



## **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO**

### **“EFECTO DE LA TEMPERATURA Y PH SOBRE EL PROCESO INDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE *COLOCASIA ESCULENTA* (PAPA CHINA)”**

**ÁNGEL EUCLIDES ACÁN ACÁN**

Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, presentado ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAGÍSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA APLICADA**

**Riobamba - Ecuador**

Noviembre - 2020

©2020, Ángel Euclides Acán Acán

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.



CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, titulado “EFECTO DE LA TEMPERATURA Y pH SOBRE EL PROCESO INDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE *Colocasia esculenta* (PAPA CHINA)” de responsabilidad del Sr. Ángel Euclides Acán Acán ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida; PhD.

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_

Ing. Mabel Mariela Parada Rivera, Mag.

**DIRECTOR**

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Marcelo Ramos Flores; Mag.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

Ing. Mayra Paola Zambrano Vinuesa, MSc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

Riobamba, noviembre de 2020

## DERECHOS INTELECTUALES

Yo, Acán Acán Ángel Euclides, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



---

Acán Acán Ángel Euclides

**CEDULA**

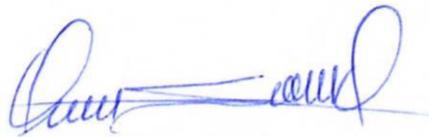
**0604359158**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Ángel Euclides Acán Acán, declaro que el presente **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, es de mí autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor(a), asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.

Riobamba, septiembre de 2020



---

Acán Acán Ángel Euclides

**CEDULA**

**0604359158**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la vida y estar siempre conmigo, guiándome en mi camino.

A mi hijo, por ser mi pequeño motor y poder ser un orgullo y ejemplo para él, decirle que es razón de ser de mi presente, mi futuro, y ha sido la motivación para concluir esta meta.

A mi esposa y a mis padres, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

.

**Ángel Acán**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida, por la fuerza que me da día tras día para seguir luchando por mis objetivos.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por permitirme realizar este trabajo de investigación brindándome todas las facilidades.

A mi Familia, que sin ellos no hubiera logrado una meta más en vida profesional, gracias por estar a mi lado en esta etapa de mi posgrado, su apoyo moral y entusiasmo que me brindaron para seguir adelante en mis propósitos compartiendo sus experiencias, conocimientos y consejos, por su amor.

A mi director de tesis y tutores, por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado a este nivel.

Finalmente, a todas aquellas personas, colegas y amigos que me brindaron su tiempo apoyo e información para alcanzar este logro.

**Ángel Acán**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Planteamiento del Problema. . . . .</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1 Situación Problemática. . . . .</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Formulación del Problema. . . . .</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3 Sistematización del problema . . . . .</i>	<i>3</i>
<b>1.2 Justificación. . . . .</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Objetivos de la investigación . . . . .</b>	<b>4</b>
<i>1.3.1 Objetivo General . . . . .</i>	<i>4</i>
<i>1.3.2 Objetivos Específicos . . . . .</i>	<i>4</i>
<b>1.4 Hipótesis . . . . .</b>	<b>4</b>
<i>1.4.1 Hipótesis general . . . . .</i>	<i>4</i>
<i>1.4.2 Hipótesis específicas . . . . .</i>	<i>4</i>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Antecedentes del problema . . . . .</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Bases Teóricas . . . . .</b>	<b>7</b>
<i>2.2.1. Raíces y Tubérculos . . . . .</i>	<i>7</i>
<i>2.2.2. Origen . . . . .</i>	<i>8</i>
<i>2.2.2.1. Colocasia esculenta (papa china) .....</i>	<i>8</i>
<i>2.2.3. Características botánicas de la Colocasia esculenta . . . . .</i>	<i>9</i>
<i>2.2.4. Composición química Colocasia esculenta . . . . .</i>	<i>10</i>
<i>2.2.5. Valor nutricional de la C. esculenta . . . . .</i>	<i>11</i>

2.2.6.	<i>Producción de papa china (Colocasia esculenta) en el Ecuador</i>	11
2.2.7.	<i>Almidón</i>	12
2.2.7.1	Generalidades	12
2.2.7.2	Propiedades físicas del almidón	13
2.2.7.3	Usos del almidón	13
2.2.8.	<i>Hidrólisis del Almidón</i>	15
2.2.8.1.	Hidrólisis ácida	15
2.2.8.2.	Hidrólisis enzimática	16
2.2.9.	<i>Producción de etanol</i>	17
<b>CAPÍTULO III</b>		
3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b>	20
3.1	<b>Tipo de Investigación</b>	20
3.1.1	<i>Investigación Correlacional</i>	20
3.2	<b>Diseño de la Investigación</b>	20
3.2.1	<i>Experimental</i>	20
3.3	<b>Métodos de investigación</b>	20
3.3.1	<i>Ubicación del ensayo</i>	20
3.3.2	<i>Caracterización del lugar</i>	21
3.3.3	<i>Obtención de materia prima</i>	21
3.3.4	<i>Obtención del almidón de C. esculenta</i>	21
3.3.5	<i>Caracterización bromatológica de C. esculenta</i>	22
3.3.6	<i>Hidrólisis del Almidón</i>	22
3.3.6.1.	Gelatinización	22
3.3.6.2.	Licuefacción	23
3.3.6.2.	Sacarificación	23
3.3.6.4.	Fermentación	23
3.3.6.5	Destilación	23
3.3.7	<i>Diseño Experimental</i>	24

3.3.8	<i>Tratamiento</i> . . . . .	24
3.3.9	<i>Análisis de Datos</i> . . . . .	25
3.4	<b>Enfoque de la investigación</b> . . . . .	25
3.5	<b>Alcance de la investigación</b> . . . . .	25
3.6	<b>Población de estudio</b> . . . . .	25
3.7	<b>Unidad de análisis</b> . . . . .	26
3.8	<b>Selección de la muestra</b> . . . . .	26
3.9	<b>Tamaño de muestra</b> . . . . .	26
3.10	<b>Técnicas de recolección</b> . . . . .	26
3.10.1	<i>Datos primarios</i> . . . . .	26
3.10.2	<i>Datos Secundarios</i> . . . . .	26
3.11	<b>Instrumentos de Recolección</b> . . . . .	27
3.11.1	<i>Datos primarios y datos secundarios</i> . . . . .	27
3.12	<b>Instrumentos para procesar datos.</b> . . . . .	27
 <b>CAPÍTULO IV</b>		
4.1	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
4.1.1	<b>Rendimiento proceso de hidrólisis enzimática</b> . . . . .	34
4.2	<b>Comprobación de la Hipótesis</b> .....	34
4.2.1	<i>Hipótesis General</i> . . . . .	38
4.2.2	<i>Hipótesis específica 1</i> . . . . .	39
4.2.3	<i>Hipótesis específica 2</i> . . . . .	39
4.2.4	<i>Hipótesis específica 3</i> . . . . .	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....		41
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		42
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Clasificación taxonómica.....	10
<b>Tabla 2-2:</b> Composición química de los tubérculos de <i>C. esculenta</i> .....	10
<b>Tabla 3-2:</b> Características físico-química de los carbohidratos de <i>C. esculenta</i> .....	11
<b>Tabla 4-2:</b> Valores de energía, proteína y calcio de la raíz <i>C. esculenta</i> frente a otras raíces por cada 100 g. de porción comestible, base fresca.....	11
<b>Tabla 5-2:</b> Provincias productoras de papa china <i>C. esculenta</i> en Ecuador .....	12
<b>Tabla 6-2:</b> Propiedades de diferentes tipos de almidones.....	14
<b>Tabla 7-2:</b> Rendimiento de cultivos para producción de alcohol por tonelada (peso fresco) y ciclo productivo de diferentes cultivos .....	15
<b>Tabla 1-3.</b> Tratamientos (T= temperatura, H= pH).....	25
<b>Tabla 2-3.</b> Equipos y reactivos utilizados.....	27
<b>Tabla 1-4.</b> Caracterización bromatológica de <i>C. esculenta</i> base seca.....	28
<b>Tabla 2-4.</b> Sacarificación del almidón de <i>C. esculenta</i> a diferentes temperaturas y pH.....	28
<b>Tabla 3-4.</b> Destilación para la obtención de bioetanol de <i>C. esculenta</i> (todos los datos son expresados en % excepto donde se mencione lo contrario) .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-2:</b> Planta y tubérculo de papa china <i>C. esculenta</i> .....	9
<b>Figura 2-2:</b> Molécula de almidón .....	13
<b>Figura 3-2:</b> Proceso hidrólisis enzimática del almidón.....	16
<b>Figura 1-3:</b> Diagrama de obtención de almidón de <i>C. esculenta</i> .....	22
<b>Figura 2-3:</b> Diagrama de obtención de bioetanol a partir de almidón de <i>C. esculenta</i> .....	24

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-4:</b> Grados Brix en el proceso de sacarificación <i>C. esculenta</i> .....	29
<b>Gráfico 2-4:</b> Residuo en el proceso de sacarificación <i>C. esculenta</i> .....	30
<b>Gráfico 3-4:</b> Volumen del destilado del bioetanol de <i>C. esculenta</i> sometida .....	32
<b>Gráfico 4-4:</b> Grado alcohólico de <i>C. esculenta</i> sometida a diferentes pH y temperaturas .....	33
<b>Gráfico 5-4:</b> Grados Brix del producto obtenido en el proceso de fermentación .....	33
<b>Gráfico 6-4:</b> Análisis de varianza .....	35
<b>Gráfico 7-4:</b> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados .....	36
<b>Gráfico 8-4:</b> Efectos de variable de forma individual para GL .....	36
<b>Gráfico 9-4:</b> Interacción de variables para GL .....	37
<b>Gráfico 10-4:</b> Probabilidad e histograma para análisis de residuo .....	38

## ÍNDICE ANEXOS

**Anexo A:** Proceso de obtención de almidón de *C. esculenta*

**Anexo B:** Descripción de proceso de obtención de glucosa

**Anexo C:** Proceso de obtención de bioetanol

**Anexo D:** Datos de análisis de variables del programa Statistic

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china). La caracterización bromatológica se realizó siguiendo los métodos descritos por Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990), donde se obtuvo un porcentaje de humedad de 81 %, proteína de 5.84 %, almidón 12.44 %, grasa 1.3 %, fibra 2.1 % y ceniza 3.2 %., para evaluar las variables en estudio en los procesos de sacarificación y destilación se evaluaron tres temperaturas: 40, 60, y 80 °C y tres pH: 4, 6 y 8. En el proceso de sacarificación se obtuvo que con los tratamientos T2H2 (60 °C, pH 6), y T1H2 (40 °C y pH 6), presentaron la mayor cantidad de grados brix con valores de 16.033 y 16.00 % respectivamente, el cual permitió deducir que a estas temperaturas se obtienen mayor conversión.. En la etapa de destilación los tratamientos T1H1 (40 °C, pH 4), y T1H2 (60 °C, pH 4) presentaron el mayor volumen de destilado (53 y 47 ml) respectivamente. Los valores de grados brix del destilado es menor en el tratamiento T1H2 infiriendo que el proceso de sacarificación fue eficaz ya que se redujo los grados brix de 16 a 0.999 por ciento, concluyendo que para obtener un mayor volumen de bioetanol es recomendable utilizar temperaturas entre 40 y 60 °C y pH ácidos entre 4 y 6. De las variables analizadas, es recomendable, que para la etapa de sacarificación con glucoamilasa en la obtención de bioetanol a partir de *C. esculenta* por hidrólisis enzimática utilizar temperaturas de 55°C, y pH ácido de 5 unidades.

**Palabras claves:** <INGENIERIA Y TÉCNOLOGÍA QUÍMICA>, <HIDROLISIS ENZIMÁTICA>, <SACARIFICACIÓN>, <DESTILACIÓN>, <GRADOS BRUX>, <FERMENTACIÓN>, <PAPA CHINA (*Colocasia esculenta*)> <BIOETANOL>.

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the effect of temperature and pH on the industrial process for obtaining bioethanol by enzymatic hydrolysis from *Colocasia esculenta* (Chinese potato). The bromatological characterization was carried out following the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990), where a humidity percentage of 81%, protein of 5.84%, starch 12.44%, fat 1.3%, fiber 2.1% and ash were obtained. 3.2%. To evaluate the variables under study in the saccharification and distillation processes, three temperatures were evaluated: 40, 60, and 80 ° C and three pH: 4, 6 and 8. In the saccharification process it was obtained that with the treatment T2H2 (60 0C, pH 6), and T1H2 (40 0C and pH 6), they presented the highest amount of brix degrees with values of 16.033 and 16.00% respectively, which allowed to deduce that at these temperatures higher conversion is obtained. In the distillation stage the treatments T1H1 (40 0C, pH 4), and T1H2 (60 0C, pH 4) presented the highest volume of distillate (53 and 47 ml) respectively. The brix degree values of the distillate are lower in the T1H2 treatment, inferring that the saccharification process was effective since the brix degrees were reduced from 16 to 0.999 percent, concluding that to obtain a greater volume of bioethanol it is advisable to use temperatures between 40 and 60 0C and acidic pH between 4 and 6. Of the variables analyzed, it is recommended that for the saccharification stage with glucoamylase in obtaining bioethanol from *C. esculenta* by enzymatic hydrolysis, use temperatures of 550C, and an acid pH of 5 units.

**Key words:** <CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY>, <ENZYMATIC HYDROLYSIS>, < SACCHARIFICATION>, <DISTILLATION>, <BRIX GRADES>, <FERMENTATION>, <CHINESE POTATO (*Colocasia esculenta*)> <BIOETHANOL>.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

En Perú, Calderón y colaboradores califican la producción de alcohol etílico a partir de papa china amazónica como “muy prometedora” en comparación con la basada en caña de azúcar o de maíz, esto por su alto contenido de hidratos de carbono fácilmente fermentables (Calderón, V., 2003).

En el estudio sobre obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano (*Cavendish gigante*) en la provincia de el Oro, se determinó la actividad enzimática de tres tipos de enzimas, encontrando que el banano es una fuente significativa de almidones que pueden ser hidrolizados a azúcares fermentables para la producción de bioetanol, Además determinaron que la mejor enzima para la hidrólisis fue el de glucosamilasa, con la que se obtuvo 7,11 °GL de bioetanol; resaltando como parámetros de mayor influencia en el rendimiento al pH y la temperatura del proceso (Espinoza Alvarado, 2015).

La investigación sobre “Producción de etanol a partir de biorreactor de tanque agitado con control de variables” se califica a la papa china como uno de los más prometedores sustratos para la obtención de etanol en nuestro país, por su alto contenido de hidratos de carbono fácilmente fermentables, la rusticidad de la planta y los altos rendimientos obtenidos (Téllez, 2009).

### 1.1 Planteamiento del Problema.

#### 1.1.1 Situación Problemática.

El aumento de la demanda energética, la acelerada disminución de las reservas de hidrocarburos, la preocupación por altos niveles de contaminación y el calentamiento global han conllevado a la utilización de combustibles mezclados con alcohol carburante (Castaño, 2008).

Los impactos del uso de gasoil y gasolina se deben al proceso de extracción, y continúan provocando al momento del uso o consumo del producto siendo los que causan impactos más severos y notorios sobre la salud humana y el ambiente (Castaño, 2008).

Los combustibles como el bioetanol, obtenidos a partir de productos vegetales están tomando importancia, principalmente por sus costos más económicos y menor efecto contaminante (Gonzales, 2008).

La *Colocasia esculenta* (papa china) es un producto poco conocido por la sociedad en el ámbito de su beneficio como alimento o su extracción de derivados que se podría obtener de este producto y esto ha hecho que su comercialización sea de poca demanda (Usucachi, 2011).

En el Ecuador el principal uso de *Colocasia esculenta* (papa china) es el consumo humano y alimentación animal. En la industria su uso es escaso debido a su perecibilidad del producto, por lo que se busca procesarla y dar un valor agregado. Se ha propuesto, como una alternativa, la obtención de alcohol a partir de almidón de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica (Lozada, 2005).

