

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*)

Trabajo de Titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera Química

Autores:

Maritza Dayanna Parapi Plaza
C.I: 0105368542
Correo electrónico: dayannaparapi@gmail.com

Ariana Angelica Pintado Garate
C.I: 0107130189
Correo electrónico: arianapintadog@gmail.com

Director:

Mgt. Jorge Washington Delgado Noboa
C.I: 0103599411

Cuenca, Ecuador

15 de julio de 2022

RESUMEN

Con el desarrollo de energías renovables se ha considerado a los desechos agroindustriales como fuente rica en celulosa para usarla como materia prima, para así obtener biocombustibles de segunda generación como alternativa para reducir el consumo de combustibles derivados del petróleo. Este trabajo tiene como objetivo la obtención de bioetanol utilizando vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*). Primero se caracterizó a las vainas de fréjol donde la principal composición química fue de 36,47% celulosa, 28,25% hemicelulosa, 6,69% lignina, humedad 6,66% y cenizas 6,86%. Para la obtención de bioetanol se realizó un acondicionamiento de la muestra mediante un proceso de secado, molienda y tamizado, la cual es sometida a un pretratamiento alcalino de 121 °C, durante 60 min y 0.5% hidróxido de sodio, posterior se realizó la hidrólisis ácida para lograr la conversión de la celulosa a azúcares simples. Mediante el empleo de un diseño factorial completo con dos niveles y tres variables y con el programa Minitab 19 se generó una matriz estándar donde se evaluó el efecto del tiempo, temperatura y concentración del ácido sulfúrico sobre la variable respuesta. En esta etapa de descomposición a azúcares totales los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones de 120 °C, durante 60 min y 3% de ácido sulfúrico dando como resultado 29,836 g/L de azúcares totales. El líquido hidrolizado se sometió a un proceso fermentativo (6 h, 35 °C, pH 3.5 y 150 rpm) en un biorreactor de tanque agitado, simultáneamente se determinó la concentración de etanol mediante el método de Winnick, la mayor concentración de etanol que se obtuvo fue de 7 g/L, los datos obtenidos se ajustaron al modelo cinético de Gompertz modificado de manera satisfactoria con un coeficiente de determinación alto $R^2 > 0,98$. Finalmente, el líquido obtenido después del proceso de fermentación se destiló y se obtuvo 7,89 g/L de etanol.

Palabras claves: Vainas de fréjol. Azúcares totales. Fermentación. Modelo de Gompertz Modificado.

ABSTRACT

With the development of renewable energies, agro-industrial waste has been considered as a rich source of cellulose to be used as raw material, in order to obtain second-generation biofuels as an alternative to reduce the consumption of petroleum-derived fuels. This work aims to obtain bioethanol using bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.). First, bean pods were characterized where the main chemical composition was 36.47% cellulose, 28,25% hemicellulose, 6.69% lignin, moisture 6,66%, and ash 6,86%. To obtain bioethanol, a conditioning of the sample was carried out through a process of drying, grinding and sieving, which is subjected to an alkaline pretreatment of 121 °C, for 60 min and 0,5% sodium hydroxide, then hydrolysis was performed. acid to achieve the conversion of cellulose to simple sugars. By using a complete factorial design with two levels and three variables and with the Minitab 19 program, a standard matrix was generated where the effect of time, temperature and concentration of sulfuric acid on the response variable was evaluated. In this stage of decomposition to total sugars, the best results were obtained with the conditions of 120 °C, for 60 min and 3% sulfuric acid, resulting in 29,836 g/L of total sugars. The hydrolyzed liquid was subjected to a fermentation process (6 h, 35 °C, pH 3,5 and 150 rpm) in a stirred tank bioreactor, simultaneously the ethanol concentration was determined by the Winnick method, the highest concentration of ethanol that was obtained was 7 g/L, the data obtained fitted the modified Gompertz kinetic model satisfactorily with a high coefficient of determination $R^2 > 0.98$. Finally, the liquid obtained after separating the yeast was distilled to obtain 7,89 g/L of ethanol. **Keywords:** Bean pods, total sugars, fermentation, modified Gompertz model.

Keywords: Bean pods. Total sugars. Fermentation. Modified Gompertz Model.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ECUACIONES	9
DEDICATORIA	14
AGRADECIMIENTOS	15
INTRODUCCIÓN	17
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
CAPÍTULO I: CONTENIDO TEÓRICO.....	21
1.1. Fréjol.....	21
1.1.1. Fréjol en Ecuador.....	21
1.1.2. Características y propiedades del fréjol	22
1.1.3. Principal caracterización química de las vainas de fréjol	22
1.1.4. Disponibilidad de materia prima.....	23
1.2. Biomasa	23
1.2.1. Tipos de Biomasa.....	24
1.2.2. Biomasa lignocelulósica	24
1.3. Bioenergía.....	25
1.3.1. Tipos de bioenergía.....	25
1.4. Bioetanol.....	26
1.4.1. Bioetanol de primera generación	27
1.4.2. Bioetanol de segunda generación	27
1.4.3. Bioetanol de tercera generación.....	27
1.4.4. Usos del bioetanol.....	27
1.5. Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación a partir de desechos agrícolas mediante hidrólisis acida proceso general.....	28

1.6. Pretratamiento.....	29
1.6.1. Pretratamiento físico.....	29
1.6.2. Pretratamiento químico.....	30
1.7. Hidrólisis.....	30
1.7.1. Hidrólisis Ácida.....	31
1.7.2. Hidrólisis Alcalina.....	32
1.7.3. Hidrólisis Enzimática.....	32
1.8. Fermentación con levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	33
1.9. Destilación simple.....	34
CAPITULO II: METODOLOGÍA.....	35
2.1. RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA.....	35
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VAINAS DE FRÉJOL.....	35
2.2.1. Acondicionamiento de la materia prima.....	35
2.2.2. Determinación de la Humedad.....	35
2.2.3. Determinación de las Cenizas.....	36
2.2.4. Determinación de Extractos.....	36
2.2.5. Determinación de la Lignina Klason.....	37
2.2.6. Determinación de Celulosa.....	38
2.2.7. Determinación de la Holocelulosa.....	39
2.2.8. Determinación de la Hemicelulosa.....	40
2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	40
2.3.1. Pretratamiento Alcalino.....	40
2.3.2. Diseño factorial 2^k	41
2.3.3. Determinación de Azúcares Totales.....	43
2.4. FERMENTACIÓN.....	44
2.4.1. Activación de la levadura.....	44
2.4.2. Determinación del contenido de alcohol.....	45
2.4.3. Método del Picnómetro.....	46
2.5. MODELO CINÉTICO.....	47
2.6. DESTILACIÓN SIMPLE.....	48
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1. Caracterización de las vainas de fréjol.....	49

3.2. Hidrólisis Ácida	50
3.2.1. Curva de calibración de glucosa	50
3.2.2. Matriz de diseño factorial 2^3 -Variable respuesta	51
3.2.3. Rendimiento de azúcares totales	52
3.2.4. Análisis de varianza	53
3.2.5. Análisis de gráficas	54
3.3. Fermentación	59
3.3.1. Medición de Grados Brix.....	59
3.3.2. Determinación de la concentración de etanol	61
3.3.3. Rendimiento del Etanol	63
3.3.3. Método del picnómetro.....	64
3.3.4. Modelo Cinético ecuación de Gompertz Modificado	66
3.3.5. Análisis y comparación.....	67
3.4. Destilación del etanol.....	68
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
4.1 CONCLUSIONES	70
4.2 RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de fréjol. Fuente: (Noticia & Relacionadas, 2022).....	21
Figura 2. Fréjol Canario (Jazmín & Chitalogro, 2016).....	22
Figura 3. Vainas de fréjol secas. Fuente: Autores	23
Figura 4. Clasificación de la Biomasa. Adaptado de: (Alberto & Morales, 2009).....	24
Figura 5. Tipos de Bioetanol. Adaptado de: (Escobedo & Calderón, 2021)	26
Figura 6. Proceso de producción de bioetanol de segunda generación mediante hidrólisis ácida. Adaptado de: (Conesa, 2017)	28
Figura 7. Esquema de pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Fuente: (Hosseini Koupaie et al., 2019).....	29
Figura 8. Reacciones producidas por la degradación de los componentes de la biomasa en condiciones ácidas. Adaptado de: (Cheng & Brewer, 2021).	31
Figura 9. Curva de calibración para la medición de azúcares totales	50
Figura 10. Gráfica de efectos normales estandarizados	55
Figura 11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.....	56
Figura 12. Gráfica de efectos principales para azúcares totales	57
Figura 13. Gráfica de interacción.....	58
Figura 14. Gráfica de cubo para los efectos.....	59
Figura 15. Curva de grados Brix del promedio de los ensayos	60
Figura 16. Curva de la concentración de etanol (g/L) promedio durante la fermentación .	62
Figura 17. Curva de producción de etanol y ajuste de la ecuación de Gompertz modificado a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua.	67
Figura 18. Correlación entre la concentración de etanol calculada por el modelo Gompertz modificado y los datos experimentales	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química principal de las vainas de fréjol. Adaptado de: (Villa Gómez et al., 2020).....	23
Tabla 2.	Factores y niveles de cada variable	42
Tabla 3.	Factores y niveles centrales	43
Tabla 4.	Combinación de factores de acuerdo al diseño factorial 2^3	43
Tabla 5.	Composición de la principal estructura química de las vainas de fréjol	49
Tabla 6.	Azúcares totales obtenidos en base al diseño factorial.....	51
Tabla 7.	Rendimiento de los azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis ácida..	52
Tabla 8.	Análisis de varianza de la variable respuesta	53
Tabla 9.	Resultados de los grados Brix de los ensayos y su promedio	60
Tabla 10.	Volumen consumido de tiosulfato de sodio durante la titulación	61
Tabla 11.	Volumen consumido de tiosulfato de sodio del blanco.....	61
Tabla 12.	Resultados obtenidos de etanol (g/L)	62
Tabla 13.	Rendimiento de etanol.....	64
Tabla 14.	Peso del picnómetro más muestra.	65
Tabla 15.	Densidad de Alcohol	65
Tabla 16.	Concentración de Alcohol Gay Lussac	66
Tabla 17.	Datos de la concentración de etanol experimentales y calculados en el programa Matlab. 66	
Tabla 18.	Datos obtenidos de la destilación simple.....	68
Tabla 19.	Rendimiento de azúcares totales	81
Tabla 20.	Concentración de etanol y gravedad específica.....	82
Tabla 21.	Cálculo de Concentración Teórica	83

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1.</i>	Ecuación de Gay-Lussac	33
<i>Ecuación 2.</i>	Representación del balance energético	33
<i>Ecuación 3.</i>	Porcentaje de Humedad.....	36
<i>Ecuación 4.</i>	Porcentaje de Cenizas	36
<i>Ecuación 5.</i>	Porcentaje de Extractos	37
<i>Ecuación 6.</i>	Porcentaje de Lignina.....	38
<i>Ecuación 7.</i>	Porcentaje de Celulosa	39
<i>Ecuación 8.</i>	Porcentaje de Holocelulosa	40
<i>Ecuación 9.</i>	Porcentaje de Hemicelulosa	40
<i>Ecuación 10.</i>	Concentración de Etanol	46
<i>Ecuación 11.</i>	Densidad Alcohol.....	47
<i>Ecuación 12.</i>	Ecuación de Gompertz	47
<i>Ecuación 13.</i>	Winnick.....	61
<i>Ecuación 14.</i>	Ecuación del Rendimiento	63
<i>Ecuación 15.</i>	Densidad Alcohol.....	65
<i>Ecuación 16.</i>	Porcentaje de rendimiento de azúcares totales.....	81

Cláusula de Propiedad Intelectual

Maritza Dayanna Parapi Plaza, autora del trabajo de titulación "Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de julio de 2022



Maritza Dayanna Parapi Plaza

C.I: 0105368542

Cláusula de Propiedad Intelectual

Ariana Angelica Pintado Garate, autora del trabajo de titulación “Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de julio de 2022



Ariana Angelica Pintado Garate

C.I: 0107130189

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Maritza Dayanna Parapi Plaza en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 15 de julio de 2022



Maritza Dayanna Parapi Plaza

C.I: 0105368542

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Ariana Angelica Pintado Garate en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 15 de julio de 2022



Ariana Angelica Pintado Garate

C.I: 0107130189

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mi mamá, Sra. María del Carmen Plaza y mi hermano Ing. Juan Parapi por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me permitió ser una persona de bien.

Con cariño para mi papá, Sr. Fernando Parapi por brindarme su amor, sus consejos, y su apoyo económico incondicional a lo largo de mi trayectoria porque ha sido un sustento para poder culminar mi carrera profesional.

A mis primos, mis tías y a Lenin, quienes me han apoyado en todo momento.

Maritza Dayanna Parapi Plaza

DEDICATORIA

Este logro dedicó a mis padres, a mi padre por siempre brindarme su apoyo en la vida, en el transcurso de mi carrera y mi trabajo final de carrera, por sus consejos, su paciencia, su cariño y su esfuerzo constante para ayudarme a culminar mis estudios y enseñarme que con trabajo y dedicación se logran las metas.

A mi madre Diana Garate por todo su amor, por ser mi confidente, mi amiga, mi consejera que esta para mí en los buenos y malos momentos, una luchadora incansable que a pesar de las adversidades de la vida siempre tiene una sonrisa y amor para brindar, que nunca perdió su FE en mí, aunque yo la perdiera, siempre creyó en mis capacidades, me enseñó que la esperanza es lo último que se pierde.

A mi hermano Ismael por su apoyo en mi vida y mi carrera por su ayuda y enseñanzas que me brindo en las tareas difíciles, por ser una inspiración para culminar las metas que me propongo.

Ariana Angelica Pintado Garate

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien me ha guiado y me ha dado la fortaleza para seguir adelante en el transcurso de la vida.

A mis padres por sus consejos y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mi hermano por su cariño y su comprensión que me ha brindado para continuar y lograr mis objetivos.

A mi tutor, Ingeniero Jorge Delgado, por su dedicación y apoyo al culminar el proyecto de tesis.

A los técnicos de los respectivos laboratorios, Ing. Verónica Saetama, Ing. Jaime Cuenca y Dr. Felipe por su colaboración en el desarrollo del proyecto de tesis.

Maritza Dayanna Parapi Plaza

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y soñar sé que me puso en este camino de esfuerzo, paciencia, voluntad, esperanza y logro.

A mis padres por su apoyo incondicional amor que me brindan día a día a mí y mi hermano mayor.

A mi hermano por sus consejos y su fuerza para continuar y lograr mis metas.

A la Universidad de Cuenca por proporcionarme los equipos y materiales para culminar mis estudios.

A mi tutor, el Ingeniero Jorge Delgado por brindarme su apoyo, conocimientos, tiempo y dedicación para culminar el proyecto de titulación.

A los técnicos de laboratorio a la Ingeniera Verónica Saetama y al Ingeniero Jaime Cuenca por su disponibilidad y ayudarme a culminar mi trabajo de titulación.

A mis amigas que tuve la oportunidad de conocer durante mis años de estudio en la carrera universitaria a Dayanna, Natasha y Elizabeth por compartir tantos momentos juntas un gran equipo

Ariana Angelica Pintado Garate

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se realiza investigaciones que han estado orientadas fundamentalmente hacia el aprovechamiento de residuos agroindustriales, para la generación de nuevas alternativas industriales como son los biocombustibles, ya que permite reducir la generación de gases contaminantes (Alonso-Gómez & Arturo Bello-Pérez, 2018).

Los mayores causantes del calentamiento global son: el CO₂, el uso de combustibles fósiles y la producción de cemento, son una fuente de gases de efecto invernadero, con una contribución cercano al 68 % en el mundo (Escobedo & Calderón, 2021). Actualmente existe la necesidad de disminuir el uso de recursos naturales no renovables (aquellos recursos naturales que no se pueden cultivar, producir, reutilizar por medios naturales) como los minerales y el petróleo por aquellos de origen renovables (se puede utilizar una y otra vez) plantas y animales (Andrade-Castañeda et al., 2017).

En el Ecuador se genera una gran cantidad de residuos orgánicos que proviene del sector agrícola por ejemplo cascarilla de arroz, cáscara de coco, maíz, bagazo de caña, vaina de trigo, vaina de fréjol y otros, los cuales pueden ser aprovechados para obtener biocombustibles, por lo que en la investigación se realiza las vainas de frejol por la facilidad de adquisición en la región (Ávila Jiménez, 2015).

En la producción de biocombustibles se ha prestado atención a los biocombustibles líquidos que son biodiésel y bioetanol de primera, segunda y tercera generación, se realiza una serie de procesos de pretratamientos a la muestra a estudiar, los cuales pueden ser: físicos, químicos, o biológicos (Sun et al., 2016) con el fin de romper la capa de lignina que protege la celulosa y hemicelulosa para que sea más accesible realizar la hidrólisis ácida en las vainas de fréjol, posteriormente se realiza un proceso fermentativo a la muestra considerando ciertos factores importantes como: la concentración de azúcares del sustrato y la levadura que se emplee (Lucia et al., 2017).

El objetivo general de este estudio es obtener bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol por hidrólisis ácida diluida, se tomará en cuenta algunos métodos de caracterización como: humedad, cenizas, extractos, lignina Klason, celulosa, holocelulosa y hemicelulosa. En la hidrólisis ácida se realiza el diseño factorial 2^k , bajo diferentes condiciones de operación: temperatura, concentración del ácido y el tiempo, luego realizar la fermentación y modelar la producción de bioetanol con las condiciones óptimas de operación, usando el modelo de Gompertz Modificado.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Con el incremento de la demanda de combustibles, se ha visto la necesidad de desarrollar nuevos estudios para obtener biocombustibles a partir de residuos agroindustriales, la mayoría de esta biomasa es proveniente de la cascarilla de arroz, paja de maíz, bagazo de caña de azúcar, cascará de coco, paja de soya y otros, aproximadamente existe 2,927,702 toneladas de residuos en los países en desarrollo (Ullah et al., 2015).

