



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

UNIVERSIDAD DE CUENCA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



TEMA:

OBTENCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DEL PERICARPIO DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

Tesis previa a la obtención del título de:
Ingeniero Químico

AUTOR:

LUIS MIGUEL ÁVILA JIMÉNEZ

DIRECTOR:

ING. JUAN JOSÉ VÁZQUEZ GUILLEN

Cuenca-Ecuador
2015



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio Tecnológico de la Universidad de Cuenca, y tuvo como principal objetivo obtener bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), mediante un proceso de hidrólisis con ácido sulfúrico diluido previo a la etapa de fermentación. De esta forma, se pretende presentar un biocombustible para el sector transporte como una alternativa energética.

El proceso se llevó a cabo en tres etapas. La primera consistió en la caracterización química del pericarpio de maracuyá, el cual presenta un 48 % de holocelulosa. En una segunda etapa se realizó una hidrólisis ácida para la producción de azúcares fermentables. Para la evaluación del mejor proceso se empleó un diseño factorial 2^3 , donde se controló los factores presión, tiempo y concentración de ácido sulfúrico. La respuesta se midió como concentración de azúcares reductores con el método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson. Los resultados de este diseño factorial permitieron seleccionar la mejor combinación de los factores para maximizar el rendimiento de conversión: presión, 15 PSI; tiempo, 30 minutos; y concentración, 5 %. La máxima concentración de azúcares reductores alcanzada fue $9,82 \pm 0,36$ g/l. Finalmente, se llevó a cabo el proceso de fermentación en condiciones anaerobias, para lo cual se utilizó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo. Adicionalmente, se ajustaron los parámetros del proceso tales como: temperatura de crecimiento, 30 °C; pH, 4.5 y agitación orbital, 200 rpm. El rendimiento de conversión de pericarpio a bioetanol fue bajo, 0.35%.

Palabras clave: bioetanol, biocombustibles, hidrólisis ácida, azúcares reductores, biomasa lignocelulósica.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

ABSTRACT

This research was made at the Cuenca University and its main objective was to get a second generation bioethanol from passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) pericarp. It was employed a hydrolysis process with dilute sulfuric acid. In this way, the purpose is to present a biofuel, which is an energetic alternative for the transport sector.

The process was developed in three steps. First, its made the chemical characterization of passion fruit pericarp, which had 48 % of holocellulose. Second, its made the acid hydrolysis process to produce reducing sugars. For evaluation the better process, its employed a factorial design 2^3 , where was controlled some factors such as: pressure, time, and acid sulfuric concentration. Besides, the answer was measured as sugars concentration with the Somogyi-Nelson spectrophotometric method. The results allowed to select the better factors configuration to maximize the conversion. The values are: 15 psi, 30 minutes and concentration of 5%. Finally, the glycosidic syrup was subjected to fermentation process anaerobically to the bioethanol production, for which it was used a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as microorganism. In addition, fermentation parameters such as, growth temperature, pH and orbital agitation were adjusted. Whit these conditions the result was a low yield.

Key words: bioethanol, biofuels, reducing sugars, acid hydrolysis, lignocellulosic biomass.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

INDICE GENERAL

SELECCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN	13
DELIMITACIÓN DEL TEMA	13
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	13
Objetivo General:	13
Objetivos Específicos:	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Situación de la energía a nivel mundial	15
1.1.1. Demanda mundial bioenergía	16
1.1.2. Emisiones de CO2 a nivel global	16
1.2. Situación de la energía a nivel de Latinoamérica	17
1.3. Situación energética en Ecuador	19
1.3.1. El transporte como consumidor principal en Ecuador	20
1.3.2. Bioetanol en Ecuador	20
2. LA BIOMASA.....	21
2.2. Bioenergía y biomasa.....	21
2.3. Origen de la biomasa	21
2.4. Biomasa lignocelulósica	23
2.4.1. Estructura de la pared celular vegetal	23
2.4.2. Componentes de la biomasa lignocelulósica.....	24
2.4.2.1. Componentes principales o estructurales	24
2.4.2.1.1. Celulosa.....	24
2.4.2.1.2. Hemicelulosa	25
2.4.2.1.3. Lignina	25
2.4.2.2. Componentes secundarios	26
2.2. Pericarpio de maracuyá como materia prima	26
2.2.1.1. Composición del pericarpio de maracuyá	27
2.2.2. Maracuyá en el Ecuador	28
3. BIOCOMBUSTIBLES	29
3.1. BIOETANOL	29
3.2. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	30



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

3.2.1. Etapa de pretratamiento	32
3.2.2. Etapa de hidrólisis	32
3.2.2.1. Hidrólisis ácida	33
3.2.2.2. Hidrólisis enzimática.....	33
3.2.2.2.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa	34
3.2.2.2.2. Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa	34
3.2.3. Fermentación.....	35
3.2.3.1. Fermentador	36
3.2.3.2. Medios de fermentación	36
3.2.3.3. Requerimientos nutricionales.....	36
3.2.3.4. Fermentación alcohólica	37
3.2.3.5. Crecimiento microbiano	37
3.2.3.6. Microorganismos involucrados en la fermentación para la producción de bioetanol	37
3.2.3.7. Selección de microorganismos	38
3.2.3.7.1. Saccharomyces cerevisiae	39
3.2.3.8. Control y monitorización de la fermentación.	39
3.2.4. Destilación	39
4. METODOLOGÍA	41
4.1. Etapa 1: Preparación de la muestra	41
4.1.1. Secado y reducción de tamaño.....	41
4.1.2. Caracterización del pericarpio de maracuyá	42
4.1.2.1. Determinación de la humedad	44
4.1.2.2. Determinación de extractos:	44
4.1.2.3. Extracción en agua caliente	45
4.1.2.4. Determinación de lignina klason	46
4.1.2.5. Determinación de holocelulosa.....	48
4.1.2.6. Determinación de azúcares reductores	49
4.1.2.7. Determinación del almidón.....	50
4.2. Etapa 2: Obtención del jarabe glucosídico	50
4.2.1. Eliminación de lignina.....	50
4.2.2. Hidrólisis ácida.....	50
4.2.2.1. Diseño factorial 2k.....	51
4.2.2.2. El diseño factorial 2 ³	51
4.2.2.3. Variables del proceso.....	53



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

4.2.2.3.1. Variables controlables	54
4.2.2.3.2. Variables independientes	54
4.2.2.3.3. Variables dependientes	54
4.3. Etapa 3: obtención de bioetanol	56
4.3.1. Fermentación	56
4.3.2. Determinación del contenido de bioetanol	57
5. RESULTADOS Y ANALISIS DE DATOS	59
5.1. Caracterización de la materia prima	59
5.2. Resultados y análisis de datos de la hidrólisis ácida	60
5.2.1. Curva de calibración	60
5.2.2. Medición de la variable respuesta	61
5.2.3. Análisis de datos del diseño factorial 2^3	61
5.2.3.1. Matriz estándar	61
5.2.3.2. Análisis de varianza	62
5.2.3.3. Análisis de gráficos	63
5.2.3.3.1. Gráfica normal de efectos estandarizados	63
5.2.3.3.2. Diagrama de efectos principales	64
5.2.3.3.3. Diagrama de cubo	64
5.2.3.4. Diagnóstico y validación del modelo	65
5.2.3.4.1. Prueba de normalidad de errores	65
5.2.3.4.2. Prueba de independencia de errores	66
5.2.4. Selección del proceso más óptimo	66
5.3. Resultados de la etapa de fermentación	68
6. CONCLUSIONES	70
7. RECOMENDACIONES	71
8. Bibliografía	72
9. ANEXOS	77



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Inversión global para el suministro de energía	15
Figura 1.2. Uso mundial de la bioenergía por sectores en el Escenario de las Nuevas Políticas	16
Figura 1.3. Emisiones de CO ₂ a nivel global.....	17
Figura 1.4. Suministro de energía en América Latina y el Caribe, año 2013	18
Figura 1.6. Fuentes de energía en la matriz energética de Ecuador	19
Figura 1.7. Demanda de energía total del Ecuador por sectores	19
Figura 2.1. Ciclo del almacenamiento de la energía solar en la biomasa y la reutilización del CO ₂	22
Figura 2.2. Estructura de la lignocelulosa	23
Figura 2.3. Pared celular primaria en las células vegetales	24
Figura 2.4. Estructura química de la celulosa.....	25
Figura 2.5. Sección representativa de la estructura de la lignina	26
Figura 2.6. Superficie cultivada de maracuyá en Ecuador en el año 2013.....	28
Figura 3.1. Esquema del proceso de producción de etanol por medio de hidrólisis de la biomasa.	31
Figura 4.1. Diagrama para la caracterización de la materia prima	43
Figura 4.2. Fase líquida con la lignina disuelta.....	50
Figura 4.3. Vista geométrica del diseño factorial 2 ³	51
Figura 4.4. Autoclave para la hidrólisis	55
Figura 4.5. Separación del jarabe glucosídico.....	56
Figura 4.6. Determinación de azúcares reductores.....	56
Figura 4.7. Equipo para el proceso de fermentación.....	57
Figura 4.8. Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá	58
Figura 5.1. Curva de calibración para la medición de los azúcares reductores	60
Figura 5.2. Gráfica normal de efectos estandarizados	63
Figura 5.3. Gráfica de efectos principales	64
Figura 5.4. Gráfica de cubos de Azúcares reductores (g/l)	65
Figura 5.5. Gráfica de probabilidad normal (La respuesta es azúcares reductores (g/l))	65
Figura 5.6. Gráfica de los residuales contra el orden de observación (La respuesta es azúcares reductores (g/l))	66



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Porcentaje de Cáscara, Pulpa, Semilla del Maracuyá (<i>Passiflora edullis flavicarpa</i>) en tres estados de Madures.....	27
Tabla 3-1. Comparación de las diferentes opciones para la hidrólisis de la celulosa. .	35
Tabla 3-2. Microorganismos generalmente empleados para la producción de bioetanol	38
Tabla 4-1. Matriz de diseño del factorial 2^3	52
Tabla 4-2. Cálculo de la tabla Anova	53
Tabla 4-3. Factores y respuesta del diseño factorial	54
Tabla 4-4. Combinación de los factores	55
Tabla 5-1. Resultados de los análisis de la caracterización.....	59
Tabla 5-2. Resultados de las corridas experimentales del diseño factorial	61
Tabla 5-3. Matriz estándar del diseño factorial con dos replicas	62
Tabla 5-4: Tabla Anova del diseño factorial	62
Tabla 5-5. Concentración de azúcares reductores.....	67
Tabla 5-6. Rendimiento de conversión de la holocelulosa.....	67
Tabla 5-7. Resultado de la determinación de bioetanol	68
Tabla 5-8. Concentración de bioetanol en g/l	68
Tabla 5-9. Rendimiento de conversión a etanol con respecto a la materia prima seca	69



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo Luis Miguel Ávila Jiménez, autor de la tesis "Obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 3 de diciembre de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luis Miguel Ávila Jiménez", written over a horizontal line.

Luis Miguel Ávila Jiménez

C.I: 0104989728



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo *Luis Miguel Ávila Jiménez*, autor de la tesis "Obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Químico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 3 de diciembre de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luis Miguel Ávila Jiménez', written over a horizontal line.

Luis Miguel Ávila Jiménez

C.I: 0104989728



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

DEDICATORIA

A Dios, por la vida y por haber puesto en mi camino a personas maravillosas que han alegrado mis días.

A mis padres, que me han apoyado en todo momento y que han sido los guías en cada reto presentado.

A mis hermanos y amigos, por su tiempo y compañía.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Juan José Vázquez Guillen, por su excelente guía y colaboración en la realización de esta tesis.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

SELECCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN

El siguiente estudio se enfoca en la obtención de bioetanol para uso carburante utilizando el pericarpio de maracuyá como materia prima, debido a que las cáscaras de esta fruta constituyen un residuo orgánico que se genera en una cantidad considerable (Producción anual de maracuyá de 11832 toneladas métricas) en los mercados, hogares y plantas procesadoras de jugo de maracuyá (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2013). Por otra parte, al obtener bioetanol de este residuo se aprovecha una fuente de carbono que no pone en vulnerabilidad la seguridad alimentaria. De esta manera se contribuye a satisfacer las necesidades energéticas del sector transporte y a que las personas tengan acceso a los alimentos.

DELIMITACIÓN DEL TEMA

Obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá, mediante el procedimiento descrito en la sección metodología, en el laboratorio tecnológico de la Universidad de Cuenca.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General:

- Obtener bioetanol de segunda generación a partir de un desecho orgánico: pericarpio de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*.)

Objetivos Específicos:

- Caracterizar el pericarpio de maracuyá para conocer la cantidad de fuente de carbono utilizable para la obtención de bioetanol.
- Evaluar el comportamiento de la hidrólisis ácida para la obtención de un jarabe glucosídico.
- Seleccionar el tipo de microorganismo más apropiado para la fermentación del jarabe glucosídico y la posterior obtención de bioetanol, en base a la información bibliográfica existente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El pericarpio de maracuyá es un compuesto pertinente para la obtención de bioetanol?



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la producción de energía para satisfacer las diversas necesidades de los diferentes sectores, tales como: transporte 29 %, industrial 28 %, residencial 23 %, comercial 8% y otros 12 %, es un tema muy importante y de interés mundial, debido al aumento de la demanda energética, que a su vez es causada por el incremento de la población mundial y el desarrollo de los países (Banco Interamericano de Desarrollo, 2015). Entre los sectores mencionados, el transporte está cobrando cada vez mayor importancia, ya que permite llevar a cabo la movilidad de las personas y de mercancías, facilitando así el desarrollo económico, pero también provocando que la demanda energética crezca a diario. Por lo tanto, es necesario que la oferta de energía también aumente para mantener un equilibrio y evitar el caos en las sociedades modernas.

Al hablar de oferta, el principal recurso que tenemos a disposición es el petróleo, que ya tiene más de un siglo cubriendo la mayoría de las demandas energéticas del planeta, sin embargo, éste recurso natural es no renovable y en un futuro no muy lejano sus reservas estarán agotadas. Por otra parte, al utilizar el petróleo como combustible se genera gran contaminación ambiental debido a las emisiones de gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global. Entonces, es necesario que se busquen fuentes alternativas de energía que sean renovables y que no generen contaminación ambiental.

Las fuentes alternativas de energía que tenemos al momento son varias y las investigaciones sobre cada una de ellas son numerosas. Una alternativa como fuente energética es la utilización de la biomasa (material de origen vegetal y animal), ya que es renovable, y a pesar de que genera dióxido de carbono, su impacto en la atmosfera se anula porque este CO₂ es consumido en el proceso de fotosíntesis para generar nueva biomasa. Sin embargo, cabe mencionar que la utilización de biomasa no es nueva, ya que se han utilizado árboles, plantas, aceites de origen vegetal y animal desde hace miles de años para la producción de energía.

Actualmente la biomasa satisface solo un 10 % de la demanda energética mundial, sin embargo, la demanda de combustibles aumenta y muchos países están tomando acciones para que las energías renovables vuelvan a tener una gran participación (Machado, 2010). Del suministro de biomasa total, los biocombustibles líquidos tienen un papel más limitado aportando con solo el 1,9 % de ésta, su importancia radica en el campo del transporte, y dentro de los biocombustibles capta gran atención el bioetanol que se ha convertido en una alternativa atractiva para la generación de energía (Wiebe, Keith Croppenstedt, André Raney, Terri, 2008).

Por otra parte, la producción de bioetanol se realiza a partir de materias primas con alto contenido en sacarosa (como la caña de azúcar) y con alto contenido de almidón (como el maíz), lo que ha creado una gran demanda de estos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

recursos por parte de la industria del bioetanol, que a su vez ha generado un incremento en los precios de estos alimentos. Esto impide el acceso a los alimentos a cierta parte de la población, generándose un problema de seguridad alimentaria.

Como respuesta al problema de seguridad alimentaria, surgen las investigaciones para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, una materia prima que no es utilizada para la alimentación y que generalmente es un residuo de la industria agroalimentaria. Esta solución es muy buena, sin embargo, hay que tener en cuenta el aumento de los costos de producción debido a la mayor complejidad del proceso.

Finalmente, teniendo en cuenta que el petróleo tiene sus días contados como principal proveedor de energía, que la demanda en el sector transporte crece a diario y que el bioetanol producido actualmente pone en vulnerabilidad la seguridad alimentaria, esta investigación se enfoca en la obtención de bioetanol a partir de residuos de maracuyá para contribuir a solucionar estos problemas.

1.1. Situación de la energía a nivel mundial

La situación energética del planeta en este momento es alarmante, con una sociedad que cada día consume mayor cantidad de energía, debido al crecimiento demográfico y al desarrollo económico. La Agencia Internacional de Energía (AIE) prevé que para el periodo que va hasta el año 2035 la demanda de energía crecerá más de un tercio. Además, los combustibles fósiles seguirán predominando en el marco energético mundial (IEA, 2013). Con respecto a la inversión para el suministro de energía a nivel mundial, la cifra ascendió a 1,6 billones de dólares por año entre el 2011 y el 2013, tal como se puede apreciar en la (figura 1.1). Los proyectos de inversión van desde la extracción de combustibles fósiles hasta la construcción de centrales eléctricas, parques eólicos, instalaciones solares y refinerías de petróleo. Los niveles de inversión son más del doble desde el año 2000, esto refleja el rápido crecimiento de la demanda energética a nivel mundial (IEA, 2014).

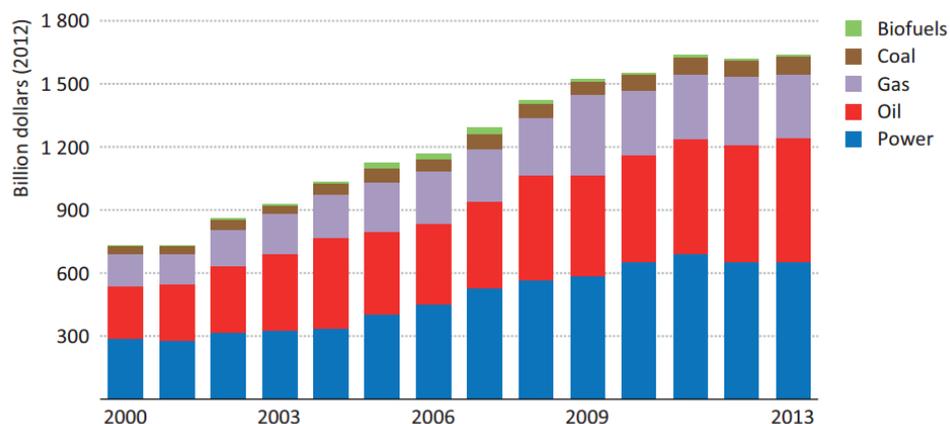
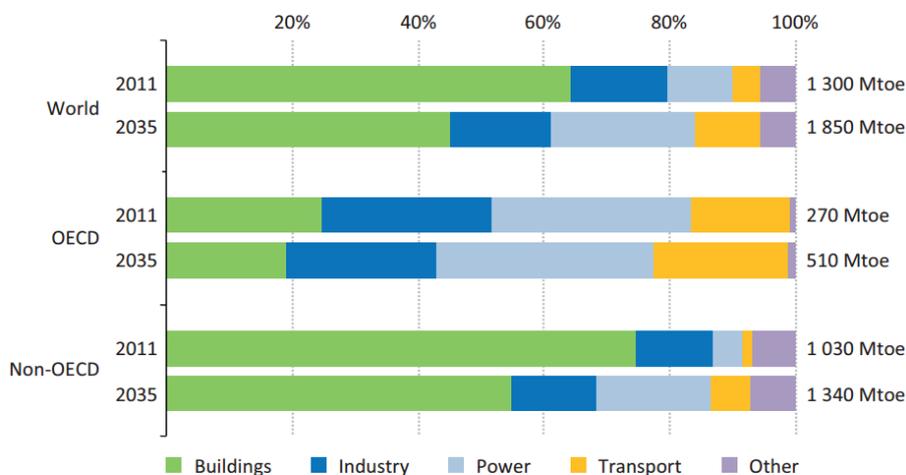


Figura 1.1. Inversión global para el suministro de energía
Fuente: (IEA, 2014)

En contraste, si tomamos en cuenta la inversión para el sector de los biocombustibles, la cifra es baja con respecto a lo invertido para la extracción de petróleo y generación eléctrica, esto significa que los biocombustibles se están introduciendo poco a poco en el mercado de la energía. Mientras tanto, se puede interpretar esta inversión como una oportunidad para proseguir con las investigaciones en esta línea.