En la provincia de Morona Santiago un alto porcentaje de la producción de *Colocasia esculenta* (papa china) se limita al consumo humano, lo cual ha hecho que su precio en el mercado no represente mayor ganancia para el productor y, según la Corporación de Programa de Exportaciones e Inversiones (CORPEI), la producción de *Colocasia esculenta* (papa china) a nivel nacional es alrededor del 80 % anual, entre pequeños y medianos productores (Armas Francisco, 2012)).

Debido a esta problemática se busca una estrategia de dar un valor agregado al producto a través de sus derivados, como es la obtención de bioetanol.

Dentro de los cultivos que pueden ser utilizados como fuentes de biocombustibles, la *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica es una opción con características idóneas para reemplazar materias primas tradicionales como la caña de azúcar y el maíz, y con rendimientos comparables, ya que, al igual que estas materias primas se ha evidenciado que la *Colocasia esculenta* (papa china) contiene alta cantidad de almidón para el proceso de obtención de bioetanol (Michelle, 2008).

### **1.1.2 Formulación del Problema.**

¿La temperatura y el pH influyen en el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china)?

### ***1.1.3. Sistematización del problema***

La investigación realizada al proceso de producción de bioetanol mediante hidrólisis enzimática es prominente, para lo cual se planteó la siguiente pregunta:

¿La temperatura y el pH influyen en el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china)?

### **1.2 Justificación.**

La producción de biocombustibles es una alternativa a las problemáticas producidas por el consumo de combustibles fósiles, mismos que generan contaminantes que producen impactos severos en el ambiente y en el ser humano (Salinas, 2009).

Con la producción de bioetanol se contribuirá de forma práctica la reducción del impacto ambiental que ayudarían a combatir el cambio climático al sustituir una parte del consumo de los combustibles fósiles también se considera que el bioetanol será una materia prima muy competitivo en cuanto a precio y calidad comparado con los combustibles fósiles, además con el empleo de los biocombustibles se puede reducir drásticamente las emisiones de CO<sub>2</sub> (Salinas, 2009)).

De forma teórica se menciona que la investigación del proyecto contribuirá para futuras investigaciones, ya que se tiene una base de estudio con el cual se podría mejorar la calidad de bioetanol en cuanto a rendimiento y/o buscar otras alternativas de proceso de obtención.

La producción de *Colocasia esculenta* (papa china) en la Provincia de Morona Santiago por hectárea en promedio es de 800 quintales y su costo por quintal en el mercado es de 14,00 USD. Valor que puede incrementarse al utilizarla para la producción de bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china), para su potencial utilización en diferentes industrias que incluyen farmacéutica y de combustibles. En este último caso, como un negocio favorable en países eminentemente agrícolas, como Ecuador (Armas Francisco, 2012).

La investigación también beneficiaría a los productores de *Colocasia esculenta* (papa china), dinamizando así la comercialización del producto, dando un valor agregado y estímulo a la

producción de este tubérculo; llevando en último término a la promoción de fuentes de trabajo en las localidades aledañas.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### ***1.3.1 Objetivo General***

Determinar el valor más adecuado de temperatura y pH sobre el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china).

#### ***1.3.2 Objetivos Específicos***

- Caracterizar la composición Bromatológica (Carbohidratos) de la *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica
- Determinar las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y pH) para el proceso de hidrólisis enzimática (glucoamilasa) en la obtención de bioetanol a partir de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica.
- Determinar la influencia que tiene la temperatura y pH sobre el rendimiento de bioetanol obtenido por hidrólisis enzimática de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica
- Definir, en base a cálculo de ingeniería y las variables óptimas de temperatura y pH, el diseño adecuado para la producción de bioetanol en un sistema de hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica y permitan una máxima obtención de bioetanol.

### **1.4 Hipótesis**

#### ***1.4.1. Hipótesis general***

¿El efecto de la temperatura y pH sobre el proceso industrial si influyen para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática de *Colocasia esculenta* (papa china)?

#### ***1.4.2. Hipótesis específicas***

- ¿La composición bromatológica (carbohidratos) de *Colocasia esculenta* (papa china) de la ciudad de Macas si es similar a la reportada en bibliografía?

- ¿Las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y pH) sí existe para el proceso de hidrólisis enzimática ( $\alpha$ -amilasa) en la obtención de bioetanol a partir de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica?
- ¿Existe una combinación de condiciones de temperatura y pH que, aplicadas a la hidrólisis enzimática de papa china, permita una máxima obtención de bioetanol?
- ¿El cálculo de ingeniería y las variables óptimas de temperatura y pH, si permiten el diseño adecuado para la producción de bioetanol en un sistema de hidrólisis enzimática a partir de *Colocasia esculenta* (papa china) y permiten una máxima obtención de bioetanol?

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 2.1 Antecedentes del problema

Benavides (2011), manifiesta que se pudo producir una bebida alcohólica a partir de hidrolisis enzimática utilizando las enzimas *Termamyl 120 L*, y *Fungamyl 800L*.

Calderón (2003), estima que la obtención de etanol utilizando como materia prima papa china amazónica es muy promisoría en comparación al proceso de obtención de etanol a partir de caña de azúcar o de maíz, debido a su elevado contenido de polisacáridos y azúcares.

Según Espinoza (2015), la mejor enzima para obtener etanol a partir de almidón de banano (*Cavendish gigante*) mediante hidrolisis enzimática fue la *glucoamilasa* con la cual se obtuvo etanol con 7.11 °GL, cuyo mayor rendimiento se logró controlando el pH y temperatura en el proceso hidrolítico. También resalta que el banano presenta un elevado contenido de almidón mismo que puede ser hidrolizado en azúcares.

Castaño y Mejía (2008), en su estudio para obtención de etanol a partir de almidón de yuca, proceso en el cual se realizó de manera conjunta las etapas de sacarificación y fermentación se determinó que la obtención de etanol se llevó a cabo en menor tiempo, con lo cual concluye que fue debido a que la glucosa producida fue utilizada por la levadura de manera inmediata para la síntesis de etanol. Concluyendo además que pH ácidos (4.5-5.5) y temperaturas de (60 y 80 °C) son las condiciones óptimas para la alfa amilasa y glucoamilasa respectivamente.

Ruiz, (2012), manifiesta que al utilizar 0.0280 gramos de alfa amilasa y 0,0631de glucoamilasa por cada 100 gramos de almidón de yuca, un medio con pH 5,0 -80 °C para alfa amilasa y pH 4,5 -70 °C para la glucoamilasa, logró obtener jarabe de glucosa que fue utilizada como materia prima para obtener bioetanol mediante hidrólisis enzimática.

Murgas y Vásquez, (2012), aseveran que se puede obtener bioetanol utilizando almidón de ñame indistintamente de su variedad (*Dioscórea rotundata*, *Dioscórea alata* y *Dioscórea trifida*) utilizando hidrolisis enzimática y fermentación, demostraron además que en la etapa de licuefacción el

porcentaje de sólidos solubles totales (% Brix) tienen una relación directa con el contenido de azúcares reductores.

El elevado contenido de almidón de vituca (72%) la convierte en una fuente rica para la obtención de alcohol, el proceso de sacarificación se realizó en dos etapas. Para la etapa de licuefacción se utilizó  $\alpha$ -amilasa bacteriana, mientras para la etapa de sacarificación se utilizó  $\alpha$ -amilasa fúngica. El producto obtenido de la hidrólisis fue sometido a fermentación con, *Saccharomyces uvarum*, luego de 7 días de fermentación 12.9 % de etanol fueron obtenidos. Los valores de pH y el % de Brix en el proceso de fermentación disminuyeron de manera significativa de 4.50 a 3.82 y de 15 a 2 respectivamente, lo cual indica que la sacarificación se realizó de manera correcta. El medio con pH ácido proporciona un ambiente adecuado para que la levadura actúe efectivamente. El contenido de azúcar se redujo considerablemente y el nivel de etanol pasó de 0 a 12,9 %. La densidad varió de 1.0000-0.9830 lo cual se debe relacionar con la conversión de los azúcares contenidos en el fermento a etanol. Indicando que la vituca es una excelente alternativa como materia prima comparada a otros productos debido a su alto contenido de almidón (72%) de igual manera para un rendimiento elevado en la producción de etanol es necesario el uso de  $\alpha$ -amilasa bacteriana y  $\alpha$ -amilasa fúngica.

Malagón (2009), considera a la yuca como una materia prima competente para la producción de etanol en el Ecuador, debido a que sus carbohidratos son viables para el proceso de fermentación alcohólica. Lizarazo *et al.*, (2015) estudiaron tres variedades de papa en el proceso industrial para obtener etanol, encontrando un rendimiento del 83 % al realizar la hidrólisis enzimática como etapa previa a la fermentación manifestando que el uso de almidón de papa es factible para este propósito.

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1. Raíces y Tubérculos**

Montaldo, (2009), se incluyen alimentos con un elevado contenido de energía proveniente de los cultivos de raíces y tubérculos los cuales presentan bajos niveles de proteína, al compararlos con alimentos derivados de animales. No obstante, suministran energía de bajo costo, ya que su producción es económica.

Las raíces y cormos están compuestos por un elevado contenido de sacárido, principalmente almidón y azúcares, dependiendo de la variedad sus niveles difieren según los cultivos (Victor, 2003;Eduardo,

1998). Existen algunas especies que se clasifican de acuerdo a su taxonomía, de igual manera su producción variara según el manejo agronómico, zonas de cultivo, clima y otros constituyentes agronómicos

### **2.2.2. Origen**

La *Colocasia esculenta* (papa china) tubérculo comestible originario de Asia, entre la India, Malasia e Indonesia, probablemente originaria de África Occidental. Extendiéndose el cultivo hacia el este por la Polinesia, Filipinas, Japón y China. La *Colocasia esculenta* se ubica en el undécimo cuarto sitio en a nivel mundial entre los rizomas de consumo básico con un área cultivada de 2 millones de hectáreas y un rendimiento de 12 millones de Toneladas (Caicedo, 2013; Deo, 2009; Bustos & Rodríguez, 2001). La introducción en América ocurrió posterior al arribo de los colonos occidentales (Armas Francisco, 2012).

#### **2.2.2.1. *Colocasia esculenta* (papa china)**

Caicedo, (2016) y Lovato (2010) indican que se encuentra especialmente en zonas climáticas con alta luminosidad, temperaturas cálidas corresponden a la familia Aráceas. Ha sido utilizada por los seres humanos desde hace décadas para alimentación, por el cual es codiciada desde tiempos antiguos. Es un cultivo de clima cálido, es muy utilizado entre los agricultores por múltiples motivos, desarrolla incansablemente bien en suelos con características nutricionales bajas, es fácil de cultivar, exige poco cuidado, resiste la humedad presenta buena productividad en comparación a otros cultivos. *C. esculenta* es comercializada para consumo inmediato, la mayor parte de su producción sirve para exportación y el resto para consumo local.

El *C. esculenta* fue descubierta en Ecuador, en la provincia del Oro. Se lo considera un tubérculo fructífero desde el punto de vista mercantil, por su gran demanda de parte de las empresas extranjeras como Unión Europea, Estados Unidos y Centroamérica entre otros, debido a las investigaciones de sus características medicinales y nutricionales que presenta este tubérculo lo que hace del taro o papa china sea un alimento básico para sustentación diaria (Hernández, *et al.*, 2013; Estrada, *et al.*, 2009).

En el Ecuador el cultivo se ha agrupado en pequeños y medianos agricultores los cuales representan 80 % de producción nacional, que corresponde a 2.500 Ha (Lozada, 2005). Las zonas que recolectan son Costa y Oriente, siendo las provincias de mayor participación, Los Ríos, Pastaza, Morona

Santiago, Santo Domingo de los Tsáchilas y Napo; gran parte de su producción es destinada a la exportación (Rodríguez, 2017).

Lozada (2005) enuncia que la producción orgánica *C. esculenta* se ubica en el quinto lugar a nivel mundial dentro de los cultivos de raíces y tubérculos, siendo este uno de los cultivos producidos de manera orgánica con mayores extensiones en las regiones amazónicas del Ecuador.

### 2.2.3. Características botánicas de la *Colocasia esculenta*

Vulgarmente conocida como papa china o taro (*C. esculenta*) es una planta tropical herbácea perenne, que se caracteriza por su raíz, que forma un cormo de apariencia escamoso y dimensiones variables, que nacen en rosetas, el final de largos peciolo (Lozada, 2005), El color de su pulpa, suele ser de blanco nieve, en algunos tipos puede encontrarse rosado – amarillento e incluso anaranjado. Las hojas son peltadas en apariencia de flecha, el peciolo de la hoja anexada a varias pulgadas del zócalo “V” de la hoja (Ver Figura 1 – 2). Su clasificación taxonómica es la siguiente (Tabla 1 – 2) (Ararat, Sinesterra, & Hernández, 2014).



**Figura 1-2:** Planta y tubérculo de papa china *C. esculenta*

Fuente: Caicedo, (2013)

**Tabla 1-2:** Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Tipo:</b>	Angiospermeae.
<b>Clase:</b>	Monocotiledóneas.
<b>Orden:</b>	Aroideas.
<b>Familia:</b>	Aráceae.
<b>Género:</b>	Colocasia.
<b>Especie:</b>	<i>Colocasia esculenta</i>
<b>Nombre común:</b>	pituca, taro, malango, papa china, culin, danchi, guagua

Fuente: Morin (1983); Onwueme (2003)

Existe una diversidad botánica de papa china, las cuales se caracterizan por dividirse en dos ejemplares principales; el tipo *dasheen*, en el cual el cormo es grande y los cormelos más pequeños y el tipo *eddoe* que posee tubérculos más pequeños y cormelos más grandes, siendo estas clasificadas como variedades botánicas diferentes a los *dasheen* y *eddoe*, bajo esta clasificación el tipo *dasheen* son de *Colocasia esculenta* variación *Esculenta*, mientras que los de tipo *eddoe* es *Colocasia esculenta* variación *Antiquorum* (Onwueme, 2003).

#### 2.2.4. Composición química *Colocasia esculenta*

En la Tabla 2 – 2. Composición bromatológica de las raíces *C. esculenta* y el Tabla 3 – 2. Se detalla las características físico-química de los carbohidratos de *C. esculenta*.

**Tabla 2-2:** Composición bromatológica de las raíces *C esculenta*

Componentes	% base húmeda	% base seca
Humedad	74,3	---
Proteína	1,5	5,8
Grasa	0,6	2,3
Fibra	0,9	3,5
Ceniza	1,2	4,7
Carbohidratos)	21,5	83,7
Almidón (g/100g)	---	13,8
Acido oxálico (g/100g)	---	15,6

Fuente: Amos, (1969)

**Tabla 3-2:** Características físico-química de los carbohidratos *C. esculenta*

Carbohidratos	% base seca
Almidón	77,0
Pentosanas	2,6
Fibra cruda	1,4
Dextrina	0,5

Fuente: Amos, (1969)

### 2.2.5. Valor nutricional de la *C. esculenta*

La raíz de *C. esculenta* es considerado como una ración básica en la mesa de la población de bajos recursos económicos de las zonas donde se cultiva el tubérculo gracias a las características proteicas del fruto húmedo que varía de 1,7 a 2,5 %. (Amos, 1969). En la Tabla 4 – 2. Se coteja los componentes de la raíz de la papa china frente a otras raíces.

**Tabla 4-2:** Valores de Energía, Proteína y calcio de la raíz *C. esculenta* frente a otras raíces por cada 100 g de porción comestible, base fresca

Alimento	Kcal.	Proteína (g)	Ca. (g)
<i>C. esculenta</i>	8,5	2,5	19,1
Camote	103	1	14
Papa	76	1,6	17,5
<b>M. esculenta</b>	121	1	28,2

Fuente: Olguín, (2011)

### 2.2.6. Producción de papa china (*Colocasia esculenta*) en el Ecuador

Las zonas donde se cultiva *C. esculenta* en el Ecuador son las provincias de Napo, Sucumbíos, Orellana, Pastaza, Santo Domingo y Morona Santiago.

