 g of biomass, without luminescence at 30° C, for 48 hours of incubation, producing under these conditions an average of 65,2 g/L of total sugars, 62,5 g/L of reducing sugars and 4,2 g/L of non-reducing sugars. In the fermentation, the work was done with 1,65 g of yeast and 12,155 g of nutrient mixture, producing an average concentration of 11.88% ethanol (v/v). Finally, the distillation with 0.1 g CaCl₂/mL, 23 mL of bio-ethanol at an average concentration of 99.6% ethanol (v/v) was produced. Chromatographic analysis of the samples revealed no other volatile products generated in the fermentation process.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El bioetanol es el producto de fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de los microorganismos. La producción de bioetanol perdió importancia a finales de la primera mitad del siglo XX, al ser sustituida por la producción de etanol por vía sintética a partir de derivados de petróleo, que resulta más barata (Hernández, 2007).

Así se empieza por la dependencia general de los países productores de petróleo para finalizar con la realidad ecológica importante en la actualidad (Michelena, Martín, 2002). Esto volvió los ojos hacia la vía fermentativa de producción de alcohol, y hoy se trabaja fundamentalmente en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales materias azucaradas, como melazas, productos intermedios de la producción de azúcar, jugos de frutas, entre otros, a la vez que se busca una mayor eficiencia en los procesos de fermentación, recuperación y purificación de alcohol producido (Hernández, 2007).

El aumento de la producción de etanol en el mundo ha estado envuelto con el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten obtener etanol a partir de residuos de madera, de desechos sólidos y de todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosa, lo que permite revalorizar los desechos de varias industrias convirtiéndolas en materias primas para la obtención de etanol (Hernández, 2007).

Hoy en día existe una gran polémica sobre la producción de bioetanol. Para unos el bioetanol es un recurso energético potencialmente sostenible que ofrece ventajas medioambientales y además económicas a largo plazo en

comparación con combustibles fósiles, mientras que para otros es el responsable de grandes deforestaciones y del aumento del precio de los alimentos debido a sus materias primas, al suplantarse selvas y terrenos agrícolas para su producción, y poniendo en juicio además su rentabilidad energética (Robson, 2007).

La alternativa de emplear residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, constituye hoy en día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo. La existencia en los diversos países iberoamericanos con abundantes recursos lignocelulósicos, justifica la dedicación por estas naciones en dar un esfuerzo importante al desarrollo y adaptación de tecnologías tendientes a la utilización integral y racional de los mismos (Hernández, 2007).

1.2 Justificación del problema

El uso global de energía en la revolución industrial supuso $0,7 \times 10^{12}$ W, desde ahí ha aumentado de forma continua (Smil, 2003); por ejemplo, se multiplicó por cinco desde 1937 y este crecimiento se espera que continúe en el futuro. El incremento global de la demanda de energía fue del 1,85% en 1995, pero excluyendo la antigua Unión Soviética, el crecimiento de la demanda de energía fue del 2,9% debido al aumento en la demanda en los países asiáticos en desarrollo (Anon, 1997).

La demanda global anual de energía en la actualidad es de 271.404 millones de kilovatios hora (kW/h) (UNESA, 2008), siendo el petróleo, el gas y el carbón las principales fuentes de energía, suplantadas por la biomasa y la energía hidroeléctrica y nuclear.

Es así que desde mediados del siglo XX, se impulsó el desarrollo de energías alternativas basadas en recursos naturales renovables y menos contaminantes. Así surgieron los llamados biocombustibles (combustibles de origen orgánico) provenientes de la biomasa (PROGRAMA EDUCATIVO PORQUÉ BIOTECNOLOGIA, 2004).

Uno de los principales biocombustibles es el bioetanol, que es el alcohol obtenido mediante fermentación de azúcares. (PROGRAMA EDUCATIVO PORQUÉ BIOTECNOLOGIA, 2004). Actualmente, es el biocombustible con mayor producción mundial. La literatura científica reporta que se elaboraron más de 40.000 millones de litros durante el año 2004 en todo el mundo. Para su fabricación se pueden utilizar una gran cantidad de materias primas (García & Laborda, 2006) como cereales (maíz, trigo, avena, cebada), papa, remolacha, caña de azúcar, biomasa forestal, residuos pecuarios, y residuos de las cosechas y las agroindustrias. El proceso productivo es similar al de la cerveza, en el que los almidones son convertidos en azúcares, y los azúcares se convierten por fermentación en etanol, el que luego es destilado en su forma final (PROGRAMA EDUCATIVO PORQUÉ BIOTECNOLOGIA, 2004).

Otra alternativa es el uso de residuos con alto contenido en biomasa. Estos residuos tienen la ventaja de su bajo costo, ya que son la parte no necesaria de otros productos o procesos. Estos no causan impacto en la seguridad alimentaria, salvo cuando son utilizados en la alimentación del ganado (García & García, 2006).

La utilización del etanol como combustible ha pasado por varias etapas a través de los años. Empezando en los años 20 cuando se temió por la estabilidad de los mercados hidrocarburíferos y el posterior embargo petrolífero del año 1973 se volvió a invertir en el desarrollo de bioetanol, hasta los años 80 donde la principal motivación para la producción de etanol fue su uso como

combustible alternativo para contribuir a la disminución de la dependencia de las importaciones de crudo y minimizar el impacto que las fluctuaciones del mercado en los precios, así como la creación de políticas medioambientales principalmente encaminadas a minimizar los problemas derivados del cambio climático (García & García, 2006).

Por lo que en la actualidad los proyectos para construir nuevas plantas productoras de bioetanol anhidro se están incrementando debido a la demanda mundial para conseguir combustibles amigables al ambiente con el fin de reducir la problemática mundial generada por el uso indiscriminado de los llamados combustibles fósiles.

Es así que en nuestro país el 15 de diciembre del 2004 se crea el Consejo Consultivo de Biocombustibles, el cual esta incentivando iniciativas científicas enfocadas hacia la producción de etanol con el “Programa de implementación de etanol anhidro” (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, 2005). Mientras que el Ministerio de Agricultura y Ganadería de nuestro país en el Boletín de prensa de marzo del 2005 plantea la importancia de la generación de etanol anhidro con el objetivo de reducir la dependencia de los ya mencionados combustibles fósiles y sus importaciones, así como la contaminación ambiental, con esto se generará cien mil puestos de trabajo alternativos mediante la industrialización de los productos agrícolas (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, 2005).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Obtener bioetanol anhidro a partir de la fermentación de residuos sólidos domésticos y determinar la factibilidad de producirlo a nivel industrial.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Determinar la composición de los residuos sólidos domésticos que potencialmente serán usados en producción de bioetanol anhidro.

1.3.2.2 Desarrollar un protocolo eficaz para la obtención de bioetanol anhidro a partir de residuos sólidos domésticos mediante la determinación de los parámetros óptimos que permitan una eficiente fermentación alcohólica a escala de laboratorio

1.3.2.3 Determinar el grado de pureza alcohólica del producto de la fermentación de los residuos sólidos mediante cromatografía gaseosa a fin de evaluar la pureza del bioetanol obtenido.

1.3.2.4 Escalar los resultados de la investigación a una unidad piloto en el laboratorio.

1.3.2.5 Evaluar la factibilidad de producir bioetanol a nivel industrial.

1.4 Marco Teórico

1.4.1.1 *Bioetanol*

El etanol o alcohol etílico, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Wingrove & Caret, 1981), es un compuesto líquido incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua. Su densidad es de 0.7893 g/mL a 20°C (Streitwieser & Heathcock, 1979).

Es el alcohol que se emplea en las bebidas alcohólicas. Dada a su gran utilidad como disolvente en la química orgánica y como materia prima para muchas síntesis, el etanol es uno de los alcoholes de más fácil adquisición y de uso más frecuente (Wingrove & Caret, 1981).

El etanol se puede obtener a través de dos procesos completamente distintos: 1) por síntesis, y 2) por fermentación. Para usos industriales se prefiere el primer sistema, debido a la pureza, que puede alcanzar valores de 99,9%. Para otros usos (alimentación, perfumería, farmacia) tiene más ventajas el segundo. En su uso como carburante, que requiere una pureza de 99.5%, por lo que éste etanol entra en el dominio de la fermentación (Scragg, 1999).

El bioetanol, también llamado etanol de biomasa (PROGRAMA EDUCATIVO PORQUÉBIOTECNOLOGIA, 2004), es producido mediante la acción de microorganismos (Hernández, 2007), donde el almidón de los cultivos ricos en él, (especialmente el maíz), son convertidos en azúcares y estos a su vez, fermentados y convertidos en etanol. Por último el etanol es destilado, adquiriendo su forma final (PROGRAMA EDUCATIVO PORQUÉ BIOTECNOLOGIA, 2004).

Puede ser usado como combustible ya que al incinerarlo produce una reacción exotérmica que genera agua y CO₂ (Robson, 2007). Como biocombustible alternativo es ampliamente usado en autos ya que es barato, fácil de obtener y procesar (May, 2007). Además de ser usado como un aditivo que oxigena hasta un 10% la gasolina estándar (BIO FACTS, 1995), por lo que puede usarse solo, o mezclando cantidades variables como reemplazo para el metil-ter-butil-éter (MTBE). El combustible obtenido se conoce, en algunos países, como “Alconafta” (García & García, 2006).

1.4.1.2 *Proceso de producción del Bioetanol*

Desde la antigüedad se obtiene el etanol por fermentación anaeróbica de azúcares con levadura en solución acuosa y posterior destilación (Ercoli *et al*, 2007).

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible (García & García, 2006).

En la figura 1.1 se puede ver, de forma esquemática, el proceso completo de obtención del alcohol, a partir de las principales materias primas que se utilizan para su producción.

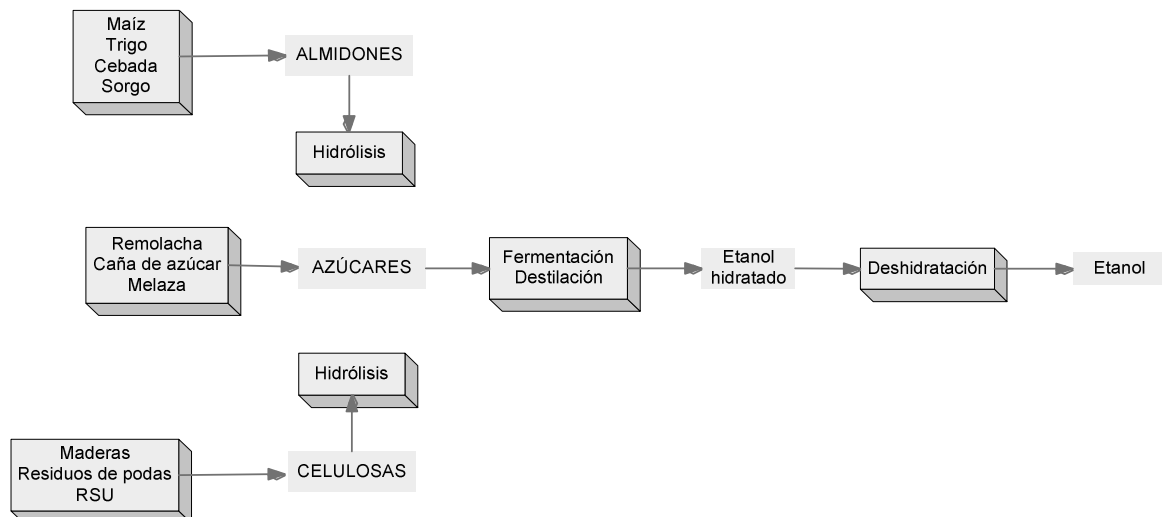


Figura 1.1: Proceso de producción de bioetanol (García, J. M. & García, J. A; 2006).

1.4.1.3 *Materias Primas*

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico está determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice (Hernández, 2007).

Principalmente se utilizan tres familias de productos para la obtención del alcohol (Hernández, 2007):

- Materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos como fuente de azúcares, tales como la caña, la remolacha, las melazas o el sorgo dulce.
- Materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares, tales como la yuca, el maíz o la papa.

- Materiales lignocelulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, tales como el bagazo, la madera o residuos agrícolas.

El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. El proceso a partir de azúcares fermentan directamente (Hernández, 2007).

El segundo tipo a partir de los hidratos de carbono complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de las enzimas (Hernández, 2007).

En la figura 1.2 se pueden ver las diferentes formas de procesar las materias primas, en función de su origen, para la obtención de sus azúcares.

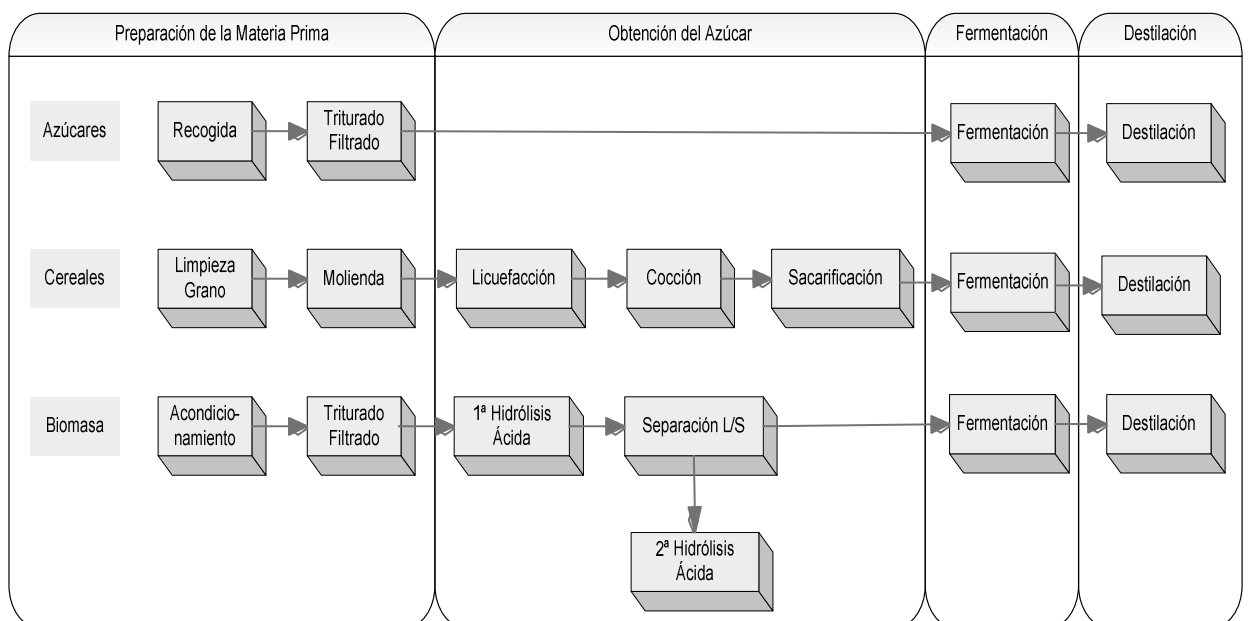


Figura 1.2: Diferenciación de procesos de producción de bioetanol (García, J. M & García, J. A; 2006).

Las sustancias lignocelulósicas de la tercera clase, se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente (Hernández, 2007). Por lo que los materiales lignocelulósicos son los que ofrecen un mayor potencial para la producción de bioetanol. Una gran parte de los materiales con alto contenido en celulosa, susceptibles de ser utilizados para estos fines, se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden de cultivos leñosos y herbáceos y, entre otros, hay que destacar los producidos en los cultivos de cereal. Por su parte, los residuos de origen forestal proceden de los tratamientos silvícola y de mejora o mantenimiento de los montes y masas forestales. También pueden utilizarse residuos generados en algunas industrias, como la papelera, la hortofrutícola o la fracción orgánica de residuos sólidos industriales. Muchos de estos residuos no sólo tienen valor económico en el contexto donde se generan sino que pueden ser causa de problemas ambientales durante su eliminación (Cabrera, 2006).

Es por esta razón que los residuos de biomasa contienen mezclas complejas de carbohidratos, llamados celulosa, hemicelulosa y lignina. Para obtener los azúcares de la biomasa, esta es tratada con ácidos o enzimas que facilitan su obtención. La celulosa y hemicelulosa son hidrolizadas por enzimas o diluidas por ácidos para obtener sacarosa, que es entonces fermentada. Tres son los principales métodos para extraer estos azúcares: la hidrólisis con ácidos concentrados, la hidrólisis con ácidos diluidos y la hidrólisis enzimática (García & García, 2006).

Las materias primas con alto contenido de celulosa son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel global, y su uso ha tenido un creciente interés global. Sin embargo, la compleja composición química de estas fuentes ha planteado retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados (Lyons *et al*, 1995).

A continuación se describen los pasos implicados en los procesos más relevantes de cada una de estas alternativas para la elaboración del alcohol.

1.4.1.4 Acondicionamiento de las materias primas

Los cereales son la principal fuente para la producción de bioetanol, destacando el uso del maíz, la cebada y el trigo. En el caso de los cereales, para los procesos de preparación de la materia prima y la obtención de los azúcares que contienen, se utilizan principalmente dos tecnologías: Wet milling y Dry milling (García & García, 2006):

El proceso de molido húmedo (Wet Milling Processes) es un sistema elegido cuando se quieren obtener subproductos como el sirope, fructosa, dextrosa, etc. además de la producción del alcohol ya que ayuda a romper las proteínas, liberar el almidón presente y ablandar el grano para el proceso de molido. Sin embargo este es un proceso complejo, dado el elevado número de pasos a seguir en el pretratamiento y su separación en sus diferentes componentes (García & García, 2006).

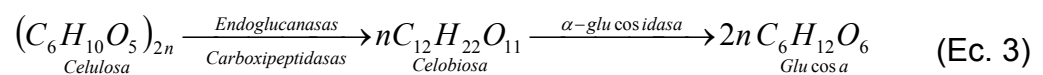
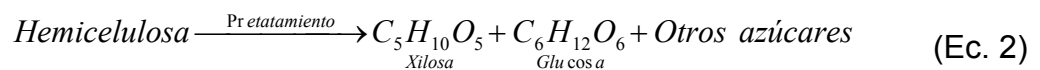
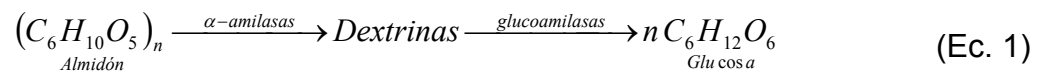
En tanto el proceso de molido en seco (Dry Milling Process) consiste en limpiar y moler los granos de cereal hasta reducirlos a finas partículas por un sistema mecánico. Se produce una harina con el germen, la fibra y la fécula (García & García, 2006).

1.4.1.5 Hidrólisis

Además de los hidratos de carbono, la materia prima contiene cantidades variables de poli - lignina y otros compuestos fenólicos "extraíbles". Estos compuestos no son directamente fermentables por la mayoría de las

levaduras, y deben ser pretratados para hidrolizar los complicados compuestos a azúcares simples (Zall & Zertuche, 1982).

La hidrólisis es un proceso químico que divide la molécula de celulosa por la acción de la molécula de agua. Las complejas estructuras de la celulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) son divididas en diferentes procesos para conseguir una solución azucarada, y eliminar productos de descomposición de los azúcares que pueden inhibir o, al menos, dificultar el proceso de fermentación. Principalmente se realizan procesos de hidrólisis de ácidos concentrados y bajas temperaturas, de ácidos diluidos y altas temperaturas y enzimáticos (García & García, 2006). A continuación se presenta las principales reacciones presentadas en el proceso de hidrólisis (Sánchez & Cardona, 2005):



1.4.1.5.1 Hidrólisis con ácidos concentrados

En la hidrólisis química, ácidos, como sulfúrico (barato y eficaz), clorhídrico, nítrico y ácido fórmico (proporción de 70 – 77%) puede ser utilizado para descomponer la celulosa y hemicelulosa a sus monómeros. La hidrólisis con ácido concentrado permite utilizar temperaturas más bajas en el proceso, las que reducen la cantidad de subproductos y proporcionan mayor rendimiento

en azúcar. La hidrólisis se lleva a cabo en dos fases debido a las diferentes estructuras de celulosa y hemicelulosa. En la primera etapa, la hemicelulosa se hidroliza bajo condiciones leves (50° C), mientras que en la segunda etapa de celulosa se hidroliza bajo duras condiciones (100° C) (Zacchi & Galbe, 2002). Este proceso de dos etapas permite a la hemicelulosa de azúcares a no ser convertidos en productos de degradación como furfural 5-hidroximetilfurfural (HMF), compuestos fenólicos (fenol, formaldehído) y ácidos carboxílicos débiles, como por ejemplo ácido fórmico que causa problemas en la fase de fermentación debido a sus efectos inhibitorios en los microorganismos, lo que lleva a reducir la producción de etanol (Abtahi, 2008).

1.4.1.5.2 Hidrólisis con ácidos diluidos

Es uno de los procesos de hidrólisis más antiguos, simples y eficientes para la producción del alcohol (García & García, 2006). Los rendimientos de producción de azúcar son bajos cuando se utiliza la hidrólisis con ácidos diluidos (proporción de 0,7% de H₂SO₄) aunque es preferible debido a la facilidad de recuperación del ácido, el bajo consumo de ácido y menor corrosión en los equipos lo que reduce el costo de producción. Esta hidrólisis se lleva a cabo en condiciones más agresivas en sus dos fases. En la primera etapa la hemicelulosa se hidroliza (170 -190 ° C), mientras que en la segunda etapa se optimiza la reacción al hidrolizar a la celulosa (200 - 230° C) (Zacchi & Galbe, 2002). Finalmente los líquidos hidrolizados son neutralizados y recuperados, normalmente mediante percolación (García & García, 2006).

1.4.1.5.3 Hidrólisis enzimática

Una alternativa a la hidrólisis química es la hidrólisis enzimática que consiste en “romper” (hidrolizar) la celulosa por la adición de determinadas enzimas. La celulosa es degradada por las celulasas a azúcares, que pueden ser fermentados por levaduras o bacterias para producir etanol (García & García, 2006).

Las celulosas por ejemplo no pueden ser fermentadas directamente, por lo que es necesario convertirla en azúcares más sencillos para su conversión en alcohol. La hidrólisis es un proceso químico que consiste en una combinación de trituración, pirólisis y ataque con ácidos y otras sustancias (Ercoli *et al*, 2007). Las complejas estructuras de la celulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) son divididas en diferentes procesos para conseguir una solución azucarada, y eliminar productos de descomposición de los azúcares que pueden inhibir o, al menos, dificultar el proceso de fermentación (García & García, 2006).

Por lo general se utilizan celulasas, provenientes de diversos microorganismos (como el hongo *Trichoderma viride* y *M. verrucaria*, en menor escala (Quintero, 1981)).

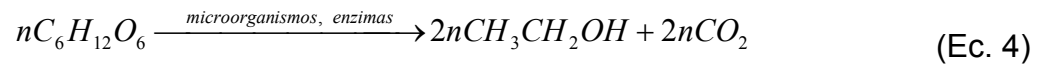
La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, como menores costos de equipamiento (debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental), mayores rendimientos y no necesita utilizar agentes químicos (García & García, 2006). La desventaja de la hidrólisis enzimática es la baja tasa de hidrólisis y el elevado costo de las enzimas (Abtahi, 2008).

1.4.1.6 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación con ausencia de aire, para obtener como productos finales: alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas (Vásquez, 2007).