Los biocombustibles han cobrado una enorme importancia como los aditivos en la gasolina para disminuir la contaminación por la quema de combustibles fósiles, adicionalmente elevan el nivel de octanaje en la gasolina y permite sustituir al 2-Methoxy-2-methylpropane (MTBE) que es un aditivo altamente contaminante (Siliceo Rodríguez, 2014). Los desechos de la industria agrícola son materias con alto contenido de celulosa que se utiliza para la producción de biocombustibles de segunda generación (Gómez & Pérez, 2018).

La importancia de este proyecto consiste en conocer la utilidad de realizar el estudio de la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol que dará un valor agregado a esta materia prima, ya que durante años no ha sido utilizada, además que esta biomasa es de bajo costo y no afecta a la alimentación de la población. En el país la producción anual en grano seco y tierno de fréjol es de 17,717 ton y 17,677 ton respectivamente (SIPA, 2021). Las vainas de fréjol no se utilizan para ningún otro proceso industrial solo para el alimento para ganado de los propios productores y en el caso del

consumo de fréjol en mercados, restaurantes y domicilios son desechados. El consumo de las vainas de fréjol por parte del ganado supone un desperdicio de más de la mitad de los carbohidratos utilizables por lo cual aprovechar esta materia prima en la elaboración de bioetanol supone un mejor uso de este, pues al ser un material que contiene celulosa va a proporcionar azúcares simples como glucosa para obtener el etanol (González Rentería et al., 2011).

Los procesos para la obtención de bioetanol requieren de equipos menos costosos en comparación con los equipos utilizados en la producción petrolera, la producción de bioetanol mejorará el nivel económico del país generando empleos, ahorrando divisas que pueden destinarse a diversos proyectos económicos y menos contaminación del medio ambiente, por lo que en Ecuador la posibilidad de producir bioetanol es bien vista por el sector público y privado (Navas & Guerrero, 2014).

Uno de los enfoques de esta investigación es probar que se puede obtener bioetanol de las vainas de fréjol de manera eficiente por lo cual se requiere de tres etapas importantes los pretratamientos, la hidrólisis y la fermentación. La hidrólisis ácida con ácido sulfúrico diluido nos permite despolimerizar los polisacáridos de la celulosa obteniendo azúcares simples que en la etapa de la fermentación son convertidos en etanol por la acción de microorganismos. Para incrementar la capacidad hidrolítica, es importante realizar pretratamientos uno físico y otro alcalino previo a la hidrólisis para conocer cuál es la forma óptima de obtener azúcares fermentables y así dar ese valor agregado a esta materia prima.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Obtener bioetanol de segunda generación a partir de vainas de fréjol tratada por hidrólisis ácida a escala laboratorio.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Determinar humedad, cenizas, extractos solubles, celulosa, hemicelulosa y lignina de las vainas de fréjol.
- Obtener azúcares fermentables por hidrólisis ácida a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico (3% y 5%).
- Realizar la fermentación con levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y determinar la concentración de etanol durante el proceso.
- Modelar la producción de etanol a partir de vainas de fréjol durante la fermentación usando el modelo cinético de Gompertz Modificado.

CAPÍTULO I: CONTENIDO TEÓRICO

1.1. Fréjol

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris L.*) botánicamente pertenece a la familia Leguminosae (Fabaceae) es una planta que puede presentar cuatro hábitos de crecimiento, pero los más relevantes son el tipo I determinado arbustivo y el tipo IV indeterminado trepador (FAO, 2018).



Figura 1. Variedades de fréjol. Fuente: (Noticia & Relacionadas, 2022)

1.1.1. Fréjol en Ecuador

El fréjol en Ecuador se desarrolla en climas templados, bajo condiciones ecológicas muy variables, además es sensible a la humedad ambiental (Peralta et al., 2009). El umbral térmico (temperatura base) de la especie es de 10 °C como temperatura mínima y 25 °C como temperatura máxima. El fréjol canario es de gran importancia para los habitantes, es un gran generador de empleo entre las familias, principalmente campesinas de la zona debido a que generalmente toda la familia se dedica a dicha actividad (Peralta et al., 2009). El fréjol con vaina pesa 0,9g y sin vaina pesa 0,5g.



Figura 2. Fréjol Canario (Jazmín & Chitalogro, 2016).

1.1.2. Características y propiedades del fréjol

El fréjol es una leguminosa que dispone aproximadamente un 22% de proteína por lo que es básico en la alimentación humana, siendo un producto económico en el mercado comparando con otros productos que contienen proteína como es la carne, además contiene calorías, vitaminas del complejo B y minerales (Fernández & Sánchez, 2017). También mejora los suelos debido a las bacterias nitrificantes que adhieren a la raíz. Es rico en componentes bioactivos (influyen en actividades celulares y fisiológicas) como inhibidores de enzimas, lecitinas, etc., y dentro de sus actividades biológicas está la capacidad antioxidante, la reducción de colesterol y lipoproteínas por lo que es un gran protector contra las enfermedades cardiovasculares y cáncer (Fernández & Sánchez, 2017).

1.1.3. Principal caracterización química de las vainas de fréjol

Existe una gran variedad de tipos de fréjol que se clasifican, por su origen, color, tamaño e incluso por su forma, por lo cual varía la composición, en la tabla 1 se especifica un resumen de la composición química de la estructura principal de las vainas de fréjol.

Tabla 1. Composición química principal de las vainas de fréjol. Adaptado de: (Villa Gómez et al., 2020).

Componente	Vainas de fréjol (residuo seco %)
Cenizas (%)	6,80
Celulosa (%)	31,13
Hemicelulosa (%)	23,92
Lignina (%)	9,70

1.1.4. Disponibilidad de materia prima

En Ecuador, existe una gran variedad de tipos de fréjol entre las variedades de fréjol más cultivadas son: el fréjol canario (conocido como poroto bola), fréjol cargabello y el fréjol panamito blanco (Pucuji, 2016). Por lo general la siembra de estas variedades de fréjol se realiza entre los meses de septiembre y noviembre y se cosecha en mayo y junio. El promedio de la superficie de cosecha de fréjol seco es de 29,539 ha y de fréjol tierno es de 9,123 ha, por lo que en el país la producción anual en grano seco y tierno es de 17,717 ton y 17,677 ton respectivamente (SIPA, 2021).



Figura 3. Vainas de fréjol secas. Fuente: Autores

1.2. Biomasa

La biomasa se define como la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos procedentes de actividades agrarias, los cuales se aprovechan su potencial energético (Rovere Herrera, 2019). La energía que reúne la biomasa tiene su origen en el sol a partir del proceso

de la fotosíntesis, las plantas absorben energía lumínica (sol), agua (suelo) y el CO₂ (atmósfera), almacenando en ellas sustancias orgánicas y liberando oxígeno durante el proceso (Herguedas et al., 2012).

1.2.1. Tipos de Biomasa

Existen numerosos tipos de biomasa que depende del origen y de la naturaleza, pero los más aceptadas se describe en la figura 4.

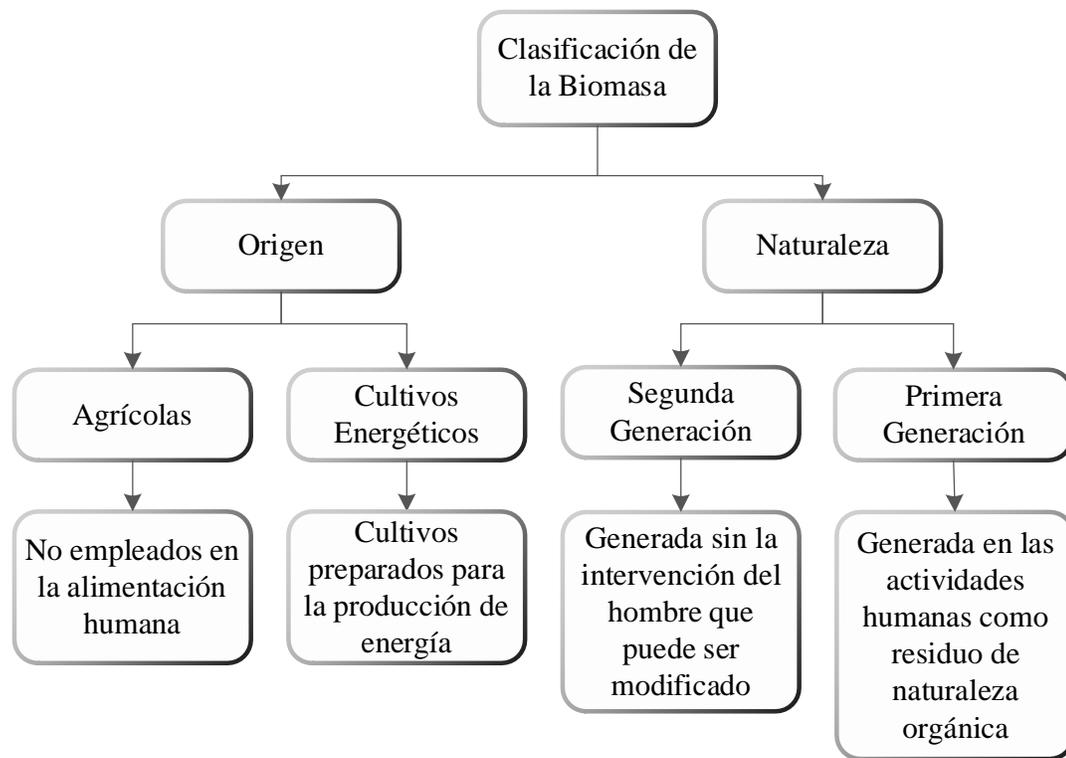


Figura 4. Clasificación de la Biomasa. Adaptado de: (Alberto & Morales, 2009)

1.2.2. Biomasa lignocelulósica

La materia que se usa como biomasa lignocelulósica básicamente son los desechos cuyos lugares de origen son múltiples como los desechos urbanos, los desechos agrícolas o los de tratamientos de lodos. La materia lignocelulósica posee tres principales compuestos: celulosa

(38 – 50%), hemicelulosa (23-32%) y lignina (15-25%). La celulosa es un polisacárido de los compuestos más abundantes de la naturaleza, realiza funciones estructurales en la pared celular de las células vegetales. Es un polímero lineal de unidades β -(1-4)-D-glucopiranosas empaquetados por largas cadenas unidos por puentes de hidrógeno. La hemicelulosa es un hetero polímero ramificado que contiene azúcares como las hexosas, pentosas y ácidos urónicos. Se encuentra unidos a la lignina por enlaces covalentes. La lignina es un polímero de cadenas de fenilpropano. Es resistente a la degradación bacteriana, concede rigidez a la pared celular y reduce la digestibilidad de los polisacáridos fibrosos (Rastogi & Shrivastava, 2017).

1.3. Bioenergía

El uso de la bioenergía está creciendo en muchas partes del mundo a medida que los países buscan la diversificación de sus fuentes energéticas a modo de promover el desarrollo económico y la calidad del medio ambiente. Se define como la energía que se obtiene de la biomasa, la biomasa es el material orgánico que más ha sido utilizado como combustible, originada cuando la luz procedente del sol es absorbida por las plantas mediante el proceso de la fotosíntesis (Branzini, 2011).

La bioenergía sustentable ofrece nuevas oportunidades a la agricultura fomenta la propagación de vegetación, permite un equilibrio entre el desarrollo urbano y rural (Samperio & Martínez, 2010).

1.3.1. Tipos de bioenergía

La bioenergía puede aportar de manera importante a sustituir las fuentes de energía, (fósil y nuclear), y da lugar a los siguientes energéticos útiles para los seres humanos, los cuales se obtienen sometiendo a la biomasa a procesos de transformación que son desarrollados por el ser humano (Sampeiro & Martínez, 2010):

- **Biocombustibles:** Según la FAO “Es aquel combustible que se produce directamente o indirectamente a partir de biomasa”, es decir son todos los alcoholes, esterres, éteres y otros productos químicos generados por materiales conformados por celulosa liberada de las plantas utilizados mayormente por el sector de transportes (Bioetanol) (Alvarado Ludeña Galo Reynel, 2021).
- **Biocarburantes:** Aceites vegetales puros, residuos de aceite de cocina convertidos en biodiésel los cuales se emplean en motores Diesel.
- **Biogás:** Es el producto de la fermentación de residuos orgánicos de bosques, campos agrícolas y de desechos de animales de crianza. Se obtiene a partir de la basura en rellenos sanitarios el metano extraído, se emplea para producir energía termina, mecánica o eléctrica (Sampeiro & Martínez, 2010).

1.4. Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible que se obtienen de materia rica en azúcares fermentables. El etanol se usa por lo general como aditivo para la gasolina permitiendo minimizar el impacto al ambiente por el uso de combustibles completamente fósiles. Los países como Brasil y EE.UU. son considerados los mayores productores de bioetanol en el mundo. La biomasa disponible en el mundo es de costo bajo y de fácil adquisición. La materia que se usa para la obtención de este aditivo son azúcares, almidones y materia de celulosa (Saini et al., 2015).

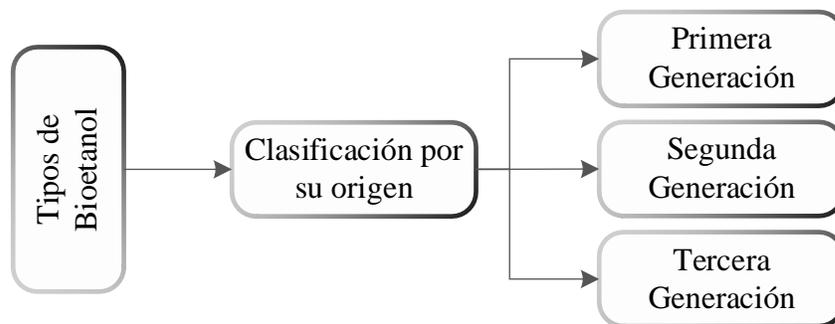


Figura 5. Tipos de Bioetanol. Adaptado de: (Escobedo & Calderón, 2021)

1.4.1. Bioetanol de primera generación

El bioetanol de primera generación se obtiene de biomasa rica en azúcares como la caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha y la melaza. Esta materia no requiere pretratamiento solo se somete a fermentación con levaduras glucolíticas, aunque los almidones como los de la yuca, papa, granos y cereales se debe realizar un proceso previo a la fermentación de hidrólisis enzimática con enzimas α -amilasas (Saini et al., 2015).

1.4.2. Bioetanol de segunda generación

El bioetanol de segunda generación se puede obtener de residuos agroindustriales con alto contenido de celulosa como los que están presentes en la madera, residuos agroindustriales como el bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz, astillas, paja. Esta biomasa contiene principalmente celulosa. Para poder obtener etanol se debe someter a procesos de pretratamiento para romper las cadenas lignocelulósicas para que la celulosa este libre para estar en contacto con los ácidos o las enzimas hidrolíticas y obtener azúcares. La biomasa lignocelulósica tiene una ventaja que es de fácil adquisición y alta disposición (Tye et al., 2016).

1.4.3. Bioetanol de tercera generación

Este biocombustible se obtiene a partir de microorganismos como levaduras, hongos que contiene alto valor energético y son de crecimiento rápido. Las algas (verdes) son la base de la investigación de este biocombustible debido a su alto contenido de lípidos las cuales son sometidas a procesos de extracción de aceites para luego producir biocombustibles (González & Kafarov, 2009).

1.4.4. Usos del bioetanol

La biomasa lignocelulósica es una materia prima óptima para la producción de bioetanol el cual es uno de los principales sustitutos de los combustibles fósiles pues posee un elevado número de octanaje y bajo punto de ebullición. Este biocombustible se usa en motores de combustión interna de encendido de chispa ya sea 100% puro o mezclado con gasolina (aditivo), otro de los usos es para la producción de ethyl tert-butyl ether (ETBE). También se produce energía del etanol en calderas de bioetanol basadas en un proceso similar de las calderas de combustibles fósiles (Ferraz, 2020).

1.5. Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación a partir de desechos agrícolas mediante hidrólisis acida proceso general

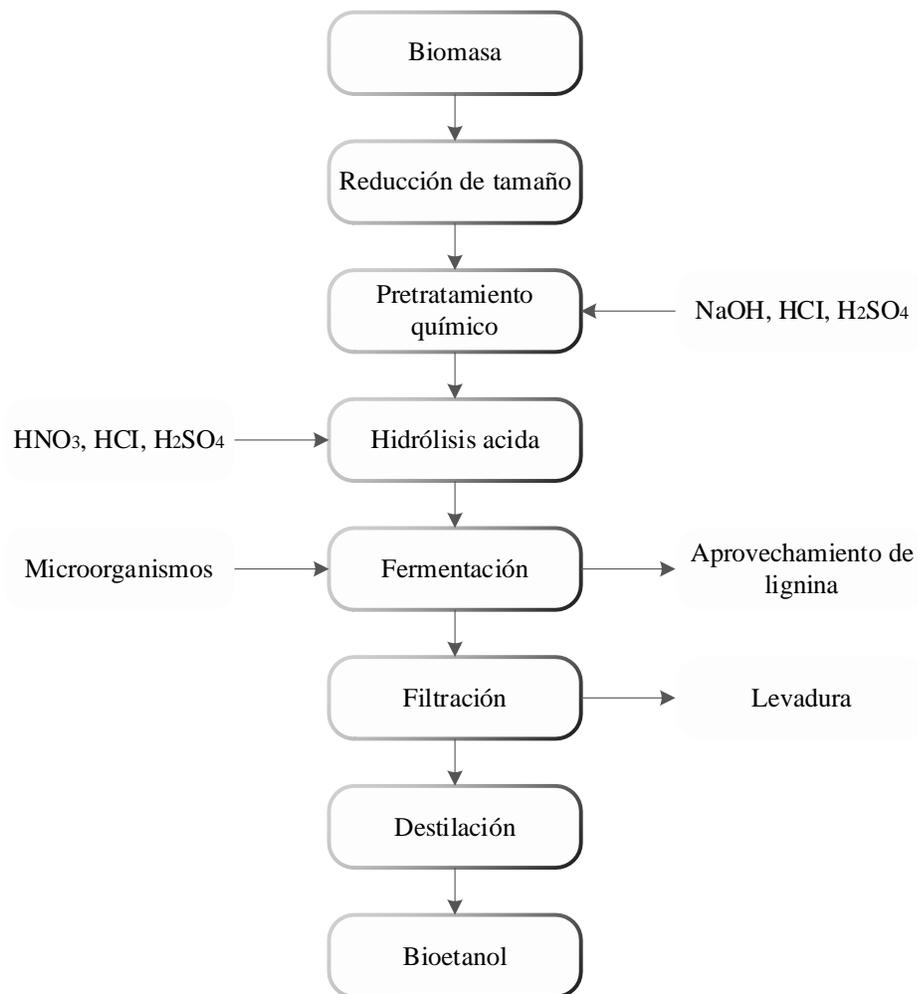


Figura 6. Proceso de producción de bioetanol de segunda generación mediante hidrólisis ácida. Adaptado de: (Conesa, 2017)

1.6. Pretratamiento

El material lignocelulósico se somete a pretratamientos para mejorar el ingreso del ácido o de las enzimas en el proceso de hidrólisis e incrementar la obtención bioetanol y la cantidad de azúcares fermentables (Salvachúa, 2013). Los objetivos de los pretratamientos son: reducir el grado de cristalinidad (Aditiya et al., 2016), evitar la formación de productos inhibidores (por ejemplo, el furfural y el Hidroximetilfurfural (HMF)) en las siguientes etapas de producción (Rastogi & Shrivastava, 2017). Los pretratamientos que se pueden realizar son físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Por lo general son costosos lo que incrementa el costo final del producto obtenido.