1.1.1. Demanda mundial bioenergía

La demanda mundial de bioenergía, es decir la energía proporcionada por la biomasa, en todos los sectores aumentara desde 1300 Mtep (millones de toneladas equivalente de petróleo) en 2011 hasta los 1850 Mtep en el 2035. En la (figura 1.2) se muestra el análisis de las demandas de bioenergía para el consumo mundial tanto para los países de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), como para los países que no son de la OECD. Aquí se observa que la mayor proporción de la demanda de ésta se da por parte de los sectores de la construcción. Sin embargo, también se puede observar que la demanda de biocombustibles por parte del sector transporte crecerá al ritmo más rápido hasta el año 2035. Este crecimiento es debido a las políticas para reducir la contaminación del aire, aumentar el uso productivo de los residuos agrícolas municipales y acelerar el despliegue de las energías renovables (IEA, 2013). Entonces, se puede ver que la producción de biocombustibles para el sector transporte tendrá el apoyo necesario para lograr introducirlos en las sociedades modernas.



Note: Buildings includes the use of traditional biomass.

Figura 1.2. Uso mundial de la bioenergía por sectores en el Escenario de las Nuevas Políticas
Fuente: (IEA, 2013)

1.1.2. Emisiones de CO2 a nivel global

Las emisiones de dióxido de carbono a la atmosfera a nivel global aumentan en un promedio de 0,7 Gt (1 Gt= 1×10^9 toneladas) por año, que es más bajo al promedio de incremento mundial de demanda de energía (IEA, 2014). En la (figura 1.3) se presenta la tendencia de las emisiones de CO2 desde el año 1990 hasta el año 2035. Como se puede apreciar la contaminación de la atmosfera con dióxido de carbono crece a diario, sin embargo, se puede apreciar también que en los años 2012 y 2035 las emisiones se reducen cada vez más,



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

y esto es debido a las nuevas políticas en el ámbito ambiental que intentan frenar el calentamiento global. Con el uso de bioetanol a gran escala las emisiones de dióxido de carbono podrían reducirse aún más, de esta manera se contribuye a cubrir la demanda energética y también se contribuye ambientalmente con la reducción de gases de efecto invernadero.

EMISIONES DE CO2 GT

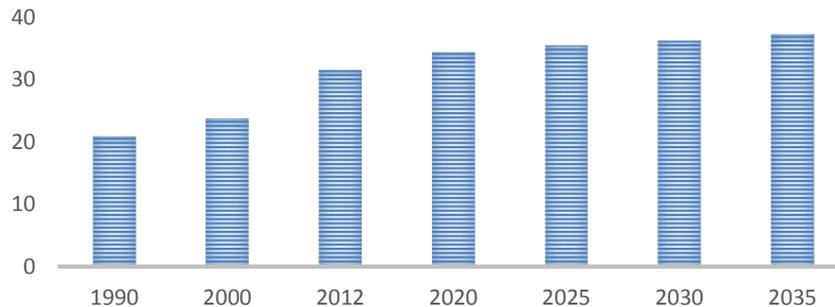


Figura 1.3. Emisiones de CO2 a nivel global
Fuente: (IEA, 2014)

1.2. Situación de la energía a nivel de Latinoamérica

En general, la situación energética en Latinoamérica depende principalmente del petróleo, sin embargo, el continente cuenta con un gran potencial de recursos hídricos y agrícolas que pueden proveer de energía a la región.

En la (figura 1.4) se observa como el principal producto suministrado para producción energética es el petróleo con una participación del 43 %, sobre todo para el sector transporte, seguido por el gas natural con 25 %, luego aparece la biomasa con un 17 %. Cabe recalcar que la biomasa se utiliza en su mayoría sin ser procesada, es decir que se utiliza en forma de leña. El suministro de hidroenergía y de carbón es del 8 % y 5 % respectivamente. Finalmente, el suministro de energía nuclear, geotérmica, eólica y solar, representan cantidades del 1 % o inferiores (Banco Interamericano de Desarrollo, 2015).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

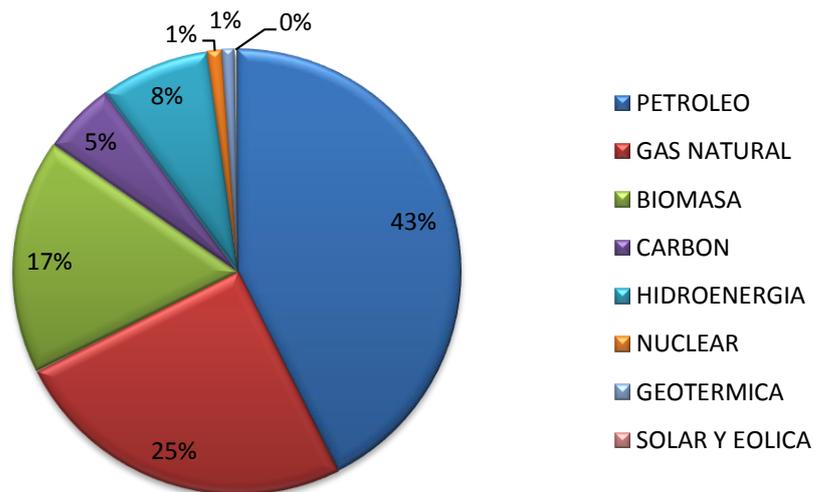


Figura 1.4. Suministro de energía en América Latina y el Caribe, año 2013
Fuente: (Banco Interamericano de Desarrollo, 2015)

América Latina posee el 13% de reservas probadas de petróleo del mundo. Sin embargo, la mayor concentración de estas se encuentran en apenas tres países: Venezuela, México y Brasil, que en conjunto poseen el 94% de reservas y el 81% de la producción de la región. El resto de países se encuentra en una situación crítica en cuanto a la seguridad energética actual y proyectada, dado su alcance de las reservas en el tiempo (Ascher, Ganduglia, Orlando, Abreu, & Macedo, 2010).

Con respecto a la demanda, será inevitable que exista un fuerte incremento del uso de energía por parte de la región, duplicándose el valor de consumo actual de 1 tep/ habitante (tep= tonelada equivalente de petróleo) en los próximos 20 años (FES, 2013). Históricamente, los sectores que consumen la mayor cantidad de energía final en América latina son: el transporte con 35 % y la industria con 33%. El consumo residencial representa el 16 % y el resto de sectores representan el 16 % (OLADE, 2013).

Por otra parte, la producción y uso de biocombustibles a partir de biomasa en Latinoamérica tiene un gran potencial, debido a que hay una demanda creciente de combustible de transporte y hay una gran disponibilidad de materia prima para producir bioetanol y biodiesel. Latinoamérica tiene como objetivo ampliar su seguridad energética y promover el desarrollo económico asociado a los biocombustibles. Para lograr esto se sigue el ejemplo de Brasil, que tiene mucha experiencia en el desarrollo del bioetanol a partir de la caña de azúcar, además que es el líder en la producción de este alcohol a nivel mundial junto con Estados Unidos (BNDES; CGEE, 2008).

1.3. Situación energética en Ecuador

En la matriz energética del Ecuador las fuentes dominantes de energía son principalmente tres: petróleo, hidroelectricidad y biomasa, tal como lo muestra la (figura 1.6).

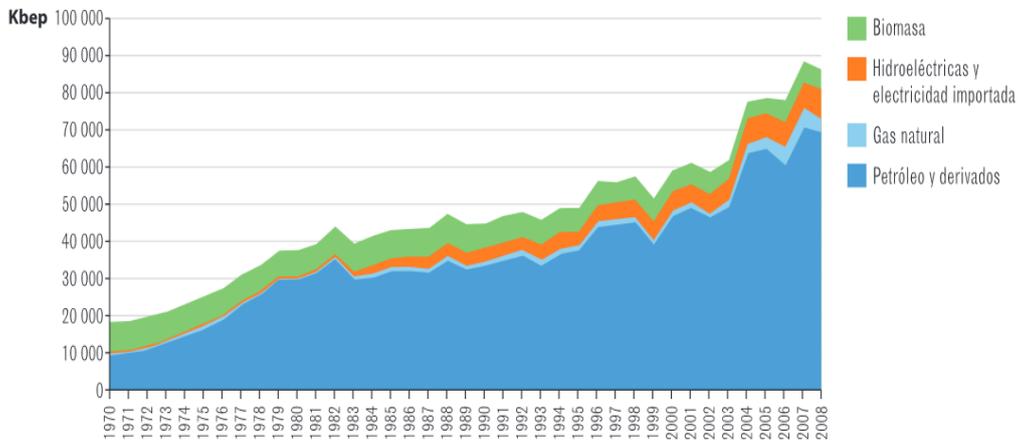


Figura 1.5. Fuentes de energía en la matriz energética de Ecuador
Fuente: (CEDA, 2011)

La fuente de energía que más ha ganado terreno en la matriz energética es el petróleo, de un 50 % en 1970 a un 81 % en el 2008. La hidroelectricidad también ha aumentado, pero en menor grado, del 1 % en 1970 al 10 % en 2008. Y por otro lado, la biomasa (carbón vegetal y leña) que en 1970 era una fuente principal de energía, ha perdido terreno en la matriz energética del país con una participación de apenas el 6 % en el 2008 (CEDA, 2011).

De acuerdo al consumo de energía por sectores, en Ecuador existen tres que sobresalen como los mayores consumidores de energía, los cuales son: el sector transporte, el sector residencial y el sector de la industria, y de estos el sector transporte es el que mayor cantidad demanda (CEDA, 2011). En la (figura 1.7) se puede observar el crecimiento de demanda de los principales sectores del país.

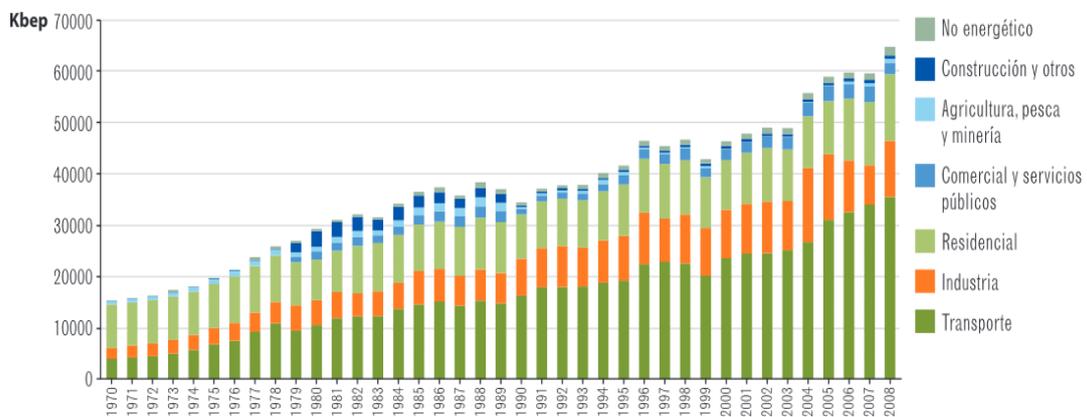


Figura 1.6. Demanda de energía total del Ecuador por sectores
Fuente: (CEDA, 2011)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

El consumo total de energía del año 2013 con respecto al año 2012 se incrementó en un promedio de 4,3 %. El sector transporte creció en un tasa del 5,5 % (Ministerio Cordinador de Sectores Estratégicos, 2014).

1.3.1. El transporte como consumidor principal en Ecuador

El transporte se ha manifestado como el principal consumidor de energía dentro de la matriz energética ecuatoriana con un consumo de energía del 55 % en el año 2008. Por otra parte, su tasa de crecimiento es la mayor en comparación con los paises latinoamericanos (CEDA, 2011). En el año 2013 el sector transporte tuvo un consumo energético de 49 millones de bep. Dentro de este sector, el principal consumidor de energía es el transporte terrestre con un 84 %, seguido del transporte marítimo con un 10 %, y por último el transporte aéreo con un 6 % de consumo (Ministerio Cordinador de Sectores Estratégicos, 2014).

Entonces, queda claro que la energía para el sector transporte en Ecuador es muy importante. Actualmente, esta energía es abastecida en su mayoría por los derivados del petróleo. Cabe mencionar que Ecuador en el año 2013 tuvo una demanda total de derivados de petróleo de 95.492 Kbep (kilo barriles equivalentes de petróleo) casi el doble de su capacidad de producción que fue de 55.580 kbep. Por lo tanto la diferencia entre estos valores tiene que ser importada para cubrir la demanda interna del país (Ministerio Cordinador de Sectores Estratégicos, 2014). Esto representa una clara oportunidad para la introducción del bioetanol en el país, con lo cual se reducen importaciones y se contribuye a la economía nacional.

1.3.2. Bioetanol en Ecuador

El bioetanol, como biocombustible en Ecuador, no tiene mucha trayectoria y por lo tanto no se tiene mucha experiencia en este campo. En la actualidad solo el proyecto piloto Ecopaís es el único productor de etanol, en la ciudad de Guayaquil. Dicho proyecto arranco el 12 de abril de 2011 y su finalidad es comercializar un combustible denominado Ecopaís, el cual es una mezcla de gasolina extra (95 %) y bioetanol anhidro (5%). En una primera etapa el proyecto será realizado en la ciudad de Guayaquil en un plazo de 2 años; luego, evaluando los resultados en esta ciudad, en una segunda fase el proyecto se extenderá a nivel nacional (Castro M. , 2012). Cabe recalcar que Ecopais utiliza bioetanol producido de la caña de azúcar, es decir, bioetanol de primera generación.

Por otra parte, la ejecución de la segunda etapa del proyecto, es decir la comercialización del combustible Ecopaís a nivel nacional permitirá reducir las emisiones de dióxido de carbono en unas 473 toneladas anuales y también generara un ahorro importante para el país (Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica, 2015).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

CAPITULO II

2. LA BIOMASA

La biomasa como materia prima para la obtención de biocombustibles es un recurso renovable que constituye una solución atractiva para cubrir la demanda de energía del sector transporte. Más aun, la biomasa lignocelulósica que no genera problemas de soberanía alimentaria y cuyos costos son prácticamente nulos por ser residuos de la industria agroalimentaria.

Ahora bien, hay que señalar que para cumplir el objetivo de esta tesis se utilizara la biomasa lignocelulósica que no compromete la utilización de alimentos, entonces se hará un enfoque de este tipo de biomasa. Por lo tanto, se comienza dando a conocer la definición de biomasa y bioenergía para ver su relación en el ciclo de formación de ésta.

2.2. Bioenergía y biomasa

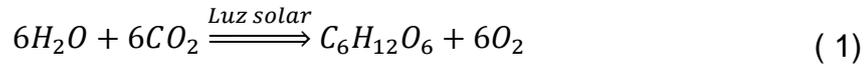
La bioenergía es un caso particular de energía química y se la puede definir como cualquier forma de energía asociada a formas de energía química acumulada mediante procesos fotosintéticos recientes. La biomasa ha sido definida de varias maneras, pero de forma general se puede decir que es todo recurso natural que posee bioenergía y que se puede procesar para obtener biocombustibles de mayor valor energético y adecuadas para un uso final. Entonces, algunos ejemplos de biomasa son: el carbón vegetal, el biogás resultante de la descomposición anaeróbica de la materia orgánica, así como los biocombustibles líquidos, como el etanol y el biodiesel, y la bioelectricidad generada por quema de bagazo de caña y madera (BNDES; CGEE, 2008).

2.3. Origen de la biomasa

La producción de biomasa es el resultado de la reacción de fotosíntesis, depende básicamente de la energía solar, de la presencia de agua y de la presencia de dióxido de carbono (CO_2) (BNDES; CGEE, 2008). La energía solar es transformada en energía química y se acumula en diversos compuestos orgánicos, como polisacáridos, grasas y otros, a lo largo de toda la cadena trófica (Abril & Navarro, 2012).

Las plantas utilizan la radiación solar para poder cumplir con su metabolismo en el proceso fotosintético, dicho proceso conlleva complejas reacciones fotoquímicas y bioquímicas que tienen lugar en los cloroplastos de las células vegetales. La energía química se almacena en forma de compuestos orgánicos como la glucosa. Este azúcar de 6 carbonos es el primer combustible en sintetizarse, luego sus monómeros se polimerizan generando macromoléculas que forman los polisacáridos. En general, el almidón en los vegetales y el glucógeno en los animales son los polisacáridos que representan las reservas de energía de la vida vegetal y animal (Abril & Navarro, 2012).

En resumen el proceso puede ser representado en la ecuación (1), en donde el agua y el CO₂ se combinan para dar lugar a la formación de una molécula de glucosa y una molécula de oxígeno.



En esta ecuación para la formación de 1kg de azúcar se requiere de 17,6 MJ de energía solar que equivalente a cerca de medio litro de gasolina.

De los factores básicos para la producción de biomasa, el CO₂ es el más disponible pues se encuentra bien distribuido en toda la atmosfera y en concentraciones suficientes para satisfacer la demanda por parte de las plantas, e incluso, con una alta producción debido a la quema de combustibles fósiles en el último siglo. Si la biomasa es procesada eficientemente, bien sea química o bioquímicamente, por extracción de la energía almacenada en los enlaces químicos y el posterior producto “energía” se combina con el oxígeno, el carbono es oxidado para producir CO₂ y agua. El proceso es cíclico y el CO₂ queda disponible nuevamente para la producción de biomasa. Visto de este modo, los biocombustibles presentan dos grandes ventajas: su uso reduce las emisiones de CO₂ y la producción de biomasa es favorecida por la disponibilidad de CO₂ (BNDES; CGEE, 2008). En la (figura 2.1) se muestra un esquema de la formación de la biomasa, y cómo los biocombustibles anulan sus emisiones de CO₂, debido a que este se reutiliza para generar nueva biomasa mediante la fotosíntesis.

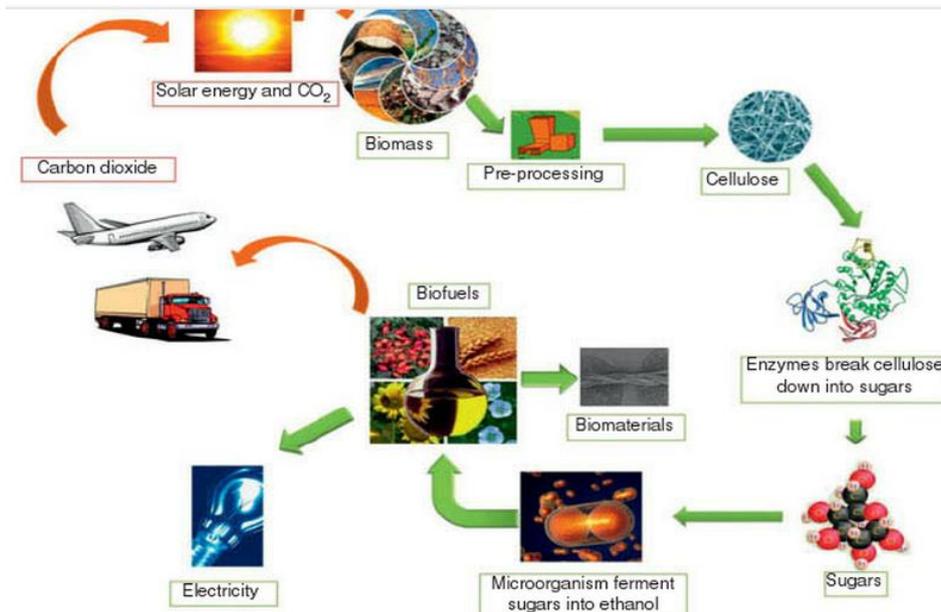


Figura 2.1. Ciclo del almacenamiento de la energía solar en la biomasa y la reutilización del CO₂

Fuente: (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013)

2.4. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica hace referencia a toda la materia vegetal seca, y que constituye la sustancia orgánica más abundante en la Tierra. La biomasa lignocelulósica es un tipo de biomasa que está integrada principalmente por tres componentes poliméricos: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos componentes están asociados unos con otros y constituyen el soporte de la pared celular. Ejemplos de esta biomasa son la paja de cereales, restos de podas de frutales, residuos forestales, serrín de la madera y algunos cultivos energéticos (Guarnizo, Martínez, & Valencia, 2009). En la (figura 2.2) se muestra la estructura de la biomasa lignocelulósica.

