



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA A PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL AGRÍCOLA
PROCEDENTE DE MAIZ BLANCO, TRIGO Y CEBADA CON FINES
DE BIOREFINERIA**

MARÍA ELENA RONQUILLO PONCE

**Trabajo de Titulación modalidad: Proyecto de Investigación y Desarrollo, presentado
ante el Instituto de Postgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito
parcial para la obtención de:**

MAGÍSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA APLICADA

Riobamba- Ecuador

junio, 2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO

CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, titulado Obtención de bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada con fines de biorefinería, de responsabilidad de la Ing. María Elena Ronquillo Ponce, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida; Ph

PRESIDENTE

**LUIS EDUARDO
HIDALGO
ALMEIDA**

Firmado digitalmente por LUIS EDUARDO HIDALGO ALMEIDA
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, ou=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION ECINCE, ou=QUITO, serialNumber=000445780, cn=LUIS EDUARDO HIDALGO ALMEIDA
Fecha: 2021.06.10 08:08:19 -05'00'

Ing. Zulay Marina Niño Ruíz; PhD

DIRECTOR

**ZULAY MARINA
NIÑO RUIZ**

Firmado digitalmente por ZULAY MARINA NIÑO RUIZ
Fecha: 2021.06.21 12:11:18 -05'00'

Ing. Juan Alberto Gaibor Chávez; PhD.

MIEMBRO

Ing. Hannibal Lorenzo Brito Moina; MsC

MIEMBRO

 Firmado electrónicamente por:
**HANNIBAL
LORENZO BRITO
MOINA**

Riobamba, junio 2021

DERECHOS INTELECTUALES

Yo, MARÍA ELENA RONQUILLO PONCE, 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.



MARÍA ELENA RONQUILLO PONCE

CI. 0201914959

DEDICATORIA

“La fuerza no viene de la capacidad corporal
sino de la voluntad del alma”

Gandhi

A Grisell y Ma. Caridad, con su inocencia han motivado mi camino cada día.

A mi amado esposo que ha sido mi soporte en muchos momentos, cuando me he querido quebrantar siendo fiel testigo de mi trabajo por superarme.

A mis padres que me han enseñado el camino para ser una persona de bien con su ejemplo y trabajo demostrado desde que yo recuerdo.

A mis hermanos que siempre han estado a mi lado, a mi abuelita Rosita quien con su cariño ha sido mi atuendo para abrigar mi vida.

María Elena

AGRADECIMIENTO

“Lo que es imposible para el hombre
es posible para Dios”

Lucas 18:27

Mi eterno agradecimiento a Dios por su amor inagotable hacia mí, y permitirme una vida llena de amor, salud, abundancia y felicidad.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser la Institución de Educación Superior que me acogió desde mi paso por obtener un tercer nivel y ahora un cuarto nivel, habiendo permitido un crecimiento profesional y personal, llenando mi camino de conocimiento, ciencia, virtudes, experiencias y sobre todo humanismo.

A la Dra. Zulay Niño mi Tutora, quien me guío desde el inicio cuando el tema tan solo fue una idea, gracias por su apoyo incondicional.

Al Ing. Hannibal Brito por ser el profesor y amigo, por incluir este proyecto de investigación dentro del grupo de Investigación Ambiental y Desarrollo de la ESPOCH (GIADE).

Al Dr. Juan Gaibor, mi eterno agradecimiento por su mano amiga, por auspiciar y dar soporte a este tema de investigación dentro de uno de sus proyectos, el cual fue desarrollado en las instalaciones del Departamento de Investigación de la Noble Universidad Estatal de Bolívar UEB.

A mi amiga espiritual Paty Coloma, por el aliento de vida en cada uno de sus mensajes, los cuales han sido un aliciente en momentos de agotamiento y debilidad, haciéndome entender que cada cosa que ocurre tiene un propósito y un significado, porque nada ocurre por casualidad.

Finalmente, a todos quienes han acompañado con su buena vibra, para plasmar esta idea en una gran realidad. Tan fuerte ha sido mi intensión y tan clara mi meta que finalmente puedo decir lo he logrado.

María Elena

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INCIDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.1.1. <i>Situacion problemática.</i>	2
1.2. Preguntas directrices o específicas de la investigación.....	4
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos de la investigación.....	6
1.5. Hipótesis	6
1.5.1. <i>Hipótesis general</i>	6
1.5.2. <i>Hipótesis específicas</i>	6
CAPÍTULO II.....	8
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes de la investigación	8
2.1.1. <i>Origen de los biocombustibles</i>	8
2.1.2. <i>Hidrólisis Enzimática Celulolítica</i>	9
2.2. Bases teóricas.....	10
2.2.1. Bioetanol.....	10
2.2.1.1. <i>Clasificación de los biocombustibles</i>	11
2.2.2. <i>Biomasa</i>	12
2.2.3. <i>Métodos para la obtención de biocombustibles</i>	13
2.2.4. <i>Bioetanol de segunda generación.</i>	13
2.2.5. <i>Características morfológicas de la biomasa</i>	14
2.2.6. <i>Estructura de la lignocelulosa</i>	15
2.2.6.1. <i>Celulosa</i>	15

2.2.6.2. <i>Hemicelulosa</i>	16
2.2.6.3. <i>Lignina</i>	17
2.2.6.4. <i>Otros componenetes de la lignocelulosa</i>	17
2.2.7. <i>Proceso de obtención de bioetanol</i>	18
2.2.7.1. <i>Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica</i>	18
2.2.7.2. <i>Hidrólisis enzimática</i>	20
2.2.7.3. <i>Fermentación alcohólica</i>	22
2.2.7.4. <i>Destilación</i>	23
2.2.7.5. <i>Rectificación</i>	24
2.2.8. <i>Factores que afectan la hidrólisis enzimática y fermentación</i>	24
2.2.8.1. <i>Nutrición</i>	24
2.2.8.2. <i>Tempertura</i>	24
2.2.8.3. <i>Ph</i>	24
2.2.8.4. <i>Presión osmótica</i>	25
2.2.8.5. <i>Oxigeno</i>	25
2.2.9. <i>Fermentación en estado sólido.</i>	25
2.2.10. <i>Compuestos tóxicos generados en pretratamientos e hidrólisis</i>	25
2.2.11. <i>Métodos que aumentan fermentabilidad en hidrolizados pre-tratados.</i>	26
2.2.11.1. <i>Métodos biológicos</i>	27
2.2.11.2. <i>Métodos físicos.</i>	27
2.2.12. <i>Cromatografía.</i>	28
2.2.12.1. <i>HPLC (Cromatógrafo líquido de alta eficacia):</i>	28
2.2.12.2. <i>UPLC acoplado a un detector masas</i>	29
2.2.12.3. <i>GC (Cromatógrafo de gases) acoplado a un detector masas.</i>	29
CAPÍTULO III	30
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	30
3.1. Parte Experimental.....	30
3.1.1. <i>Recolección de Muestras</i>	31
3.1.2. <i>Pretratamiento</i>	31
3.1.3. <i>Inoculación de la cepa fúngica.</i>	36
3.1.3.1. <i>Aislamiento, purificación, pruebas de crecimiento, identificación molecular y multiplicación masiva de las cepas.</i>	37
3.1.4. <i>Hidrólisis enzimática y sacarificación</i>	38

3.1.4.1.	<i>Determinación de azúcares reductores</i>	39
3.1.4.2.	<i>Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico</i>	39
3.1.4.3.	<i>Curva de calibración método DNS (METODO MILLER)</i>	39
3.1.4.4.	<i>Cuantificación de azúcares</i>	39
3.1.5.	<i>Adecuación de la muestra hidrolizada</i>	41
3.1.6.	<i>Fermentación</i>	41
3.1.7.	<i>Destilación y rectificación</i>	42
3.2.	Identificación de variables	44
3.2.1.	<i>Variables independientes</i>	44
3.2.2.	<i>Variables dependientes</i>	44
3.2.3.	Matriz de consistencia	45
3.3.	Tipo y diseño de investigación	46
3.3.1.	<i>Tipo de investigación</i>	46
3.3.2.	<i>Diseño de la investigación</i>	46
3.4.	Métodos de la investigación	46
3.4.1.	<i>Deductivo</i>	46
3.4.2.	<i>Inductivo</i>	46
3.4.	Enfoque de la investigación	47
3.5.	Alcance de la investigación	47
3.6.	Población de estudio	47
3.7.	Unidad de análisis	47
3.8.	Tamaño de muestra	47
3.9.	Diseño experimental	48
3.11.	Datos primarios	48
3.12.	Factores en estudio	49
3.13.	Tratamientos	50
3.14.	Técnicas de recolección	51
3.14.1.	<i>Datos Secundarios</i>	51
3.15.	Materiales	51
3.15.1.	<i>Material Experimental</i>	51
3.15.2.	<i>Equipos e instrumentos de Laboratorio</i>	51
3.15.3.	<i>Materiales de Laboratorio</i>	52
3.15.3.	<i>Reactivos y sustancias</i>	52

3.15.5. <i>Material de Oficina</i>	53
3.15.6. <i>Instrumentos para procesar datos recopilados</i>	53
CAPÍTULO IV	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1. Pretratamiento	54
4.2. Aislamiento, purificación, pruebas de crecimiento, identificación molecular y multiplicación masiva de las cepas.....	59
4.3. Hidrólisis enzimática y sacarificación	60
4.4. Fermentación	61
4.5. Destilación y Rectificación.....	62
4.5.1. <i>Cálculo de la cantidad de la solución concentrada en gramos</i>	62
4.5.2. <i>Balance de masa</i>	63
4.5.3. <i>Transformación de masa a volumen</i>	64
4.5.4. <i>Cálculo del volumen de etanol obtenido después de la fermentación</i>	64
4.5.5. <i>Porcentaje experimental del bioetanol</i>	65
4.6. Análisis del Diseño experimental	66
CONCLUSIONES.....	76
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. . Propiedades físico químicas del alcohol etílico.....	10
Tabla 2-2. Comparación de contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina en pajas de maíz, trigo y cebada.	15
Tabla 3-1. Biomasa residual agrícola.....	32
Tabla 3-2. Cepas nutritivas en fase laboratorio.....	36
Tabla 3-3. Tiempo de hidrolisis enzimática.....	38
Tabla 3-4. Concentración vs Absorbancia.....	40
Tabla 3-5. Densidad de la solución de alcohol etílico y agua a varias temperaturas.....	43
Tabla 3-6. Matriz de consistencia.....	45
Tabla 3-7. Factores de estudio.....	49
Tabla 3-8. Tratamientos.....	50
Tabla 4-1. Caracterización elemental en biomasa residual agrícola.....	54
Tabla 4-2. Determinación de ceniza.....	55
Tabla 4-3. Determinación d humedad.....	56
Tabla 4-4. Análisis estructural de residuos agrícolas sin y con tratamiento.....	58
Tabla 4-5. Concentración de azúcares reductores.....	60
Tabla 4-6. Porcentaje experimental de bioetanol.....	65
Tabla 4-7. Resumen del diseño Multi-Factorial Categórico.....	66
Tabla 4-8. Análisis de Varianza para porcentaje de Etanol- Suma de Cuadrados Tipo III.....	67
Tabla 4-9. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por RESIDUOS.....	77
Tabla 4-10. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por RESIDUOS.....	68
Tabla 4-11. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por CEPAS.....	68
Tabla 4-12. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por CEPAS.....	68
Tabla 4-13. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por TIEMPO.....	69
Tabla 4-14. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por TIRMPO.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2-1. Tipos de biomasa	13
Fig. 2-2. Plantación de maíz.....	14
Fig. 2-3. Biomasa o rastrojo de maíz blanco	14
Fig. 2-4. Plantación de trigo.....	14
Fig. 2-5. Biomasa o rastrojo de trigo	14
Fig. 2-6. Plantación de cebada.....	15
Fig. 2-7. Biomasa o rastrojo de cebada	15
Fig. 2-8. Estructura molecular de la celulosa.....	16
Fig. 2-9. Estructura molecular de la hemicelulosa.....	16
Fig. 2-10. Estructura molecular de la lignina.....	17
Fig. 2-11. Proceso de fermentación de glucosa a etanol.....	23
Fig. 2-12. Productos de lignocelulosa.....	26
Fig. 3-1. Proceso de obtención de bioetanol.....	30
Fig. 3-2. Activación de cepas fúngicas.....	31
Fig. 3-3. Curva patrón para detección de azúcares reductores.....	41
Fig. 4-1. Caracterización elemental en biomasa residual agrícola.....	54
Fig. 4-2. Determinación de ceniza.....	56
Fig. 4-3. Determinación de humedad.....	57
Fig. 4-4. Biomasa residual sin y con tratamiento.....	58
Fig. 4-5. Disminución de lignina.....	59
Fig. 4-6. Presencia de azúcares reductores.....	61
Fig. 4-7. Balancee de masa.....	63
Fig. 4-8. Diseño experimental de bioetanol.....	66
Fig. 4-9. Medias Residuos vs % Etanol.....	70
Fig. 4-10. Medias Tiempo vs % Etanol	70
Fig. 4-11. Medias Residuos vs % Etanol	71
Fig. 4-12. Interacción Residuos vs Cepas y % Etanol.....	72
Fig. 4-13. Interacción Residuos vs Tiempo y % Etanol	72
Fig. 4-14. Interacción Cepas vs Tiempo y % Etanol	73
Fig. 4-15. Residuos vs Residuos.....	74
Fig. 4-16. Cepas vs Residuos.....	74
Fig. 4-17. Tiempo vs Residuos.....	74

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Recolección de Cepas Fúngicas Nativas y Biomasa Residual Agrícola

Anexo B. Análisis Físico, Químico de Muestras.

Anexo C. Análisis Físico, Químico de Muestras.

Anexo D. Hidrólisis Enzimática

Anexo E. Esterilización y Fermentación de Muestras.

Anexo F. Destilación y Rectificación

Anexo G. Proceso en General

Anexo H. Revisión de Normas Técnicas, Resumen y Bibliografía.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo obtener bioetanol al 95 % mediante hidrólisis enzimática, a partir de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada con fines de biorefinería, la biomasa fue sometida a caracterización tanto física como química, para disminuir el tamaño de partícula así como para determinar si es apta para su posterior hidrólisis enzimática utilizando 5 cepas fúngicas nativas cuyas enzimas celulasas y xilasas son capaces de convertir cadenas poliméricas en monómeros como la glucosa, se utilizó 100g de biomasa pre tratada para el proceso de hidrólisis, sacarificación, fermentación, destilación y rectificación con carbón activado. Se utilizó métodos inductivos-deductivos de tipo correlacional y diseño experimental de bloques completamente al azar con tres factores de estudio, 30 tratamientos, 3 repeticiones, con 90 ensayos. Las variables fueron analizadas según el diseño empleado mediante un análisis estadístico de varianza para determinar diferencias significativas en las muestras. Las pruebas de medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza, se efectuó una transformación polinomial para observar el efecto lineal o cuadrático de los tratamientos. El destilado se recoge cuando la temperatura empieza a estabilizarse a 65°C, cuando alcanzó 88°C se detiene porque pueden destilarse alcoholes superiores, se rectificó con destilación vertical con condensador de bulbos, se obtiene bioetanol azeotrópico de 89%, finalmente se lleva a filtración con carbón activado granulado para eliminar compuestos no deseados. Esto nos permite aceptar la hipótesis de la investigadora donde los tratamientos T4,T2,T3: residuo agrícola de maíz, tres tipos de hongos y 192 h, obtuvieron mejores rendimientos con un porcentaje igual al 95%, esto lo corrobora el análisis de varianza con $p < 0,05$ que se ajusta con los resultados obtenidos en laboratorio. El tiempo estimado para el proceso completo fue de 15-20 días.

Palabras clave: BIOETANOL, BIOMASA, HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, SACARIFICACION, FERMENTACIÓN, DESTILACIÓN, BIOREFINERIA.

LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente por
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Nombre de reconocimiento
(DN): c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766974,
cn=LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Fecha: 2021.06.14 12:54:11
-05'00'



0079-DBRAI-UPT-IPEC-2021

ABSTRACT

The investigation aimed to obtain 95% bioethanol by enzymatic hydrolysis, from agricultural residual biomass from white corn, wheat and barley for biorefinery purposes. The biomass was subjected to both physical and chemical characterization, to reduce the particle size as well as to determine if it is suitable for subsequent enzymatic hydrolysis using 5 native fungal strains whose cellulase and xylanase enzymes are capable of converting polymer chains into monomers such as glucose, 100g of pretreated biomass was used for the hydrolysis, saccharification, fermentation, distillation and rectification with activated carbon. Inductive-deductive methods of correlational type and a completely randomized block experimental design with three study factors, 30 treatments, 3 repetitions, with 90 trials were used. The variables were analyzed according to the design used by means of a statistical analysis of variance to determine significant differences in the samples. The means tests were evaluated with the Tukey statistical test at 95% confidence, a polynomial transformation was carried out to observe the linear or quadratic effect of the treatments. The distillate is collected when the temperature begins to stabilize at 65°C, when it reaches 88°C it stops because higher alcohols can be distilled, it was rectified using vertical distillation with a bulb condenser, 89% azeotropic bioethanol is obtained. Finally, it is filtered with activated carbon granulate to remove unwanted compounds. This allows us to accept the researcher's hypothesis where the treatments T4, T2, T3: agricultural residue of corn, three types of fungi and 192 h, obtained better yields with a percentage equal to 95%, this is corroborated by the analysis of variance with $p < 0.05$ that is adjusted with the results obtained in the laboratory. The estimated time for the complete process was 15-20 days.

Keywords: BIOETHANOL, BIOMASS, ENZYMATIC HYDROLYSIS, SACARIFICATION, FERMENTATION, DISTILLATION, BIOREFINERY.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles existen desde que la humanidad descubrió cómo hacer fuego y se valió de madera para cocinar o calentarse, ya para el siglo XVIII, las principales ciudades europeas y americanas se iluminaban utilizando grasas vegetales. Eso cambió a partir de 1860, el uso de kerosene se impuso para lámparas de casas y calles. A principios del siglo XX, Rudolf Diesel (1858- 1913), inventor del motor de combustión interna que lleva su nombre, desarrolló un prototipo de ese motor que funcionaba con aceite de maní, ya más adelante se empezó con el uso de hidrocarburos fósiles para motores a Diesel.

Actualmente el agotamiento de los combustibles fósiles y la creciente demanda energética, ha provocado el interés en biocombustibles renovables. El bioetanol es uno de los biocombustibles más estudiados y sugeridos para contrarrestar la problemática que existe debido a la posibilidad que se tiene de producirlo a partir de recursos renovables y su potencial de sostenibilidad, ese combustible reduce aproximadamente el 90 % de las emisiones de CO₂ al ambiente con respecto a otros combustibles como la gasolina. Actualmente los mayores productores de bioetanol primera generación son Brasil, que produce principalmente a partir de caña de azúcar y Estados Unidos que lo produce a partir del almidón del maíz, trigo, arroz y en menor cantidad de remolacha y sorgo, mismos que contienen almidón en su estructura.

América del Sur ocupa el segundo lugar en importancia como productor mundial de biocombustibles, ante todo por la acción de Brasil, que en 2019 exportó a los Estados Unidos y a países europeos como Suecia y Holanda 33875 Millones de litros es decir el 26% de la cantidad global consumida. Brasil y Estados Unidos son líderes mundiales en lo que se refiere al etanol (CEDRSSA, 2020). Argentina, también tiene una producción más reciente de biocombustibles, lo cual la ha convertido en uno de los cinco mayores generadores de biodiésel del mundo, México es un país que está empezando a exportar biocombustibles.

Hay varias formas de producir biocombustibles de segunda generación lo cual se obtiene de materia lignocelulósica conocida como biomasa, de las cuales la vía bioquímica y la termoquímica son las más conocidas. Los biocombustibles de tercera generación provienen de organismos que producen su propio alimento a partir de energía solar y CO₂, entre ellas algas, que se pueden cultivar en reactores fotoquímicos o en piletones al aire libre. Los biocombustibles

de cuarta generación se producen a partir de organismos genéticamente modificados para que capturen más dióxido de carbono del ambiente, con lo que tienen la doble característica de proveer de una fuente alternativa de energía y ser generados por procedimientos que disminuyen el contenido atmosférico de gases de efecto invernadero. (Ramos S, 2019)

En Ecuador el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en su artículo 67 literal d, cita lo siguiente “Se preferirá y fomentará la producción y uso de aditivos oxigenados, tal como el etanol anhidro, a partir de materia prima renovable” (Figuerola, 2008).