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan

una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía. La ecuación 4 resume la reacción global general de todo el proceso cuando se fermentan las hexosas:



Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de bioetanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se insufla una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos (Nogueira, 2008).

La celulosa, como el almidón, es un polímero lineal conformado por unidades de glucosa, y se diferencia de este último en su configuración estructural. La hemicelulosa, a diferencia de la celulosa, es un polímero ramificado, y está conformado por hexosas (azúcares de 6 carbonos) y pentosas (azúcares de 5 carbonos); su composición varía de acuerdo al tipo de planta del cual provenga (Badger, 2002). Con esto, las levaduras no son muy efectivas en la producción de etanol a partir de materiales celulósicos, debido a su incapacidad de fermentar azúcares como la xilosa.

La levadura contiene una enzima llamada invertasa, que actúa como catalizador ayudando a convertir los azúcares en glucosa y fructosa (ambos $C_6H_{12}O_6$) (García & García, 2006).

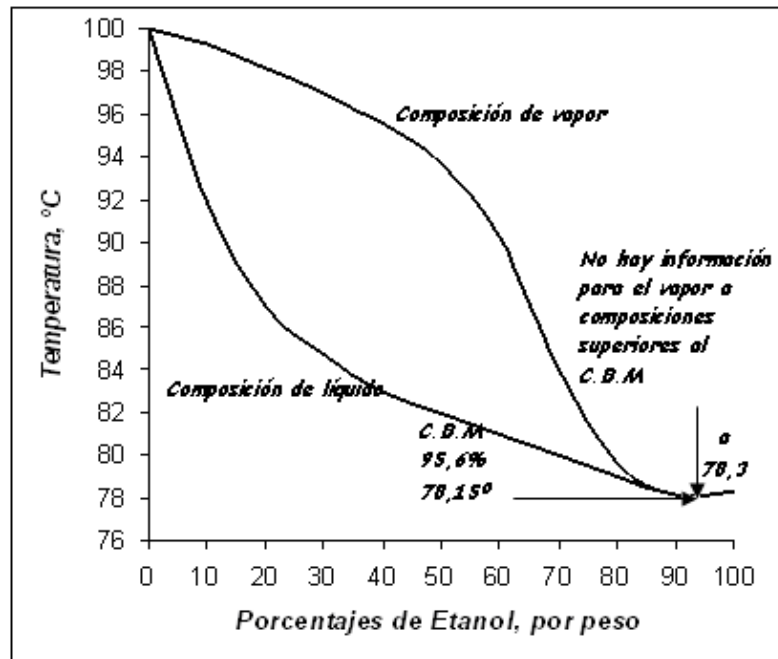


Figura 1.3: Diagrama de punto de ebullición de mezclas etanol-agua. Azeótropo (Kosaric *et al*, 1987)

En el azeótropo, la mezcla etanol-agua alcanza un valor de composición constante; en términos prácticos, esto significa que, en condiciones normales, el vapor rico en etanol en la cima de la torre de destilación tiene la misma composición del líquido del cual se generó por ebullición, haciéndose imposible una separación mayor (Nogueira, 2008).

Para lograr una concentración mayor de etanol y deshidratarlo totalmente, es necesario romper el azeótropo y, por lo tanto, emplear otros métodos de separación utilizando un tercer compuesto a la mezcla etanol-agua (Nogueira, 2008).

La destilación extractiva es un método para separar azeótropos de bajo punto de ebullición con el empleo de un "arrastrador" que es el componente más pesado de la mezcla y no forma azeótropos ni otra fase líquida con los

otros componentes; asimismo, el solvente tiene un punto de ebullición alto y generalmente no es volátil (Guala & Campanella, 2006).

Un aspecto fundamental en la destilación extractiva es la elección del solvente. Entre los aspectos que hay que tener en cuenta se incluye: su capacidad para alterar de forma significativa las volatilidades relativas de los componentes a separar, su economía (cantidad a utilizar, costos y disponibilidad), debe tener facilidad para separarse de los fondos de la columna, no debe reaccionar químicamente con los productos de la mezcla, no debe causar corrosión en los equipos, entre otros (Uyazán *et al*, 2006)

Por ello el esquema para separar los componentes que forman el azeótropo consiste de dos columnas. En la primera, con dos alimentaciones, se separa por cabeza uno de los componentes del azeótropo y por fondo una mezcla de arrastrador con el otro componente. En la segunda columna se separan el arrastrador, que se recicla a la primera columna, y el otro componente (Guala & Campanella, 2006). La Figura 1.4 esquematiza dicho fundamento.

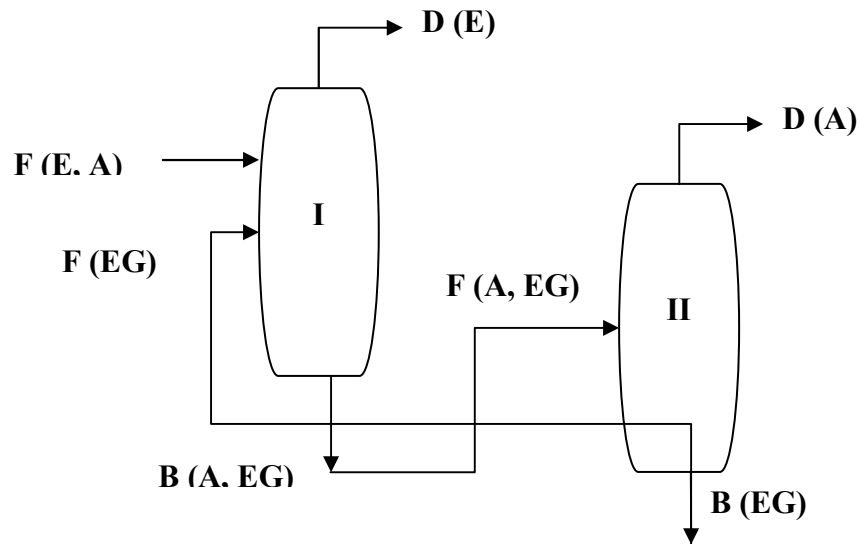


Figura 1.4: Secuencia tradicional de la destilación extractiva de etanol (E) – agua (A) con etilenglicol (EG). En paréntesis los principales componentes. (Guala & Campanella, 2006).

1.5 Hipótesis

Es factible obtener bioetanol anhidro a partir de la fermentación de residuos sólidos domésticos mediante la aplicación de tratamientos de destilación extractiva.

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El desarrollo del presente proyecto fue posible gracias a la asistencia científico – técnica del Ing. Luis Cumbal y de la Ing. Patricia Moreira asignados Director y Codirector respectivamente, así como también gracias a la colaboración proporcionada por el Dr. Vicente Delgado, investigador asociado del CEINCI y profesor del Departamento de Ciencias de la Tierra y la Construcción.

2.2 Zona de estudio

La fase experimental del proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) ubicado en la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Sangolquí, Avenida El Progreso s/n.

2.3 Período de tiempo de investigación

Este proyecto tuvo una duración de 15 meses; iniciando en Junio del 2008 y culminando en Septiembre del 2009.

2.4 Diseño experimental y/o estadístico

Para la consecución de los objetivos planteados en el presente estudio, se empleó una estadística descriptiva que evalúa los resultados obtenidos en los ensayos realizados detallando los componentes para dicho análisis.

2.5 Materiales y Metodología

2.5.1 Pretratamiento de la materia prima

Se utilizaron residuos sólidos domésticos, recogidos asépticamente en la época seca del año en el comedor de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Sangolquí, Avenida El Progreso s/n.



Figura 2.1 Residuos sólidos domésticos.

Una vez obtenidos los residuos, se procedió a seleccionar la materia prima que presente un color uniforme, sin deterioros ni alteraciones externas para ser lavada y posteriormente triturlarla con el fin de obtener partículas del menor tamaño posible que faciliten la penetración del agua al tener una gran área superficial (Lyons *et al*, 1995). El material obtenido fue secado en la estufa a 70°C por 48 horas para volverlos a triturar y almacenarlos en recipientes herméticos en un lugar fresco y seco evitando contaminaciones cruzadas. Este paso importante se llevo a cabo con el objetivo de mantener durante toda la fase experimental un material similar.



Figura 2.2 Materia prima triturada.

2.5.2 El Microorganismo *Mucor sp.*

El microorganismo usado durante la fase experimental fue *Mucor sp.*, el cual fue obtenido de los laboratorios del INIAP, estación Sta. Catalina en Quito – Ecuador. La cepa se mantuvo a pH $5,5 \pm 0,2$ en medio PDA incubado por 4 días a 30°C , para posteriormente ser almacenado a 4°C por el resto de la investigación (Abtahi, 2008).

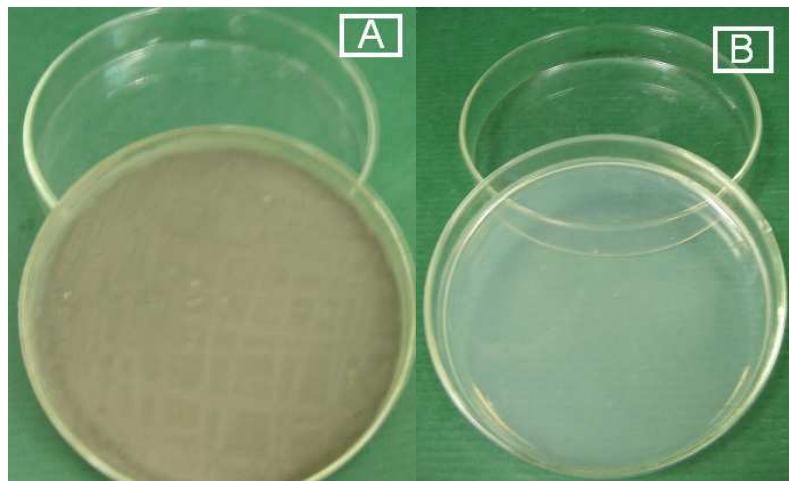


Figura 2.3 A) Hongo *Mucor sp.* B) Medio PDA.

2.5.2.1 Selección de Medio líquido para *Mucor sp.*

Para la preparación de los tres medios de cultivo (Tabla 2.1), los reactivos fueron disueltos por separado dependiendo de su grupo químico, ya sea en sulfatos y fosfatos y posteriormente fueron mezclados. El pH de los tres medios de cultivo fue ajustado según su especificación para luego autoclavarlos a 121 °C, 1 atm de presión por 30 minutos.

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo líquido usados.

MEDIO 1 (García & Nickerson, 1962)		MEDIO 2 (Abtahi, 2008)		MEDIO 3 (Bialozynski, 2007)	
Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
H ₂ O	100 mL	H ₂ O	100 mL	H ₂ O	100 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆	2 g	C ₆ H ₁₂ O ₆	2 g	PDA	1,22 g
KH ₂ PO ₄	0,3g	E. Levadura	0,5 g		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,05 g	(NH ₄) SO ₄	0,74 g		
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,18 mg	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,075 g		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,1 mg	KH ₂ PO ₄	0,35 g		
MnSO ₄ *H ₂ O	0,3 mg	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1 g		
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,04 mg	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,09 g		
Tiamina	0,1 mg	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,06 g		
Ac. Nicotínico	0,1 mg	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,006 g		
pH 4,5 ± 0,2		pH 5,5 ± 0,2		pH 6,6 ± 0,2	

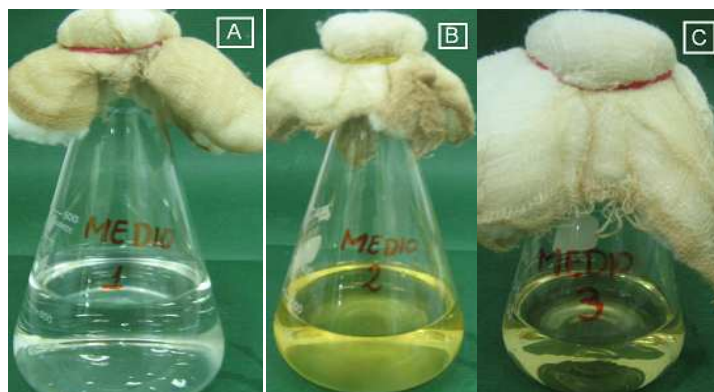


Figura 2.4 Medio de cultivo: A) Medio 1 B) Medio 2 C) PDA

Una vez esterilizados los medios de cultivo se procedió a inocularlos. Los erlenmeyers para incubación fueron cerrados con tapones de algodón y el proceso se realizó a 30° C por 120 horas bajo un régimen de agitación constante de 150 rpm.



Figura 2.5 Incubación bajo agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó el contenido de todos los frascos, se los filtró y se procedió a la cuantificación de la biomasa húmeda con el objetivo de determinar el medio idóneo para la crecimiento de *Mucor sp* (Carlile *et al*, 2001).

2.5.3 Cinética de la fermentación

En la determinación de los parámetros cinéticos ideales del proceso de obtención de bioetanol anhidro usando residuos sólidos domésticos, se efectuaron tres repeticiones por cada tratamiento y en cada etapa a ser evaluada.

Durante los ensayos cinéticos, se tomaron muestras cada 24 horas para analizar: azúcares totales, azúcares reductores y no reductores. Su cuantificación se realizó siguiendo los métodos y procedimientos establecidos en la sección 2.5.5 Métodos analíticos.

2.5.3.1 Hidrólisis

Una vez obtenido el medio líquido apropiado para el crecimiento del hongo *Mucor sp.* (Figura 2.6) se comenzó con la etapa de hidrólisis. La hidrólisis se llevó a cabo inoculando la materia prima con el hongo en 100 mL del medio (Figura 2.7) durante 96 horas y agitación permanente (180 rpm). En esta etapa ocurre una reacción química que libera los azúcares que normalmente están enlazados entre sí formando cadenas complejas (Ercoli et al, 2007).



Figura 2.6 Medio para Hidrólisis.



Figura 2.7 Inoculación.

2.5.3.1.1 Efecto de la iluminación, temperatura y cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis.

En la determinación de los parámetros a ser usados en la hidrólisis, se procedió en primer lugar a establecer el efecto de la luminiscencia en el crecimiento del hongo. Dicha etapa experimental se llevó a cabo con agitación constante, temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad o presencia de luz. Esta prueba ayuda a identificar el ritmo de propagación del hongo (Carlile *et al*, 2001).

Una vez establecido el efecto de la luz en la propagación del hongo se procedió a establecer la influencia de la temperatura en el crecimiento del hongo. Los ensayos se condujeron fijando tres temperaturas: 20° C, 30° C y 40° C. Luego del análisis de los resultados se determinó la temperatura a la cual los hongos crecen mejor (Carlile *et al*, 2001).

Finalmente habiendo establecido el efecto de la temperatura, se examina el efecto en la hidrólisis de la cantidad de materia prima. Se experimentará con cinco cantidades de materia prima y se establece la tolerancia de los hongos al sustrato (Carlile *et al*, 2001). Las cantidades de materia prima utilizadas en la experimentación fueron: 2g, 4g, 6g, 8g, y 10g.

Adicionalmente, se evaluaron combinaciones de luminiscencia, temperatura y cantidad de biomasa y se determinó la combinación más apropiada de los tres parámetros en la generación de un alto porcentaje de producción de azúcar mediante la hidrólisis (Patel *et al*, 2007)

Una vez identificados los parámetros experimentales, se procedió a la cuantificación de la biomasa de cada uno de los frascos. Para el efecto, el contenido de los frascos se filtra y se recoge por separado (Figura 2.8). El

líquido se autoclava a 121 °C y una atmósfera de presión por 30 minutos para evitar una posible contaminación cruzada en la siguiente etapa, en tanto que la biomasa se seca por 24 horas a $103 \pm 3^\circ \text{C}$. La producción de biomasa fue calculada sobre la base de la formación total de la biomasa (Abtahi, 2008).



Figura 2.8 Filtrado.

2.5.3.2 Fermentación

La etapa de fermentación se llevó a cabo usando erlenmeyers de 500 mL de capacidad con 300 mL del medio proveniente de la hidrólisis. Los erlenmeyers se sellaron con tapones provistos de dos salidas: 1) para la extracción de muestras y 2) para la salida de gases. Los fermentadores fueron sellados con silicona y parafilm para mantener condiciones anaerobias en el interior del fermentador (Battcock & Azam-Ali, 1998).



Figura 2.9 Fermentación.

2.5.3.2.1 Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación.

Diversas clases de levaduras, bacterias y hongos se han utilizado en la producción de etanol (Nogueira, 2008). Para la selección del microorganismo a ser usado en la etapa de fermentación, se procedió a estimar la eficiencia en la producción de bioetanol del hongo (*Mucor sp.*) y de la levadura (*S. cerevisiae*). Esta etapa tuvo una duración de 192 horas a 30° C.

El primer microorganismo en probarse fue el hongo *Mucor sp.*, el cual necesita de un cultivo anaeróbico a 30° C durante 192 horas y agitación permanente (150 rpm). Este hongo tiene la capacidad de utilizar como sustrato diferentes tipos de azúcares como la glucosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, celobiosa (Skory *et al*, 1997).

El otro microorganismo con el que se experimentó fue la levadura *S. cerevisiae*. Se utilizó levadura comercial granulada marca Levapan.

Tradicionalmente, las levaduras son los microorganismos más empleados en la fermentación alcohólica (Lin & Tanaka, 2006). Las levaduras producen etanol a temperaturas de 35°C (Lin & Tanaka, 2006) y pueden crecer a un pH de $4,5 \pm 0,2$ (Mountney & Gould, 1988) de manera que se ajustó el pH esos valores con HCl.

Para la inoculación, las levaduras fueron activadas con una solución de glucosa al 0,08% (p/v) con 0,15 g de levadura y 1,105 g de mezcla nutricional (Tabla 2.2) a pH $7 \pm 0,2$ durante 15 minutos bajo condiciones aerobias (Mosquera, 2007). Después de acondicionar la temperatura del medio hidrolizado a 30° C, se inocularon 1% (v/v) de levaduras activadas (Michelena & Martin, 2002) y se mantuvo la fermentación por 192 horas.

Tabla 2.2. Composición de la mezcla nutricional empleada para la activación de *S. cerevisiae* (Mosquera, 2007)

Nutriente	Composición % (p/p)
Nitrogeno Uréico	27.14
Potasio Soluble en Agua (K ₂ O)	2.71
Magnesio (MgO)	1.36
Fósforo Asimilable (P ₂ O ₅)	2.71
Calcio (CaO)	1.74
Azufre (S)	2.71E-01
Boro (B)	1.36 E-01
Hierro (Fe)	7.10 E-01
Manganeso (Mn)	1.63 E-01
Zinc (Zn)	5.97 E-01
Tiamina	1.44 E-02
Rifoblavina	2.89 E-02
Piridoxina	4.83 E-02
Nicotinamida	1.44 E-02
Pantotenato de calcio	9.66 E-03

Identificados los parámetros experimentales, se procedió a filtrar las muestras a través de un tamiz para retener el material sólido. Para extraer la mayor parte de etanol se centrifugó la materia sólida a 2000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante fue recolectado para la posterior cuantificación de etanol siguiendo el método de cromatografía de gases (Abtahi, 2008).



Figura 2.10 Muestra A) Filtrada B) Centrifugada.

2.5.3.3 Destilación

La etapa de destilación tiene por objetivo separar al bioetanol de los diferentes componentes obtenidos en la fermentación (Nogueira, 2008). Se empleó destilación simple, manteniendo una temperatura de 78° C a fin de alcanzar la temperatura de ebullición del etanol.



Figura 2.11 A) Equipo de destilación simple B) Destilado.

Luego de la destilación simple se empleó un enriquecimiento del etanol por destilación fraccionada para comprobar la llegada al punto de formación de azeótropo. La destilación fraccionada se llevo a cabo a una temperatura de 78° C.



Figura 2.12 A) Equipo de destilación fraccionada B) Destilado.

2.5.3.3.1 ***Deshidratación***

Para la deshidratación del bioetanol se empleó destilación extractiva usando sales anhidras. Se empleó tres tratamientos con sales de CaCl_2 (Cloruro de calcio), MgCl_2 (Cloruro de magnesio) y NaCOOCH_3 (Acetato de Sodio). El volumen de la solución de etanol utilizado fue de 30 mL de etanol enriquecido con una concentración de sales de 0.1 g/mL (Vázquez, 2006). Para la posterior valoración de la concentración de bioetanol.



Figura 2.13 Deshidratación A) CaCl_2 B) MgCl_2 C) NaCOOCH_3 .

2.5.4 Producción de bioetanol en pruebas piloto

Tomando como referencia el rendimiento productivo obtenido tanto en los ensayos hidrolíticos mediante la comparación entre luminiscencia, temperatura y cantidad de biomasa como en los ensayos fermentativos con la comparación de microorganismos; se realizó un escalado de la fase de laboratorio del mejor tratamiento para cada fase de la cinética de fermentación. Se efectuó tres repeticiones por cada prueba piloto.

La hidrólisis se llevó a cabo en reactores plásticos de 5 L de capacidad. El pH de los 4 L del medio de cultivo se ajustó a $5,5 \pm 0,2$, luego se añadieron 80 g de biomasa. El contenido se autoclavó a 121°C a 1 atmósfera de presión por 30 minutos para finalmente inocular el contenido de los reactores. La agitación se consiguió con un agitador mecánico de inmersión el cual mantuvo un rango de velocidad de 150 – 180 rpm y una temperatura de 30°C por 48 horas.



Figura 2.14 A) Agitador mecánico B) Hidrólisis piloto

Transcurrido el tiempo de la hidrólisis se tomó el contenido de todos los frascos para filtrarlos y proceder a la cuantificación de la biomasa. El líquido se autoclava a 121 °C y una atmósfera de presión por 30 minutos.

La fermentación se llevó a cabo en los mismos reactores plásticos de 5 L de capacidad, los cuales fueron sellados con tapones provistos de dos conexiones de salida: 1) para la extracción de muestras y 2) para la salida de gases. Las salidas fueron selladas con silicona y parafilm para mantener condiciones anaerobias en el interior del fermentador (Mosquera, 2007). El pH del hidrolizado se ajustó a $4,5 \pm 0,2$. Se añadieron 4 mL de levaduras activadas con una solución de glucosa al 0,08% (p/v) con 1,65 g de levadura y 12,155 g de mezcla nutricional a pH $7 \pm 0,2$ durante 15 minutos bajo condiciones aerobias.



Figura 2.15 Fermentación piloto

Cumplido el tiempo de fermentación las muestras se filtraron las muestras a través de un tamiz para retener el material sólido. Para extraer la mayor parte de etanol se centrifugó la materia sólida a 2000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante fue recolectado para la posterior cuantificación de etanol siguiendo el método de cromatografía de gases

Se efectuaron los procesos de destilación simple y fraccionada hasta alcanzar una concentración cercana al 96% (v/v) de etanol y se empleó la sal anhidra CaCl_2 , la cual presento mejor rendimiento. Finalmente se determinó la cantidad de bioetanol anhidro obtenido mediante cromatografía gaseosa.

2.5.5 Métodos analíticos

2.5.5.1 Medición de pH y temperatura.

Para la medición del pH se empleó un pHmetro, el cual fue calibrado en cada medición con soluciones buffer de 4, 7 y 10. Para la medición se sumergió el electrodo detector en la muestra hasta que se estabilice la lectura. Para la medición de la temperatura se empleó un termómetro de mercurio de 20° C a 120° C.



Figura 2.16 Medición de A) pH B) Temperatura.