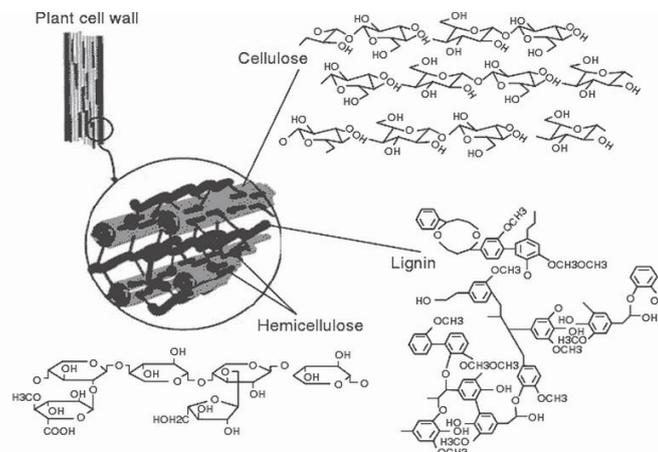


Figura 2.2. Estructura de la lignocelulosa
Fuente: (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013)

En la actualidad sus aplicaciones son muy variadas y constituyen la base de muchas industrias tales como la de la celulosa y el papel, materiales de construcción, combustibles líquidos y gaseosos entre otros. La ventaja de los materiales lignocelulósicos es que son biodegradables y también renovables. Por lo tanto, su uso como combustibles constituye una manera sostenible y amigable con el medio ambiente (Abril & Navarro, 2012).

El conocimiento de la composición y estructura de la pared celular vegetal es de fundamental importancia para poder entender cada una de las etapas en el proceso de obtención de los azúcares fermentables para la producción de bioetanol. Debido a esto, es necesario conocer como está formada la pared celular del material lignocelulósico.

2.4.1. Estructura de la pared celular vegetal

Las células vegetales tienen como principal característica la presencia de una pared celular, que presentan pared primaria y secundaria, y una lamela media (membrana), presente en la unión de células vecinas. La rigidez relativa que posee la pared celular vegetal también entrega rigidez a las plantas y materiales vegetales como la madera. El espesor, la composición y la organización de la pared celular pueden variar significativamente de una planta a otra, haciendo que las características de dichas plantas también varíen (Amarasekara, 2013).

En general, la pared celular está formada por polisacáridos tales como, celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya función es dar estructura y resistencia a la planta (Machado, 2010).

En la (figura 2.3) se ilustra cómo se forma un tabique rígido entre las células vegetales. La lamela media es la primera capa en formarse durante la división celular, esta es la parte externa de la célula y es compartida por las células adyacentes; esta lamela media además está compuesta por material péctico y proteínas. Al envejecer la célula, secreta materiales nuevos que luego se mezclan con los constituyentes de la pared primaria, dando lugar a la formación de la pared celular secundaria.

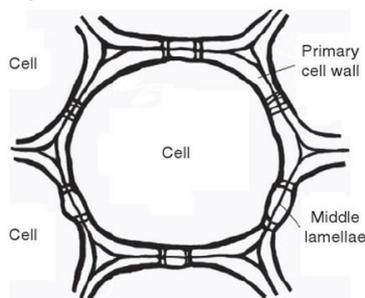


Figura 2.3. Pared celular primaria en las células vegetales
Fuente: (Amarasekara, 2013)

2.4.2. Componentes de la biomasa lignocelulósica

Los componentes de la biomasa lignocelulósica se encuentran divididos en dos grupos: componentes principales y componentes secundarios.

2.4.2.1. Componentes principales o estructurales

Son los polímeros que dan la estructura a la pared celular de las plantas: celulosa, hemicelulosa y lignina. Los tres componentes principales varían entre diferentes especies de plantas. La madera seca generalmente contiene 40-50 % de celulosa, 15-20 % de hemicelulosa, y 20-30 % de lignina (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013).

2.4.2.1.1. Celulosa

La celulosa es un homopolímero de cadena larga compuesta por unidades de D-Glucosa, un azúcar simple. Es el principal componente de la pared celular de las plantas. Los múltiples grupos hidroxilos de la glucosa en la cadena pueden formar enlaces de hidrogeno con las moléculas de oxígeno de la misma cadena o de las cadenas vecinas, de esta manera se mantienen unidas las cadenas firmemente formando microfibrillas con alta resistencia a la tracción. Esta resistencia es una de las principales fuentes de rigidez de la pared celular de las plantas (Kubisek, 2012). En la (figura 2.4) aparece la estructura química de la celulosa.

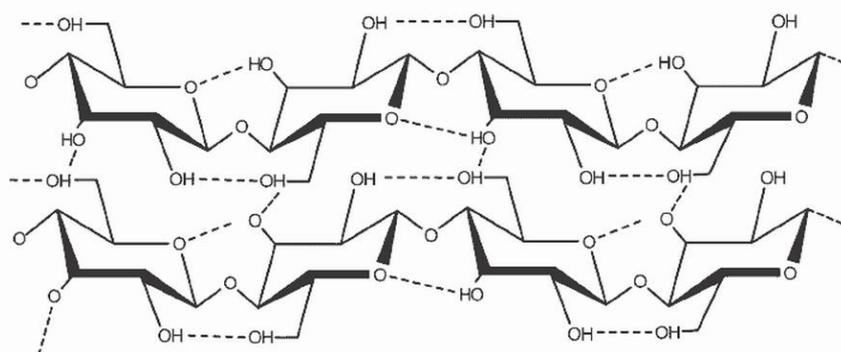


Figura 2.4. Estructura química de la celulosa

Fuente: (Kubisek, 2012)

2.4.2.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa, también llamada poliosa, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, comprendiendo un 20-40 % de la masa lignocelulósica dependiendo del tipo de biomasa que se use. El mayor componente de la hemicelulosa es el xilano, compuesto de unidades D-xilopiranosil unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es un polímero ramificado que está formado por cadenas más cortas, que van de 500 – 3000 unidades de azúcares. La hemicelulosa, debido a que está compuesta por varios tipos de polímeros, es mucho más compleja que la celulosa (Amarasekara, 2013).

Los azúcares que forman la hemicelulosa se dividen en diferentes grupos: pentosas, como la xilosa y arabinosa; hexosas, como la glucosa, manosa y galactosa; ácidos hexourónicos, tales como los ácidos glucurónico, metilglucurónico y galacturónico; y deoxihexosas, tales como la ramnosa y fucosa. La naturaleza ramificada de la hemicelulosa la hace más fácil de hidrolizar que la celulosa por ser amorfa. El porcentaje de hemicelulosa varía entre especies (Nogués, García, & Rezeau, 2010).

2.4.2.1.3. Lignina

La lignina es el tercer componente mayoritario de la biomasa, que es un material macromolecular reticulado constituido básicamente por unidades de monómeros fenilpropano unidos entre sí mediante enlaces alquil-aril-éter (Amarasekara, 2013). La lignina tiene la función de dar rigidez a la planta, proporcionar protección contra la humedad, agentes medioambientales y microorganismos. Químicamente es un polímero tridimensional amorfo. La composición y porcentaje de lignina en la biomasa varían según las especies, así por ejemplo, las coníferas poseen más lignina que las frondosas (Nogués, García, & Rezeau, 2010).

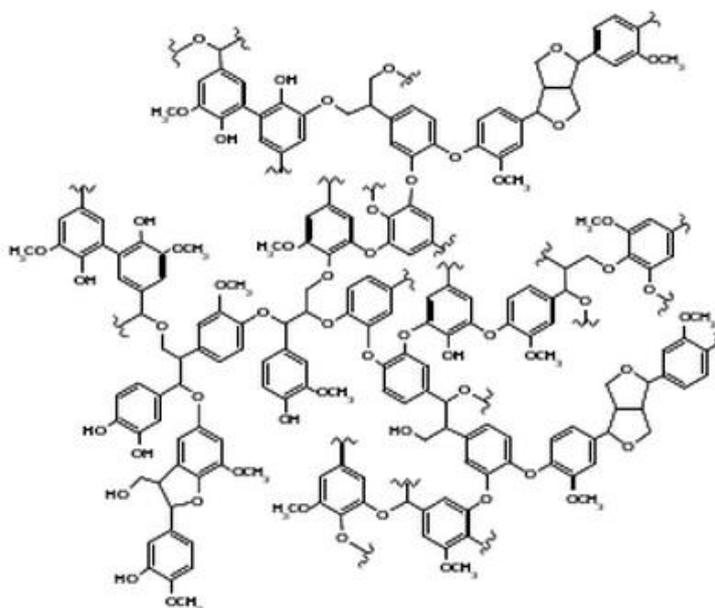


Figura 2.5. Sección representativa de la estructura de la lignina
Fuente: (Amarasekara, 2013)

2.4.2.2. Componentes secundarios

Son compuestos que participan en bajas proporciones en la composición de la lignocelulosa: minerales y extractivos (Guarnizo, Martínez, & Valencia, 2009). Los compuestos minerales se determinan en los análisis químicos como cenizas, principalmente son: carbonatos, oxalatos y sílice. Por otra parte, los extractivos son aquellos compuestos que son solubles en agua y solventes orgánicos, en este grupo se encuentran: grasas, ácidos grasos, alcoholes, resinas, taninos, hidratos de carbono de bajo peso molecular, alcaloides y lignina soluble (Barroso, 2010).

2.2. Pericarpio de maracuyá como materia prima

El pericarpio de maracuyá como biomasa lignocelulósica residual es la materia prima que se eligió en este trabajo para realizar el estudio de obtención de bioetanol de segunda generación, debido a su disponibilidad en todo el país como un residuo orgánico de los hogares y de los mercados. Este residuo es desechado, ya que lo que se aprovecha para el consumo humano es la pulpa de la fruta. Además, otra fuente de residuos lo representa las plantas procesadoras de jugo de maracuyá que desechan el pericarpio en grandes cantidades.

El maracuyá es una fruta tropical de una planta que crece en una forma enredada, pertenece a la familia de las *Passifloras* que posee más de 400 variedades (Castro, Paredes, & Muñoz, 2009). Las especies del género *Passiflora* habitan parte de América, Asia y Australia, y las especies que más se cultivan son: *Passiflora edulis f. purpurea de color morado* y *Passiflora edulis f. flavicarpa de color amarillo* (Malavolta, 1994). Ésta última es la fruta que proporciona el pericarpio para este trabajo de investigación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

El fruto de maracuyá es una baya de forma redondeada u ovalada, de 6- 10 cm de largo, en el estado de madurez puede presentar un color amarillo. Existen numerosas semillas en su interior, las cuales están rodeadas de mucilaginosas que contiene el jugo. El maracuyá se utiliza en el consumo humano de dos formas principales: consumo directo del fruto y en jugo. La utilización del fruto para la producción de jugo genera una gran cantidad de residuos (cáscara y semillas) (Malavolta, 1994). En general, está compuesto de: pericarpio del 50-60%, pulpa del 30-40% y semillas del 10-15% (Serna & Chacón, 2000).

Según (Borja, 2008), el porcentaje de cáscara y pulpa disminuye el rango entre el máximo y el mínimo de acuerdo a su estado de madurez (Verde, Pintona y Amarilla), mientras que el porcentaje de semillas se mantiene similar para los tres estados. La (tabla 2-1) muestra los diferentes valores.

Tabla 2-1. Porcentaje de Cáscara, Pulpa, Semilla del Maracuyá (*Passiflora edulis flavicarpa*) en tres estados de Madures.

Descripción	Verde		Pintona		Amarilla	
	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)
Cáscara	36	68	32	48	39	48
Pulpa	16	48	34	47	33	44
Semilla	10	16	12	16	10	16

Fuente: (Borja, 2008)

2.2.1.1. Composición del pericarpio de maracuyá

El pericarpio de maracuyá está formado (Castro, Paredes, & Muñóz, 2009) por tres partes:

- 1) Exocarpio.- es la parte exterior del pericarpio, es liso y está recubierta por una cera natural que le da brillo.
- 2) Mesocarpio.- se ubica entre el exocarpio y el endocarpio; es blando, poroso y de color blanco; está formado principalmente por pectina.
- 3) Endocarpio.- es la parte interna del pericarpio y está en contacto con la pulpa.

Un análisis proximal del pericarpio de maracuyá realizado por (Canteri, y otros, 2010) muestra la composición de los componentes principales del pericarpio de maracuyá, en donde se puede observar (Tabla 2-3) que el mayor porcentaje corresponde a la fibra, compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además se aprecia un porcentaje significativo de sacáridos disponibles. Los componentes mayoritarios son los que se tratarán de aprovechar para la producción de azúcares reductores.

Tabla 2-3. Análisis proximal de la harina de pericarpio de maracuyá

Análisis	Media \pm desviación estándar
Proteína (%)	3.70 \pm 0.20
Gasa (%)	0.70 \pm 0.11
Cenizas (%)	7.41 \pm 0.21
Sacáridos disponibles (%)	23.1
Total fibra dietaria (%)	65.7 \pm 3.21
Humedad (%)	4.30 \pm 0.21
Valor energético (kJ/g)	10.0

Fuente: (Canteri, y otros, 2010)

2.2.2. Maracuyá en el Ecuador

En el Ecuador el maracuyá se encuentra cultivado en mayor proporción en la zona litoral, con una participación de el 55.59% y en menor cantidad en la región Sierra con un 44.41 % (Figura 2.6). La producción para el año 2012 fue de 11832 toneladas métricas (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2013).

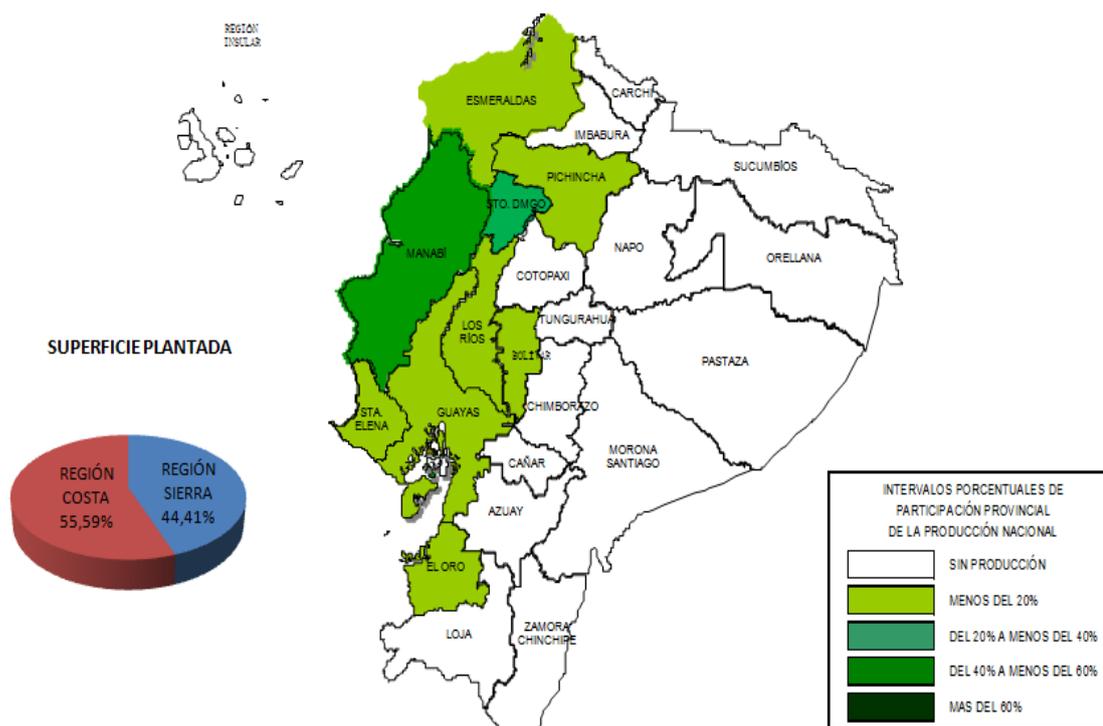


Figura 2.6. Superficie cultivada de maracuyá en Ecuador en el año 2013
Fuente: (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2013)

En la (figura 2.6) también se aprecia la superficie de maracuyá cultivada en las diferentes provincias. Los diferentes tonos de color verde indican en qué cantidad participa cada provincia con respecto a la producción nacional.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

CAPÍTULO III

3. BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles son combustibles obtenidos a partir de desechos agrícolas, forestales, industriales, entre otros (Acosta, 2012). Los biocombustibles líquidos más conocidos son el bioetanol y el biodiesel.

Los biocombustibles, según (Gasparini, Ganduglia y otros, 2009), se los puede diferenciar de las siguientes maneras:

- 1) Primera generación.- La producción de primera generación utiliza como materia prima un potencial alimento, de esta manera se estaría afectando a la soberanía alimentaria. En la actualidad esta producción ya es de nivel comercial, por lo general estos provienen de cultivos con técnicas similares a las agrícolas.
- 2) Segunda generación.- Estos no compiten con los suelos que están destinados a los cultivos para alimentación, es decir estos son a partir de lignocelulosa como la contenida en nuestro pericarpio de maracuyá. La producción de biocombustibles de segunda generación al momento pasa por una fase de experimentación, pero el éxito de las diversas investigaciones, lograra que este se produzca comercialmente con una gran rentabilidad.
- 3) Tercera generación.- Estos se basan en la generación de cultivos energéticos, utilizando técnicas genéticas avanzadas, para obtener materias primas más eficientes para la producción de biocombustibles.
- 4) Cuarta generación.- Combinan la producción de agro-energía y biocombustibles con tecnología de captura y almacenamiento de carbono mediante la materia prima y la tecnología del proceso.

3.1. BIOETANOL

El bioetanol es un compuesto líquido producido a partir de la fermentación de los azúcares obtenidos de las plantas. Este compuesto se caracteriza por ser un líquido incoloro, de olor ardiente, fácilmente inflamable, presentar una llama azulada, y es muy higroscópico. Se lo puede obtener a partir de tres tipos de materia prima, tales como: materiales con alto contenido de sacarosa, materiales con alto contenido de almidón y materiales con alto contenido de celulosa. En esta investigación, se utiliza el tercer tipo de material, es decir, con alto contenido de celulosa.

Cabe recalcar que el bioetanol y el etanol (también llamado alcohol etílico) son el mismo producto, la diferencia del nombre radica en la fuente a partir de la cual se obtiene, siendo el primero producido a partir de materias primas biológicas y



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

el segundo a partir de la síntesis del etileno que se obtiene en la refinación del petróleo.

Con respecto a sus aplicaciones, el bioetanol es el biocombustible más utilizado en la actualidad y ha recibido mucha atención como posible sucesor de la gasolina, y es que se ha logrado acumular gran experiencia en su obtención. Además, se lo puede mezclar con la gasolina en diversas proporciones, sin tener que realizar cambios significativos en los motores de los vehículos, y con posibilidad de utilizar la infraestructura existente para la distribución de la gasolina (Abril & Navarro, 2012). Puede ser utilizado de forma anhidra o en forma hidratada. El etanol anhidro presenta cantidades insignificantes de agua inferiores al 0,1 % siendo éste ideal para la mezcla carburante con gasolina (Machado, 2010).

El bioetanol viene siendo producido por hidrólisis y fermentación a partir de los materiales lignocelulósicos desde el siglo XIX. Pero apenas en las últimas décadas esta tecnología ha sido propuesta para atender el mercado de combustibles. Las investigaciones en este campo están lideradas por Europa, Estados Unidos y Brasil y la producción al momento es básicamente a escala experimental, pero su éxito llevara a la producción de bioetanol en casi todas las regiones del mundo, aprovechando la alta disponibilidad de residuos orgánicos de diversas fuentes.

Las tecnologías para lograr la obtención del bioetanol a partir de residuos orgánicos comprenden la hidrólisis de los polisacáridos de la biomasa en azúcares fermentables y su posterior fermentación. Para esto, la hidrólisis utiliza tecnologías complejas y multifásicas mediante vías ácidas y/o enzimáticas para la separación de los azúcares y la eliminación de la lignina (BNDES; CGEE, 2008).

3.2. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos es un proceso muy complejo. En forma global, el proceso de obtención de bioetanol combustible constituye cuatro etapas principales, las cuales son: pretratamiento de la biomasa, hidrólisis de la celulosa, fermentación de azúcares y destilación. Además, una etapa adicional que puede llevarse a cabo es la desintoxicación de compuestos tóxicos liberados durante las etapas de pretratamiento e hidrólisis con el objetivo de mejorar el rendimiento de la etapa de fermentación (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013).

En la (figura 3.1) se muestra un diagrama general del proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. El proceso inicia con la preparación de la muestra, luego se realiza la hidrólisis de la hemicelulosa y de la celulosa y se liberan los azúcares. Con los azúcares obtenidos se realiza la fermentación, el resultado es una solución alcohólica de baja concentración que debe pasar por un proceso de destilación, para purificar el bioetanol. De esta manera se obtiene un producto que puede ser utilizado en los motores de combustión interna.