**Tabla 5-2:** Provincias productoras de papa china *C. esculenta* en Ecuador

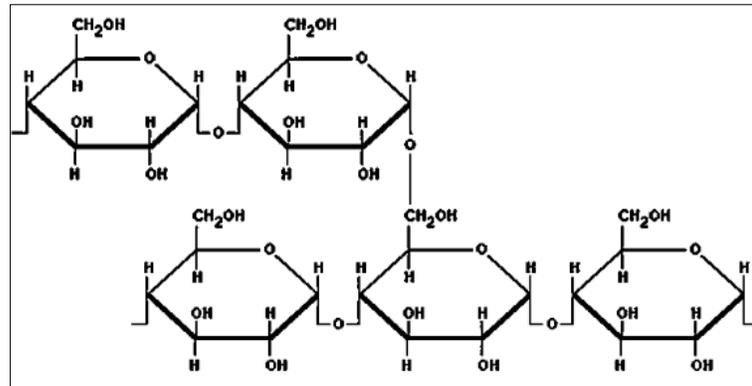
<b>PROVINCIA</b>	<b>UPAs</b>	<b>Superficie Cosechada (Ha)</b>	<b>Cantidad Cosechada (Ha)</b>	<b>Cantidad Vendida (Ha)</b>
<b>Morona Santiago</b>	65,43	46,44	30,65	7,40
<b>Santo Domingo</b>	35,53	38,82	149,56	149,56
<b>Manga Del Cura</b>	1,64	4,91	43,11	43,11
<b>Los Rios</b>	2,29	8,86	67,07	67,07
<b>Guayas</b>	1,07	4,27	8,71	8,71

Fuente: Caicedo,2013

### 2.2.7. Almidón

#### 2.2.7.1 Generalidades

El almidón es un producto orgánico de mayor distribución en el reino vegetal, es un producto de reserva en los vegetales que se excreta durante la asimilación durante el proceso fotosintético. Se almacena en las raíces tuberculosas que servirán de reserva alimenticia para el desarrollo de los tejidos en la etapa de crecimiento de los vegetales. El anhídrido carbónico que se obtiene del aire, la radiación solar y el agua utilizados por las plantas para producir glucosa como producto intermedio. En las plantas se encuentran como gránulos sólidos intracelulares o moléculas definidas con cuyo diámetro es de 1 – 100  $\mu\text{m}$ ; se los clasifica de acuerdo a su origen ya que las propiedades físicas de estos difieren considerablemente de una variedad a otra que las propiedades de los gránulos y su aspecto físico varían ampliamente de una planta a otra. El grano de almidón está formado por 2  $\alpha$ -glucanos, el amilopectina (alrededor del 80 %) como elemento externo y amilosa (alrededor del 20 %) como elemento interno, que corresponde al 98 y 99 % del peso de granulo. Dichos polisacáridos difieren por sus características físicas y químicas (Espinosa, 2012; Knorr, *et al*, 2006; Anaya, 2004; Thomas & Atwell, 1999; Hans, 1987).



**Figura 2-2:** Molécula de almidón

Fuente: Sotoj, (2016)

Diversos alimentos poseen almidón en abundancia, como es el caso de *Colocasia esculenta* (papa china) amazónica. De manera industrial se lo obtiene por vía húmeda. El almidón de fuentes naturales se obtiene después de romper el tejido vegetal; por ejemplo, al pasar la papa por un extractor de jugos se obtiene un líquido con un residuo lechoso, ese residuo lechoso es el almidón, el cual debe someterse a varios lavados para eliminar las impurezas y obtener un polvo blanco, fino, insípido, constituido por granos con características microscópicas específicas para cada variedad (Espinosa, 2012; Gil & Ruíz, 2010).

#### 2.2.7.2 Propiedades físicas del almidón

Se lo encuentra en forma de harina o aglomeraciones angulares irregulares, varía de un blanco lechosos a tonos cremas, insoluble en agua fría y solventes orgánico, cuando se lo somete a ebullición presenta alta viscosidad tomando 15 su peso en agua, lo cual es debido a que los granos se hidratan, se llenan y rompen provocando que sus componentes formen una jalea estable y transparente al enfriarse (Gil & Ruíz, 2010; Salama, 2016). La densidad oscila entre 1,62 a 1,65 g/cm<sup>3</sup>, dicha solución reacciona con el yodo produciendo una coloración azul, el cual a una temperatura de 93 °C se vuelve incolora, y al enfriarse toma nuevamente un color azul (Salama, 2016).

#### 2.2.7.3 Usos del almidón

Se considera que el almidón es una de las principales fuentes de energía en la alimentación humana debido a que es producido en abundancia por los vegetales y el ser humano lo ha utilizado desde sus

orígenes. Con el incremento de productos procesados por empresas alimenticias y la facilidad de obtención de almidón prosperó su utilización. Tiene extraordinarias aplicaciones en los procesos industriales de elaboración de alimentos por sus características bromatológicas y su importancia en el mercado (Torres et al, 2013; Costas, 2009; Espin, *et al*, 2004).

La Tabla 6 – 2. Propiedades de amilopectina y la amilosa, por lo cual se hace la comparación con otros almidones observando los siguientes resultados de composición de la *C. esculenta* con 75 % de amilopectina y 25 % de amilosa.

**Tabla 6-2:** Propiedades de diferentes tipos de almidones

<b>Tipo</b>	<b>Amilopectina (%)</b>	<b>Amilosa (%)</b>	<b>Tamaño (micras)</b>
<b>Maíz</b>	73	23	5-25
<b>Maíz amiláceo</b>	20-45	55-80	5-25
<b>Papa</b>	78	22	5-100
<b>Arroz yuca</b>	83	17	2-55
<b>Yuca</b>	82	18	5-35
<b>Maíz céreo</b>	99-100	0-1	5-25
<b>Sorgo</b>	99-100	0-1	5-45
<b>Trigo</b>	76	24	11-41
<b>Oca</b>	71	29	20-29
<b>Mashua</b>	73	27	5-10
<b>Vituca</b>	75	25	4-11

Fuente: Morales, (2012)

Opara y Mejía, (2003), manifiestan que a nivel mundial se presenta una intranquilidad debido a la poca reserva de energía de fuentes no renovables, así como también por la toxicidad provocada por los hidrocarburos hacia la atmósfera. La obtención de etanol utilizando como materia prima azúcares que provienen de distintos almidones de tubérculos podrían reemplazar el uso de combustibles de fósiles; las raíces comestibles servirán como fuente para la producción de energía. El alcohol obtenido de yuca y cereales presenta mayor rendimiento que el de la papa china, pero la producción de ésta es mayor que otros cereales y caña dulce, lo que se puede apreciar en la tabla 7.2. Estados Unidos considera que la transformación de biomasa de almidón en alcohol ideal es de 1.67 kg de almidón transformado a 1 litro de alcohol.

**Tabla 7-2:** Rendimiento de cultivos para producción de alcohol por tonelada (peso fresco) y ciclo productivo de diferentes cultivos

<b>Cultivos</b>	<b>Rendimiento del alcohol (Litro.t<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ciclo productivo</b>
<b>Papa china</b>	142	9 – 15
<b>Patata dulce</b>	142	5
<b>Caña de azúcar</b>	67	10 – 22
<b>Sorgo dulce</b>	76.7	4
<b>yuca</b>	180	12
<b>Maíz</b>	385	3.5
<b>Trigo de primavera</b>	368	4
<b>Grano de sorgo</b>	389	3.5

Fuente: Wang e Higa, (1983)

### 2.2.8. Hidrólisis del Almidón

Proceso químico por cual el almidón reacciona con el agua y se transforma en moléculas más pequeñas de polisacáridos como amilosa y amilopectina que son azúcares con menor peso molecular. La hidrólisis puede llevarse a cabo por acción de enzimas o por soluciones acidas y calor, lo que facilita la ruptura de los enlaces glucosídicos. El proceso hidrolítico se ve afectado por el tamaño de los granos de almidón a mayor tamaño la ruptura e hidratación tomara más tiempo y viceversa debido a la superficie de contacto. Otros factores que afectan el proceso hidrolítico son cantidad de lípidos y su interacción con los corpúsculos de amilosa, concentración de fosforo, difusión e interacción de los enlaces de almidón. En el complejo amilosa -lípido no se lleva acabo fácilmente el proceso hidrolítico. (Voet, *et al* 2009; Bugg, 2004).

El enlace glucosídico reacciona con el hidrogeno del agua el cual se entrelaza con el oxígeno final de la molécula de azúcar, y el hidroxilo se une al otro extremo del azúcar produciéndose un monosacárido, el resto de la molécula se rompe como otro monosacárido o disacárido dependiendo del número de monosacáridos del glucósido (Zambrano & Machado, 2013; Vázquez & Dacosta, 2007).

La hidrólisis acida tiene muchas desventajas, comparado con el proceso de hidrólisis enzimático, radica en la formación de subproductos no deseables, demanda de alta carga energética en el proceso, se requiere el uso de altas presiones y altas temperaturas, por último, es necesario que el equipo resista el ácido empleado en este proceso, haciendo muy viable la técnica del uso de las enzimas, en cuanto a control de la formación de productos no deseables y mayor flexibilidad del producto (Castaño, 2008; Espinel & López, 2009).

#### 2.2.8.1. Hidrólisis ácida

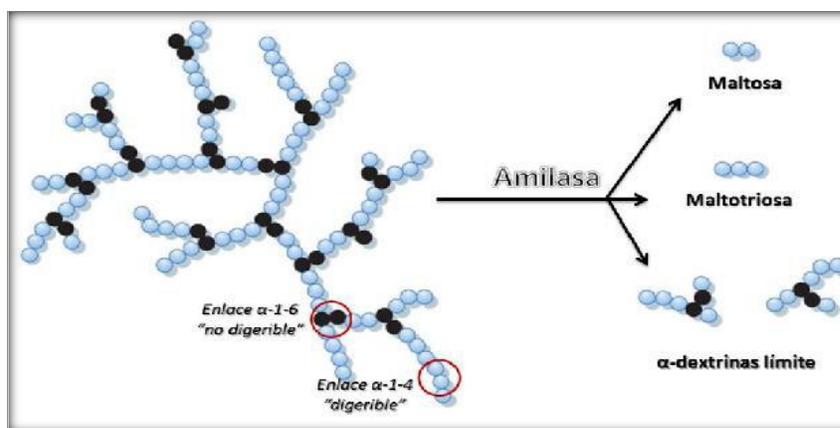
En medio ácido y calor el almidón se romperá en cadenas más cortas de dextrinas. La ruptura de enlaces dependerá del tipo de ácido utilizado, la concentración del mismo, la temperatura y tiempo de reacción. El ácido clorhídrico, nítrico y sulfúrico son los más utilizados para los procesos de obtención de dextrinas, obteniéndose como productos jarabes de glucosa, también se obtiene como productos no deseados el hidroximetilfurfural, el ácido levulónico y el ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo (Rojas & Cabanillas, 2008; Cortes, Gonzáles, & Fernando, 2008; Voet, Voet, & Charlotte, 2009).

#### 2.2.8.2. Hidrólisis enzimática

Espín, Villacres y Brito (2004) manifiesta que las rupturas hidrolíticas catalizada por una enzima es una reacción en la cual el almidón se rompe en unidades monoméricas llamadas azúcares, La primera etapa se utiliza enzimas termoestables (etapa de licuefacción), en la segunda etapa (sacarificación) se transforma el almidón en glucosa para lo cual se utiliza otro tipo de enzimas.

La ruptura de los enlaces enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 se lleva a cabo con amilasa enzimática, se lleva a cabo en tres etapas: gelatinización, licuefacción y sacarificación. Para cada etapa existe una enzima específica. (Voet, Voet, & Charlotte, 2009; Badui, 2006).

La hidrólisis va siendo reemplazada por las reacciones enzimáticas puesto que cada vez existe en el mercado de nuevos tipos de enzimas. Las enzimas difieren de los fermentos químicos tradicionales en diversos aspectos importantes (Voet, Voet, & Charlotte, 2009).



**Figura 3-2:** Proceso hidrólisis enzimática del almidón

Fuente: Badui, (2006)

La conversión del almidón para obtener aminoácidos biológicamente activos presenta mayor rendimiento utilizando hidrólisis enzimática. Posee mayor ventaja frente a la hidrólisis química en rendimiento y costos de producción (Rojas & Cabanillas, 2008).

*Gelatinización.* – Para que se dé la reacción del almidón con amilasas éste debe estar primeramente gelatinizado; para lo cual se lo somete a calentamiento. El proceso de gelatinización del almidón es una ruptura molecular, proceso en el cual el almidón al ponerse en contacto con agua fría se hidrata y con temperatura se hincha, hasta que a determinada temperatura la estructura del granulo se destroza y su birrefringencia desaparece además la viscosidad de la solución se incrementa.

*Licuefacción.* - Cuando el almidón esta gelatinizado la etapa de licuefacción convierte al almidón en glucosa, la temperatura de esta etapa dependerá de la enzima a ser utilizada el almidón debe previamente ser gelatinizado para el proceso de licuefacción, el cual transforma los gránulos a glucosa.; Las enzimas que se utilizan son la alfa amilasa que son termoestables como *Bacillus licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, que operan entre 67,5° - 72,5° C y pH de 5,7 (Escudero, 2015).

En la reacción con Lugol se observa un color rojo, lo que indica reacción positiva para cadenas de amilosa mayor a 40 unidades (Zambrano & Machado, 2013; Tester, Kakarlas, & Qui, 2004).

*Sacarificación.* – En esta etapa se añade comúnmente glucoamilasa en una relación de 0.22 ml de enzima por cada 100 g de sustrato, La reacción se lleva a cabo de 24 a 36 horas, hasta un valor de 96 °C o superior. Los parámetros recomendables son un pH entre 4 y 6 y a una temperatura entre 50 °C y 65 °C en un tiempo entre 90 y 120 minutos de reacción” (Mora, 2014; Usucachi, 2011).

### **2.2.9. Producción de etanol**

Carriazo (2012), Manifiesta que el etanol se lo obtiene por fermentación de azucres que se encuentran en biomasa vegetal, en un proceso de fermentación, proceso en el cual intervienen microorganismos específicos en medios con condiciones aptas: pH entre 4 y 5. Pudiendo distinguir 4 pasos fundamentales:

*Acondicionamiento de la materia prima:* Se elimina la biomasa que no presenta características óptimas.

*Hidrólisis de almidón:* El objetivo en esta etapa es obtener azúcares mismos que serán utilizados en el siguiente proceso.

*Fermentación alcohólica:* Bajo la acción de levaduras se produce la fermentación para obtener etanol, el tiempo para esta etapa va a depender del método utilizado.

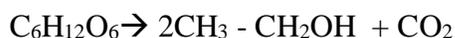
*Fermentación.* - Fermentación se define como el proceso de reacciones químicas que experimenta una sustancia orgánica de origen vegetal libre de nitrógeno, entre ellas están los hidratos de carbono o sus derivados, con la utilización de microorganismos específicos, la reacción se caracteriza por producción de gas y energía. (Madigan, 2004).

Girón y Funes, (2013), Describen a la fermentación es una reacción anaerobia que transforma moléculas complejas en sencillas, la fermentación característica es llevada por las levaduras, y otros microorganismos.

Suarez, (2008). Manifiesta que dependiendo de su estructura molecular que está formada la materia prima dependerá el tipo de pretratamiento previamente a ser sometidas al proceso de fermentación ya sea por acción de bacterias, levaduras, las materias primas que contienen sacarosa pocas veces necesitan pretratamiento a diferencia de las que contienen celulosa las cuales se deben someter a hidrólisis para ser reducidas azúcares más pequeños para poder ser fermentados.

Por medio de la labor enzimática se lleva a cabo la fermentación de glucosa y fructosa en etanol y dióxido de carbono. La primera es continuamente recirculada desde una centrífuga ubicada aguas abajo del fermentador. Los gases formados en la fermentación son enviados a una torre de adsorción en la cual se debe recuperar el 98 % en masa del etanol arrastrado ( (Cardona, Sánchez, Montoya, & Quintero, 2005).

En la etapa de fermentación se obtiene el alcohol, el cual no es puro está unido a sustancias no alcohólicas, entre los cuales tenemos aldehídos, furfural, esteroides, ácidos, alcoholes superiores y otros que acompañan al alcohol etílico, Se emplea destilación por arrastre de vapor para la segregación (Lindeboom, Chang, & Rodríguez, 2004).