La obtención de bioetanol comprende principalmente un pretratamiento seguido por la hidrólisis de la estructura lignocelulósica de la biomasa para la liberación de azúcares fermentables, la fermentación y la destilación de la solución.

Una mezcla típica obtenida en un proceso de fermentación alcohólica tiene alrededor de 10% al 13% en peso de etanol y esta mezcla se puede concentrar hasta alcohol de alta pureza. El bioetanol forma una mezcla azeotrópica con el agua por lo que no es posible la obtención de etanol anhidro mediante procesos de destilación simple, por esta razón, es necesaria la implementación de procesos de separación como la destilación extractiva, en la que se añade un tercer componente capaz de desplazar el azeótropo formado por el etanol y el agua, o la implementación de una rectificación.

El desarrollo de métodos enzimáticos en la biomasa lignocelulósica para deslignificar y romper cadenas de celulosa en azúcares que se fermenten a etanol es el interés de muchos grupos de investigación, eso incluye métodos que económicamente rindan.

Este trabajo se consolidó con la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de tres residuos agrícolas abundantes en la provincia.

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Situación problemática.

El crecimiento de la población mundial en las últimas décadas, los avances industriales y los cambios en nuestro estilo de vida han contribuido fuertemente a disminuir las reservas de petróleo del planeta y por ende aumentar la contaminación ambiental.

La eficiencia energética constituye uno de los aspectos críticos de la meta mundial de desarrollo sostenible (Wang, Wei y Zhang, 2012). Por ello, muchos han sido los estudios en esta materia para

abordar los avances y las previsiones futuras energéticas de gran interés para el planeta (Song, An, Zhang, Wang y Wu, 2012).

Debido a que la mayoría de combustibles son derivados de fósiles, se ha impulsado la búsqueda de energías renovables alternativas que permitan asegurar el abastecimiento de combustible y a su vez ser más respetuosas con el ambiente, reduciendo las emisiones de CO₂ y el calentamiento global, y así tratar de garantizar el abastecimiento energético de todo el planeta. Se estima que solo el 8.5% de la energía procede de fuentes renovables.

El gobierno de Ecuador en el año 2010 impulsó un proyecto para la producción de Eco país (gasolina ecológica), se incluyó en el Programa Nacional de Agro energía, impulsado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (Magap), dentro del cual incluyeron la plantación de 6.000 hectáreas de caña de azúcar con fines energéticos e instalación de plantas de procesamiento de alcohol etílico para la producción de gasolina ecológica compuesta por un 5% de etanol anhidro y con el 95% de gasolina normal, el proyecto empezó a comercializarse en parte de las gasolineras de Guayaquil. Desde enero de 2010 hasta marzo del mismo año el plan piloto alcanzó 62 millones de despacho, generando un ahorro neto al país por \$ 9,6 millones. Dicha urbe consume cerca de 5800 barriles de gasolina extra y requiere 50000 litros diarios de combustible orgánico. Actualmente el proyecto ha llegado casi a todos los rincones del país, con el uso del biocombustible se preveía reducir las emisiones de gases que causan el efecto invernadero, promover el desarrollo agroindustrial, aumentar el empleo rural y disminuir el gasto fiscal por la compra de derivados de petróleo. (El Telégrafo, 2012).

El conocimiento es un medio para el cambio de la matriz productiva y energética, estamos trabajando por el Ecuador del futuro, el de la era post petrolera, se trata del Proyecto RESETA (Recursos Sustentables para Etanol) que le ha permitido al Ecuador en el 2012 diseñar y construir su primera biorefinería piloto con capacidad para producir de 40.000 a 60.000 litros de etanol anhidro por año con biomasa residual de bagazo de banano, papa, palma africana, tagua, entre otros, RESETA busca la transición de una economía basada en los hidrocarburos a una economía basada en los carbohidratos; esta se encuentra ubicada en el campus Nayón–Quito de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). (Ladrón de Cerebros, 2016)

Según la FAO, la producción mundial total de cereales y gramíneas en 2018 estimó un aproximado de 2652,6 millones de toneladas (Mt). De entre todos los cereales, la producción de trigo fue de 730,2 Mt, maíz 36 Mt, cereales secundarios 1405,4 Mt, considerando que por cada kilogramo de cereales se generan entre 0,53 y 1,3 kg de residuo (paja), ésta actividad agrícola genera al año una elevada cantidad de residuos, que en la actualidad son utilizados, en el mejor

de los casos y en cantidades pequeñas, como enmienda agrícola y alimento para el ganado, siendo en su mayoría quemados directamente en el campo, lo que provoca contaminación y riesgo de incendios, informa también que se quemaron 379,4 Mt de residuos agrícolas de maíz, arroz, caña de azúcar y trigo, provocando unas emisiones de 29.746 Gg de equivalentes de CO₂ procedentes de la producción de metano y óxido nitroso generados por la combustión de un porcentaje de residuos agrícolas quemados in situ. Estas emisiones superaron los 785 millones de toneladas de CO₂ eq en 2010, con un crecimiento del 75% desde 1990.

Las nuevas estimaciones sobre los gases de efecto invernadero muestran que las emisiones procedentes de la agricultura, la silvicultura y la pesca se han casi duplicado en los últimos cincuenta años, y podrían aumentar en un 30 por ciento adicional para 2050, sin no se lleva a cabo un esfuerzo mayor para reducir las (FAO, 2014)

Razón suficiente para plantear esta propuesta en la provincia Bolívar, que incentive a darle valor a los residuos agrícolas.

1.2. Preguntas directrices o específicas de la investigación

- ✓ ¿Cómo la hidrólisis enzimática de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada puede dar origen a bioetanol con fines de biorefinería?
- ✓ ¿Por qué razón pretendo desarrollar este tema de investigación en mi tesis?
- ✓ ¿La biomasa residual agrícola más conocida como rastrojo o paja podría considerarse materia prima ideal para la obtención de bioetanol?
- ✓ ¿Será que mi tema es demasiado amplio, corto o es adecuado?
- ✓ ¿Qué conocimientos y experiencia tengo en el tema?
- ✓ ¿Tengo experiencia en el uso de metodologías?
- ✓ ¿Conozco los métodos, técnicas y procedimientos específicos para realizar la investigación?
- ✓ ¿Tengo acceso a fuentes de información para poder investigar el tema?
- ✓ ¿Cómo lo voy a justificar, la que pretendo es lo adecuado?
- ✓ ¿Qué tipo de investigación la voy hacer? ¿Exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa? ¿Por qué?
- ✓ ¿Las variables que planteo me ayudaran a cumplir los objetivos?
- ✓ ¿Tendré las suficientes variables o faltarán o estarán de sobra?
- ✓ ¿Tendré problemas para poder medir las variables seleccionadas? ¿Cuáles serán?
- ✓ ¿Qué tipo de análisis estadísticos iré a realizar para responder a las preguntas?

- ✓ ¿Podré conseguir ejecutar el trabajo sin problemas? O ¿Tendré que pedir apoyo a otras instituciones?
- ✓ ¿Podré sola hacer el trabajo, cubrir sola los gastos o pediré ayuda económica?
- ✓ ¿Qué equipos me harán falta para los diferentes análisis?
- ✓ ¿Los resultados podrían ser publicables como artículo novedoso?
- ✓ ¿La bibliografía en inglés es de gran ayuda?
- ✓ ¿Existe bibliografía en revistas de alto impacto?
- ✓ ¿Cómo contribuirá el desarrollo de este proyecto a disminuir el impacto de la huella de carbono en la Provincia Bolívar?

1.3. Justificación

Según MAGAP(2018), la provincia Bolívar ha sido declarada oficialmente como la tierra del maíz por ser una zona de gran producción agrícola, esta declaratoria se realiza debido a que en la provincia se siembra 36 mil hectarias de maíz blanco variedad Guagal INIAP 111, producto que sustenta la economía de 12500 agricultores, alcanzando los 80 y 90 qq/ha (3636 y 4090,5kg/ha), cuando en períodos anteriores su producción oscilaba entre los 50 y 60 qq/ha (2272,5 y 2727 Kg/ha). Obteniéndose un residuo aproximado entre 120 a 134 millones de Kg de biomasa residual; el trigo y cebada son los cereales secundarios en la provincia por lo que sus residuos son relevantes para nuestro proyecto.

La obtención de bioetanol a partir de biomasa residual agrícola de maíz blanco, trigo y cebada conlleva una cadena de producción que empieza con la siembra de las semillas, después de un periodo de tiempo se cosecha generando grandes cantidades de residuos también llamada biomasa residual (paja o rastrojo), actualmente no tienen el destino adecuado, mismos que en su gran mayoría son quemados, restando interés en el suelo y ambiente que sufren sus efectos.

Bolívar cuenta con biomasa residual agrícola rica en lignocelulosa conocida como paja o rastrojo procedente de maíz blanco, trigo, cebada, entre otros susceptibles de ser valorizado y aprovechado, que por su composición y abundancia es una materia prima idónea para la producción de bioetanol mediante hidrólisis enzimática con fines de biorefinería, debido a que ocupan los primeros puestos de producción agrícola.

Razón suficiente para considerar la importancia de esta biomasa residual con mejores fines y con ello mejorar el buen vivir de las comunidades, parroquias, cantones y provincia, impulsando la matriz productiva del país con un forma de energía limpia, apuntando hacia una economía que

pueda generar valor agregado mediante el conocimiento contribuyendo a seguir investigando otras áreas no convencionales.

1.4. Objetivos de la investigación

Objetivo general.

- Obtener bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada con fines de biorefinería.

Objetivos específicos.

- Analizar las muestras de biomasa residual mediante operaciones físicas de acondicionamiento y caracterización integral, determinando los diversos componentes para su adecuado tratamiento.
- Aplicar hidrólisis enzimática por aislamiento de cepas fúngicas nativas que permitan romper las cadenas de polisacáridos de celulosa para obtener glucosa y su posterior transformación.
- Determinar el tipo de cultivo, la cepa fúngica y el tiempo como parámetros indispensables en la obtención de bioetanol.
- Efectuar operaciones de pureza susceptible a ser utilizado en biorefinería que permitan obtener un bioetanol con un porcentaje mayor o igual al 95%

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis general

Es factible procesar biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada mediante hidrólisis enzimática con cepas fúngicas nativas para obtener etanol con fines de biorefinería.

1.5.2. Hipótesis específicas

- Mediante análisis de muestras de biomasa residual se determina su composición para su debido tratamiento.
- Aplicando hidrólisis enzimática por aislamiento de cepas fúngicas nativas se rompe las cadenas de polisacáridos de celulosa para obtener glucosa.
- El tipo de cultivo, la cepa fúngica y el tiempo son determinantes en la obtención de bioetanol.

- La fermentación, destilación y rectificación permiten obtener un bioetanol con un porcentaje de pureza igual o superior al 95%.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

La presente investigación se basó en la revisión literaria de artículos científicos en inglés/español y trabajos relacionados con la obtención de bioetanol de segunda generación (2G), obtenidos de recursos naturales renovables “Biocombustibles”, mismos que se inician a fines del siglo XIX y nace prácticamente con el uso de los hidrocarburos.

2.1.1. *Origen de los biocombustibles*

Según Salinas y Gasca (2009), fuente de energía. La idea de aceites vegetales como combustible para motores de combustión interna data de 1895. En ese año el Dr. Rudolf Diesel desarrolló el primer motor diesel, cuyo prototipo estaba previsto que funcionara con aceites vegetales como por ejemplo el aceite de maní, que en las primeras pruebas funcionó bien.

Años después Henry Ford hizo el primer diseño de su automóvil modelo T en 1908, esperaba utilizar el etanol como combustible. La Standard Oil empleó a principios de los años veinte, en el área de Baltimore, 25% del etanol en gasolina, pero los elevados precios del maíz producto del que se obtenía junto con los altos costos de almacenamiento y las dificultades en el transporte, hicieron abandonar el proyecto; además el petróleo irrumpió en el mercado más barato, más eficiente y más disponible. La primera experiencia del empleo de un biocombustible en el transporte público data de 1938, cuando se utilizó biodiesel en la línea de ómnibus Bruselas-Lovaina en el curso de la Segunda Guerra Mundial. Los alemanes emplearon el biodiesel para mover sus flotas de guerra y los vehículos pesados en el norte de África.

Con la crisis del petróleo que se vivió en la década de los setenta disminuyó la oferta, por lo que se disparó su precio en forma exorbitante, así como el precio de la gasolina, que se incrementó 100%. A fines de 1979, a raíz de la crisis de los precios del petróleo, se estableció una mezcla de gasolina y etanol: los biocombustibles se volvían a presentar como una alternativa al alza de los precios del petróleo y al posible agotamiento de los recursos no renovables.

En Brasil la crisis del petróleo también tuvo fuerte repercusión. En el año de 1975, se desarrolló el proyecto Proalcohol, cuyo objetivo era reemplazar el uso de los hidrocarburos.

Finalmente, la guerra de Kuwait elevó más todavía los precios de los hidrocarburos, afianzando la idea de nuevas fuentes de energía alternativa.

2.1.2. Hidrólisis Enzimática Celulolítica

La producción de celulasas microbianas comerciales tiene un mercado mundial. Las celulasas se usan ampliamente en la investigación y en las industrias alimentaria, papelera, textil, química y energética (Bhat y Sukumaran, 2000).

La mayoría de las celulasas se derivan de hongos porque han demostrado una alta actividad y han producido celulasas en grandes cantidades. En los últimos años, la necesidad de celulasas más robustas en sustratos complejos, como los residuos agrícolas con alto contenido de celulosa, ha aumentado debido a su uso como sustratos potencialmente fermentables en la producción de biocombustibles (Juturu V; Wu JC, 2014; Martínez AC et al., 2008).

Una opción para esto serían las celulasas bacterianas, que forman complejos multienzimáticos sinérgicos con mayor actividad (Sadhu y Maiti, 2013). Además, las celulasas bacterianas son activas en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura, como las que se encuentran en los procesos de compostaje (Ryckeboer et al., 2003), incluidos los entornos de alta temperatura donde la presencia de enzimas termoestables aumenta las tasas de bioconversión (Acharya y Jhoshi, 2012). Las especies bacterianas que dominan la fase termófila de los procesos de compost pertenecen al género *Bacillus*. Desempeñan un papel importante en la degradación de sustratos complejos, como la celulosa. Existen varios informes de celulasas bacterianas con actividades a pH extremo (ácido o básico), alta salinidad y temperaturas (Annamalai et al., 2013). Estas celulasas se han aislado de varios entornos, como las tripas de termitas (Bashir et al., 2013), el suelo contaminado con residuos de la industria papelera (Rawat y Tewari, 2012) el suelo de mangle (Behera et al., 2014), la biomasa lignocelulósica degradada (Ventorino et al., 2015) y los sistemas de compost de residuos de cocina y jardín, desechos sólidos municipales, residuos de café y otros residuos agrícolas (Eida et al., 2012). Estos residuos celulósicos son complejos, y cada uno de ellos tiene características que confieren cierta especificidad.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Bioetanol

Es conocido también como alcohol etílico, es un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, está presente en las bebidas alcohólicas, se usa como antiséptico y como biocombustible (Almeida, 2017) En la tabla 2 se presentan las propiedades físico químicas del alcohol etílico a 100 °C y 1 atm.

Tabla2-1. Propiedades físico químicas del alcohol etílico.

Propiedades físico químicas	Descripción
Estado de agregación	Líquido
Apariencia	Incoloro
Densidad	810 kg/m ³ ; (0.810g/cm ³)
Masa molecular	46,07 uma
Punto de fusión	158.9 K (-114.1 °C)
Punto de ebullición	351.6K (78.6 °C)
Temperatura crítica	514 K (-114.1 °C)
Presión crítica	63 atm
Temperatura de inflamación	13 °C
Poder calorífico inferior	6.619 Kcal/Kg
Poder calorífico Superior	7.302 Kcal/Kg

Fuente: (Almeida, 2017)

Si el etanol es elaborado a partir de fuentes biológicas, y por tanto renovables, se denomina **bioetanol**. Su producción se realiza mediante la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica, que es un proceso de degradación de los monómeros o dímeros de hidratos de carbono llevado a cabo por microorganismos, obteniendo un alcohol hidratado con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado (0,7% de agua) se puede utilizar como combustible. (Velázquez, B. 2017).

El etanol se usa como materia prima química o como promotor de octano de gasolinas. Mezclas de etanol: gasolina (v: v) en concentraciones del 5 al 10%, E5 y E10 respectivamente. (Hernandez-Salas et al., 2009). Con la mezcla E10 se define la cantidad máxima de etanol permitida para motores no modificados, por las garantías de fabricantes de automóviles. (Yacobucci, 2010)

Aunque el alcohol más usado en la actualidad como carburante para sustituir a la gasolina sea el bioetanol, existen otros con posibilidades técnicas de adaptarse a las necesidades de los motores, como son el biopropanol y el biobutanol. (Velázquez, B. 2017).

2.2.1.1. Clasificación de los biocombustibles

Biocombustibles de primera generación (1G)

Los biocombustibles líquidos de primera generación son los más socorridos; esto se demuestra porque hoy en día se está produciendo aproximadamente el equivalente a 20 millones de toneladas de petróleo, lo que significa 1% del consumo mundial total. Los biocombustibles líquidos más usados actualmente son: Los bioalcoholes. Son alcoholes de origen orgánico. Están formados por dos tipos fundamentales: el etanol y el metanol. El etanol presenta mejores expectativas en lo que se refiere a la utilización, al primero se le conoce como bioetanol. El etanol se fabrica siguiendo un proceso similar al de la cerveza. La materia prima es muy variada: cereales (maíz, trigo y cebada), tubérculos (yuca, camote, patata y malanga), celulosa (madera y residuos agrícolas), y sacarosa (remolacha, caña de azúcar, melaza y sorgo dulce). Estos compuestos energéticos se transforman en azúcares, y a continuación se convierten en etanol por medio de la fermentación alcohólica. Se emplea en mezclas con gasolina convencional para sustituirla como carburante en mayores o en menores proporciones; no substituye totalmente a la gasolina, ya que ésta le da a la mezcla estabilidad y resta volatilidad, lo que facilita su uso cotidiano, su almacenamiento y su transporte. (Salinas y Gasca, 2009).

Biocombustibles de segunda generación (2G)

Los biocombustibles de segunda generación obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica son una alternativa interesante, ya que las materias primas lignocelulósicas no compiten con los cultivos alimentarios y también tienen un precio más competitivo que las materias primas agrícolas convencionales (Gómez *et al.*, 2013). En principio, existen dos opciones para abastecer la demanda de la materia prima para la producción de los biocombustibles de segunda generación (en adelante, biocombustibles). Una primera opción consistiría en aprovechar los residuos agrícolas o procedentes de la madera, aunque estos residuos parecen a todas luces insuficientes (FAO, 2008), por lo que los procesos de segunda generación podrían ser más rentables si se integrasen en las instalaciones manufactureras existentes, por ejemplo, de fabricación del papel, que producen biomasa barata o subproductos de biomasa. La segunda opción es crear una reserva forestal mediante plantaciones para abastecer las necesidades de materia prima (Gómez *et al.*, 2013).

Sin embargo, la conversión de lignocelulosa a etanol a escala comercial es todavía un reto, ya que se requieren pretratamientos específicos para desestructurar este material, procesamientos de producción más sofisticados, más inversión por unidad de producción e instalaciones de mayor envergadura que las de 1G (Nigam y Singh, 2011).

Biocombustibles de tercera generación (3G)

La última generación de biocombustibles dirige su atención a la explotación de ciertos organismos como levaduras, hongos y microalgas. Algunos de estos organismos son considerados como fuentes potenciales para la producción de bioetanol y biodiésel ya que pueden sintetizar y almacenar grandes cantidades de lípidos, proteínas e hidratos de carbono durante períodos cortos de tiempo (Nigam y Singh, 2011; Xiong et al., 2008). Además, también pueden utilizarse para producir otros compuestos con alto valor añadido para el sector alimentario, químico o farmacéutico.