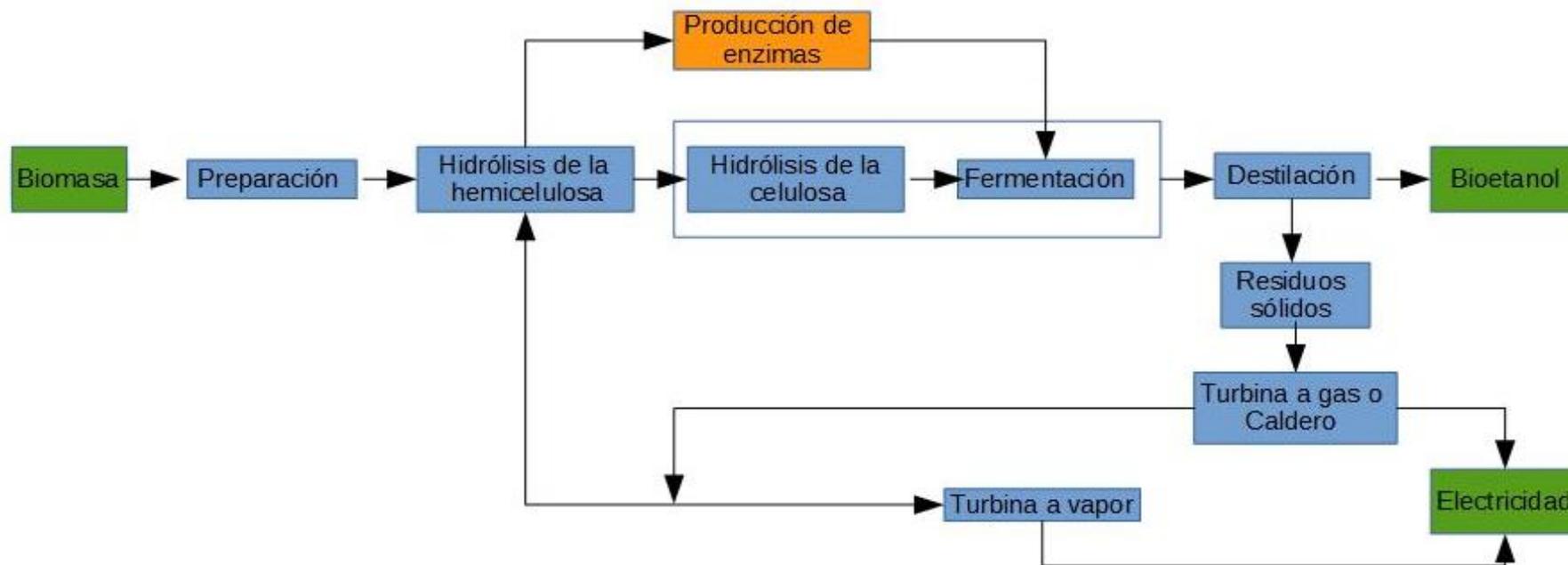


Figura 3.1. Esquema del proceso de producción de etanol por medio de hidrólisis de la biomasa.

Fuente: (BNDES; CGEE, 2008).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

A continuación se explicara cada de estas etapas, para tener una idea de la complejidad que implica la obtención de bioetanol mediante la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática.

3.2.1. Etapa de pretratamiento

El pretratamiento es una etapa muy importante para la biomasa lignocelulósica ya que va a permitir conseguir azúcares fermentables en el proceso de hidrólisis. El objetivo de esta etapa es disminuir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la superficie de la biomasa, remover la hemicelulosa, romper la barrera de lignina e incrementar la porosidad del material lignocelulósico. Todo esto hace que la celulosa sea más accesible a las enzimas hidrolíticas que facilitan la conversión de los polímeros de carbohidratos a azúcares fermentables por un camino rápido y acompañado de incrementos en el rendimiento. Debido a que gran cantidad de materiales lignocelulósicos poseen características fisicoquímicas diferentes, se hace necesario usar una tecnología de pretratamiento adecuado para cada tipo de material basado en sus propiedades fisicoquímicas (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013). El pretratamiento debe cumplir los siguientes requerimientos:

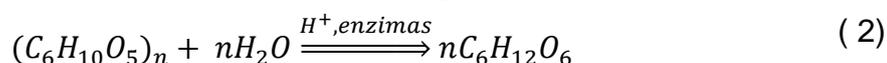
- Mejorar la formación de azúcares o la capacidad para la posterior formación de azúcares mediante la hidrólisis.
- Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos.
- Evitar la formación de subproductos que son inhibidores en los procesos posteriores de hidrólisis y fermentación.
- Ser económicamente viable.

El pretratamiento incluye métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos. Para nuestro estudio, con el pericarpio de maracuyá, el tratamiento fue únicamente físico. Es decir que se aumentó la superficie específica mediante la reducción de tamaño de partícula con un molino. Además, previamente se realizó el secado del pericarpio a una temperatura adecuada para evitar degradar los carbohidratos.

Una vez que la biomasa ha sido preparada por cualquiera de los métodos existentes se procede a la siguiente etapa, que es la hidrólisis.

3.2.2. Etapa de hidrólisis

El proceso de hidrólisis tiene como objetivo generar azúcares monoméricos fermentables a partir de la celulosa y hemicelulosa contenida en la biomasa lignocelulósica. Esto puede ser realizado mediante dos procesos conocidos como hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013). La principal reacción que se da es el desdoblamiento de la celulosa en monómeros de glucosa, que puede ser catalizada por un ácido diluido, concentrado o por enzimas (BNDES; CGEE, 2008). La representación general de la reacción del proceso de hidrolisis es la siguiente, ecuación (2):





3.2.2.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es uno de los métodos más antiguos utilizados para lograr la sacarificación de la biomasa lignocelulósica, en donde se emplean ácidos minerales como el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, y el ácido nítrico. Por otra parte, también es el proceso más empleado industrialmente y su ventaja es que separan los azúcares monoméricos de la hemicelulosa y exponen las fibras celulósicas a la acción hidrolítica posterior (Amarasekara, 2013) .

Cuando el proceso utiliza ácido sulfúrico la hidrólisis se opera bajo dos condiciones:

- a) Un proceso que emplea ácido sulfúrico concentrado, bajas temperaturas, y tiempos relativamente largos.
- b) Un proceso con ácido sulfúrico diluido, temperaturas más altas, y tiempos cortos.

La hidrólisis con ácido diluido se encuentra en una fase más avanzada con respecto a otros métodos, pero con el inconveniente de generar bajos rendimientos (50-70%); mientras que la hidrólisis con ácido concentrado alcanza rendimientos mayores y presenta menos problemas con la producción de inhibidores, sin embargo, por la necesidad de recuperar el ácido y de equipos resistentes a la corrosión su desempeño económico se reduce (BNDES; CGEE, 2008).

Mediante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica con ácido sulfúrico se puede producir xilosa, arabinosa, glucosa, fructosa, etc., por ruptura del enlace β -1,4 de los compuestos de la celulosa y de la hemicelulosa. Estos compuestos, sobre todo la glucosa, son el producto deseado para la posterior fermentación, y se los conoce como azúcares reductores o fermentables (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013).

Por otra parte, la hidrólisis ácida del material lignocelulósico también produce varios compuestos tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, etc., lo cual representa una desventaja. Estos compuestos actúan como potentes inhibidores, afectando negativamente el proceso de fermentación. Por lo tanto, es necesario remover estos compuestos antes de la fermentación y esto significa un aumento en los costos de producción. Para intentar resolver este inconveniente se puede utilizar cal para neutralizar los ácidos, sin embargo, el uso de cal causa una pérdida significativa de los azúcares en el yeso (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013).

3.2.2.2. Hidrólisis enzimática

La hidrolisis enzimática es un método efectivo para la obtención de azúcares fermentables mediante el uso de enzimas, las cuales son altamente específicas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

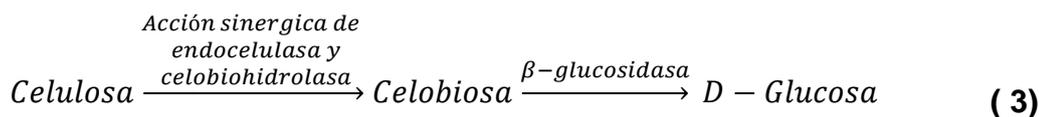
para las reacciones que catalizan y por ende no forman otros compuestos indeseables o tóxicos (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013).

La hidrólisis enzimática presenta altos rendimientos (75-95 %) y su ventaja al no utilizar ácidos puede significar grandes beneficios tanto económicos como ambientales. El proceso se realiza de forma gradual hasta obtener azúcares simples (BNDES; CGEE, 2008).

3.2.2.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa

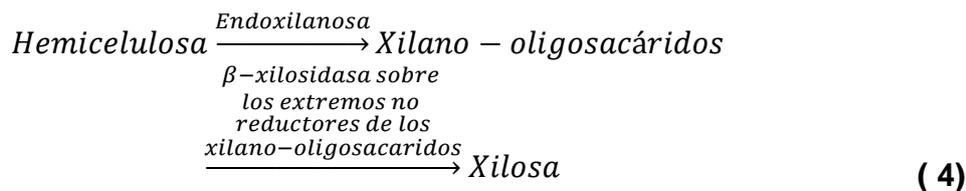
En la hidrólisis enzimática, la celulosa es degradada por una enzima llamada celulasa. El proceso se da en tres pasos: adsorción de las enzimas sobre la superficie de la celulosa y liberación de las cadenas separadas, hidrólisis de los enlaces 1,4- β -D-glucosídico de la celulosa para reducirla a azúcares fermentables, y desorción de las enzimas (Amarasekara, 2013).

La celulosa se refiere a un conjunto de enzimas producidas principalmente por hongos bacterias y protozoos, aunque también existen celulasas producidas por plantas y animales. Existen tres tipos principales de celulasas (Amarasekara, 2013) basados en el tipo de reacción que se da en la despolimerización enzimática de la celulosa a D-glucosa: endocelulasa, exocelulasa y celobiasa. El proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa queda representado en la siguiente ecuación (3):



3.2.2.2. Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa

Debido a la naturaleza heterogénea de la hemicelulosa, para su sacarificación e hidrólisis completa están involucradas una serie de enzimas y se requiere un sistema enzimático entero. Este sistema está compuesto generalmente de β -xilanasas, β -xilosidasas entre otras (Amarasekara, 2013). La reacción se muestra en la ecuación (4).



Como resumen, en la (tabla 3-1) se hace una comparación entre los distintos procesos conocidos para realizar la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 3-1. Comparación de las diferentes opciones para la hidrólisis de la celulosa.

HIDRÓLISIS	Insumo	Temperatura	Tiempo	Sacarificación
Ácida diluida	< 1%	215 °C	3 min.	50-70 %
Ácida concentrada	H ₂ SO ₄	40 °C	2-6 h	90 %
	30-70%			
Enzimática	Celulasa	70 °C	1,5 días	75-95 %

Fuente: (BNDES; CGEE, 2008)

3.2.3. Fermentación

La fermentación es un proceso biológico de oxidación incompleta llevada a cabo por microorganismos que toman energía de una fuente de carbono. En sentido general, la fermentación se refiere a la transformación bioquímica de sustancias orgánicas a compuestos más simples mediante la utilización de la actividad enzimática en un ambiente anaeróbico (Ragauskas, 2014).

La fermentación se define como un tipo de catabolismo anaeróbico en la que no se produce una reacción redox neta y cuya función es la síntesis de ATP (Adenosín trifosfato) por fosforilación a nivel de sustrato. El rendimiento energético de las fermentaciones es bajo: 2 ATP/ mol de glucosa para fermentación láctica y alcohólica y ligeramente mayor para otras fermentaciones (Castillo, 2005).

En la síntesis de ATP, un grupo fosfato se añade a algún intermediario en la ruta bioquímica como un fosfato de alta energía y eventualmente se transfiere un ADP (Adenosín difosfato) para formar ATP (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

Una ruta bioquímica muy utilizada por la fermentación es la glucólisis, también denominada de Embden-Meyerhof en honor a sus descubridores. Las etapas en las que se desarrolla esta ruta bioquímica son tres, en cada una de las cuales se producen una serie de reacciones individuales catalizadas enzimáticamente (Madigan, Martinko, & Parker, 2004):

- 1) Primera etapa.- incluye ciertas reacciones preparatorias que no implica ni oxidación ni reducción y que no liberan energía, pero producen dos moléculas del intermediario clave gliceraldehído- 3- fosfato a partir de la glucosa.
- 2) Segunda etapa.- en esta tiene lugar un proceso redox, la energía se conserva en forma de ATP, y se forman dos moléculas de piruvato.
- 3) Tercera etapa.- ocurre una segunda reacción redox y se generan los productos de fermentación, tales como por ejemplo, etanol, dióxido de carbono o ácido láctico.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

3.2.3.1. Fermentador

El recipiente en el que se lleva a cabo el proceso de fermentación se denomina fermentador. El fermentador ideal es aquel que proporciona las condiciones ambientales adecuadas para el óptimo crecimiento de los microorganismos y por ende la máxima cantidad del producto. Por lo tanto, el diseño del fermentador es de vital importancia en el proceso de fermentación (Reddy, Reddy, & Babu, 2012). Para que el producto deseado sea más fácil de obtener el fermentador debería estar equipado con lo siguiente: cuerpo del fermentador, agitador, serpentín, salida de gas, puerto inoculador, termómetro, medidor de pH

3.2.3.2. Medios de fermentación

Los medios de fermentación son muy importantes para el desarrollo óptimo de los procesos fermentativos, por lo que su preparación es una etapa fundamental para garantizar una buena productividad. Los componentes de los medios de fermentación representan factores externos químicos esenciales para cumplir con los requerimientos del crecimiento y de la formación de productos, deben suministrar la energía necesaria para la formación de metabolitos y para el mantenimiento celular (Merchuck, 2006). La clasificación de los componentes de los medios de fermentación se ha hecho en las siguientes categorías:

- a) Macronutrientes, que se agregan en cantidades de gramos por litro y constituyen las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.
- b) Micronutrientes, representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co, agregados en los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro.
- c) Factores de crecimiento, que se suministran al medio en baja concentración, estos pueden ser vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc.

3.2.3.3. Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales se determinan en base al tipo de metabolismo celular del microorganismo. Este puede ser autotrófico, debido a que utiliza como fuente de carbono el CO₂, o heterótrofo, cuya fuente de carbono lo constituyen los compuestos orgánicos. Otro factor importante está dado por las condiciones del cultivo, ya que este se puede dar en condiciones aerobias o anaerobias. Las fuentes de carbono también actúan como fuente de energía.

Una fuente nutricional también lo constituye el nitrógeno, el cual puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica. El nitrógeno se requiere para la síntesis de proteínas, ácidos nucleídos y polímeros de la pared celular.

Los Macronutrientes como el fósforo y el azufre son suministrados en forma de PO₄H⁻ y SO₄⁻. El fósforo se incorpora a los ácidos nucleídos y el azufre se utiliza para la síntesis de aminoácidos azufrados.



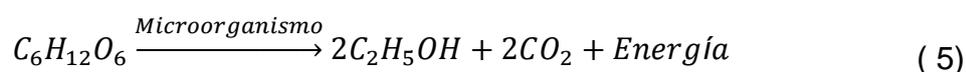
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

El potasio está unido en su mayoría al RNA (ácido ribonucleico), de manera que su requerimiento aumenta al aumentar el crecimiento celular. Por otra parte, el magnesio es esencial para la estabilidad de los ribosomas. Ambos macronutrientes, potasio y magnesio, se incorporan al medio de fermentación como fosfato y sulfato respectivamente.

3.2.3.4. Fermentación alcohólica

De los diversos tipos de fermentaciones que existen, aquí se hablara sobre el que se aplica a nuestro caso, la fermentación alcohólica. Este tipo de fermentación se caracteriza por la acción de un microorganismo en ausencia de oxígeno sobre la glucosa para transformarla en etanol y anhídrido carbónico, obteniendo energía para llevar a cabo el proceso. La ecuación estequiométrica (6) de la reacción es:



Para los procesos fermentativos industriales se requieren de microorganismos que proporcionen un alto rendimiento de bioetanol, alta productividad y que sea capaz de soportar altas concentraciones de bioetanol.

3.2.3.5. Crecimiento microbiano

En el crecimiento microbiano, los microorganismos comienzan a dividirse de forma activa y para ello utilizan los nutrientes que les provee el medio de cultivo, de esta manera se generan nuevos microorganismos. El proceso sigue hasta que en algún momento se agota algún nutriente del medio de cultivo y el crecimiento se interrumpe. Los aspectos fundamentales que caracterizan el crecimiento microbiano son: la estequiometría, por la cual se relaciona la concentración final de los microorganismos producidos con la concentración y composición del medio; y la cinética de reacción, que indica con que velocidad se lleva a cabo el proceso (Merchuck, 2006).

3.2.3.6. Microorganismos involucrados en la fermentación para la producción de bioetanol

Para el proceso de fermentación pueden utilizarse diferentes tipos de microorganismos, dependiendo de la materia prima a procesar. Las levaduras son los microorganismos preferidos para la producción de bioetanol a escala industrial, siendo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercializada mundialmente para tal fin (Babu, Thapliyal, & Kumar, 2013). También existen algunos termófilos asociados con la producción de bioetanol. En la (tabla 3-2) se observa una lista de los microorganismos generalmente empleados en la producción de bioetanol.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 3-2. Microorganismos generalmente empleados para la producción de bioetanol

1. BACTERIAS	CARACTERISTICAS
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Termófilo extremo.
<i>Clostridium thermocellum</i>	Termofílico, hidroliza la celulosa.
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Fermenta xilosa y almidón.
<i>Zymomonas mobilis</i>	La forma salvaje fermenta únicamente glucosa, fructosa y sacarosa, con baja productividad.
2. LEVADURAS	CARACTREISTICAS
<i>Candida pseudotropicalis, C. tropicalis</i>	Fermenta xilosa.
<i>Candida species</i>	Fermenta xilosa y celobiosa.
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Fermenta xilosa.
<i>Pichia stipitis</i>	Fermenta xilosa.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	La mayoría de las cepas fermentan únicamente glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa.
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	Hidroliza el almidón.
3. HONGOS FILAMENTOSOS	CARACTERISTICAS
<i>Fusarium species</i>	Fermenta xilosa.
<i>Monilia species</i>	Hidroliza la xilosa y el xilano.
<i>Mucor species</i>	Fermenta xilosa y arabinosa.

Fuente: (Reddy, Reddy, & Babu, 2012)

3.2.3.7. Selección de microorganismos

Al momento de elegir un microorganismo para su utilización en un proceso industrial se deben considerar algunos aspectos, debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo en su mayor parte depende de la cepa a utilizar (Merchuck, 2006). Dichos aspectos o criterios pueden ser:

- Cepa genéticamente estable.
- Velocidad de crecimiento alta.
- Cepa libre de contaminantes.
- Los requerimientos nutricionales deben ser satisfechos con medios de cultivo de un costo mínimo.
- Su conservación debe ser fácil de llevar a cabo para largos periodos de tiempo sin perder sus características particulares.
- Debe realizar el proceso fermentativo en un corto tiempo.
- Para la obtención de un producto, este debe tener un alto rendimiento, y su separación del medio de cultivo debe ser fácil de realizar.

Los microorganismos seleccionados para un proceso fermentativo pueden ser obtenidos de una colección de cultivos o a partir de fuentes naturales.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

De los diversos tipos de microorganismos que se utilizan para lograr la fermentación alcohólica de los azúcares, en este trabajo se utilizó el microorganismo más conocido y comercializado: *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.3.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Es el microorganismo que más se ha explotado para la fermentación alcohólica y está disponible comercialmente para la elaboración de pan y cerveza. Esta levadura sigue la ruta metabólica de Embden- Meyerhot- Parnas o (EMP) mediante la cual una molécula de glucosa genera dos moléculas de piruvato. En teoría el rendimiento que produce es de 0,511mol de etanol/ mol de glucosa (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

El microorganismo *S. cerevisiae* ha demostrado ser muy fuerte y adecuado para la fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos, que fácilmente puede fermentar mono y disacáridos de 6 carbonos como la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. Sin embargo, *S. cerevisiae* no es capaz de fermentar azúcares de 5 carbonos como la xilosa obtenida en la hidrólisis de la hemicelulosa, convirtiendo esto en una gran desventaja ya que los hidrolizados de la biomasa son mezclas de azúcares de 5 y 6 carbonos (Amarasekara, 2013).

3.2.3.8. Control y monitorización de la fermentación.

Cualquier tipo de fermentación puede ser monitoreada para garantizar que el proceso se realice de forma correcta, sobre todo en las fermentaciones a escala industrial ya que el costo de operación es elevado. Los factores ambientales que se controlan con mayor frecuencia son la temperatura, concentración de oxígeno, pH, masa celular y concentración del producto.