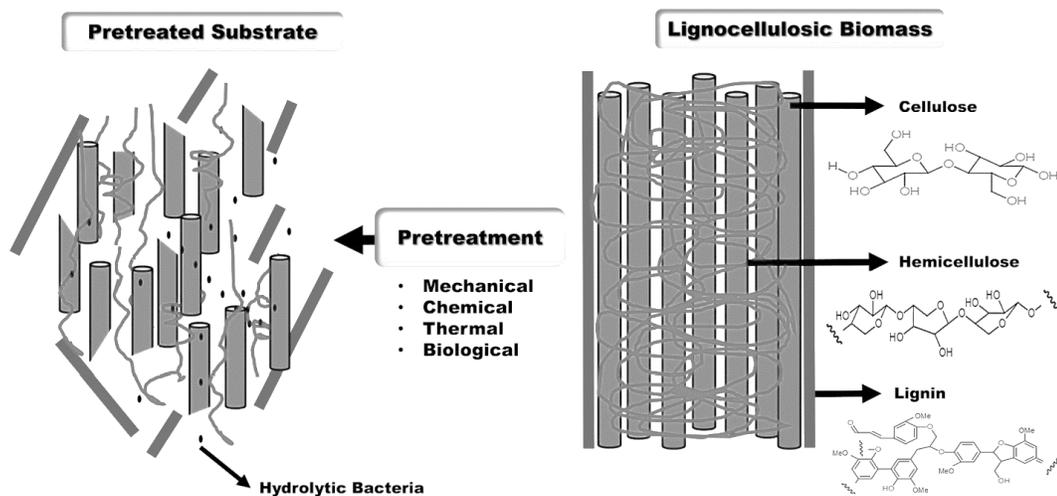


Figura 7. Esquema de pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Fuente: (Hosseini Koupaie et al., 2019)

1.6.1. Pretratamiento físico

El pretratamiento físico consiste en reducir el tamaño de la partícula y la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial del material (Sun et al., 2016). La molienda, el fresado son los procesos físicos más utilizados para obtener materiales de diferentes tamaños (Saini et al., 2015). La reducción óptima del material está entre 5 mm a 2 mm (Bahry et al., 2017). Antes del proceso de reducción primero se seca el material para evitar que se forme una pasta en la molienda de la biomasa. Estos procesos incrementan el consumo de energía desfavoreciendo la producción de bioetanol.

1.6.2. Pretratamiento químico

El pretratamiento químico se basa en tratamiento en el uso de ácidos o con álcalis, siendo este el más usado. Lo que se requiere de estos pretratamientos es eliminar la lignina y la hemicelulosa para liberar a la celulosa para que sea atacado por las enzimas hidrolíticas y los ácidos y obtener azúcares fermentables. El problema que presenta el tratamiento ácido es que puede degradar a la celulosa por las elevadas concentraciones de los ácidos usados. Al final de estos procesos se debe realizar un lavado para eliminar los residuos de los reactivos (Sun et al., 2016).

1.6.2.1. Pretratamiento alcalino

Durante el pretratamiento alcalino se da un aumento del área superficial interna de biomasa lignocelulósica, a concentraciones alcalinas altas se da una hidrólisis que degrada y descompone el polisacárido (Loja Sánchez, 2016). La efectividad del pretratamiento depende del contenido de lignina de la muestra a tratar (Sánchez Arbeláez, 2018).

1.7. Hidrólisis

La conversión de los polímeros de carbohidratos en la materia lignocelulósica a azúcares simples se da mediante un proceso denominado hidrólisis que consiste en la adición de una molécula de agua. Esta reacción es catalizada por ácido diluido, ácido concentrado o enzimas celulasas (Aditiya et al., 2016).

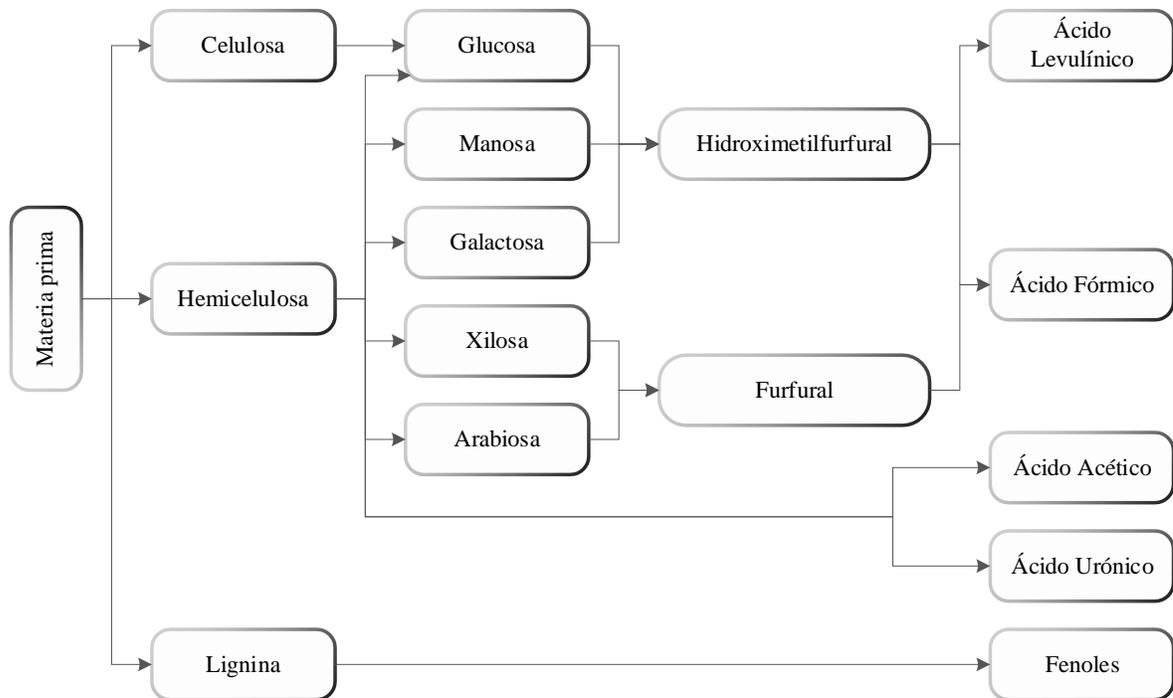


Figura 8. Reacciones producidas por la degradación de los componentes de la biomasa en condiciones ácidas. Adaptado de: (Cheng & Brewer, 2021).

1.7.1. Hidrólisis Ácida

En la primera fase de la hidrólisis ácida se rompe la pared celular de la biomasa e hidroliza la hemicelulosa, en la segunda fase netamente denominada hidrólisis se polimeriza los polisacáridos de la celulosa, finalmente los azúcares liberados pueden ser usados fácilmente en la fermentación.

Se puede trabajar con diferentes ácidos (clorhídrico, nítrico, fluorhídrico y sulfúrico), así como ácidos orgánicos (cítrico y acético) y operar bajo dos condiciones: A) ácido concentrado, temperatura baja, tiempo de reacción largo. B) ácido diluido, temperatura alta, tiempo de reacción bajo. Las reacciones son complejas en la hidrólisis, para la celulosa los principales productos en medio ácidos son: celobiosa y glucosa, mientras que para la hemicelulosa el producto es la xilosa (Loja Sánchez, 2016).

1.7.2. Hidrólisis Alcalina

La hidrólisis alcalina utiliza reactivos con el hidróxido de sodio, el amoníaco, hidróxido de potasio y la cal los cuales son los más utilizados. Este procedimiento permite la solubilización de la lignina, la hinchazón de la celulosa y la hidrólisis de la hemicelulosa. La hinchazón provoca un aumento del área superficial interna lo que permite que la cristalinidad de la celulosa disminuya. Los tratamientos con reactivos alcalinos requieren de menores temperaturas que los tratamientos con ácidos, pero los tiempos son más prolongados (Cauch, 2016).

1.7.3. Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática convierte la celulosa en glucosa y a la hemicelulosa en pentosas y hexosas mediante el uso de enzimas denominadas celulasas y hemicelulasas. Existen tres grupos principales de celulasas que intervienen en la hidrólisis de la celulosa: endoglucanasas, exoglucanasas (celobiohidrolasas) y β -glucosidasas.

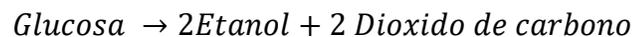
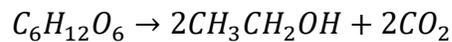
La endoglucanasa rompe los enlaces no covalentes presentes en la celulosa amorfa (Melendez et al., 2022), mientras que la exoglucanasa actúa sobre el extremo libre de la cadena de celulosa liberando monómeros de glucosa, celobiosa y algunos oligosacáridos. La β -glucosidasa hidroliza los disacáridos en glucosa. (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009). Las celulasas son producidas a partir de varios microorganismos como hongos (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus fumigatus*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*) o de bacterias (*Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*) (Siva et al., 2022).

Las hidrólisis ácidas y alcalinas son más contaminantes que este proceso, pero la desventaja es que las enzimas son costosas y el tiempo de hidrólisis es prolongado en comparación con otros métodos (Saini et al., 2015). Existen algunos factores que afectan al proceso de sacarificación aquellos que están relacionados con las enzimas como la carga enzimática y la temperatura y aquellos que se relacionan con la concentración de los sustratos para que las enzimas ingresen a la celulosa (Sun et al., 2016).

1.8. Fermentación con levadura *Saccharomyces Cerevisiae*

El proceso de fermentación alcohólica se da principalmente por levaduras del tipo *Saccharomyces Cerevisiae*, este tipo de levaduras prefiere a la glucosa como sustrato, obteniendo etanol, dióxido de carbono y otros subproductos como ácido acético. La conversión se representa mediante la ecuación de Gay-Lussac (Mora, 2014).

Ecuación 1. Ecuación de Gay-Lussac



Balance energético de la fermentación se puede representar de la siguiente forma (Mora, 2014).

Ecuación 2. Representación del balance energético



La desventaja de usar estas levaduras es que no poseen afinidad por otros azúcares como la xilosa provocando un déficit en la obtención de etanol (Salvachúa, 2013). El rendimiento teórico a partir de azúcares fermentables como la glucosa, fructuosa, es aproximadamente de 0.51kg de etanol y 0.49 kg de dióxido de carbono. Para la óptima fermentación se debe considerar algunos factores, los azúcares obtenidos en la hidrólisis debe ser menor al 25% m/v pues la levadura se estresa debido a la falta de agua, este tipo de levadura no soporta un contenido de etanol mayor al 15% m/v con un porcentaje mayor muere. La temperatura óptima para fermentar es de 25 °C, un pH menor a 3.5 la levadura no puede realizar un correcto metabolismo. Además, es importante adicionar nutrientes en bases nitrogenadas para mejorar la fermentación (Aditiya et al., 2016).

1.9. Destilación simple

La destilación es el proceso de separación de una mezcla líquida por vaporización parcial. Se basa en aplicar calor donde el componente más liviano se concentra en el destilado. Al eliminar el agua presente en el etanol, se obtiene un producto de mayor pureza. Se destila por diferencia de temperaturas donde el etanol se evapora a 78.2 °C este se condensa y se obtiene etanol como un grado alcohólico mayor al que está presente en el producto después de la fermentación. Otro proceso que se realiza es la destilación de membrana, destilación azeotrópica, deshidratación química, la destilación por adsorción para mejorar costos (Segovia-Hernandez, 2018).

CAPITULO II: METODOLOGÍA

2.1. RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA

La recolección de las vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) se realizó en las parroquias Nulti, Deleg y el Valle después de la cosecha del maíz, fréjol y habas en el mes de junio, después se escogió el fréjol canario conocido como “poroto bola”, sin presencia de descomposición, posteriormente se desgrano para obtener solo las vainas de fréjol que se encuentran en estado seco, la cantidad materia prima recolectada fue de 2 Kg.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VAINAS DE FRÉJOL

2.2.1. Acondicionamiento de la materia prima

La muestra se secó y molió para obtener mayor superficie específica e incrementar el ataque del ácido sobre la materia lignocelulósica. Para lo cual se requirió secar la muestra en una estufa a 60 °C por 3 horas, y luego se realizó una molienda y tamizado por la malla 60 ASTM (para obtener un tamaño de partícula de 0.250 mm).

2.2.2. Determinación de la Humedad

La humedad de la muestra ya acondicionada se determinó el método Gravimétrico por diferencias de pesos.

Procedimiento:

Se pesó 3 g de muestra previamente acondicionada, en una cápsula de porcelana, la cual se colocó en la estufa (Memmert) durante 24 horas a una temperatura de 105°C, una vez transcurrido este tiempo se extrae la muestra de la estufa y se deja enfriar en el desecador, posteriormente se pesa en una balanza analítica (Sartorius) y se calcula la humedad utilizando la Ecuación 3. Este ensayo se efectuó por duplicado.

Ecuación 3. Porcentaje de Humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Muestra húmeda} - \text{Muestra seca}}{\text{Muestra húmeda}} * 100$$

2.2.3. Determinación de las Cenizas

Mediante el procedimiento NREL/TP-510-42622 se procedió a determinar las cenizas de esta materia lignocelulósica.

Procedimiento:

Previo al proceso se secó el crisol de porcelana en la mufla a 500 °C durante 5 horas, finalizado el tiempo se dejó enfriar el crisol en el desecador y se determinó el peso. Luego en una balanza analítica (Sartorius) se pesó 1 g de muestra ya acondicionada, en una capsula de porcelana, para evitar que los humos afecten a la mufla en una placa calefactora (Presto) se colocó el crisol con muestra a máxima potencia hasta que la muestra se carbonizó por completo y no hubo presencia de humo. A continuación, se colocó en la mufla la muestra carbonizada a 575 °C por 24 horas. Tras finalizar el tiempo se enfrió el crisol en el desecador y se pesó. Finalmente se determinó las cenizas mediante la Ecuación 4. El ensayo se efectuó por duplicado.

Ecuación 4. Porcentaje de Cenizas

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso cenizas}}{\text{Peso muestra original}} * 100$$

2.2.4. Determinación de Extractos

Es importante que la muestra se encuentre libre de extractos para determinar la celulosa, lignina y hemicelulosa para evitar interferencias. El método que se aplicó para la determinación de extractos en biomasa se enfocó en el procedimiento NREL/TP-510-42619.

Procedimiento:

Previo a la determinación de extractos se secó y pesó la cápsula de porcelana vacía. En una balanza analítica (Mettler Toledo) se pesó 4,25 g de muestra en papel filtro para formar un cartucho y se colocó en el equipo Soxhlet. En una probeta se midió 110 ml de agua destilada y se colocó en el matraz de fondo plano cuello esmerilado de 250 ml, este a su vez se colocó en el extractor de Soxhlet. Se encendió la placa calefactora y desde la ebullición se esperó 4 sifonamientos. Después de los 4 sifonamientos se desechó el agua del matraz y se midió 110 ml de alcohol absoluto al 99% se colocó en el matraz y se realizó 4 sifonamientos más, en total fueron 8 sifonamientos. Cuando el color del extracto ya desapareció se colocó la muestra libre de extractos en la cápsula y se lavó la muestra con agua destilada hasta pH neutro. Cuando la muestra llegó al pH deseado se secó en una estufa (Mettler) a 105 °C hasta obtener peso constante. Finalmente se determinó el porcentaje de extractos solubles con la Ecuación 5. El ensayo se realizó por duplicado en total son cuatro muestras.

Ecuación 5. Porcentaje de Extractos

$$\%Extractos = \frac{\text{Peso muestra original (g)} - \text{Peso muestra sin extracto (g)}}{\text{Peso muestra original (g)}} * 100$$

2.2.5. Determinación de la Lignina Klason

El método que se usó para determinar la lignina Klason estuvo basado en la norma TAPPI 222 om-88 el cual consistió en realizar dos hidrólisis una con ácido sulfúrico al 72% y la otra con ácido sulfúrico al 4%.

Procedimiento:

Se pesó 1 g de muestra libre de extractos. Luego en un vaso de precipitación se añadió la muestra más 15 ml de H₂SO₄ al 72% manteniendo en agitación y en baño María a 20 °C, aproximadamente 2 horas hasta que se observó la muestra oscura. Después se trasvasó el contenido del vaso de precipitación a un matraz de fondo plano cuello esmerilado de 500 ml y se añadió 560 ml de agua destilada caliente para obtener H₂SO₄ al 4%. A continuación, se armó el refrigerante y se llevó a ebullición la muestra durante 4 horas (reflujo). Pasado este tiempo se decantó la muestra para facilitar la filtración. Luego se filtró y se lavó el residuo sólido con agua destilada caliente. Posteriormente se secó la muestra en una estufa (Memmert) a 105 °C hasta obtener peso constante. Finalmente se determinó el contenido de lignina aplicando la Ecuación 6. El procedimiento se realizó por triplicado.