2.5.5.2 Cuantificación de azúcares

Para la cuantificación de azúcares reductores, no reductores y totales durante de todo el proceso de obtención de etanol se determinaron por el método de Fehling con la glucosa como estándar (ANEXOS C, D Y E) (Hart & Fisher, 1971).

2.5.5.3 Cuantificación de biomasa

Para la cuantificación de la biomasa se tomo a las muestras filtradas y se las llevo a la estufa por 24 horas a $103 \pm 3^{\circ}$ C (Abtahi, 2008).

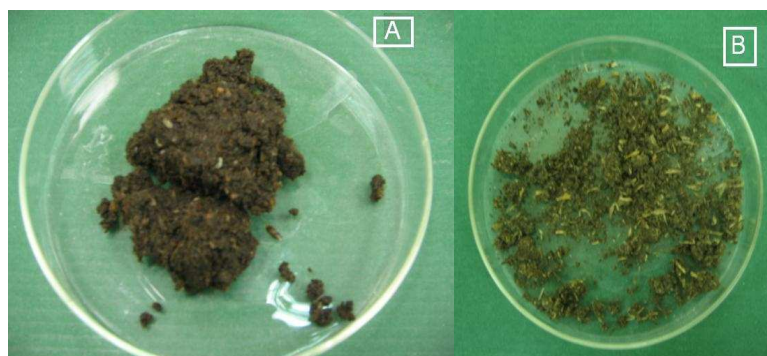


Figura 2.17 Biomasa A) Húmeda B) Seca.

Para la posterior cuantificación de humedad se utilizó la ecuación 1 mostrada a continuación.

$$\%Humedad = \frac{Peso\ húmedo - Peso\ seco}{Peso\ húmedo} * 100 \quad (Ec. 1)$$

2.5.5.4 Cuantificación de compuestos fermentativos volátiles por cromatografía gaseosa

Para el análisis de los compuestos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem con detección de ionización en llama (FID). Para el procesamiento de los cromatogramas se empleó el programa Turbochrom Navigator Version 4.1. El área de los picos es determinada por integración electrónica (Mosquera, 2007). Los parámetros de cromatografía gaseosa empleados en los análisis se muestran en el cuadro 2.1. Para el análisis, las muestras fueron filtradas por filtros millipore de 2 mm de diámetro con un PV de 0,22 μm , diluidas en una relación 1:6 con agua destilada e inyectadas al cromatógrafo automáticamente. La separación tuvo lugar en una columna Porapak Q; con fase separativa provista de un polímero poroso (compuesto de etilvinilbenzol y divinilbenzol), que es adecuado para la separación cromatográfica de las sustancias volátiles de bajo peso molecular, por ser separadas de acuerdo a sus puntos de ebullición (Matissek *et al*, 1992).



Figura 2.18 Filtrado.



Figura 2.19 Equipo de Cromatografía.

Cuadro 2.1. Parámetros utilizados en la Cromatografía de gases empleada para la determinación de compuestos volátiles.

COLUMNA	Porapack Q
GAS PORTADOR	Nitrógeno
TEMPERATURA DEL HORNO	180° C
TEMPERATURA DEL INYECTOR	190° C
TEMPERATURA DEL DETECTOR	185° C
FLUJO DEL GAS PORTADOR	21,6 mL/min
ATENUACIÓN	128
COLUMNA DE INYECCIÓN	1 µm
ESTANDAR EMPLEADO	0.1% (v/v) etanol – acetona
ESTANDAR DE CONTAMINANTES	0.1% (v/v) etanol – acetona, propanol, metanol y alcohol isoamílico
AUTOCERO	4,65 Mv
TIEMPO	15 minutos
TIEMPO DE RETENCIÓN DEL ETANOL	7,192 min

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Pretratamiento de la materia prima

3.1.1 Caracterización de la materia prima

La Tabla 3.1 muestra la caracterización de la materia prima empleada en el proceso de obtención de bioetanol anhidro. Esta tabla presenta el contenido de carbohidratos, proteínas y de fibra que son parámetros de gran importancia debido a su influencia directa en el proceso productivo de bioetanol por vía fermentativa.

Tabla 3.1 Caracterización de la materia prima empleada en la fase experimental.

Parámetro	Por 100 gramos
Proteínas	1.960 g
Materia Nitrogenada	2.690 g
Grasa Total	8.095 g
Carbohidratos	14 g
Fibra	7.3 g
Ceniza	8.608 g

3.2 Microorganismo *Mucor sp.*

3.2.1 Selección de Medio Líquido para *Mucor sp.*

La selección del medio de cultivo líquido para *Mucor sp.* se basó en el análisis de la variación de biomasa húmeda. Se aplicó tres medios de cultivos líquidos diferentes, como se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Tratamientos para la selección de medio líquido.

Nº	TRATAMIENTO	AUTOR
1	Medio 1	García & Nickerson, 1962
2	Medio 2	Abtahi, 2008
3	Medio 3	Bialozynski, 2007

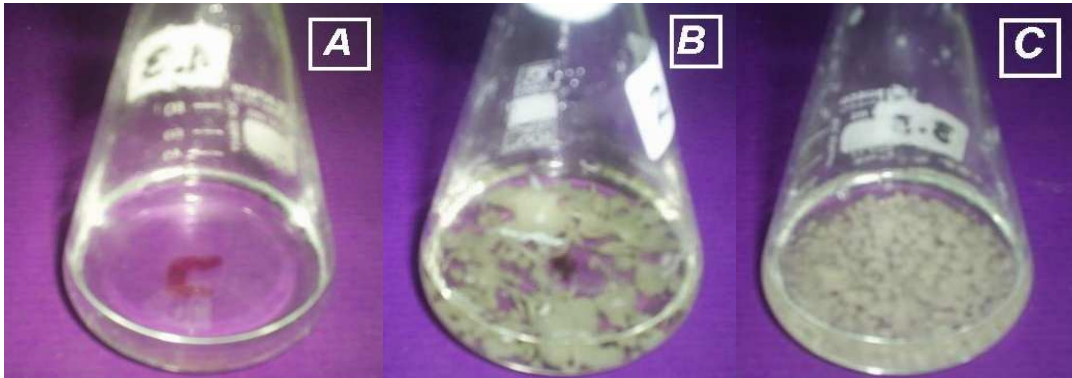


Figura 3.1 Medio de cultivo: A) Medio 1 B) Medio 2 C) PDA

Los datos obtenidos después de aplicar los tratamientos anteriormente descritos (Tabla 3.2), se muestran en la figura 3.2. Los datos representados en la figura corresponden a la biomasa húmeda cuantificada a las 120 horas de incubación del hongo.

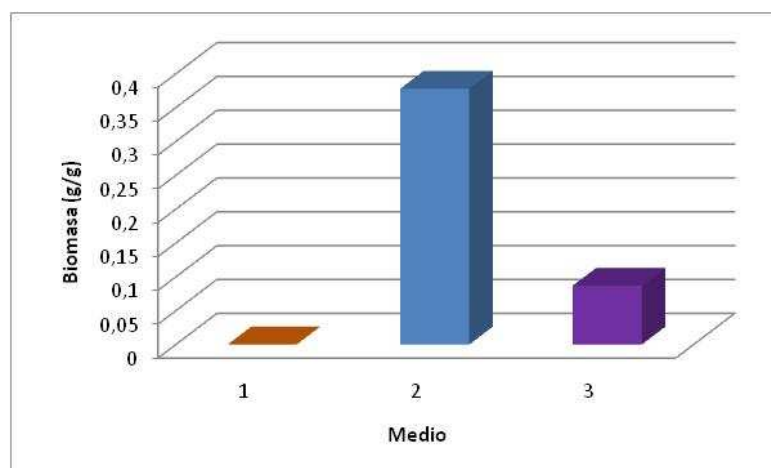


Figura 3.2 Variación de la cantidad de biomasa húmeda en base a la comparación entre tres medios de cultivo líquidos.

Posteriormente, se realiza un ANOVA con los datos obtenidos (Tabla 3.3) y se constata que existe diferencia estadística entre los tratamientos y se los considera altamente significativos ($p < 0.05$), por lo que se procedió a analizarlos con la prueba de Tukey al 5 %.

Tabla 3.3 ANOVA de la cantidad de biomasa húmeda en la selección del medio de cultivo líquido.

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	0,234863	2	0,117431	19.30	0.0024
REPETICIONES	0,0365127	6	0,00608544		
TOTAL	0,271376	8			

Tabla 3.4 Prueba de Tukey al 5% para la composición de los medios de cultivo.

MEDIO	MEDIA BIOMASA	RANGO DE SIGNIFICANCIA
Medio 1	0,0	A
Medio 2	0,378	B
Medio 3	0,087	A

Para este caso, se observan dos rangos de significancia, en el rango B se encuentra el Medio 2, cuyo promedio de biomasa húmeda es mejor (0,378 g/g), comparado con el rango A, en el que están tanto el Medio 1 como el Medio 3, los dos con un promedio de biomasa húmeda estadísticamente iguales debido a se encuentran cercanos al cero.

3.3 Hidrólisis

Uno de los objetivos de esta investigación, es determinar el mejor protocolo para alcanzar una mayor producción de azúcares usando la hidrólisis enzimática, la que depende de la variación de azúcares (debido a la división de

celulosa) y a la eliminación de productos de descomposición que puedan inhibir o dificultar el proceso de fermentación.

La variación en función del tiempo de azúcares totales, reductores y no reductores generados durante la hidrólisis de la materia prima, son las principales variables estudiadas en esta etapa.

3.3.1 Efecto de la iluminación sobre la hidrólisis

El análisis de la variación de la cantidad de azúcares, se realizó aplicando un arreglo factorial 5x2, equivalente a cinco valores de tiempo y dos tipos de luminiscencia, como se muestra en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x2 (5 valores de tiempo y 2 tipos de luminiscencia).

Nº	TRATAMIENTO	TIEMPO x LUMINISCENCIA
1	T1 CL	0 horas – CL
2	T2 CL	24 horas – CL
3	T3 CL	48 horas – CL
4	T4 CL	72 horas – CL
5	T5 CL	96 horas –CL
6	T1 SL	0 horas – SL
7	T2 SL	24 horas – SL
8	T3 SL	48 horas – SL
9	T4 SL	72 horas – SL
10	T5 SL	96 horas –SL

Las figuras 3.3, 3.4 y 3.5, muestran los porcentajes de azúcares totales, reductores y no reductores alcanzados durante el estudio de los efectos de la luminiscencia.

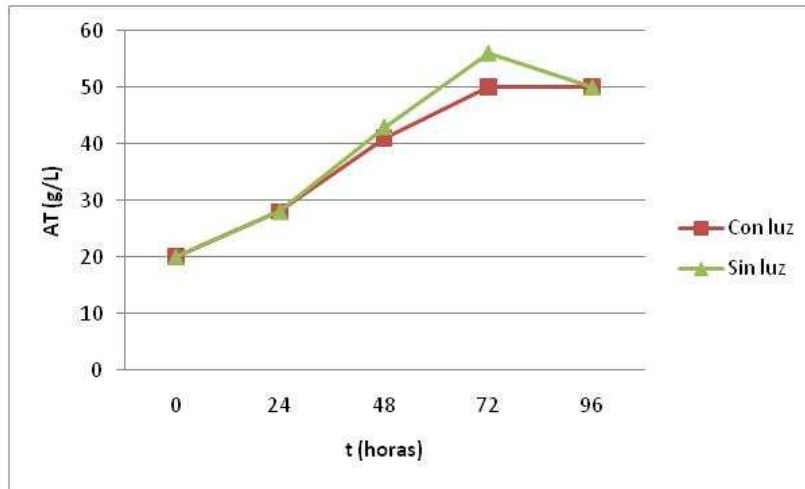


Figura 3.3 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).

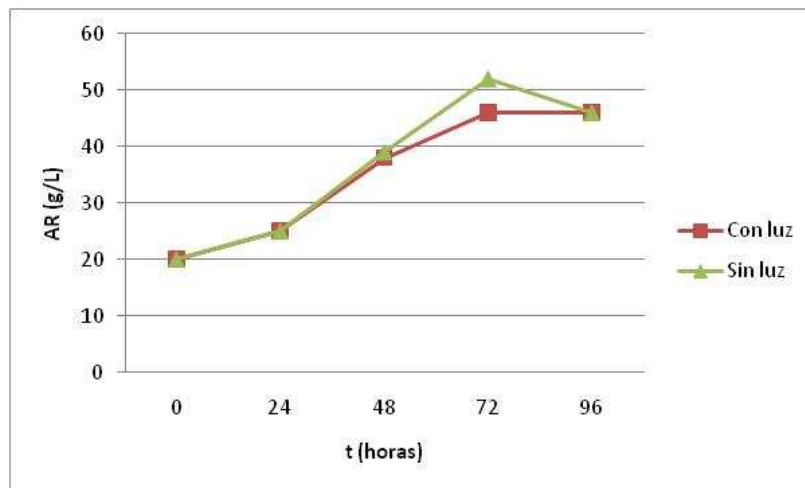


Figura 3.4 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).

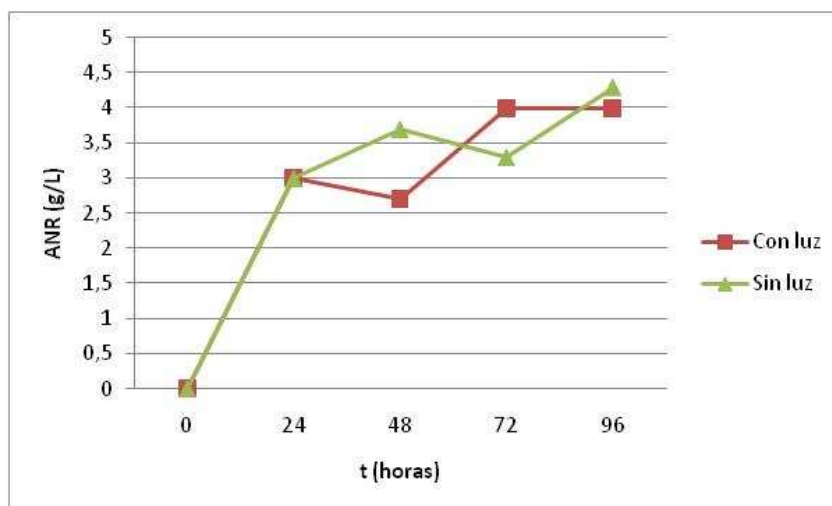


Figura 3.5 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x2).

Con los datos obtenidos de la experimentación, se elabora un ANOVA (Tabla 3.6) y se comprueba que existe importancia estadística sobre el efecto del uso de luminiscencia en la hidrólisis, lo que sugiere que es necesario analizarlo con la prueba de Tukey al 5%. La tabla 3.7 muestra los resultados de esta prueba.

Tabla 3.6 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis.

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	13.3333	1	13.3333	0.26	0.6121
HORAS	4104.2	4	1026.05	20.31	0.000
REPETICIONES	1212.33	24	50.5139		
TOTAL	5329.07	29			

Tabla 3.7 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la luminiscencia.

Tratamiento	Media AR.	Rango de Significancia
Con luz	35.4	A
Sin luz	36.7333	A

Se determinó un solo rango de significancia, es decir, la utilización de luminiscencia no establece diferencias significativas entre tratamientos. El mejor promedio de azúcares reductores es 36.73%, que corresponde al tratamiento sin luz.

3.3.2 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis

El análisis de la variación de la cantidad de azúcares producidos se condujo en ausencia de luz y aplicando un arreglo factorial 5x3, equivalente a cinco valores de tiempo y tres valores de temperatura. En la tabla 3.8 se detallan los tratamientos examinados.

Tabla 3.8 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x3 (5 valores de tiempo y 3 valores de temperatura).

Nº	TRATAMIENTO	TIEMPO x LUMINISCENCIA
1	T1 20° C	0 horas - 20° C
2	T2 20° C	24 horas - 20° C
3	T3 20° C	48 horas - 20° C
4	T4 20° C	72 horas - 20° C
5	T5 20° C	96 horas - 20° C
6	T1 30° C	0 horas - 30° C
7	T2 30° C	24 horas - 30° C
8	T3 30° C	48 horas - 30° C
9	T4 30° C	72 horas - 30° C
10	T5 30° C	96 horas - 30° C
11	T1 40° C	0 horas - 40° C
12	T2 40° C	24 horas - 40° C
13	T3 40° C	48 horas - 40° C
14	T4 40° C	72 horas - 40° C
15	T5 40° C	96 horas - 40° C

Las figuras 3.6, 3.7 y 3.8, muestra el porcentaje de azúcares totales, reductores y no reductores alcanzados al variar la temperatura del proceso.

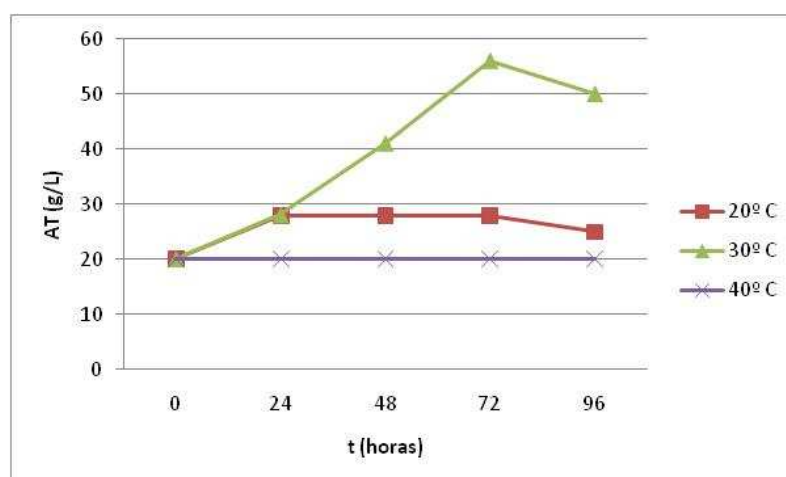


Figura 3.6 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).

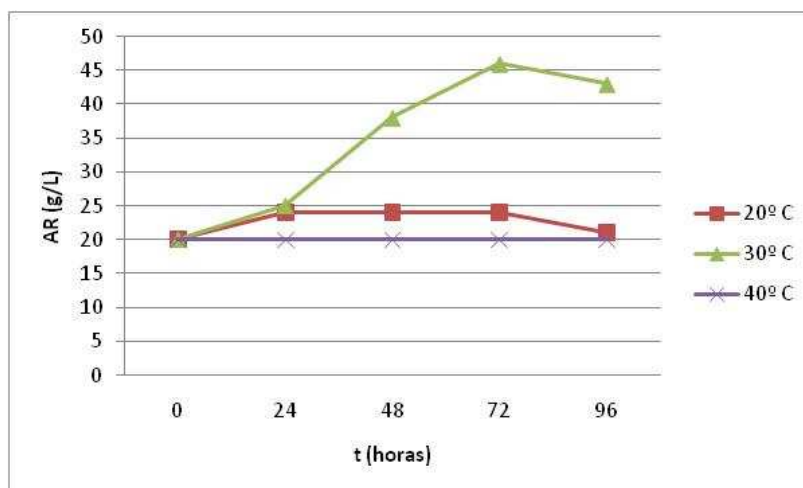


Figura 3.7 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).

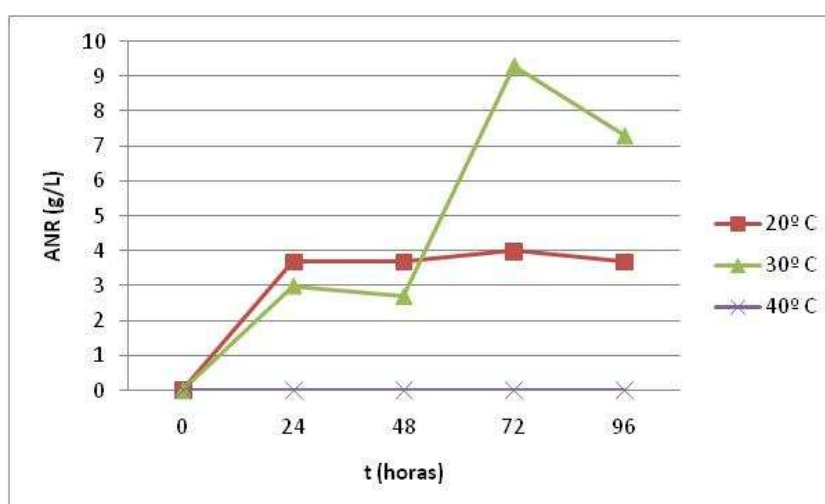


Figura 3.8 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x3).

A continuación, se realiza un ANOVA con los resultados obtenidos en la experimentación (Tabla 3.9) y se muestra que existe una diferencia estadística sobre la variación de la temperatura en el proceso de hidrólisis, por lo que se realizó un análisis con la prueba de Tukey al 5% (Tabla 3.10).

Tabla 3.9 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	1830.53	2	915	19.92	0.000
HORAS	632.756	4	150.189	3.44	0.017
REPETICIONES	1745.91	38	45.945		
TOTAL	4209.2	44			

Tabla 3.10 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la temperatura.

Tratamiento	Media AR.	Rango de Significancia
20° C	22.0667	A
30° C	34.7333	B
40° C	20	A

La prueba de Tukey estableció dos rangos de significancia. En el rango B se encuentra los 30° C, temperatura a la cual se tiene un mejor promedio de azúcares reductores en relación al rango A, en el que se encuentran 20 y 40° C, temperaturas que generan un promedio de azúcares reductores estadísticamente iguales y poco significativos.

3.3.3 Efecto de la cantidad de biomasa en la hidrólisis

Ausencia de luz y temperatura de incubación de 30° C fueron las condiciones experimentales que se seleccionaron para el análisis de la variación de la cantidad de azúcares producidos al cambiar la cantidad de biomasa. Adicionalmente se aplicó un diseño estadístico factorial 5x5, con cinco valores de tiempo y cinco cantidades de biomasa (ver tabla 3.11).

Tabla 3.11 Tratamientos establecidos para el arreglo factorial 5x5 (5 valores de tiempo y 5 cantidades de biomasa).

Nº	TRATAMIENTO	TIEMPO x LUMINISCENCIA
1	T1 2 g	0 horas – 2 g
2	T2 2 g	24 horas – 2 g
3	T3 2 g	48 horas – 2g
4	T4 2 g	72 horas – 2 g
5	T5 2 g	96 horas – 2 g
6	T1 4 g	0 horas – 4 g
7	T2 4 g	24 horas – 4 g
8	T3 4 g	48 horas – 4g
9	T4 4 g	72 horas – 4 g
10	T5 4 g	96 horas – 4 g
11	T1 6 g	0 horas – 6 g
12	T2 6 g	24 horas – 6 g
13	T3 6 g	48 horas – 6g
14	T4 6 g	72 horas – 6 g
15	T5 6 g	96 horas – 6 g
16	T1 8 g	0 horas – 8 g
17	T2 8 g	24 horas – 8 g
18	T3 8 g	48 horas – 8g
19	T4 8 g	72 horas – 8 g
20	T5 8 g	96 horas – 8 g
21	T1 10 g	0 horas – 10 g
22	T2 10 g	24 horas – 10 g
23	T3 10 g	48 horas – 10g
24	T4 10 g	72 horas – 10 g
25	T5 10 g	96 horas – 10 g

Las figuras 3.9, 3.10 y 3.11, indican los porcentajes de azúcares totales, reductores y no reductores alcanzados con la variación en la cantidad de biomasa.