3.2.4. Destilación

La destilación es el proceso utilizado para separar el bioetanol de la mezcla resultante del proceso de fermentación, ya que la concentración del producto deseado en esta mezcla es baja. En general, para la obtención de un bioetanol de grado combustible los métodos de producción requieren una separación y una posterior deshidratación del bioetanol. El procesado de la solución alcohólica para su purificación a la fecha es una tecnología madura, debido a que son técnicas muy utilizadas y desarrolladas para la producción de etanol a partir de maíz y caña de azúcar. Estas técnicas desarrolladas para el bioetanol de primera generación también son útiles para la purificación del bioetanol lignocelulósico o de segunda generación (Amarasekara, 2013).

El proceso de destilación se basa en las diferentes temperaturas de los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla que queremos separar. El etanol absoluto hierve a 78.5 °C y el agua a 100 °C a una atmósfera de presión. Cuando el etanol y el agua son mezclados la temperatura del punto de ebullición de la mezcla varía entre los dos puntos de ebullición del agua y etanol puros.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

De esta manera, si se hierve una mezcla de agua y etanol sale del recipiente más vapor de etanol que vapor de agua (Amarasekara, 2013).

En este trabajo de investigación se enfocó en las primeras fases del proceso de producción de etanol y mas no en la etapa de destilación o deshidratación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

CAPÍTULO III

4. METODOLOGÍA

Para la realización de las pruebas experimentales se utilizó como materia prima el pericarpio de la fruta de maracuyá, que se obtuvo de los mercados municipales de la ciudad de Cuenca, durante los meses de abril y mayo, de acuerdo al cronograma establecido para la realización de esta tesis. Las pruebas se realizaron en laboratorio tecnológico de la Universidad de Cuenca. El plan experimental se ejecutó en tres etapas, de acuerdo al siguiente orden:

Etapa 1: Preparación de la muestra.

- Secado de la muestra y reducción de tamaño.
- Caracterización de la materia prima.

Etapa 2: Obtención del jarabe glucosídico.

- Eliminación de lignina.
- Hidrólisis ácida.
- Medición de azúcares reductores.

Etapa 3: Obtención de bioetanol.

- Fermentación.
- Medición del bioetanol producido.

4.1. Etapa 1: Preparación de la muestra

Esta etapa del proceso es muy importante debido a que los resultados que se puedan obtener van a estar influenciados en cierto grado por la preparación de la muestra. Para empezar, la muestra se lavó con agua normal y luego con agua destilada para eliminar cualquier tipo de partículas extrañas, y sobre todo para eliminar cualquier cantidad de azúcares reductores residuales procedentes de la pulpa de maracuyá. De esta manera se puede asegurar que los azúcares reductores, medidos después de la hidrólisis ácida, son el resultado de la ruptura de los enlaces glucosídicos de la celulosa.

4.1.1. Secado y reducción de tamaño

También, en la preparación de la muestra se realizó la reducción del tamaño de partícula para aumentar la superficie específica y así mejorar el ataque del ácido sobre el material lignocelulósico. Para esto primero se secó el pericarpio de maracuyá a una temperatura de 60 °C por 12 horas para luego molerlo sin mucha dificultad.

Materiales:



- Horno o estufa.
- Molino de discos.
- Malla numero 40 ASTM.

Procedimiento:

1. Secar el material en un horno o estufa durante algunas horas.
2. Moler el material y tamizarlo.

4.1.2. Caracterización del pericarpio de maracuyá

Como una etapa fundamental del proceso, es necesaria la caracterización de la materia prima, se indicó anteriormente, que es muy importante conocer la composición del material lignocelulósico a utilizar para determinar la posibilidad de obtener azúcares reductores. La información obtenida sirve para evaluar si el pericarpio de maracuyá posee suficiente cantidad de celulosa y hemicelulosa para proseguir con el estudio.

En la caracterización del pericarpio de maracuyá se determinó los siguientes componentes:

- Humedad (Método básico mediante pesada)
- Extractos en acetona (Norma TAPPI T 204)
- Extractos en agua (Norma TAPPI T 207)
- Holocelulosa (celulosa + hemicelulosa), (Método de Wise)
- Lignina (Norma TAPPI 222)
- Azúcares reductores (Método de Somogyi-Nelson)
- Almidón (Por diferencia)

En la (figura 4.1) se presenta un esquema del procedimiento que se realizó para la caracterización del pericarpio de maracuyá. Como se puede observar, se partió de la muestra recién separada de la fruta; aquí se realizó la primera determinación de humedad; luego se secó y se molió, y se determinó una nueva humedad. Con la muestra preparada se determinó los extractivos, primero en solvente orgánico (acetona) y luego en agua caliente. Posteriormente, con la muestra libre de extractivos, se procedió a la determinación de la holocelulosa y de la lignina. También se extrajo los azúcares reductores con agua fría y se midieron con el método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson. Finalmente se hizo una determinación aproximada del contenido de almidón por diferencia del contenido de extractivos en agua y el contenido de azúcares reductores.

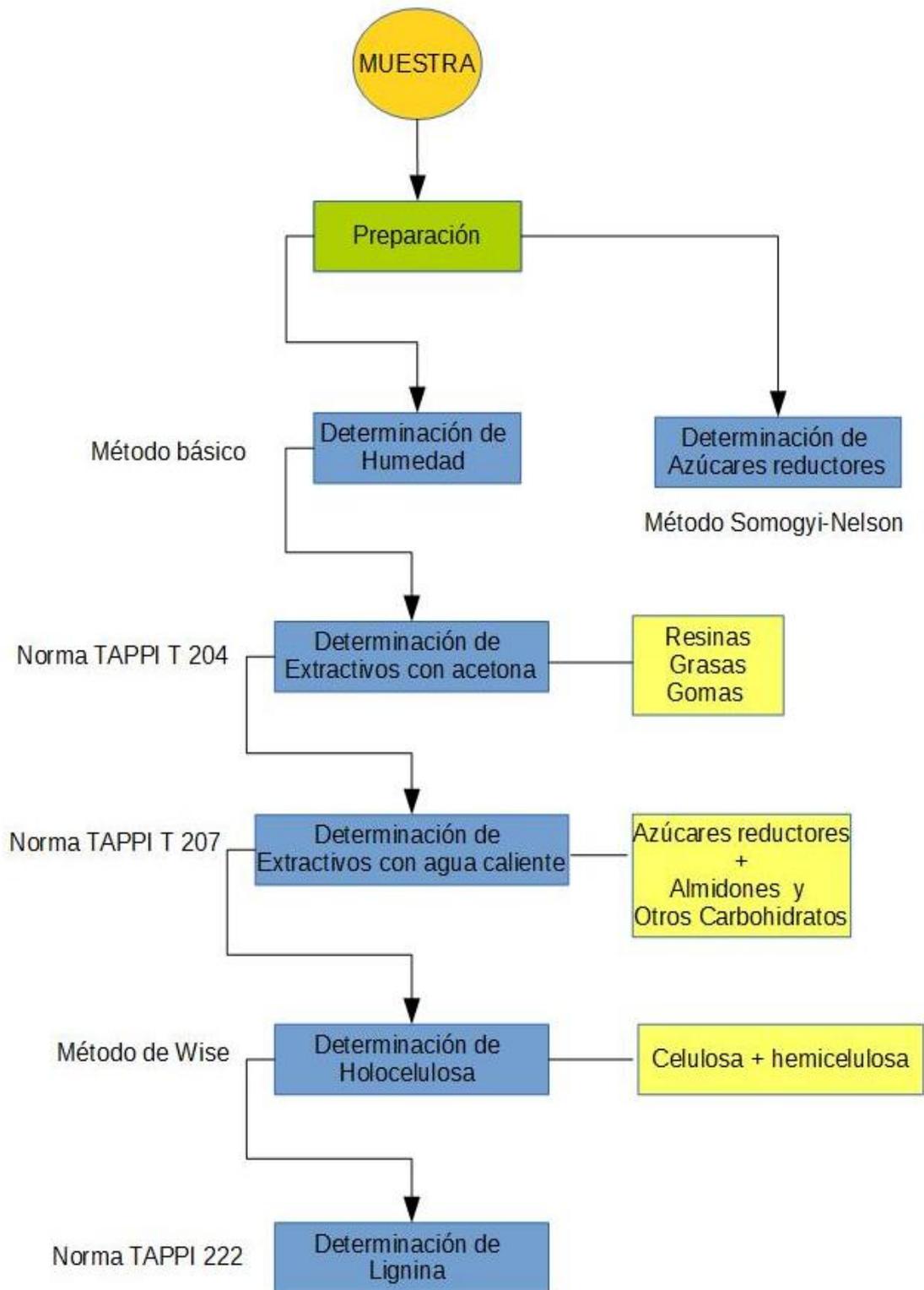


Figura 4.1. Diagrama para la caracterización de la materia prima
Fuente: Autor



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

A continuación se describen cada uno de los procedimientos seguidos para la caracterización del pericarpio de maracuyá.

4.1.2.1. Determinación de la humedad

Método básico de eliminación de humedad por desecación a 105 °C.

Materiales:

- Capsula de porcelana (secada previamente a 105°C por 2 horas).
- Pinzas.
- Desecador.
- Estufa capaz de mantener 105 +/- 3 °C.
- Balanza analítica de 0,1 mg de precisión.

Procedimiento:

1. Esta determinación se realiza por duplicado. Primero se toma un peso aproximado de 5 gramos de muestra en una capsula de porcelana previamente secada y pesada. Se registra el peso.
2. Secar en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 24 horas.
3. Sacar de la estufa y dejar enfriar en un desecador antes de pesar.
4. Pesar y registrar el peso.

Cálculos:

La humedad se expresa como g de agua/g de materia húmeda o en porcentaje.

$$\%H = \frac{Ph - Ps}{Ph} * 100 \quad (8)$$

4.1.2.2. Determinación de extractos:

Extracción en acetona

Esta determinación se basa en la norma UNE-EN ISO14453 descrito en (Barroso, 2010) y la norma TAPPI T 204.

El método consiste en la extracción de algunos componentes secundarios del material lignocelulósico con acetona, un disolvente orgánico volátil. Para ello se utiliza un extractor Soxhlet.

Materiales:

- Extractor Soxhlet.
- Cartucho de celulosa.
- Placa calefactora.
- Estufa capaz de mantener una temperatura de 105°C +/- 3 °C.
- Refrigerante con corriente de agua.
- Balanza analítica.
- Luna de reloj.
- Espátula.

Reactivos:

- Acetona



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Procedimiento:

1. Pesar en un cartucho de celulosa un peso cercano a los 5 gramos de muestra.
2. La humedad de la muestra debe ser conocida.
3. Colocar el matraz de bola en la estufa para desecarlo y luego pesarlo. Registrar el peso.
4. Colocar el cartucho de celulosa con la muestra en el extractor Soxhlet y rellenar con celulosa hasta que sifone una vez, luego nuevamente llenar con acetona hasta la mitad del extractor.
5. Encender la placa calefactora y dejar por un tiempo de tres horas a partir del comienzo de la ebullición.
6. Transcurrido este tiempo se toma por un lado la muestra y por el otro el matraz de bola. Para recoger el matraz se debe esperar a que se evapore toda la acetona.
7. Se seca completamente el matraz de bola en la estufa, se deja enfriar en el desecador y se pesa. Registrar el peso.

Cálculos

$$C_{EA} = \frac{P_{EA}}{P_{MS}} = \frac{P_{matraz+extractos} - P_{matraz}}{P_{MH}(100 - H)} * 100\% \quad (9)$$

Donde:

C_{EA} =cantidad de extractos en disolvente orgánico-acetona por cada 100 gramos de materia seca.

P_{EA} =peso de extractos en disolvente orgánico-acetona.

P_{MS} =peso del material lignocelulósico seco.

P_{MH} =peso del material lignocelulósico húmedo.

H =humedad del material lignocelulósico en gramos de agua por gramos de material lignocelulósico seco (o en porcentaje).

4.1.2.3. Extracción en agua caliente

Esta determinación está basado en la norma UNE 57-013-82 y en la Norma TAPPI T 207, descrito en (Barroso, 2010).

Este método sirve para extraer compuestos secundarios tales como, taninos, azúcares, almidones, mediante disolución en agua hirviendo.

Materiales:

- Erlenmeyer de 1l.
- Refrigerante y corriente de agua.
- 600ml de agua destilada.
- Toma de vacío.
- Kitasato.
- Embudo Buchner.
- Disco de papel de filtro.



- Trompa de seguridad.

Procedimiento:

1. Se toma toda la muestra extraída con acetona luego de haber esperado al menos varias horas para que se evapore. Se introduce en el matraz Erlenmeyer de 1l y se agrega 600 ml de agua destilada.
2. Se instala el sistema de reflujo, se conecta la placa calefactora y se deja 3 horas a ebullición suave desde que esta comienza.
3. Una vez que ha pasado ese tiempo, se prepara el sistema filtrante y se recoge la muestra con el papel filtro.
4. Se pesa la muestra y se registra. Luego, determinar su humedad H_E .
5. A partir de aquí se puede dividir la muestra y pesar las cantidades necesarias para las determinaciones posteriores, pues ya se conoce su humedad.

Cálculos:

$$C_{EW} = \frac{P_{EW}}{P_{MS}} = \frac{P_{MH(1-H)} - P_{EA} - P_{MEH(1-H_E)}}{P_{MH}(100 - H)} * 100\% \quad (10)$$

Donde:

C_{EW} =cantidad en gramos de extractos en agua por 100 gramos de materia seca.

P_{EW} =peso de extractos en agua.

P_{MS} =peso del material lignocelulósico seco.

P_{MH} =peso del material lignocelulósico húmedo.

P_{MEH} =peso del material lignocelulósico libre de extractos húmedo.

H_E =humedad de la muestra tras extracciones.

Para determinar la cantidad de lignina, holocelulosa y celulosa sobre materia seca se debe conocer la cantidad de extractos totales.

$$C_E = C_{EW} + C_{EA} \quad (11)$$

4.1.2.4. Determinación de lignina klason

El método está basado en la norma TAPPI 222, descrito en (Barroso, 2010), y consiste en una hidrólisis, primero con ácido sulfúrico al 72% para romper los polisacáridos en oligosacáridos y segundo con ácido sulfúrico al 4% para romper los oligosacáridos en monosacáridos. Luego se separa la parte sólida y se deseca.

Materiales:

- Balanza analítica de 0,1 mg de precisión.
- Estufa capaz de mantener 105 °C +/- 3 °C.
- Desecador.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

- Vaso de precipitación de 50 ml.
- Varilla de vidrio.
- Erlenmeyer de 1l.
- Refrigerante y corriente de agua.
- Toma de vacío
- kitasato.
- Trompa de seguridad.
- Placa porosa del número 3.

Reactivos:

1. Disolución de H₂SO₄ al 72 %.
2. Agua destilada.

Procedimiento:

1. Tomar aproximadamente 1 gramo seco de muestra libre de extracción en acetona y agua, se registra el peso. Se debe conocer su humedad H_{E1} y se determina por duplicado.
2. Se coloca en un vaso de precipitado de 50 ml con 15 ml de ácido sulfúrico al 72 %.
3. Se mantiene 2 horas en el vaso, agitando con la varilla de vidrio. Se debe observar que la muestra se oscurece al poco tiempo de añadir el ácido.
4. Transcurrido este tiempo, se traspasa la muestra al matraz Erlenmeyer.
5. Se agrega 560 ml de agua destilada caliente para evitar la formación de espumas, resultando en una disolución final al 4% de ácido sulfúrico.
6. Se prepara el refrigerante y se mantiene a ebullición suave durante 4 horas.
7. Colocar la placa porosa número 3 en el sistema filtrante, previamente secado y pesado.
8. Dejar decantar la muestra en el Erlenmeyer y filtrar.
9. Lavar con agua destilada el residuo sólido.
10. Secar en la estufa a 105 °C durante 24 horas.
11. Pesar la placa con la lignina seca y registrar.

Cálculos:

$$C_{LK} = \frac{P_L}{P_{MS}} = \frac{(P_{placa+lignina} - P_{placa})}{P_{MEH1}(100 - H_{E1})} * (100 - C_E) \quad (12)$$

Donde:

P_L =peso de lignina en gramos.

P_{MS} =peso de la muestra seca.

P_{MEH1} =peso de la muestra húmeda libre de extractos tomada para la determinación de lignina.

H_{E1} =humedad de la muestra extraída en acetona y agua tomada para la determinación de lignina Klason en g /100 g de muestra seca.

C_E =cantidad de extractos totales en g / 100 gramos de muestra seca.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

4.1.2.5. Determinación de holocelulosa

Esta determinación se basa en el método de Wise, descrito en (Barroso, 2010), que consiste en el tratamiento del material lignocelulósico con una disolución de clorito de sodio a una temperatura moderada.

Materiales:

- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Hielo.
- Baño de agua.
- Placa porosa número 2.
- Estufa capaz de mantener 105 °C.
- Balanza analítica.
- Tapón.
- Kitasato.
- Trompa de seguridad.
- Desecador.
- Campana de extracción.

Reactivos:

1. Clorito sódico.
2. Ácido acético glacial.
3. Agua destilada.
4. Acetona.

Procedimiento:

1. Tomar aproximadamente 2 gramos de la muestra tras extracción. Se debe conocer su humedad H_{E2} y se determina por duplicado.
2. Se coloca la muestra en el matraz de 250 ml con 150 ml de agua destilada y se tapona.
3. Se activa el baño a 80 – 85 °C.
4. Luego de que se haya calentado se debe añadir 1,5 g de clorito de sodio y 10 gotas de ácido acético glacial.
5. Se mantiene una hora removiéndolo periódicamente.
6. Se añade nuevamente 1,5 gramos de clorito de sodio y 10 gotas de ácido acético glacial.
7. Se repite este proceso hasta que se vuelva blanca la muestra. Al menos se agrega el ácido acético y el clorito unas tres veces.
8. Esperar una hora tras la última adición.
9. Sacar el matraz del baño y dejar enfriar en agua con hielo.
10. Colocar la placa porosa número 2 previamente secada y pesada en el sistema filtrante.
11. Filtrar el contenido del matraz.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

12. Lavar la muestra con agua destilada fría, luego lavar con acetona y por último lavar nuevamente con agua destilada fría.
13. Secar la placa con la muestra en la estufa a 105 ° C.
14. Pesar en la balanza analítica y registrar el peso.

Cálculos:

$$C_H = \frac{P_H}{P_{MS}} = \frac{P_{placa+holocelulosa} - P_{placa}}{P_{MEH2}(100 - H_{E2})} * (100 - C_E) \quad (13)$$

Donde:

C_H =contenido de holocelulosa en g por cada 100 g de materia seca.

P_H =peso de holocelulosa.

P_{MEH2} =peso de la muestra libre de extractos húmeda tomada para la determinación de holocelulosa.

H_{E2} =humedad de la muestra libre de extractos tomada para la determinación de holocelulosa en g / 100 gramos de muestra extraída húmeda.

C_E =cantidad de extractos totales en gramos / 100 gramos de materia seca.

4.1.2.6. Determinación de azúcares reductores

La determinación de los azúcares reductores está basada en el método fotométrico de Somogyi-Nelson descrito en (González & Castellános, 2003).

Para este método se preparan los reactivos en dos partes:

- Preparación del Reactivo de Somogyi:

Componente A: disolver 24 gramos de carbonato de sodio deshidratado y 12 gramos de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada. Añadir una solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (4 g en 40 ml de agua) y por último 16 g de $NaHCO_3$. Componente B: disolver 18 g de Na_2SO_4 en 500 ml de agua caliente (80 °C) y calentar hasta ebullición durante cinco minutos.

- Preparación del reactivo de Nelson:

Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua destilada caliente (60 °C). Dejar enfriar la solución hasta 5 – 10 °C y añadirle 21 ml de H_2SO_4 concentrado con 3 g de arseniato de sodio. Se completa la solución a 500 ml. Incubar a una temperatura de 40 °C en un tiempo de 24 – 48 horas. Filtrar si es necesario. El periodo para la conservación del reactivo puede ser de 2 – 3 meses.

Procedimiento:

1. En un tubo de ensayo aforado, colocar 1 ml del reactivo de Somogyi y 1 ml de la solución que se va a estudiar (solución de glucosa 20 a 180 mg/ml).
2. Poner esta mezcla en baño María hirviendo por 40 min.
3. Dejar enfriar la solución y añadir 1 ml del reactivo de Nelson, agitando suavemente. Completar con agua destilada hasta 10 ml.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

4. Medir la absorbancia en una celda de 1 cm de ancho a 520 nm de longitud de onda. Usar agua destilada como blanco.

4.1.2.7. Determinación del almidón

Para determinar una cantidad aproximada de almidón se realizó por diferencia entre la cantidad de extractos en agua caliente y la cantidad de azúcares.

$$\%Almidon = C_{EW} - AR \quad (14)$$

Donde:

C_{EW} = cantidad en gramos de extractos en agua por 100 gramos de materia seca.