Ecuación 6. Porcentaje de Lignina

$$\%Lignina = \frac{\text{Peso residuo seco (g)}}{\text{Peso muestra original libre extracto (g)}} * 100$$

2.2.6. Determinación de Celulosa

El método para determinar la celulosa se basó en el procedimiento de Kurschner & Hoffer con la muestra libre de extractos se realizó dos digestiones una con etanol y otra con ácido nítrico concentrado, después se saturó la muestra con acetato de sodio y agua destilada.

Procedimiento:

Se pesó 1 g de muestra libre de extractos y se colocó en un matraz fondo plano de 250 ml, al matraz se añadió 20 ml de etanol al 99% y 5 ml de ácido nítrico concentrado. Luego se armó el refrigerante y se dejó hervir en baño María por 30 minutos a reflujo. Finalizado ese tiempo se filtró la solución. El residuo sólido se sometió a una segunda digestión con 20 ml de etanol al 99% y 5ml de ácido nítrico concentrado, durante 30 minutos a reflujo. Después se filtró la solución y el residuo sólido se sometió a una tercera digestión con 100 ml de agua destilada

durante 1 hora. Pasado este tiempo se filtró la solución y se lavó, primero con agua destilada caliente, luego con 100 ml de solución saturada de acetato de sodio y finalmente con 500 ml más de agua destilada caliente. Posteriormente se secó el residuo en una estufa a 105 °C hasta peso constante. Finalmente se determinó el porcentaje de celulosa aplicando la Ecuación 7. El ensayo se realizó por duplicado.

Ecuación 7. Porcentaje de Celulosa

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Peso seco residuo (g)}}{\text{Peso muestra original libre extracto (g)}} * 100$$

2.2.7. Determinación de la Holocelulosa

La holocelulosa es una fracción de carbohidrato insoluble en agua compuesta por la suma de celulosa y hemicelulosa (Gao et al., 2022). Los métodos para determinar la hemicelulosa son muy complejos por lo cual es recomendable determinar la holocelulosa, este procedimiento se lo realizó por el método de Wise el cual consistió en someter a la muestra libre de extractos a una disolución de clorito de sodio y ácido acético en un baño de agua. La determinación de la hemicelulosa se realizó por la diferencia entre la holocelulosa y la celulosa.

Procedimiento:

Se pesó 2 g de muestra libre de extractos y se colocó en un Erlenmeyer de 500 ml, se añadió 160 ml de agua destilada, 1g de clorito de sodio y 0,2 ml de ácido acético glacial, en un baño maría entre (70 - 80) °C por una hora. Nuevamente se añadió 1 g de clorito de sodio y 0,2 ml de ácido acético glacial, manteniendo la temperatura indicada. Esta acción se realizó por lo menos tres veces durante mínimo tres horas, hasta que la muestra se tornó blanca. Luego se debe esperar una hora tras la última adición y enfriar en un baño de hielo. Posteriormente se filtró y lavó el residuo sólido con 500 ml de agua destilada fría y se colocó la muestra en una cápsula de porcelana previo peso conocido y se secó en la estufa a 105 °C durante 8 horas,

hasta peso constante. Finalmente se determinó la holocelulosa mediante la Ecuación 8. Se realizó el ensayo por duplicado.

Ecuación 8. Porcentaje de Holocelulosa

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{Peso del residuo seco (g)}}{\text{Peso muestra original libre de extractos (g)}} * 100$$

2.2.8. Determinación de la Hemicelulosa

Al obtener el valor de la celulosa y la holocelulosa se puede determinar la hemicelulosa al realizar la diferencia entre la holocelulosa y la celulosa.

Ecuación 9. Porcentaje de Hemicelulosa

$$\% \text{HEMICELULOSA} = \% \text{HOLOCELULOSA} - \% \text{CELULOSA}$$

2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA

2.3.1. Pretratamiento Alcalino

Los pretratamientos alcalinos son efectivos para la solubilización de la lignina eximiendo una menor solubilización de celulosa y hemicelulosa. Por lo que el proceso que se desarrolló es el descrito por M. Gonzales (2011).

Procedimiento:

Se mezcló 10 g de vainas de fréjol con 100 ml de hidróxido de sodio al 0.5% después se calentó la muestra a temperatura de 121°C, durante 60 minutos, se enfrió a temperatura ambiente. Se lavó la muestra hasta que el pH del agua de lavado se aproximó a la neutralidad.

Se secó en la estufa (Memmert) a 70 °C durante 24 horas. Finalmente se almacenó a temperatura ambiente en frascos de vidrios cerrados herméticamente.

2.3.2. Diseño factorial 2^k

2.3.2.1. Hidrólisis ácida con ácido sulfúrico diluido

Para la obtención de azúcares simples se realizó la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa para liberar la glucosa y otros azúcares.

Procedimiento:

El proceso para la hidrólisis se realizó en una autoclave (All-american) en el cual se colocaron frascos autoclavables de 250 ml sellados con las diferentes muestras. Luego de la hidrólisis se separó la parte sólida de la parte líquida con una centrifugadora (Centrifuge 80-3). Se recomienda pasar por el papel filtro para eliminar cualquier residuo. Se realizó cada experimento por triplicado.

2.3.2.2. Diseño factorial 2^k

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en los procesos de producción basada en herramientas matemáticas y estadísticas, lo cual servirá para evaluar la producción de azúcares totales, el objetivo es filtrar las variables del proceso para saber cuál de ellas produce una variación significativa en la respuesta lo que permitirá seleccionar la mejor opción para maximizar la producción de azúcares totales.

El diseño factorial, se evalúan 3 factores que son: Temperatura, Tiempo y Concentración A, B y C respectivamente, que estarán a dos niveles cada uno, lo que implicaría 8 combinaciones que son representadas en un cubo. La notación de los signos + (positivo) y – (negativo) representa los niveles de los factores alto y bajo.

Variables Controladas

Como variables controladas se tomó en cuenta la Temperatura: Es importante ya que el incremento de la temperatura del medio de reacción para una determinada concentración permite un mayor rendimiento en la hidrólisis. Tiempo: En este proceso es muy importante el tiempo, ya que si se tiene tiempos largos puede conducir a la degradación y si se tiene tiempos muy cortos no es suficiente para hidrolizar todos los polisacáridos y por último la concentración de ácido: Aquí se analiza la concentración de ácido sulfúrico debido a que los rendimientos van a depender de la concentración, el ácido concentrado da mayor rendimiento que el ácido diluido.

Variable Dependiente

Concentración de azúcares totales: es la variable repuesta a medir que depende de la composición de las vainas de fréjol y de la combinación de las variables controladas.

Los niveles elegidos para cada factor, se apoyó en revisiones bibliográficas basadas en hidrólisis ácida, como, por ejemplo: Cortez-acosta et al. (2008) en la investigación que realizan para Obtención de azúcares fermentables por hidrólisis ácida de la paja de frijol utilizaron tres soluciones acuosas de H_2SO_4 (1, 3 y 5.0% en peso), tres niveles de temperatura (90° , 105° y $120^\circ C$) y cinco tiempos (5, 10, 20, 40 y 80 min). Loja Sánchez, (2016) en su investigación con los residuos de cascarilla de arroz utilizó una temperatura $100^\circ C$ - $150^\circ C$, durante un tiempo de 10min-15min y a una concentración de 1,5%-2%.

Tabla 2. Factores y niveles de cada variable

Factor	Bajo	Alto
Temperatura ($^\circ C$)	105	120
Tiempo (minutos)	30	60
Concentración del ácido sulfúrico (%p/p)	3	5
Respuesta (g/L)	Azúcares totales	Azúcares totales

Tabla 3. Factores y niveles centrales

Factor	Centrales
Temperatura (°C)	112.5
Tiempo (minutos)	45
Concentración del ácido sulfúrico (%p/p)	4
Respuesta (g/L)	Azúcares totales

Combinación de factores 2³

Tabla 4. Combinación de factores de acuerdo al diseño factorial 2³

Muestras	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de ácido (%)
1	105	30	3
2	120	30	3
3	105	60	3
4	120	60	3
5	105	30	5
6	120	30	5
7	105	60	5
8	120	60	5
9	105	30	3
10	120	30	3
11	105	60	3
12	120	60	3
13	105	30	5
14	120	30	5
15	105	60	5
16	120	60	5
17*	112.5	45	4
18*	112.5	45	4

* Valores centrales

2.3.3. Determinación de azúcares totales

Para conocer la cantidad de azúcares totales presentes en la muestra obtenida en la hidrólisis ácida se realizó un ensayo colorimétrico por el método de Du Bois conocido también como

método de fenol - ácido sulfúrico. El fenol en presencia de ácido sulfúrico se puede usar para la determinación colorimétrica cuantitativa de azúcares y sus derivados metflicos. El método es simple, rápido y significativo y da resultados reproducibles (Dubois et al., 1956).

Procedimiento:

En una cámara de extracción de humos se preparó una solución de fenol al 5 % (p/v). Posteriormente se preparó la disolución patrón con glucosa (1 µg/ml). Luego se determinó la curva patrón con los respectivos estándares en el espectrofotómetro UV-visible (Jenway). En cada tubo de ensayo se colocó 2 ml de cada muestra de los hidrolizados, 1 ml de fenol al 5% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado al 94%. Se deja reposar las muestras durante 10 minutos y se agitan los tubos de ensayo por 30 segundos. Luego se colocan los tubos de ensayo en baño maría con hielo por 20 minutos. Finalizado el tiempo de baño maría se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Se realizó el ensayo por triplicado

2.4. FERMENTACIÓN

La fermentación alcohólica con *Saccharomyces Cerevisiae* es de vital importancia, puesto que existen varias condiciones de trabajo que afectarían el desempeño de la transformación de azúcares a etanol, que es el producto deseado, actúa en un medio anaerobio, se realizó la activación de la levadura y la fermentación.

2.4.1. Activación de la levadura

Para la activación de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, se midió en un vaso 25 ml de agua destilada luego se pesó en una balanza analítica 7 g de levadura y se calentó el vaso que contiene el agua destilada hasta que la temperatura llegue a 40°C se le adicionó la levadura y se mezcla y se dejó reposar durante 20 min.

Procedimiento:

La fermentación se desarrolló en un biorreactor de fermentación marca (Biotrón Smart GX), se realizó 3 ensayos, donde se fermentó 2.5L de cada muestra dejando libre un volumen de 1 L los cuales se utilizó para la adición de ácido HCl y base NaOH para la regulación de pH. El proceso de la fermentación se realizó con los siguientes parámetros: temperatura de 35 °C a 150 rpm, tiempo de 6 horas, con la adición de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* 7 g y por último el pH (3.5) el mismo que debe ser controlado con ácido clorhídrico (HCl) 1N o base hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

2.4.2. Determinación del contenido de alcohol

Durante y después del proceso fermentativo se requiere determinar el contenido de etanol para lo cual se realizó mediante el método de Winnick que está basado en la micro difusión de Conway.

Procedimiento:

Para la determinación se tomó una muestra de 7 ml del sustrato que se encuentra fermentando en tubos vacutainer de plástico, luego esta muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min terminada la centrifugación se tomó el líquido sobrenadante que sirvió para hacer la dilución respectiva, luego se colocó 2 ml de la muestra previamente diluida en el compartimiento A de la caja bipetri y se midió 2 ml de carbonato de potasio K_2CO_3 (20%) y se colocó en el compartimiento A de la caja bipetri, con agitación suave mezclar los reactivos. También se midió 1 ml de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (0.4 N) preparado en ácido sulfúrico H_2SO_4 (10N) y se colocó en el compartimiento B de la caja bipetri y se cerró la caja bipetri herméticamente, utilizando cinta aislante, se colocó las cajas bipetri en el secador a una temperatura de 50°C o 125°F durante al menos 2 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se procede a retirar el cierre hermético de las cajas bipetri para destaparlas, se colocó 1 ml de yoduro de potasio KI (3N) y 3 gotas de indicador de almidón en la cámara B de la caja bipetri y se mezcló bien los reactivos en la cámara B de la

caja bipetri luego se valoró la solución con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1N) con agitación constante hasta que se dé el viraje de color a azul, se registró el volumen de tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido. El ensayo se realizó por duplicado para corroborar los resultados

Nota: Cuando hayan transcurrido 2 horas en el desecador si el color de la cámara B de la caja bipetri es azul se debe descartar dicha muestra y luego tomar otra muestra y realizar una dilución más. Si el reactivo presenta un color verde, verde amarillento u ocre se procede a titular la muestra.

Ecuación 10. Concentración de Etanol

$$Etanol = \frac{N * (Vb - Vm)}{VM} * 11.51$$

Donde:

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

V_b : Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación del blanco (ml)

V_m : Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación de la muestra problema (ml)

V_M : Volumen de muestra utilizada en la experimentación (2ml)

2.4.3 Método del Picnómetro

El picnómetro es utilizado para determinar con precisión la densidad de líquidos su característica fundamental es la de mantener un volumen fijo al ser colocado diferentes líquidos en su interior (Alberto Arenas, 2011).

Procedimiento:

Se peso el picnómetro vacío en la balanza analítica luego se pesó el picnómetro con agua destilada y a continuación el picnómetro con la muestra. Finalmente se determinó mediante la Ecuación 11. El ensayo se realizó por duplicado.

Ecuación 11. Densidad Alcohol

$$\rho_{muestra} = \frac{p_{(p+m)} - p_{(pv)}}{p_{(p+a)} - p_{(pv)}} * \rho_{H_2O}$$

Donde:

$p_{(p+m)}$ = Peso del picnómetro + muestra.

$p_{(p+a)}$ = Peso del picnómetro + H₂O destilada.

$p_{(pv)}$ = Peso del picnómetro vacío.

ρ_{H_2O} = Densidad del agua destilada.

2.5. MODELO CINÉTICO

La ecuación de Gompertz Modificado se ha utilizado para los estudios de producción de etanol. Este modelo se aplicó para predecir la formación del producto por lo que presenta la velocidad máxima de producción del producto ($r_{p.m}$), la máxima concentración de etanol (P_{max}) y el periodo de retraso (t_L).

Ecuación 12. Ecuación de Gompertz

$$P = P_{max} \cdot \exp \left[- \exp \left(\frac{r_{p.m} \cdot \exp(1)}{P_{max}} \right) (t_L - t) + 1 \right]$$

El objetivo fue comparar los datos experimentales obtenidos durante la fermentación con el modelo y ver la semejanza de los resultados en la producción del etanol para lo cual se utilizó el método de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt en el programa MATLAB.

2.6. DESTILACIÓN SIMPLE

La columna de destilación permite separar, por evaporación, el etanol del cultivo de fermentación. Este proceso se realiza por la diferencia de puntos de ebullición que posee el agua y el etanol. La mezcla se calienta hasta 78.2 °C para lograr evaporar el etanol, luego se condensa y se obtiene un producto de mayor pureza con menor presencia de agua.

Procedimiento:

Para la destilación, se armó el equipo de destilación que consta en hornilla, matraz, refrigerante, balón, soportes metálicos y las pinzas, se procedió a colocar la muestra en el Balón de destilación y con ayuda del termómetro se verificó la temperatura de 78.4°C.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las vainas de fréjol

Los resultados obtenidos de los métodos expuestos en el capítulo anterior para determinar la composición química de las vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la principal estructura química de las vainas de fréjol

Componente	% Peso
Humedad	6,667
Cenizas	6,862
Extractos Solubles	22,562
Lignina Klason	6,698
Celulosa	36,472
Holocelulosa	64, 725
Hemicelulosa	28,253

La celulosa y la hemicelulosa son los principales sustratos para la producción de bioetanol, la glucosa que es principal azúcar para la fermentación se obtiene de la celulosa (Equihua Sanchez, 2013). El porcentaje de celulosa es el predominante con 36,472% seguida por la hemicelulosa 28,253%, lo que indica que existe una importante fuente de carbono para obtener el etanol. La humedad obtenida es relativamente baja 6,667% en comparación con la paja de trigo (8,4%), vaina de arveja (7,3 %) y bagazo de maíz (9,7%) (Sevilla, 2015), la materia prima usada son vainas de fréjol en estado seco lo cual justifica este valor, en cuanto a los demás resultados se observa que, el porcentaje de lignina es bajo 6,698% por lo que habrá menor resistencia del material a la hidrólisis ácida (Tiburcio León, 2019). Con lo que respecta a los extractos solubles se obtiene una cantidad considerable 22,562%. Por último, las cenizas con 6,862% representan la parte que no se va a hidrolizar.

Autores como Gonzáles Rentería et al. (2011) en la caracterización de cuatro variedades de vainas de fréjol reportaron valores de celulosa 30,64%, de hemicelulosa 23,14% y lignina 9,35%. Mientras que Villa Gómez et al. (2020) en la caracterización del fréjol negro conocido

como “Negro San Luis” obtuvieron valores de 31,13% de celulosa, 23,92% de hemicelulosa y 9,70% lignina. Okot et al. (2019) obtuvo valores de una mezcla de varios tipos de paja de fréjol de 21,4% de celulosa, 21,4% de hemicelulosa, 10,2% de lignina y 6,8% de cenizas, en comparación con los valores obtenidos en esta investigación difiere con los valores reportados por los autores mencionados anteriormente, pues el análisis se realizó en un tipo específico de fréjol mientras que en bibliografía los análisis fueron realizados de mezclas de varios tipos de fréjol y otra variedad fréjol.

3.2. Hidrólisis Ácida

3.2.1. Curva de calibración de glucosa

En la figura 9 se muestra la curva de calibración de azúcares totales, con los datos obtenidos del método colorimétrico fenol – ácido sulfúrico. Se representa la absorbancia en (nm) frente a la concentración de azúcar en g/L. Se utilizó glucosa como estándar.