2.2.2. Biomasa

Se define la biomasa como: “toda materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía renovable entendiendo que, se consume a un ritmo inferior o igual al que se produce”. (Espinosa, 2013)

“La Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) utiliza la definición de la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 para catalogar la biomasa como: todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización. Entre estos últimos estarían el carbón, el petróleo y el gas natural, cuya formación y composición hace millones de años no es comparable con lo que se denomina “el balance neutro de la biomasa” en las emisiones de dióxido de carbono (CO₂). La combustión de biomasa no contribuye al aumento de efecto invernadero porque el carbono que se libera forma parte de la atmósfera actual y no del subsuelo, capturado en épocas remotas como el gas y petróleo.



Figura 2-1. Tipos de biomasa
Realizado por: Ronquillo María, 2020

2.2.3. Métodos para la obtención de biocombustibles

Según la naturaleza de la biomasa, se puede contar con diferentes métodos para obtener biocombustibles: procesos mecánicos (astillado, trituración y compactación), termoquímicos (combustión, pirolisis y gasificación), biotecnológicos (micro bacterianos y enzimáticos) y extractivos para obtener combustibles líquidos, sólidos y gaseosos. (Zabet et al, 2017).

2.2.4. Bioetanol de segunda generación.

El bioetanol 2G se obtiene de material lignocelulósico y se considera una de las alternativas más viables para sustituir o disminuir el uso de gasolina por dos razones principales: no compite con el sector alimentario y la lignocelulosa es el recurso renovable más abundante en el planeta. Entre los residuos agrícolas, la paja de trigo ocupa un lugar destacado como materia prima para la producción de etanol 2G, según la FAO la estimación sobre la **producción** mundial de cereales en 2019 se ha revisado al alza, con un incremento de 1,2 millones de toneladas a abril de 2020, ubicándose ahora en 2 721 millones de toneladas, es decir, 64,6 millones de toneladas (un 2,4 %) por encima del nivel alcanzado en 2018.

El trigo junto con el arroz, el maíz y la cebada, son los cereales de mayor importancia en el Ecuador. El consumo nacional de trigo supera las 450000 Tm /año. El Ecuador importa el 98% de los requerimientos internos de trigo (Banco Central del Ecuador, 2007).

2.2.5. Características morfológicas de la biomasa

Características morfológicas del maíz y su biomasa

Nombre común: Maíz blanco

Nombre científico: *Zea mays L.*



Figura 2-2. Plantación de Maíz
Fuente: Ronquillo María, 2020



Figura 2-3. Biomasa o rastrojo de maíz blanco
Fuente: Ronquillo María, 2020

Características morfológicas del trigo y su biomasa

Nombre común: Trigo

Nombre científico: *Triticum aestivum L.*



Figura 2-4. Plantación de trigo
Fuente: Ronquillo María, 2020



Figura 2-5. Biomasa o rastrojo de trigo
Fuente: Ronquillo María, 2020

Características morfológicas de la cebada y su biomasa

Nombre común: cebada

Nombre científico: *Hordeum vulgare*



Figura 2-6. Plantación de cebada
Fuente: Ronquillo María, 2020



Figura 2-7. Biomasa o rastrojo de cebada
Fuente: Ronquillo María, 2020

Tabla 2. 2. Comparación de contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina en pajas de maíz, trigo y cebada.

Material lignocelulósico	Celulosa(%)	Hemicelulosa(%)	Lignina(%)	Cenizas y Extractivos
Rastrojo de maíz	36,80	30,60	23,10	9,50
Paja de trigo	30,20	22,30	17,00	30,5
Paja de cebada	35,15	23,00	16,10	25,90

Fuente: Ballesteris et al., (2004); Olofsson et al., (2008)

2.2.6. Estructura de la lignocelulosa

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía. La biomasa residual agrícola como otros residuos lignocelulósicos, contiene tres componentes principales (% peso/peso): celulosa (40-50%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (5-20%). Los porcentajes de estos componentes pueden variar significativamente dependiendo de la especie, del suelo y de las condiciones climáticas (Prasad et al., 2007). La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos potencialmente convertibles a etanol mediante hidrólisis y posterior fermentación, pero la lignina ofrece un obstáculo ralentizador y por ello es necesario separar antes de llevar a cabo este proceso. (Velázquez, B. 2017).

2.2.6.1. Celulosa

Es un polisacárido que tiene la fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ es químicamente considerada un polímero natural, formada por un gran número de unidades de glucosa y es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas, comprende por lo menos,

una tercera parte de toda la materia vegetal y es el más abundante de todos los compuestos orgánicos. (Mantilla, 2012) Técnicamente se da el nombre de celulosa a las fibras blancas que se obtienen cuando se somete la materia vegetal a tratamientos de purificación mediante los cuales se extraen casi totalmente los demás componentes de la planta, especialmente la lignina. Está compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. La celulosa es el compuesto orgánico natural más abundante y, por tanto, materia prima potencial para la Química Orgánica Industrial. La madera contiene del 40 al 60% de celulosa y la paja un 30%. Más del 90% de la producción de celulosa se obtiene de la madera y el 10% restante de otras plantas. (Sanz, 2019).

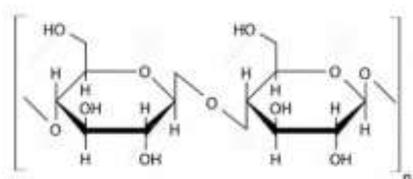


Figura2-8. Estructura molecular de la celulosa.

Fuente: (Sanz, 2019).

2.2.6.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa ($C_5H_8O_4$) está formada por una cadena recta y altamente ramificada de polisacáridos muy heterogéneos e incluye diversos azúcares como pentosas. (Gírio et al., 2010). La hemicelulosa son los segundos biopolímeros más abundantes en las plantas después de la celulosa y se la puede emplear en varias aplicaciones entre ellas como una capa de barrera en el embalaje del papel y cartón. (Thuvander & Jonsson, 2019)

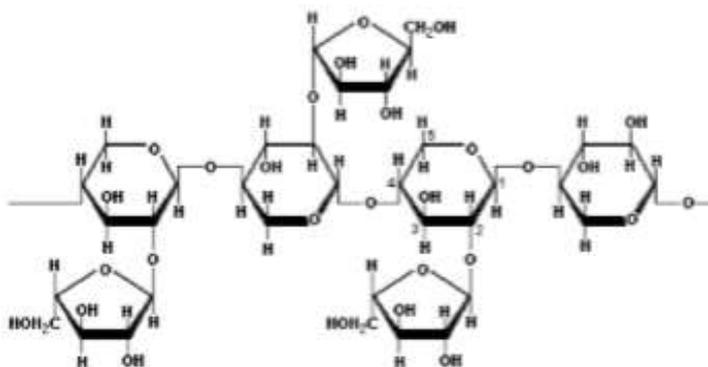


Figura 2-9. Estructura molecular de la hemicelulosa.

Fuente: (Thuvander & Jonsson, 2019)

2.2.6.3. Lignina

La lignina es el constituyente intercelular incrustante o cementante de las células fibrosas de los vegetales. Se concentra en la lámina media y funciona prácticamente como relleno para impartir rigidez al tallo de la planta. Es el segundo elemento en importancia de la composición. La lignina representa el 30 % de los componentes del vegetal. La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos. (Velázquez, B. 2017).

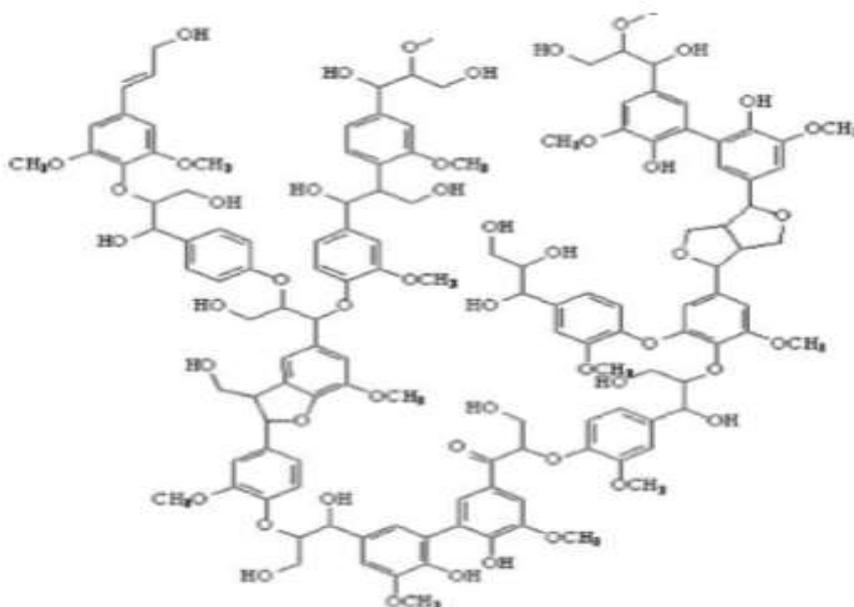


Figura 2-10. Estructura molecular de la lignina

Fuente: (Velázquez, B. 2017).

2.2.6.4. Otros componentes de la lignocelulosa

Aparte de todos estos elementos, en la pared vegetal hay también ácidos cinámicos, como el ácido p-cumárico, que contribuyen a la unión de la lignina con las hemicelulosas mediante enlaces covalentes, o el ácido ferúlico, que es el principal responsable de las uniones entre la lignina y los polisacáridos. Por último, y como componentes minoritarios de la biomasa residual agrícola, también cabe mencionar la presencia de pectinas, proteínas, lípidos y minerales. (Fengel y Wegener, 1984).

2.2.7. Proceso de obtención de bioetanol

2.2.7.1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

El pretratamiento se da antes de proceder a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico facilitando la acción de los enzimas.

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a: reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis.

Además, un pretratamiento eficaz debe reunir otras características como: bajo consumo energético, bajos costes de inversión, utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables, y debe ser aplicable a diversos substratos. (Borja, 2016)

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos:

- físicos,
- químicos,
- físico-químicos,
- biológicos

Pretratamientos físicos

Estos pretratamientos se basan principalmente en la reducción del tamaño de partícula de la materia prima a través de procesos de triturado, astillado, molienda y pulverización. La disminución del tamaño de partícula conlleva una mayor digestibilidad, pero también un incremento en el consumo de energía. (Talebnia et al., 2010).

Existen diferentes tipos de molinos: molino de bolas, molino de martillos, molino de cuchillas, molino de rodillos. (Velázquez, B. 2017).

Pretratamientos químicos

En estos procesos se emplean ácidos, bases y agentes oxidantes (ej. peróxido y ozono), generando cada uno resultados muy diferentes. Por ejemplo, los agentes alcalinos y oxidantes facilitan la eliminación de la lignina, mientras que un tratamiento ácido facilitaría la solubilización de la hemicelulosa (Talebnia et al., 2010). Un inconveniente de estas tecnologías es que durante los tratamientos

se generan subproductos que pueden inhibir etapas posteriores y afectar negativamente el rendimiento global del proceso.

Caracterización Elemental

Técnica que permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presentes en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas. Esta técnica analítica es complementaria de otras de análisis estructural para la confirmación de la fórmula molecular de compuestos provenientes de síntesis orgánica o inorgánica. Las áreas de aplicación son: Análisis de fármacos, suelos y sedimentos, polímeros, industria alimenticia, control ambiental, materiales agrícolas, productos naturales, aceites, entre otras. Existen equipos como el analizador elemental que le permite un análisis específico de elementos. (UNAM, 2018)

Caracterización Proximal

El análisis proximal comprende la determinación de los porcentajes de humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos. Al realizar el análisis químico de matrices alimentarias, la toma y tratamiento de la muestra y el método analítico seleccionado deben ser los apropiados. Los resultados deben ser analizados con un criterio estadístico y comparados con la normativa vigente. Solo realizando estos pasos, se puede proporcionar un resultado que sea válido para el consumidor (UCR, 2018)

Caracterización Estructural

Técnica que permite determinar el contenido total de celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, lípidos y proteínas. Mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas más importantes (resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia magnética (EM, Ultra visible (UV), infrarojo (IR), espectroscopia de transmisión con transformada de Fourier (FTIR), difracción con rayos X (DRX) y de su potencial de utilización para el análisis de estructuras químicas, además se utilizan técnicas y metodologías convencionales como la determinación de fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, mismas que nos permiten mediante cálculo obtener datos estructurales de la materia.

Pretratamientos físico-químicos

La idea es solubilizar los diferentes componentes de la lignocelulosa, variando la temperatura, presión, pH y contenido en humedad de la materia prima. Dentro de este grupo existen varias

modalidades, como la explosión por vapor o steam explosion (EV) en el que la paja se somete a cambios muy bruscos de temperatura y presión en tiempos muy cortos, el pretratamiento con agua caliente en fase líquida (ACL) consiste en humedecer la paja con agua caliente y someterla a presión durante tiempos de tratamiento mucho más largos que los usados en la EV. (Petersen et al., 2009), la explosión por vapor (AFEX) se basa en tratamientos alcalinos, utilizando amoníaco y cambios de temperatura y presión y, más recientemente la extrusión en presencia de agentes químicos puede ser combinada durante el tratamiento con agua caliente, ácidos, bases o surfactantes ya sea en procesos discontinuos o continuos (Duque et al., 2013).

Pretratamiento biológico

Es la capacidad de ciertos microorganismos para degradar la lignina y así facilitar la accesibilidad a la celulosa y hemicelulosa, se puede destacar ciertos hongos de podredumbre blanca, verde, marrón o blanda para degradar la lignina y separarla de la hemicelulosa. En función del patrón de degradación que producen sobre la lignocelulosa se pueden encontrar una gran variedad entre ellos hongos filamentosos celulolíticos como: *Trichoderma reesei*, *aspergillus niger*, *aspergillus nidulans*, *neurospora crassa*, *penicillium decumbens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viridee*, *penicillium notatum* (Gutierrez, I et al., 2014)

2.2.7.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, cuya acción conjunta produce la descomposición de la celulosa en monosacáridos. Estas enzimas se encuentran en las plantas superiores, en los sistemas digestivos de los herbívoros tanto de vertebrados como invertebrados, y un gran número de microorganismos (hongos y bacterias). Las celulasas más utilizadas a nivel industrial son las de origen microbiano, dado que pueden ser fácilmente producidas en grandes cantidades en biorreactores con diversos medios de cultivo. Los más comunes son de hongos de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*. La condición óptima de operación se sitúa en un pH 4-5 y temperatura entre 50 y 65°C. También resultan interesante las celulasas provenientes de bacterias termófilas y mesófilas como cultivos de *Clostridium thermocellum* que se utilizan en cultivos mixtos levaduras con pH óptimo 5 y 6, y temperatura alrededor de los 65°C

Sin embargo, a veces se requieren otras enzimas, especialmente en el caso de la hemicelulosa ya que, dependiendo de su origen, puede presentar alta heterogeneidad (Gírio, 2010). Para facilitar la

hidrólisis de un material tan complejo, dependiendo de la materia prima utilizada, se pueden añadir proteasas, expansinas, o incluso enzimas ligninolíticas (Talebnia et al., 2010).

La hidrólisis enzimática es muy compleja e involucra muchas etapas y mecanismos de acción sobre el sustrato una de estas es la formación del complejo Enzima-Sustrato.

Microorganismos degradadores de la lignocelulosa.

El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo por dicha razón en este trabajo se ha investigado que en la naturaleza existen números organismos capaces de degradar la lignocelulosa, pero sin duda los principales descomponedores son los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias a través de la producción de celulasas extracelulares. Los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian & Valaskova, 2008), que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales. Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, son los mejores productores de celulasa extracelular (Lynd et al., 2002). Los basidiomicetos se han dividido en dos grupos: de podredumbre parda y los otros de podredumbre blanca. Los primeros han desarrollado mecanismos oxidativos para metabolizar la celulosa sin degradar la lignina, de manera que el material sobre el que crecen adquiere una tonalidad parda, los segundos degradan la lignina de manera preferente o simultánea a los polisacáridos originando un residuo blanquecino.

Entre algunos géneros y especies de hongos que producen celulasas se encuentran: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Rhizoctonia*, *Trametes versicolor*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium* (Lynd et al., 2002).

Enzimas fúngicas implicadas en la degradación de la lignocelulosa

Degradación de la celulosa

Los microorganismos que degradan la celulosa secretan una batería de enzimas muy amplia, con especificidades diferentes y que actúan conjuntamente. Las celulasas se dividen en tres grandes categorías (Baldrian y Valaskova, 2008):

- (i) Endo-1,4- β -glucanasas, que inician un ataque al azar en múltiples sitios de la fibra de celulosa.

- (ii) Exocelulasas o celobiohidrolasas, que liberan dímeros o monómeros desde los extremos terminales de las cadenas de glucosa.
- (iii) β -glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa (dímeros de glucosa) y otros oligosacáridos liberando monosacáridos.

Degradación de la hemicelulosa

La degradación de la hemicelulosa es más complicada debido a su heterogeneidad estructural y molecular, siendo los productos finales de hidrólisis monosacáridos y ácido acético (Girio et al., 2010). El xilano, que es el principal polímero de la hemicelulosa de la paja de trigo, requiere de la acción de endo y exo-1,4- β -xilanasas y 1,4- β xilosidasas para liberar la xilosa. Además, dependiendo de la complejidad de las hemicelulosas, otras enzimas como las xilan-esterasas, mananasas, feruloil-esterasas, p-cumárico esterasas, α -1-arabinofuranosidasas, α -4-O metilglucuronidasas o α -glucuronidasas pueden ser necesarias para hidrolizar completamente este polisacárido.

Degradación de la lignina

La lignina tiene una compleja y altamente irregular estructura, por lo que su biodegradación consiste en un proceso oxidativo, muy inespecífico, en el que intervienen oxidoreductasas extracelulares (peroxidasas, lacasas y oxidasas productoras de H₂O₂) e intracelulares, metabolitos y especies activas de oxígeno (Salvachúa, 2013)

2.2.7.3. Fermentación alcohólica

Consiste en la producción de etanol a partir de los azúcares liberados tras la hidrólisis enzimática. A nivel industrial, la fermentación de la glucosa se realiza eficientemente utilizando la levadura *S. cerevisiae*. Estequiométricamente, la conversión de glucosa a etanol es de 0.51 gramos de etanol por gramo de azúcar, pero en la práctica, obtener el 100% de conversión es muy difícil ya que aproximadamente el 5% de los azúcares se utilizan para el crecimiento y el metabolismo celular de la levadura. (Salvachúa, 2013)



El balance energético de la fermentación puede expresarse de la siguiente forma:

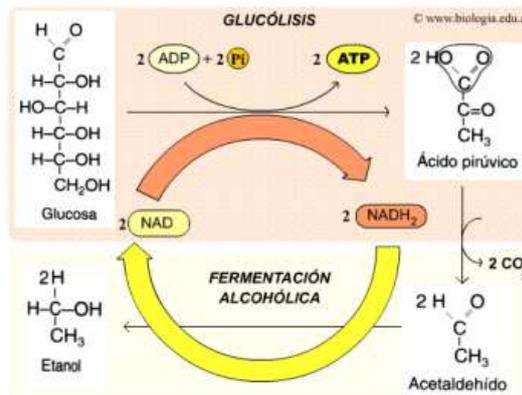
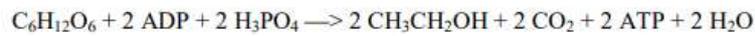
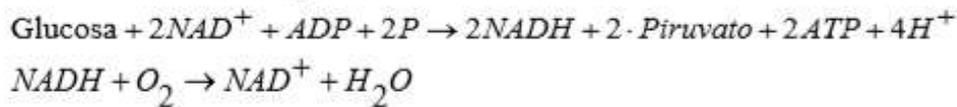
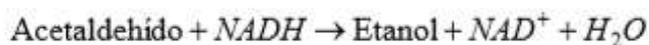
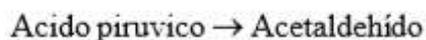


Fig. 2-11. Proceso de fermentación de glucosa a etanol.
Fuente: (Salvachúa, 2013)

Proceso normal del glucólisis



Proceso de la fermentación alcohólica



2.2.7.4. Destilación

El alcohol producido en la fermentación está disuelto en agua junto un gran número de otras sustancias residuales del proceso. Su utilización tanto a nivel industrial como biocombustible requiera una depuración. Para ello se utiliza un proceso de destilación. La destilación es la operación de separar mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla, aprovechando las diferentes temperaturas de ebullición de cada uno de ellos. Dado que el etanol tiene un punto de ebullición menor (78,3°C) que el agua, la mezcla se calienta a unos 90°C hasta que el alcohol se evapora. La fase

gaseosa posee pequeñas cantidades de dióxido de azufre (SO₂), lo que obliga a un proceso de desulfuración por absorción a alta temperatura, usando óxidos de aluminio o cobre. Tras la desulfuración el alcohol se recupera por condensación en una torre de enfriamiento. Tras la condensación, el alcohol resultante es una mezcla de etanol y metanol, y además aún contiene un 10% de agua. Para la deshidratación se realiza un tamizado con zeolitas, sustancias que captan las moléculas de agua, obteniéndose purezas en alcohol de hasta 99,99%. (Velázquez, B. 2017).