*Destilación:* En esta etapa se procederá a la deshidratación del líquido fermentado obteniendo en mejor concentrado de alcohol (Usucachi, 2011). Siendo esta una operación unitaria que consiste en la separación de los componentes de una mezcla líquida (en la que todos los compuestos son más o menos volátiles) por evaporación y condensación sucesivas. La separación se basa en la diferencia de volatilidades absolutas de los componentes, lo que tiene como consecuencia la formación de un vapor de composición diferente a la del líquido del que procede (Murgas, 2012).

En la selección de las tecnologías se aplicará una metodología de evaluación cualitativa donde se tienen en cuenta las ventajas y desventajas de cada tecnología con respecto a aspectos económicos y ambientales (Cardona, *et al.*,2005).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo de Investigación

##### *3.1.1 Investigación Correlacional*

Relaciona variables medibles como el pH, temperatura para la producción de bioetanol mediante hidrólisis enzimática. El problema y las Hipótesis están planteadas en forma de valorar las respuestas de una variable frente a los valores lo que permitió recabar la información acerca de la influencia del pH y temperatura sobre la producción de bioetanol.

#### 3.2 Diseño de la Investigación

##### *3.2.1 Experimental*

La investigación fue de carácter experimental ya que se utilizó un diseño de bloques completos al azar en arreglo factorial tres por tres con tres repeticiones los cuales consistían en la aplicación de diferentes temperaturas (40, 60, 80) y pH (4,6,8) para la producción industrial de bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de *C. esculenta* amazónica.

#### 3.3 Métodos de investigación

##### *3.3.1 Ubicación del ensayo*

La presente investigación se realizó en el Centro de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el Cantón Cevallos, Provincia de Tungurahua, a 20 Km al sur de Ambato con una altitud de 2850 m.s.n.m. cuyas coordenadas geográficas son: 01° 22' 0.2" de latitud Sur y 78° 36' 22" de longitud Oeste.

La obtención de almidón, caracterización bromatológica de *C. esculenta* y el ensayo para la obtención de bioetanol se lo realizó en el laboratorio de Análisis de Suelos y aguas del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

### ***3.3.2 Caracterización del lugar***

Según la Estación Meteorológica de primer orden ubicada en la Granja Experimental Docente Querochada, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, los datos meteorológicos de los años 2005 al 2009, expresan que esta zona es templada, con temperatura media de 12,5 °C, y precipitación anual de 600 mm, humedad relativa de 77 % y velocidad de viento de 4,2 m/s.

Todos los tratamientos desde la recepción de la materia prima hasta la obtención de bioetanol se realizaron en la Granja Experimental Docente Querochada, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

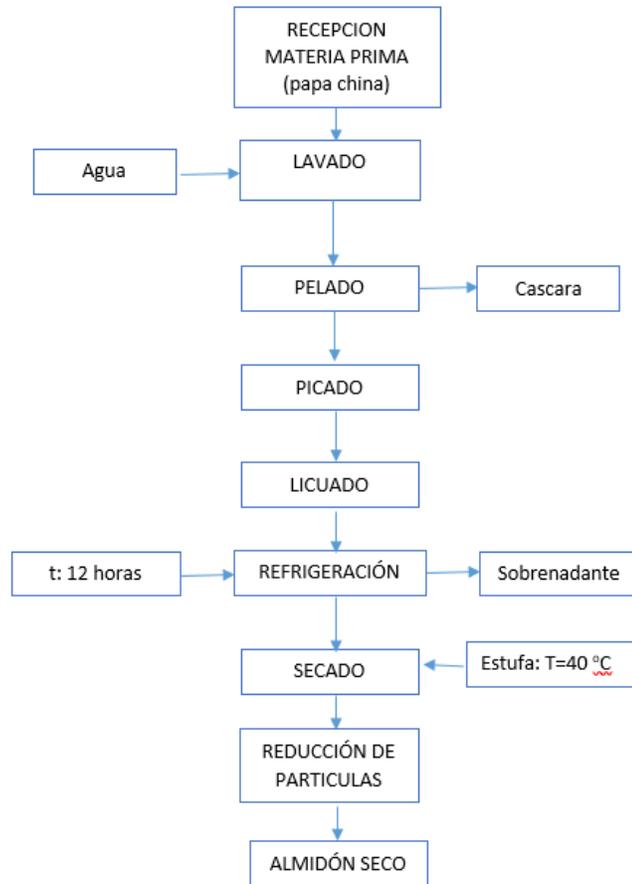
### ***3.3.3 Obtención de materia prima***

La muestra para esta investigación se obtuvo de los mercados locales de la ciudad de Macas cabecera cantonal de la provincia de Morona Santiago, a donde llegan los agricultores de la zona con su producción a vender.

### ***3.3.4 Obtención del almidón de C. esculenta***

La materia prima se lavó con agua potable, se retiró la corteza con ayuda de un cuchillo, se picó en trozos pequeños y se licuó con agua en una relación (1:3), la solución lechosa recogida en una tina se tamizó a través de un paño de algodón para eliminar fibra residual, el producto obtenido se decantó a 4 °C, luego de este tiempo se desechó el sobrenadante, se volvió a adicionar agua, se agitó nuevamente y se dejó reposar por otras 12 h, finalmente se desechó el sobrenadante obteniéndose una pasta blanca.

El almidón obtenido se sometió a secado en estufa a 40 °C hasta que alcance una humedad del 10 por ciento.



**Figura 1-3:** Diagrama de obtención de almidón de *C. esculenta*  
 Realizado por: Acán Ángel

### 3.3.5 Caracterización bromatológica de *C. esculenta*

En la caracterización bromatológica de *C. esculenta*, se determinaron los contenidos de humedad, cenizas, proteína bruta, fibra de acuerdo con los métodos descritos por Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990), y carbohidratos se lo realizo por cálculo matemático.

### 3.3.6 Hidrólisis del Almidón

#### 3.3.6.1. Gelatinización

Se preparó una suspensión del almidón de *C. esculenta* al 20 % en agua destilada para todos los tratamientos y repeticiones, se colocó sobre una placa de agitación a 300 rpm con temperatura controlada, esta etapa se realizó a 90 °C por 10 minutos.

#### 3.3.6.2. Licuefacción

Posterior a la gelatinización se bajó la temperatura a 70 °C, se colocó nuevamente en la plancha de agitación y se añadió la enzima  $\alpha$  amilasa marca ANKOM 0.5 ml por cada tratamiento, se agregó 2 mg de calcio cloruro. Se ajustó la temperatura 70 °C y se dejó que la reacción se lleve a cabo por cuatro horas, a una velocidad de agitación de 200 rpm, al final de la reacción se midió pH y grados brix.

#### 3.3.6.2. Sacarificación

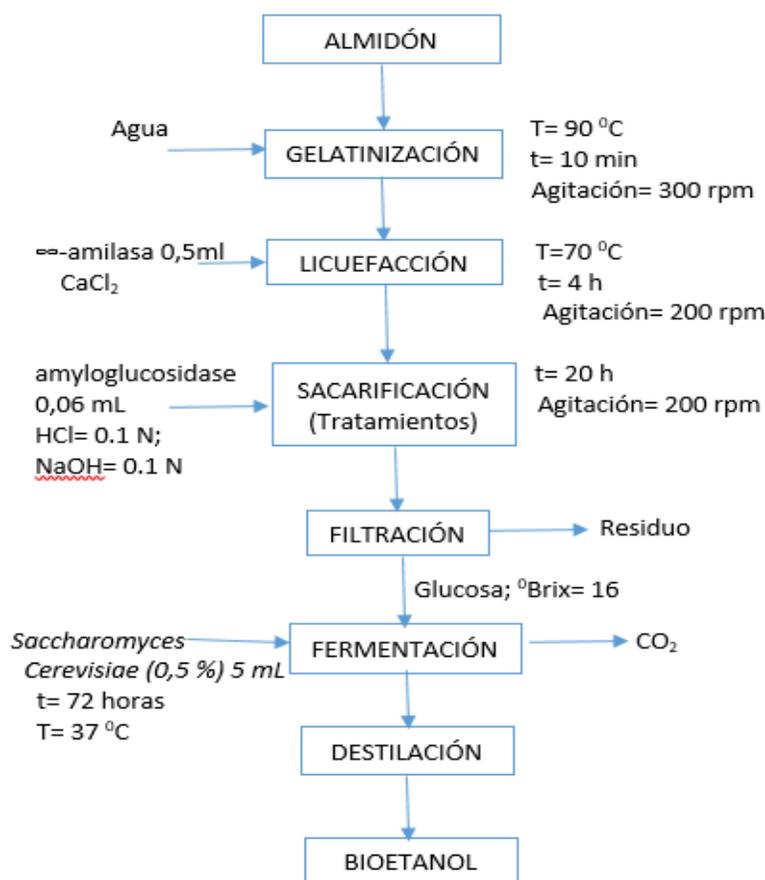
A las soluciones obtenidas de la etapa anterior se les ajustó el pH con una solución de HCl 0.1N y NaOH 0,1 N hasta llegar a los factores establecidos en el diseño experimental ( 4, 6 y 8 unidades de pH), de igual manera la temperatura se ajustó de acuerdo a los parámetros establecidos como variables ( 40, 60 y 80 °C) para la etapa de sacarificación, se añadió la enzima amyloglucosidase marca SIGMA 0.06 ml para cada tratamiento, esta etapa se realizó por un tiempo de 20 horas, los residuos insolubles fueron filtrados, al final de esta etapa se midió pH, grados brix, y se procedió a filtrar con un embudo buchner, se pesó los residuos de esta etapa para poder calcular, el % de conversión del almidón

#### 3.3.6.4. Fermentación

Para esta etapa se utilizó una solución de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) al 0.5 %, se disolvió la levadura en poca cantidad de agua caliente (37 °C) con azúcar con la finalidad de activarla, una vez activada se procedió a añadir 5ml a cada uno de los tratamientos, se armó el equipo de fermentación de manera hermética para evitar el ingreso de oxígeno, se colocó los diferentes tratamientos en estufa a temperatura controlada (37 °C) esta etapa se llevó a cabo por 72 horas, se midió los °Brix y pH al final de la fermentación.

#### 3.3.6.5 Destilación

Los productos de la fermentación anaerobia de los distintos tratamientos se sometieron a destilación, evitando en lo posible la pérdida de muestra y producto por evaporación, se mide el volumen obtenido, la densidad, grados alcohólicos y con ayuda de un densímetro se determina los grados alcohólicos del producto final.



**Figura 2-3:** Diagrama de obtención de bioetanol a partir de almidón de *C. esculenta*  
Realizado por: Acán Ángel, 2020

### 3.3.7 Diseño Experimental

El diseño aplicado en la presente investigación es un diseño experimental de bloques completamente aleatorio, con arreglo factorial tres por tres, con tres tratamientos y 3 repeticiones. Todas las variables se analizaron según el diseño empleado mediante una ANOVA. La comparación de medias se realizó con la prueba estadística Tukey al 95 % de confianza.

### 3.3.8 Tratamiento

**Tabla 1-3:** Tratamientos (T= temperatura, H= pH)

Número	Tratamientos	Descripción de las variables	
1	T1H1	40 °C	4
2	T1H2	40 °C	6
3	T1H3	40 °C	8
4	T2H1	60 °C	4
5	T2H2	60 °C	6
6	T2H3	60 °C	8
7	T3H1	80 °C	4
8	T3H2	80 °C	6
9	T3H3	80 °C	8

Realizado por: Acán, Ángel, (2020)

### 3.3.9 Análisis de Datos

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico Statistics y el programa MS Excel.

### 3.4 Enfoque de la investigación

Corresponde a un enfoque cuantitativo, puesto que, en las diferentes etapas, desde la caracterización inicial de la *C. esculenta* amazónica, pasando por la experimentación, medición de rendimiento obtenido y expresión de relaciones de variables, todas involucran tanto la medición basada en análisis químico como aplicación de análisis estadísticos. La investigación al ser correlacional y experimental es de tipo cuantitativo esto es que debe ser lo más objetiva posible.

### 3.5 Alcance de la investigación

En la presente investigación se pretende determinar el efecto de Temperatura y pH sobre la obtención de bioetanol a partir de *C. esculenta*, el alcance de los resultados incluye a todas las poblaciones que cultivan este tubérculo en el oriente ecuatoriano, en cuanto a la utilización industrial de dicho tubérculo, y también a la región centro de Ecuador, en tanto a la generación de materia prima de interés para otros tipos de industrias.

### 3.6 Población de estudio

La población en estudio fue el producto agrícola *C. esculenta* producido en las localidades de la región amazónica que llega a ser comercializada en la ciudad de Macas.

### **3.7 Unidad de análisis**

Muestras de *C. esculenta* amazónica, sometidas a hidrólisis enzimática con alfa amilasa y amyloglucosidasa en condiciones controladas de temperatura y pH., para la obtención de bioetanol por fermentación anaerobia.

### **3.8 Selección de la muestra**

Se clasifico la materia prima eliminando aquellas que se encontraron en mal estado, la muestra de *C. esculenta* fue colocada sobre un mesón limpio luego de ser lavada procediendo a homogenizar, se formó una pila, se aplanó y cuarteó en porciones iguales, hasta obtener ocho kilos de muestra fresca para extraer el almidón y posteriormente realizar el ensayo de hidrólisis enzimática de acuerdo a los respectivos tratamientos.

### **3.9 Tamaño de muestra**

Se utilizó 1 kilo de muestra fresca por cada uno de los tratamientos para realizar la investigación.

### **3.10 Técnicas de recolección**

#### ***3.10.1 Datos primarios***

Se obtuvo a través de la observación directa para percibir activamente la realidad exterior con el propósito de obtener los datos que previamente han sido definidos de interés para la investigación, también con entrevistas a expertos en el área, experimentalmente, mediante análisis de laboratorio con la caracterización bromatológica de la materia prima para la identificación de las variables se realizó ensayos con diferentes pH y temperaturas para determinar el % de grados alcohólicos optimo del producto.

#### ***3.10.2 Datos Secundarios***

Fueron observados a partir de información bibliográfica, artículos y revistas científicas.

### 3.11 Instrumentos de Recolección

#### 3.11.1 Datos primarios y datos secundarios

**Tabla 2-3: Equipos y reactivos utilizados**

<b>Equipos -reactivos</b>	<b>Marca</b>
Estufa	Memmert
Molino	Fritch
Plancha de agitación –calentamiento	Ika C-mag
pH-metro	(BANTE-221 portable pH/ORP Meter
Brixómetro	Hanna
Balanzas analítica y digital	Ohaus
Refrigerador	Indurama
Analizador elemental	LEKO
Computadora portátil	Dell
Destilador	Wisd
Alcoholímetro Gay Lussac	Gay Lussac
Termómetro	De mercurio
Bandejas plásticas.	Sin marca
Tamiz (1 mm)	ASTM
Licuadaora	Oster
Erlenmeyer	boeco
Vasos de precipitación	boeco
Matraces aforados	boeco
Agitadores magnéticos	Sin marca
Enzimas	SIGMA, ANKOM
Fosfato de amonio	Merk p.a
Reactivo de benedic	Se prepara en el laboratorio
HCl 0.1N	Merk p.a
Na(OH) 0.1N	Merk p.a
CaCl <sub>2</sub>	Merk p.a

Fuente: Acán Ángel, 2020

### 3.12 Instrumentos para procesar datos.

Se utilizó el paquete estadístico Statistics y además el programa MS Excel.

## CAPÍTULO IV

### 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1-4:** Caracterización bromatológica de *C. esculenta* base seca

Parámetro	valor	unidad
Humedad	81	%
Proteína	5.84	%
Fibra	2.1	%
Grasa	1.3	%
ceniza	3.2	%
Almidón	12.44	%

Fuente: Realizado por: Acán, Ángel 2020

**Tabla 2-4.** Sacarificación del almidón de *C. esculenta* a diferentes temperaturas y pH

Tratamientos	Variables medidas	
	°Brix	Residuo
T1H1	15.07±0.737 ab	0.42±0.022a
T1H2	16.00±0.985a	0.61±0.015b
T1H3	14.90±1.305ab	1.00±0.085d
T2H1	15.07±0.907ab	0.83±0.012c
T2H2	16.03±0.651a	0.80±0.006c
T2H3	12.90±0.361bc	0.91±0.043cd
T3H1	11.53±0.711	0.50±0.039ab
T3H2	11.48±0.501	0.54±0.032ab
T3H3	11.33±0.862c	0.45±0.078ab
EEM	0.6473	0.0387
Valor de P	0.01	0.01

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ( $P < 0.01$ ). T1: 40 °C, T2: 60 °C, T3: 80 °C; H1: pH 4, H2: pH 6, H3: pH 8 EEM: error estándar de la media.