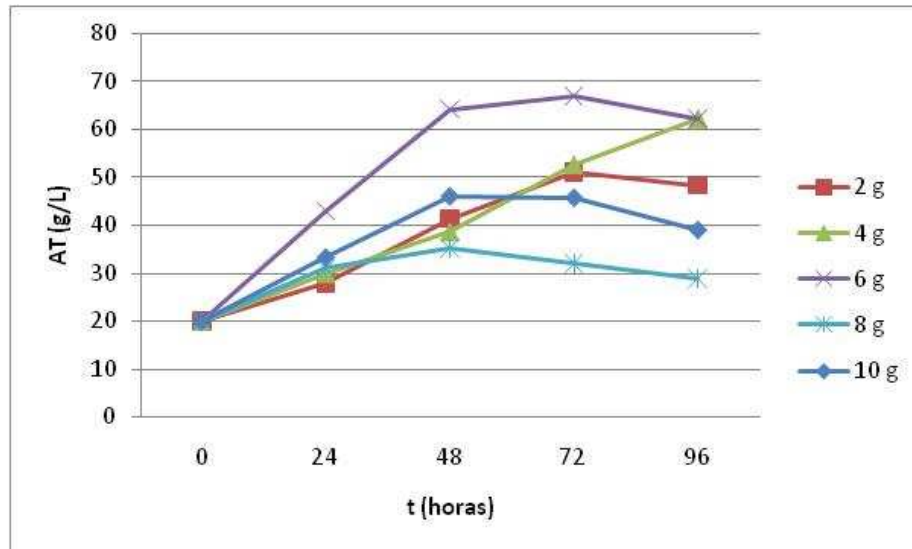


Figura 3.9 Variación del porcentaje azúcares totales en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5).

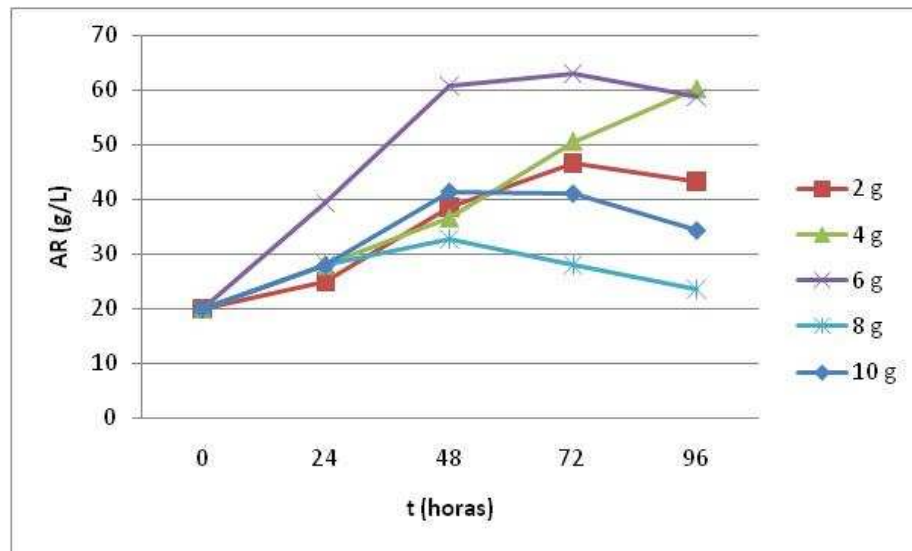


Figura 3.10 Variación del porcentaje azúcares reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5).

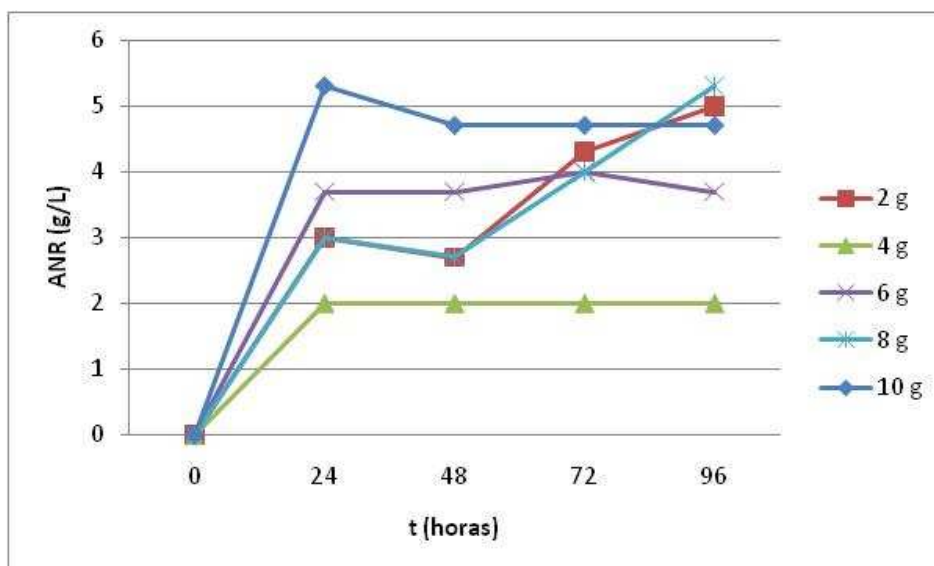


Figura 3.11 Variación del porcentaje azúcares no reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis (arreglo estadístico 5x5).

El análisis de variancia ANOVA efectuado con los datos conseguidos (Tabla 3.12), muestra una diferencia estadística entre las cantidades de biomasa utilizadas, por lo que se los considera altamente significativos. De manera, se decidió realizar una prueba de Tukey al 5% para analizarlos (Tabla 3.13).

Tabla 3.12 ANOVA del porcentaje de azúcares reductores en el estudio del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis.

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	3949.65	4	987.413	14.95	0.00
HORAS	7410.32	4	1052.50	20.04	0.00
REPETICIONES	4660.35	66	66.0659		
TOTAL	15720,3	74			

Tabla 3.13 Prueba de Tukey al 5% para el efecto de la cantidad de biomasa.

Tratamiento	Media AR	Rango de Significancia
2 g	34.7333	B
4 g	39.1333	C
6 g	40.3333	D
8 g	26.4667	A
10 g	32.9333	B

En el análisis del efecto de la cantidad de biomasa en la hidrólisis, la prueba de Tukey fijó cuatro rangos de significancia. El mejor promedio de azúcares reductores corresponde al tratamiento de 6 g, localizado en el rango D. En el rango C se encuentra el tratamiento de 4 g., en el rango B están 2 y 10 g. Finalmente el rango A con el promedio de azúcares reductores más bajos corresponde al tratamiento de 8 g.

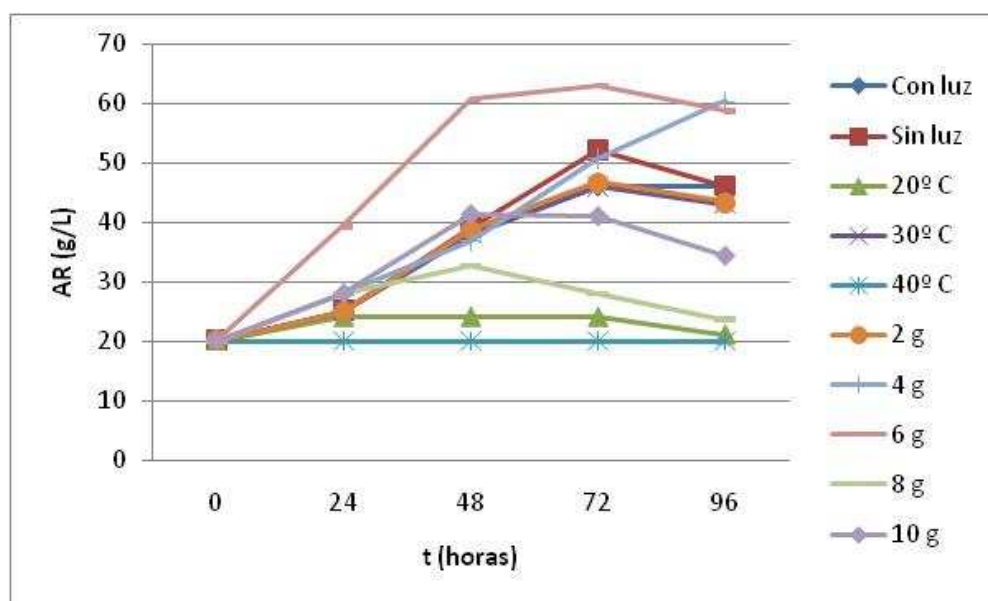


Figura 3.12 Variación del porcentaje azúcares no reductores durante el estudio del efecto de la iluminación, temperatura y cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis.

Los porcentajes de azúcares reductores obtenidos en cada tratamiento, se muestran en la figura 3.12. En esta figura se observa de forma mas clara las diferencias entre los tratamientos, así como también la mejor combinación de factores que permitió alcanzar el mayor porcentaje (40,33%) de azúcares reductores (6 g. de materia prima, 48 horas de hidrólisis, sin luz y 30° C).

La hidrólisis produce una disminución del contenido de biomasa, así como también del valor de pH. En la tabla 3.14, se muestra la variación porcentual en el contenido de biomasa tanto húmeda como seca y el valor de pH. Se puede observar que la cantidad de biomasa está en un rango de 60.98 – 66.41%, mientras que el valor del pH se reduce entre 4.66 – 4.85.

Tabla 3.14 Características finales de la biomasa en la etapa de hidrólisis.

REPETICIÓN	BIOMASA (g)		% HUMEDAD	pH
	Húmeda	Seca		
R1	21,4772	3,6587	82,9647	4,66
R2	23,1143	3,7440	83,8022	4,78
R2	26,0169	3,9847	84,6842	4,85
MEDIAS	23,5361	3,7958	83,8170	4,76

3.4 Fermentación

La variación de productos volátiles generados durante el proceso de producción de bioetanol versus los microorganismos utilizados, es la principal variable a ser estudiada en esta etapa.

3.4.1 Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación

El análisis de la variación de productos volátiles, se realizó aplicando dos tipos de microorganismos, como se muestra en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Tratamientos establecidos para la selección del microorganismo para el proceso individual de fermentación.

Nº	TRATAMIENTO	MICROORGANISMO
1	T1	<i>Mucor sp.</i>
2	T2	<i>S. cerevisiae.</i>

La figura 3.13 presenta los porcentajes de etanol producidos usando *S. cerevisiae* y *Mucor sp.* en el proceso de fermentación.

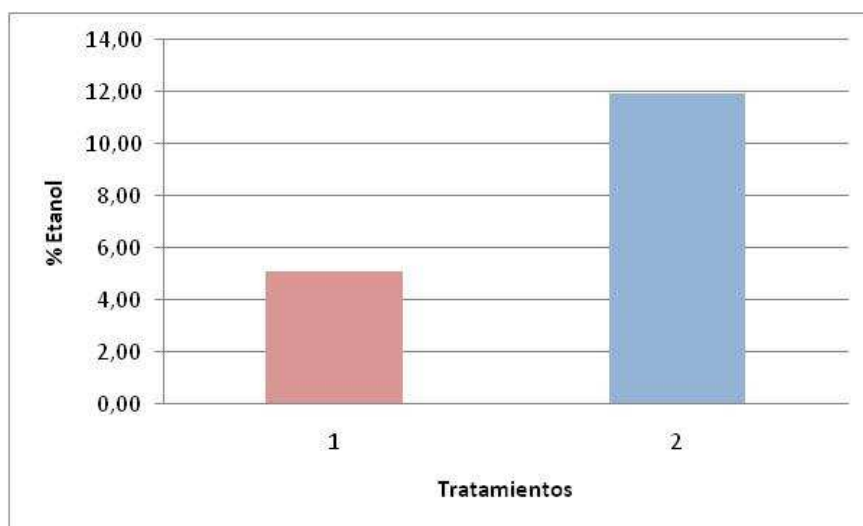


Figura 3.13 Variación del porcentaje de etanol generado por *S. cerevisiae* y *Mucor sp.*

Tabla 3.16 ANOVA del porcentaje de etanol producido por *S. cerevisiae* y *Mucor sp.*

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	68.0040	1	68.8848	141.32	0.0003
REPETICIONES	1.9473	4	0.487433		
TOTAL	70.8345	5			

Para este caso, el análisis de variancia ANOVA realizado con los datos experimentales obtenidos (Tabla 3.16), muestran una diferencia estadística entre los microorganismos considerándolos altamente significativos, por lo que se decidió analizarlos con la prueba de Tukey al 5%.

Tabla 3.17 Prueba de Tukey al 5% para la comparación entre la producción de *S. cerevisiae* y *Mucor sp.*

Tratamiento	Media % Etanol	Rango de Significancia
<i>Mucor sp.</i>	5.12667	A
<i>S. cerevisiae.</i>	11.9033	B

La producción de etanol entre *S. cerevisiae* y *Mucor sp.* muestra dos rangos de significancia, en el rango B se encuentra *S. cerevisiae* con el mejor promedio de producción de etanol comparado con el que se genera con el *Mucor sp.*, rango A.

Respecto al porcentaje de etanol, los resultados detallados en la tabla 3.17, muestran una clara diferencia entre los microorganismos, lo que facilita escoger a *S. cerevisiae.* como microorganismo fermentador.

La fermentación exige una disminución en el contenido de azúcares reductores, así como también en el valor de pH. En la tabla 3.18, se muestra la variación porcentual en el contenido de azúcares reductores y el valor de pH. Se observa que el contenido de azúcares reductores disminuye en un rango de 25 – 40%, mientras que el valor del pH se reduce entre 3.67 – 3.98%.

Tabla 3.18 Características finales en la etapa de fermentación.

PARÁMETRO	REPETICIONES			MEDIAS
	R1	R2	R3	
pH	3,67	3,74	3,98	3,80
AR (g/L)	28	20	14	20,67

3.5 Cinética del protocolo de obtención de bioetanol

La variación del pH, azúcares reductores y productos volátiles generados durante el proceso de producción de bioetanol, en función del tiempo se muestra en las figuras 3.14, 3.15 y 3.16.

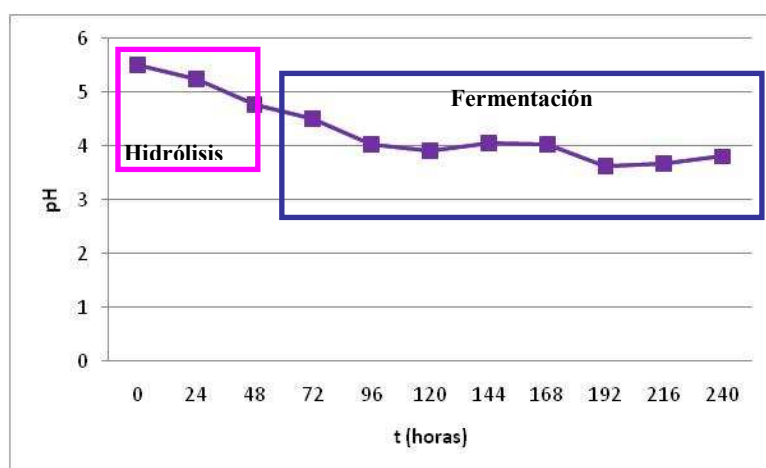


Figura 3.14 Variación del pH durante la obtención de bioetanol.

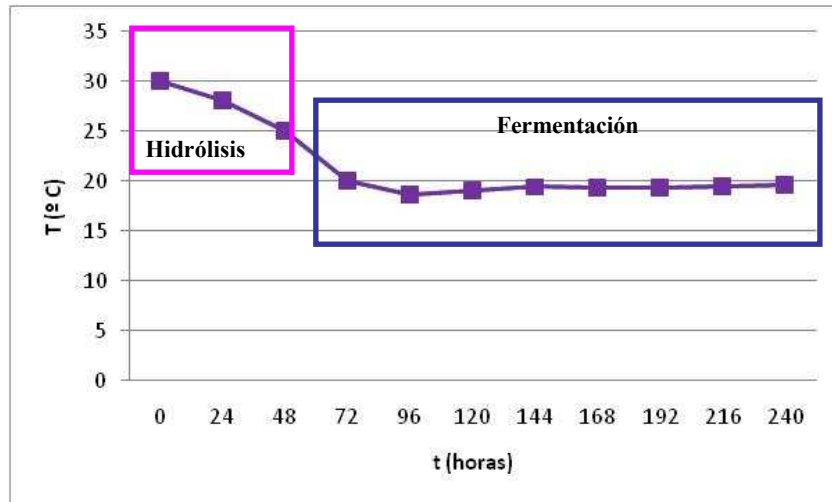


Figura 3.15 Variación de temperatura durante la obtención de bioetanol.

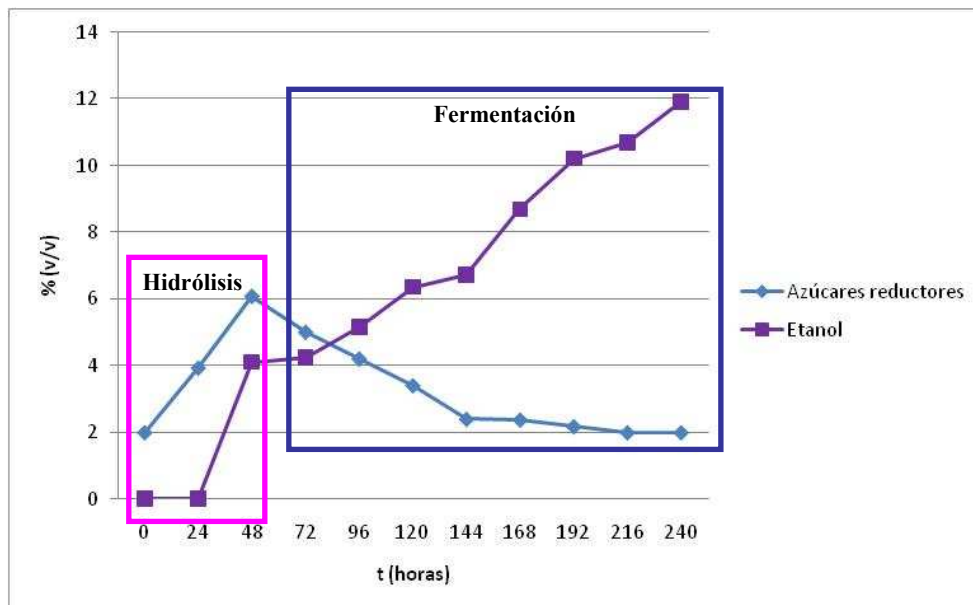


Figura 3.16 Variación de etanol y azúcares reductores durante la de obtención de bioetanol.

3.6 Destilación

Se efectuó una destilación simple y tres destilaciones fraccionadas consecutivas bajo un rango de temperatura de salida de gases de 65 – 70° C, hasta alcanzar una concentración de etanol aproximada del 96%.

Tabla 3.19 Resultados obtenidos en los procesos de destilación, previo a la deshidratación.

REPETICIONES	DESTILACIÓN							
	SIMPLE		FRACCIONADA					
			I		II		III	
	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)
R1	510	31,8	182	60,2	113	95,89	109	95,9
R2	485	38,2	181	69,5	112	95,68	110	95,8
R3	498	35,3	179	66,1	113	95,52	110	95,6
MEDIAS	497,67	35,10	180,67	65,27	112,67	95,70	109,67	95,77

La tabla 3.19 muestra que la concentración promedio de etanol obtenido en la destilación simple es del 35,10% (v/v). En la etapa de enriquecimiento por la destilación fraccionada, se produce una concentración promedio de etanol de 65,27% (v/v), mientras que en el enriquecimiento final, se logra una concentración promedio de etanol de 95,7% (v/v). Se realizó una destilación fraccionada adicional para comprobar si se alcanza el punto de formación azeótropo.

3.6.1 Deshidratación

Con los concentrados finales de la destilación, se condujeron tratamientos de destilación extractiva usando sales anhidras. Para el efecto, se dividió el etanol obtenido en tres alícuotas iguales de 30 mL cada una. La tabla 3.20 muestra los tratamientos de sales anhidras aplicadas.

Tabla 3.20 Tratamientos deshidratación con sales anhidras.

Nº	TRATAMIENTO	SAL ANHIDRA
1	T1	CaCl ₂
2	T2	MgCl ₂
3	T3	NaCOOCH ₃

Las concentraciones de etanol y volúmenes obtenidos mediante la deshidratación con sales anhidras se muestran en la tabla 3.21.

Tabla 3.21 Resultados obtenidos en el proceso de deshidratación con sales anhidras.

REPETICIONES	DESHIDRATACIÓN					
	CaCl ₂		MgCl ₂		NaCOOCH ₃	
	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)
R1	26	99,5	26	98,5	25	98,2
R2	25	99,6	26	98,3	27	98,3
R3	26	99,8	26	98,7	26	97,8
MEDIAS	25,67	99,63	26,00	98,50	26,00	98,10

El ANOVA efectuado para los datos experimentales obtenidos en la etapa de deshidratación (Tabla 3.22), muestran una diferencia estadística con el uso de las sales anhidras, por lo que se los consideró altamente significativos. Luego se procedió a analizarlos con la prueba de Tukey al 5%.

Tabla 3.22 ANOVA del porcentaje de etanol obtenido en el proceso de deshidratación con sales anhidras.

FUENTE	SC	G de L	CM	F CAL	F TAB
TRATAMIENTOS	3,79556	2	1,89778	42,70	0,0003
REPETICIONES	0,266667	6	0,0444444		
TOTAL	4,06222	8			

Tabla 3.23 Prueba de Tukey al 5% para la etapa de deshidratación con sales anhidras.

Tratamiento	Media % Etanol (v/v)	Rango de Significancia
CaCl ₂	99,6333	A
MgCl ₂	98,5	B
NaCOOCH ₃	98,1	B

Los resultados obtenidos muestran dos rangos de significancia, en el rango A se encuentra el CaCl₂, cuyo promedio de concentración es mejor con respecto al rango B (sales de MgCl₂ y NaCOOCH₃). De manera que se escoge al CaCl₂ como mejor tratamiento de deshidratación con sales anhidras.

3.7 Producción de bioetanol en pruebas piloto

Tomando como base los mayores rendimientos de los ensayos hidrolíticos bajo condiciones óptimas de luminiscencia, temperatura y cantidad de biomasa y de los ensayos fermentativos, se escalaron los tratamientos usados en el nivel de laboratorio a los valores presentados en la tabla 3.24 para la hidrólisis y la fermentación. Mientras que para el proceso de deshidratación con sales anhidras, se empleó aquel tratamiento que produjo la mayor concentración de etanol.

Tabla 3.24 Niveles aplicados en la fase piloto.

ETAPA	CARACTERISTICAS
Hidrólisis	80 g de biomasa – sin luminiscencia – 30° C – 48 horas
Fermentación	1,65 g de levaduras - 12,155 g de mezcla nutritiva
Deshidratación	0,1 g de CaCl ₂ /mL

Concluida de hidrólisis, se obtuvo una concentración promedio de azúcares totales de 65,2 g/L, azúcares reductores de 62,5 g/L y azúcares reductores de 4,2 g/L. Mientras que al finalizar la fermentación se obtuvo una concentración promedio de etanol de 11,88% (v/v).