2.2.7.5. Rectificación

La rectificación es una de las formas de la destilación. Se emplea, para el fraccionamiento del petróleo. Si se vuelve a destilar el condensado obtenido de una destilación, se obtiene un nuevo destilado con un contenido aún mayor de componentes más volátiles. Repitiendo varias veces este proceso se puede aumentar con cada paso este contenido en el destilado.

2.2.8. Factores que afectan la hidrólisis enzimática y fermentación

2.2.8.1. Nutrición

Según Alvarado, (2012), las levaduras necesitan recibir energía para conservar y reparar su estructura, para sintetizar nuevos componentes celulares como ácidos nucleicos, polisacáridos y enzimas, para poder transformar determinadas sustancias a las células desde sus alrededores, para crecer, multiplicarse y moverse. Los nutrientes más significativos para las levaduras son los carbohidratos que le sirve como fuente de energía (Türker, 2015).

2.2.8.2. Tempertura

La temperatura que las levaduras necesitan para crecer y desarrollarse está comprendida entre 5 y 37 grados centígrados. El valor óptimo se sitúa hasta los 28 grados centígrados. La termo destrucción comienza desde los 52°C (Gutiérrez, 2007).

2.2.8.3. Ph

En su etapa de crecimiento las levaduras metabolizan los componentes del medio como los azúcares, desaminan y decarboxilan los aminoácidos, proteínas y otros componentes de los caldos de crecimiento, alteran considerablemente el pH del medio a la alcalinidad, pudiéndose producir

efectos violentos de los metabolitos generados en el medio sobre el producto (Chávez, 2000). Las levaduras se ven poco afectadas a un pH con rango de 4 a 6.

2.2.8.4. Presión osmótica

La levadura debe ser un proceso estrictamente osmótico lo cual permite evitar la plasmólisis, por lo que es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos. El estrés osmótico puede originar una reducción en el volumen celular afectando la velocidad de fermentación (Suárez-Machín, Garrido-Carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016)

2.2.8.5. Oxígeno

Las levaduras necesitan una cantidad entre 5y 10 mg/l de oxígeno, ya que actúa en la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática de la levadura; cuyos componentes son responsables de la resistencia de las levaduras al alcohol final de la fermentación. (Javier, Ajenjo, & L, 2014).

2.2.9. Fermentación en estado sólido.

Técnicamente el biopretratamiento del material lignocelulósico con algunos microorganismos del género *Trichoderma* o con basidiomicetos de podredumbre blanca se la hace en condiciones de fermentación en estado sólido.

Sin embargo, para optimizar y controlar los rendimientos del proceso es preciso evaluar cuidadosamente ciertos parámetros tales como la concentración de biomasa fúngica en el inóculo, el contenido en humedad y el tamaño de partícula del sustrato, la presencia de iones que faciliten la degradación y/o la temperatura y aireación de los cultivos (Reid, 1989; Wan y Li, 2012).

2.2.10. Compuestos tóxicos generados en pretratamientos e hidrólisis

Los productos de degradación que son potenciales inhibidores de la fermentación pueden dividirse en cuatro grupos: derivados del furano (furfural puede degradarse a ácido fórmico o en 5-hidroximetilfurfural (HMF) este a su vez origina ácidos fórmico y levulínico, y ácido acético), ácidos alifáticos de bajo peso molecular (producen un efecto tóxico en los microorganismos fermentadores provocando un descenso de la tasa de crecimiento celular y del rendimiento en la producción de etanol), derivados fenólicos (se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y polímeros con una gran variedad de sustituyentes. Los fenoles

originados en el pretratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que existe una gran diferenciación de la lignina atendiendo al grupo taxonómico) y extractivos (entre ellos se encuentran diferentes tipos de resinas ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras) y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc.) (Velázquez, B. 2017).

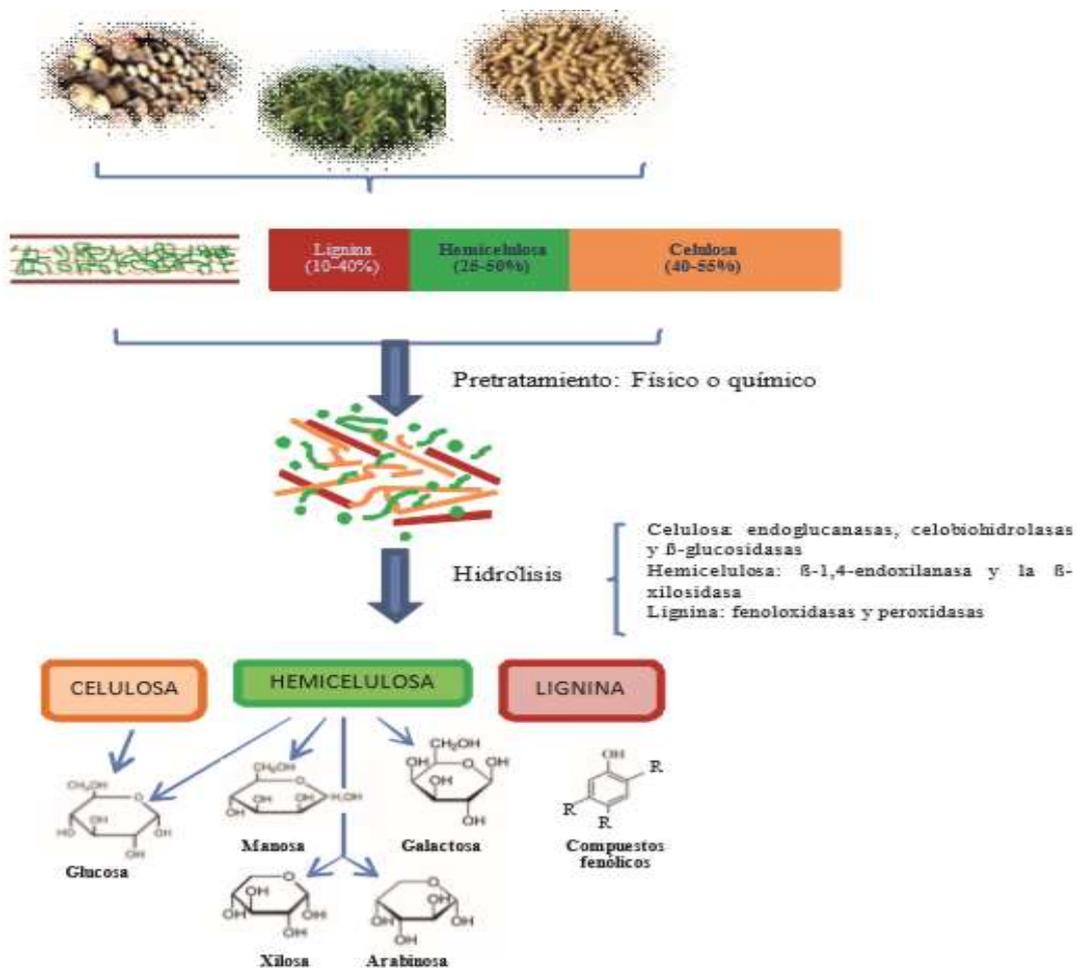


Figura 2-12. Productos de lignocelulosa.

Fuente: (Velázquez, B. 2017).

2.2.11. Métodos que aumentan fermentabilidad en hidrolizados pre-tratados.

El objetivo es conseguir aumentos significativos en la productividad volumétrica y el rendimiento en etanol. Dependiendo de los mecanismos empleados para la eliminación de los inhibidores, los métodos se pueden agrupar en: biológicos, químicos y físicos. (Velázquez, B. 2017).

2.2.11.1. Métodos biológicos

Consiste en utilizar microorganismos capaces de metabolizar algunos de los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados. Un ejemplo de tratamiento biológico es la utilización del hongo *Trichoderma reesei*. Este microorganismo es capaz de metabolizar moléculas como el ácido acético, el furfural y el ácido benzoico. También metaboliza las pentosas y oligómeros presentes. El hongo *Trametes versicolor* permite la eliminación completa y selectiva de los monómeros fenólicos presentes en hidrolizados a través de las enzimas lacasa y peroxidasa, que producen una polimerización oxidativa de los compuestos moleculares menos tóxicos. (Velázquez, B. 2017).

2.2.11.2. Métodos físicos.

Evaporación

Este tratamiento persigue la eliminación de compuestos volátiles como el furfural, ácido acético y ácido fórmico. Sin embargo compuestos como el ácido levulínico, el hidroximetilfurfural y los compuestos fenólicos no son eliminados. El tratamiento debe realizarse a un pH bajo ya que compuestos como el ácido acético y fórmico sólo son volátiles en la forma protonada.

El limitado aumento de la fermentabilidad de los hidrolizados con este tratamiento puede deberse a la menor toxicidad de los compuestos volátiles eliminados en este método comparado con los compuestos fenólicos que no son eliminados.

Carbón activo y carbón vegetal tratado a 600°C

Consiste en la filtración del hidrolizado, de forma que la glucosa no queda retenida mientras que el furfural, hidroximetilfurfural compuestos fenólicos y ácidos alifáticos son eliminados.

Resinas de intercambio iónico

Pueden ser resinas de intercambio catiónico o resinas de intercambio aniónico a un pH de 10. Las resinas aniónicas tienen capacidad de eliminar compuestos fenólicos (cargados positivamente), las resinas catiónicas reducen la concentración de los furanos (debida en este caso a interacciones hidrofóbicas) y de los ácidos alifáticos. A pesar de

los buenos resultados en la eliminación de productos inhibidores retienen parte de los azúcares fermentables.

Lignina residual

La lignina que se elimina en el pretratamiento puede ser utilizada como absorbente en una retención de los elementos inhibidores con partes hidrofóbicas. Es una solución bastante económica.

Utilización de zeolitas

El término zeolita engloba a un gran número de minerales, tanto naturales como sintéticos, compuestos de un esqueleto cristalino formado por la combinación tridimensional de tetraedros TO₄ (T= Si, Al, B, Ga,) unidos entre sí a través de átomos de oxígeno comunes. Esta estructura confiere a las zeolitas una notable superficie específica con capacidad de intercambio iónico, filtración y la existencia de lugares activos que permiten una importante actividad catalítica (por ejemplo en la hidrólisis de polisacáridos).

2.2.12. Cromatografía.

La cromatografía analítica se usa habitualmente en la industria y la academia para la separación, cuantificación e identificación de compuestos químicos o biológicos. El análisis cromatográfico es esencial en la producción de productos farmacéuticos, químicos o alimentos y bebidas.

Equipos Principales:

2.2.12.1. HPLC (Cromatógrafo líquido de alta eficacia):

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes individuales de una muestra. Esta separación se produce mediante las interacciones químicas o físicas de la muestra con las fases móvil y estacionaria. Debido a que existen muchas combinaciones de fases móvil/estacionaria que se pueden emplear cuando se separa una mezcla, hay varios tipos diferentes de cromatografías que se clasifican según los estados físicos de esas fases. La cromatografía en columna líquido-sólido, la técnica de cromatografía más popular, incluye una fase móvil líquida que filtra lentamente a través de la fase estacionaria sólida, lo que lleva los componentes separados.

2.2.12.2. UPLC acoplado a un detector masas

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica que se ha tratado con RMe_2SiCl . La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determina

2.2.12.3. GC (Cromatógrafo de gases) acoplado a un detector masas.

El GC acoplado a un detector masas, detector de ionización de llama y detector de captura de electrones, se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada, permite la separación molecular de compuestos volátiles. La cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Aplicaciones: medioambientales, alimentos y aromas, química industrial, biociencia, derivados de petróleo. (Parrales, Reyes Vera, & Pine Tobar, 2012).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Parte Experimental

Fase laboratorio

El desarrollo de este proyecto de investigación estuvo comprendido por la siguiente metodología general:

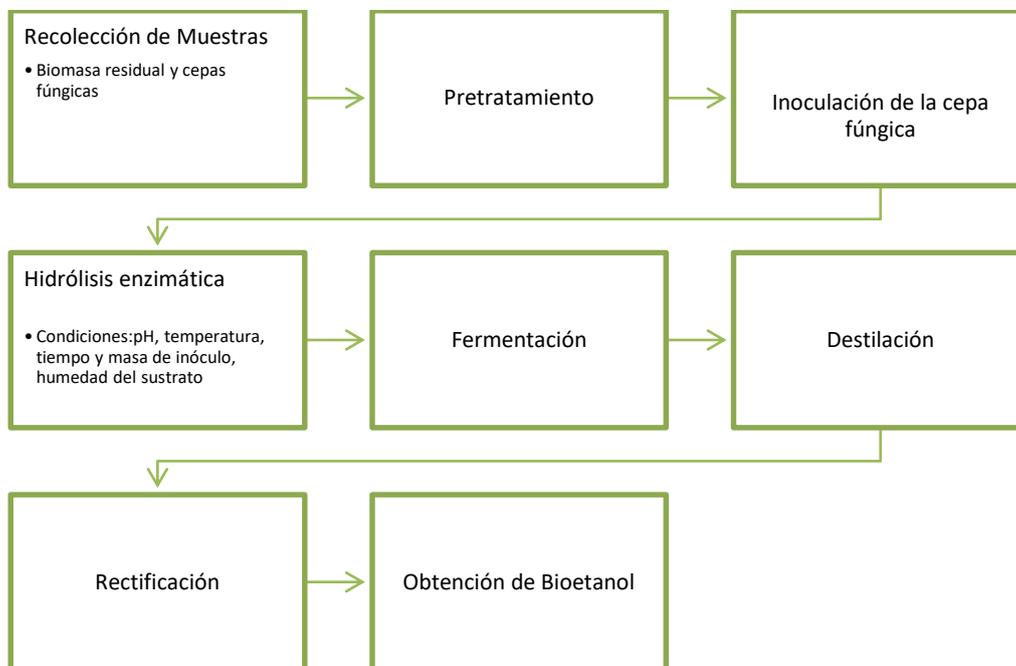


Figura 3-1 Proceso de obtención de bioetanol

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

Primero se llevó a cabo la recolección de muestras, la fase de pretratamiento consistió en la caracterización de la materia prima, la siguiente fase fue inocular los hongos para que actúe la hidrólisis enzimática y aumente el porcentaje de celulosa y por ende se degrade en glucosa, sin utilizar hidrólisis ácida que es la forma convencional. En la siguiente fase se realizó la fermentación anaerobia de la glucosa para formar alcohol por medio de levaduras, posterior se realizó la destilación, rectificación y finalmente se realizó una caracterización físico química del alcohol obtenido.

3.1.1. *Recolección de Muestras*

Biomasa Residual

La biomasa residual agrícola de maíz blanco, trigo y cebada se recolectó de parcelas de varios sectores de la Provincia Bolívar en cantones como San Miguel, San José de Chimbo, Chillanes y Guaranda donde la producción es elevada, una vez que ya había sido realizada la cosecha se delimitó la zona de cultivo a 100 m² de la que se procedió a tomar las muestras. Se empleó un muestreo aleatorio simple. Se realizó un cálculo previo para determinar la cantidad necesaria que se empleara en los ensayos.

Cepas

Fúngicas

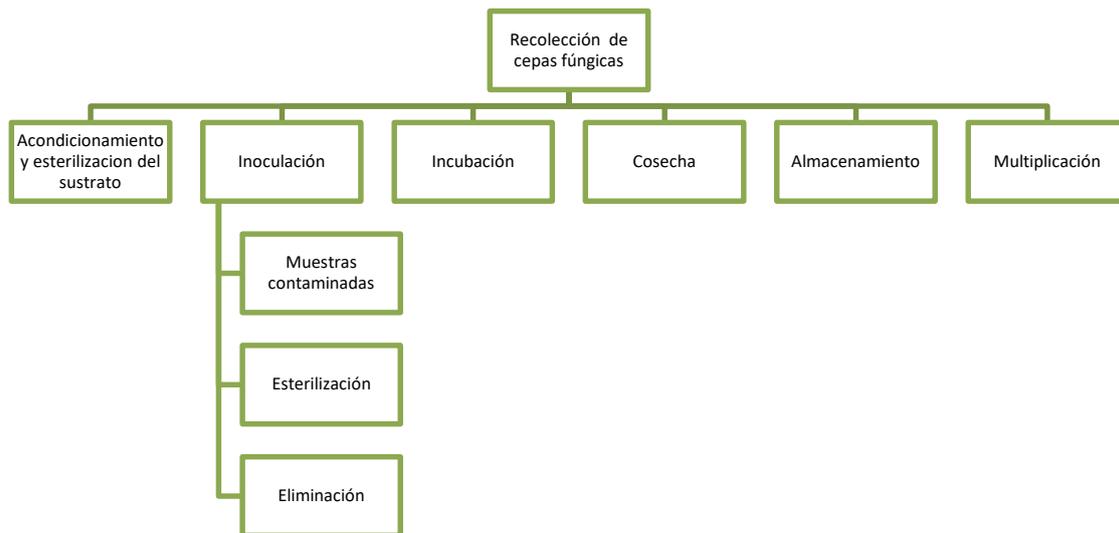


Figura 3-2. Activación de Cepas Fúngicas.

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

3.1.2. *Pretratamiento*

Trituración y Molienda

Las muestras de biomasa residual agrícola, se sometieron a un tratamiento físico para disminuir el tamaño de partícula empezando por una trituración manual posterior molienda (malla $\leq 2\text{mm}$), en un molino de impacto de rotor Marca: Retsch de 110V, el cual se encuentra ubicado en el Laboratorio de preparación de muestras del Departamento de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

La disminución del tamaño de partícula conlleva una mayor digestibilidad por lo que aumenta la superficie de contacto, se estima también un incremento en el consumo de energía. (Talebnia *et al.*, 2010).

Tabla 3-1. Biomasa residual agrícola

<i>Factor</i>	<i>Código</i>	<i>Niveles</i>
Biomasa residual agrícola	A	a1: Residuo maíz a2: Residuo trigo a3: Residuo cebada

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

Caracterización Elemental

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, son transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para ser luego ser de sorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

Macronutrientes. Los macronutrientes son los elementos no metálicos (carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo) y elementos metálicos (potasio, calcio, sodio, magnesio). Los macronutrientes no metálicos, en general, sirven como elementos estructurales en el protoplasma y síntesis de la pared celular. Otros elementos se toman en forma de compuestos o iones. Los macronutrientes metálicos son elementos esencialmente funcionales, actuando en el metabolismo del hongo. Sin embargo, todos los elementos participan en los eventos metabólicos de los procesos vitales (Dube, 2009).

Carbono. Los hongos son quimioorganotrofos, es decir, obtienen su energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos. Al ser no fotosintéticos, depende de la oferta externa de compuestos de carbono orgánico (San & Marín, 2009).

Nitrógeno. El nitrógeno es requerido por los hongos para sintetizar ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos útiles para la estructuración del protoplasma. Los hongos en su gran mayoría prefieren las fuentes de nitrógeno orgánico como urea e hidrolizado de caseína, que suministran una mezcla de aminoácidos que permite un rápido crecimiento del microorganismo (Griffin, 1996).

Para este análisis se empleó el Analizador Elemental, vario MACRO cube V3.1.3 S.N.20144056, Marca: Elementar Analysensysteme GmbH, Modelo: Vario MACRO cube superuser, Capacidad: 60 muestras, el cual se encuentra ubicado en el Laboratorio de Biomasa del Departamento de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Las muestras de biomasa se sometieron a una caracterización elemental para determinar porcentaje de elementos principales N, C, H, S; se utilizaron 3 muestras de 1g cada una con un tamaño de partícula de 2mm con 3 repeticiones cada una, estos valores se definieron en base a validación del método “sulf 1” de medida con patrones estándar.