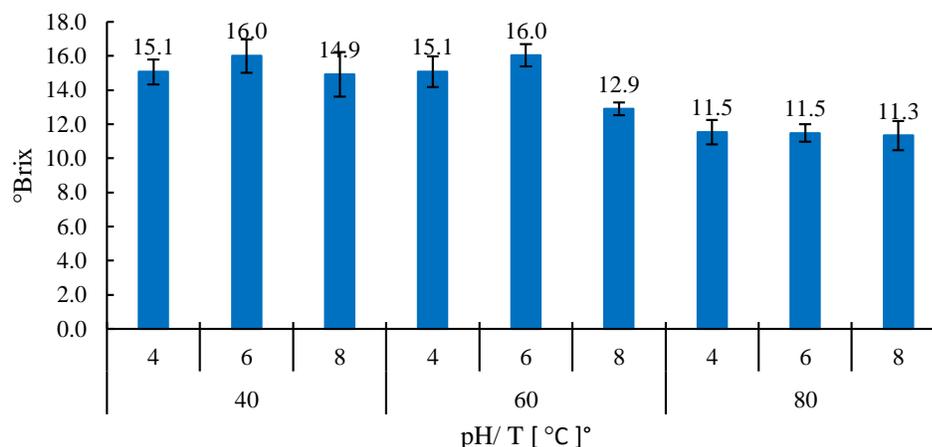
Realizado por: Acán, Ángel 2020

Al analizar la variable grados brix en el proceso de sacarificación del almidón de *C. esculenta*. Se determinó que los tratamientos T2H2 y T1H2 se ubicaron en el primer y segundo lugar en la prueba estadística con el rango a, con valores de 16.03 y 16.00 % de grados brix, mientras que en el último rango de la prueba estadística se ubica el tratamiento T3H3, lo que permite deducir que temperaturas entre 40 y 60 °C con un pH 6 influyen en un mayor grados Brix, Braide y Nwaogulkpe, (2011)

manifiestan que el alto porcentaje de almidón que posee la papa china constituye un excelente producto para la producción de alcohol.

En el método de sacarificación se utilizó la enzima glucoamilasa bacteriana (un agente de licuación) que degrada al almidón, reduciendo los grados brix de 15.0 a 2.0. Esto quiere decir que el proceso de sacarificación fue eficaz. El pH ácido proporciona un medio propicio para la actividad enzimática.

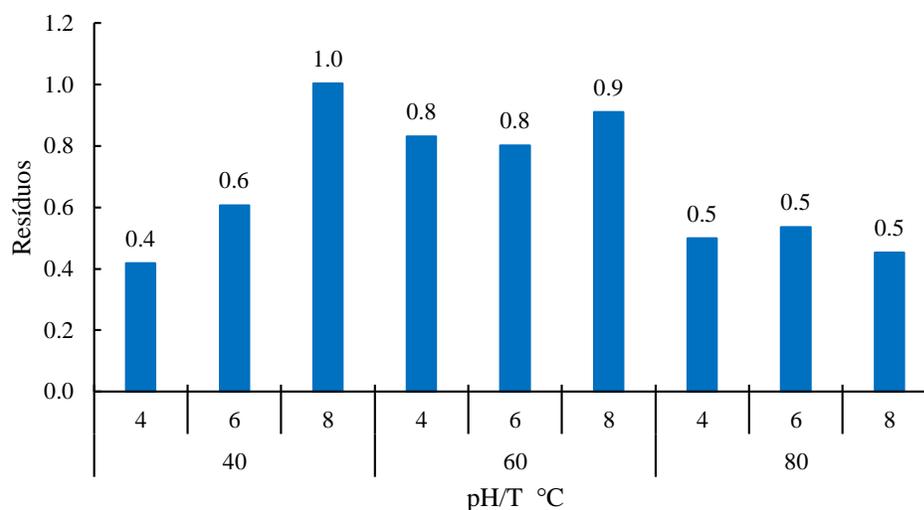
Escudero, (2015); Morales y Sánchez, (2012), Manifiestan que conviene que el almidón esté gelatinizado, para el proceso de licuefacción, en donde los gránulos de almidón de la suspensión se transformen en glucosa. La temperatura a la cual debe de ser calentada la solución para la licuefacción depende del tipo de enzima; pero por lo general actúan entre 67,5°C - 72,5 °C y pH de 5,7 unidades.



**Gráfico 1-4:** Grados Brix en el proceso de sacarificación *C. esculenta*  
Realizado por: Acán Ángel 2020

En la figura 1-4 se presenta en el eje X los valores de pH (Tratamientos 4,6,8) a temperaturas de 40, 60 y 80 °C. En el eje Y se encuentran los valores de grados brix, en donde los tratamientos T1H2 y T2H2 presentan mayores valores con 16 %, lo que permite deducir que temperaturas entre 40 y 60 °C con un pH 6 influyen en un mayor valor de grados Brix.

Según Mera, I. 2005. Las condiciones de operación de las enzimas en los procesos están limitadas por las propiedades específicas siendo lo más apropiado trabajar a condiciones entre pH 6.0 y 70 °C de temperatura cuando se trate la reacción con alfa-amilasa, y pH 4.8 y 65 °C de temperatura cuando se lleve la reacción en presencia de glucoamilasa, lo que se enfatiza con los resultados obtenidos.



**Gráfico 2-4:** Residuo en el proceso de sacarificación *C. esculenta*

Realizado por: Acán Ángel 2020

En la figura 2-4 se presenta en el eje X los valores de pH (Tratamientos 4,6,8) a temperaturas de 40, 60 y 80 °C. En el eje Y se encuentran los valores de los residuos obtenidos en el proceso de sacarificación, obteniendo menos cantidad de residuos (0.4 g) con el tratamiento T1H1. Lo que nos indica que el proceso de sacarificación del almidón de *C. esculenta*, fue más efectivo a 40° C y pH de 4.

**Tabla 3-4.** Destilación para la obtención de bioetanol de *C. esculenta* (todos los datos son expresados en % excepto donde se menciona lo contrario)

Tratamientos	Variables medido		
	ml de destilado	GL	°Brix
T1H1	53.00±2.646 a	4.66±0.577a	0.77±0.058a
T1H2	46.67±3.215 a	4.00±1.000a	0.900±0.1a
T1H3	28.00±4.000 b	0.67±0.577c	0.77±0.058a
T2H1	26.33±2.082 b	3.33±0.577ab	0.43±0.056b
T2H2	43.67±4.726 a	4.33±0.577bc	0.37±0.057bc
T2H3	23.33±2.082 bc	0.33±0.577c	0.30±0.00bc
T3H1	13.67±1.528cd	1.33±0.577bc	0.267±0.058bc
T3H2	10.33±1.53d	1.00±0.00c	0.267±0.058bc
T3H3	15.67±1.155cd	0.67±0.577c	0.233±0.058c
EEM	2.3544	0.4875	0.0500
Valor de P	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ( $P < 0.01$ ), ( $< 0.05$ ). T1: 40 °C, T2: 60 °C, T3: 80 °C; H1: pH 4, H2 :pH 6, H3: pH 8 EEM: error estándar de la media.

Realizado por: Acán, Ángel 2020

En la tabla 3-4 se presenta los resultados obtenidos para las variables, ml de destilado grado alcohólico (GL), grados brix del bioetanol obtenido de *C. esculenta*, mediante la prueba de Tuckey al 1 y 5 %, determinando que para la variable, volumen de destilado, con los tratamientos T1H1, T1H2 y T2H2 se obtuvo un mayor volumen de destilado con valores de 53.00, 46.67 y 43.67 ml respectivamente ubicándose en el primer lugar de la prueba estadística con un rango a, mientras que el tratamiento T3H2 se ubicó en el último lugar de la prueba estadística (rango d), con un valor promedio de 10.33 ml, lo que permite concluir que para obtener un mayor volumen de bioetanol es recomendable utilizar entre 40 y 60 °C y con pH ácidos entre 4 y 6.

El rendimiento de alcohol de la papa china tiene una mayor producción que la caña de azúcar y maíz dulce (Wang & Higa, 1983).

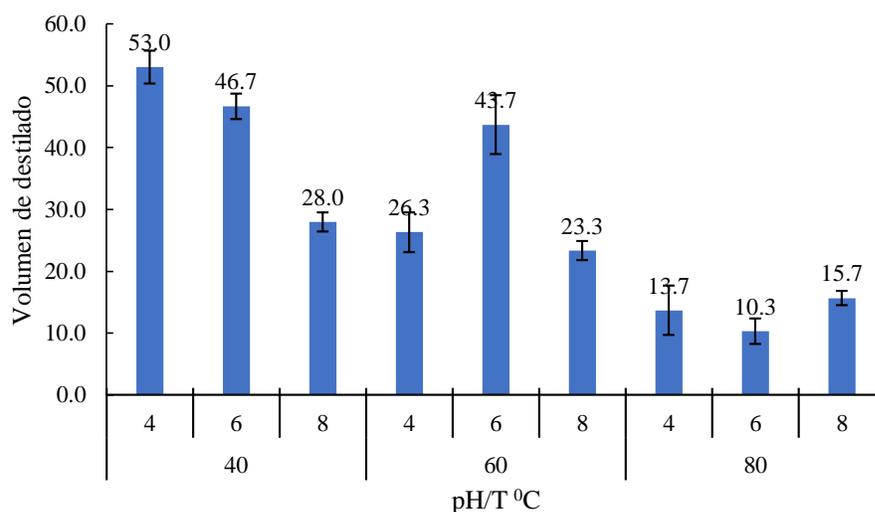
Braide y Nwaogulkpe, (2011), indican que el pH ácido proporciona un entorno adecuado para la actividad de la levadura. El nivel de azúcar disminuye, así como también la gravedad específica.

El grado alcohólico del bioetanol obtenido en el proceso de destilación muestran que los tratamientos T1H1, T2H2, T1H2 comparten el primer rango (a), con valores promedios de 4.667, 4.333, 4.000, respectivamente, mientras que el tratamiento T2H3 se ubica en el último lugar en la prueba estadística (rango c) con un valor de 0.333. Lo que permite inferir que para obtener un mayor grado alcohólico se debe realizar el proceso de sacarificación entre 40 y 60 °C, con pH ácidos de 4 a 6. Lo que concuerda con (Carriazo, 2012), quien indica que, la reacción química para obtener bioetanol se da al momento que los azúcares presentes en la materia prima se convierten en etanol en un ambiente con pH que varía de 4 a 5.

Al aplicar la prueba de comparación de medias (Tuckey al 5 %) en la variable grados brix en la solución obtenido en la fermentación, los tratamientos T1H2, T1H1 y T1H3 reportaron un promedio de 0.90, 0.77 y 0.77 grados brix respectivamente mientras que el tratamiento T3H1, T2H2 y T3H3 se ubica en el último lugar de la prueba estadística (rango bc) con un valor de 0.267, 0.267 y 0.233 respectivamente, lo que demuestra que la temperatura (40 °C) y el pH entre 4 – 6 influye positivamente en el valor de grados brix lo que significa que el proceso de sacarificación fue eficaz reduciendo los Brix de 16 a 0.90 (Tratamiento T1H2).

Los grados Brix (sólidos solubles totales) del caldo de fermentación se redujo significativamente de 15.0 a 2.0 respectivamente. La disminución en el nivel Brix se debe a que el azúcar en el caldo se convirtió en etanol.

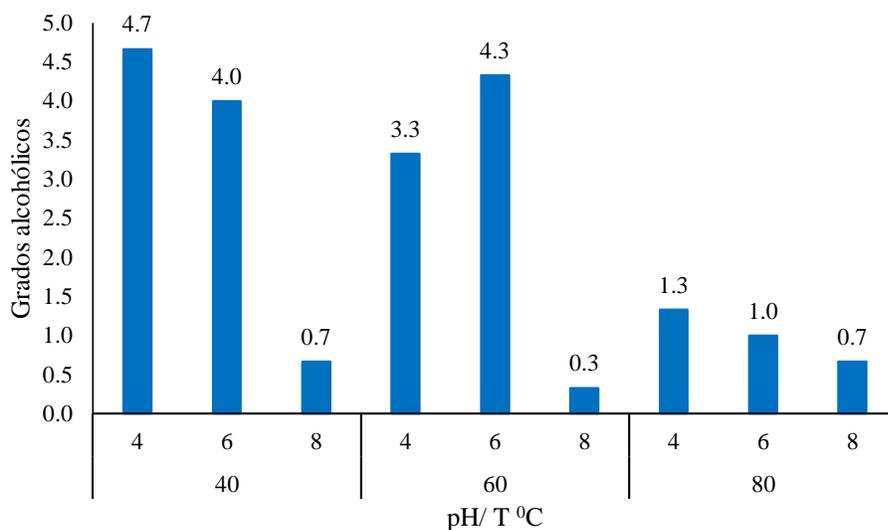
Castaño y Mejía, (2008), llegaron a la conclusión de que los procesos de sacarificación y fermentación simultánea reduce los tiempos de proceso debido a que conforme se produce glucosa la levadura va consumiendo y transformando a bioetanol, los parámetros adecuados de pH para la obtención de bioetanol son entre 4.5 a 5.5.



**Gráfico 3-4:** Volumen del destilado del bioetanol de *C. esculenta* sometida a diferente pH y temperatura

Realizado por: Acán Ángel, 2020

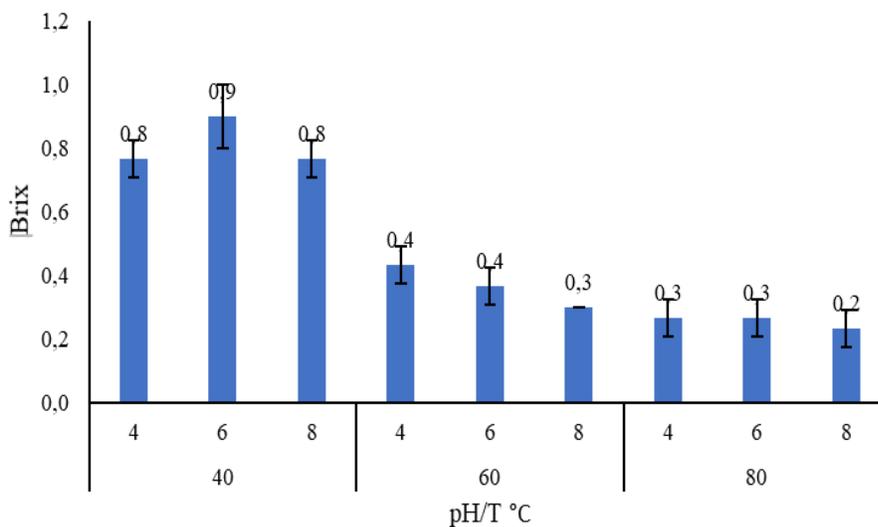
En la figura 3-4 se presenta en el eje X los valores de pH (4,6,8) a temperaturas de 40, 60 y 80 °C. En el eje Y se encuentran los valores del volumen de destilado en la etapa de destilación en donde se puede apreciar que los tratamientos T1H1 y T2H1 presentan valores de 53 y 47 ml respectivamente., lo que permite deducir que para obtener un mayor volumen de bioetanol es recomendable utilizar entre 40 y 60 °C de temperatura y pH ácidos entre 4 y 6 unidades.



**Gráfico 4-4:** Grado alcohólico de *C. esculenta* sometida a diferentes pH y temperaturas

Realizado por: Acán Ángel, 2020

En la figura 4-4 se presenta en el eje X los valores de pH (Tratamientos 4,6,8) a temperaturas de 40, 60 y 80 °C. En el eje Y se encuentran los valores de grados alcohólicos del destilado en donde el tratamiento T1H1 presentan el mayor valor (4.7), lo que permite inferir que para obtener un mayor grado alcohólico se debe realizar el proceso de sacarificación entre 40 y 60 °C, con pH ácidos de 4 a 6 unidades.