Los resultados promedio obtenidos en los procesos de destilación y deshidratación se muestran en la tabla 3.25. En la destilación simple, se alcanzó un grado de pureza de 30.6% (v/v), mientras en la destilación fraccionada se logró una pureza del 95.8% (v/v), reiterando que la tercera destilación fraccionada se la realizó únicamente para comprobar la llegada al punto azeotrópico. Finalmente, la deshidratación con CaCl₂ alcanza una pureza de 99.6% (v/v), repitiéndose valores conseguidos en la fase de laboratorio.

Tabla 3.25 Rendimiento de los procesos de destilación.

DESTILACIÓN								DESHIDRATACIÓN	
SIMPLE		FRACCIONADA						CaCl ₂	
		I		II		III			
Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)	Volumen (mL)	% Etanol (v/v)
123,0	30,6	47,0	66,7	29,0	95,7	26,7	95,8	23,0	99,6

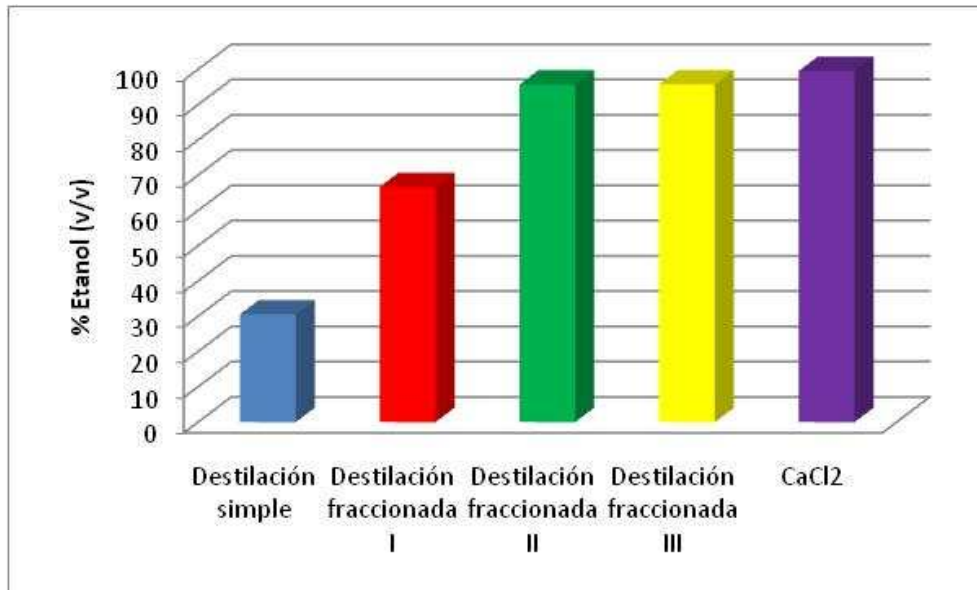


Figura 3.17 Porcentajes de etanol obtenidos luego de destilación y de la deshidratación en la fase piloto.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Selección del medio líquido para *Mucor sp.*

En la selección del medio de cultivo líquido para *Mucor sp.* debe considerarse las cantidades de nutrientes disponibles y la composición química de los medios. Los análisis realizados en este trabajo sirvieron para determinar la composición óptima de materia prima a emplearse.

Los resultados experimentales muestran que el mejor medio de cultivo, es aquel suplementado con (g/L): glucosa, 20; extracto de levadura, 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75; KH_2PO_4 , 3,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,9; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,06 (pH $5,5 \pm 0,2$), pues permite lograr una cantidad promedio de biomasa de 0,378 g/g, datos similares a los obtenidos por Sues *et al* (2005), quienes alcanzan un 0,40 g/g de biomasa. La composición química del medio de cultivo es un aspecto adicional que se debe tomar en cuenta, ya que influye tanto en el tiempo de incubación como en el rendimiento.

Bartnicki & Nikerson (1962) reportan en sus estudios, que el medio de cultivo para el hongo debe contener $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 en concentraciones estándar (0,75 y 3.5 g/L respectivamente). En cambio el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la glucosa fueron elegidos como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. Además, metales traza como el zinc, hierro, cobre y calcio fueron requeridos como cofactores de enzimas y otras proteínas funcionales, y vitaminas como la tiamina o ácido nicotínico fueron necesarias para apoyar el crecimiento anaerobio del hongo. Sues *et al* (2005) indican en su estudio que el extracto de levadura es el suplemento más eficiente, mientras que la adición de vitaminas al medio tiene un efecto insignificante debido a que las vitaminas estándar son bien sintetizadas por *Mucor sp.*

4.2 Hidrólisis

Carlile *et al* (2001) en su libro indica que el hongo *Mucor sp.* es capaz de hidrolizar la materia prima mediante el proceso amilo (amilasas), el cual transforma la biomasa en glucosa y promueven su transformación en alcohol. En este estudio, se realizaron diferentes ensayos con el fin de estimar los efectos que pueden producir las variaciones de luminiscencia, temperatura y cantidad de biomasa en el proceso de hidrólisis y de esta manera identificar las condiciones óptimas del proceso hidrolítico a mayor escala.

4.2.1 Efecto de la iluminación sobre la etapa de hidrólisis

En la hidrólisis enzimática bajo el efecto de la iluminación, no se establecieron rangos de significancia, de manera que la iluminación no es considerada como un factor determinante en la hidrólisis. Carlile *et al.* (2001) en su libro expone que la iluminación comunmente reduce la tasa de crecimiento del hongo en el medio de cultivo. Tal efecto es debido a la destrucción fotoquímica de los componentes del medio, pero en otros casos un efecto directo sobre el metabolismo parece probable.

Carlile *et al* (2001) también indica que *Mucor sp.*, puede, dependiendo de las condiciones de luz, temperatura y humedad, producir solo micelio. La producción de micelio fue confirmada en el presente estudio y se comprobó que en condiciones de oscuridad, se produjo solamente micelio, que es el componente que se necesita mayormente, mientras que con iluminación se observó crecimiento tanto de micelio como de esporas.

4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la etapa de hidrólisis

Algunas especies de hongos tienen una temperatura máxima de crecimiento de entre 30 – 40° C. El análisis del efecto de la temperatura sobre

el proceso de hidrólisis, se realizó evaluando tres valores diferentes de temperatura: 20° C, 30° C y 40° C. Después de 96 horas de hidrólisis, se mantuvo una cantidad de azúcares reductores entre 20 – 46 g/L (Tabla 3.14), siendo el promedio de azúcares reductores para 20° C 22.07 g/L; para 30° C 34.73 g/L y para 40° C 20 g/L. Estos valores indican que la temperatura influye en el proceso, por lo que la hidrólisis puede realizarse de manera efectiva a una temperatura de 30° C. Los resultados del presente estudio, son comparados con los descritos por Ingensson *et al.* (2001), quien indica que la hidrólisis producida por *Mucor sp.* es más estable a bajas temperaturas de reacción (25° . 30° C), rango en el que se alcanza una cantidad de azúcares reductores de 68,4 g/L; de manera que la temperatura óptima de hidrólisis es de 30° C. A esta temperatura la velocidad de reacción de hidrólisis aumenta, lo que resulta en un importe mayor de energía cinética a las moléculas reactantes según lo expone Kelp (1975) en su libro, además de que el hongo se desarrolla a esta temperatura en su hábitat natural (temperatura del suelo en Quito varía ente 15 y 30° C) según lo expone Breijo & Yúfera (1989).

4.2.3 Efecto de la cantidad de biomasa sobre la etapa de hidrólisis

El efecto de la cantidad de biomasa sobre el proceso de hidrólisis, se analizó evaluando cinco cantidades diferentes de biomasa: 2, 4, 6, 8 y 10 g. El rango de azúcares reductores se mantuvo entre 20 – 63 g/L después de 96 horas de hidrólisis (Tabla 3.20). Estos valores indican que la cantidad de biomasa influye en el proceso hidrolítico por existir tolerancia al sustrato por parte del hongo *Mucor sp.* Tomsen *et al.* (2006), reportan en su estudio que el hongo *Mucor sp.* no puede tolerar concentraciones de biomasa de más del 50%. Lynd *et al.* (2001); Joseleau *et al.* (1992) y Pérez *et al.* (2002) explican que este comportamiento se debe a la resistencia mecánica y biológica que opone la biomasa a la hidrólisis. Además Kosaric *et al.* (1987), reportan que a concentraciones de sustrato muy altas, se presentan problemas de respiración en los microorganismos, y la presión osmótica sobre sus paredes celulares es muy grande, por lo que disminuyen su eficiencia. De manera que la cantidad

óptima de biomasa en el proceso hidrolítico es de 6 g., en donde se alcanza una cantidad de azúcares reductores del 40,33 g/L.

4.3 Fermentación

Los microorganismos poseen diferentes capacidades para fermentar azúcares. Sues *et al* (2005), en su estudio manifiesta que *Mucor sp.* tiene mayor capacidad de metabolizar varios tipos de azúcares incluyendo hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). Entre tanto Lin & Tanaka (2006) exponen que *S. cerevisiae.* puede metabolizar solo azúcares simples (glucosa) y disacáridos (sucrosa). Por lo que en este estudio se realizaron diferentes ensayos con el fin de estimar las diferencias entre microorganismos, y de esta manera identificar al adecuado para el proceso fermentativo a mayor escala.

4.3.1 Selección del microorganismo adecuado para el proceso individual de fermentación

La aplicación de los tratamientos para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica, muestran una significancia estadística alta, lo cual indica la existencia de una mejora productiva, en base a los microorganismos aplicados.

Los microorganismos capaces de producir etanol como mayor producto de su metabolismo dependen de su tolerancia tanto a la glucosa como al mismo etanol, así Herrero & Gomez (1980), demostraron que los procesos de fermentación utilizando *Mucor sp.* son lentos (3 – 12 días), y con una pobre producción de etanol (0,8 – 60 g/L), que puede estar asociado con su baja tolerancia a la glucosa y al etanol en condiciones anaerobias. Mientras que Lin & Tanaka (2006) y Caylak & Vardar (1996) demuestran que *S. cerevisiae.* es capaz de producir etanol a partir de glucosa en 4 días con una producción de

alrededor del 96 g/L. Tales resultados son comparables con los obtenidos en la presente investigación. En este estudio se comprueba que *Mucor sp.* es un fermentador lento en comparación con *S. cerevisiae.*, con una producción de etanol del 5,13% y 11,90% respectivamente.

Por otra parte, Abtahi (2008); Millati *et al* (2008) y Karimi *et al* (2006), demuestran que *Mucor sp.* en una fermentación anaerobia produce niveles altos de etanol y glicerol comparado con una fermentación aerobia (donde los niveles de etanol y de glicerol son bajos). Además, los estudios de Taherzadeh *et al* (1996) y Karimi *et al* (2006) con *S. cerevisiae.* demuestran que existe una mayor concentración de etanol y niveles bajos de glicerol en una fermentación anaerobia. En este sentido, la producción de una mayor cantidad de metabolitos secundarios que se aprecia claramente en los cromatogramas obtenidos en este estudio (ANEXO F). La fermentación con *Mucor sp.* produce una mayor cantidad de metabolitos secundarios en comparación con *S. cerevisiae.*

Adicionalmente, la relación entre la levadura y los nutrientes, confirma que los microorganismos interactúan con el ambiente, por lo que la adaptación que desarrollen frente a éste, dependerá de las condiciones físicas y nutricionales (Universidad de Antioquia, 2004); por lo que la cuantificación de los requerimientos nutricionales es de vital importancia. La aplicación de la cantidad adecuada de nutrientes benefician a las condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae* en la fermentación. Berry & Brown (1897), reportan que las levaduras utilizan la mayoría de aminoácidos como fuente de nitrógeno, sin embargo las tasas de crecimiento dependerán de las características de cada aminoácido. Por otro lado, se sabe que mezclas que incluyen diferentes tipos de aminoácidos proporcionan un mejor crecimiento que un aminoácido solo. Esto sugiere que los aminoácidos presentes en el hidrolizado de nuestro estudio no fueron suficientes (carbohidratos (14%), fibras (7.3%), materia nitrogenada (2.69%) y proteínas (1.96%)), por lo que fue necesario la adición de nutrientes que benefician el proceso fermentativo.

4.4 Cinética del protocolo de obtención de bioetanol

Lin & Tanaka (2006), indican que es importante definir las condiciones óptimas de las variables de operación para lograr una rentabilidad suficiente, de manera que los modelos cinéticos que describen el comportamiento de los sistemas microbiológicos son una herramienta muy apreciada.

Madigan *et al* (1997), indican que la fermentación es una vía de conservación de la energía proveniente de la oxidación de los compuestos orgánicos. En tanto que Austin (1988), expone los factores que influyen la fermentación alcohólica son el pH, la aireación, la uniformidad, la propagación del microorganismo, los productos fermentativos, entre otros.

En la presente investigación el pH durante la hidrólisis se mantuvo en $5.5 \pm 0,2$, debido a que en estas condiciones se desarrollan los efectos de las enzimas sobre la biomasa. Los ensayos de fermentación, se realizaron a pH $4.5 \pm 0,2$ puesto que estas condiciones de acidez evitan la contaminación. Aunque para eliminar completamente la contaminación, se utilizó un paso de esterilización mediante el autoclavado.

El pH fue seleccionado tomando en cuenta la resistencia que presenta *S. cerevisiae*. a la acidez, ya que las bacterias que se encuentran junto a las levaduras compitiendo por los mismos nutrientes, no toleran valores de pH inferiores. Müller (1981), explica que este fenómeno está relacionado con la impermeabilidad de las envolturas celulares de *S. cerevisiae*. a los iones de H^+ y OH^- . Esta característica permite tolerar rangos de pH muy amplios (2.6 – 8.6). Adicionalmente, se han propuesto diferentes rangos de pH óptimos para *S. cerevisiae*. durante la fermentación alcohólica. Oleas (1981) propone pH de 3 – 4 y Müller (1981) pH superiores a 4.2. El rango general para la fermentación fue fijado entre 3 – 5.5, el cual depende de la naturaleza del mosto y factores que influyen el proceso fermentativo.

La curva de pH denota una estabilidad durante todo el proceso de fermentación, lo que permite que las levaduras puedan desarrollarse sin ningún inconveniente al no existir variaciones en la acidez o alcalinidad del medio. Streitwieser & Heathcock (1979), indican que la acidez se refiere comúnmente al equilibrio de ionización que se da en una solución acuosa, por la tendencia a ceder protones al agua, o por el consumo de iones hidroxilo. En cambio, Claassen *et al* (2000) demuestra que la descomposición de compuestos ácidos en la hidrólisis provoca una leve baja del pH. Mientras que Leveau & Bouix (2000), indican que al finalizar la fermentación, la acidez aumenta debido a la reducción de iones OH⁻, consecuencia del consumo de etanol por parte de las levaduras.

La temperatura durante la hidrólisis se mantuvo en 30° C, esto debido a que en este punto las enzimas desarrollan su efecto hidrolítico sobre la biomasa. Posteriormente, la temperatura de fermentación se mantuvo en 30° C, lo que facilita según Flanzky (2000), mantener la tasa óptima de crecimiento para *S. cerevisiae*. De los resultados reportados en presente estudio y por otros investigadores, se concluye que es importante conservar los rangos de temperatura entre 4 – 40° C, puesto que fuera de estos valores se puede inducir la mortalidad celular como lo han demostrado Sa-Correia & Van Uden (1986).

Además, luego de concluir las anteriores etapas, en que ocurre la variación significativa de la temperatura, el proceso se mantiene entre el rango de 18.6 – 19.6° C, directamente relacionado con la temperatura del ambiente. Leveau & Bouix (2000), indican que al no observar estos límites ocurriría una lisis o detenimiento del crecimiento celular, con el consecuente detenimiento de la fermentación.

Al comparar las curvas de azúcares reductores con la curva de formación de etanol (Figura 3.18), se observa que la disminución de los

azúcares reductores coincide con el intervalo de tiempo de formación de etanol, lo que según Leveau & Bouix (2000), demuestra que las levaduras están empleando los compuestos carbonados metabolizados por el hongo como fuentes de energía y carbono. La producción de azúcares reductores alcanza un máximo rendimiento (80.7% a las 48 horas). Este valor es similar a los obtenidos por Ingesson *et al* (2001). Sin embargo, debido a la alta velocidad de agitación produjo una mayor tasa de rendimiento (82%). En tanto que la producción de etanol alcanzó un máximo rendimiento de 11.9% (v/v) a las 192 horas. Estas concentraciones se encuentran dentro de los rangos estudiados por Scout (1985) y Flanzy (2000): 8 - 12% (v/v) y del 12 - 14% (v/v), respectivamente, mientras que las reportadas por González & Molina (2005) son valores superiores (7 - 8% (v/v)) a los obtenidos en este estudio (1.025% (v/v)) en un período de 30 horas..

Leveau & Bouix (2000), explican que el descenso de la cantidad de etanol se debe a que otros compuestos pueden ser empleados como fuentes de carbono aun cuando existan glúcidos disponibles. Asimismo el descenso en la cantidad de etanol producido puede ser asociado con las condiciones tóxicas del ambiente que reduce la población microbiana en el ensayo.

Un descenso de la actividad fermentativa se caracteriza según Alexandre *et al* (1994) y Leao & Van Uden (1980, 1984) por un ligero aumento de etanol, el cual afecta la permeabilidad citoplasmática de la membrana de la levadura disminuyendo su selectividad. En presencia de etanol y medio ácido *S. cerevisiae.*, acelera el flujo pasivo de protones del hidrolizado hasta el interior de la célula según lo reportan Juroszel *et al* (1987). Entonces para conservar la neutralidad intracelular, se activa la ATPasa membranal, la cual según Flanzy (2000) está implicada también en las funciones de transporte, como la excreción de protones e ingreso de nutrientes; consecuentemente el aumento de la permeabilidad membranal a los protones conduce a un descenso de la viabilidad celular.

El etanol desnatura las proteínas de los microorganismos hasta inhibir la producción de metabolitos esenciales para la división celular, sin embargo cuando el etanol se encuentra en presencia de materia orgánica puede neutralizar o reducir su efecto desnaturador, debido a que las proteínas lo cuagulan y precipitan, dificultando así su penetración en los microorganismos y por ende reduce su acción inhibitoria, tal reacción se observa en nuestro estudio donde se denota claramente (Figura 3.16) que no existe una disminución en la producción de etanol por parte de los microorganismos.

Durante la fermentación con *Mucor sp.* fue evidente la presencia de metabolitos secundarios (ANEXO F), lo que Michelena & Martin (2002) explican que se debe a que durante la fermentación además de producirse etanol y CO₂ se generan compuestos organolépticos metabolizados a partir de otros componentes del hidrolizado, pudiendo ser clasificados en cinco grupos: alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, compuestos sulfurados y ácidos orgánicos que provienen de los esqueletos carbonados de los aminoácidos que ya han sido metabolizados como lo manifiestan Leveau & Bouix (2000). Tales esqueletos sufren primero una transaminación que transforma el ácido α -acetónico, para luego ser descarboxilado y reducido, esto genera alcoholes cuyo esqueleto contiene un átomo de carbono menos que el aminoácido de partida. La gama de compuestos organolépticos generados durante la producción de etanol es muy amplia, ya que depende de factores como temperatura, tiempo, materia prima, entre otros.

4.5 Destilación

Los resultados muestran que se requiere de cuatro destilaciones hasta alcanzar el punto azeotrópico. Las concentraciones de etanol obtenidas luego de las primeras destilaciones (simple y fraccionada), que se encuentran dentro de los rangos esperados en estos procesos de destilación (20 – 40% para la destilación simple y hasta el 96% en la destilación fraccionada), son altos. Este

comportamiento puede estar asociado con la disminución de la temperatura de volatilización a la salida de gases, por la presión atmosférica donde se efectuaron las experimentaciones. El Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE, se encuentra ubicado a 2280 msnm y su presión barométrica es 0,73 atm. Hiler & Scout (1985) expresan que a una presión menor, la disminución de la temperatura de volatilización del etanol y del agua se hace evidente, por lo que se trabajó en un rango de temperatura de extracción de 65 - 70° C, debido a que el punto de equilibrio contiene mayor cantidad de etanol y menor cantidad de agua.

4.5.1 Deshidratación

Se empleó sales anhidras durante la destilación extractiva, con las cuales se logra alcanzar una concentración cercana al 99,9% debido a que permiten la ruptura del azeótropo. Perry *et al* (2001), en su libro enumera las características principales de un agente de separación. El agente debe alterar la volatilidad relativa, no debe formar azeótropos con ningún otro componente de la mezcla, no debe causar corrosión en los equipos y debe ser de fácil acceso.

Entre los tratamientos aplicados existe una diferencia significativa, lo cual quiere decir, que el empleo de CaCl_2 logra un efecto mayor en la concentración alcohólica obtenida. Esto puede atribuirse a que la naturaleza higroscópica de la sal, que la vuelve mayormente susceptible a la hidratación. Perry *et al* (2001), explica que la adición de sales iónicas no volátiles y solubles, logran modificar el comportamiento de la fase líquida que contiene etanol y agua, mediante el aumento de la volatilidad relativa de la mezcla. Vásquez *et al* (2006) añaden que los iones de las sales tienen mayor afinidad por las moléculas de los efectos más polares (agua), debido a esto la selectividad y magnitud del efecto de la sal sobre la composición de la fase de vapor depende de la diferencia de solubilidades individuales de la sal con los componentes líquidos.

4.6 Producción de bioetanol en pruebas piloto

En la corrida piloto de hidrólisis durante 24 horas, se obtienen concentraciones de azúcares reductores ligeramente mayores a los obtenidos en la fase de laboratorio, 65,2 g/L, lo cual puede atribuirse según Ingensson *et al* (2001) a la alta velocidad de agitación que produjo una mayor tasa de rendimiento al tener mayor interacción de la biomasa con el medio.

Mientras que en la corrida piloto de la fermentación durante 192 horas, se obtienen concentraciones iguales a las obtenidas en la fase de laboratorio, 11,88% (v/v). González & Molina (2005) explican que este comportamiento se debe a una buena interacción de la biomasa con el medio exterior.

Los resultados muestran un rendimiento de 23 mL de etanol al 99,6% (v/v). Estableciéndose una producción experimental de 11,88 g/80 g de biomasa. La concentración obtenida en este piloto, es mayor a la obtenida por Karimi *et al* (2006), a partir de desechos de cascarrilla de arroz. En ese estudio se alcanza una producción de etanol de 220 g/390 g de celulosa extraída de 1 kg de cascarrilla de arroz.

En cambio, la eficiencia total obtenida en el proceso de producción de bioetanol anhidro usando a *S. cerevisiae*. como microorganismo fermentador, fue 14.85%, que está el rango de 12 – 18% de eficiencia evaluada y descrita por Lin & Tanaka (2006) en su compendio de trabajos al respecto.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Con el fin obtener bioetanol por medio de una hidrólisis, se investigó la aplicación de hidrólisis enzimática microbiana, lo que permitió obtener las siguientes conclusiones:

- Se obtuvo 23 mL de bioetanol anhidro al 99.6% (v/v) partiendo de 80 g de materia prima.
- La materia prima óptima tiene una composición de 14 g de carbohidratos, 8.608 g de cenizas, 8.095 g de grasas totales, 7.3 g de fibra., 2.69 g. de materia nitrogenada y 1,96 g de proteínas.
- El medio de cultivo para *Mucor sp.* debe contener glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Además debe contener concentraciones estándar de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 , niveles traza de zinc, hierro, cobre y calcio y extracto de levadura como suplemento.
- La iluminación no es un factor determinante en la hidrólisis, pero se comprobó que bajo un régimen sin iluminación, se obtiene micelio en el crecimiento del hongo.
- El análisis del efecto de la temperatura sobre el proceso de hidrólisis, indica que la temperatura óptima en el proceso es de 30° C, temperatura con la que se alcanza una cantidad de azúcares reductores de 68,4 g/L.
- La cantidad óptima de biomasa en el proceso hidrolítico es de 6 g., con la cual se alcanza una cantidad de azúcares reductores del 40,33 g/L.