Caracterización Proximal

La **humedad** se determinó mediante: Biocombustibles sólidos. Determinación del contenido de humedad. Método de secado en estufa. Parte 3. Humedad de la muestra para análisis general. Norma Española AENOR UNE-EN 14774-3 utilizando la especificación técnica CEN/TS 14780, utilizando una Balanza analítica Rango: (0 - 220 g); Ap $\pm 0,1$ mg, una estufa de secado a (105 \pm 2) °C y un desecador.

Procedimiento

La muestra debe ser de 1g por un tiempo de 3 horas, hasta que alcance un peso constante. Se define la masa constante como un cambio menor de 1 mg en masa durante un periodo posterior de calentamiento de 60 min a (105 \pm 2) °C.

Cálculo.

Para cada determinación del contenido de humedad en la muestra para análisis, M_{ad} , tal y como se analiza, expresado como un porcentaje de masa, debe calcularse usando la siguiente fórmula:

$$\text{Mad} = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} * 100$$

Dónde:

m_1 es la masa en gramos del plato vacío y la tapa

m_2 es la masa en gramos del plato, la tapa y la muestra del secado

m_3 es la masa en gramos del plato, la tapa y la muestra después del secado.

El resultado se debe expresar como la media de determinaciones duplicadas, redondeando al 0,1%.

La **ceniza** se determinó mediante: Biocombustibles sólidos. Método para la determinación del contenido de cenizas. Norma Española AENOR UNE-EN 14775:2009 para biomasa utilizando la especificación técnica CEN/TS 335, utilizando una Balanza analítica Rango: (0 - 220 g); Ap $\pm 0,1\text{mg}$, una mufla a (540 ± 2) °C por una hora.

Procedimiento

Para estabilizar los crisoles, la muestra debe permanecer a 540 °C por 4 horas, pasar al desecador para que se enfríe y pesamos.

Cálculo

Para cada determinación del contenido de cenizas en la muestra para análisis, tal y como se analiza, expresado como un porcentaje de masa, debe calcularse usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(C_2 - C_0)}{(C_1 - C_0)} * 100$$

Dónde:

C_0 Peso del crisol vacío en gramos.

C_1 Peso del crisol conteniendo la muestra de ensayo en gramos.

C_2 Peso del crisol y cenizas en gramos.

Caracterización Estructural

El analizador de fibra automatiza las determinaciones de fibra, elimina la manipulación de químicos y agua caliente. Las muestras se preparan con la tecnología de bolsa de filtro ANKOM y se colocan en un tirante de bolsa. Aquí el técnico simplemente selecciona el método analítico en el controlador de la computadora y presiona un botón. El sistema agrega automáticamente los químicos apropiados y realiza los enjuagues necesarios. La solución se calienta y la solubilización tiene lugar sin intervención manual. Cuando se completa el proceso, el técnico retira las bolsas y completa un secado final y pesado.

Para nuestro estudio se realizó una primera caracterización estructural para determinar el porcentaje de lignina, celulosa y hemicelulosa de las muestras iniciales utilizando el método volumétrico de Van Soest (1963) para determinar Fibra Detergente Neutra y la fracción llamada Fibra Detergente Acida, mediante cálculo se pudo determinar el porcentaje de lignina, celulosa y hemicelulosa, el equipo que se utilizó fue un Analizador de Fibra Marca: ANKOM 2000, S.N. 20382931, el cual se encuentra ubicado en el Laboratorio de Biomasa del Departamento de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Se utilizó las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Hemicelulosa} = \% \text{FDN} - \% \text{FDA}$$

$$\% \text{FDN y } \% \text{FDA} = \frac{W_3 - (W_2 * \frac{PB}{PA})}{W_3} * 100$$

$$\% \text{ Celulosa} = \% \text{ FDA} - \% \text{FDL}$$

$$\% \text{ Lignina} = \% \text{ FDL}$$

Calculo del porcentaje de lignina

$$\% \text{Lignina} = \frac{P_2 - P_3}{P_1} * 100$$

En dónde:

% FDN = Porcentaje de fibra detergente neutra

%FDA = Porcentaje fibra detergente acida

%FDL = Porcentaje fibra detergente lignina.

W1= Peso muestra

W2= Peso bolsa vacía

W3= Peso bolsa + muestra

PB= Promedio peso final de bolsa vacía

A= Promedio peso inicial de bolsa vacía

P1= Peso muestra

P2= Peso de crisol + muestra

P3= Peso de crisol + ceniza

3.1.3. *Inoculación de la cepa fúngica.*

Para la obtención de los consorcios, se tomaron con pinzas estériles muestras de tapetes de microorganismos de residuos agrícolas de suelo, así como de la parte externa de arbustos del Bosque Nativo Cashca Totoras del sector Totoras, Cantón San Miguel. Ubicación geográfica: 01°45'42''S, 78°55'26''W; el bosque se encuentra 3400m.s.n.m. Las muestras fueron colocadas en fundas zipoc estériles y trasladadas a un congelador hasta el Departamento de Investigación Ambiental y Desarrollo de la ESPOCH (GIADE)

Tabla 3-2. Cepas Nativas en fase laboratorio

Factor	Código	Nivel	Origen
Cepas fúngicas	B	b1: Neurospora Crassa	Bosque nativo
		b2: Aspergillus Nidulans	Corteza de naranja y tomate
		b3: Aspergillus Niger	Corteza de naranja y tomate
		b4: Trichoderma Reesei	Bosque nativo
		b5: Trichoderma Vireede	Bosque nativo

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

3.1.3.1. Aislamiento, purificación, pruebas de crecimiento, identificación molecular y multiplicación masiva de las cepas.

Se aisló de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN1529-1:2013. Control Microbiológico de los Alimentos. Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos. Las muestras obtenidas se tamizaron y pesaron 10g para disolverlas en 100 ml de agua destilada estéril, la solución madre se dispuso en tres medios de cultivo: patata dextrosa agar (PDA), agar nutritivo, agar dextrosa Sabouru, con 3 repeticiones cada una, se incubaron las cajas Petri en incubadoras a 28 y 30°C durante 7 días para luego realizar la purificación en medio de cultivo PDA resultando ser el medio más selectivo, se utilizó el sistema de siembra en estría y por grumos esparciendo homogéneamente sobre la superficie de la caja, para luego realizar la purificación en medio de cultivo PDA (39g/l), considerando que se denomina “medio de cultivo” a cualquier material que presente una adecuada combinación de nutrientes para permitir el crecimiento o el incremento del número de células de una población microbiana. (Tortora, 2007)

El crecimiento radial en mm/día se determinó con la ayuda de una regla graduada desde el centro de la caja Petri hasta que el hongo alcanzo las paredes de la misma. Abdel- Fattah, G. et al (2007).

La selección de determinadas cepas fúngicas para la producción de biomasa se realiza a través de una serie de análisis o ensayos que relacionen los aspectos de mayor relevancia para su producción industrial en pro de la obtención de características de interés. Pruebas de crecimiento micelial (Adenipekun, Lawal, y Isikhuemhen, 2015; Zervakis, Philippoussis, Ioannidou, y Diamantopoulou, 2001), evaluación de la aparición de primodios, características morfológicas de las carpóforos, tasas de bioconversión (Mane, Patil, Syed, y Baig, 2007), propiedades organolépticas de la seta (Onyango, Palapala, Arama, Wagai, y Gichimu, 2011) e índices de rendimiento (Qiang, 2015), son algunos de los aspectos a tener en cuenta para la selección de la cepa que se desee producir. Una vez establecida la cepa se procede a realizar labores de aislamiento e identificación que ratifiquen el escoger correctamente el material.

Es importante determinar la concentración mediante diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} .

Viabilidad (UFC/g) = Promedio de colonias del hongo x factor de dilución x factor de siembra de 10 (1000 μ L / 10 μ L). (Tortora, 2007)

Con las siembras realizadas en las cajas Petri para la evaluación de la viabilidad de los microorganismos, se contabilizó el número de colonias de hongo benéfico en cada caja Petri, en las diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Con lo que se determinó su pureza.

Posterior a ello se puso a prueba el crecimiento de hongos en sustrato de biomasa de maíz, trigo y cebada, inoculando en proporciones adecuadas a temperatura de 28°C, una humedad del 35% a pH=5,2 todo esto se probó inicialmente con muestras de 5g de sustrato con los distintos hongos por cada muestra durante 5 días, siendo la unidad de análisis las cajas Petri.

3.1.4. *Hidrólisis enzimática y sacarificación*

Esta se la llevó a cabo en los sustratos orgánicos (maíz, trigo y cebada); utilizando el método de agua caliente en fase líquida (ACL) el cual consiste en humedecer la paja con agua caliente, se siguió el protocolo de laboratorio de bioseguridad de Microbiología, este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica y por tanto se requiere un ambiente limpio y ordenado. Solórzano (2015), para ello se empleó 100 g del sustrato esterilizado en Autoclave Matachana a 121°C por 15 minutos.

Una vez enfriado los sustratos se inoculó las diferentes cepas de hongos se probaron 30 tratamientos con 3 tipos de residuos agrícolas con 5 cepas de y 2 tiempos.

Se probó su crecimiento sometiéndolos a incubación a temperatura de 28 °C, a una humedad relativa (HR) de 35% y pH de 5,2 esto ha permitido presentar una concentración en azúcares reductores, se probó los hongos de forma individual y combinados para ver su sinergia y posibles resultados, con lo que se determinó la disminución en el porcentaje de contenido de lignina, para una posterior transformación de celulosa a glucosa, en estado de reposo, transcurrido 2 días (48 horas) se empezó a ver presencia de micelios, se dejó por el lapso de 6 días (144horas) y 8 días (192 horas) se caracterizó estructuralmente por segunda vez la biomasa determinando la disminución y el aumento de los principales componentes (lignina, celulosa, hemicelulosa).

Tabla 3-3. Tiempo de hidrólisis enzimática.

Factor	Código	Niveles
Tiempo	C	t1: 144 horas t2: 192 horas

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

3.1.4.1. Determinación de azúcares reductores

Este método es una técnica colorimétrica que emplea un procedimiento que se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS desarrollado por Miller y los azúcares reductores presentes en la muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540 nm de los azúcares reductores. Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores como productos de una reacción enzimática, su ventaja radica en su alta sensibilidad y productividad debido a que es un método espectrofotométrico.

3.1.4.2. Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico

El reactivo es preparado en caliente, pesando 0,5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15g de sal Rochelle (Tartrato de Na-K) y 0,8g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 40mL de agua destilada, luego en agitación es agregado lentamente el tartrato de Na-K y se añade lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. El recipiente se pone en baño de maría a una temperatura de 92°C con agitación constante por aproximadamente una hora, de manera que pasado este tiempo no se observen partículas sólidas de las sustancias utilizadas; se enfría el reactivo y se completa con agua destilada a un volumen de 50mL, se filtra y almacena inmediatamente en frasco de ámbar debido a que este es sensible a la luz.

3.1.4.3. Curva de calibración método DNS (METODO MILLER)

Para la construcción de la curva de calibración por medio de la cual se determinaran las concentraciones desconocidas de azúcares presentes en las muestras hidrolizadas se debe preparar una solución patrón de glucosa cuya concentración sea de 2g/L, posteriormente se realizan diluciones, finalmente se realiza la medición de las absorbancias de cada una de estas muestras a una longitud de onda de 540 nm, las cuales son graficadas versus la concentración conocida de glucosa y de esta forma poder realizar la linealización para obtener una ecuación en donde se reemplazara el valor de las absorbancias de las muestras hidrolizadas para obtener la concentración de azúcares en la muestra (Gaitán, 2007)

3.1.4.4. Cuantificación de azúcares.

Inicialmente para obtener un medio líquido al cual se le pueda medir la absorbancia es necesario que para cada gramo de sustrato inicial se le agreguen 10ml de agua destilada los cuales son agitados a 130 rpm a temperatura de 28°C durante dos horas, esta mezcla se filtra por medio de un papel filtro millipore de 0,45 micrómetros del cual se obtiene una porción líquida que debe ser

centrifugada a 10000 rpm durante 15 min a 4°C de este proceso se obtendrá un sobrenadante el cual se utilizará para la medición de azúcares reductores mediante el método DNS haciendo uso del reactivo previamente preparado.

En tubos de ensayo se adicionan 0,25mL de cada una de las muestras hidrolizadas, de las cuales se desconoce la concentración de azúcar, se agrega 0,25mL de reactivo DNS, se agitan los tubos en vórtex, se calientan en baño maría a una temperatura de 92°C por 10 min. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalisílico es reducido en presencia de calor, por el contacto con azúcares reductores, se desarrolla un cambio de color de amarillo a naranja ladrillo, se sumergen en agua fría por 10 min para frenar la reacción y se agregan 2,5mL de agua destilada; el cambio de coloración puede determinarse por lecturas de densidad óptica, haciendo uso de equipo de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm. Es necesario preparar el blanco adicionando 0,25mL de extracto de piña sin realizar el proceso de hidrólisis y 0,25mL de reactivo DNS en un tubo de ensayo al cual se le realiza el mismo proceso descrito anteriormente. (Miller, 1959; Crisancho, 2014)

La concentración de azúcar presente en la muestra problema es determinada por la línea recta creada en la curva de calibración del azúcar patrón empleado, la gráfica lleva como coordenada “y” la absorbancia y en el eje “x” se lee la concentración de glucosa.

Tabla 3-4. Concentración vs Absorbancia

Glucosa (g/L)	absorbancia (nm)
0,4	0,050
0,8	0,167
1,2	0,294
1,6	0,400
2	0,532

Realizado por: Ronquillo María, 2020.

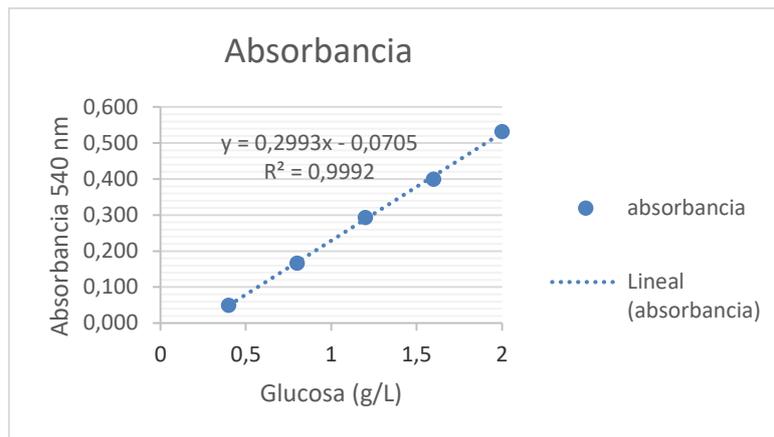


Figura 3-3. Curva patrón para detección de azúcares reductores
Realizado por: Ronquillo María, 2020.

3.1.5. Adecuación de la muestra hidrolizada

Según la metodología descrita por Muniswaran et al (2018). Para 10 gramos de sustrato hidrolizado, se agregan 100mL de agua destilada y se agita a 130 rpm a temperatura de 28°C durante 2 horas. La mezcla se filtra a través de una tela de nylon de malla 200. La porción líquida se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se usa para analizar los azúcares reductores y la actividad enzimática.

3.1.6. Fermentación

Concluida la hidrólisis enzimática sólida se hidrata la muestra al 100% (para 100 g se agrega 1000ml de agua destilada) se somete a ebullición para mejorar la desintegración de las cadenas de oligosacáridos se enfría lo más rápido posible hasta una T= 40°C, luego se agita a 130 rpm a 28°C por 2 horas, se filtra, la porción líquida se centrifuga a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C, seguidamente se agrega la levadura *sacharomices servisae* en proporción de un 1g/l, se deja fermentar en tiempos: 6 y 8 días a una temperatura de 30°C, con un nivel de pH en un rango óptimo de 5,2 en condiciones de reposo y en un espacio oscuro, hasta que la solución no presente producción de CO₂. La fermentación se lleva a cabo en materiales de laboratorio los cuales fueron adaptados a ciertas condiciones, para evitar contaminación de muestras.

Se determina azucares reductores totales por segunda vez, conociendo que un azúcar reductor es aquel cuya estructura posee un grupo carbonilo reactivo que se oxida con mayor facilidad para formar productos muy diversos (Ghnimi, 2018), ejemplo de estos azucares son la glucosa, maltosa y lactosa. Sin embargo, el método estudiado se basa en una reacción de oxidación y reducción entre el reactivo DNS y los azucares reductores presentes en la muestra incógnita (Passos et al, 2018)

3.1.7. Destilación y rectificación

Concluida la etapa de fermentación se obtiene una mezcla agua-etanol, con 1L con una concentración de 8-13 % (v/v). A continuación, esta mezcla ingresa a un proceso de separación, destilación convencional, la cual no nos dio buenos resultados en la que se observó que las muestras empiezan a destilar a 45°C, notándose que las primeras gotas no corresponden a nuestra muestra en cuestión, por lo que podrían ser compuestos livianos como acetonas o metanol, se empezó a recoger el destilado cuando la temperatura empezó a estabilizarse a 65°C en el tiempo de 1 hora, cuando la temperatura alcanzó 88°C paramos la destilación debido a que pueden estar por destilarse alcoholes superiores o llamados alcoholes de fusel, o aceite fusel es un sub-producto de las destilerías durante la preparación del etanol mediante la fermentación del azúcar (Urresta, 2014), por lo que se optó por un equipo de destilación vertical, con un condensador de bulbos lo que nos ayudó a controlar de una mejor manera la temperatura, donde se obtiene etanol azeotrópico de 89% en fracción molar, se necesita mayor pureza, de esta manera, se requieren métodos de separación que rompan el azeótropo etanol agua. (Pham y col. 1990).

Para determinar el v/v del alcohol se aplica la siguiente formula:

$$\%v = \frac{\text{volumen del soluto}}{\text{volumen de la solución}} * 100$$

$$\rho_{\text{etanol}} = 0,78 \text{ g/ml}$$

Se destiló 3 veces, en la primera destilación se recuperó 0,8 L, en la segunda se recuperó 0,4 L en la tercera 0,155L la primera prueba fue con un densímetro y alcoholímetro con los que se hizo la toma de densidades y grado alcohólico lo que nos permitió determinar el porcentaje de pureza, acompañada de características organolépticas que detectó aromas despreciables, en la última destilación hicimos una prueba rápida de aplicación de la muestra a la flama, mostrando un color azulado-verdoso, para efectos de medición se tomó muestras del destilado a distintos tiempos y temperaturas y se calculó mediante densidad la concentración de la muestra, así mismo a las muestras finales se les midió el agrado alcohólico.

Adicional se aplicó absorción física que es otro método de purificación muy utilizado mediante tamices moleculares que permite separar las moléculas según su tamaño. Otros tamices moleculares se utilizan como desecantes incluyen carbón activado y gel de sílice (Helmenstine, 2020), se utilizó carbón activado granulado de 1mm de diámetro, con un aproximado de 5g, se dejó reposar por 7 días en donde se pudo apreciar una concentración del 95% de bioetanol.

Tabla 3-5. Densidad de la solución de alcohol etílico y agua a varias temperaturas.