**Gráfico 5-4:** Grados Brix del producto obtenido en el proceso de fermentación de *C. esculenta* sometida a diferentes pH y temperatura

Realizado por: Acán Ángel, 2020

En la figura 5-4 se presenta en el eje X los valores de pH (Tratamientos 4,6,8) a temperaturas de 40, 60 y 80 °C. En el eje Y se encuentran los valores de grados brix del destilado en donde el tratamiento T1H1 presentan el menor valor de grados brix (rango a) lo que significa que el proceso de sacarificación fue eficaz reduciendo los Brix de 16 a 0.90 (Tratamiento T1H2).

Los costos de producción del alcohol de papa china fueron similares al de yuca o caña de azúcar, por la proporción de conversión almidón – alcohol óptima que es aproximadamente 1.67 Kg de almidón a 1 litro de alcohol (Opara & Mejía, 2003).

#### 4.1.1 Rendimiento proceso de hidrólisis enzimática

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g de glucosa obtenido}}{\text{g de almidón utilizado}} * 100$$

El tratamiento en el que se obtiene una alta conversión de almidón-glucosa se encuentra a condiciones de 60 °C y pH 6, por tanto, el rendimiento será:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\frac{16 \text{ g glucosa}}{100 \text{ g disolución}}}{\frac{20 \text{ g almidón}}{100 \text{ g disolución}}} * 100 = 80 \%$$

A las condiciones descritas y utilizando la alfa-amilasa y la glucosidase como enzimas el proceso de hidrólisis enzimática es viable, alcanzando una conversión del 80 % almidón-glucosa, siendo directamente proporcional en la obtención de bioetanol en las siguientes etapas del proceso.

#### 4.2 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Para la aceptación/rechazo de las hipótesis de investigación, el diseño de experimentos con los resultados obtenidos se analizó mediante el software Minitab, considerando los siguientes resultados:

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Respuesta</i>
Temperatura	1: 40 °C	Grado alcohólico GL
	2: 60 °C	
	3: 80 °C	
pH	1: 4	
	2: 6	
	3: 8	

El análisis del diseño factorial arrojó los siguientes resultados, que se discuten en cada caso:

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	76,519	9,5648	25,83	0,000
Lineal	4	61,481	15,3704	41,50	0,000
T	2	39,185	19,5926	52,90	0,000
pH	2	22,296	11,1481	30,10	0,000
Interacciones de 2 términos	4	15,037	3,7593	10,15	0,000
T*pH	4	15,037	3,7593	10,15	0,000
Error	18	6,667	0,3704		
Total	26	83,185			

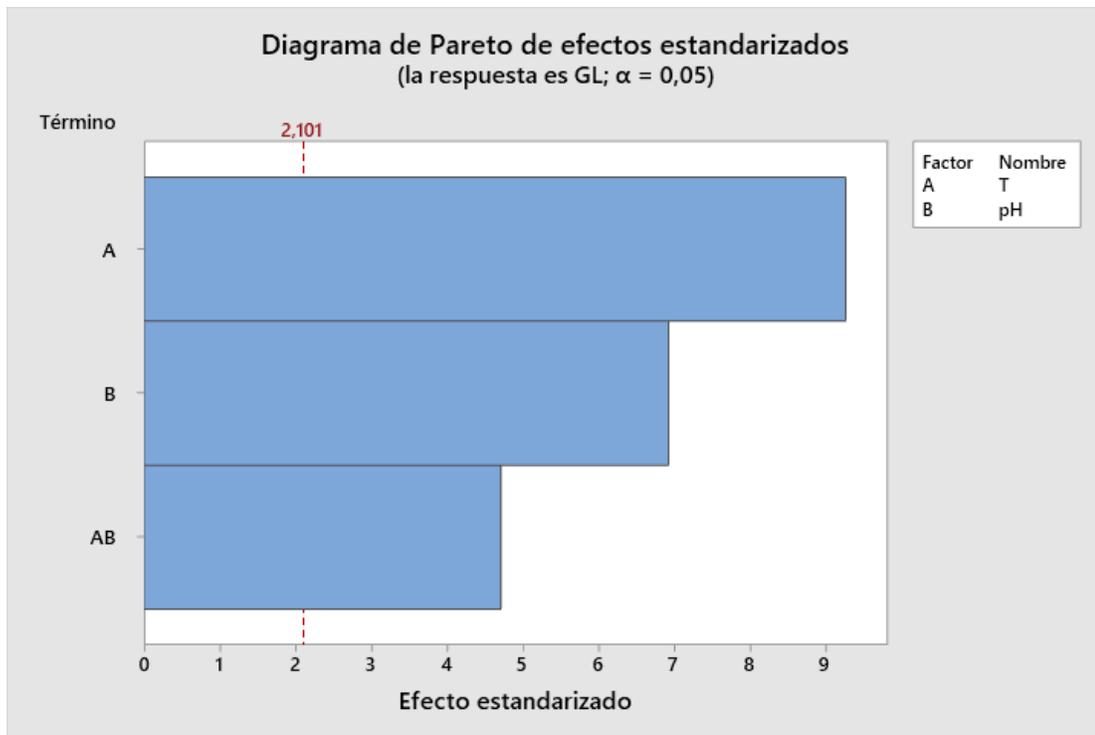
### Coeficientes

Término	EE del		Valor T	Valor p	FIV
	Coef	coef.			
Constante	2,259	0,117	19,29	0,000	
T					
40	0,852	0,166	5,14	0,000	1,33
60	0,852	0,166	5,14	0,000	1,33
pH					
4	0,852	0,166	5,14	0,000	1,33
6	0,407	0,166	2,46	0,024	1,33
T*pH					
40 4	0,704	0,234	3,00	0,008	1,78
40 6	-0,185	0,234	-0,79	0,439	1,78
60 4	0,037	0,234	0,16	0,876	1,78
60 6	0,815	0,234	3,48	0,003	1,78

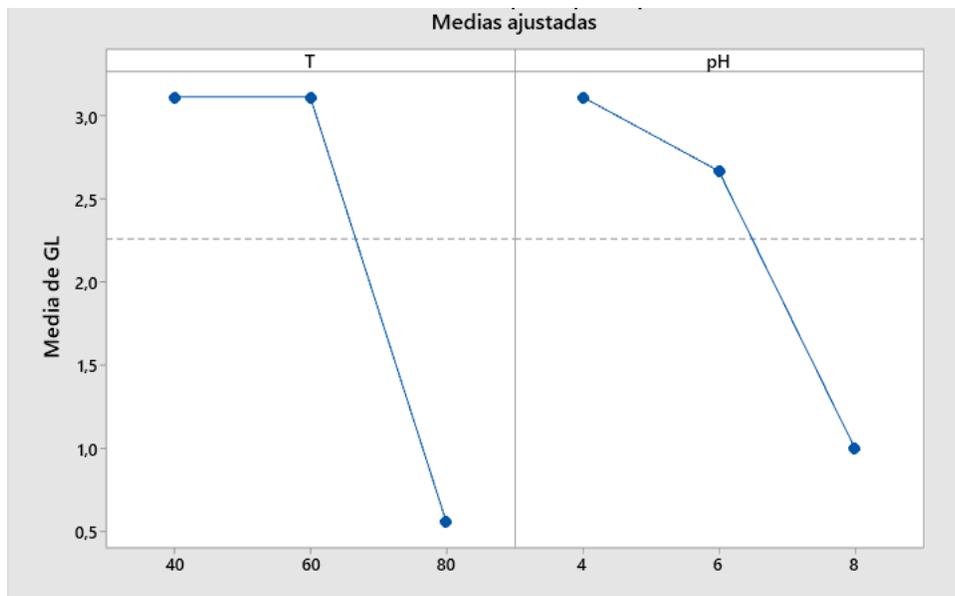
### Gráfico 6-4: Análisis de varianza

Realizado por: Acán Ángel, (2020)

El análisis de varianza, mediante los valores p (p-values), todos menores a 0,05, indica que todos los factores y niveles tienen un efecto sobre la variable respuesta, lo que es lógico considerando que en todos los casos se obtiene etanol; por lo tanto, se recurre a los coeficientes, en donde se observa que los valores p más relevantes ocurren en los efectos individuales, de los que el más significativo es de la temperatura, seguido del pH. Los valores p de los efectos combinados, indican que éstos no son significativos respecto al grado alcohólico obtenido. Esto último se hace más fácilmente evidenciable mediante el diagrama de Pareto.

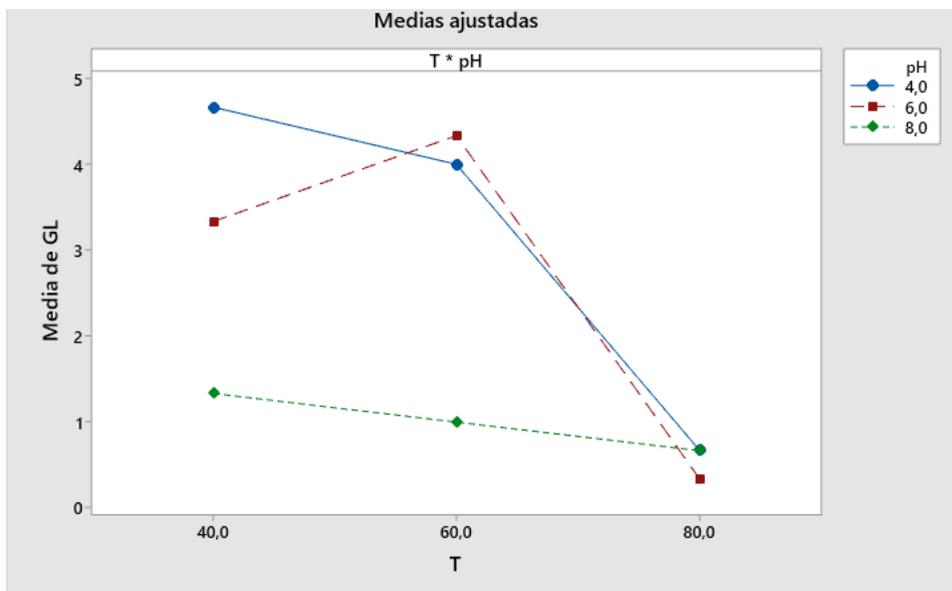


**Gráfico 7-4:** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados  
Realizado: Ángel Acán, (2020)



**Gráfico 8-4:** Efectos de variable de forma individual para GL  
Realizado por: Acán Ángel, (2020)

El análisis del efecto individual indica que, en el caso de la temperatura, el rango 40°-60° es el óptimo, en tanto que a mayores temperaturas decrece. Respecto al pH, el efecto decrece a medida que se desplaza a valores básicos

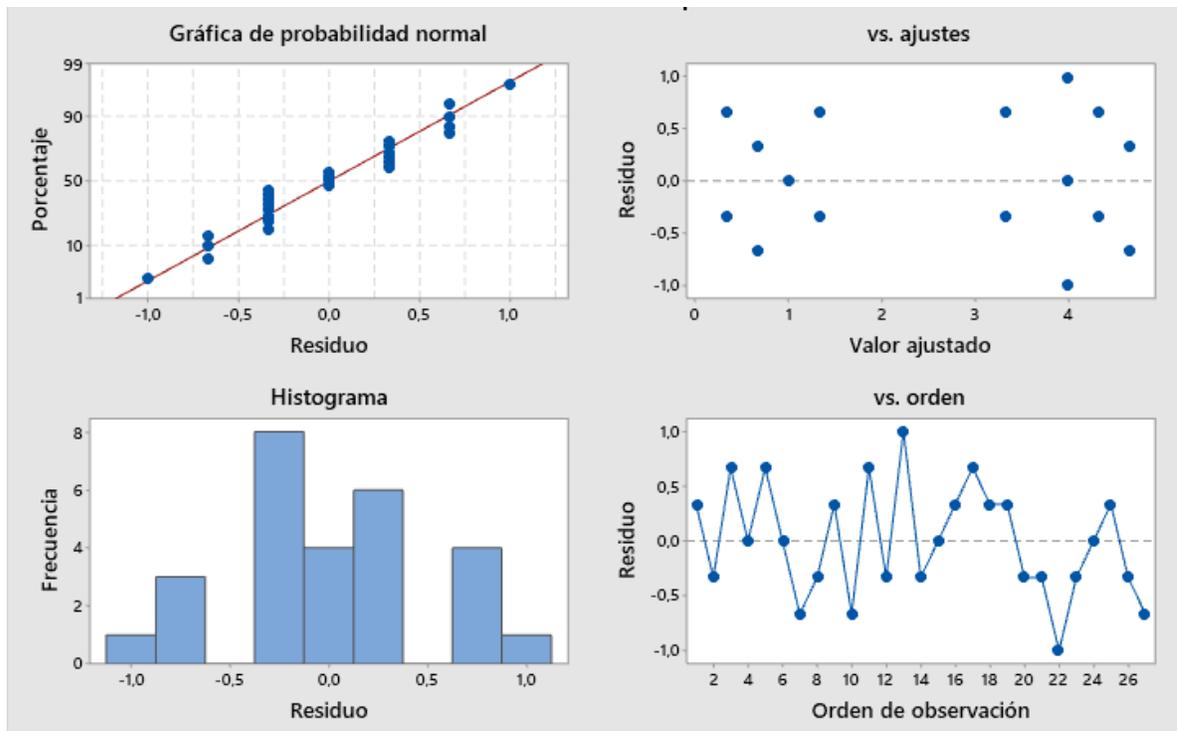


**Gráfico 91-4:** Interacción de variables para GL

Realizado: Acán Ángel, (2020)

Respecto a la interacción de los factores, se confirma que el efecto máximo se obtiene a 40°C con pH 4, seguido de cerca por el efecto de una temperatura de 60°C con pH 6.

Las gráficas de residuos confirman el cumplimiento de supuestos del modelo, con distribución normal de los residuos (gráfica de probabilidad e histograma) y aleatoriedad (residuo vs ajustes y residuo vs orden)



**Gráfico 20-4:** Probabilidad e histograma para análisis de residuo

Realizado: Acán Ángel, 2020

El modelo obtenido tiene un  $R^2$  de 81,97 lo que indica que se ajusta aproximadamente al 82% de los datos. Para mejorar este aspecto se recomendaría aumentar el número de puntos de medición.

### Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
0,608581	91,99%	88,42%
		81,97%

#### 4.2.1 Hipótesis General

$H_0$  = La temperatura y pH no tiene efecto sobre el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática de *Colocasia esculenta* (papa china).

$H_i$  = La temperatura y pH si tiene efecto sobre el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática de *Colocasia esculenta* (papa china).

El análisis del efecto individual indica que, en el caso de la temperatura, el rango 40°-60° es el óptimo, en tanto que a mayores temperaturas decrece. Respecto al pH, el efecto decrece a medida que se desplaza a valores básicos

Se rechaza la  $H_0$  y se asevera que la temperatura y pH tienen un efecto significativo sobre el proceso industrial para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática de *Colocasia esculenta* (papa china).

#### 4.2.2 Hipótesis específica 1

$H_0$  = La composición bromatológica (carbohidratos) de *C. esculenta* (papa china) del sector de Macas no es similar a la reportada en bibliografía

$H_i$  = La composición bromatológica (carbohidratos) de *Colocasia esculenta* (papa china) del sector de Macas es similar a la reportada en bibliografía

El resultado obtenido de la composición bromatológica en referencia al Manual Técnico del Pequeño Agricultor realizado por el MAGAP de Morona Santiago indica que la composición es similar a los análisis realizados.

Se rechaza la  $H_0$  y se asevera que la composición bromatológica (carbohidratos) de *C. esculenta* (papa china) del sector de Macas es similar a la reportada en bibliografía lo que se demuestra en los resultados obtenidos.

#### 4.2.3 Hipótesis específica 2

$H_0$  = Las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y pH) no existe para el proceso de hidrólisis enzimática en la obtención de bioetanol a partir de *C. esculenta* (papa china) amazónica?

$H_i$  = Las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y pH) sí existe para el proceso de hidrólisis enzimática en la obtención de bioetanol a partir de *C. esculenta* (papa china) amazónica

Del análisis de las variables  $^{\circ}$ Brix, en resultados se puede observar que los tratamientos a temperatura  $60^{\circ}$ C y pH 4, la hidrólisis enzimática presenta una mejor conversión de glucosa a etanol

Se rechaza la  $H_0$  y se asevera que sí existen las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y pH) para el proceso de hidrólisis enzimática en la obtención de bioetanol a partir de *C. esculenta* (papa china) amazónica.