- *S. cerevisiae*. es el mejor microorganismo fermentador en condiciones anaerobias capaz de producir etanol a partir del hidrolizado de *Mucor sp.* en 192 horas.
- La adición de 1% (v/v) de levaduras activadas (solución de glucosa al 0,08% (p/v) con 0,15 g de levadura y 1,105 g de mezcla nutricional) brinda una concentración de etanol de 11.9% (v/v) para 6 g de materia prima durante la fermentación, lo que demuestra que se incrementa la estabilidad microbiológica contribuyendo a un mejoramiento en la eficiencia del proceso.
- Con la adición de 0.1 g de CaCl_2/mL en la solución alcohólica, se logra una concentración de etanol del 99,63% (v/v), porque se logra una mejor ruptura del azeótropo etanol – agua, en comparación con las otras sales anhidras (MgCl_2 y NaCOOCH_3).
- El etanol obtenido de la fermentación a nivel piloto, presenta una concentración de etanol de 11.88% (v/v).
- En la prueba piloto, la producción de etanol fue de 11,88 g/80 g de biomasa, con una eficiencia total de 14.85% usando a *S. cerevisiae*. como microorganismo fermentador.
- Según los datos obtenidos, se concluye que es factible obtener bioetanol anhidro a partir de residuos sólidos domésticos, utilizando una hidrólisis enzimática con *Mucor sp.* y una fermentación con *S. cerevisiae*..

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

- Desarrollar más estudios de laboratorio con el objetivo de optimizar la bioconversión de los residuos sólidos domésticos a la producción de bioetanol.
- Caracterizar microbiológicamente al hongo *Mucor sp.* para posteriores estudios.
- Evaluar la carga enzimática producida por el hongo *Mucor sp.*
- Evaluar la eficiencia del hongo *Mucor sp.* sobre diferentes tipos de sustratos como desechos industriales.
- Emplear procesos alternos de hidrólisis mediante cócteles enzimáticos obtenidos del sinergismo entre hongos y bacterias.
- Realizar estudios de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), con el fin de compara los rendimientos de etanol al utilizar *Mucor sp.*
- El uso de técnicas más sensibles, como el HPLC, para la determinación de los metabolitos producidos en el proceso productivo.
- Evaluar procedimientos microbiológicos alternativos y amigables con el planeta en la producción de alcoholes útiles en la creación de nuevos biocombustibles.
- Evaluar procedimientos industriales alternativos que reciclen de una manera eficiente los metabolitos secundarios como el glicerol en una destilación extractiva.

- Comparar el costo de producción entre procesos que impliquen hidrólisis química frente a la hidrólisis enzimática.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA

1. Abtahi, Z. (2008). Ethanol and glucose tolerance of *M. indicus* in aerobic and anaerobic conditions. University College of Borås.
2. Alexandre. H., Berlot, JP., Charpentier, C. (1994). Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplast of *Sacharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. Biotechnol. Techn., 8: 295-300.
3. Anónimo. (1997). World oil supply and demand. Euro Energy Information Newsletter, 15.
4. Austin, G. (1988). Manual de procesos químicos en la industria. (M. Espinosa, J. Trad.) México: McGraw-Hill.
5. Badger, P. (2002). Ethanol from cellulose: A general review. American Society for Horticultural Science (ASHS). United States of America.
6. Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W. (1962). Nutrition growth, and morphogenesis on *Mucor rouxii*. J. Bacteriol., 84: 841-858.
7. Battcock, M., Azam-Ali, S. (1998). Fermented fruits and vegetables: a global perspective. Roma. FAO. Agricultural Services Bulletin No. 134.
8. Berry, D., Brown, C. (1987). Physiology of the yeast growth. In: Berry, D.R.; Russel, I.; Steward, G.G., Yeast Biotechnology, Allen and Unwin, London, p. 159.
9. Bialozynsky, R. (2007). Ethanol production from biomass. Pulaski FFA Chapter. Ag. Science Fair.

10. BioFacts. (1995). Ethanol from biomass. The National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy.
11. Breijó, F., Yúfera, E. (1989). Alcohol de biomasa. III. Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 29 (4): 501-509.
12. Cabrera, J. (2006). Informe CIEMAT.
13. García, C. J., García, L. J. (2006). Biocarburantes Líquidos: Biodiésel y Bioetanol. (Informe de Vigilancia Tecnológica). España. Universidad Rey Juan Carlos.
14. Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G., (2001). The fungi. United States of America.
15. Caylak, B., Vardar, S. (1996). Comparasion of different production processes for bioethanol. Turk J. Chem., 22: 351-359.
16. Claassen, P., Budde, M., López-Contreras, A. (2000). Acetone, butanol and ethanol production from domestic organic waaste by solventogenic *Clostridia*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2 (1): 39-44.
17. Ercoli, M., Lazo, M., Saldaño, M. (2007). Biocombustibles. Universidad nacional del Cuyo. Facultad de Ingeniería. Industrias y Servicios.
18. Flanzky, C. (Ed.). (2000). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. España: AMV.
19. Gonzalez, J., Molina, M. (2005). Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa. Extraído el 6 de febrero del 2009, de <http://www.hiddenwaterfalls.com/ingenieria/ing001-02.pdf>.

20. Guala, M., Campanella, E. (2006). Análisis de Factibilidad de Columnas de Destilación con Salida Lateral. Información Tecnológica, 2 (17): 25-32.
21. Hart, L., Fisher, H. 1971. Modern Food Analysis. New York-United States of America. Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven. Editorial Springer-Verlag, 519 pp.
22. Hernández, M. (2007). Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Universidad Rafael Landívar.
23. Herrero, A., Gomez, R. (1980). Development of ethanol tolerant in *Clostridium thermocellum*: Effect of growth temperature. Appl. Environ. Microbiol., 40: 571-577.
24. Hiller, E., Scout, B. (Eds.). (1985). Biomass Energy: A Monograph. United States of America: University Press.
25. Ingensson, H., Zacchi, G., Yang, B., Esteghlalian, A., Saddler, J. (2001). The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. J. Biotechnol., 88: 177-182.
26. Joseleau, J., Comtat, J., Ruel, K. (1992). Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. Amsterdam. Elsevier Science Publishers. 1-15 pp.
27. Juroszek, JR., Feuillat M., Charpentier, C. (1987). Effect of ethanol on the glucose induced movements of protons across the plasma membrane of *Sacharomyces cerevisiae* NCYC 431. Can J Microbiol, 66: 9397.
28. Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. (2006). Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technol., 40: 138-144.

29. Kelp. (1975). Food Science and & Technology. United States of America. 32-36, 90 pp.
30. Kosaric, N. *et al.* (1987). Ethanol. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, A9: 587-653. Editorial Hans-Jürgen Arpe.
31. Leoa, C., Van Uden, N. (1980). Effect of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Sacharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 22: 359-363.
32. Leoa, C., Van Uden, N. (1984). Effect of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Sacharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 26: 403-405.
33. Leveau J., Bouix, M. 2000. Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza-España, Editorial Acribia.
34. Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospect. App. Microbiol. and Biotechnol., 69: 627-642.
35. Lynd, L., Lyford, K., South, C., van Walsum, G., Levenson, K. (2001). Evaluation of paper sludges for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. Tappi J., 84 (2): 50.
36. Lyons, T. *et al.* 1995. The Alcohol Textbook. Nottingham-Reino Unido. Nottingham University. 332 p.
37. Madigan , M., Martinko, J., Parker, J. (1997). Biology of Microorganism. United States of America: Prentice Hall.
38. Matissek, R., Schnepel, F., Steiner, G. (1992). Análisis de los alimentos: Fundamentos, métodos y aplicaciones. España: Acribia.
39. May, T. (2007). Knowlwdge Database. Industrievertrefungen

40. Michelena, M., Martin, F. 2002. Los biocombustibles. Madrid-España. Editorial Mundi-Prensa.
41. Millati, R., Karimi, K., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. (2008). Ethanol production from xylose and wood hydrolyzate by *Mucor indicus* at different aeration rates. BioResources, 3 (4): 1020-1029.
42. Ministerio De Agricultura Y Ganadería. Boletín De Prensa. (2005). Ecuador.
43. Mosquera, M. (2007). Obtención de etanol anhidro a partir de materiales floculentos de producción nacional: Maíz (*Zea maiz*) y Yuca (*Manihot esculenta crantz*). Tesis Ingeniería en Biotecnología. Quito: Escuela Politécnica del Ecuador.
44. Mountney, G., Gould, W. 1988. Practical Food Microbiology and Technology. New York, United States of America. AVI Books.
45. Müller, Gunther. 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Zaragoza-España, Editorial Acribia. 291 pp.
46. Nogueira, L., Seabra, J., Best, G., Leal, M., Poppe, M. (2008). Bioetanol de caña de azúcar: Energía para el desarrollo sostenible. Rio de Janeiro.
47. Oleas, M. (1981). Estudio comparativo de la obtención de Etanol a partir del plano y de la yuca. Tesis Ingeniería Química. Quito: Universidad Central del Ecuador.
48. Patel, S., Onkarappa, R., Shobha, K. (2007). Study of ethanol production from fangal pretreated wheat and rice straw. J. Microbiology, 1 (4).
49. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, j. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: An overview. International Microbiology, 5: 53-63.

50. Perry, R., Green, D., Maloney, J. (2001). Manual del Ingeniero Químico. (Vols. 1-4). España: McGraw-Hill.
51. Programa Educativo POR QUÉ BIOTECNOLOGIA. (2004). Cuaderno N° 58. Extraído el 02 de abril del 2008, de <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/saccharom/cuaderno/doc/EI%20Cuaderno%2058.doc>.
52. Quintero, R. 1981. Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones. México. Editorial Alhambra Mexicana. 332 p.
53. Robson, G. (2007). The history and development of bioethanol as an alternative fuel. *Biotechnology (Enterprise)*.
54. Sa-Correia, I., van Uden, N. (1986). Ethanol-induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 301-303.
55. Sánchez, O., Cardona, C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 11 (30): 671-678.
56. Sánchez, O., Cardona, C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante II: integración de procesos. *Interciencia*, 11 (30): 679-686.
57. Scragg, A. 1999. Biología Ambiental. Zaragoza-España, Editorial Acribia.
58. Skory, C., Freer, S., Bothast, R. (1997). Screening for ethanol-producing filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.*, 19: 203-206.
59. Smil, V. (2003). Energy at the crossroads.

60. Streitwieser, A., Heathcock, C. 1979. Química orgánica. México. Editorial Interamericana.
61. Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. (2005). Ethanol production from hexoses, pentosas, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. FEMS Yeast Research, 5: 669-676.
62. Taherzadeh, M., Lidén, G., Gustafsson, L., Niklasson, C. (1996). The effect of pantothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by *Sacharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 46 (2): 176-182.
63. Thomsen, M., Martín, C., Taherzadeh, M., Hauggaard-Nielsen, H., Thomsen, A. (2006). Bioethanol fermentation with *Mucor indicus* on a White Clover/Rye grass substrate. Risoe National Laboratory (Clover-grass project) and EU-project Co-production Biofuels.
64. Unesa. (2008). Avance Estadístico de la Asociación Española de la Industria Eléctrica. Extraído el 02 de agosto del 2009, de <http://www.europapress.es/economia/energia-00341/noticia-economia-energia-ampl-consumo-electricidad-registra-caida-historica-43-2009-crisis-20091230132811.html?rel>.
65. Universidad de Antioquia (2004). Relación de los microorganismos con el medio. Extraído el 10 de diciembre del 2008, de http://docencia.udea.edu.co/bacteriología/MicrobiologiaAmbiental/microbiologia_2.pdf.
66. Uyazán, A., Gil, D., Aguilar, J., Rodríguez, G., Caicedo, L. (2006). Producción de etanol carburante por destilación extractiva: Simulación del proceso con glicerol. Rev. Ingeniería e Investigación, 1 (26): 45-50.

67. Vázquez, C., Ruiz, C., Anrango, D., Caicedo, R., Sanchez, M., Ríos, L., Restrepo, G. (2006). Producción de etanol absoluto por destilación extractiva combinada con efecto salino. Universidad de Antioquia.
68. Wingrove, A., Caret, R. 1981. Química Orgánica. (M. Chu, P. Trad.) México. Editorial Harla.
69. Zacchi, G., Galbe, M. (2002). A review of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Bioeng., 36: 417-426.
70. Zertuche, L., Zall, R. (1982). A study of producing ethanol from cellulose using *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Bioeng., 24: 57-68.

ANEXOS

ANEXO A: REACTIVO DE FEHLING

- a) Solución de sulfato de cobre.- Disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua destilada.

- b) Solución alcalina de tartrato.- Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratada y 50 g de NaOH en 500 mL de agua destilada.

Tomado de: AOAC Official Method 923.09 (2005)

Extraído el: 27 de febrero del 2009.

ANEXO B: ESTANDARIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FEHLING

1. Coloque 2,5 mL de la solución A y 2,5 mL de la solución B en un erlenmeyer de 250 mL. Añada 10 mL de agua destilada y algunas perlas de vidrio. (Por duplicado).
2. En una bureta de 50 mL, coloque la solución de glucosa al 0.5%. Deje caer desde la bureta solución de glucosa y lleve a ebullición. Deje calentar durante 2 minutos.
3. Continúe agregando pequeñas cantidades de solución de glucosa y caliente después de cada adición hasta que observe un precipitado rojo y el líquido se encuentre sobre el sea prácticamente incoloro.
4. Tome en cuenta el volumen de solución de glucosa gastado en la titulación final y calcule el título del licor de Fehling expresado en mg. de glucosa anhidra.
5. Registre sus resultados en la tabla 1

Cálculos:

$$f = \frac{(\text{mL de sol. Gastados} * \% \text{ sol. Glucosa} * 5 \text{ mL de sol. Fehling})}{1000}$$

Para los siguientes experimentos se necesitara el valor del titulo del licor de Fehling (f), para ello calcule un valor promedio con los valores obtenidos

Tabla 1 Datos experimentales de la estandarización de la solución de Fehling.

MUESTRA	VOLUMEN DE SOLUCIÓN GASTADOS (mL)	TÍTULO DE LICOR DE FEHLING (f)	CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR EN LA MUESTRA (mg/mL)
1	11	0,0275	55
2	11	0,0275	55
TÍTULO DE LICOR DE FEHLING (f) PROMEDIO		0,0275	

Tomado de: Práctica N° 10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS (Universidad Nacional Experimental del Yaracuy "UNEY")

Extraído el: 27 de febrero del 2009.

ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

1. Coloque en una bureta la solución problema.
2. Coloque en un erlenmeyer de 250 mL, 2,5 mL de la solución de Fehling A y 2,5 mL de solución de Fehling B, agregue 10 mL de agua destilada y unas perlas de vidrio (Hágalo por duplicado).
3. Lleve a ebullición y vierta rápidamente la solución problema, con la ayuda de la bureta. A medida que la coloración (azul) cúprica se debilita, indica que la titulación esta llegando a su fin. Continúe la titulación hasta que el líquido que se encuentra sobre el precipitado rojo sea incoloro.
4. Anote el volumen de la muestra problema consumido en la titulación.
5. Registre sus resultados en la tabla 2

Cálculos:

$$\%A.R = \left(\frac{f}{\text{vol. Sol. Gastados}} \right) * 100$$

Tabla 2 Datos experimentales de la determinación de azúcares reductores.

MUESTRA	VOLUMEN DE SOLUCIÓN GASTADOS (mL)	% DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA MUESTRA
1		
2		

Tomado de: Práctica N° 10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
(Universidad Nacional Experimental del Yaracuy "UNEY")

Extraído el: 27 de febrero del 2009.

DATOS DE AZÚCARES REDUCTORES

Tabla 2.1 Datos experimentales de la determinación de azúcares reductores, realizado para el análisis del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR
CON LUZ	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,115	24,0	0,106	26,0	0,110	25,0
	48	0,051	54,0	0,081	34,0	0,098	28,0
	72	0,053	52,0	0,053	52,0	0,076	36,0
	96	0,089	37,5	0,094	33,0	0,106	27,3
	MEDIA	0,065	42,0	0,060	46,0	0,053	52,0
SIN LUZ	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,115	24,0	0,110	25,0	0,106	26,0
	48	0,053	52,0	0,115	24,0	0,064	43,0
	72	0,054	51,0	0,051	54,0	0,052	53,0
	96	0,054	51,0	0,076	36,0	0,053	52,0
	MEDIA	0,069	44,5	0,088	34,8	0,069	43,5

Tabla 2.2 Datos experimentales de la determinación de azúcares reductores, realizado para el análisis del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR
20° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,110	25,0	0,110	25,0	0,120	23,0
	48	0,110	25,0	0,110	25,0	0,120	23,0
	72	0,110	25,0	0,115	24,0	0,120	23,0
	96	0,115	24,0	0,120	23,0	0,153	18,0
	MEDIA	0,111	24,8	0,114	24,3	0,128	21,8
30° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,115	24,0	0,106	26,0	0,110	25,0
	48	0,051	54,0	0,081	34,0	0,098	28,0
	72	0,053	52,0	0,053	52,0	0,076	36,0
	96	0,065	42,0	0,076	36,0	0,053	52,0
	MEDIA	0,071	43,0	0,079	37,0	0,084	35,3
40° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	48	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	72	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	96	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	MEDIA	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0

Tabla 2.3 Datos experimentales de la determinación de azúcares reductores, realizado para el análisis del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AR
2 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,115	24,0	0,106	26,0	0,110	25,0
	48	0,051	54,0	0,081	34,0	0,098	28,0
	72	0,053	52,0	0,053	52,0	0,076	36,0
	96	0,065	42,0	0,076	36,0	0,053	52,0
	MEDIA	0,071	43,0	0,079	37,0	0,084	35,3
4 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,098	28,0	0,060	46,0	0,076	36,0
	72	0,049	56,0	0,049	56,0	0,069	40,0
	96	0,042	65,0	0,046	60,0	0,049	56,0
	MEDIA	0,072	44,3	0,063	47,5	0,073	40,0
6 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,069	40,0	0,086	32,0	0,060	46,0
	48	0,039	70,0	0,049	56,0	0,049	56,0
	72	0,042	66,0	0,046	60,0	0,044	63,0
	96	0,046	60,0	0,048	57,0	0,047	59,0
	MEDIA	0,049	59,0	0,057	51,3	0,050	56,0
8 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,086	32,0	0,092	30,0	0,076	36,0
	72	0,106	26,0	0,106	26,0	0,086	32,0
	96	0,138	20,0	0,110	25,0	0,106	26,0
	MEDIA	0,107	26,5	0,101	27,3	0,092	30,5
10 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,086	32,0	0,060	46,0	0,060	46,0
	72	0,060	46,0	0,069	40,0	0,074	37,0
	96	0,074	37,0	0,076	36,0	0,092	30,0
	MEDIA	0,080	35,8	0,076	37,5	0,081	35,3

ANEXO D: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES (HIDRÓLISIS)

1. Mida 50 mL de la solución problema con una pipeta y coloque los en un matraz aforado de 100 mL.
2. Añada 5 mL de HCl 1:1 y caliente a 70° C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
3. Neutralice con NaOH usando fenolftaleina como indicador.
4. Complete el volumen a 100 mL con agua.
5. Filtre
6. Coloque en una bureta la solución problema.
7. Coloque en un erlenmeyer de 250 mL, 2,5 mL de la solución de Fehling A y 2,5 mL de solución de Fehling B, agregue 10 mL de agua destilada y unas perlas de vidrio (Hágalo por duplicado).
8. Lleve a ebullición y vierta rápidamente la solución problema, con la ayuda de la bureta. A medida que la coloración (azul) cúprica se debilita, indica que la titulación esta llegando a su fin. Continúe la titulación hasta que el liquido que se encuentra sobre el precipitado rojo sea incoloro.

9. Anote el volumen de la muestra problema consumido en la titulación.

10. Registre sus resultados en la tabla 3

Cálculos:

$$\%A.T = \left(\frac{f}{\text{vol. Sol. Gastados}} \right) * 100$$

Tabla 3 Datos experimentales de la determinación de azúcares totales.

MUESTRA	VOLUMEN DE SOLUCIÓN GASTADOS (mL)	% DE AZÚCARES TOTALES EN LA MUESTRA
1		
2		

Tomado de: Práctica N° 10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
(Universidad Nacional Experimental del Yaracuy “UNEY”)

Extraído el: 27 de febrero del 2009.

DATOS DE AZÚCARES TOTALES

Tabla 3.1 Datos experimentales de la determinación de azúcares totales, realizado para el análisis del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT
CON LUZ	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,049	56,0	0,076	36,0	0,086	32,0
	72	0,049	56,0	0,049	56,0	0,069	40,0
	96	0,060	46,0	0,055	50,0	0,049	56,0
	MEDIA	0,064	46,5	0,070	42,5	0,076	39,0
SIN LUZ	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,049	56,0	0,098	28,0	0,060	46,0
	72	0,049	56,0	0,049	56,0	0,049	56,0
	96	0,049	56,0	0,069	40,0	0,049	56,0
	MEDIA	0,061	49,0	0,079	38,0	0,064	46,5

Tabla 3.2 Datos experimentales de la determinación de azúcares totales, realizado para el análisis del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT
20° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	72	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	96	0,098	28,0	0,098	28,0	0,138	20,0
	MEDIA	0,098	28,0	0,098	28,0	0,108	26,0
30° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,049	56,0	0,076	36,0	0,086	32,0
	72	0,049	56,0	0,049	56,0	0,049	56,0
	96	0,049	56,0	0,069	40,0	0,049	56,0
	MEDIA	0,061	49,0	0,073	40,0	0,071	43,0
40° C	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	48	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	72	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	96	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	MEDIA	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0

Tabla 3.3 Datos experimentales de la determinación de azúcares totales, realizado para el análisis del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICIÓN					
		R1		R2		R3	
		Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT	Vol. Sol. Gastado (mL)	% AT
2 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,098	28,0	0,098	28,0	0,098	28,0
	48	0,049	56,0	0,076	36,0	0,086	32,0
	72	0,049	56,0	0,049	56,0	0,067	41,0
	96	0,056	49,0	0,069	40,0	0,049	56,0
	MEDIA	0,063	47,3	0,073	40,0	0,075	39,3
4 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,092	30,0	0,095	29,0	0,089	31,0
	48	0,092	30,0	0,059	47,0	0,071	39,0
	72	0,047	58,0	0,048	57,0	0,064	43,0
	96	0,041	67,0	0,045	61,0	0,047	59,0
	MEDIA	0,068	46,3	0,062	48,5	0,067	43,0
6 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,064	43,0	0,079	35,0	0,054	51,0
	48	0,038	73,0	0,047	59,0	0,045	61,0
	72	0,040	69,0	0,043	64,0	0,040	68,0
	96	0,043	64,0	0,044	62,0	0,045	61,0
	MEDIA	0,046	62,3	0,053	55,0	0,046	60,3
8 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,086	32,0	0,092	30,0	0,089	31,0
	48	0,081	34,0	0,086	32,0	0,069	40,0
	72	0,092	30,0	0,092	30,0	0,076	36,0
	96	0,098	28,0	0,095	29,0	0,092	30,0
	MEDIA	0,089	31,0	0,091	30,3	0,081	34,3
10 g.	0	0,138	20,0	0,138	20,0	0,138	20,0
	24	0,079	35,0	0,086	32,0	0,083	33,0
	48	0,072	38,0	0,056	49,0	0,054	51,0
	72	0,053	52,0	0,064	43,0	0,065	42,0
	96	0,064	43,0	0,071	39,0	0,079	35,0
	MEDIA	0,067	42,0	0,069	40,8	0,070	40,3

ANEXO E: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NO REDUCTORES

Cálculos:

$$\%A.N.R = \%A.T - \%A.R$$

Tomado de: Práctica N° 10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS
(Universidad Nacional Experimental del Yaracuy "UNEY")

Extraído el: 27 de febrero del 2009.