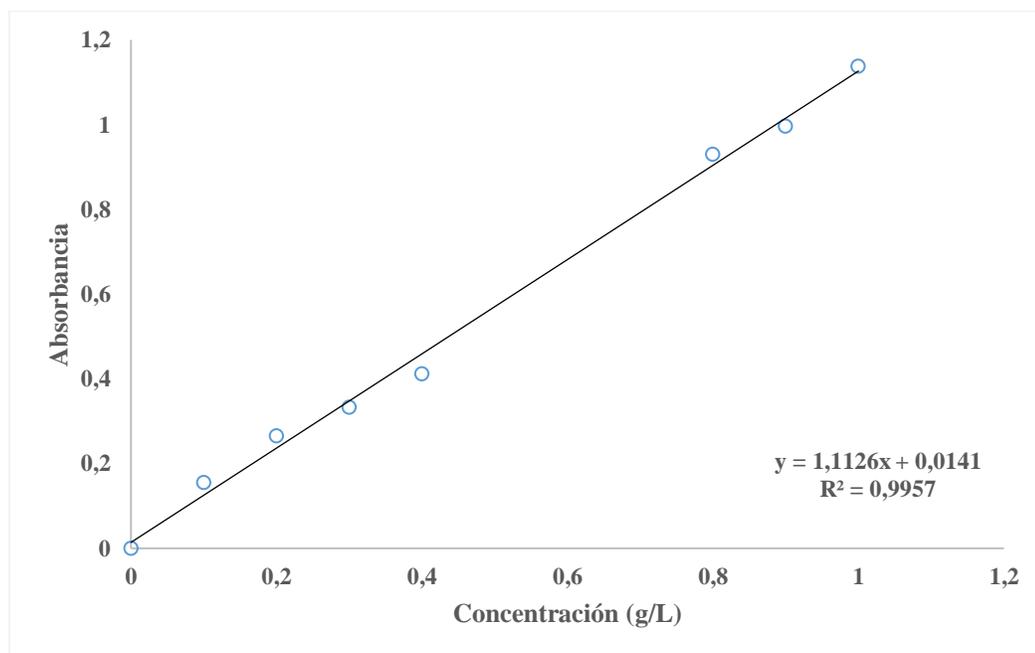


Figura 9. Curva de calibración para la medición de azúcares totales

Se obtuvo un coeficiente de correlación alto $R^2 = 0,995$, en la curva patrón realizada se toman las absorbancias obtenidas a la longitud de onda de 490 nm de las diferentes muestras y se remplace en la ecuación de la curva para determinar la concentración de azúcares totales en la muestra.

3.2.2. Matriz de diseño factorial 2^3 -Variable respuesta

La matriz estándar se representa en la Tabla 6 con los resultados obtenidos de las diferentes combinaciones de los tres factores, ocho corridas experimentales, con una réplica y dos puntos centrales.

Tabla 6. Azúcares totales obtenidos en base al diseño factorial

Orden estándar	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de H ₂ SO ₄ (%)	Azúcares Totales (g/L)
1	105	30	3	5,972
2	120	30	3	28,038
3	105	60	3	16,533
4	120	60	3	29,836
5	105	30	5	10,736
6	120	30	5	20,039
7	105	60	5	21,342
8	120	60	5	27,139
9	105	30	3	5,029
10	120	30	3	27,454
11	105	60	3	16,713
12	120	60	3	29,656
13	105	30	5	7,815
14	120	30	5	26,330
15	105	60	5	22,600
16	120	60	5	26,240
17*	112,5	45	4	18,316
18*	112,5	45	4	19,859

* Valores centrales: 17* 18*

Balat, (2011) indica que para recuperar azúcares de seis carbonos los sólidos se someten a temperaturas más altas pero las concentraciones del ácido son más suaves Es por eso que la mayor concentración de azúcares totales se obtuvo en las condiciones de temperatura 120 °C, durante 60 min y una concentración de ácido 3%, por lo tanto, el proceso

fermentativo se realizó con el líquido hidrolizado con la mejor combinación de los tres factores tiempo, temperatura, concentración de ácido sulfúrico.

3.2.3. Rendimiento de azúcares totales

El rendimiento de la concentración de azúcares totales se calcula a partir de la materia hemicelulósica que posee la materia prima los resultados obtenidos de la cuantificación se presentan en la Tabla 7 (Anexo 1).

Tabla 7. Rendimiento de los azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis ácida

Muestra	Rendimiento (%)
1	11,11
2	52,13
3	30,74
4	55,48
5	19,96
6	37,26
7	39,68
8	50,46
9	9,35
10	51,05
11	31,08
12	55,14
13	14,53
14	48,96
15	42,02
16	48,79
17	34,06
18	36,93

El máximo rendimiento obtenido es de 55,48% lo que demuestra una baja conversión de celulosa a azúcares simples en la hidrólisis ácida, aunque se realizó un pretratamiento alcalino no se logra un alto rendimiento. Gonzáles Rentería et al. (2011) obtuvo una sacarificación del 98,95%, pero para lograr este resultado en la hidrólisis trabajaron con un cóctel de enzimas celulasas, además en el pretratamiento que realizan fue a una temperatura de 121 °C mientras que la temperatura alcanzada en este trabajo fue de 110 °C. Sin embargo

Cortez-Acosta et al. (2008) reporta un máximo de conversión de azúcares reductores de 23% lo cual explica que por cada gramo de paja de fréjol se obtiene 0.23 g de azúcares reductores dato que es muy cercano a los datos obtenidos en esta investigación que es de 0.27 g de azúcares totales por gramo de vaina de fréjol.

3.2.4. Análisis de varianza

El análisis de la varianza (ANOVA) se presenta en la Tabla 8 donde se muestra todos los efectos. Si el valor-p es menor al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$) se rechaza la hipótesis nula y se considera que el efecto es significativo o influye en la variable respuesta. Se trabajó con un nivel de confianza de 95%.

Tabla 8. Análisis de varianza de la variable respuesta

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	1102,49	137,811	45,79	0,000
Lineal	3	944,42	314,806	104,60	0,000
Temperatura (°C)	1	728,89	728,892	242,18	0,000
Tiempo (min)	1	214,96	214,960	71,42	0,000
Concentración (%)	1	0,57	0,566	0,19	0,675
Interacciones de 2 términos	3	156,28	52,092	17,31	0,000
Temperatura*Tiempo	1	83,84	83,841	27,86	0,001
Temperatura*Concentración	1	70,07	70,065	23,28	0,001
Tiempo*Concentración	1	2,37	2,369	0,79	0,398
Interacciones de 3 términos	1	0,00	0,001	0,00	0,985
Temperatura*Tiempo*Concentración	1	0,00	0,001	0,00	0,985
Curvatura	1	1,79	1,794	0,60	0,460
Error	9	27,09	3,010		
Total	17	1129,58			

La temperatura y el tiempo son factores que tienen un efecto significativo en la variable respuesta por lo cual se rechaza la hipótesis nula. Las interacciones dobles AB y AC también rechazan las hipótesis nulas y afectaron a la obtención de azúcares totales. La temperatura es el factor más significativo que influye en la variable respuesta, tanto solo como en las interacciones. La combinación de los tres factores en sus niveles altos (120 °C, 60 min, 5%

H₂SO₄) generó 27,139 g/L de azúcares lo que demuestra que no es conveniente incrementar el valor de la concentración de ácido, debido a que los azúcares tienden a degradarse a altas concentraciones de ácido y tiempos prolongados, provocando la formación de inhibidores (por ejemplo, furfural, ácido levulínico, fenol y otros) (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Autores como Montoya-Rosales et al. (2020) emplearon HCl al 2% v/v a la paja de fréjol de la variedad de fréjol conocido como “Negro San Luis” donde obtuvieron 14,58 g/L de azúcares totales este valor es inferior al de esta investigación donde se utilizó ácido sulfúrico y vainas de fréjol de la variedad de fréjol canario. Selvakumar et al. (2022) emplearon una concentración de H₂SO₄ al 3% y obtuvieron 55,4 mg/ml de glucosa a partir de la mazorca de maíz. Mientras que Casa (2018) obtuvo 18,7968 g/L de glucosa a partir de caña de maíz ocupando una concentración de H₂SO₄ al 1%. Además, en una investigación realizada por Bacca & Revelo (2020) utilizaron HCl al 2% y obtuvieron 13,33 g/L de azúcares reductores a partir de almidón de papa, por lo que en la tabla ANOVA se demuestra que la concentración de ácido sulfúrico no es significativa debido a que en su nivel alto en vez de incrementar la variable respuesta disminuye su contenido, pero esto no significa que este factor no es importante solo que al aumentar su valor no afecta a la obtención de azúcares.

Para este modelo el coeficiente de determinación obtenido es de $R^2 = 97,60\%$ y $R^2_{ajus} = 95,47\%$. Estos coeficientes miden el porcentaje de variabilidad en los datos experimentales. Si se disminuye los errores experimentales o se elimina los efectos no significativos el valor de R^2 se eleva.

3.2.5. Análisis de gráficas

Para una mejor comprensión del análisis de varianza se representa de forma gráfica las diferentes interacciones entre los efectos de los factores y sus interacciones obtenidas con la herramienta Minitab 19.

3.2.5.1. Gráfica de efectos normales estandarizados

En la Figura 10 se presenta los efectos y las interacciones en las cuales la hipótesis nula fue rechazada en el análisis de varianza.

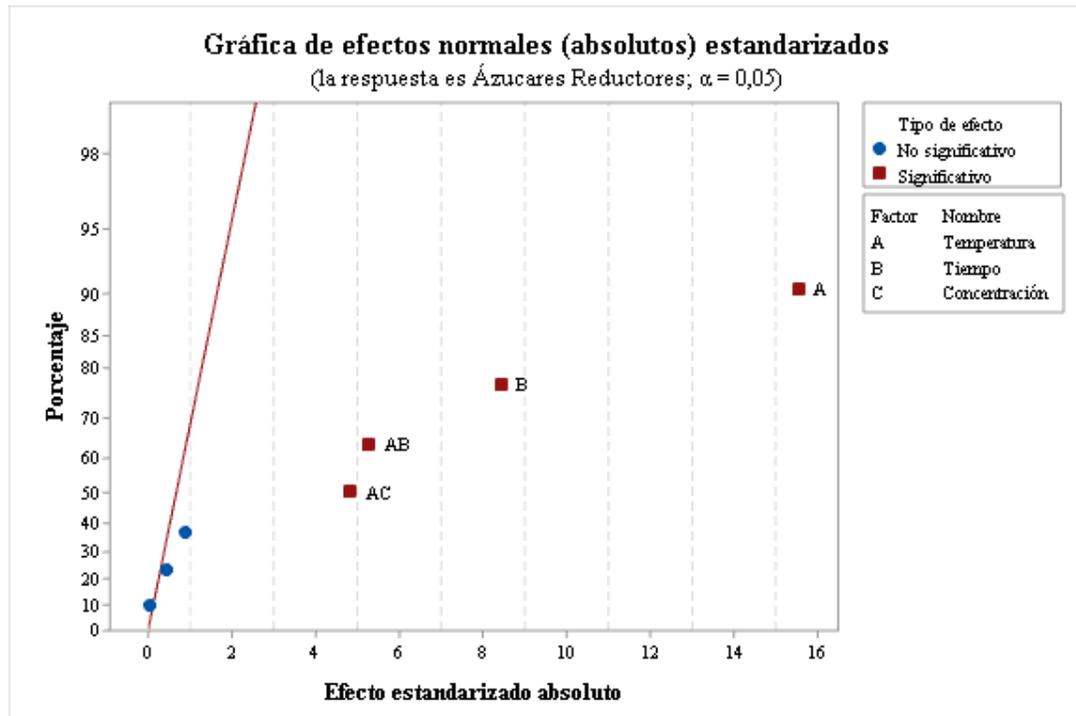


Figura 10. Gráfica de efectos normales estandarizados

En la gráfica de efectos normales se observa que en los efectos significativos de color rojo coinciden con los datos proporcionados en el análisis ANOVA. Mientras más alejado este un efecto o la interacción de la recta de efecto-porcentaje más significativos son.

Los efectos principales A temperatura y B tiempo son altamente significativos siendo el efecto A es de mayor significancia, pero es más importante evaluar las interacciones sobre todo la interacción AB pues a mayor temperatura y un tiempo más prolongado permite que exista un incremento de la variable respuesta.

En cuanto a la concentración C y a las interacciones BC y ABC no se rechaza la hipótesis nula y esto no tienen efecto en la variable respuesta por lo tanto son no significativos, ya que están más alineados a la recta efecto-porcentaje lo que denota normalidad.

3.2.5.2. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

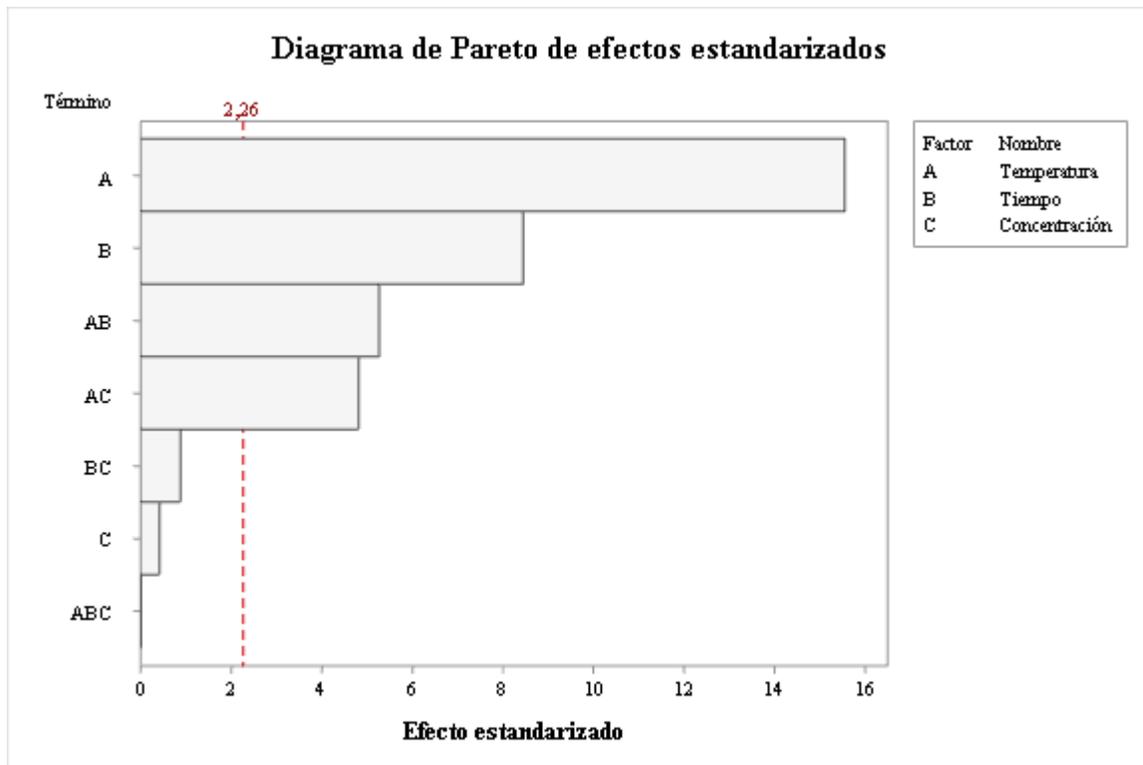


Figura 11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

En el diagrama de Pareto se puede evidenciar de manera sencilla y visual la causa principal de una consecuencia, los aspectos son ordenados de mayor a menor frecuencia, en la cual se identifica que los factores de temperatura y tiempo (interacción temperatura-tiempo) son los más significativos en los azúcares totales ya que el incremento de la temperatura del medio de reacción permite un mayor rendimiento en la hidrólisis ácida y en tiempos muy cortos no es suficiente para hidrolizar todos los polisacáridos (Ávila Jiménez, 2015).

3.2.5.3. Gráfica de efectos principales

Los efectos principales se representan de forma gráfica como en la Figura 12. Donde los niveles de cada factor están en el eje horizontal mientras que la media de la respuesta está en el eje vertical.

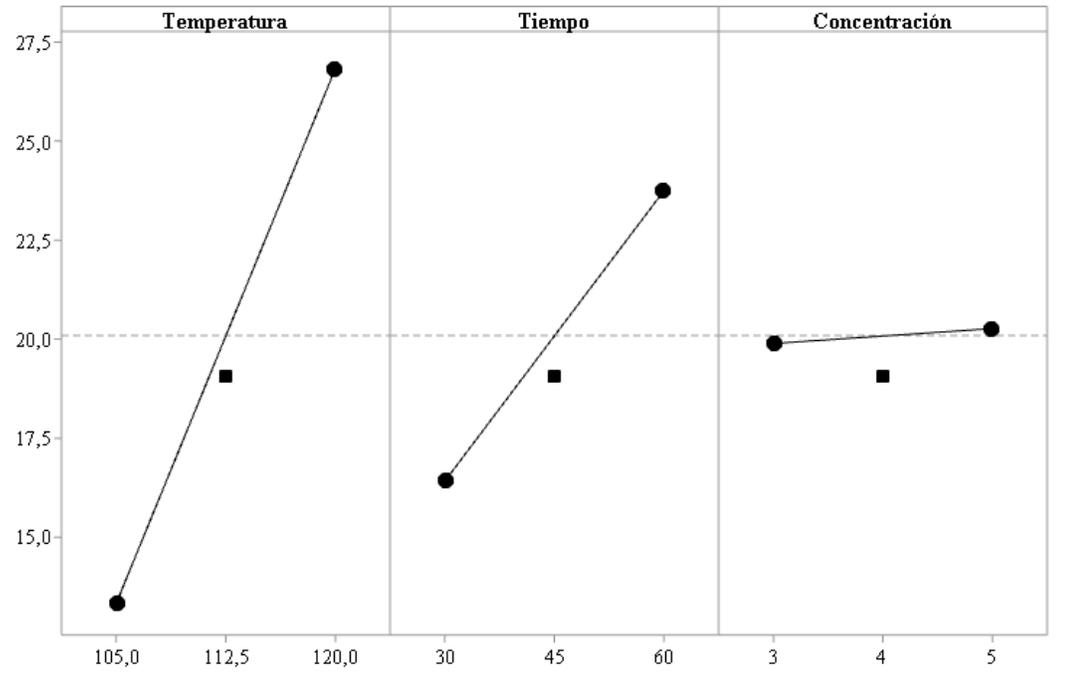


Figura 12. Gráfica de efectos principales para azúcares totales

La temperatura es el efecto más significativo cuando incrementa la temperatura de 105 a 120 °C se obtiene mayor cantidad de azúcares totales, igual sucede con el tiempo pues en su nivel superior se eleva la variable respuesta, con respecto a la concentración si esta se incrementa su valor no afecta de manera significativa en la variable respuesta, mientras más horizontal se represente en la gráfica el efecto menos significativo.