#### **4.2.4 Hipótesis específica 3**

$H_0$  = La temperatura y pH no influyen sobre el rendimiento de bioetanol obtenido por hidrólisis enzimática de *C. esculenta* (papa china) amazónica.

$H_i$  = La temperatura y pH sí influyen sobre el rendimiento de bioetanol obtenido por hidrólisis enzimática de *C. esculenta* (papa china) amazónica.

Al realizar la interacción de los factores, se confirma que el efecto máximo se obtiene a 40°C con pH 4, seguido de cerca por el efecto de una temperatura de 60°C con pH 6.

Se rechaza la  $H_0$  y se infiere que la temperatura y pH sí influyen sobre el rendimiento de bioetanol obtenido por hidrólisis enzimática de *C. esculenta* (papa china) amazónica.

## CONCLUSIONES

- En la presente investigación se logró la obtención de bioetanol a partir del almidón de *C. esculenta*, a través del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación anaerobia, controlando como variables de estudio la temperatura y el pH, además se determinaron parámetros como °Brix y densidad.
- La *C. esculenta*, presenta un valor alto de humedad con un valor de 81 %, un porcentaje de proteína de 5.84 %, almidón 12.44 %, grasa 1.3 %, fibra 2.1 % y ceniza 3.2; todos los anteriores similares a los reportados en bibliografía.
- La mejor temperatura de operación se encuentra entre los 40 °C y 60 °C, a mayores temperaturas el rendimiento baja por inactivación de la enzima aplicada, y el mejor pH para el proceso estudiado es 4, reduciéndose la eficiencia a medida que se acerca a la neutralidad y cayendo en la zona básica, debido a que la actividad de la enzima disminuye.
- En la interacción de las variables de temperatura y pH se encuentran que las condiciones óptimas de operación están a 55 °C y pH 5.5.
- El porcentaje de rendimiento en el proceso de hidrólisis enzimática en cuanto a la conversión de almidón a glucosa es del 80 %.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo otras investigaciones, a diferentes concentraciones de enzima en la etapa de sacarificación, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en esta investigación.
- Con los resultados obtenidos en la presente investigación se puede evaluar conjuntamente las etapas de sacarificación y fermentación con lo que se podría disminuir el tiempo de producción de bioetanol.
- El valor de  $R^2$  necesita mejorarse, mediante la inclusión de mayores puntos experimentales de medición de manera que se pueda obtener un modelo matemático que relacione las variables y sus efectos sobre el rendimiento del proceso.
- Para la etapa de fermentación se debe controlar que no ingrese oxígeno al medio y así evitar la presencia de otros microorganismos que podrían generar la síntesis de productos no deseados y comprometer la asignación de efectos únicamente al caso de la enzima utilizada.
- Realizar la hidrólisis enzimática a condiciones de 55 °C y pH 5.5 con el fin de obtener un alto grado de conversión de almidón a glucosa, lo que permitirá generar un mejor rendimiento en cuanto a la obtención de bioetanol.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amos, A. (1969). *Manual de la Industria de Alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Anaya, F. (2004). Obtención De Jarabes De Glucosa A Partir De Almidón De Yuca Mediante Hidrólisis Acida Asistida Por Microondas. *Red Colombiana de Información Científica*, 69-100. Obtenido de Red Colombiana de Información Científica.
- Ararat, M., Sinesterra, C., & Hernández, C. (2014). Aloraciones agronómicas y de rendimiento en la cosecha de “papa china” (*Colocasia esculenta* L.) en el trópico húmedo colombiano. *Agraria y Ambiental*, 150-180.
- Armas Francisco. (2012). *Manual Técnico del pequeño agricultor*. Macas: Cultural S.A.
- Badui, S. (2006). *Química de alimentos*. México: Pearson Educación.
- Barrera, V. (2003). *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*. Lima: Agro Consult International S.A.C.
- Benavides, I. P. (25 de 02 de 2011). *Elaboración de una Bebida Alcohólica Destilada (Vodka) a partir de tres variedades de Papa (Solanum Tuberosum) utilizando dos tipos de Enzimas*. Obtenido de Repositorio digital Universidad Técnica del Norte: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/327>
- Braide, W., & Nwaoguikpe, R. (2011). Production of ethanol from cocoyam (*Colocasia esculenta*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 64-66.
- Bugg, D. (2004). Enzymes are Wonderful Catalysts. *Blackwell*, 29-47.
- Bustos, V., & Rodriguez, W. (2001). Producción y comercialización de yuca y malanga como una alternativa para la exportación de productos no tradicionales. *Repositorio Escuela Politécnica del Litoral*, 120.
- Caicedo, W. (2013). Efecto de inocuidad del ensilado biológico de tubérculos de papa China (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) para la alimentación de cerdos. *Amazónica Ciencia y Tecnología*, 162-171.
- Caicedo, W., Lezcano, P., Flores, L., & y Ferreira, N. (2016). Chemical composition and in vitro digestibility of silages of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) tubers for feeding pigs. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49.
- Calderón, V. (2003). *Producción de etanol partiendo de la papa como materia prima*. Perú: Información estadística de la FAO.
- Cardona, A., Sánchez, J., Montoya, I., & Quintero, A. (2005). Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. *Scientia et Technica*, 28.

- Carriazo. (25 de 06 de 2012). *Estudio de factibilidad para una planta de bioetanol a partir del aprovechamiento cascaras de plátano en la empresa Colombian Biofuel SAS* . Obtenido de Repositorio Udec: <http://hdl.handle.net/11227/1293>
- Castaño, H. M. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultaneas (SSF). *Vitae*, 15.
- Cortes, E., Gonzáles, H., & Fernando, Á. (2008). Colombia en la era del alcohol carburante. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4-8.
- Costas, B. (2009). Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. *Chemistry and Techonology*, 293-359.
- Deo, P. (2009). Mejora de la producción de taro (*Colocasia esculenta* var. *Esculenta*) utilizando enfoques biotecnológicos. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 6-13.
- Eduardo, O. (1998). *Sistemas alimentarios de raíces y tubérculos*. Caripe: Fonaiap.
- Escudero, J. (03 de 08 de 2015). *Obtención de bioetanol a partir de inulina proveniente de biomasa vegetal mediante sacarificación y fermentación*. Obtenido de Repositorio Digital de UCE: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4516>
- Espin, S., Villacres, E., & Brito, B. (2004). Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. *Semantic Scholar*, 20-24.
- Espinel, E., & López, E. (2009). PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  $\alpha$ -AMILASA DE *PENICILLIUM COMMUNE* PRODUCIDA MEDIANTE FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA. *Colombiana de Química*, 191-208.
- Espinosa, V. (18 de 10 de 2012). *Propiedades de digestión de almidones nativos y modificados de plátano y mango*. Obtenido de IPN: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/7645>
- Espinoza Alvarado, S. (2015). *Obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano (cavendish gigante)*. Machala: El Guabo 2014.
- Estrada, C., Pérez, A., Sánchez, M., Soto, M., & Hernández, J. y. (2009). Producción enzimática de maltodextrinas a partir de almidón de malanga ( *Colocasia esculenta*). *Journal of food*, 233-241.
- Gil, A., & Ruíz, M. (2010). *Tratado de nutrición*. Madrid: Medica Panamericana.
- Giron, G., & Funes, L. (05 de 10 de 2013). *Obtención de alcohol etílico por medio de fermentación alcohólica de las cáscaras de musa paradisíaca (plátano) utilizando como microorganismo productor saccharomyces cerevisiae (levadura)*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad de El Salvador: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4719>
- Gonzales, A. C. (2008). Biocombustibles, Biotecnología y alimentos. *Scielo*, 29.

- Hans, B. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona: Reverté.
- Hernández, V., Maruaga, J., Hernández, S., & Mayek, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y Perspectivas. *SciELO*, 97-98.
- Knorr, D., Heinz, V., & Buckow, R. (2006). Aplicación a alta presión para biopolímeros alimentarios. *Biochimica et Biophysica Acta*, 619-131.
- Lindeboom, N., Chang, R., & Rodríguez, F. (2004). Aspectos analíticos, bioquímicos y fisicoquímicos del tamaño de los gránulos de almidón, con énfasis en los pequeños almidones de gránulos: una revisión. *Starch-Starke*, 89-90.
- Lovato, E. (2010). Prefactibilidad Técnica-Económica Para La Instalación De Una Planta Procesadora Del Chontaduro, Plátano Y Yuca Producidos En El Cantón Tiwintza. *Escuela Politecnica Nacional*, 2.
- Lozada, A. (2005). Producción del cultivo de papa china (*Colocasia esculenta*) utilizando dos métodos de propagación asexual bajo cuatro niveles de fertilización orgánica. *Escuela Politécnica del Ejército*, 120.
- Madigan, M. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. España: Pearson.
- Madragón, M. (2009). Obtención de etanol a partir de brócoli y cáscara de arveja empleando la enzima multifect 720 de carácter básico a nivel de laboratorio. *Universidad de America*, 130.
- Michelle, C. (2008). Biocombustibles y cultivos biofarmaceuticos. *El Cotidiano*, 12.
- Montaldo, A. (2009). *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. New York: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1972.
- Mora, Y. (03 de 11 de 2014). *Modelación cinética de la fermentación alcohólica del zumo de pomarrosa*. Obtenido de Repositorio UCE: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2308>
- Morales, A. (2012). Fitogeografía e industrialización del almidón de pituca. *Espacio y Desarrollo*, 24.
- Morin, C. (1983). La pituca o taro; información básica sobre su cultivo. *Repositorio Universidad de Lima*, 45.
- Murgas, J. V. (2012). Evaluación de la obtención de bioetanol a partir del almidón de ñame (*dioscorea rotundata*, *dioscorea alata* y *dioscorea trifida*) mediante la hidrólisis enzimática y posterior fermentación. *Universidad de San Buena Ventura*, 138.
- Olguín, C., & Álvarez, M. (2011). La malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) bajo un enfoque de investigación-desarrollo. *Agroproductividad*, 199-227.
- Onwueme, C. (2003). *The Tropical Tuber Crops, yam, cassava, sweet potato and cocoyam*. John Wiley and Sons. *New york and Brisbane Toronto*, 34.

- Opara, U., & Mejía, D. (2003). Aroides comestibles. *AGST/FAO*, 12.
- Rodríguez, R. (2017). Diseño de un plan estratégico para mejorar la comercialización de papa china en el sector norte de la ciudad de Guayaquil. *Repositorio universidad de Guayaquil*, 111.
- Rojas, R., & Cabanillas, J. (2008). Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos—cáscaras de arroz (*Oriza sativa*). *Virtula Redesma*, 5-9.
- Ruiz Monica. (2012). Obtención De Jarabes De Glucosa A Partir De Almidón De Yuca Por Medio De Hidrólisis Enzimática Para Ser Usados Como Sustrato En La Producción De Bioetanol. *Semantic Scholar*, 15.
- Salama, A. (2016). *Notas de clase. Manual de farmacognosia: Análisis microscópico y fitoquímico, y usos de plantas medicinales.* . Colombia: Universidad de Colombia.
- Salinas, E. G. (2009). Biocombustibles. *El Cotidiano*, 9.
- Sotoj, M. (2016). Análisis del bioetanol obtenido a partir de papa (*solanum tuberosum*) por medio de hidrólisis enzimática y fermentación a escala laboratorio. *SIIDCA*, 53.
- Suarez, F. (2008). *El poder del metabolismo*. España: Ediciones B.
- Téllez, A. (2009). Produccion de etanol a partir de yuca mediante bioreactor de taque agitado con control de variables. *Univesidad Autonoma de Bucaramanga*, 13.
- Tester, F., Kakarlas, J., & Qui, X. (2004). El almidón composición, estructura fina y la arquitectura. *Ciencias cereales*, 151-165.
- Thomas, D., & Atwell, W. (1999). Starches. Practical Guide for The Food Industry. *Eagan.*, 1-12.
- Torres, A., & Montero, P. y. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Lasallista de Investigación*, 53.
- Usucachi, P. (2011). Proceso de obtención de bioetanol a partir de papa peruana. *Uni*, 12.
- Vázquez, J., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 249-259.
- Voet, D., Voet, J., & Charlotte, P. (2009). *Fundamentos De Bioquímica/Fundamental of Biochemistry*. Bogota: Editorial Medica Panamericana.
- Wang, J., & Higa, S. (1983). Taro, a review of *Colocasia esculenta* and its potentials. *Honolulu*, 56.
- Zambrano, G., & Machado, A. (6 de 5 de 2013). *Estudio técnico-económico para la obtención de alcohol a partir del camote*. Obtenido de Semantic Scholar: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1173>

## ANEXOS

### Anexo A: Proceso de obtención de almidón de *C. esculenta*



Pelado de papa china



Lavado



Licudo



Escurreido



Pasta de almidón



Secado



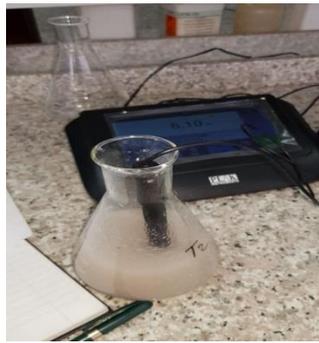
Almidon

## Anexo B: Descripción de proceso de obtención de glucosa

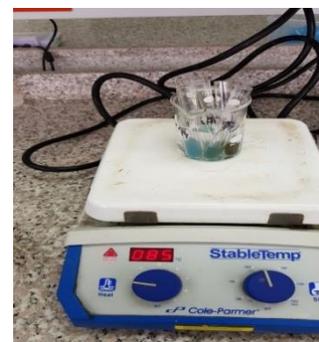
---



Gelatinización



Enzima alfa-amilasa



Prueba de Benedict

---

**Anexo C:** Proceso de obtención de bioetanol de *C esculenta*

---



Filtración



Fermentación



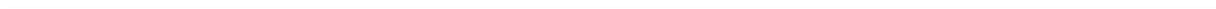
Fermentación



Destilación



Etanol



## Anexo D: Datos de análisis de variables del programa Statistic

### Análisis de papa china (Sacarificación)

#### ANOVA

Statistix 10.0

07/02/2020; 11:24:41

#### Factorial AOV Table for Brix

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	2.127	1.0636		
TEMPERATU	2	77.615	38.8075	61.76	0.0000
pH	2	9.532	4.7658	7.58	0.0048
TEMPERATU*pH	4	8.007	2.0017	3.19	0.0419
Error	16	10.054	0.6284		
Total	26	107.335			

Grand Mean 13.817

CV 5.74

#### Factorial AOV Table for pHfinal

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0673	0.0337		
TEMPERATU	2	0.0463	0.0231	0.54	0.5932
pH	2	62.8398	31.4199	732.90	0.0000
TEMPERATU*pH	4	0.3758	0.0939	2.19	0.1163
Error	16	0.6859	0.0429		
Total	26	64.0151			

Grand Mean 6.1874

CV 3.35

#### Factorial AOV Table for Residuos

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.00117	0.00058		
TEMPERATU	2	0.55443	0.27721	123.48	0.0000
pH	2	0.19982	0.09991	44.50	0.0000
TEMPERATU*pH	4	0.36509	0.09127	40.66	0.0000
Error	16	0.03592	0.00224		
Total	26	1.15642			

Grand Mean 0.6732

CV 7.04

## Prueba de Medias

Statistix 10.0

07/02/2020; 11:18:48

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for TEMPERATU\*pH

TEMPERATU	pH	Mean	Homogeneous Groups
2	2	16.033	A
1	2	16.000	A
1	1	15.067	AB
2	1	15.067	AB
1	3	14.933	AB
2	3	12.900	BC
3	1	11.533	C
3	2	11.483	C
3	3	11.333	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.6473  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 2.8473  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for TEMPERATU

TEMPERATU	Mean	Homogeneous Groups
1	15.333	A
2	14.667	A
3	11.450	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.3737  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 1.2587  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for pH

pH	Mean	Homogeneous Groups
2	14.506	A
1	13.889	AB
3	13.056	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.3737  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 1.2587  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHfinal for TEMPERATU\*pH