DATOS DE AZÚCARES NO REDUCTORES

Tabla 4.1 Datos experimentales de la determinación de azúcares no reductores, realizado para el análisis del efecto de la luminiscencia sobre la hidrólisis.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICION		
		R1	R2	R3
CON LUZ	0	0,0	0,0	0,0
	24	4,0	2,0	3,0
	48	2,0	2,0	4,0
	72	4,0	4,0	4,0
	96	4,0	4,0	4,0
	MEDIA	3,5	3,0	3,8
	SIN LUZ	0	0,0	0,0
24		4,0	3,0	2,0
48		4,0	4,0	3,0
72		5,0	2,0	3,0
96		5,0	4,0	4,0
MEDIA		4,5	3,3	3,0

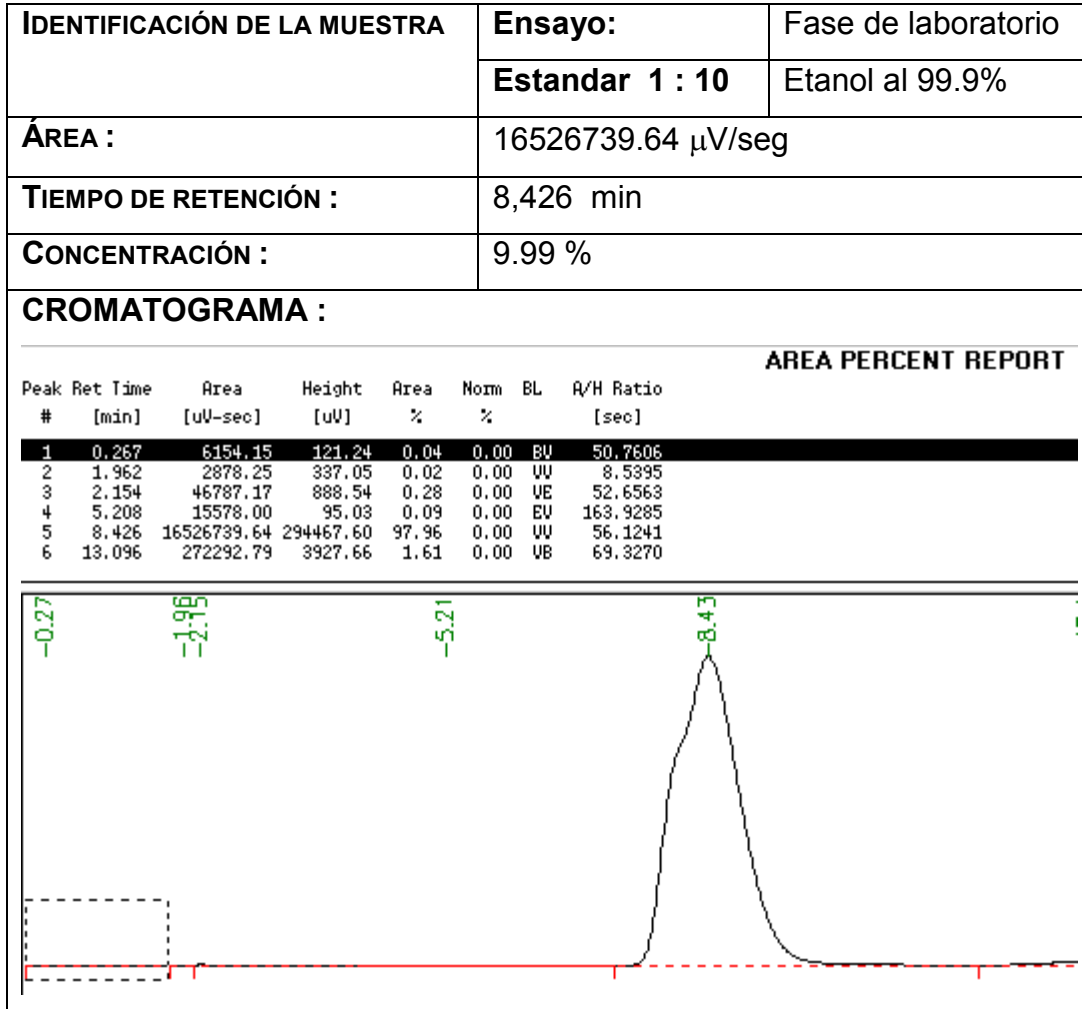
Tabla 4.2 Datos experimentales de la determinación de azúcares no reductores, realizado para el análisis del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis.

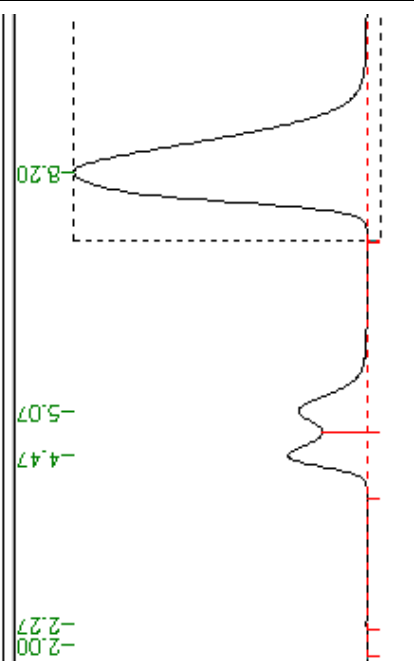
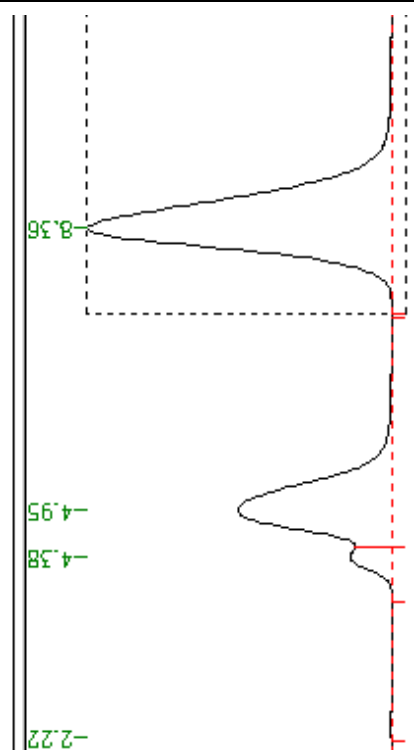
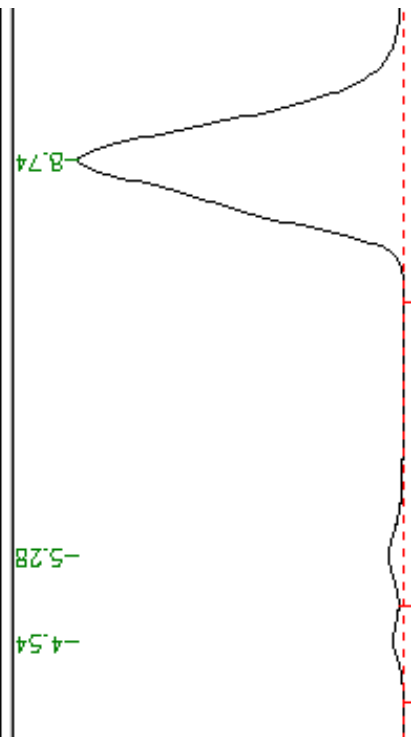
TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICION		
		R1	R2	R3
20° C	0	0,0	0,0	0,0
	24	3,0	3,0	5,0
	48	3,0	3,0	5,0
	72	3,0	4,0	5,0
	96	4,0	5,0	2,0
	MEDIA	3,3	3,8	4,3
30° C	0	0,0	0,0	0,0
	24	4,0	2,0	3,0
	48	2,0	2,0	4,0
	72	4,0	4,0	20,0
	96	14,0	4,0	4,0
	MEDIA	6,0	3,0	7,8
40° C	0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0
	MEDIA	0,0	0,0	0,0

Tabla 4.3 Datos experimentales de la determinación de azúcares no reductores, realizado para el análisis del efecto de la cantidad de biomasa sobre la hidrólisis.

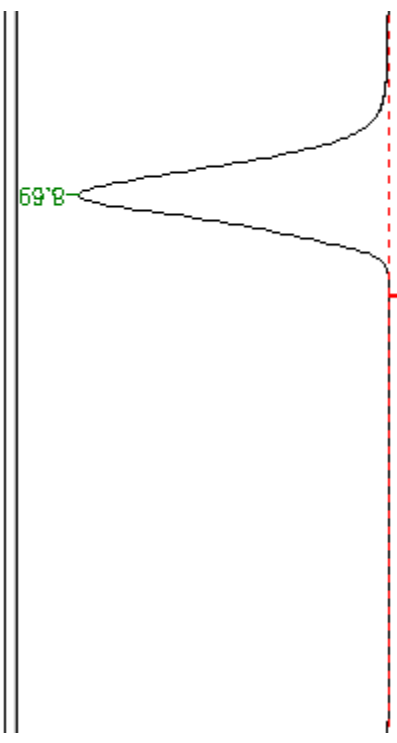
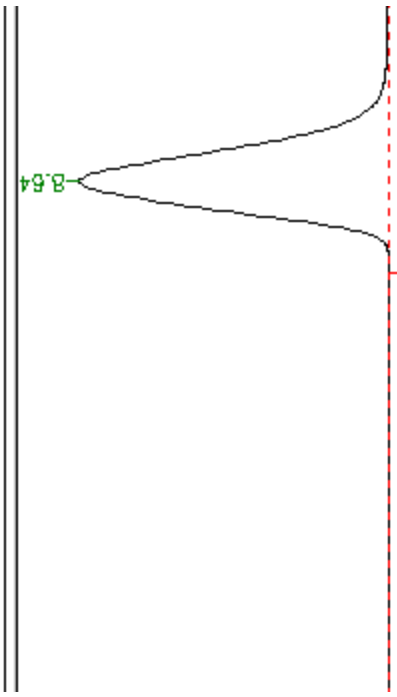
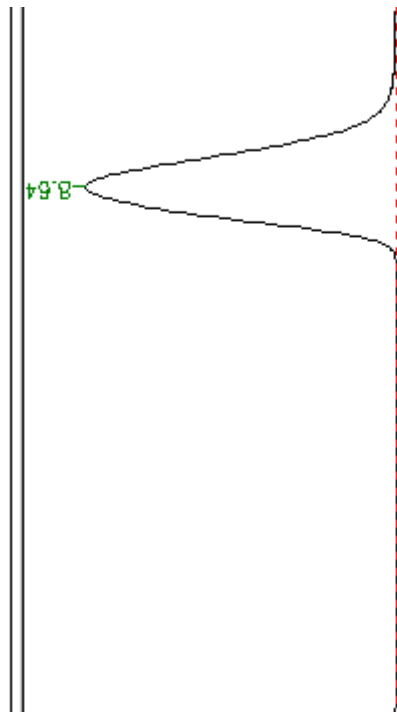
TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)	REPETICION		
		R1	R2	R3
2 g.	0	0,0	0,0	0,0
	24	4,0	2,0	3,0
	48	2,0	2,0	4,0
	72	4,0	4,0	5,0
	96	7,0	4,0	4,0
	MEDIA	4,3	3,0	4,0
4 g.	0	0,0	0,0	0,0
	24	2,0	1,0	3,0
	48	2,0	1,0	3,0
	72	2,0	1,0	3,0
	96	2,0	1,0	3,0
	MEDIA	2,0	1,0	3,0
6 g.	0	0,0	0,0	0,0
	24	3,0	3,0	5,0
	48	3,0	3,0	5,0
	72	3,0	4,0	5,0
	96	4,0	5,0	2,0
	MEDIA	3,3	3,8	4,3
8 g.	0	0,0	0,0	0,0
	24	4,0	2,0	3,0
	48	2,0	2,0	4,0
	72	4,0	4,0	4,0
	96	8,0	4,0	4,0
	MEDIA	4,5	3,0	3,8
10 g.	0	0,0	0,0	0,0
	24	7,0	4,0	5,0
	48	6,0	3,0	5,0
	72	6,0	3,0	5,0
	96	6,0	3,0	5,0
	MEDIA	6,3	3,3	5,0

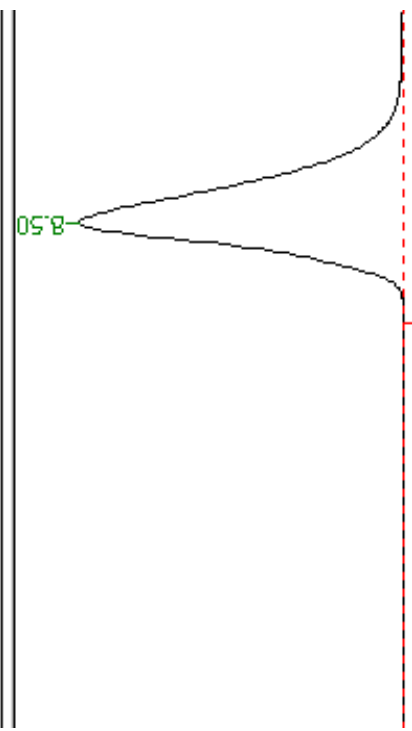
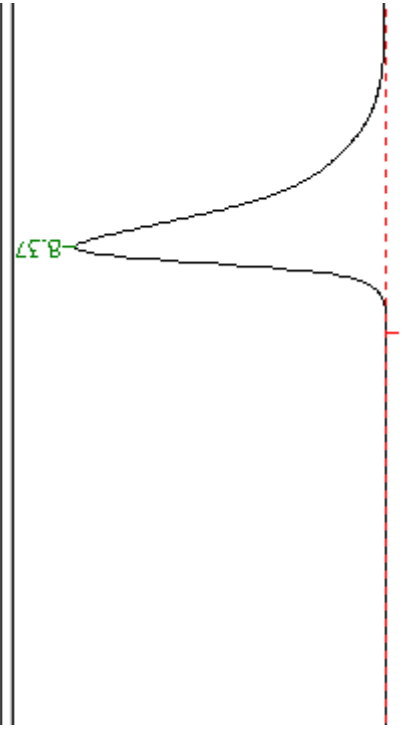
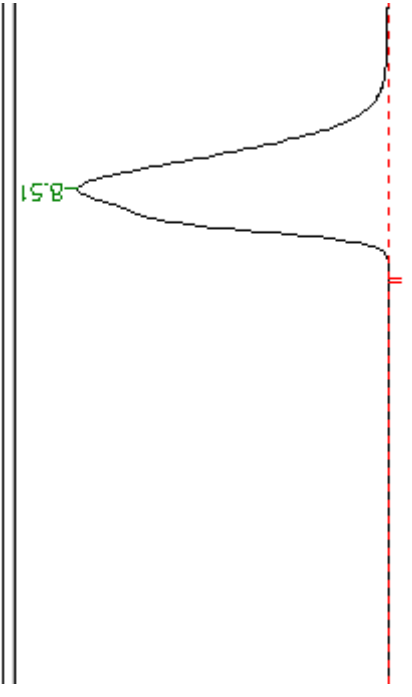
ANEXO F: CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

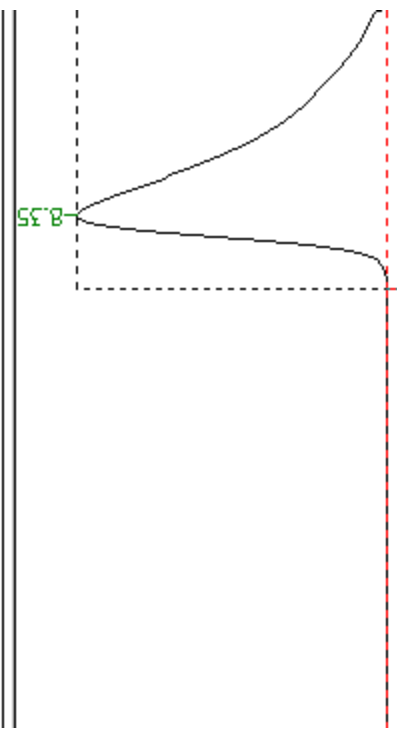
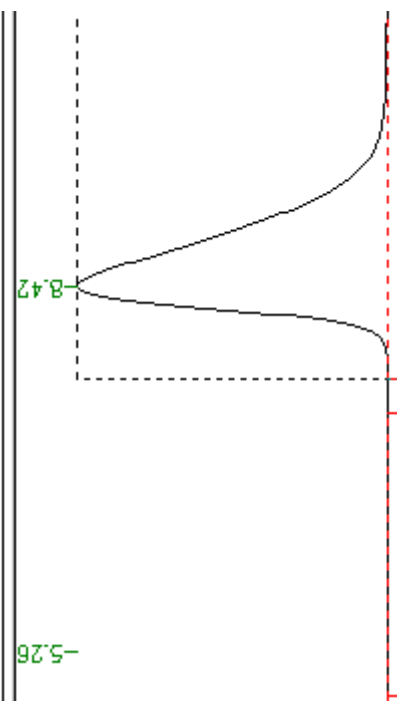
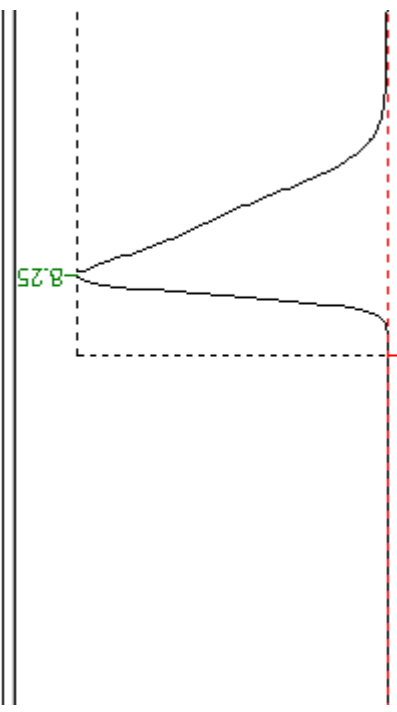


IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Fase de laboratorio	
		Microorganismo :	<i>Mucor sp.</i>	
Repetición :	1	Repetición :	2	3
ÁREA (µV/seg) :	7575288.00	ÁREA (µV/seg) :	9674309.00	8217756,83
VOLUMEN :	300 mL	VOLUMEN :	300 mL	300 mL
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.199 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.356 min	8.735 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	4.57 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	5.84 %	4.97 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :
				

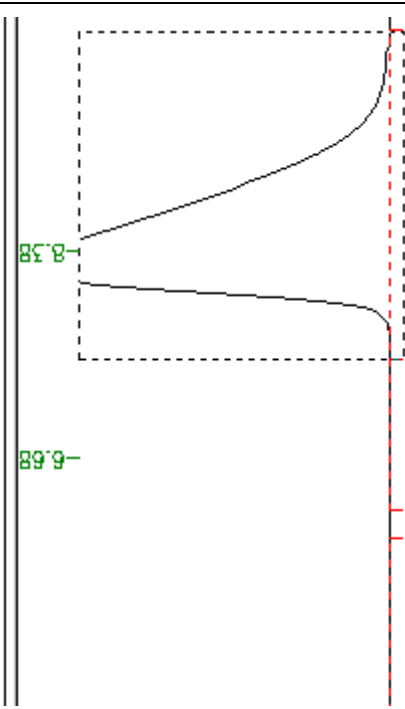
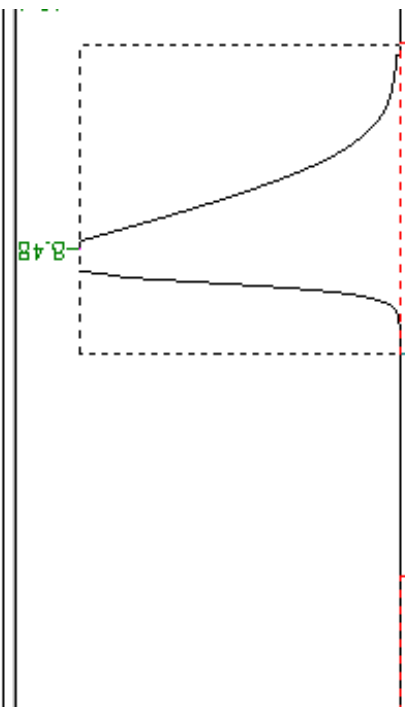
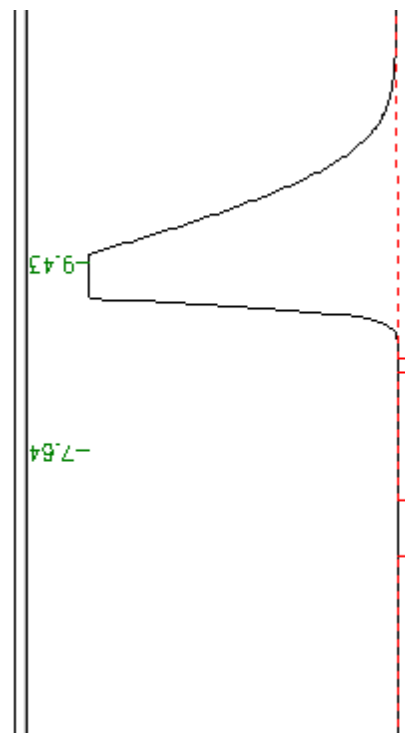
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
		Microorganismo :		<i>S. cerevisiae.</i>	
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	18404082,67	ÁREA (μV/seg) :	20968481,38	ÁREA (μV/seg) :	19842890,46
VOLUMEN :	300 mL	VOLUMEN :	300 mL	VOLUMEN :	300 mL
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.371 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.00 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.461 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	11.12 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	12.6 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	11.99 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