3.2.5.4. Interacciones de los efectos principales

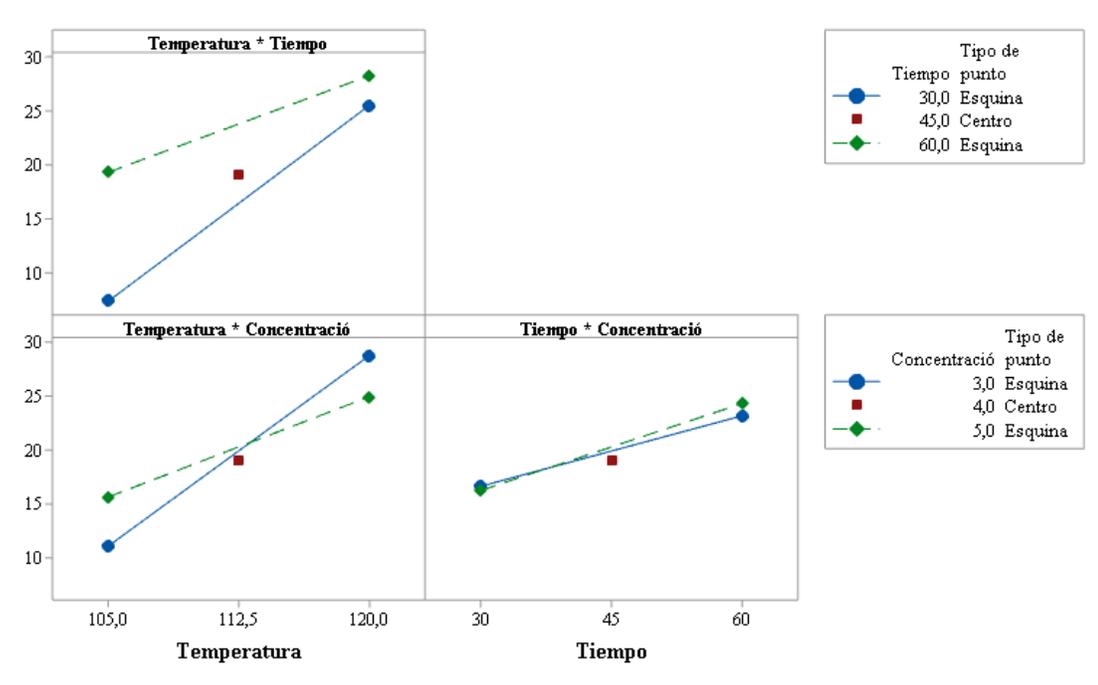


Figura 13. Gráfica de interacción

La gráfica de interacción para Azúcares Totales, representa:

- Interacción Temperatura*Tiempo las líneas son paralelas entre sí, existe interacción entre los dos factores.
- Interacción Temperatura*Concentrado no son paralelas entre sí, entonces existe intersección entre los dos factores.
- Interacción Tiempo*Concentrado no son paralelas entre sí, existe intersección entre los factores.

3.2.5.5. Diagrama de cubo

Cada una de las interacciones de cada experimento se muestran en la Figura 14. La cual representa de forma geométrica en un diagrama de cubo.

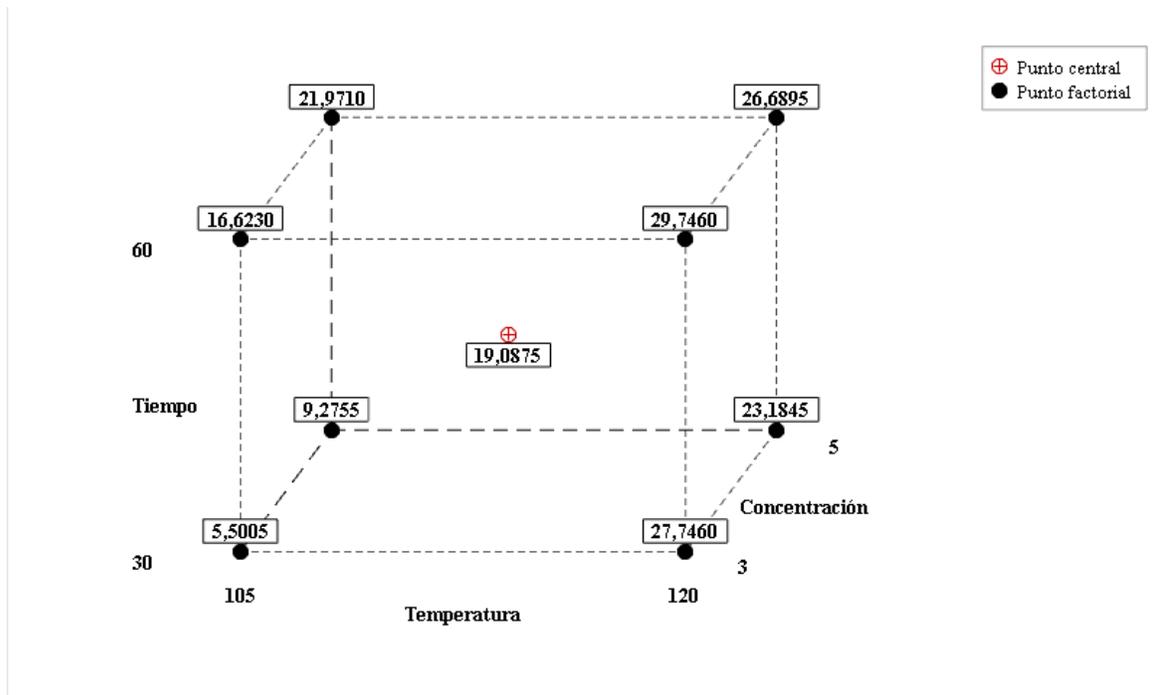


Figura 14. Gráfica de cubo para los efectos

En la gráfica se identifica que dos condiciones en las que se puede obtener mayor cantidad de azúcares totales una es $(1, -1, -1) = (120\text{ °C}, 30\text{ min}, 3\%)$ y $(1, 1, -1) = (120\text{ °C}, 60\text{ min}, 3\%)$ con una cantidad de 29,746 g/L siendo este último valor el mayor resultado de la variable respuesta obtenida.

3.3. Fermentación

3.3.1. Medición de Grados Brix

La medición de los grados brix se realizó en un refractómetro donde se coloca una gota de la muestra fermentada y se leyó el valor que indica el instrumento.

Tabla 9. Resultados de los grados Brix de los ensayos y su promedio

Tiempo (h)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo3	Promedio brix
0	6,2	6,5	6,3	6,3
1	5,7	6	6	5,9
2	5,5	5,8	5,7	5,7
3	5,3	5,7	5,5	5,5
4	5,1	5,3	5,3	5,3
5	5,1	5,3	5,1	5,2
6	5	5,3	5,1	5,1

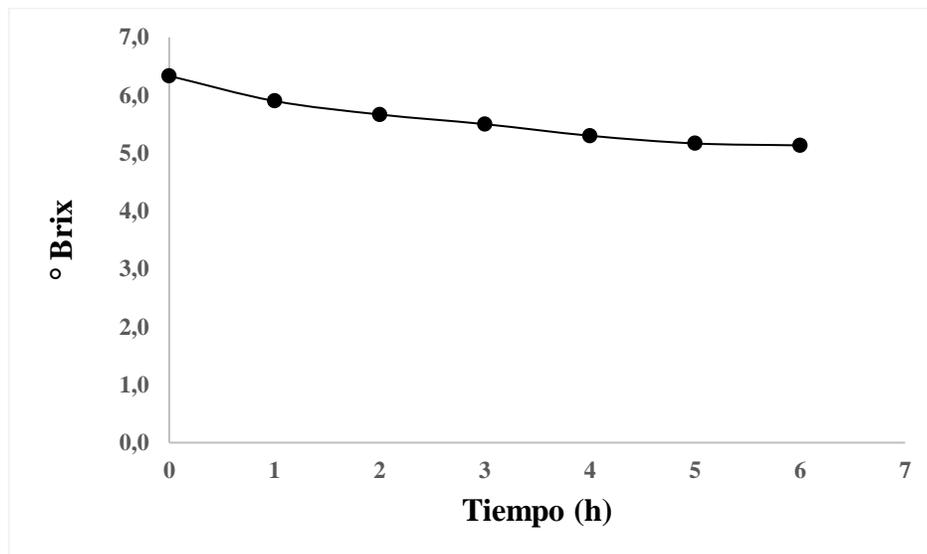


Figura 15. Curva de grados Brix del promedio de los ensayos

En la Figura 15 se observa que la fermentación inicia con 6,3 °Brix y se termina con 5,1 °Brix. A medida que pasa el tiempo de fermentación en el biorreactor los grados brix va disminuyendo esto se debe a la transformación de azúcares solubles a etanol y CO₂ (Salvachúa, 2013). El proceso de fermentación concluye cuando los grados Brix permanezcan constante.

3.3.2. Determinación de la concentración de etanol

Determinación de etanol por el método de Winnick, se realizó durante la fermentación con un número de 7 muestras, presentados en la tabla 10.

Tabla 10. Volumen consumido de tiosulfato de sodio durante la titulación

Tiempo (h)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)
0	2,117	2,067	2,100
1	1,933	1,900	1,917
2	1,717	1,733	1,600
3	1,100	1,483	1,033
4	1,617	1,850	1,650
5	1,767	1,767	1,833
6	1,967	1,967	1,867

Tabla 11. Volumen consumido de tiosulfato de sodio del blanco

Blanco	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)
1	2,10
2	2,15
3	2,10

Se aplica la fórmula de Winnick:

Ecuación 13. Winnick

$$Etanol = \frac{N * (Vb - Vm)}{VM} * 11.51$$

Donde:

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

V_b : Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación del blanco (ml)

V_m : Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación de la muestra problema (ml)

V_M : Volumen de muestra utilizada en la experimentación (2ml)

Tabla 12. Resultados obtenidos de etanol (g/L)

Tiempo (h)	Muestra 1 Etanol (g/L)	Muestra 2 Etanol (g/L)	Muestra 3 Etanol (g/L)	Promedio de Etanol (g/L)
0	0	0	0	0
1	1,06	0,96	1,06	1,027
2	2,30	1,92	2,88	2,367
3	2,88	7,00	2,59	4,157
4	5,85	3,36	6,14	5,117
5	2,01	1,73	2,59	2,110
6	0,86	0,58	1,34	0,927

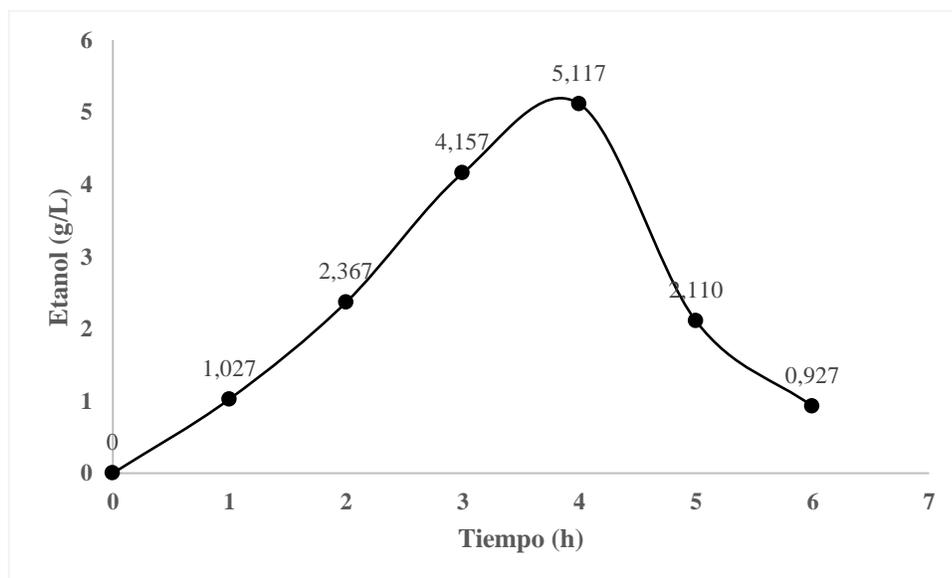


Figura 16. Curva de la concentración de etanol (g/L) promedio durante la fermentación

Se puede observar el comportamiento del promedio de los 3 ensayos durante la fermentación en la Figura 16. Donde, los primeros datos de fermentación en los primeros tiempos de 1 h a 4 h se tiene un incremento de concentración de etanol, ya que al utilizar la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* fermentan fácilmente mono y disacáridos de 6 carbonos como la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. (Ávila Jiménez, 2015), en el tiempo de 5 h a 6 h se observa una disminución del contenido de etanol en gramos por litro, a medida que pasa el tiempo de fermentación existe una inhibición del crecimiento microbiano debido al etanol, causando una disminución en la producción de etanol. La tolerancia de etanol que llega a presentar ciertas levaduras depende del contenido de ácidos grasos que componen su membrana, ya que esta composición favorece o inhibe la excreción o producción del etanol. También si se tiene las concentraciones bajas de azúcares, disminuyen el crecimiento y la viabilidad de las levaduras debido a que ocasiona un estrés. Si el contenido de etanol alcanza un nivel suficientemente alto empieza a ser tóxico para la levadura. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar, así como de la levadura utilizada (Mena Espino, 2011). Finalmente, al realizar los ensayos el contenido más alto de etanol es de 5,117 g/L para las vainas de fréjol.

3.3.3. Rendimiento del Etanol

Para determinar el rendimiento, se realizó mediante el resultado de azúcar total más óptimo el cual es de 29,836 (g/L) multiplicado por 0,51 g que se obtiene de etanol y 0,49 g de CO₂ para obtener la concentración teórica estequiométrica, los valores fueron cuantificados por Gay Lussac (Arellano Perales Carla, 2015), como se observa en (Anexo 3), luego se procede al cálculo del rendimiento.

Ecuación 14. Ecuación del Rendimiento

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Concentración de Etanol (g/L)}}{\text{Concentración Teórica (g/L)}} \times 100$$

Tabla 13. Rendimiento de etanol

Tiempo (h)	Etanol (g/L)	Rendimiento (%)
0	0,000	0,00
1	1,027	6,75
2	2,367	15,56
3	4,157	27,32
4	5,117	33,63
5	2,110	13,87
6	0,927	6,09

Los rendimientos de bioetanol durante la fermentación de 6 horas, fueron en promedio del 14,74%, lo que indica que, en el proceso de fermentación, los azúcares totales no fueron convertidos a etanol en su totalidad en todas las muestras; los rendimientos son menores al 50% (Apaza & Ramírez, 2021).

El valor más alto es la muestra durante 4 horas fue al obtener etanol del 5,117 g/L con un rendimiento de 33,63%, el rendimiento obtenido es superior al rendimiento de 11,4% en la producción de bioetanol mediante residuo lignocelulósicos de maíz con un tiempo de fermentación de 48 horas, la variación se debe al porcentaje de composición de la biomasa (Sánchez Arbeláez, 2018). Para la muestra con semillas de fréjol se tiene una eficiencia del 71,3 - 79,2% con un contenido de etanol de 38,4 g/L (Pietrzak et al., 2016). La muestra de corteza de cacao tiene un rendimiento del 50% con un tiempo de fermentación de 3 días (Loayza Calva Kelly Noemy, 2020). En los proyectos citados se utiliza la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, lo que varía es el tiempo de fermentación en la que depende de las variables en temperatura, pH, rpm, también el pretratamiento que se utiliza cada una de ellas y el porcentaje de azúcares que posee.

3.3.3. Método del picnómetro

Los resultados de método del picnómetro se presentan en la tabla 16 de las tres fermentaciones realizadas en esta investigación.

Ecuación 15. Densidad Alcohol

$$\rho_{muestra} = \frac{p_{(p+m)} - p_{(pv)}}{p_{(p+a)} - p_{(pv)}} * \rho_{H_2O}$$

Donde:

$p_{(p+m)}$ = Peso del picnómetro + muestra.

$p_{(p+a)}$ = Peso del picnómetro + H₂O destilada.

$p_{(pv)}$ = Peso del picnómetro vacío.

ρ_{H_2O} = Densidad del agua destilada.

Tabla 14. Peso del picnómetro más muestra.

Muestra en tiempo de 4h	Peso picnómetro + muestra (g)
1	20,6966
2	20,6887
3	20,6865

Peso del picnómetro vacío = 14,5804g

Peso del picnómetro + H₂O destilada = 20,7318g

Densidad del agua destilada = 1

Tabla 15. Densidad de Alcohol

Muestra	Densidad alcohol
1	0,9930
2	0,9943
3	0,9926

Tabla 16. Concentración de Alcohol Gay Lussac

Muestra	Concentración de etanol (Grado Gay Lussac)
1	4,85
2	3,93
3	5,15
Promedio	4,64

Como se puede observar en la tabla 16, el tiempo de 4 horas de cada fermentación (3 muestras fermentadas), se da la concentración de etanol grado Gay Lussac de 3,93, 5,15 y 4,85 respectivamente, el promedio de grado de alcohol es de 4,64 en el tiempo de 4 horas de la fermentación, por lo que según la tabla 12 se puede ver que existe una diferencia en los métodos de obtención de etanol.

3.3.4. Modelo Cinético ecuación de Gompertz Modificado

El modelo de Gompertz modificado se ajustó de manera satisfactoria a los datos obtenidos experimentalmente con un $R^2 > 0,98$. En la tabla 17, se expresa los resultados obtenidos durante la fermentación y los datos calculados.

Tabla 17. Datos de la concentración de etanol experimentales y calculados en el programa Matlab.

Tiempo (h)	Concentración de etanol (g/L) experimental	Concentración de etanol (g/L) calculado
0	0,000	0,0607
1	1,0270	0,9671
2	2,3670	2,7365
3	4,1570	4,0449
4	5,1170	4,6844

La concentración máxima de etanol obtenida experimentalmente fue de ($P_{\max} = 5,117 \text{ g/L}$) y la calculada de ($P_{\max} = 4,6844 \text{ g/L}$) este valor es menor probablemente por al tiempo de muestreo de los datos, ya que los valores se modificaban rápidamente además el ajuste del modelo es menor a 0,99 por lo que también influyen en los valores calculados mediante la ecuación de Gompertz modificado. La velocidad máxima de producción de etanol calculado es de ($r_{pm} = 1,430 \text{ g/ (L.h)}$). La gráfica del ajuste realizado con el modelo de Gompertz modificado se observa en la Figura 17.