% alcohol en peso	Densidad (g/ml) a:								% alcohol en peso	Densidad (g/ml) a:							
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	10°C		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C		
0	0.99973	0.99913	0.99823	0.99708	0.99568	0.99406	0.99225	50	0.97162	0.97176	0.97184	0.97185	0.97179	0.97168	0.97150		
1	735	725	636	520	379	217	94	51	91943	555	160	763	353	227	519		
2	602	542	453	336	194	91	98845	52	723	333	90336	534	125	710	222		
3	426	365	275	157	91	98849	663	53	502	110	711	307	8555	470	655		
4	258	195	103	98984	08339	672	485	54	279	90885	485	079	637	245	82923		
5	99	932	98928	817	670	501	311	55	055	659	258	89250	437	016	589		
6	98946	98277	780	656	507	935	142	56	90231	433	031	621	226	68794	356		
7	801	729	627	500	347	172	97975	57	607	207	85823	392	98975	592	122		
8	650	584	478	346	189	009	808	58	381	89680	574	162	744	319	87528		
9	524	442	331	193	031	97846	641	59	134	752	344	83931	512	083	653		
10	393	304	187	043	97875	685	475	60	89927	525	113	692	272	37251	417		
11	267	171	047	97897	725	527	312	61	658	293	88822	466	044	615	108		
12	145	041	97910	753	573	371	150	62	468	062	650	233	87809	379	80843		
13	026	97914	775	611	424	216	96989	63	237	88830	417	87998	574	142	705		
14	97911	790	643	472	278	063	829	64	006	597	183	237	26905	466			
15	600	669	514	334	133	96911	670	65	88774	364	87948	527	100	657	227		
16	632	552	387	199	96990	760	512	66	541	130	713	291	86863	429	85927		
17	583	433	259	062	844	607	352	67	308	87895	477	054	625	150	747		
18	473	313	129	96923	697	452	189	68	074	660	241	86817	387	83550	527		
19	363	191	96997	782	547	294	023	69	87839	424	004	579	148	710	256		
20	252	068	864	639	395	134	95856	70	602	187	86765	340	85908	470	025		
21	139	96944	729	495	242	96973	687	71	365	86949	527	100	667	228	84783		
22	024	818	592	348	087	809	516	72	127	710	287	85859	426	84586	540		
23	56927	689	453	199	95829	643	343	73	86888	470	047	618	184	743	297		
24	787	558	312	048	769	476	168	74	648	229	85806	376	84941	500	053		
25	665	424	168	95895	607	306	94991	75	408	85988	564	134	698	257	83829		
26	539	287	020	738	442	133	810	76	168	747	322	84891	455	613	584		
27	406	144	95867	576	272	94555	625	77	85627	505	079	647	211	83768	319		
28	268	95996	710	410	098	774	438	78	685	262	84635	409	83956	503	074		
29	125	844	548	241	94922	560	248	79	442	018	590	158	720	277	82927		
30	95977	686	392	067	741	403	055	80	197	84772	344	83911	473	029	578		
31	823	524	212	94690	557	214	93860	81	84950	525	086	664	224	82760	529		
32	665	357	038	703	370	021	662	82	702	277	83848	415	82574	530	079		
33	502	186	94860	525	180	93825	461	83	453	028	599	164	724	279	81828		
34	334	011	679	337	93986	626	257	84	203	83777	348	82513	473	027	576		
35	162	94832	494	146	790	425	051	85	83951	525	095	660	220	81774	322		
36	94986	650	306	93952	591	221	92843	86	697	271	82840	405	81965	519	067		
37	805	464	114	756	390	016	634	87	441	014	583	148	708	262	80011		
38	620	273	93919	556	186	92808	422	88	181	82754	323	81682	443	023	552		
39	431	079	720	353	92979	597	208	89	82919	492	062	626	166	80742	291		
40	238	93882	518	148	770	385	91992	90	664	227	81757	352	80522	478	028		
41	042	682	314	92940	558	170	774	91	386	81959	529	064	655	211	79781		
42	93842	478	107	729	344	91952	554	92	114	688	257	80823	384	79941	491		
43	639	271	92897	516	128	733	332	93	81839	413	80583	549	111	669	270		
44	433	062	685	301	91910	513	108	94	561	134	705	272	79635	353	78847		
45	226	92852	472	085	692	291	90884	95	278	80852	424	79991	555	114	670		
46	017	640	257	91868	472	069	660	96	80991	566	138	706	271	78831	328		
47	92806	426	041	649	250	90845	434	97	698	274	79846	415	78981	542	160		
48	593	211	91823	429	028	621	207	98	399	79975	547	117	684	247	77506		
49	379	91995	604	206	92805	396	89079	99	094	670	243	78814	382	77946	507		
								100	79784	360	78534	506	075	641	203		

Fuente: Ramírez Wagner, 2020

3.2. Identificación de variables

3.2.1. Variables independientes

- ✓ Biomasa residual
- ✓ Hidrólisis enzimática
- ✓ Tiempo de operación.

3.2.2. Variables dependientes

- ✓ Bioetanol

3.2.3. Matriz de consistencia

Tabla 3-6. Matriz de consistencia

ASPECTOS GENERALES						
FORMULACION DEL PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL.	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES	INDICADORES	TECNICAS	INSTRUMENTOS
Cómo la hidrólisis enzimática de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada puede dar origen a bioetanol con fines de biorefinería?	Obtener bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada con fines de biorefinería.	Al procesar biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada mediante hidrólisis enzimática con cepas fúngicas nativas se obtendrá etanol con fines de biorefinería.	Independiente Biomasa residual Dependiente Bioetanol.	% de celulosa Concentración de glucosa Pureza de bioetanol	Técnicas de caracterización	Analizador de fibra Cromatógrafo líquido de alta eficiencia
ASPECTOS ESPECIFICOS						
FORMULACION DE PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS	VARIABLES	INDICADORES	TECNICAS	INSTRUMENTOS
Qué propiedades físico químicas presenta la biomasa residual al caracterizarla?	Analizar las muestras de biomasa residual mediante operaciones físicas de acondicionamiento y caracterización integral, determinando los diversos componentes para su adecuado tratamiento.	Mediante análisis de muestras de biomasa residual se podrá determinar su composición para su debido tratamiento.	Independiente Naturaleza y concentración de la fuente de carbono y nitrógeno. Dependiente Propiedades físico químicas de la biomasa	Composición elemental química.	Caracterización elemental Caracterización proximal Caracterización estructural	Analizador elemental
¿Qué microorganismos producirán enzimas que permitan romper las cadenas de polisacáridos de celulosa para obtener glucosa?	Aplicar hidrólisis enzimática aislando cepas fúngicas nativas que permitan romper las cadenas de polisacáridos de celulosa para obtener glucosa, mediante análisis de su actividad enzimática en función del tiempo.	Aplicando hidrólisis enzimática por aislamiento de cepas fúngicas nativas se podrán romper las cadenas de polisacáridos de celulosa para obtener glucosa.	Independiente Cepas fúngicas nativas Dependiente Obtención de glucosa	UFC (Unidades formadoras de colonias) Porcentaje de glucosa	Técnica de conteo de cámara de neubauer. Técnica de Miller	Espectrofotómetro UV. Contador de colonias
Cuáles serán las condiciones óptimas (relación biomasa/agua, tamaño de partícula, pH, temperatura, velocidad de reacción y volumen del inóculo) para el cultivo en el sustrato de la cepas fúngicas.	Determinar las condiciones óptimas (relación biomasa/agua, tamaño de partícula, pH, temperatura, velocidad de reacción y volumen del inóculo) para el cultivo en el sustrato de la cepas fúngicas.	La variación del tamaño de partícula, pH, temperatura velocidad de reacción y volumen del inóculo determinará las condiciones óptimas de la cepa fúngica nativa para su cultivo en el sustrato.	Independiente Combinación de condiciones de operación Dependiente Crecimiento de cepas fúngicas en el sustrato	(1-2mm) (1-14)pH (20-40°C) Horas L	Ensayos de laboratorio	Instrumentos de laboratorio (tamices, pH-metro, termómetro, incubadora, cronometro, probetas, vasos de precipitación)
Qué operaciones unitarias permitirán obtener un bioetanol con un porcentaje mayor o igual al 95% de pureza susceptible a ser utilizado en biorefinería?	Efectuar operaciones unitarias que permitan obtener un bioetanol con un porcentaje mayor o igual al 95% de pureza susceptible a ser utilizado en biorefinería.	Las operaciones unitarias adecuadas permitirán obtener un bioetanol con un porcentaje de pureza igual o superior al 95%.	Independiente Operaciones unitarias Dependiente Pureza del bioetanol.	Presencia o ausencia de productos. % de pureza del alcohol.	Ensayos prueba/error Análisis de datos	Molino Reactor Bach Cromatógrafo de gases Herramientas informáticas.

Realizado por: Ronquillo María, 2020

3.3. Tipo y diseño de investigación

3.3.1. Tipo de investigación

Es una investigación de tipo *correlacional*, hace referencia a variables medibles como la biomasa residual agrícola, crecimiento de cepas fúngicas, porcentaje de remoción de lignina, liberación de celulosa, porcentaje de glucosa, tiempo de fermentación y la pureza de bioetanol. El problema y las hipótesis están planteados de manera que se puedan correlacionar el obtener bioetanol empleando biomasa residual agrícola a través de enzimas producidas por hongos.

3.3.2. Diseño de la investigación

El proyecto de titulación fue de carácter *experimental* ya que se utilizó diferentes tratamientos con especies fúngicas en biomasa y la combinación de condiciones, las cuales consistieron en la aplicación de diferentes temperaturas, porcentajes de humedad de la biomasa, hidratación del sustrato, revoluciones por minuto y tiempo de fermentación en la obtención de bioetanol.

3.4. Métodos de la investigación

3.4.1. Deductivo

EL proyecto de titulación se ha basado en investigaciones de varias fuentes bibliográficas, lo que ha permitido conseguir un producto a partir de ensayos experimentales (ensayo -error), consiguiendo que los conocimientos generales sustenten los procedimientos hasta obtener una alternativa diferente.

3.4.2. Inductivo

Hace referencia de lo particular a lo general, para tener un alcance adecuado se basa en un conjunto de métodos estadísticos, es el caso de inferir de la obtención de una muestra de bioetanol a una población en general y su posible utilización en la biorefinería.

3.4. Enfoque de la investigación

La investigación al ser correlacional y experimental es de tipo *cuantitativo* esto es que debe tener la mayor objetividad posible.

3.5. Alcance de la investigación

La presente investigación se enfoca en determinar variables específicas como la temperatura ideal a la que crecen los hongos en el sustrato, porcentaje de remoción de lignina liberación de celulosa por actividad fúngica, las revoluciones por minuto a la que se agita el sustrato para hidrolizarlo y el tiempo necesario para obtener bioetanol con fines de biorefinería y su relación con la caracterización físico- química de la materia prima y cepas fúngicas.

3.6. Población de estudio

Los tres residuos agrícolas ricos en lignocelulosa (maíz, trigo, cebada), han sido probados como sustratos por parte de cepas fúngicas nativas que más se adapten a las condiciones de consumo de lignina, liberación de celulosa y transformación y purificación en glucosa para su fermentación y producción de bioetanol.

3.7. Unidad de análisis

Las cepas fúngicas nativas han sido aisladas y analizadas en laboratorio, a partir de muestras de microorganismos capaces de descomponer materia polisacárida en glucosa en condiciones reales, y el proceso de obtención de bioetanol se llevó a cabo en los laboratorios de la Unidad de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar, siendo las unidades de análisis: cajas Petri, biomasa de residuos agrícolas.

Para la manipulación, conservación y evaluación en el laboratorio de procesos, biomasa y diversidad microbiana, se tomó como referencia la NTE INEN-ISO 10381-6:2014.

3.8. Tamaño de muestra

Se utilizó 100g de muestra fresca de biomasa de maíz, trigo y cebada, por cada uno de los tratamientos para realizar la investigación.

3.9. Diseño experimental

El modelo estadístico es el siguiente:

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

Dónde:

μ es la media general

α_i es el efecto debido al i-ésimo nivel del factor residuo agrícola

β_j es el efecto debido al j-ésimo nivel del factor cepa fúngica

γ_k es el efecto debido al k-ésimo nivel del factor tiempo

e_{ijkl} error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media 0 y varianza constante σ^2 , y son independientes

El diseño aplicado en la presente investigación corresponde a un diseño experimental de bloques completamente al azar, con tres factores de estudio, 30 tratamientos, 3 repeticiones, con 90 ensayos. Las variables fueron analizadas según el diseño empleado mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) con la finalidad de determinar diferencias significativas en las muestras. Las pruebas de medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza, además se efectuó una transformación polinomial de los datos para observar el efecto lineal o cuadrático de los tratamientos.

3.11. Datos primarios

Tratándose de un proyecto de tipo experimental, se utiliza la estadística descriptiva e inferencial se pudo apreciar a través de la observación directa y visita in situ para conocer la realidad con el objetivo de obtener datos que han sido considerados de interés para la investigación, así también conversatorios con profesionales expertos en el área.

3.12. Factores en estudio

En la **Tabla 3-7** se muestran los factores y sus correspondientes niveles, lo que genera el siguiente diseño experimental:

Diseño Experimental: 3 x 5 x 2

Tabla 3-7. Factores de estudio

Factor	Código	Niveles
Residuos agrícolas	A	a1: Residuo maíz
		a2: Residuo trigo
		a3: Residuo cebada
Cepas fúngicas	B	b1: Neurospora Crassa
		b2: Aspergillus Nidulans
		b3: Aspergillus Niger
		b4: Trichoderma Reseei
		b5: Trichoderma Vireede
Tiempo	C	t1: 144 horas
		t2: 192 horas

Realizado por: Ronquillo María, 2020

3.13. Tratamientos

Las combinaciones que generaron los 30 tratamientos se muestran en la Tabla 3-8.

Tratamientos	Descripción del nivel		
	a	b	c
T1	a1	b1	t1
T2	a1	b2	t2
T3	a1	b3	t1
T4	a1	b4	t2
T5	a1	b5	t1
T6	a1	b1	t2
T7	a1	b2	t1
T8	a1	b3	t2
T9	a1	b4	t1
T10	a1	b5	t2
T11	a2	b1	t1
T12	a2	b2	t2
T13	a2	b3	t1
T14	a2	b4	t2
T15	a2	b5	t1
T16	a2	b1	t2
T17	a2	b2	t1
T18	a2	b3	t2
T19	a2	b4	t1
T20	a2	b5	t2
T21	a3	b1	t1
T22	a3	b2	t2
T23	a3	b3	t1
T24	a3	b4	t2
T25	a3	b5	t1
T26	a3	b1	t2
T27	a3	b2	t1
T28	a3	b3	t2
T29	a3	b4	t1
T30	a3	b5	t2

Realizado por: Ronquillo María, 2020

3.14. Técnicas de recolección

3.14.1. Datos Secundarios

Estos fueron recopilados mediante revisión bibliográfica: libros electrónicos, artículos científicos, revistas científicas y bases de datos (Sciencedirect, Web of Knowledge, Scopus)

3.15. Materiales

3.15.1. Material Experimental

- Residuos agrícolas
- Cepas fúngicas

3.15.2. Equipos e instrumentos de Laboratorio

- ✓ Molino
- ✓ Analizador elemental
- ✓ Estufa
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Desecador
- ✓ Analizador de fibra
- ✓ Autoclave matachana
- ✓ Baño maría
- ✓ Espectrofotómetro UV
- ✓ Incubadora
- ✓ Agitador orbital
- ✓ Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas
- ✓ Mufla
- ✓ Agitador de Tubos Vortex
- ✓ Cabina de seguridad biológica.
- ✓ Plancha de calentamiento
- ✓ Centrifuga
- ✓ pH-metro
- ✓ Termómetro
- ✓ Alcohólímetro

3.15.3. *Materiales de Laboratorio*

- ✓ Mallas
- ✓ Cajas petri
- ✓ Crisoles
- ✓ Gradilla
- ✓ Tamizador
- ✓ Regla graduada
- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Matraces Erlenmeyer
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Equipo de destilación
- ✓ Probetas
- ✓ Embudo
- ✓ Papel filtro
- ✓ Algodón
- ✓ Fundas de plástico herméticas
- ✓ Envases de vidrio color ámbar
- ✓ Kitasatos
- ✓ Hisopos
- ✓ Recolectores de muestra
- ✓ Papel filtro
- ✓ Núcleos de ebullición.

3.15.3. *Reactivos y sustancias*

- ✓ Alcohol industrial
- ✓ Agua destilada estéril
- ✓ Agar PDA
- ✓ Agar dextrosa sabouru
- ✓ Agar nutritivo
- ✓ H₂SO₄
- ✓ Glucosa
- ✓ Carbón activado granulado

3.15.5. Material de Oficina

- ✓ Laptop
- ✓ cuaderno de notas
- ✓ registro y codificación de datos
- ✓ Lápiz codificador
- ✓ Esferográfico
- ✓ Borrador
- ✓ Papel boom

3.15.6. Instrumentos para procesar datos recopilados

- ✓ Excel
- ✓ Statgraphics
- ✓ InfoStat

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pretratamiento

Las materias primas fueron caracterizadas por análisis elemental, los resultados se presentan en la tabla 4-1 y figura 4-1.

Tabla 4-1. Caracterización elemental en biomasa residual agrícola

Muestras	%N	%C	%H	%S
a1 ₁	0,75	45,99	4,07	0
a1 ₂	0,7	43,72	4,33	0
a1 ₃	0,69	43,99	4,07	0
a2 ₁	0,93	32,62	5,53	0,04
a2 ₂	1,09	37,85	6,37	0,03
a2 ₃	1,06	38,16	6,59	0
a3 ₁	1,01	38,68	6,08	0,01
a3 ₂	1,07	37,6	6,14	0
a3 ₃	1,04	40,79	6,31	0

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Los subíndices en la columna de muestras representan la repetición.

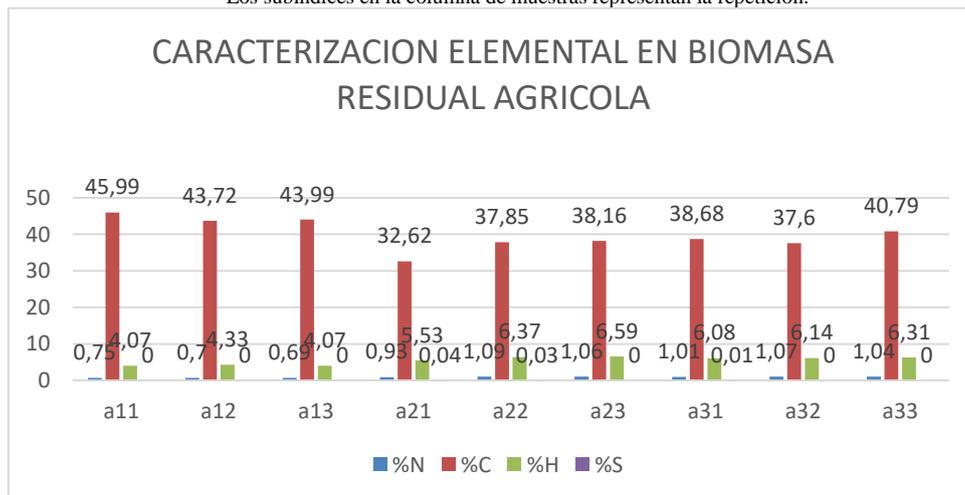


Figura4-1. Caracterización elemental en biomasa residual agrícola

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Los subíndices en la fila de muestras representan la repetición

Alrededor de la mitad del peso seco de las células fúngicas equivale a carbono, demostrándose la importancia de éste en la célula. Los compuestos orgánicos son utilizados como materiales estructurales, suministrando energía para los procesos de oxidación (Dube, 2009). Con este análisis se evidencia la presencia de Carbono en especial en las muestras de maíz con un promedio de 44,57%, cebada 39,02% seguida de trigo con 36,21% con respecto a otros elementos presentes en las muestras en menores proporciones como: H, N y S. Con estos resultados se puede deducir que existe en un porcentaje elevado presencia de celulosa.

El agua influye en el grado de madurez y crecimiento de la planta, reflejándose en la relación C/N; los mayores contenidos de nitrógeno en las plantas se encuentran en los tejidos jóvenes, a medida que la planta avanza en edad, la proporción de celulosa aumenta y el porcentaje de nitrógeno disminuye y se eleva el contenido de carbono ligado a la producción de polisacáridos es decir se aumenta el contenido de celulosa hemicelulosa y lignina.

Caracterización Proximal

Dentro de la caracterización proximal de los residuos agrícolas se determinaron ceniza y humedad los resultados se muestran en la tabla 4-2, figura 4-2 y tabla 4-3, figura 4-3 respectivamente.