AR = Gramos de azúcares reductores por cada 100 gramos de muestra seca

4.2. Etapa 2: Obtención del jarabe glucosídico

4.2.1. Eliminación de lignina

La eliminación de la lignina se realizó sumergiendo la muestra en una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. El volumen de solución es de 350 ml por cada 50 gramos de cascara, es decir, una relación de 7:1. A los 15 minutos se adicionó sulfato de calcio para evitar la degradación de la celulosa, luego se dejó reposar la solución por 3 horas (Monsalve, Medina, & Ruiz, 2006). Finalmente se separó el licor oscuro que contiene la lignina disuelta por decantación, (figura 4.2). El licor obtenido se desechó y la parte solida se envió al proceso de hidrólisis ácida.



Figura 4.2. Fase líquida con la lignina disuelta
Fuente: Autor

4.2.2. Hidrólisis ácida

El proceso que se empleó para romper los enlaces glucosídicos de los polisacáridos del pericarpio de maracuyá fue la hidrólisis ácida, utilizando ácido sulfúrico diluido. La relación empleada fue ácido: pericarpio de 1:2, es decir, 50 ml de ácido por cada 100 gramos de pericarpio.

Para la evaluación de la hidrólisis ácida se realizó un diseño factorial completo 2^3 con dos replicas, de esta manera se pudo observar el comportamiento de la hidrólisis al variar tres factores a la vez y a dos niveles.

4.2.2.1. Diseño factorial 2^k

La realización de un diseño factorial para evaluar la producción de azúcares reductores proporciona información muy importante sobre el proceso de hidrólisis. El objetivo es filtrar las variables del proceso, es decir, ver que variables producen una variación significativa en la respuesta medida. Además, el diseño permitirá seleccionar la mejor combinación en los niveles de las variables para maximizar la producción de azúcares reductores.

El diseño factorial 2^k es la estrategia experimental óptima cuando el objetivo es estudiar simultáneamente el efecto de k factores en un proceso sobre la respuesta y ver si interaccionan entre ellos. Los diseños factoriales proporcionan experimentos más eficientes, debido a que cada observación genera información sobre todos los factores, de este modo es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. La interacción entre factores ocurre cuando su actuación no es independiente.

4.2.2.2. El diseño factorial 2^3

En los diseños factoriales 2^3 se evalúan 3 factores A, B y C, a dos niveles cada uno, esto implica ocho combinaciones de tratamientos que pueden ser colocadas geoméricamente como un cubo, como se muestra en la (figura 4.3). La notación de signos “+” y “-” representa a los niveles de los factores alto y bajo respectivamente.

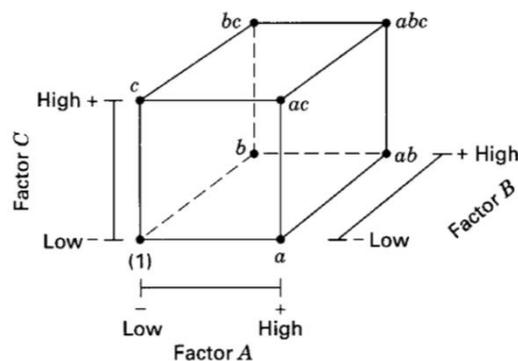


Figura 4.3. Vista geométrica del diseño factorial 2^3
Fuente: (Montgomery, 2001)

Con respecto a la notación de la configuración de los 8 tratamientos en la (tabla 4-1) se observa dos tipos de notaciones: una con los signos “+” y “-” denominada notación geométrica, y otra con letras minúsculas, notación de Yates. Esta tabla muestra la matriz de diseño del factorial 2^3 .



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 4-1. Matriz de diseño del factorial 2³

Corrida	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Notación de Yates
1	-	-	-	+	+	+	-	(1)
2	+	-	-	-	-	+	+	a
3	-	+	-	-	+	-	+	b
4	+	+	-	+	-	-	-	ab
5	-	-	+	+	-	-	+	c
6	+	-	+	-	+	-	-	ac
7	-	+	+	-	-	+	-	cb
8	+	+	+	+	+	+	+	abc

Fuente: (Montgomery, 2001)

También, a partir de los signos de la matriz se puede obtener muy fácilmente los signos de los contrastes multiplicando las columnas adecuadas de los efectos principales. Por ejemplo, la columna con los signos de interacción AB se obtiene multiplicando los signos de la columna A con los signos de la columna B, y el contraste AB, ecuación (15), se obtiene multiplicando la columna AC con la columna de la notación de Yates.

$$\text{Contraste}_{AB} = (1) - a - b + ab + c - ac - bc + abc \quad (15)$$

De esta manera se obtienen todos los demás contrastes (A, B, C, AC, BC y ABC).

Los efectos y la suma de cuadrados para el análisis Anova se calcula con las ecuaciones:

$$\text{Efecto} = \frac{\text{Contraste}}{4n} \quad (16)$$

$$SC = \frac{(\text{Contraste})^2}{8n} \quad (17)$$

La suma total de cuadrados se determina de la manera usual mediante:

$$SC_T = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^2 \sum_{l=1}^n Y_{ijkl}^2 - \frac{Y_{...}^2}{8n} \quad (18)$$

En general SC_T tiene 8n - 1 grados de libertad. La suma de cuadrados del error, con 8(n-1) grados de libertad se puede calcular por diferencia, mediante.

$$SC_E = SC_T - SC_A - SC_B - SC_C - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC} - SC_{ABC} \quad (19)$$

Las fórmulas para el análisis completo de varianza se presentan a continuación en la (tabla 4-2).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 4-2. Cálculo de la tabla Anova

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada
Efecto principal:				
A	SCA	a-1	s_1^2	$f_1 = \frac{s_1^2}{s^2}$
B	SCB	b-1	s_2^2	$f_2 = \frac{s_2^2}{s^2}$
C	SCC	c-1	s_3^2	$f_3 = \frac{s_3^2}{s^2}$
Interacción de 2 factores:				
AB	SC(AB)	(a-1)(b-1)	s_4^2	$f_4 = \frac{s_4^2}{s^2}$
AC	SC(AC)	(a-1)(c-1)	s_5^2	$f_5 = \frac{s_5^2}{s^2}$
BC	SC(BC)	(b-1)(c-1)	s_6^2	$f_6 = \frac{s_6^2}{s^2}$
Interacción de 3 factores:				
ABC	SC(ABC)	(a-1)(b-1)(c-1)	s_7^2	$f_7 = \frac{s_7^2}{s^2}$
Error	SCE	abc(n-1)	s^2	
Total	STC	abcn-1		

Fuente: (Walpole, Myers, Myers, & Ye, 2012)

- Modelo estadístico para tres factores:

El modelo de medias de celdas para un diseño factorial de tres factores y n réplicas de cada una de las abc combinaciones de tratamientos en un diseño totalmente aleatorizado es:

$$y_{ijkl} = \mu_{ijk} + e_{ijkl} \quad (20)$$

$$i = 1, 2, \dots, a; \quad j = 1, 2, \dots, b; \quad k = 1, 2, \dots, c; \quad l = 1, 2, \dots, n$$

La media de celdas μ_{ijk} expresada como una función del factorial de los efectos principales y de las interacciones es:

$$\mu_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} \quad (21)$$

Donde $\mu = \bar{\mu}$ es la media general, α_i , β_j , γ_k son los efectos principales de los factores A, B y C respectivamente. Los efectos de las interacciones de dos factores son, $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$, $(\beta\gamma)_{jk}$ y el efecto de la interacción de tres factores es $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$.

4.2.2.3. Variables del proceso

Las variables que se estudiaron en el proceso son:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

4.2.2.3.1. Variables controlables

Las variables que se manipulo en el proceso fueron la presión de vapor de agua, el tiempo de hidrólisis y la concentración del ácido sulfúrico. Éstas representan los factores para el diseño factorial.

- Presión.- la presión del vapor de es un parámetro indispensable y debe ser monitoreado y controlado, pues al controlar la presión se controla también la temperatura del proceso, ya que ambos parámetros están relacionados. Además como se revisó en la parte teórica, la temperatura del proceso de hidrólisis esta sobre los 100 °C.
- Tiempo.- el tiempo es otro factor muy importante en este proceso, pues tiempos cortos no son suficientes para hidrolizar todos los polisacáridos y tiempos muy largos puede conducir a una degradación excesiva de los carbohidratos. Debido a esto se debe buscar un rango adecuado para realizar el proceso. El rango que se estudiara en este trabajo será de 15-30 minutos.
- Concentración.- la concentración del ácido sulfúrico también es un factor al que hay que tomarlo en consideración, debido a que los rendimientos dependen de la concentración. Como ya se aclaró en el Capítulo III, el ácido concentrado da mayor rendimiento que el ácido diluido, sin embargo, los costos de producción aumentan. Por esta razón, es este trabajo se decidió evaluar ácido sulfúrico diluido en dos niveles de concentración de 2,5 y 5 % (en volumen).

4.2.2.3.2. Variables independientes

- Tipo de residuo.- esta variable es el objeto de estudio, aquí está involucrada la composición del pericarpio.

4.2.2.3.3. Variables dependientes

- Concentración de azúcares reductores.- es la variable a medir, depende principalmente de la composición, además de cómo se combinen las variables controlables.

En la (tabla 4-3) se presenta las variables tomadas en cuenta, los niveles de cada variable y la respuesta a medir.

Tabla 4-3. Factores y respuesta del diseño factorial

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo
Presión (PSI)	10	15
Tiempo (minutos)	15	30
Concentración (%)	2.5	5
P/V		
Respuesta	azúcares reductores (g/l)	azúcares reductores (g/l)

Fuente: Autor en base a (Monsalve, Medina, & Ruiz, 2006)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

El arreglo o combinación de los tratamientos se realiza de acuerdo a la matriz estándar, la cual se muestra a continuación.

Tabla 4-4. Combinación de los factores

N	Presión (PSI)	Tiempo (min)	Concentración (%)
1	10	15	2,5
2	15	15	2,5
3	10	30	2,5
4	15	30	2,5
5	10	15	5
6	15	15	5
7	10	30	5
8	15	30	5

Fuente: Autor

Para llevar a cabo las corridas experimentales se utilizó las siguientes cantidades para cada replica: 5 gramos de muestra; 35 ml de solución de hidróxido de sodio para la etapa de deslignificación y 2,5 ml de ácido sulfúrico para la etapa de hidrólisis.

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo en un autoclave marca All-american, (figura 4.3), y las réplicas se colocaron en vasos de precipitación bien tapados. Luego de la hidrólisis se procedió a la separación del jarabe glucosídico de la parte sólida en una centrifugadora por 15 minutos (figura 4.4). Finalmente se midió la concentración de azúcares reductores de los jarabes obtenidos con el método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson (figura 4.5), se utilizó un espectrofotómetro marca Spectronic Thermo 20D.



Figura 4.4. Autoclave para la hidrólisis

Fuente: Autor



Figura 4.5. Separación del jarabe glucosídico por centrifugación
Fuente: Autor



Figura 4.6. Determinación de azúcares reductores
Fuente: Autor

4.3. Etapa 3: obtención de bioetanol

4.3.1. Fermentación

En la etapa de fermentación se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo para que realice el trabajo de bioconversión de los azúcares obtenidos a bioetanol. El proceso se llevó a cabo en frascos Erlenmeyer con un volumen efectivo de 50 ml de cultivo, en condiciones anaerobias a una temperatura de 30°C, a 200 rpm y en un tiempo de 7 horas (Monsalve, Medina, & Ruiz, 2006), (Tejada, y otros, 2010).

Para conseguir las condiciones de temperatura y agitación se construyó un agitador orbital al que se le adicione un calentador eléctrico (figura 4.6). El calentador eléctrico se conectó a un controlador de temperatura marca Autonics TC4Y-14R con una termocupla tipo K, que fue calibrado con un termómetro de mercurio, para controlar la temperatura de fermentación.



Figura 4.7. Equipo para el proceso de fermentación
Fuente: Autor

El jarabe glucosídico obtenido se acondicionó para que la fermentación sea efectiva, para esto, se regulo el pH a 4,5 con hidróxido de sodio, luego se empleó 0,25% de fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. Se inoculó la solución con levadura seca de panificación marca Levapan (0,1%), para esto primero se diluyó la levadura en un poco de jarabe (Tejada, y otros, 2010).

Finalizado el proceso de fermentación se midió la concentración de alcohol producido mediante un método químico.

4.3.2. Determinación del contenido de bioetanol

Para la determinación del bioetanol se utilizó el método químico según la norma INEN 379 (INEN, 1978). Ver anexo 1.

En este método se destila el alcohol etílico para transformarlo en acetaldehído y determinar su contenido mediante titulación.

Cálculos

El contenido de alcohol etílico se calcula con la siguiente ecuación.

$$A = 0,0072(20 - V) \quad (22)$$

Donde:

A = contenido de alcohol etílico en volumen.

V = volumen ocupado de tiosulfato de sodio en ml.

Finalmente, en la (figura 4.8) se puede observar todo el proceso para la obtención del bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá.

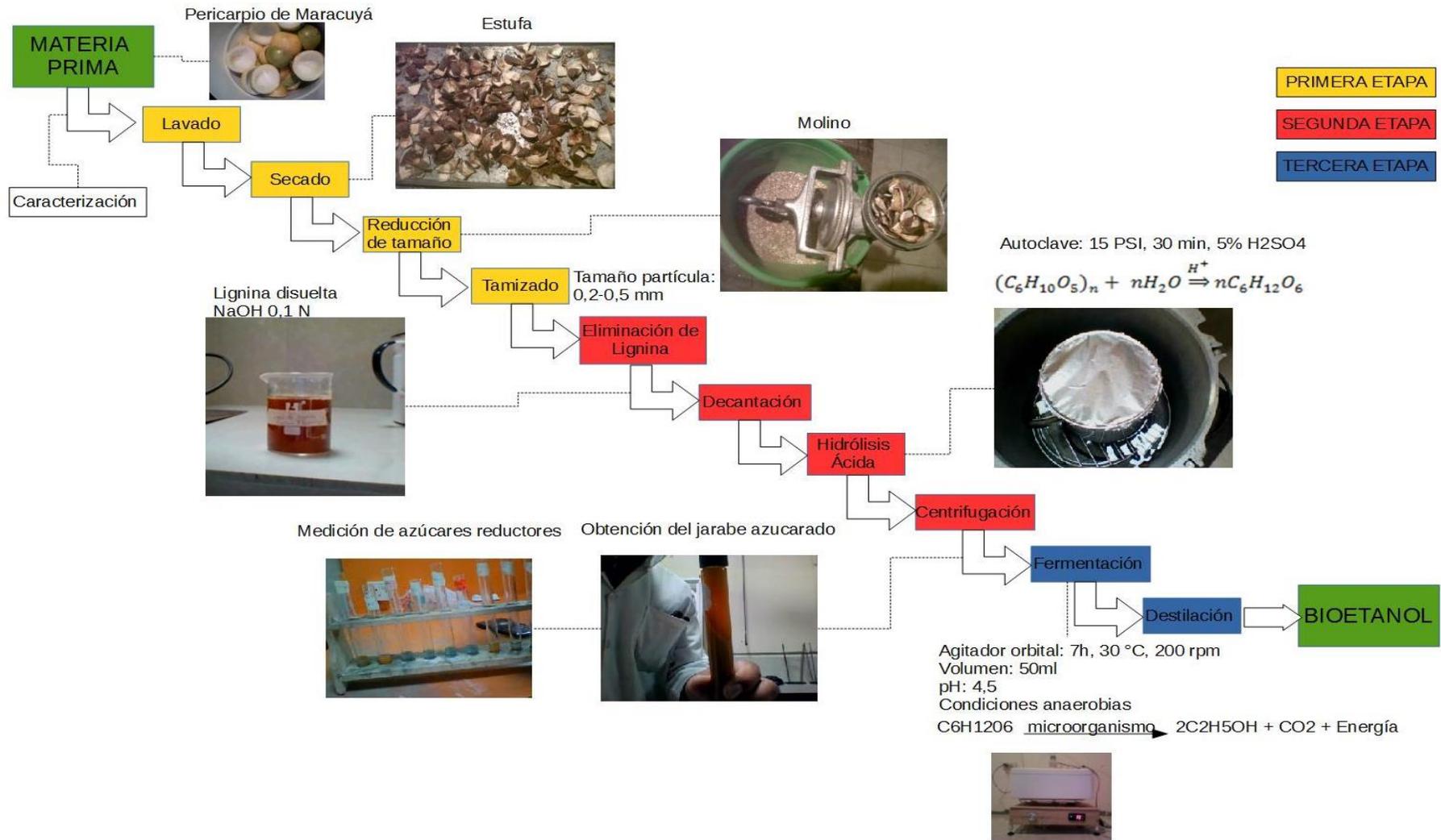


Figura 4.8. Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá

Fuente: Autor



CAPITULO IV

5. RESULTADOS Y ANALISIS DE DATOS

5.1. Caracterización de la materia prima

La información que nos entrega el análisis de los diferentes componentes descritos en la sección metodología se muestra a continuación en la (tabla 5.1).

Tabla 5-1. Resultados de los análisis de la caracterización

COMPONENTE	%
HUMEDAD INICIAL	87,6783
HUMEDAD MUESTRA SECADA	52,2619
EXTRACTOS DISUETOS EN ACETONA	6,8412
EXTRACTOS DISULTOS EN AGUA CALIENTE	18,7032
EXTRACTOS TOTALES	25,5444
HOLOCELULOSA (CELULOSA + HEMICELULOSA)	48,0833
LIGNINA	19,4292
AZÚCARES REDUCTORES	3,55
ALMIDON	15,0967

Fuente: Autor

Estos resultados nos dan una idea más clara de la materia prima que se utilizó. El pericarpio de maracuyá contiene una cantidad de holocelulosa que representa más del 48 % de la estructura en base seca y que puede ser una potencial fuente de carbono. Cabe recalcar que la holocelulosa está formada por celulosa y por hemicelulosa. En base a este resultado se decidió continuar con el estudio de la siguiente etapa del proceso.

Es importante indicar que la humedad inicial de 87.6783 % es el valor que se midió antes de que la muestra sea secada. Debido a que la muestra presentaba una humedad elevada, se secó a 70 °C durante 12 horas, luego se la molió en un molino de discos y se la tamizó. Posteriormente con la muestra preparada se determinó la humedad que intervienen en los cálculos de los demás componentes cuyo valor es 52,2619 %.

Por otra parte, además de la cantidad de holocelulosa, existe un porcentaje significativo de extractos disueltos en agua caliente. Dichos extractos contienen carbohidratos de bajo peso molecular como almidón y azúcares fermentables que se pueden aprovechar para aumentar la cantidad de fuente de carbono para la producción de bioetanol.

Con respecto a los azúcares reductores, se determinó su composición en el pericarpio de maracuyá dándonos como resultado 3,55 gramos de azúcares reductores por cada 100 gramos de materia seca. De esta información se confirma que el pericarpio ya posee monómeros de azúcares que pueden ser

perfectamente fermentables, este dato hay que tenerlo en cuenta para ver la conversión final al someter la cascara al proceso de hidrolisis.

Con respecto a la lignina, se puede apreciar que el pericarpio de maracuyá tiene una cantidad significativa de lignina, este dato es muy importante porque confirma que en el proceso se debe realizar la etapa de deslignificación para liberar la celulosa y hemicelulosa.

En el estudio sobre la caracterización del pericarpio de maracuyá realizado por (Canteri, y otros, 2010) se reporta un contenido de fibra de un 65 % en base seca, este dato comparado con los resultados que se obtuvieron en este trabajo son similares, ya que si sumamos el porcentaje de holocelulosa y lignina nos da un valor de 67,5% y esto representa la fibra.

5.2. Resultados y análisis de datos de la hidrólisis ácida

5.2.1. Curva de calibración.

Para la medición de la concentración de azúcares reductores, como variable respuesta en los jarabes obtenidos, se utilizó el método fotométrico de Somogyi-Nelson. Con los datos obtenidos se graficó la curva de calibración (figura 5.1) mediante el método de mínimos cuadrados y se obtuvo la ecuación (23) con un valor de $R^2 = 0,995$.