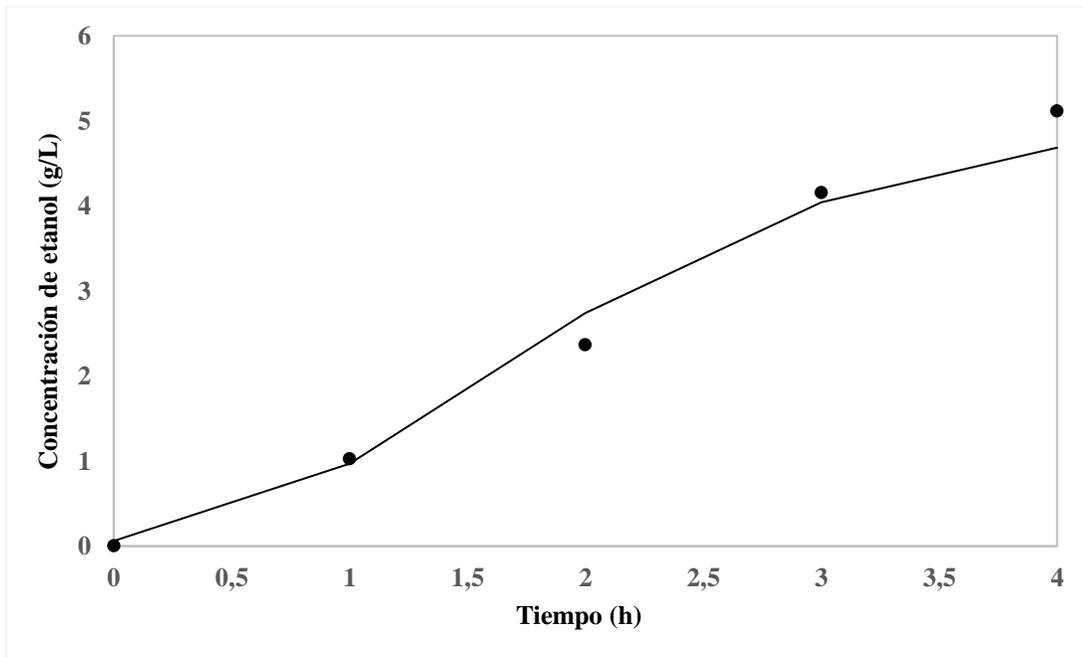


Figura 17. Curva de producción de etanol y ajuste de la ecuación de Gompertz modificado a los datos experimentales obtenidos durante el proceso de fermentación discontinua.

3.3.5. Análisis y comparación

Se realizó una comparación de los datos experimentales con los valores predichos por el modelo Gompertz, modificado empleado en el software Minitab. La función es $y = x$ con base en el indicador estadístico R^2 cuyo valor fue 0,986 y banda de confianza del 95%, se

pudo deducir que este modelo cinético puede predecir el comportamiento de este sistema en particular bajo las condiciones definidas.

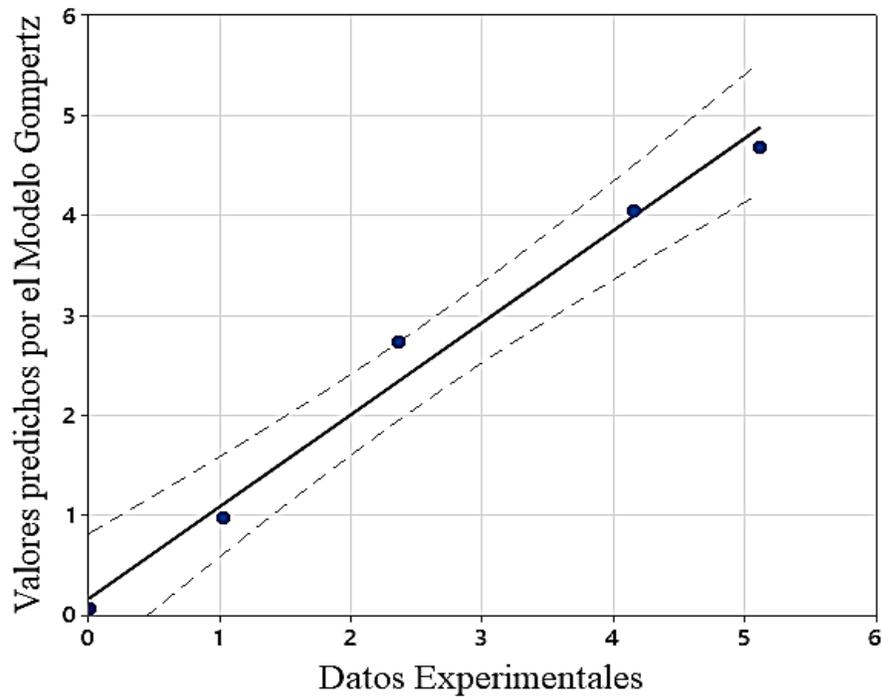


Figura 18. Correlación entre la concentración de etanol calculada por el modelo Gompertz modificado y los datos experimentales

3.4. Destilación del etanol

La destilación simple es un proceso en el cual no se obtuvo una notable purificación del etanol obtenido después de la fermentación por lo cual es importante realizar una destilación fraccionada para obtener datos significativos en la Tabla 18 se muestra los resultados de la destilación simple la cantidad de etanol se realizó por el método de Winnick.

Tabla 18. Datos obtenidos de la destilación simple

Muestra	Etanol (g/L)
1	6.139
2	7.289
3	6.522

La mayor cantidad de etanol que se obtuvo es de 7,289 g/L comparando este resultado con la obtención de bioetanol con otros residuos agroindustriales como la cascarilla de arroz donde Apaza & Ramírez, (2021) obtuvieron 11,71 g/L, mientras que Rovere, (2019), obtuvo de los residuos de café 9,60 g/L de etanol, la cantidad de biocombustible obtenida para las vainas de fréjol es baja.

Aunque la cantidad de azúcares totales es considerable no se obtuvo un buen rendimiento en el contenido de etanol, las razones son varias una de ellas es el tipo de levadura que se ocupa, pues la *Saccharomyces Cerevisiae* no fermenta pentosas con la xilosa (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009), que es posible encontrar en la cuantificación de azúcares totales, ya que se encuentra en la hemicelulosa compuesto considerable en la materia prima utilizada

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

En la caracterización de las vainas de frejol (*Phaseolus vulgaris L.*), se obtuvo 36,472% de Celulosa, 28,253% Hemicelulosa y 6,698% Lignina, siendo la celulosa la principal fuente para obtener azúcares fermentables. También se obtiene 6,667% Humedad, 6,862% Cenizas y 22,562% extractos solubles, todo esto puede ser usado con fines energéticos.

En la hidrólisis ácida, los mejores resultados obtenidos mediante el diseño factorial 2^3 fueron en las condiciones de 120 °C, durante 60 min y 3% de ácido sulfúrico dando como resultado 29,836 g/L de azúcares totales. En el análisis de varianza (ANOVA), se evalúa el efecto de las variables en el proceso, teniendo un coeficiente de determinación de $R^2 = 97,60\%$ lo que explica la variabilidad en la generación de azúcares totales teniendo relación con las variables independientes.

El tiempo de fermentación duro 6 horas en cada uno de los ensayos. Se observó que, de 1 h a 4 h incrementa el contenido de etanol y de 5 h a 6 h disminuye el contenido de alcohol, la mayor concentración de etanol se obtuvo en la segunda fermentación con un valor de 7,00 g/L.

La simulación de la producción de etanol durante el proceso fermentativo con el modelo cinético de Gompertz Modificado demostró un buen ajuste con los datos experimentales obtenidos en la fermentación. La concentración máxima de etanol obtenida experimentalmente con el promedio de las tres fermentaciones realizada fue de $P_{\max} = 5,117$ g/L y la calculada de $P_{\max} = 4,6844$ g/L.

4.2 RECOMENDACIONES

- En la determinación de extractos se recomienda usar un método diferente al presentado en este trabajo pues el tiempo de determinación es demasiado prolongado debido al uso de agua.
- Se recomienda experimentar con enzimas celulasas o un cóctel de enzimas en el proceso de hidrólisis y verificar si existe un incremento en el rendimiento azúcares totales.
- En la etapa de fermentación se recomienda usar levaduras que puedan fermentar hexosas y pentosas como la *Pichia stipitis* junto con la *Saccharomyces Cerevisiae* (Gupta et al., 2012), Unrean & Srienc, (2010) menciona el uso de cepas etanológicas de *Escherichia coli* que consumen selectivamente pentosas y hexosas y así incrementar el contenido de etanol. Estudios más recientes han experimentado con el uso de bacterias anaerobias como la *Caloramator boliviensis* que puede convertir las hexosas y pentosas en etanol (Crespo et al., 2012).

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Alberto Arenas, C. (2011). *Medición de densidad*. <https://www.oiml.org/en/publications/other-language-translations/spanish/g014-es11.pdf>
- Alberto, L., & Morales, T. (2009). *Escuela Superior Politécnica del Litoral*, 13–19. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10768/2/TESIS%20BIOMAS A.pdf>
- Alonso-Gómez, A., & Arturo Bello-Pérez, L. (2018). *Materias primas usadas para la producción de etanol de cuatro generaciones: retos y oportunidades four generations of raw materials used for ethanol production: challenges and opportunities*. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n7/2521-9766-agro-52-07-967.pdf>
- Alvarado, G. R. (2021). *Obtención de bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante hidrólisis enzimática*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21229/1/UPS-CT009334.pdf>
- Andrade-Castañeda, H. J., Arteaga-Céspedes, C. C., & Segura-Madrigal, M. A. (2017). Emisión de gases de efecto invernadero por uso de combustibles fósiles en Ibagué, Tolima (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 103–112. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:561
- Apaza, Y., & Ramírez, G. (2021). *Optimización de la Hidrólisis Enzimática en Cascarilla de Arroz (Oryza sativa) para la Obtención de Bioetanol*.
- Arellano Perales Carla. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática*. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46812/ArellanoPeralesCarla.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- Ávila Jiménez, L. M. (2015). Obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá (*passiflora edulis* f. *flavicarpa*). <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23207/1/TESIS.pdf>
- Bacca, A., & Revelo, D. (2020). Obtención de bioetanol mediante proceso de extracción - fermentación de almidón de papa. *Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 28(50), 16. <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/566/430>
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S., & Vial, C. (2017). Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresource Technology*, 235, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.056>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Branzini, A. (2011). The global bioenergy partnership sustainability indicators for bioenergy: Vol. Primera Edición. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bioenergia/sustentabilidad/_archivos//000002_Reporte%20GBEP-Espa%C3%B1ol/000002_Reporte%20GBEP-Espa%C3%B1ol.pdf
- Casa, E. (2018). Evaluación del potencial de producción de bioetanol de la biomasa lignocelulosica de la caña de maíz por hidrólisis ácida (Vol. 7, Issue 5).
- Cauich, J. V. G. (2016). Establecimiento de un proceso de hidrólisis a partir de cladodios frescos y secos de nopal *Opuntia* spp. para la obtención de azúcares fermentables. 89.
- Cevallos, A. (2020). Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado enzimático con *Trichoderma* del Jacinto de agua Proveniente del embalse analiza. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18695/1/UPS-CT008747.pdf>
- Cheng, F., & Brewer, C. E. (2021). Conversion of protein-rich lignocellulosic wastes to bioenergy: Review and recommendations for hydrolysis + fermentation and anaerobic

- digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 146(July 2020), 111167. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111167>
- Crespo, C. F., Badshah, M., Alvarez, M. T., & Mattiasson, B. (2012). Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe *Caloramator boliviensis*. *Bioresource Technology*, 103(1), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.020>
- Conesa, C. (2017). Desarrollos tecnológicos para la mejora y control del proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos agroalimentarios.
- Cortez-acosta, D., Soto-cruz, O., González-laredo, R., López-miranda, J., & Pescador, F. (2008). *Obtención de azúcares fermentables por hidrólisis ácida de la paja de frijol*. 618, 8185402.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Equihua Sanchez, M. (2013). Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce. 81. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/695/1/PCER_M_Tesis_2013_Mintzirani_Equihua_Sánchez.pdf
- Escobedo, M. J., & Calderón, A. C. (2021a). Microalgal biomass with high potential for the biofuels production. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 12, Issue 2, pp. 265–282). Universidad Nacional de Trujillo. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.030>
- Escobedo, M. J., & Calderón, A. C. (2021b). Microalgal biomass with high potential for the biofuels production. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 12, Issue 2, pp. 265–282). Universidad Nacional de Trujillo. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.030>
- FAO. (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. In *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.

- Fernández, A., & Sánchez, E. (2017). Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México, 1–17
<https://www.redalyc.org/pdf/2033/203350918008.pdf>
- Ferraz, G. (2020). Aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos de las plataneras para la producción de bioetanol. 15–16.
- Gao, W., Zhou, L., Liu, S., Guan, Y., Gao, H., & Hu, J. (2022). Machine learning algorithms for rapid estimation of holocellulose content of poplar clones based on Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 292(May), 119635.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119635>
- Gómez, L. A., & Pérez, L. A. (2018). Four generations of raw materials used for ethanol production: Challenges and opportunities. *Agrociencia*, 52(7), 967–990.
- González Rentería, S. M., Soto Cruz, N. O., Rutiaga Quiñones, O. M., Medrano Roldán, H., Rutiaga Quiñones, J. G., & López Miranda, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 17–28.
- González, A. D., & Kafarov, V. (2009). Producción de biocombustibles de tercera generación: extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel Ángel D. González*, Viatcheslav Kafarov. *IV Simposio de Química Aplicada SIQUIA*, 1–10.
- Gonzales Jurado, Y. A., & Villada, C. D. (2018). Obtención de etanol celulósico a partir de la variedad de pasto Pennisetum Clandestinum. 20.
[https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/7649/GonzalezJuradoYuran yAndrea2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/7649/GonzalezJuradoYuran%20yAndrea2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Guncay Buestan, J. V., & Silva Ibarra, M. V. (2018). Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucílago de cacao CCN – 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30426>
- Gupta, R., Mehta, G., & Chander Kuhad, R. (2012). Fermentation of pentose and hexose

- sugars from corncob, a low cost feedstock into ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 47, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.027>
- Herguedas, I., Peso, C., & Rodríguez, E. (2012). Biomasa, biocombustibles y sostenibilidad. <http://sostenible.palencia.uva.es/system/files/publicaciones/Biomasa%20%20Biocombustibles%20y%20Sostenibilidad.pdf>
- Hosseini Koupaie, E., Dahadha, S., Baziyar Lakeh, A. A., Azizi, A., & Elbeshbishy, E. (2019). Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of Environmental Management*, 233(October 2018), 774–784. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>
- Jazmín, W., & Chitalogro, P. (2016). Universidad Central del Ecuador facultad de ciencias agrícolas carrera de ingeniería agronómica evaluación del manejo agronómico y reacción a enfermedades de variedades mezcla de fréjol (*phaseolus vulgaris* l.) *allphas y chacras de Cotacachi trabajo de grado previo a la obtención del título de ingeniero agrónomo*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8324/1/T-UCE-0004-55.pdf>
- Loayza Calva Kelly Noemy. (2020). Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir de hidrolizado ácido de la corteza de cacao.
- Loja Sánchez, C. P. (2016). Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26247/1/TRABAJO%20DE%20TITULACION%20N.pdf>
- López, N. (2019). Las demandas de la asociación española del bioetanol. <https://www.energynews.es/piden-ayudas-fiscales-y-mayor-reconocimiento-para-el-bioetanol/>
- Lucía, M., Micán, M., Andrés Garay Hernández, C., & Peña Peña, N. (2017). Obtaining of bioethanol from lignocellulose residues. *América Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 69–76.