TEMPERATU	pH	Mean	Homogeneous Groups
1	3	8.0667	A
2	3	8.0367	A
3	3	7.9433	A
3	2	6.4567	B

2 2	6.1933	B
1 2	6.1467	B
2 1	4.5000	C
1 1	4.2200	C
3 1	4.1233	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1691  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 0.7437  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHfinal for TEMPERATU**

TEMPERATU	Mean	Homogeneous Groups
2	6.2433	A
3	6.1744	A
1	6.1444	A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0976  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.3288  
There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHfinal for pH**

pH	Mean	Homogeneous Groups
3	8.0156	A
2	6.2656	B
1	4.2811	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0976  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.3288  
All 3 means are significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Residuos for TEMPERATU\*pH**

TEMPERATU pH	Mean	Homogeneous Groups
1 3	1.0037	A
2 3	0.9097	AB
2 1	0.8304	B
2 2	0.8014	B
1 2	0.6071	C
3 2	0.5359	CD
3 1	0.4995	CD
3 3	0.4533	CD
1 1	0.4182	D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0387  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 0.1702  
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Residuos for TEMPERATU**

TEMPERATU	Mean	Homogeneous Groups
2	0.8472	A
1	0.6763	B

3            0.4962    C

Alpha                    0.01            Standard Error for Comparison            0.0223  
 Critical Q Value        4.764            Critical Value for Comparison            0.0752  
 All 3 means are significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Residuos for pH**

**pH    Mean    Homogeneous Groups**  
 3    0.7889    A  
 2    0.6481    B  
 1    0.5827    B

Alpha                    0.01            Standard Error for Comparison            0.0223  
 Critical Q Value        4.764            Critical Value for Comparison            0.0752  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

**Resumen estadísticos**

Statistix 10.0                    07/02/2020; 11:25:42

**Breakdown for Brix**

TEMPERATU		pH			Total
		1	2	3	
1	Mean	15.067	16.000	14.933	15.333
	SD	0.7371	0.9849	1.3051	1.0283
	Min	14.500	15.200	13.900	13.900
	Max	15.900	17.100	16.400	17.100
2	Mean	15.067	16.033	12.900	14.667
	SD	0.9074	0.6506	0.3606	1.5083
	Min	14.400	15.400	12.500	12.500
	Max	16.100	16.700	13.200	16.700
3	Mean	11.533	11.483	11.333	11.450
	SD	0.7095	0.5008	0.8622	0.6185
	Min	10.900	11.000	10.400	10.400
	Max	12.300	12.000	12.100	12.300
Total	Mean	13.889	14.506	13.056	13.817
	SD	1.8944	2.3556	1.7572	2.0318
	Min	10.900	11.000	10.400	10.400
	Max	16.100	17.100	16.400	17.100

Cases Included 27 Missing Cases 0

**Breakdown for pHfinal**

TEMPERATU		pH			Total
		1	2	3	
1	Mean	4.2200	6.1467	8.0667	6.1444

	SD	0.1000	0.0551	0.0814	1.6671
	Min	4.1200	6.0900	8.0100	4.1200
	Max	4.3200	6.2000	8.1600	8.1600
2	Mean	4.5000	6.1933	8.0367	6.2433
	SD	0.5724	0.0115	0.0462	1.5586
	Min	4.1400	6.1800	8.0100	4.1400
	Max	5.1600	6.2000	8.0900	8.0900
3	Mean	4.1233	6.4567	7.9433	6.1744
	SD	0.0252	0.0971	0.1305	1.6696
	Min	4.1000	6.3500	7.8400	4.1000
	Max	4.1500	6.5400	8.0900	8.0900
Total	Mean	4.2811	6.2656	8.0156	6.1874
	SD	0.3365	0.1553	0.0977	1.5691
	Min	4.1000	6.0900	7.8400	4.1000
	Max	5.1600	6.5400	8.1600	8.1600

Cases Included 27 Missing Cases 0

#### Breakdown for Residuos

TEMPERATU		pH			
		1	2	3	Total
1	Mean	0.4182	0.6071	1.0037	0.6763
	SD	0.0220	0.0153	0.0852	0.2626
	Min	0.3974	0.5945	0.9544	0.3974
	Max	0.4412	0.6241	1.1021	1.1021
2	Mean	0.8304	0.8014	0.9097	0.8472
	SD	0.0123	6.261E-03	0.0426	0.0534
	Min	0.8175	0.7954	0.8694	0.7954
	Max	0.8421	0.8079	0.9542	0.9542
3	Mean	0.4995	0.5359	0.4533	0.4962
	SD	0.0387	0.0323	0.0776	0.0585
	Min	0.4752	0.4989	0.3945	0.3945
	Max	0.5441	0.5584	0.5412	0.5584
Total	Mean	0.5827	0.6481	0.7889	0.6732
	SD	0.1905	0.1204	0.2623	0.2109
	Min	0.3974	0.4989	0.3945	0.3945
	Max	0.8421	0.8079	1.1021	1.1021

Cases Included 27 Missing Cases 0

## Análisis Destilado

### ANOVA

Statistix 10.0

07/02/2020; 11:35:47

#### Factorial AOV Table for Brix

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.00667	0.00333		
Temp	2	1.55556	0.77778	207.41	0.0000
pH	2	0.02889	0.01444	3.85	0.0431
Temp*pH	4	0.03556	0.00889	2.37	0.0961
Error	16	0.06000	0.00375		
Total	26	1.68667			

Grand Mean 0.4778

CV 12.82

#### Factorial AOV Table for Destilado

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	7.63	3.81		
pH	2	3934.30	1967.15	236.58	0.0000
Temp	2	622.74	311.37	37.45	0.0000
pH*Temp	4	1157.26	289.31	34.80	0.0000
Error	16	133.04	8.31		
Total	26	5854.96			

Grand Mean 28.963

CV 9.96

#### Factorial AOV Table for Densidad

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	4.519E-08	2.259E-08		
pH	2	4.941E-05	2.470E-05	365.46	0.0000
Temp	2	3.284E-05	1.642E-05	242.92	0.0000
pH*Temp	4	1.720E-05	4.300E-06	63.62	0.0000
Error	16	1.081E-06	6.759E-08		
Total	26	1.006E-04			

Grand Mean 0.9981

CV 0.03

#### Factorial AOV Table for GL

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.9630	0.4815		

pH	2	22.2963	11.1481	31.27	0.0000
Temp	2	39.1852	19.5926	54.96	0.0000
pH*Temp	4	15.0370	3.7593	10.55	0.0002
Error	16	5.7037	0.3565		
Total	26	83.1852			

Grand Mean 2.2593  
CV 26.43

#### Factorial AOV Table for pHf

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.00956	4.781E-03		
pH	2	0.01672	8.359E-03	5.37	0.0164
Temp	2	0.01943	9.715E-03	6.24	0.0099
pH*Temp	4	0.02115	5.287E-03	3.40	0.0342
Error	16	0.02490	1.556E-03		
Total	26	0.09176			

Grand Mean 3.7970  
CV 1.04

#### Prueba de medias

Statistix 10.0 07/02/2020; 11:31:32

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for pH

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for Temp

Temp	Mean	Homogeneous Groups
1	0.8111	A
2	0.3667	B
3	0.2556	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0289  
Critical Q Value 3.651 Critical Value for Comparison 0.0745  
All 3 means are significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for pH

pH	Mean	Homogeneous Groups
2	0.5111	A
1	0.4889	AB
3	0.4333	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0289  
Critical Q Value 3.651 Critical Value for Comparison 0.0745  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Brix for Temp\*pH

Temp pH	Mean	Homogeneous Groups
1 2	0.9000	A
1 1	0.7667	A

1 3	0.7667	A
2 1	0.4333	B
2 2	0.3667	BC
2 3	0.3000	BC
3 1	0.2667	BC
3 2	0.2667	BC
3 3	0.2333	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0500  
Critical Q Value 5.035 Critical Value for Comparison 0.1780  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Destilado for pH**

pH	Mean	Homogeneous Groups
1	42.556	A
2	31.111	B
3	13.222	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 1.3593  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 4.5786  
All 3 means are significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Destilado for pH\*Temp**

pH Temp	Mean	Homogeneous Groups
1 1	53.000	A
1 2	46.667	A
2 2	43.667	A
1 3	28.000	B
2 1	26.333	B
2 3	23.333	BC
3 3	15.667	CD
3 1	13.667	CD
3 2	10.333	D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 2.3544  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 10.357  
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Destilado for Temp**

Temp	Mean	Homogeneous Groups
2	33.556	A
1	31.000	A
3	22.333	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 1.3593  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 4.5786  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Densidad for pH**

pH	Mean	Homogeneous Groups
3	0.9999	A
2	0.9976	B
1	0.9967	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 1.226E-04  
 Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 4.128E-04  
 All 3 means are significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Densidad for pH\*Temp

pH Temp	Mean	Homogeneous Groups
3 3	1.0001	A
3 2	1.0000	A
2 3	0.9999	A
3 1	0.9997	A
1 3	0.9987	B
2 2	0.9976	C
1 1	0.9958	D
1 2	0.9957	D
2 1	0.9953	D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 2.123E-04  
 Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 9.338E-04  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Densidad for Temp

Temp	Mean	Homogeneous Groups
3	0.9996	A
2	0.9978	B
1	0.9969	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 1.226E-04  
 Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 4.128E-04  
 All 3 means are significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GL for pH

pH	Mean	Homogeneous Groups
1	3.1111	A
2	2.6667	A
3	1.0000	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.2815  
 Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.9480  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GL for pH\*Temp

pH Temp	Mean	Homogeneous Groups
1 1	4.6667	A
2 2	4.3333	A

1 2	4.0000	A
2 1	3.3333	AB
3 1	1.3333	BC
3 2	1.0000	C
1 3	0.6667	C
3 3	0.6667	C
2 3	0.3333	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.4875  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 2.1445  
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GL for Temp**

Temp	Mean	Homogeneous Groups
1	3.1111	A
2	3.1111	A
3	0.5556	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.2815  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.9480  
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHf for pH**

pH	Mean	Homogeneous Groups
1	3.8322	A
2	3.7800	A
3	3.7789	A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0186  
Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.0626  
There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHf for pH\*Temp**

pH Temp	Mean	Homogeneous Groups
1 2	3.8933	A
1 1	3.8467	A
2 1	3.8200	A
3 1	3.8100	A
2 3	3.7633	A
3 2	3.7633	A
3 3	3.7633	A
2 2	3.7567	A
1 3	3.7567	A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0322  
Critical Q Value 6.221 Critical Value for Comparison 0.1417  
There are no significant pairwise differences among the means.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pHf for Temp**

Temp	Mean	Homogeneous Groups
------	------	--------------------

1	3.8256	A
2	3.8044	AB
3	3.7611	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0186  
 Critical Q Value 4.764 Critical Value for Comparison 0.0626

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

### Resumen de estadísticos

Statistix 10.0 07/02/2020; 11:38:42

#### Breakdown for Brix

pH		Temp			Total
		1	2	3	
1	Mean	0.7667	0.4333	0.2667	0.4889
	SD	0.0577	0.0577	0.0577	0.2261
	Min	0.7000	0.4000	0.2000	0.2000
	Max	0.8000	0.5000	0.3000	0.8000
2	Mean	3.3000	0.3667	0.2667	1.3111
	SD	4.0706	0.0577	0.0577	2.5241
	Min	0.9000	0.3000	0.2000	0.2000
	Max	0.5000	0.4000	0.3000	0.05
3	Mean	0.7667	0.3000	0.2333	0.4333
	SD	0.0577	0.0000	0.0577	0.2550
	Min	0.7000	0.3000	0.2000	0.2000
	Max	0.8000	0.3000	0.3000	0.8000
Total	Mean	1.6111	0.3667	0.2556	0.7444
	SD	2.3976	0.0707	0.0527	1.4708
	Min	0.7000	0.3000	0.2000	0.2000
	Max	8.0000	0.5000	0.3000	8.0000

Cases Included 27 Missing Cases 0

#### Breakdown for Destilado

pH		Temp			Total
		1	2	3	
1	Mean	53.000	46.667	28.000	42.556
	SD	2.6458	3.2146	4.0000	11.620
	Min	50.000	43.000	24.000	24.000
	Max	55.000	49.000	32.000	55.000
2	Mean	26.333	43.667	23.333	31.111
	SD	2.0817	4.7258	2.0817	9.9051
	Min	24.000	40.000	21.000	21.000
	Max	28.000	49.000	25.000	49.000
3	Mean	13.667	10.333	15.667	13.222
	SD	1.5275	1.5275	1.1547	2.6352

	Min	12.000	9.0000	15.000	9.0000
	Max	15.000	12.000	17.000	17.000
Total	Mean	31.000	33.556	22.333	28.963
	SD	17.486	17.714	5.8737	15.006
	Min	12.000	9.0000	15.000	9.0000
	Max	55.000	49.000	32.000	55.000

Cases Included 27 Missing Cases 0

### Breakdown for Densidad

		Temp			
pH		1	2	3	Total
1	Mean	0.9958	0.9957	0.9987	0.9967
	SD	5.774E-05	1.732E-04	0.0000	1.486E-03
	Min	0.9957	0.9955	0.9987	0.9955
	Max	0.9958	0.9958	0.9987	0.9987
2	Mean	0.9953	0.9976	0.9999	0.9976
	SD	2.082E-04	1.155E-04	0.0000	2.010E-03
	Min	0.9951	0.9975	0.9999	0.9951
	Max	0.9955	0.9977	0.9999	0.9999
3	Mean	0.9997	1.0000	1.0001	0.9999
	SD	6.557E-04	1.732E-04	1.155E-04	3.833E-04
	Min	0.9990	0.9999	1.0000	0.9990
	Max	1.0003	1.0002	1.0002	1.0003
Total	Mean	0.9969	0.9978	0.9996	0.9981
	SD	2.131E-03	1.872E-03	6.483E-04	1.967E-03
	Min	0.9951	0.9955	0.9987	0.9951
	Max	1.0003	1.0002	1.0002	1.0003

Cases Included 27 Missing Cases 0

### Breakdown for GL

		Temp			
pH		1	2	3	Total
1	Mean	4.6667	4.0000	0.6667	3.1111
	SD	0.5774	1.0000	0.5774	1.9650
	Min	4.0000	3.0000	0.0000	0.0000
	Max	5.0000	5.0000	1.0000	5.0000
2	Mean	3.3333	4.3333	0.3333	2.6667
	SD	0.5774	0.5774	0.5774	1.8708
	Min	3.0000	4.0000	0.0000	0.0000
	Max	4.0000	5.0000	1.0000	5.0000
3	Mean	1.3333	1.0000	0.6667	1.0000
	SD	0.5774	0.0000	0.5774	0.5000

	Min	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
	Max	2.0000	1.0000	1.0000	2.0000
Total	Mean	3.1111	3.1111	0.5556	2.2593
	SD	1.5366	1.6915	0.5270	1.7887
	Min	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
	Max	5.0000	5.0000	1.0000	5.0000

Cases Included 27 Missing Cases 0

### Breakdown for pHf

pH		Temp			Total
		1	2	3	
1	Mean	3.8467	3.8933	3.7567	3.8322
	SD	0.0451	0.0208	0.0252	0.0663
	Min	3.8000	3.8700	3.7300	3.7300
	Max	3.8900	3.9100	3.7800	3.9100
2	Mean	3.8200	3.7567	3.7633	3.7800
	SD	0.0200	0.0153	0.0569	0.0433
	Min	3.8000	3.7400	3.7000	3.7000
	Max	3.8400	3.7700	3.8100	3.8400
3	Mean	3.8100	3.7633	3.7633	3.7789
	SD	0.0600	0.0551	0.0603	0.0558
	Min	3.7500	3.7000	3.7000	3.7000
	Max	3.8700	3.8000	3.8200	3.8700
Total	Mean	3.8256	3.8044	3.7611	3.7970
	SD	0.0422	0.0733	0.0434	0.0594
	Min	3.7500	3.7000	3.7000	3.7000
	Max	3.8900	3.9100	3.8200	3.9100

Cases Included 27 Missing Cases 0