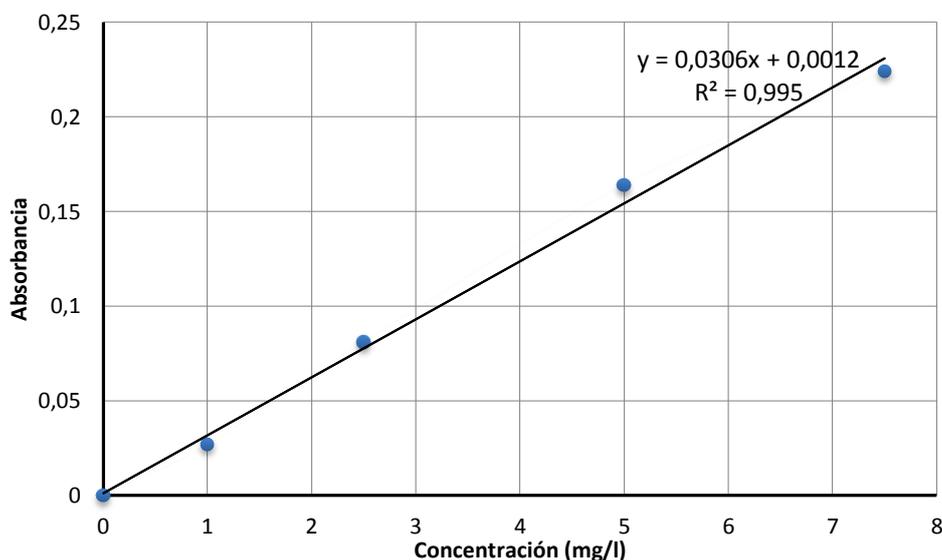


Figura 5.1. Curva de calibración para la medición de los azúcares reductores
Fuente: Autor

La ecuación despejada es:

$$\text{Concentración} = 32.6797 * \text{Absorbancia} - 0.0392 \quad (23)$$



5.2.2. Medición de la variable respuesta.

Los valores de la concentración de azúcares de cada tratamiento se obtuvieron con los datos arrojados por el espectrofotómetro y con la curva de calibración de la (figura 5.1). En la (tabla 5-2) se tiene los resultados de absorbancia y concentración de azúcares en g/l. Como se puede observar la tabla cuenta 16 corridas en total debido a que se hicieron dos replicas.

Tabla 5-2. Resultados de las corridas experimentales del diseño factorial

ORDEN ESTANDAR	ABSORBANCIA	Concentración (g/l)
1	0,095	3,0654
2	0,214	6,9542
3	0,223	7,2484
4	0,201	6,5294
5	0,193	6,2680
6	0,176	5,7124
7	0,184	5,9739
8	0,241	7,8366
9	0,134	4,3399
10	0,188	6,1046
11	0,233	7,5752
12	0,174	5,6471
13	0,204	6,6275
14	0,194	6,3007
15	0,166	5,3856
16	0,269	8,7516

Fuente: Autor

5.2.3. Análisis de datos del diseño factorial 2³

Luego de que se obtuvieron los resultados de la variable respuesta de cada tratamiento y su respectiva replica, se procedió a hacer el análisis de los datos con el diseño factorial 2³ explicado en el capítulo IV. En esta sección se presenta el análisis de varianza, y los gráficos que nos ayudan visualizar las interacciones entre las variables.

5.2.3.1. Matriz estándar

La construcción de la matriz del diseño factorial se presenta en la (tabla 5-3). Los ocho tratamientos están ordenados de acuerdo al orden estándar, se puede ver todas las combinaciones posibles de los niveles de los tres factores junto con las dos réplicas de la variable respuesta.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 5-3. Matriz estándar del diseño factorial con dos replicas

Orden estándar	Presión (Psi)	Tiempo (min)	Concentración (%)	Azúcares reductores (g/l)	
				Replica1	Replica 2
1	10	15	2.5	3.06536	4.33987
2	15	15	2.5	6.95425	6.10458
3	10	30	2.5	7.24837	7.57516
4	15	30	2.5	6.52941	5.64706
5	10	15	5.0	6.26797	6.62745
6	15	15	5.0	5.71242	6.30065
7	10	30	5.0	5.97386	5.38562
8	15	30	5.0	7.83660	8.75163

Fuente: Autor

5.2.3.2. Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza que nos entrega el programa estadístico Minitab se muestra en la (tabla 5-4). Se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 5-4: Tabla Anova del diseño factorial

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Modelo	7	25.0838	3.5834	11.72	0.001
Lineal	3	10.9266	3.6422	11.92	0.003
Presión (Psi)	1	3.3791	3.3791	11.06	0.010
Tiempo (min)	1	5.7302	5.7302	18.75	0.003
Concentración (%)	1	1.8172	1.8172	5.95	0.041
Interacciones de 2 términos	3	1.1760	0.3920	1.28	0.345
Presión*Tiempo	1	0.2996	0.2996	0.98	0.351
Presión*Concentración	1	0.1122	0.1122	0.37	0.561
Tiempo*Concentración	1	0.7642	0.7642	2.50	0.152
Interacciones de 3 términos	1	12.9812	12.9812	42.4	0.000
Presión*Tiempo*Concentración	1	12.9812	12.9812	42.47	0.000
Error	8	2.4451	0.3056		
Total	15	27.5289			

Fuente: Autor

Se efectuó una prueba de hipótesis para ver si las medias de la concentración resultan iguales, el modelo lineal empleado es:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (24)$$



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

- Hipótesis nula:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k = \mu$$

- Hipótesis alternativa:

Ha: al menos una media es diferente

Para poder efectuar la prueba de hipótesis se emplea el valor p de la (tabla 5-4) de varianza y un valor de $\alpha=0,05$. Por lo tanto, si $\alpha > p$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Esto indica que se ha producido una variación significativa sobre la variable respuesta.

De acuerdo a esto, los efectos que resultaron significativos son: los tres efectos principales (A, B Y C) y el efecto de la interacción de tercer orden (ABC).

5.2.3.3. Análisis de gráficos

Para poder apreciar mejor cómo se comportan las variables en el proceso y para corroborar los resultados del análisis Anova se hace un análisis de gráficos, donde se visualiza el efecto de los factores, así como la interacción entre ellos.

5.2.3.3.1. Gráfica normal de efectos estandarizados

En esta gráfica (figura 5.2) se observa tanto los efectos como las interacciones para los cuales se rechazó la hipótesis nula en el análisis Anova.

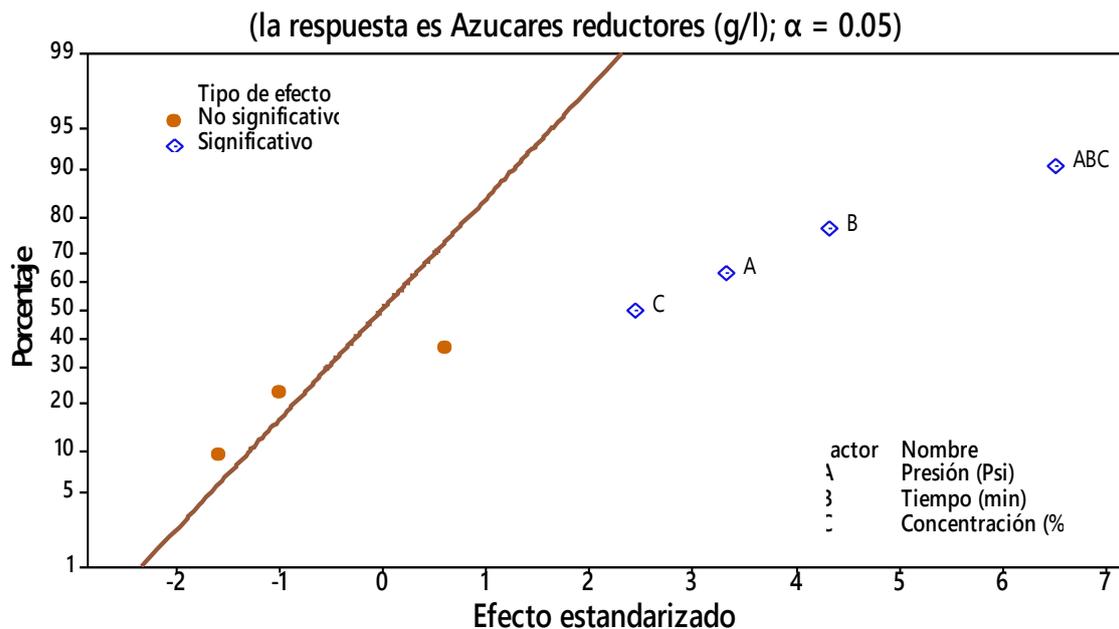


Figura 5.2. Gráfica normal de efectos estandarizados

Fuente: Autor

De acuerdo a esta grafica los efectos que están alejados de la línea recta son significativos y mientras más alejados estén más significativos son.

De esta manera se puede comprobar lo que se concluyó en el análisis Anova, es decir, que los efectos significativos son los de los factores presión, tiempo y concentración. Además se observa que el efecto más significativo corresponde



al efecto de la interacción de los tres factores, esta es una interacción compleja, pero se puede decir que los tres factores estudiados se encuentran íntimamente relacionados o son interdependientes.

Por otro lado, se puede observar los efectos que no se aceptan como significativos, debido a que están ajustados a la línea recta y estos corresponden a los efectos causados por las interacciones de dos factores AB, AC Y BC.

5.2.3.3.2. Diagrama de efectos principales

Con este diagrama, (figura 5.3), se puede visualizar el nivel óptimo en que debe ser utilizado cada efecto principal. Aquí no se toma en cuenta las interacciones.

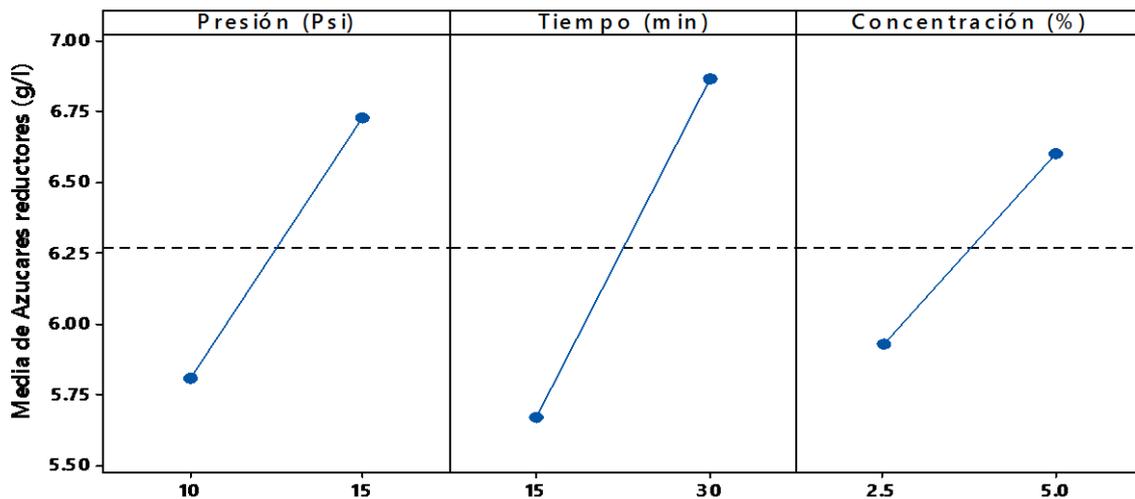


Figura 5.3. Gráfica de efectos principales
Fuente: Autor

Para el caso de la presión, se observa que la mayor concentración de azúcares reductores se logra con 15 psi. Con respecto al tiempo, se puede ver que al pasar del nivel mínimo al máximo se produce la mayor variación en la variable respuesta y el mayor resultado se produce a los 30 minutos. Y por último, de acuerdo a la concentración de la acido la mayor respuesta se da en el nivel máximo de 5%.

5.2.3.3.3. Diagrama de cubo

Este diagrama, (figura 5.4), muestra el resultado de todas las interacciones del experimento, donde se puede observar que la máxima concentración de azúcares que se alcanza es de 8.4941 g/l, la cual corresponde a la combinación de: presión, 15 psi; tiempo, 30 minutos; y concentración, 5% de ácido sulfúrico.

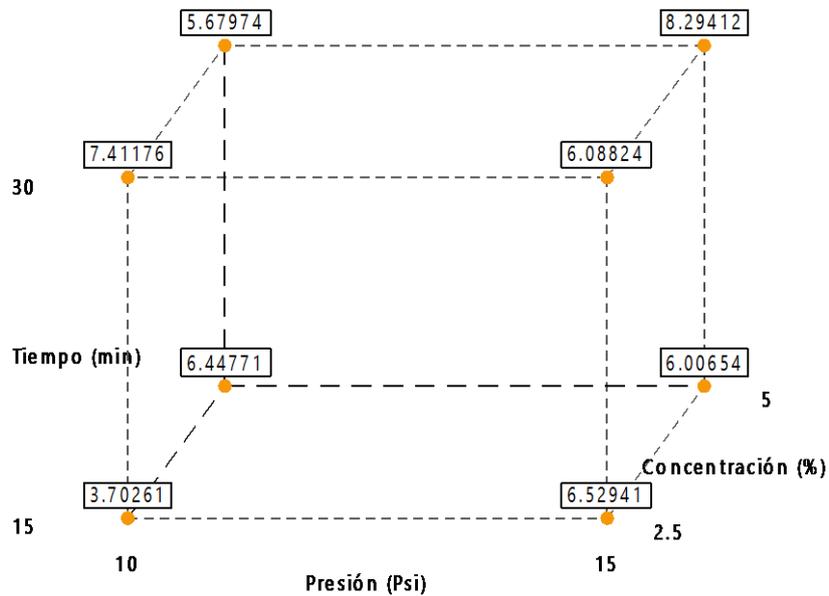


Figura 5.4. Gráfica de cubos de Azúcares reductores (g/l)
Fuente: Autor

5.2.3.4. Diagnósis y validación del modelo.

Una vez realizado el análisis de varianza es necesario verificar la hipótesis del modelo para poder emplear las conclusiones encontradas. Para esto es necesario hacer un análisis de los residuos.

5.2.3.4.1. Prueba de normalidad de errores

Con esta prueba se verifica que el error asociado a la experimentación tiene una distribución normal. Para esta prueba se grafica los residuales del análisis y se los ajusta a una línea recta, (figura 5.5). El error tiene una distribución normal si los datos se ajustan a la línea.

(la respuesta es Azúcares reductores (g/l))

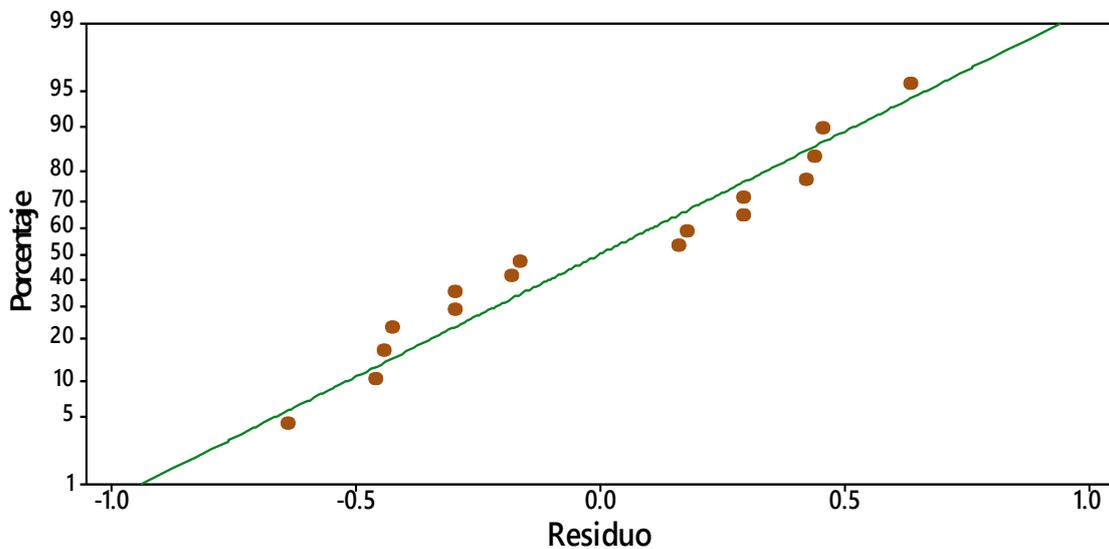


Figura 5.5. Gráfica de probabilidad normal (La respuesta es azúcares reductores (g/l))
Fuente: Autor

En este gráfico se observa que los datos se ajustan a la línea recta, por lo que se deduce que el error presenta una distribución normal.

5.2.3.4.2. Prueba de independencia de errores

Con ésta prueba se verifica que los errores son independientes. Para esto se utiliza un diagrama en el que se grafican los residuales versus el orden de observación, (figura 5.6). Si no se presenta ningún patrón en la distribución de los datos, entonces se puede concluir que no existen errores sistemáticos.

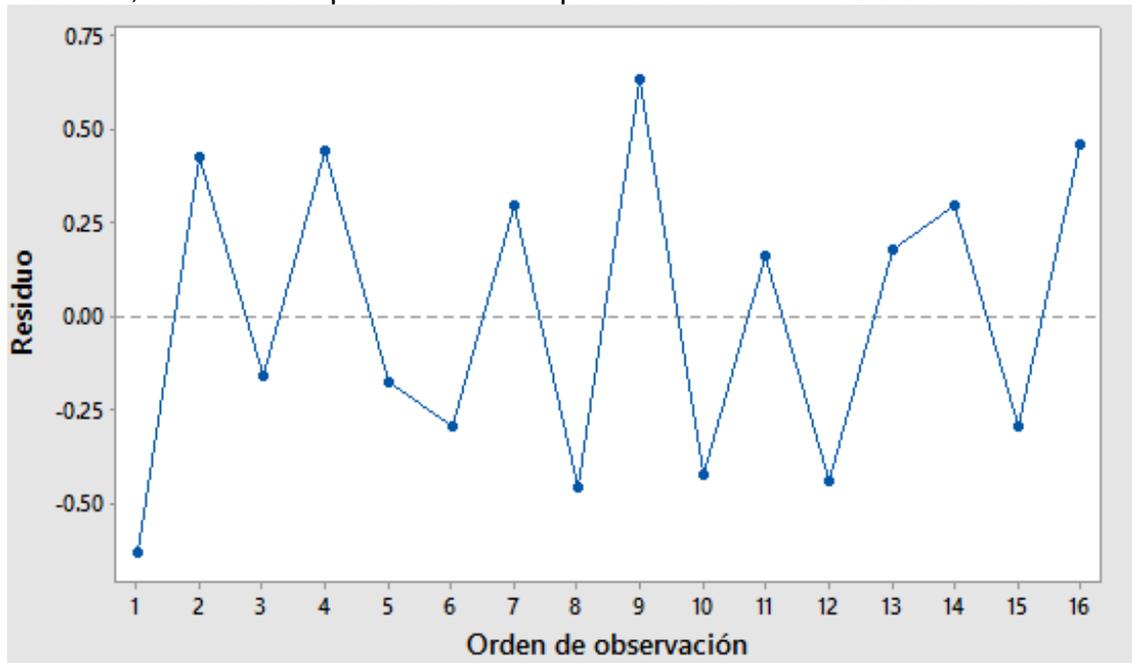


Figura 5.6. Gráfica de los residuales contra el orden de observación (La respuesta es azúcares reductores (g/l))
Fuente: Autor

Al revisar la gráfica, se afirma que los errores son independientes ya que como se puede observar los datos se distribuyen aleatoriamente y no siguen ningún patrón definido.

5.2.4. Selección del proceso más óptimo

Del diagrama de cubo se pudo apreciar que la mayor producción de azúcares se da a 15 psi, 30 minutos y con una concentración de ácido sulfúrico del 5 %. De acuerdo a estos resultados seleccionamos este tratamiento para continuar con la siguiente etapa del proceso.

Con el proceso seleccionado se realizó una nueva hidrólisis pero con mayores cantidades manteniendo las mismas relaciones ya utilizadas, es decir 100 g de pericarpio y 50 ml de solución de ácido sulfúrico. En la (tabla 5-5) se muestran los resultados.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Tabla 5-5. Concentración de azúcares reductores en el jarabe obtenido

Medición	Concentración (g/l)	Media aritmética (g/l)	Desviación estándar (g/l)
1	10,22813688		
2	9,594423321	9,8226	0,3524
3	9,645120406		

Fuente: Autor

El porcentaje de azúcares medidos por cada 100 gramos de pericarpio libre de humedad está en la (tabla 5-6). En donde también se presenta el rendimiento de conversión de azúcares reductores, teniendo en cuenta los azúcares existentes inicialmente. Éste rendimiento de conversión muestra el porcentaje de holocelulosa que se ha transformado en monómeros fermentables.