Tabla 4-2. Determinación de Ceniza

Biomasa residual	Ceniza %	Promedio	Desvesta
a1 ₁	4,71		
a1 ₂	4,61	4,68	0,06
a1 ₃	4,71		
a2 ₁	5,29		
a2 ₂	5,36	5,15	0,30
a2 ₃	4,81		
a3 ₁	4,79		
a3 ₂	4,97	4,82	0,14
a3 ₃	4,70		

Realizado por: Ronquillo María, 2020

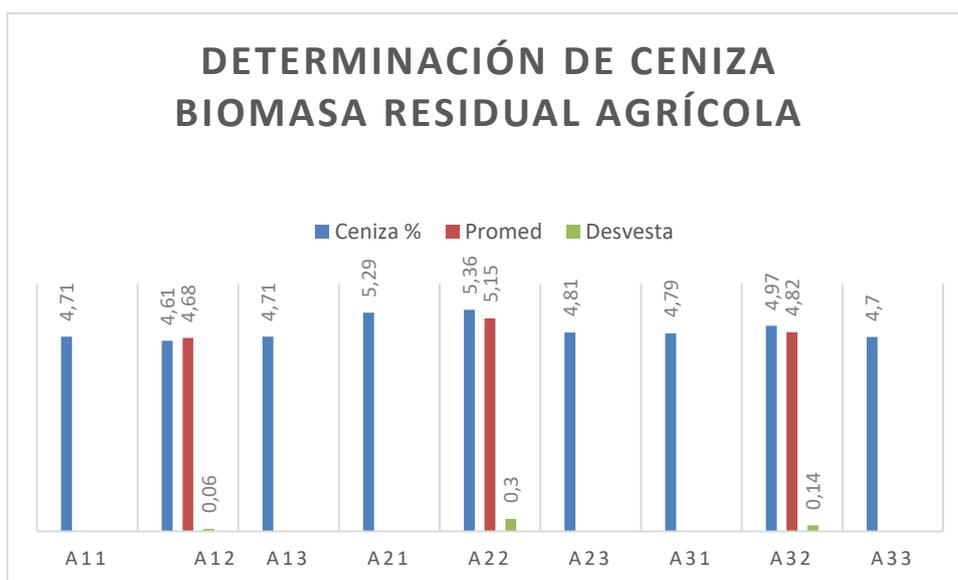


Figura 4-2. Determinación de Ceniza

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Es importante conocer el porcentaje cenizas en la materia prima, ya que se ha demostrado que la paja de trigo cuenta con un alto contenido de sílice. (Ruigang et. al., 2004). Se puede apreciar el contenido de cenizas obtenido de las tres muestras de biomasa de maíz, trigo y cebada fue de 4,68 % \pm 0,06; 5,15 % \pm 0,30 y 4,82% \pm 0,14 respectivamente, se comparó con datos obtenidos por (Ruilova, 2014) con valores de 5,98 Maíz, 10,64 trigo y 9,75 cebada lo que hace muy similar para cualquier tipo de tratamiento.

Tabla 4-3. Determinación de Humedad

MUESTRAS	HUMEDAD	PROMED	DESVESTA
a1 ₁	4,17		
a1 ₂	4,20	4,18	0,02
a1 ₃	4,18		
a2 ₁	7,70		
a2 ₂	7,18	7,48	0,27
a2 ₃	7,55		
a3 ₁	7,49		
a3 ₂	7,60	7,55	0,05
a3 ₃	7,56		

Realizado por: Ronquillo María, 2020

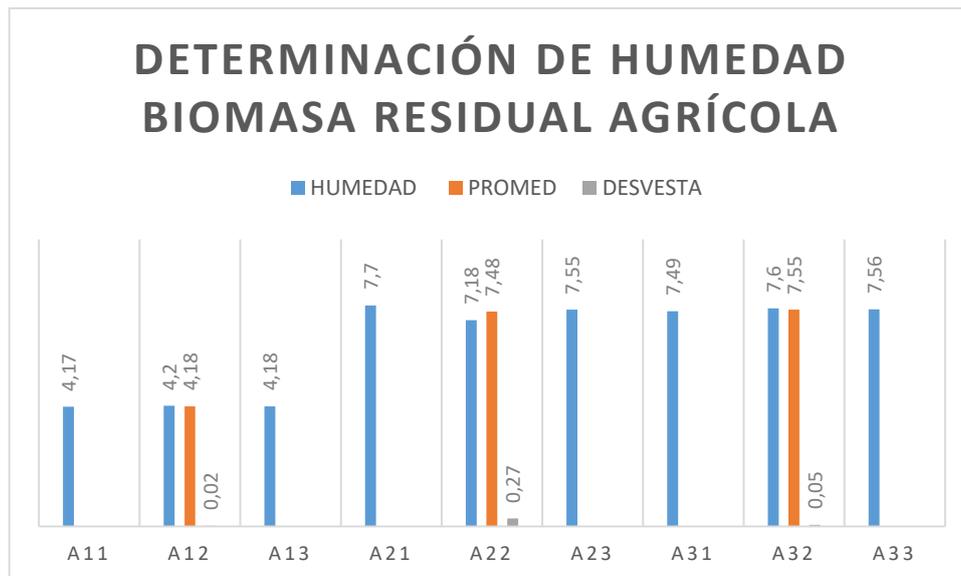


Figura4-3. Determinación de Humedad
Realizado por: Ronquillo María, 2020

La humedad es una de las variables de mayor importancia atribuidas a la biomasa y a los productos obtenidos de esta, ya que la eliminación de agua permite el aprovechamiento óptimo de la capacidad energética de la biomasa (Garzón, 2018). Además, es uno de los factores más influyentes en la biosíntesis de carbohidratos en la planta debido a el agua es fundamental en el proceso de fotosíntesis (Navarro & Navarro, 2003).

Se determinó la humedad de las muestras, obteniendo muestras casi secas, se secaron en estufa para facilitar su manejo. Las muestras secas se pusieron en la termobalanza, obteniendo una humedad de $4,18 \% \pm 0,02$ para maíz, $7,48 \% \pm 0,27$ para trigo y $7,55\% \pm 0,05$ para cebada. Se toma referencia de humedad obtenida por (Ruilova,2014) en rastrojos de maíz, trigo y cebada con 10,11; 13,61; 13,81 respectivamente. Al igual que la humedad, en cuanto al análisis de cenizas, se obtuvo un coeficiente de variación menor a 10 % el cual es un valor preciso a nivel de repetitividad. (Navarro & Navarro, 2003).

Los datos obtenidos del análisis proximal de los residuos agrícolas que se expresan en las Tablas 4-2 y 4-3 al analizar los mismos se puede establecer que estos valores están en concordancia con los análisis reportados por Ramos, (2017). Del análisis estadístico se determina que no hay diferencias significativas entre los diferentes residuos agrícolas.

Caracterización Estructural

A través del analizador de fibra se determinó el análisis estructural de los 30 tratamientos, tanto a biomasa inicial como a biomasa tratada de las cuales se tomó un tratamiento al azar (T8) para una comparativa la cual se muestra en la tabla 4-4 y figura 4-4.

Tabla 4-4. Análisis estructural residual agrícola sin y con tratamiento

COMPONENTE	BIOMASA SIN TRATAR %			BIOMASA TRATADA %		
	Residuo maíz	Residuo trigo	Residuo cebada	Residuo maíz	Residuo trigo	Residuo cebada
Lignina	24,41	19,97	18,98	13,58	12,99	12,03
Celulosa	33,12	30,78	32,59	48,12	42,78	42,59
Hemicelulosa	30,88	24,09	23,99	26,88	18,99	17,99

Realizado por: Ronquillo María, 2020

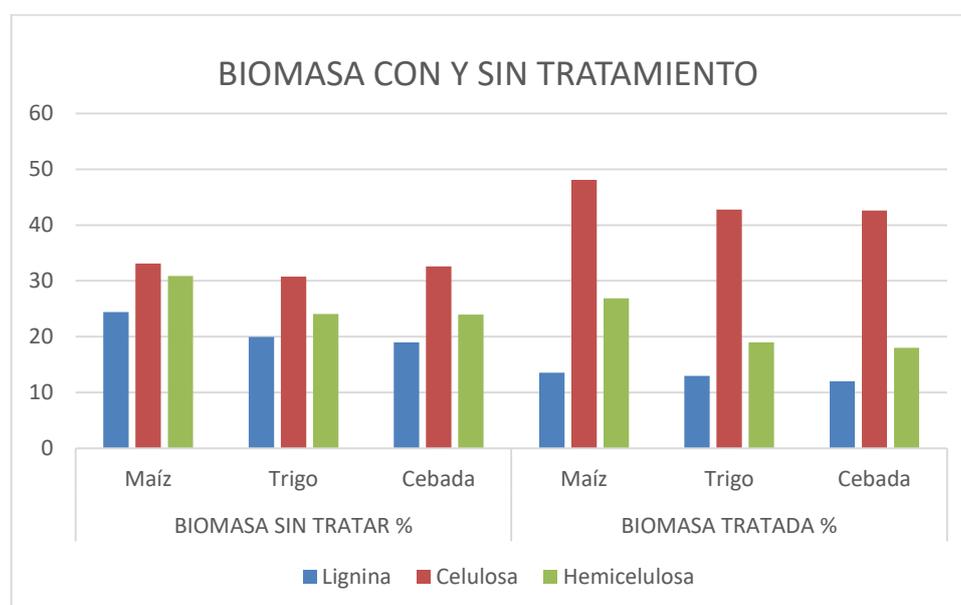


Figura 4-4. Biomasa residual sin y con tratamiento

Realizado por: Ronquillo María, 2020

En la caracterización estructural se realizaron diferentes análisis que permitan separar la pared celular de la célula vegetal de biomasa. Aplicando el método de Van Soest (1964) se calculó FDA, FDN lo que ayudó a determinar el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina en las muestras iniciales como en las finales, también se pudo referenciar con estudios realizados en biomasa residual con resultados similares. Ruilova (2014). Se logra evidenciar que la lignina disminuye en las diferentes muestras considerando las muestras iniciales se determinó una disminución en biomasa de maíz de un 10,83%, en biomasa de trigo un 6,98% y en biomasa de cebada un 6,95%,

referenciando a la cebada como la muestra más difícil de romper dicha estructura, en cambio se logra evidenciar que la celulosa aumenta en un 15; 12;10% respectivamente, hemicelulosa disminuye en un 4; 5,1 y 6% respectivamente, lo que nos indica resultados favorables, Tabla 4-4 y Figura 4-4.

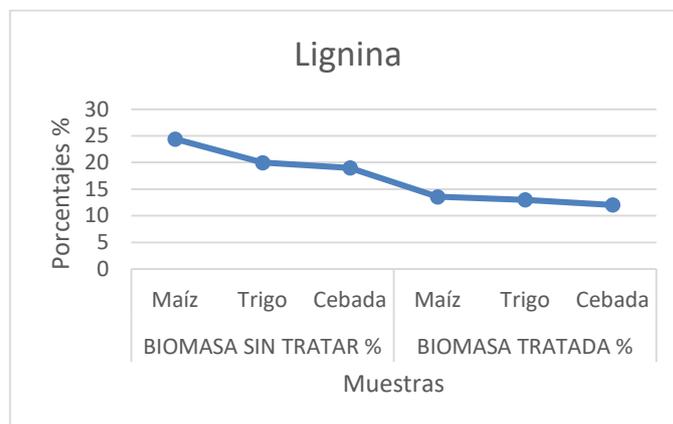


Figura4-5. Disminución de lignina
Realizado por: Ronquillo María, 2020

Los resultados reportados reflejan valores que se han encontrado en los residuos agrícolas analizados y su variabilidad estará en dependencia de factores como: variedad, condiciones de cultivo, fertilidad del suelo, edad del residuo entre otros. Se puede apreciar una evidente disminución de lignina entre el 12 al 13% al someter las muestras a un tratamiento enzimático. Las muestras se evaluaron hasta las 192 h.

4.2. Aislamiento, purificación, pruebas de crecimiento, identificación molecular y multiplicación masiva de las cepas.

Una vez aislados se observó las características de producción de micelio, conidios en si la esporulación, después de transcurrido tal periodo, la identificación morfológica macro y microscópica se realizó mediante claves taxonómicas para cuantificar las esporas por el método de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) en placa por diluciones seriadas, utilizando el instrumento contador de colonias efectuando varios contajes para obtener un resultado más confiable, resultando un buen nivel de crecimiento entre $1,5 \times 10^{10}$ y $2,1 \times 10^9$ UFC/ml, la multiplicación masiva de los hongos se la realizó en cajas Petri con 3 repeticiones.

La esporulación de los hongos empezó a notarse a las 24 horas, respecto a los porcentajes de sustrato de maíz, trigo y cebada, la temperatura adecuada fue de 28 °C a una humedad del 35% a pH =5,2 el sustrato que presto las condiciones para que crezca un hongo por cada muestra fueron

muy buenas, la única variante en esto fue el tiempo, en lo que se pudo observar mayor esporulación en los sustratos de maíz.

4.3. Hidrólisis enzimática y sacarificación

Despejando la concentración de la ecuación de calibración del espectrofotómetro encontrada en la sección 3.3 se obtiene la ecuación que permite calcular la presencia de azúcares reductores.

$$x = \frac{y - 0,0705}{0,2993}$$

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla.4.5. Concentración de Azúcares Reductores.

Tratamientos	Absorbancia (540nm)	Concentración g/l (x)
T1	0,231	1,009
T2	0,378	1,499
T3	0,236	1,024
T4	0,408	1,599
T5	0,229	0,999
T6	0,236	1,023
T7	0,355	1,422
T8	0,284	1,184
T9	0,235	1,022
T10	0,229	1,002
T11	0,261	1,106
T12	0,288	1,197
T13	0,349	1,401
T14	0,375	1,487
T15	0,230	1,003
T16	0,236	1,023
T17	0,228	0,998
T18	0,163	0,781
T19	0,269	1,138
T20	0,228	0,997
T21	0,261	1,108
T22	0,287	1,193
T23	0,360	1,437
T24	0,358	1,432
T25	0,229	0,999
T26	0,210	0,938
T27	0,291	1,207
T28	0,397	1,561
T29	0,201	0,908
T30	0,236	1,024

Realizado por: Ronquillo María, 2020

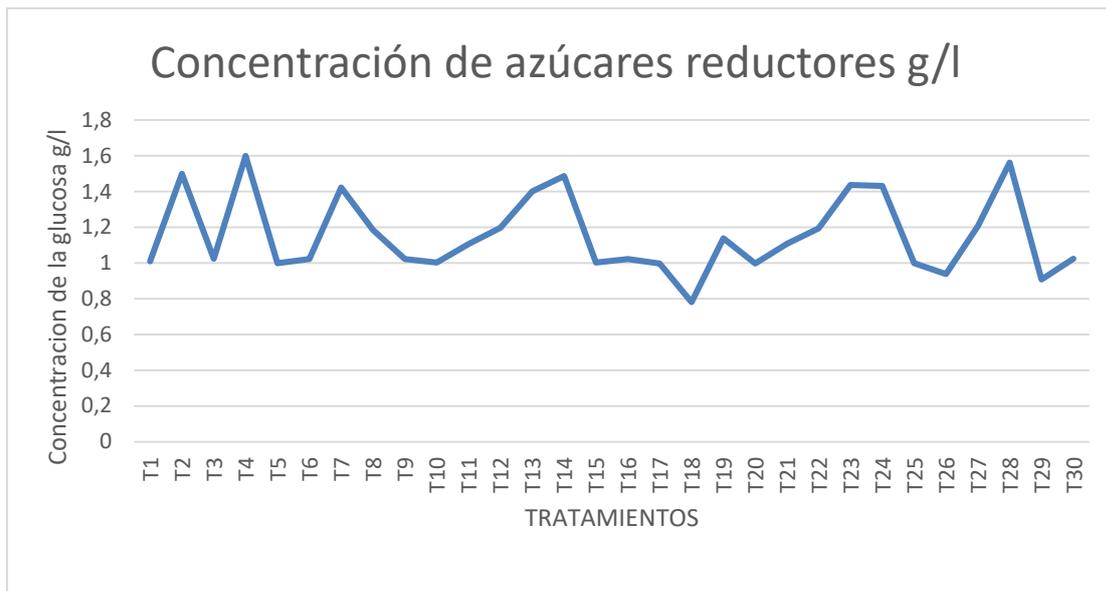


Figura4-6. Presencia de azúcares reductores.

Realizado por: Ronquillo María, 2020

La hidrólisis enzimática es el paso más importante de todo el proceso porque son las enzimas presentes en los hongos lignocelulolíticos que producen reacciones de oxidación y degradación de la lignina rompiendo así las moléculas de polisacáridos, degradando con las enzimas celulasas y xilanasas producidas por las diferentes cepas fúngicas. permitiendo llegar hasta sus monosacáridos, azúcares potencialmente fermentables. Sin embargo, a veces se requieren otras enzimas, especialmente en el caso de la hemicelulosa, dependiendo de su origen, puede presentar alta heterogeneidad (Girio, 2010). Se pueden añadir proteasas expansinas e incluso enzimas ligninolíticas (Talebnia et al.,2010)

Los distintos tratamientos han permitido obtener las distintas concentraciones de azúcares reductores presentando algunos de estos mayores rendimientos. Estos resultados permiten determinar que las enzimas producidas por las cepas fúngicas son eficientes en sacarificar residuos agrícolas, no obstante, el tiempo es una limitante.

4.4. Fermentación

La fermentación se realizó en kitsatos de 2L se tomó como base 100g de biomasa pre tratada, pH de 5,2 y 1 L de agua destilada misma que se llevó a cabo por el tiempo de 6 y 8 días, temperatura de 28 °C y sistema anaerobio, utilizando el microorganismo de fermentación *sacharomyces servisiae* comercial a una concentración de 1g/l.

La reacción química que ocurre en la fermentación es la siguiente:

4.5.2. Balance de masa

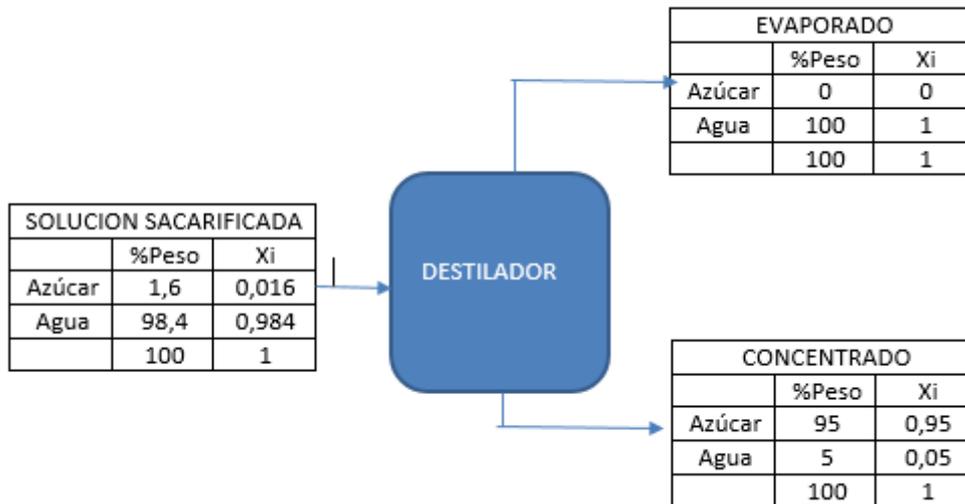


Figura4-7. Balance de masa.
Realizado por: Ronquillo María, 2020

Ecuaciones de Balance de Masa

Ecuación General $S = E + C$ Ec. 1

Azúcar $X_{azúcar} * S = X_{azúcar} * E + X_{azúcar} * C$ Ec. 2

Agua $X_{agua} * S = X_{agua} * E + X_{agua} * C$ Ec. 3

Dónde:

S= Solución sacarificada

E = Evaporado

C = Concentrado

$X_{azúcar}$ = Fracción en peso de azúcar contenida en la solución

X_{agua} = Fracción en peso de agua contenida en la solución

Remplazando datos en la ecuación 1 y 2 se obtiene:

$$S = E + 1,6 \text{ g}$$

$$0,016 * S = 0 * E + 0,95 * 1,6\text{g}$$

$S = 95 \text{ g}$ de solución sacarificada después de las 3 fases de destilación.

4.5.3. Transformación de masa a volumen.

$$95 \text{ g} * \frac{1 \text{ ml}}{1,56\text{g}} = 60,89 \text{ ml}$$

El balance de masa indica que se necesitan 60,89 mL de solución sacarificada con el 1,6% de azúcares, para obtener 1000 mL de solución concentrada al 95%.