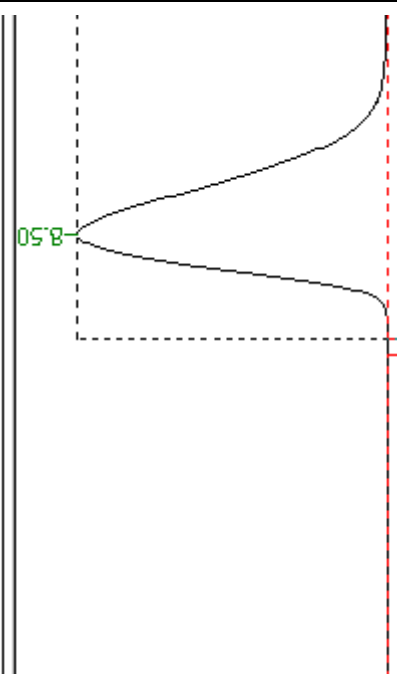
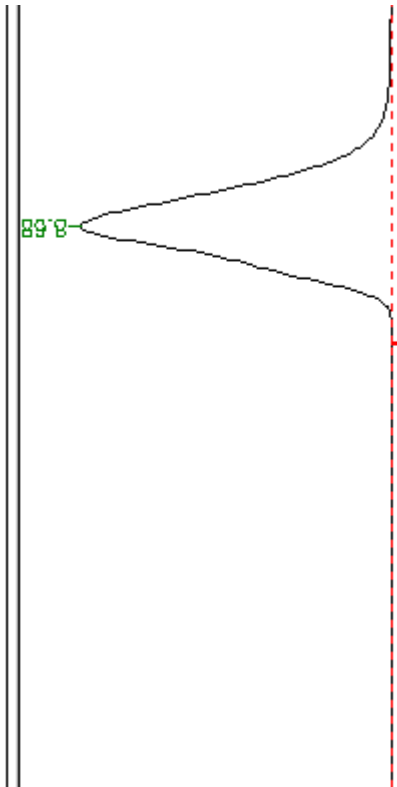
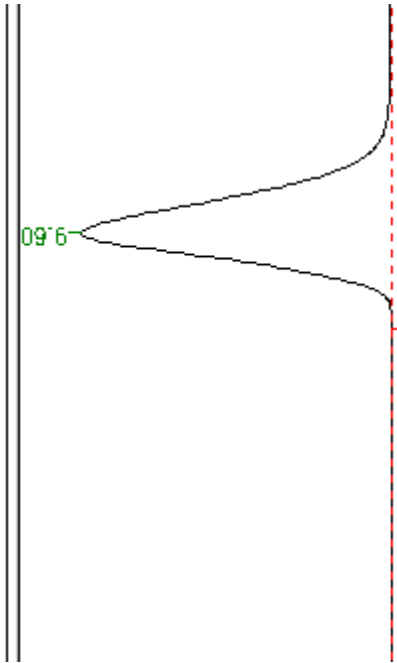
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
Destilación :		Simple			
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (µV/seg) :	8781488	ÁREA (µV/seg) :	10528439,95	ÁREA (µV/seg) :	9734081,9
VOLUMEN :	510 mL	VOLUMEN :	485 mL	VOLUMEN :	498 mL
DILUCIÓN :	1: 6	DILUCIÓN :	1: 6	DILUCIÓN :	1: 6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.687 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.644 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.639 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	31.8 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	38.2 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	35.3 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
					

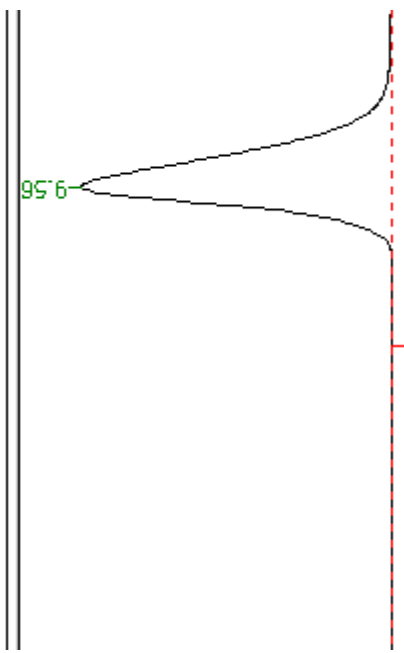
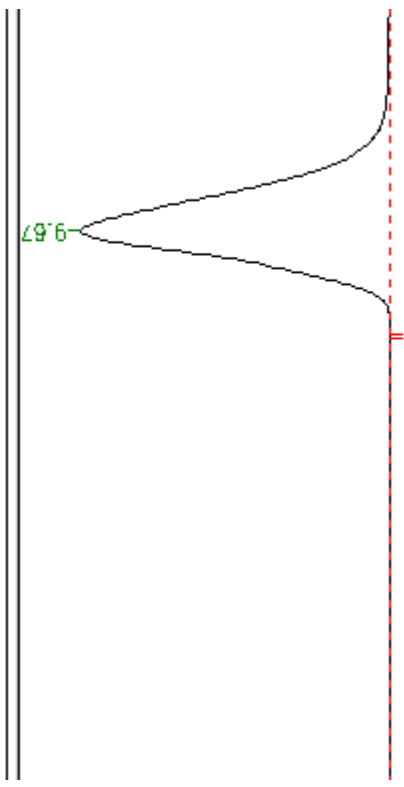
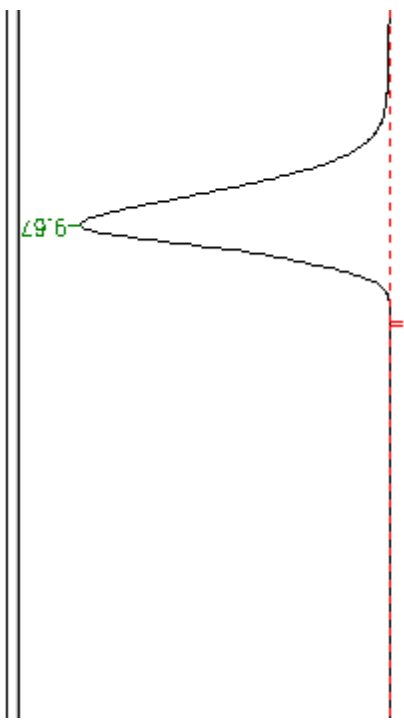
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
		Destilación :		Fraccionada I	
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	16582352,11	ÁREA (μV/seg) :	19176129,47	ÁREA (μV/seg) :	18235072
VOLUMEN :	182 mL	VOLUMEN :	181 mL	VOLUMEN :	179 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.496 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.370 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.506 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	60.2 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	69.5 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	66.1 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
					

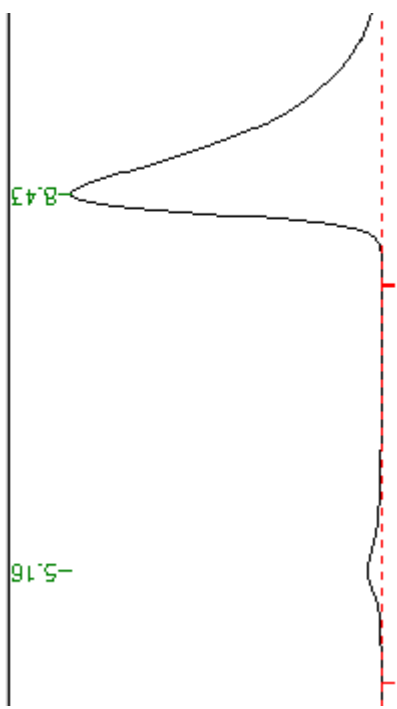
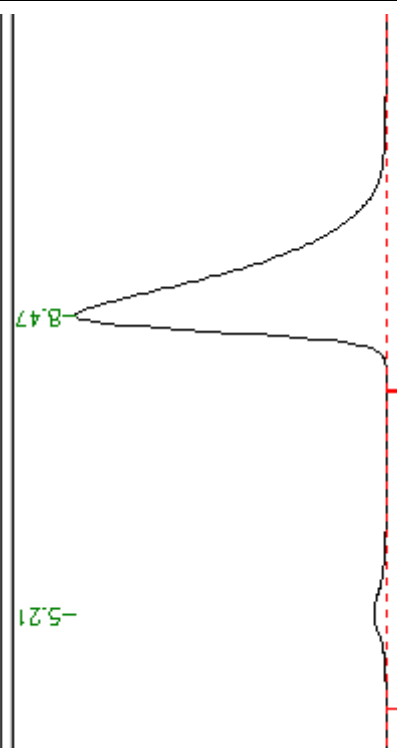
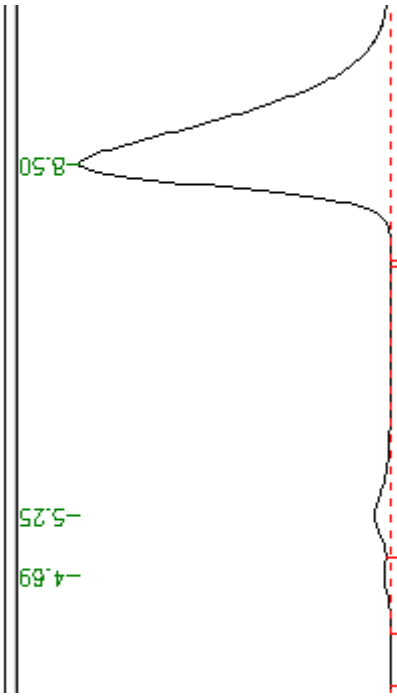
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
		Destilación :		Fraccionada II	
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	26441677.82	ÁREA (μV/seg) :	26382003.88	ÁREA (μV/seg) :	2592361.86
VOLUMEN :	113 mL	VOLUMEN :	112 mL	VOLUMEN :	113 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.345 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.421 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.252 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.89 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.68 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.52 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
					

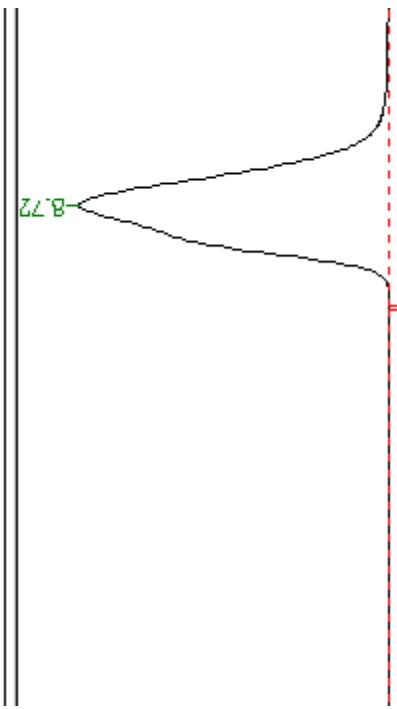
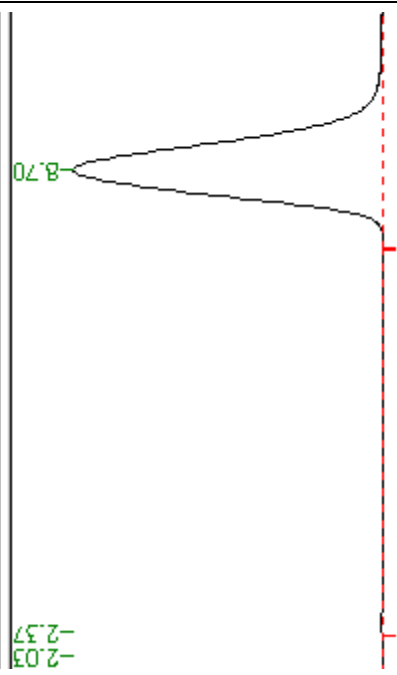
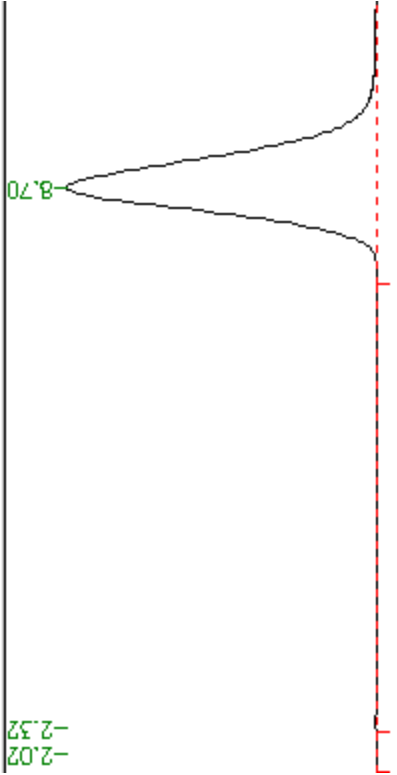
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
		Destilación :		Fraccionada III	
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA ($\mu\text{V}/\text{seg}$) :	2602674.87	ÁREA ($\mu\text{V}/\text{seg}$) :	2599960.92	ÁREA ($\mu\text{V}/\text{seg}$) :	2594533.03
VOLUMEN :	109 mL	VOLUMEN :	110 mL	VOLUMEN :	110 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.683 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.626 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.379 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.9 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.8 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.6 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

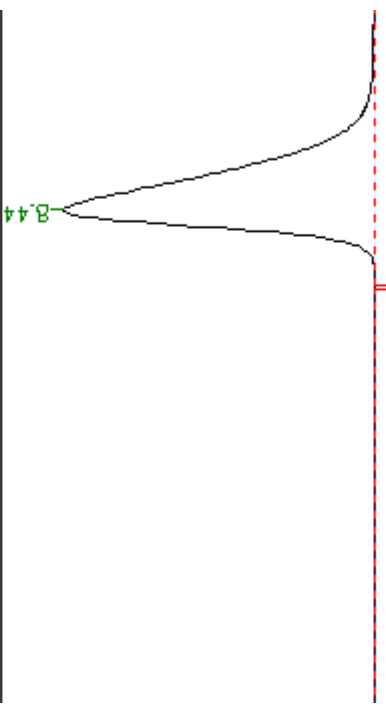
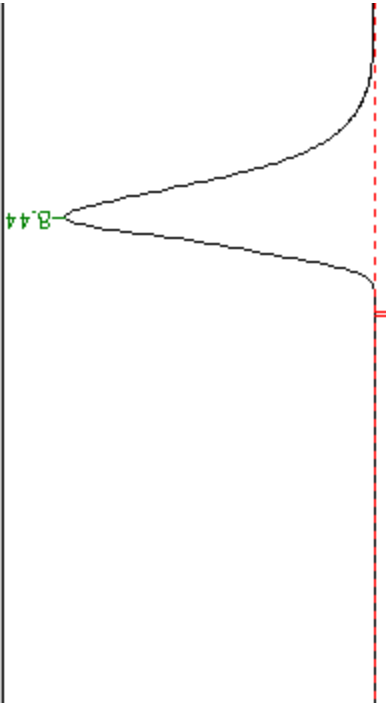
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Fase de laboratorio	
		Deshidratación :		CaCl ₂	
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	27434277.51	ÁREA (μV/seg) :	27461849.65	ÁREA (μV/seg) :	27516993.93
VOLUMEN :	26 mL	VOLUMEN :	25 mL	VOLUMEN :	26 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.375 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.475 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	9.425 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	99.5 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	99.6 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	99.8 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
					

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Fase de laboratorio		
		Deshidratación :	MgCl ₂		
Repetición :	1	Repetición :	2	3	
ÁREA (μV/seg) :	27158556.13	ÁREA (μV/seg) :	27103411.86	27213700.41	
VOLUMEN :	26 mL	VOLUMEN :	26 mL	26 mL	
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	1:6	
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.497 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.683 min	9.599 min	
CONCENTRACIÓN % (V/V) :	98.5 %	CONCENTRACIÓN % (V/V) :	98.3 %	98.7 %	
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

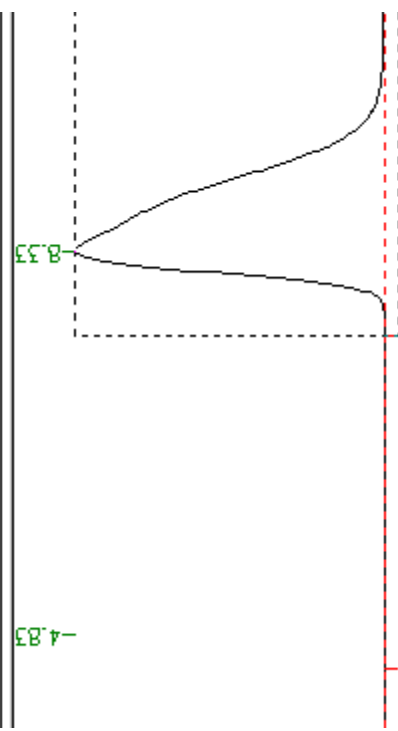
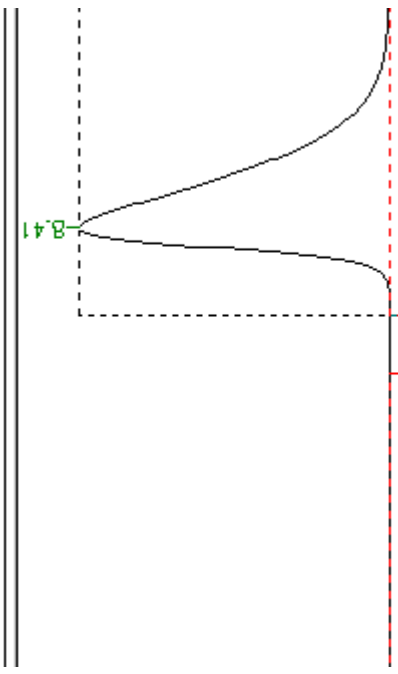
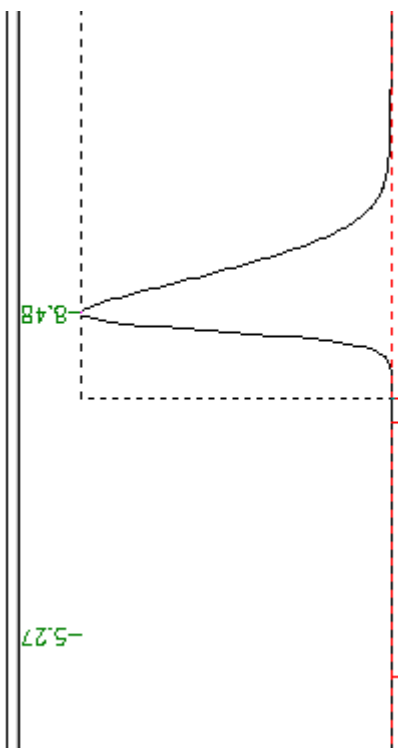
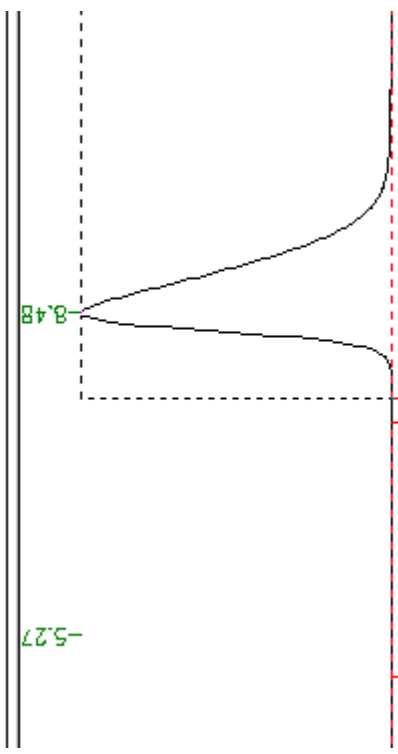
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Fase de laboratorio		
		Deshidratación :	NaCOOCH ₃		
Repetición :	1	Repetición :	2	3	
ÁREA (μV/seg) :	27075839.72	ÁREA (μV/seg) :	27103411.86	269655551.16	
VOLUMEN :	25 mL	VOLUMEN :	27 mL	26 mL	
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6	1:6	
TIEMPO DE RETENCIÓN :	9.557 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	9.665 min	9.67 min	
CONCENTRACIÓN % (V/V) :	98.2 %	CONCENTRACIÓN % (V/V) :	98.3 %	97.8 %	
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

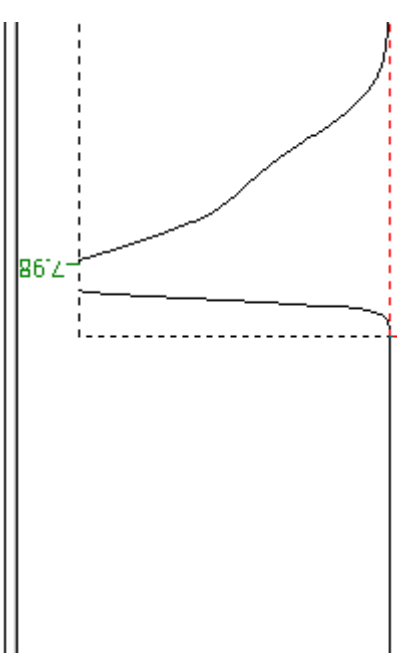
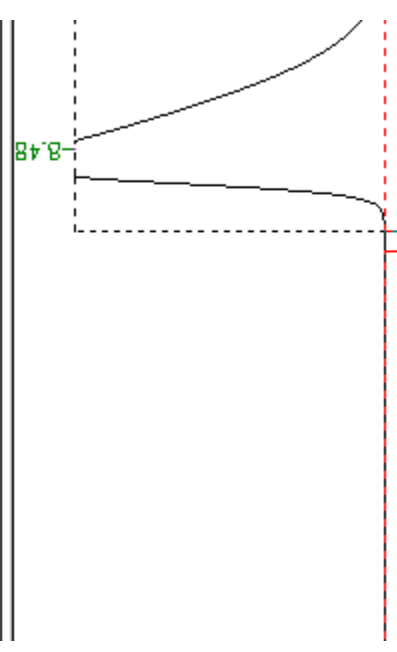
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Piloto
		Microorganismo :	<i>S. cerevisiae</i> .
Repetición :	1	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	20415534	ÁREA (μV/seg) :	18355345
VOLUMEN :	4 L	VOLUMEN :	4 L
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.434 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.496 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	12.34 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	11.09 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
			

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :		Piloto	
Destilación :		Simple			
Repetición :	1	Repetición :	2	Repetición :	3
ÁREA (µV/seg) :	9111328	ÁREA (µV/seg) :	7690158,5	ÁREA (µV/seg) :	8490670
VOLUMEN :	144 mL	VOLUMEN :	102 mL	VOLUMEN :	123 mL
DILUCIÓN :	1: 6	DILUCIÓN :	1: 6	DILUCIÓN :	1: 6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.719 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.699 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.703 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	33 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	27.9 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	30.8 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
					

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Piloto
Destilación :		Fraccionada I	
Repetición :	1	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	18836467,5	ÁREA (μV/seg) :	18619345
VOLUMEN :	54 mL	VOLUMEN :	47 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.441 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.383 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	68.3 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	67.5 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
			

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Piloto
		Destilación :	Fraccionada II
Repetición :	1	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	26411351.19	ÁREA (μV/seg) :	26364478.55
VOLUMEN :	33 mL	VOLUMEN :	29 mL
DILUCIÓN :	1: 6	DILUCIÓN :	1: 6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.252 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.487 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.79 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.62 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Piloto
Destilación :		Fraccionada III	
Repetición :	1	Repetición :	3
ÁREA (μV/seg) :	2641408.41	ÁREA (μV/seg) :	26386536.26
VOLUMEN :	31 mL	VOLUMEN :	27 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.332 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.413 min
CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.8 %	CONCENTRACIÓN % (V/V)	95.7 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		Ensayo :	Piloto
		Deshidratación :	CaCl ₂
Repetición :	1	Repetición :	2
ÁREA (μV/seg) :	27461849.65	ÁREA (μV/seg) :	27489421.79
VOLUMEN :	24 mL	VOLUMEN :	20 mL
DILUCIÓN :	1:6	DILUCIÓN :	1:6
TIEMPO DE RETENCIÓN :	7.975 min	TIEMPO DE RETENCIÓN :	8.475 min
CONCENTRACIÓN % (V/V) :	99.6 %	CONCENTRACIÓN % (V/V) :	99.7 %
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
			
CROMATOGRAMA :		CROMATOGRAMA :	