Tabla 5-6. Rendimiento de conversión de la holocelulosa

Parámetro	Cantidad
Azúcares antes de la hidrólisis	3,5501g
Azúcares después de la hidrólisis	8,1855g
Holocelulosa Ecuación	48,0833g
	$R = \frac{AR_{despues\ de\ la\ hidrolisis} - AR_{antes\ de\ hidrolisis}}{HOLOCELULOSA} * 100$
Rendimiento	9,6403%

Fuente: Autor

Se ve entonces que el pericarpio ya tiene una cantidad apreciable de azúcares reductores. El rendimiento expuesto representa la conversión de la holocelulosa suponiendo que la cantidad inicial de azúcares que posee el pericarpio de maracuyá no se degrada en el proceso de hidrólisis, sin embargo la degradación por la acción del ácido sulfúrico puede ocurrir, en cuyo caso el rendimiento sería mayor. Por otra parte, en la conversión de holocelulosa se degrada tanto la celulosa como la hemicelulosa y los azúcares resultantes pueden ser monómeros de 5 y 6 carbonos, lo cual puede afectar de alguna manera el proceso de fermentación.

Ahora bien, el bajo rendimiento se puede explicar por el empleo de un ácido diluido; además por la falta de eliminación de lignina y liberación de la celulosa en la etapa de deslignificación, ya que como señala (Cortes, Ibla, Calderón, & Herrera, 2013) al aumentar el tiempo de acción del hidróxido de sodio (NaOH) a 24 horas se elimina toda la lignina y la producción de azúcares aumenta.

En la hidrólisis de cáscaras de piña y naranja, (Tejada, y otros, 2010), se obtuvieron jarabes azucarados de 80 g/l y 45g/l respectivamente, lo cual es un resultado superior al que se obtuvo en la hidrólisis de la cáscara de maracuyá.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Sin embargo, tendríamos que considerar el volumen de jarabe obtenido y calcular la cantidad de azúcares producidos por cada 100 gramos de cascara. En la hidrólisis ácida de residuos de poda, (Tejada, Quintana, Pérez, & Young, 2011) se obtuvieron jarabes azucarados para: tallos, 10,77g/l; hojas, 16,85 g/l y flores, 30,46 g /l, y con un rendimiento de conversión de 16%, 13% y 2% respectivamente. También, en el estudio para producción de azúcares reductores a partir de residuos agroindustriales del mango, (Mejía, Martínez, Betancourt, & Castrillón, 2007), utilizando ácido sulfúrico al 0,5 %, a una temperatura de 80°C y durante una hora de proceso se logró un rendimiento del 52%, pero también se generó otros compuestos indeseables. En la hidrólisis ácida de cascara de naranja *Citrus sinensis*, (Alvear, y otros, 2009) , con ácido sulfúrico al 7 %, se logra una producción de 25 mg de azúcares por cada gramo de cascara.

Como se puede apreciar los resultados de la producción de jarabes azucarados con distintas materias primas son variados y relativamente bajos, sin embargo, estas investigaciones son exploratorias, y el objetivo en esta línea es mejorar los rendimientos hasta aprovechar al máximo los componentes de los residuos orgánicos.

5.3. Resultados de la etapa de fermentación

Los resultados de la determinación de bioetanol se muestran a continuación en la (tabla 5-7), y está expresado como porcentaje en volumen. Este etanol se generó en un tiempo de 7 horas en las condiciones indicadas en el apartado metodología.

Tabla 5-7. Resultado de la determinación de bioetanol

N	V	Ecuación	% <i>Etanol</i> _(V/V)	Media	Desviación estándar
1	2,85		0,1235		
2	3,05	% <i>Etanol</i> _(V/V) = 0,0072(20 - V)	0,1220	0,1229	0,0008
3	2,90		0,1231		

Fuente: Autor

Para facilitar la comparación con otros resultados de trabajos similares, en la (tabla 5-8) se da el resultado de la concentración en gramos por litro, para esto utilizamos la densidad del etanol de 0,789 g/cm³.

Tabla 5-8. Concentración de bioetanol en g/l

N	g/l	Media (g/l)	Desviación estándar (g/l)
1	0,9629		
2	0,9743	0,9695	0,0059
3	0,9714		

Fuente: Autor



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Este resultado de 0,9695 g/l permite responder que es posible obtener bioetanol a partir del pericarpio de maracuyá.

La cantidad de pericarpio utilizado fue de 50 g, con lo que se logró producir 200 ml de jarabe glucosídico. Los 50 ml de jarabe producen 0,04843 gramos de bioetanol. En la (tabla 5-9) se presentan los resultados del rendimiento de conversión de cada gramo de pericarpio a etanol.

Tabla 5-9. Rendimiento de conversión a etanol con respecto a la materia prima seca

N	Rendimiento (mg etanol/g pericarpio)	Media aritmética (mg etanol/g pericarpio)	Desviación estándar (mg etanol/g pericarpio)
1	3,8515824		
2	3,8970288	3,8781	0,0237
3	3,8856672		

Fuente: Autor

El rendimiento de producción es muy bajo, lo cual no lo hace rentable para la producción industrial, sin embargo, no hay que descartar el pericarpio de maracuyá como una fuente de carbono, ya que se debería primero probar con otro proceso como el enzimático.

Por citar algunos resultados, en la obtención de bioetanol a partir de cáscaras de banano, (Monsalve, Medina, & Ruiz, 2006), se logra una concentración de 7,92 g/l, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y en condiciones similares a las empleadas en esta investigación. Por otra parte, en el estudio realizado por (Tejada, 2010), se obtiene bioetanol a partir de cáscaras de piña (8,4 mg/g) y cáscaras de naranja (1,0 mg/g). Estos resultados son similares con el resultado aquí obtenido. Como se puede observar, los rendimientos en la producción de bioetanol en diferentes tipos de materia prima son por lo general bajos.

Estos bajos rendimientos de producción de bioetanol se pueden explicar debido a varias causas. En primer lugar se tiene la baja concentración de jarabe utilizado, si se tiene poca cantidad de sustrato es lógico que se genere pequeñas cantidades de producto. En segundo lugar, es debido al tipo de azúcares reductores que constituyen el jarabe, ya que en el proceso de hidrólisis se liberan los azúcares tanto de la celulosa como de la hemicelulosa, dando lugar a moléculas de glucosa y otros azúcares de 5 y 6 carbonos; por lo tanto se necesita un microorganismo que aproveche la mayoría de azúcares producidos para aumentar el rendimiento.



6. CONCLUSIONES

El pericarpio de maracuyá presenta una composición química con un contenido de holocelulosa superior al 48 %, por lo que muestra la posibilidad de ser utilizado como materia prima para la obtención de azúcares reductores. Además, presenta un contenido en azúcares y carbohidratos de bajo peso molecular que también pueden ser aprovechados.

Con respecto a la generación de azúcares reductores, mediante el proceso de hidrólisis ácida, se obtuvo un jarabe glucosídico con una concentración de $9,82 \pm 0,36$ g/l y con una conversión de 9% con respecto a la cantidad de holocelulosa, este resultado se consiguió con la configuración más óptima para maximizar la producción. Esta configuración de factores es: presión, 15 Psi; tiempo, 30 minutos y concentración de ácido sulfúrico, 5 % (P/V).

El contenido de bioetanol, obtenido por la fermentación del jarabe glucosídico de mayor rendimiento, con la utilización del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones anaeróbicas presenta un valor de $0.96 \pm 0,05$ g/l, y con un rendimiento de producción con respecto a la materia prima de 3,45 mg de bioetanol por cada gramo de pericarpio de maracuyá, el cual presenta un valor muy bajo. El rendimiento bajo puede ser explicado por la hidrólisis de la hemicelulosa, la cual se divide en azúcares de diferente tipo, sobretodo pentosas que no son fermentadas por el microorganismo empleado.

Por lo tanto, a partir del pericarpio de maracuyá es posible obtener bioetanol de segunda generación mediante un proceso de hidrólisis con ácido sulfúrico diluido, sin embargo, el rendimiento resulta ser muy bajo (0,345 %), ya que se obtuvo una cantidad no significativa de bioetanol por cada gramo de pericarpio de maracuyá. Por otro lado, teniendo en cuenta que el pericarpio es un residuo de bajo costo el proceso puede ser viable utilizando grandes cantidades de materia prima. Además, el proceso puede mejorar los rendimientos si se utiliza una hidrólisis enzimática, en lugar de la hidrólisis ácida.



7. RECOMENDACIONES

Con respecto a la caracterización del pericarpio es recomendable hacer el análisis de celulosa y hemicelulosa para tener una visión más precisa de qué tipo de azúcares reductores se obtiene.

Se recomienda experimentar con enzimas para lograr un mayor rendimiento en la conversión de holocelulosa en azúcares reductores, ya que el pericarpio presenta una composición química que puede ser aprovechada con otro proceso diferente al que se empleó en esta investigación, por ejemplo, la hidrólisis enzimática.

Para la etapa de fermentación es recomendable que se experimenten con otros tipos de microorganismos, que sean capaces de fermentar azúcares tanto de cinco como de seis carbonos, de esta manera se puede aumentar el rendimiento en la etapa de fermentación. Para ello, es necesario que la Escuela de Ingeniería Química adquiera colecciones de varios tipos de microorganismos para facilitar y fortalecer el proceso de investigación en esta línea.

Y por último con respecto al producto obtenido se recomienda hacer la determinación de etanol por cromatografía de gases, ya que este método es muy preciso.



8. Bibliografía

- Ministerio Cordinador de Sectores Estratégicos. (2014). *Balance Energeético Nacional 2014*. Recuperado el 2 de Junio de 2015, de <http://www.sectoresestrategicos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/11/Resumen-Balance-Energe%CC%81tico-Nacional-20141.pdf>
- Abril, A., & Navarro, E. (2012). *ETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA*. Aleta Ediciones.
- Acosta, A. (2012). *Los Biocombustibles*. ANI-Academia Nacional de Ingenieria.
- Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica. (15 de Mayo de 2015). *andes*. Obtenido de <http://www.andes.info.ec>
- Alvear, R., Castillo, C., Henao, L., Marimón, W., Tejada, C., Tejada, C., & Villabona, A. (2009). Estudio de la hidrólisis ácida de cáscaras de naranja *Citrus sinensis* para la obtención de etanol. *Universidad de Cartagena*.
- Amarasekara, A. S. (2013). *Handbook of Cellulosic Ethanol*. NJ: John Wiley; Sons.
- Ascher, M., Ganduglia, F., Orlando, V., Abreu, F., & Macedo, J. (2010). *América Latina y el Caribe. Mapeo político-institucional y análisis de la competencia entre producción de alimentos y bioenergía*. San José: IICA.
- Babu, V., Thapliyal, A., & Kumar, P. G. (2013). *Biofuels Production*. New Jersey: John Wiley; sons.
- Banco Interamericano de Desarrollo. (Agosto de 2015). *Base de datos de energía*. Recuperado el Noviembre de 2015, de <http://www.iadb.org/es/temas/energia/base-de-datos-de-energia/base-de-datos-de-energia,19144.html?view=v11>
- Barroso, C. M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Madrid.
- Bernal, J., Tamayo, A., Londoño, M., & Hincapié, M. (2001). *Frutales de clima calido*. Corpoica.
- BNDES; CGEE. (2008). *Bioetanol de Caña de Azúcar-Energía para el Desarrollo Sostenible*. Río de Janeiro: FAO, CEPAL, CGEE, BNDES.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

- Borja, C. (2008). *CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES DE MARACUYÁ (Passiflora edulis) EN EL ECUADOR*.
- Canteri, M. H., Scheer, A., Petkowics, C., Ginies, C., Renard, C., & Gilran, W. (2010). Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49, 113-122.
- Castillo, R. F. (2005). *BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL*. Madrid: TÉBAR.
- Castro, J., Paredes, C., & Muñoz, A. (2009). *CULTIVO DE MARACUYÁ (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg)*. Tujillo-Perú: Gerencia Regional Agraria La Libertad.
- Castro, M. (Abril de 2012). *Centro Ecuatoriano de Derecho Ambiental*. Recuperado el Mayo de 2015, de <http://www.ceda.org.ec/temas-de-analisis/#>
- CEDA. (Noviembre de 2011). *Hacia una matriz energética diversificada en Ecuador*. Recuperado el 31 de mayo de 2015, de <http://www.ceda.org.ec/publicaciones-categoria/publicaciones-centro-ecuatoriano-derecho-ambiental/page/2/>
- Cortes, W., Ibla, J., Calderón, L., & Herrera, A. (2013). Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de banano y naranja. *Revista de Tecnología*, 72-76.
- Farone, W. A., & Cuzens, J. E. (3 de December de 1996b). *Patente nº 5580389*. United States.
- FES. (2013). *FRIEDRICH EBERTO STIFTUNG*. Recuperado el 8 de Abril de 2015, de <http://library.fes.de/pdf-files/bueros/quito/10374-20131204.pdf>
- Gasparini, Ganduglia y otros. (2009). *MANUAL DE BIOCOMBUSTIBLES*. ARPEL IICA.
- Gomelsky, R. (22 de Agosto de 2011). *Propuesta de lineamientos de Política y Estrategia Nacional de Biocombustibles para Ecuador*. Recuperado el 2 de Junio de 2015, de USAID: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnadw724.pdf
- González, G. H., & Castellános, Ó. (2003). Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *Revista Ingeniería e Investigación*, 5-17.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

- Guarnizo, F. A., Martínez, Y. P., & Valencia, S. H. (2009). PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACAIRIFICACIÓN. *Scientia et Technica Año XV*, 284-289.
- IEA. (2013). *International Energy Agency*. Recuperado el 05 de Abril de 2015, de <http://www.worldenergyoutlook.org/publications/weo-2013/>
- IEA. (2014). *International Energy Agency*. Recuperado el 07 de Abril de 2015, de <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEIO2014.pdf>
- INEN. (Mayo de 1978). *NORMA INEN 379*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0379.1979.pdf>
- INER. (s.f.).
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2013).
- Kubisek, C. P. (2012). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. John Wiley and Sons.
- Machado, C. (2010). *Situación de los biocombustibles de 2da y 3ra generación en América Latina y el Caribe*. IICA.
- Madigan, T. M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock: Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación.
- Malavolta, E. (1994). *NUTRICIÓN Y FERTILIZACIÓN DEL MARACUYÁ*. SAO PAULO: IPNI. Obtenido de [http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe05257a40005f359f/\\$FILE/L%20Maracuya.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe05257a40005f359f/$FILE/L%20Maracuya.pdf)
- Mejía, F., Martínez, H., Betancourt, E., & Castrillón, C. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*, 41-62.
- Merchuck, J. (2006). *MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL*. Recuperado el 3 de Abril de 2015, de <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=whdxh3wv%2FWc%3D&tabid=581>
- Ministerio Coordinador de Sectores Estratégicos. (2014). Recuperado el 2 de Junio de 2015, de <http://www.sectoresestrategicos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/11/Resumen-Balance-Energe%CC%81tico-Nacional-20141.pdf>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

- Monsalve, J., Medina, V., & Ruiz, A. (2006). Producción de etanol a partir de la cascara de banano y de almidón de yuca. *Dyna*(150), 21-27.
- Montgomery, D. (2001). *Desing and Analysis of experiments*. John Wiley & Sons, INC.
- Nogués, F. S., García, D., & Rezeau, A. (2010). *Energía de la biomasa*. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza.
- OLADE. (2012). *Sistema de información Económica Energética: Energía en cifras*. Quito: OLADE.
- OLADE. (2013). *Energía Sostenible-Perspectiva Regional: Centroamérica - America Latina y El Caribe*. San José: OLADE.
- Quintero, S. J. (2008). DESHIDRATACIÓN DE ETANOL CON MATERIALES ADSORBENTES DE ORIGEN AMILÁCEO Y CELULÓSICO. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.
- Ragauskas, A. J. (2014). *Materials for biofuels*. Singapore: World Scintific Publishing Company.
- Reddy, S. M., Reddy, R. S., & Babu, G. N. (2012). *BASIC INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY*. New Delhi: New Age.
- sdd. (234). *sd*.
- Serna, J., & Chacón, C. (2000). El cultivo del maracuya. *Federacion nacional de cafeteros de colombia*, 32.
- TAPPI. (Marzo de 2007). *TAPPI*. Obtenido de <http://www.tappi.org/content/sarg/t204.pdf>
- Tejada, L. e. (2010). PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE FERMENTACION ALCOHOLICA DE JARABES GLUCOSADOS DERIVADOS DE CÁSCARAS DE NARANJA Y PIÑA. *Revista Educación en Ingeniería*, 120-125.
- Tejada, L., Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 111-116.
- Tejada, L., Tejada, C., Villabona, Á. A., Castillo, C., Henao, D., Marimón, W., . . . Tarón, A. (2010). PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE FERMENTACIÓN ALCOHOLICA DE JARABES GLUCOSADOS



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

DERIVADOS DE CÁSCARAS DE NARANJA Y PIÑA. *Revista Educación en Ingeniería*, 120-125.

Tentradue, C., & Carranza, H. (2014). La eficiencia energética en el transporte. *Petrotecnia*, 14-37.

Valarezo, A., Cañarte, E., Valarezo, O., & Zambrano, O. (2009). *MANEJO DEL CULTIVO DE MARACUYA (Pasiflora edulis f. flavicarpa Deg) EN EL LITORAL ECUATORIANO*. PORTOVIEJO: INIAP.

Walpole, R., Myers, R., Myers, S., & Ye, K. (2012). *Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias*. Naucalpan de Juárez, Estado de Mexico: PEARSON EDUCATION.

Wiebe, Keith Croppenstedt, André Raney, Terri. (2008). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación: biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades*. D - FAO.



9. ANEXOS

Anexo 1. Norma INEN para la determinación de etanol

CDU: 664.8		INEN		AL 02.01-301	
Norma Técnica Ecuatoriana	CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACION DE ALCOHOL ETILICO			INEN 379 1978-05	
rito Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno E8-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción	1. OBJETO				
	1.1 Esta norma tiene por objeto establecer el método para determinar el contenido de alcohol etílico en conservas vegetales.				
	2. RESUMEN				
	2.1 Destilar el alcohol etílico para transformarlo en acetaldehído y determinar su contenido mediante titulación.				
	3. INSTRUMENTAL				
	3.1 <i>Equipo para destilación.</i> Matraz volumétrico de 50 cm ³ , con tapa de caucho perforada y termómetro. Refrigerante Liebig de tamaño acorde con el matraz y tubo de vidrio colector de destilados.				
	3.2 <i>Pipeta volumétrica,</i> de 10 cm ³ .				
	3.3 <i>Reverbero eléctrico,</i> u otra fuente calórica adecuada.				
	3.4 <i>Matraz, Erlenmeyer,</i> de 500 cm ³ .				
	4. REACTIVOS				
4.1 <i>Solución 0,01667 N de bicromato de potasio.</i>					
4.2 <i>Acido sulfúrico,</i> reactivo para análisis.					
4.3 <i>Solución al 5% de yoduro de potasio,</i> reactivo para análisis.					
4.4 <i>Solución 0,1 N de tiosulfato de sodio.</i>					
5. PROCEDIMIENTO					
5.1 La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra.					
5.2 Homogeneizar la muestra cuidadosamente, diluyéndola hasta cinco veces su volumen con agua destilada.					
5.3 Tomar, mediante una pipeta, 10 cm ³ de la solución de muestra y colocar en el matraz para destilación.					



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

NTE INEN 379

1978-05

5.4 Colocar, en el tubo colector de destilados, 20 cm³ de la solución 0,01667 N de bicromato de potasio y 10 cm³ de ácido sulfúrico.

5.5 Inmediatamente proceder a destilar el contenido del matraz, hasta que el volumen se reduzca aproximadamente a la mitad, recogiendo en el tubo colector.

5.6 Transferir el contenido del tubo colector a un matraz Erlenmeyer de 500 cm³ y diluir hasta 250 cm³ con agua destilada.

5.7 Añadir 10 cm³ de la solución al 5% de yoduro de potasio y titular cuidadosamente con la solución 0,1 N de tiosulfato de sodio, hasta que el color verde- amarillento se transforme en verde azulado .

6. CÁLCULOS

6.1 El contenido de alcohol etílico en conservas vegetales se determina mediante la ecuación siguiente:

$$A = 0,0072 (20-V)$$

Siendo:

A = contenido de alcohol etílico, en porcentaje de volumen.

V = volumen de solución 0,1 N tiosulfato de sodio utilizado en la titulación, en cm³.

7. ERRORES DE MÉTODO

7.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder del 0,5%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación.

8.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

8.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.