<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6439/1/COL0046961-2017-1-IQ.pdf>

- Malla, J. (2018). Universidad Central del Ecuador Carrera de Ingeniería Agronómica Evaluación del rendimiento de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) INIAP 484 Centenario, en siembra directa bajo fertilización química, orgánica más *Rhizobium* sp. (tesis de pregrado). 36.
- Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A., & El Salous, A. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160(February). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112260>
- Mena, X. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales de Plátano. file:///C:/Users/59396/Downloads/PCBP_D_Tesis_2011_Xenia_Mena_Espino.pdf
- Montoya-Rosales, J. ., Peces, M., González-Rodríguez, L. ., Alatraste-Mondragón, F., & Villa-Gómez, K. (2020). Biomass and Bioenergy A broad overview comparing a fungal , thermal and acid pre-treatment of bean straw in terms of substrate and anaerobic digestion effect. *Biomass and Bioenergy*, 142(October), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105775>
- Mora, Y. (2014). Modelación cinética de la fermentación alcohólica del zumo de pomarrosa. In *Pontificia Universidad Catolica del Peru* (Vol. 8, Issue 33). Universidad Central del Ecuador.
- Navas, C., & Guerrero, G. (2014). La Industria de los Biocombustibles en Ecuador: caso producción y comercialización de etanol anhidro en la provincia de Bolívar. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/6903/7.36.000576.pdf>
- Noticia, C. E., & Relacionadas, N. (2022). El fréjol, una investigación desde la lúdica y los juegos de países andinos. 1–6.
- Okot, D. K., Bilsborrow, P. E., & Phan, A. N. (2019). Briquetting characteristics of bean straw-maize cob blend. *Biomass and Bioenergy*, 126(May), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.05.009>

- Ortega, F. A., Pérez, O. A., & López, E. A. (2016). Modelo Semifísico de Base Fenomenológica del Proceso Continuo de Fermentación Alcohólica. *Información Tecnológica*, 27(1), 21–32. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000100004>
- Peralta, E., Murillo, A., & Mazón, N. (2009). Producción y Distribución de Semilla de Buena calidad de frejol arbustivo con pequeños agricultores, a través de un sistema no convencional, 13–24 <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3291/1/iniapscpm147.pdf>
- Pietrzak, W., Kawa, J., Krol, B., Lennartsson, P., & Taherzadeh Mohammad. (2016). *Ethanol, feed components and fungal biomass production from field bean (Vicia faba var. equina) seeds in an integrated process.* 69–76. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416306952?via%3Dihub>
- Pucuji, W. (2016). Evaluación del manejo agronómico y reacción a enfermedades de variedades mezcla de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) *Allphas y Chacras de Cotacachi.* 3–4. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8324/1/T-UCE-0004-55.pdf>
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(January), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>
- R.C. Saxena, D.K. Adhikari, H. B. G. (2009). Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Rovere Herrera, O. R. (2019). Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de residuos de granos de café molido usado del Distrito Metropolitano de Quito, 20–26. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20291/1/T-UCE-0017-IQU-074.pdf>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>

- Salvachúa, D. (2013). Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo: hongos, enzimas fúngicas y aplicaciones.
- Sampeiro, J., & Martínez, A. (2010). *Bioenergía*. 32–33. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/61_2/PDF/Bioenergia.pdf
- Sánchez Arbeláez, N. I. (2018). Obtención de Bioetanol de segunda generación a partir de cascara de arroz. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/33223/1/401-1328%20-%20Obtenc%20bioetanol%20segund%20generac%20partir%20cascara%20arroz.pdf>
- Segovia-Hernandez, J. G. (2018). Alternative Schemes for the Purification of Bioethanol: A Comparative Study. *Recent Advances in Petrochemical Science*, 4(2). <https://doi.org/10.19080/RAPSCI.2018.04.555631>
- Selvakumar, P., Adane, A. A., Zelalem, T., Hunegnaw, B. M., Karthik, V., Kavitha, S., Jayakumar, M., Karmegam, N., Govarathanan, M., & Kim, W. (2022). Optimization of binary acids pretreatment of corncob biomass for enhanced recovery of cellulose to produce bioethanol. *Fuel*, 321(April), 124060. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124060>
- Sevilla, I. R. (2015). Caracterización química de tres residuos lignocelulósicos generados en la región del Cantón Alausí. *Revista Del Instituto de Investigación de La Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica*, 20(40), 80–85.
- SICA. (2002). Resultados nacionales sobre el III censo nacional agropecuario de la república del Ecuador. *Censo Nacional Agropecuario*, 1, 57.
- Siliceo Rodríguez, M. L. (2014). Análisis De La Productividad Industrial De Bioetanol. *Universidad Veracruzana*, 1, 27. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46727/SiliceoRodriguezMLuisa.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- SIPA. (2021). *Sistema de Información Pública Agropecuaria*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Siva, D., Srivethi, G., Vasan, P. T., Rajesh, D., Alfarhan, A., & Rajagopal, R. (2022).

- Enhanced cellulase enzyme production by *Aspergillus niger* using cellulase/iron oxide magnetic nano-composites. *Journal of King Saud University - Science*, 34(1), 101695. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101695>
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2(3), 472–499.
- Tiburcio León, F. A. (2019). *Produccion de etanol de segunda generacion a partir de rastrojo de Maiz*. 1–63.
- Tye, Y. Y., Lee, K. T., Wan Abdullah, W. N., & Leh, C. P. (2016). The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 60, 155–172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.072>
- Ullah, K., Kumar Sharma, V., Dhingra, S., Braccio, G., Ahmad, M., & Sofia, S. (2015). Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 682–698. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.044>
- Ulloa, J. A., Petra, M. C., Ulloa, R., Carmen, J., Ramírez, R., Blanca, I. B. Q., & Ulloa, E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3(8), 5–9.
- Unrean, P., & Srienc, F. (2010). Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains. *Journal of Biotechnology*, 150(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.002>
- Villa Gómez, D. K., Becerra Castañeda, P., Montoya Rosales, J. de J., & González Rodríguez, L. M. (2020). Anaerobic digestion of bean straw applying a fungal pre-treatment and using cow manure as co-substrate. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 41(22), 2863–2874. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1587004>

1. Rendimiento de azúcares totales

Para obtener el porcentaje de azúcares totales es importante conocer el material lignocelulósico de la muestra por lo cual se requiere conocer el contenido de celulosa y hemicelulosa (Apaza & Ramírez, 2021).

Para la obtener el valor del material lignocelulósico se basó en los valores del estudio realizado por (González Rentería et al., 2011) es cual basa su estudio en las normas internacionales AOAC.

Ecuación 16. Porcentaje de rendimiento de azúcares totales

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Concentración de azúcares totales}}{\text{Concentración potencial de azúcar del sustrato}} * 100$$

Tabla 19. Rendimiento de azúcares totales

Azúcares totales (g/L)	Concentración potencial de azúcar del sustrato	Rendimiento (%)
5,972	53.78	11,11
28,038	53.78	52,13
16,533	53.78	30,74
29,836	53.78	55,48
10,736	53.78	19,96
20,039	53.78	37,26
21,342	53.78	39,68
27,139	53.78	50,46
5,029	53.78	9,35
27,454	53.78	51,05
16,713	53.78	31,08
29,656	53.78	55,14
7,815	53.78	14,53
26,330	53.78	48,96

22,600	53.78	42,02
26,240	53.78	48,79
18,316	53.78	34,06
19,859	53.78	36,93

Anexo 2

2. Relación entre Concentración de Etanol y Gravedad Especifica

Tabla 20. Concentración de etanol y gravedad especifica

Porcentaje de Alcohol	Gravedad Especifica	Porcentaje de Alcohol	Gravedad Especifica	Porcentaje de Alcohol	Gravedad Especifica	Porcentaje de Alcohol	Gravedad Especifica
0	1.0000	26	0.9698	52	0.9303	78	0.8693
1	0.9985	27	0.9687	53	0.9283	79	0.8666
2	0.9970	28	0.9676	54	0.9263	80	0.8638
3	0.9956	29	0.9665	55	0.9242	81	0.8610
4	0.9942	30	0.9653	56	0.9221	82	0.8528
5	0.9928	31	0.9642	57	0.9200	83	0.8553
6	0.9915	32	0.9630	58	0.9178	84	0.8524
7	0.9902	33	0.9617	59	0.9156	85	0.8494
8	0.9890	34	0.9604	60	0.9134	86	0.8464
9	0.9876	35	0.9591	61	0.9112	87	0.8436
10	0.9866	36	0.9577	62	0.9089	88	0.8402
11	0.9854	37	0.9563	63	0.9066	89	0.8371
12	0.9843	38	0.9548	64	0.9043	90	0.8338
13	0.9832	39	0.9533	65	0.9020	91	0.8305
14	0.9821	40	0.9518	66	0.8997	92	0.8270
15	0.9810	41	0.9502	67	0.8973	93	0.8235
16	0.9800	42	0.9486	68	0.8949	94	0.8198
17	0.9789	43	0.9469	69	0.8924	95	0.8160
18	0.9779	44	0.9452	70	0.8900	96	0.8121
19	0.9769	45	0.9435	71	0.8875	97	0.8079
20	0.9760	46	0.9417	72	0.8850	98	0.8036
21	0.9750	47	0.9399	73	0.8824	99	0.7989
22	0.9740	48	0.9381	74	0.8799	100	0.79389
23	0.9729	49	0.9362	75	0.8773		
24	0.9719	50	0.9343	76	0.8746		
25	0.9708	51	0.9323	77	0.8720		

3. Rendimiento de Bioetanol

La concentración teórica se obtiene multiplicando 0,51 g que se obtiene de etanol por cada uno de los resultados de azúcares totales.

Balance global de la fermentación alcohólica en la que se obtiene 0,51 g de etanol y 0,49 g de CO₂ por 1 g de glucosa.



Tabla 21. Cálculo de Concentración Teórica

Azúcares totales (g/L)	Concentración Teórica
5,972	3,05
28,038	14,30
16,533	8,43
29,836	15,22
10,736	5,48
20,039	10,22
21,342	10,88
27,139	13,84
5,029	2,56
27,454	14,00
16,713	8,52
29,656	15,12
7,815	3,99
26,330	13,43
22,600	11,53
26,240	13,38
18,316	9,34
19,859	10,13

4. Manual del Biorreactor

OPERATING
MANUAL

Document Product Model Ver. Date Item Language

A. INTRODUCTION

1. Introduction

This manual contains a description of the equipments, installation, operation and maintenance instruction for the Biotron GX system manufactured by the BIOTRON, INC



2. DESCRIPTION OF EQUIPMENT

The new developed bioreactor is well designed to provide a stable, reliable bio environment for various cell culture applications. This system can be employed for batch culture fed-batch culture or continuous culture with microprocessor control and PC control of pH, DO, agitation, temperature, antifoam, pump feed, vessel level accurately.

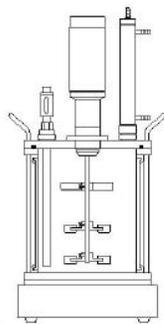
Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

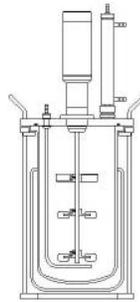
1. DESCRIPTION OF VESSEL

The vessels are normally decided according to the working volumes of real media and provide interchangeable vessel and easy to scale up with various different sizes of vessels from 2.5L, 5L, 7L and 10L. The glass vessel connected with stainless steel head plate is assembled by simple clamp. It is a convenient device to assemble into the vessel or to disassemble from one.

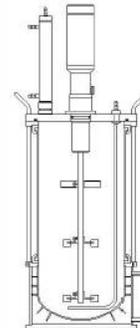
There are optional choices between the single wall vessel and double (jacket) vessel.



Single vessel



Double vessel



Bowl vessel

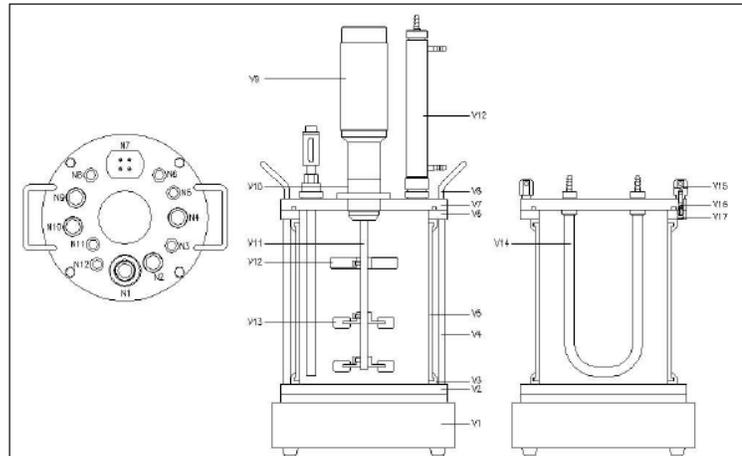


The stainless steel head plate is composed of 10 location free ports. Ports are provided in the head plate for the fixed temperature sensor, Sparger, sampling, pH electrodes, DO electrodes, a foam probe, exhaust condenser. 4 different tubes of peristaltic pump would be connected to only one line, which could be space saving in the head plate.

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

2. Vessel parts and structure



N1	Inoculum Port	V1	Heater Plate
N2	Sampling Port	V2	Bottom Plate
N3	Sparger Port	V3	Packing
N4	DO Sensor Port	V4	Support
N5	Thermowell Port	V5	Glass Vessel
N6	ColdFinger Port-1	V6	Middle Plate
N7	4P Feeding	V7	Top Plate
N8	ColdFinger Port-2	V8	Handle
N9	Condenser	V9	DC Motor
N10	PH Sensor Port	V10	Bearing Housing
N11	Transfer Line	V11	Shaft
N12	Foam Sensor Port	V12	Foam Breaker
		V13	6th Turbine Impeller
		V14	U-type ColdFinger
		V15	Hexagon Nut
		V16	Top Plate Bolt
		V17	Wrench Bolt

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

3. AGITATION SYSTEM

A removable agitation DC motor located on the top of bearing housing is connected to the agitation shaft. DC motor should be removed before the sterilization and then placed in the bearing housing after the sterilization. The motor will provide agitation speed range of 50 to 1200 rpm.

In case of the motor mode, it is controlled by the speed that users set and in case of the DO model, it is controlled by the measured DO value through the DO sensor to keep the DO value that users set.

4. DO CONTROL

DO value is controlled in the range of 0 - 100%. DO value is sensed by D.O electrode and also is controlled and kept by the agitation speed. In case DO value can not be maintained by the agitation speed, DO should be increased by the pure oxygen supplies by the use of high-pressure oxygen or oxygen cylinder.

5. pH CONTROL

pH is controlled in the range of 2.00-12.00. The pH is measured by a glass electrode. Control is maintained by Aci and Base peristaltic pump by PID

6. TEMPERATURE CONTROL

Temperature automatically controls itself in the range of 8-80. This Fermentor is able to control the temperature by the use of circular water-bath and by the heat plate and cooling water of the bottom part in the single vessel and also in case of bigger vessel than the volume of 10L, cold finger is used for it.

As the water for controlling the temperature does not pass the body case, it prevent the aging and corrosion of the controlling plate and also in case f the single vessel, it is possible to control the temperature by the air cooling. RTD (Resistance Temperature Detector) is used for temperature measure.

7. FOAM CONTROL

Firstly, foam is removed through the foam breaking impeller and then in case of the remaining foam, it is sensed by foam/level sensor and anti-foam is injected and removes the foam by antifoam pump.

8. AERATION

Air and oxygen can be supplied to the medium through the ring sparger. The flow rate is controlled through the control valve, which is located on a flow meter. In case quantities of DO that users want to get by the agitation is not provided, DO should be increased by the pure oxygen supplies by the use of high-pressure oxygen or oxygen cylinder.

9.1. AIR SUPPLYING CONTROL

The air flowing amount is controlled in the range of 0-23L/min by the control of a flow meter and the flow meter suitable for the using vessel is installed. If it requires more air flowing amount, the flow meter should be replaced.

Document	Product	Model	Ver.	Date	Item	Language
----------	---------	-------	------	------	------	----------

B. DESCRIPTION OF PARTS

9. EXHAUST SYSTEM

Gas moisture going out to the outside is condensed and then comes back to the vessel. As the gas goes out through the 0.2 air filter, there is no contamination without the air flowing.

10. SAMPLING SYSTEM

Sample is collected through the installed sampling line before the fermentation for the sampling of components during the fermentation. You can use a convenient one of 2 methods following below.

- Close the gas out line, open the sampling line and then do the Sampling by the pressure.
- Connect the silicon tube linked to the sampling line to the peristaltic pump and then do the Sampling by the pump working.

11. FED-BATCH SYSTEM

Add a small quantity of the substrate continuously after measuring DO by the added substrate of low concentration in the early process of fermentation as the indirect post. There are four type of Fed Batch mode in this system. User can select one of the mode to feed the medium or a special substrate to the fermenter.

5. Fotografías

- **Acondicionamiento de la materia prima (Vainas de Frejol)**



- **Determinación de Humedad**





- **Determinación de Cenizas**

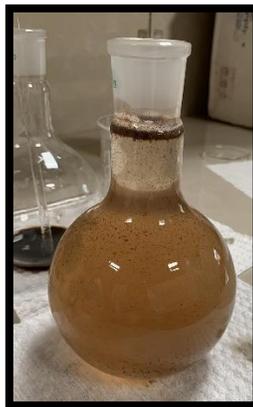


- **Determinación de Extractos**





- **Determinación de Lignina**



- **Determinación de Celulosa**





- **Determinación de Holocelulosa**



- **Pretratamiento alcalino**

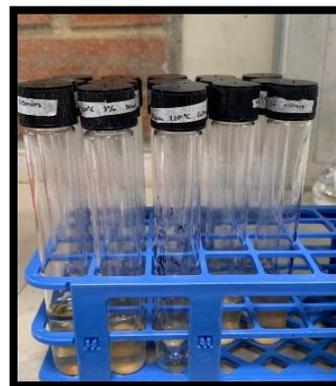


- **Hidrólisis Ácida**

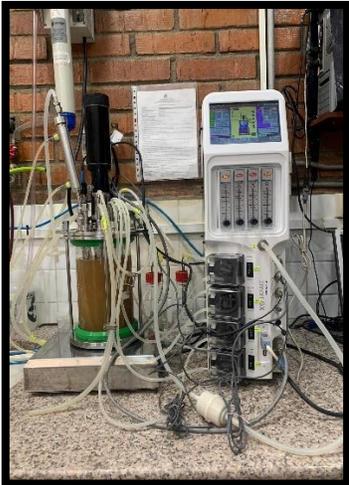




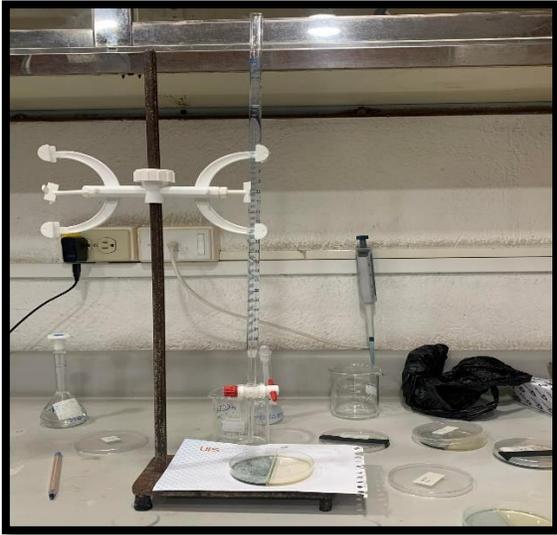
- **Determinación de Azúcar Totales**



- **Fermentación**

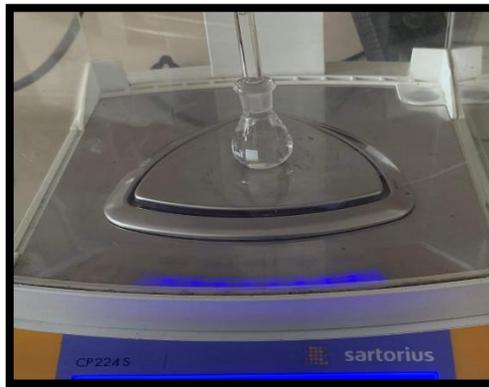


- **Determinación de Contenido de Etanol**





- **Método del picnómetro**



- **Destilación**