4.5.4. Cálculo del volumen de etanol obtenido después de la fermentación

Es necesario calcular la cantidad de etanol obtenido en el proceso de fermentación mediante la concentración alcohólica medida.

$$ve = vd * \frac{\%alcoholico}{100}$$

Dónde:

ve = volumen de etanol

vd = volumen del destilado

Para esquematizar los cálculos realizados se presenta aquí un ejemplo tomando la información del tratamiento T4

$$ve = 155 * \frac{95}{100}$$

$$ve = 147,25 \text{ ml}$$

Se considera que al 95% de pureza tomando como referencia el tratamiento 4 se obtiene un volumen de etanol de 147,25 ml, el restante 5% es agua, considerando el volumen total de 155ml

Estos procesos de destilación se lleva por el tiempo aproximado de 3 horas a una intensidad de llama menor a 30°C

4.5.5. Porcentaje experimental del bioetanol

Tabla 4-6 Porcentaje experimental de bioetanol

Tratamiento	Residuos agrícolas	Cepas fúngicas	t (h)	%-OH
T1	a1	b1	144	33
T2	a1	b2	192	88
T3	a1	b3	144	80
T4	a1	b4	192	95
T5	a1	b5	144	18
T6	a1	b1	192	22
T7	a1	b2	144	76
T8	a1	b3	192	85
T9	a1	b4	144	89
T10	a1	b5	192	22
T11	a2	b1	144	30
T12	a2	b2	192	84
T13	a2	b3	144	75
T14	a2	b4	192	91
T15	a2	b5	144	8
T16	a2	b1	192	18
T17	a2	b2	144	66
T18	a2	b3	192	53
T19	a2	b4	144	75
T20	a2	b5	192	10
T21	a3	b1	144	32
T22	a3	b2	192	85
T23	a3	b3	144	78
T24	a3	b4	192	93
T25	a3	b5	144	17
T26	a3	b1	192	20
T27	a3	b2	144	77
T28	a3	b3	192	76
T29	a3	b4	144	80
T30	a3	b5	192	18

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Las filas pintadas pertenecen a los mejores tratamientos en rendimientos de etanol.

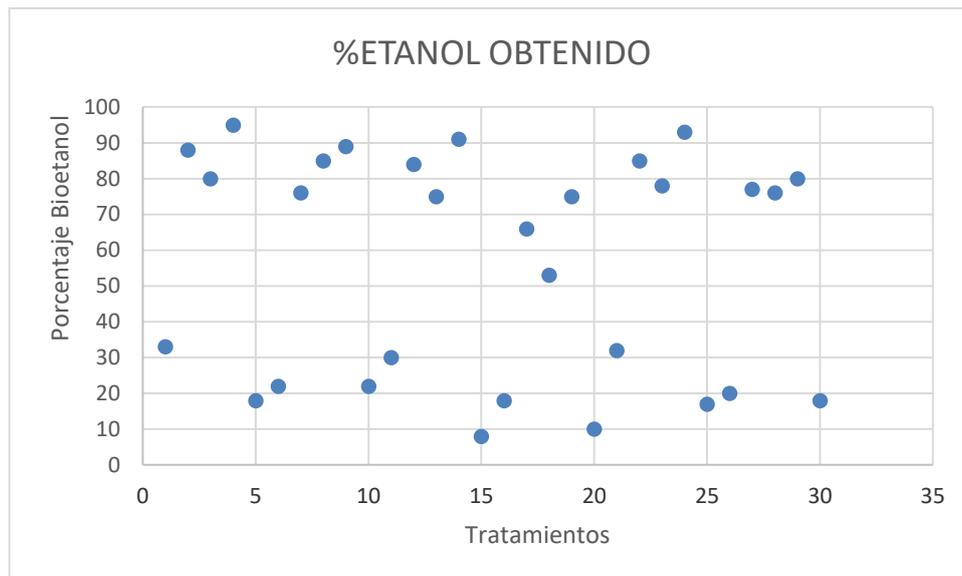


Figura 4-8. Diseño experimental de bioetanol
Realizado por: Ronquillo María, 2020

Se puede apreciar el diseño experimental con 30 tratamientos con sus respectivos factores y niveles, en el que se determinó la pureza del etanol de los destilados utilizando el método de grado alcohólico y de densidades.

4.6. Análisis del Diseño experimental

El diseño experimental se evaluó utilizando el software estadístico Statgraphics. Obteniendo el siguiente resumen del diseño factorial:

Tabla 4.7. Resumen del Diseño Multi-factorial Categórico.

Diseño base			
Factores experimentales	3	Réplicas	3
Corrida base	30	Total de corridas	90
Bloques base	1	Total de Bloques	3
Número de respuesta	1		
Grados de libertad para el error	8		
Aleatorizar	Si.		
Número de niveles	3:5:2		

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Se ha creado un diseño experimental el cual estima los efectos de 3 factores categóricos. El diseño es una factorial estándar que consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores. Hay un total de 90 corridas con 30 ejecuciones en el diseño.

Tabla 4-8. Análisis de Varianza para % Etanol - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Residuos agrícolas	499,467	2	249,733	8,30	0,0112
B:Cepas	26443,5	4	6610,87	219,63	0,0000
C:Tiempo	22,5333	1	22,5333	0,75	0,4121
INTERACCIONES					
AB	146,533	8	18,3167	0,61	0,7510
AC	9,86667	2	4,93333	0,16	0,8516
BC	694,8	4	173,7	5,77	0,0174
ABC	240,8	8	30,1		
RESIDUOS	0	0			
TOTAL	28057,5	29			
(CORREGIDO)					

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Etanol en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % Etanol con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 4-9. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por RESIDUOS
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

RESIDUOS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
a2	10	51,0	1,73494	X
a3	10	57,6	1,73494	XX
a1	10	60,8	1,73494	X

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Tabla 4-10. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por RESIDUOS
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
a1 - a2	*	9,8	6,9989
a1 - a3		3,2	6,9989
a2 - a3		-6,6	6,9989

Realizado por: Ronquillo María, 2020

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a un par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 4-9. se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 4-11. Pruebas de Múltiple Rangos para % Etanol por Cepas
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos
				Homogéneos
b5	6	15,5	2,23979	X
b1	6	25,8333	2,23979	X
b3	6	74,5	2,23979	X
b2	6	79,3333	2,23979	XX
b4	6	87,1667	2,23979	X

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Tabla 4-12. Pruebas de Múltiple Rangos para % Etanol por Cepas
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
b1 - b2	*	-53,5	10,9236
b1 - b3	*	-48,6667	10,9236
b1 - b4	*	-61,3333	10,9236

b1 - b5		10,3333	10,9236
b2 - b3		4,83333	10,9236
b2 - b4		-7,83333	10,9236
b2 - b5	*	63,8333	10,9236
b3 - b4	*	-12,6667	10,9236
b3 - b5	*	59,0	10,9236
b4 - b5	*	71,6667	10,9236

Realizado por: Ronquillo María, 2020
* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza de Tukey. En la tabla 4-16. se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's, esto se puede observar en la cepa b2.

Tabla 4-13. Pruebas de Múltiple Rangos para %ETANOL por TIEMPO
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TIEMPO	Casos	Media	Sigma	Grupos
		LS	LS	Homogéneos
144	15	55,6	1,41657	X
192	15	57,3333	1,41657	X

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Tabla 4-14. Pruebas de Múltiple Rangos para % ETANOL por TIEMPO
Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
144 - 192		-1,73333	4,6197

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Podemos observar que existe una diferencia significativa entre grupos, el método de Tukey considera que hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Determinacion de Medias.

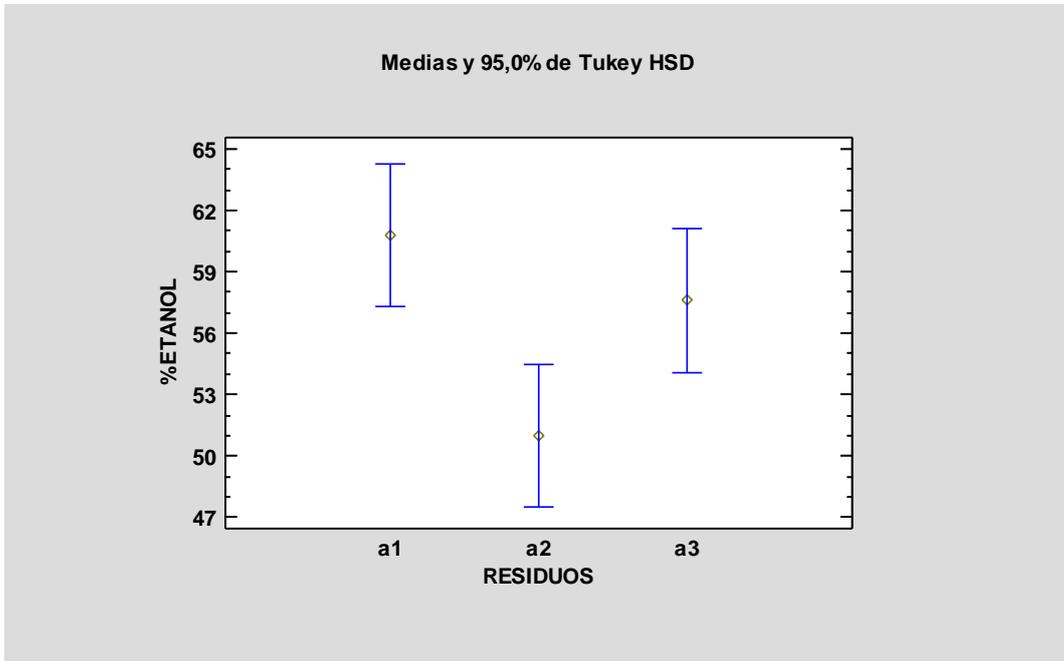


Figura 4-9. Medias Residuos vs % Etanol
Realizado por: Ronquillo María, 2020

Las medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza, se puede evidenciar que el mejor rendimiento de etanol se obtiene con el residuo a1(residuo de maíz seguido de a3 (residuo de cebada), finalmente el que sigue en rendimiento se encuentra el a2 (residuo de trigo)

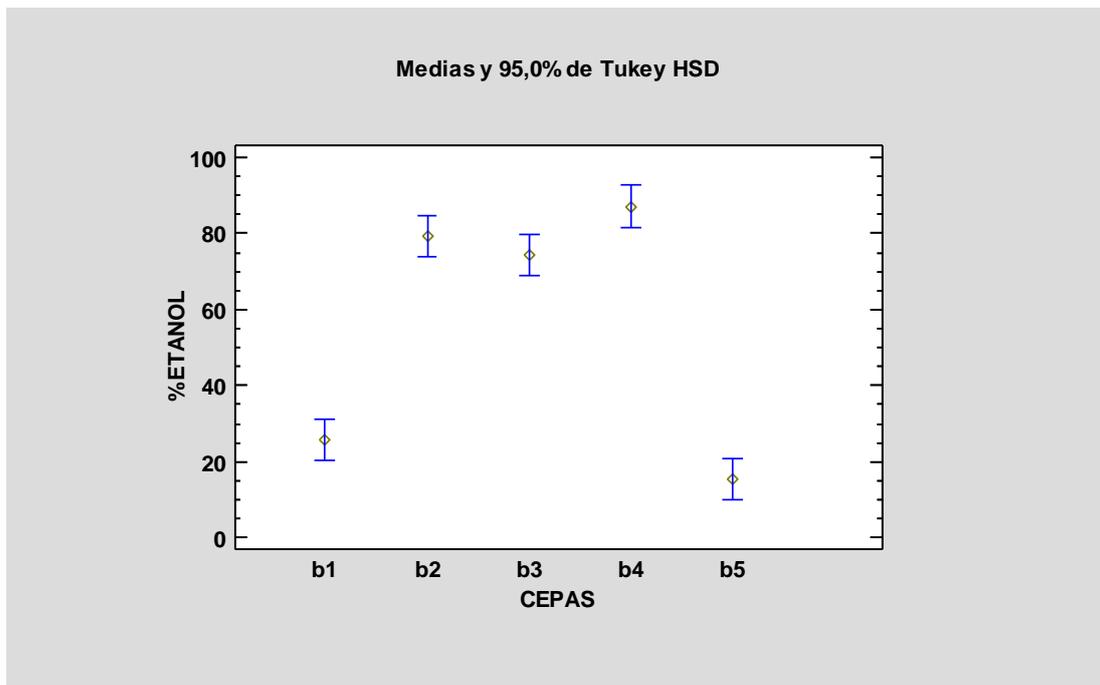


Figura 4-10. Medias Cepas vs % Etanol
Realizado por: Ronquillo María, 2020

En esta figura las medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza, se puede observar que el mejor rendimiento de etanol se obtiene con tres cepas b4 (Trichoderma Reseei), b2 (Aspergillus Nidulans), b3 (Aspergillus Niger) las cuales presentan diferencia significativa con respecto a cepas como (b1 y b5).

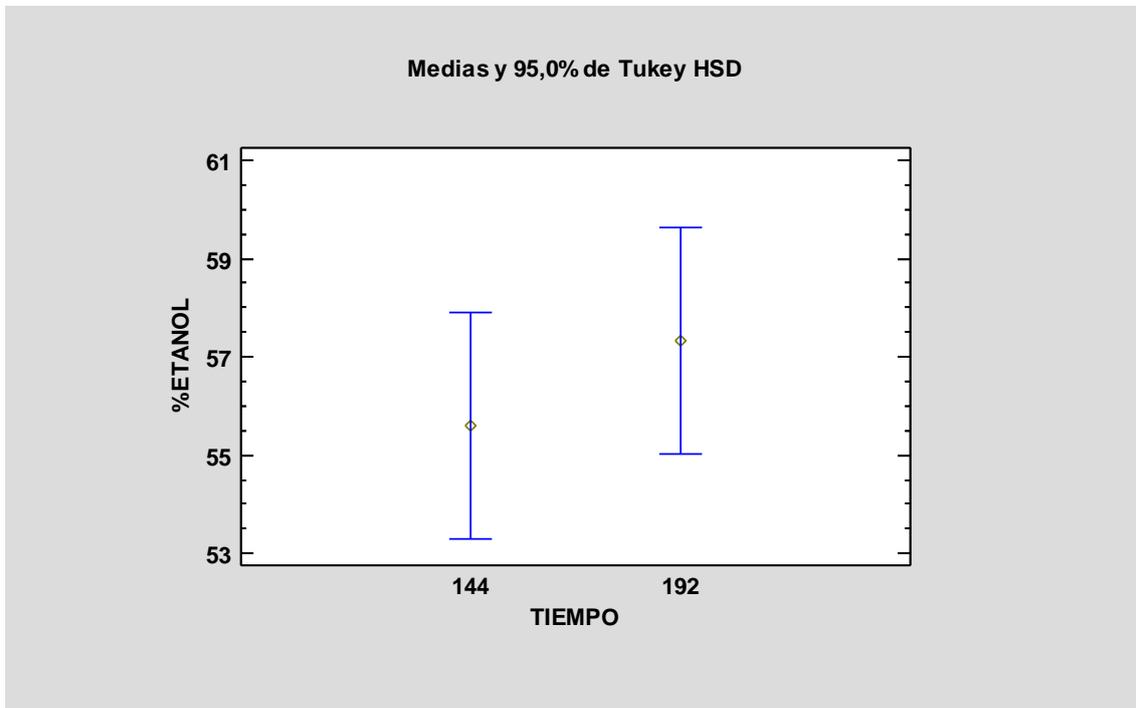


Figura 4-11. Medias Tiempo vs % Etanol

Realizado por: Ronquillo María, 2020

Se observa que en un tiempo de 192 h los sustratos presentan un mejor rendimiento de etanol, estas medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza.

Gráficas de Interacciones

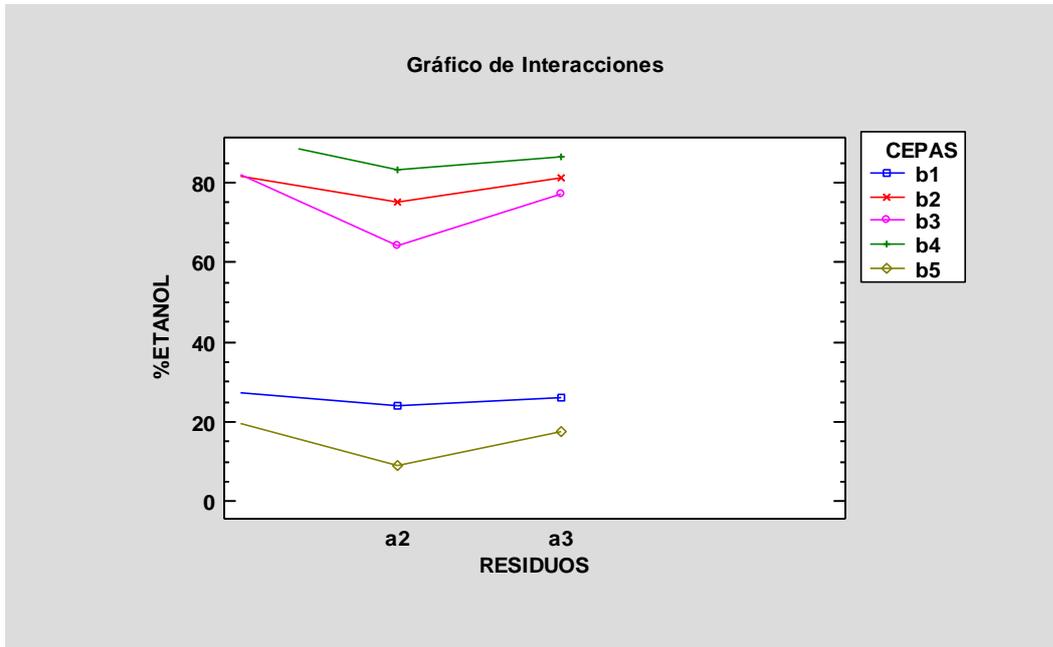


Figura 4-12. Interacción Residuos vs Cepas y % Etanol

Realizado por: Ronquillo María, 2020

En esta ilustración se muestra con claridad la interacción de residuos vs cepas lo que nos indica que el mejor rendimiento de etanol se produce tanto con el residuo a2 y a3 sin duda con las cepas b2, b3 y b4 las presentan diferencia significativa con respecto a cepas como (b1 y b5).

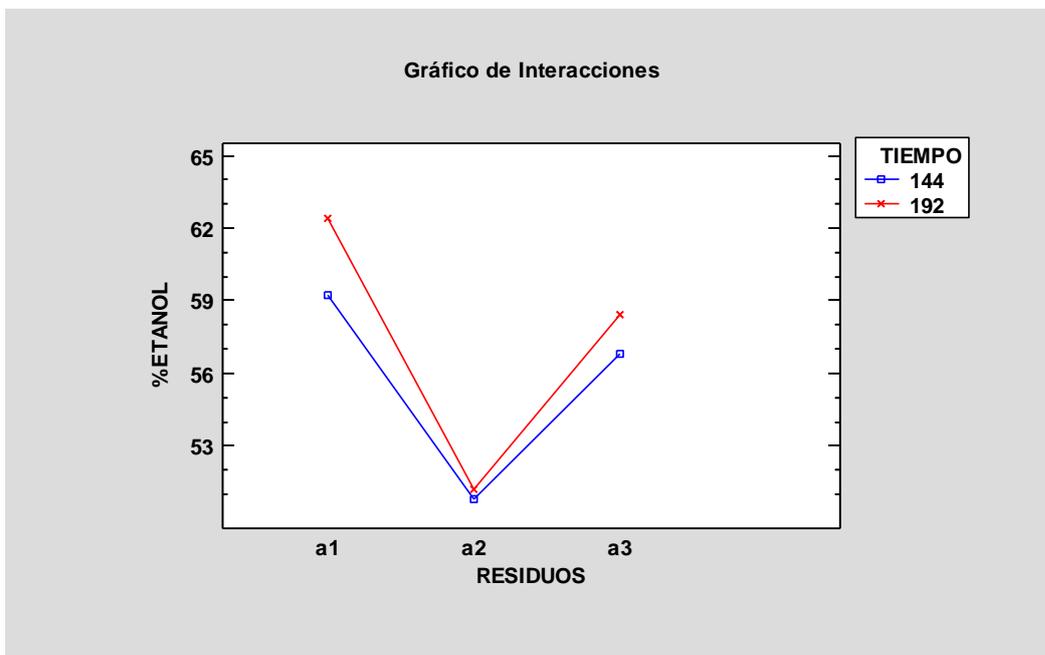


Figura 4-13. Interacción Residuos vs Tiempo y % Etanol

Realizado por: Ronquillo María, 2020

En esta figura se muestra la interacción de residuos vs tiempo la cual nos proporciona resultados con respecto al porcentaje de etanol obtenido, la cual presenta mejores rendimientos con el a1 en un tiempo de 192h seguido de un tiempo de 144h, el que sigue en rendimiento de etanol es el residuo a3 con un tiempo de 192h estos dos tratamientos muestran una diferencia significativa grande con el residuo a2.

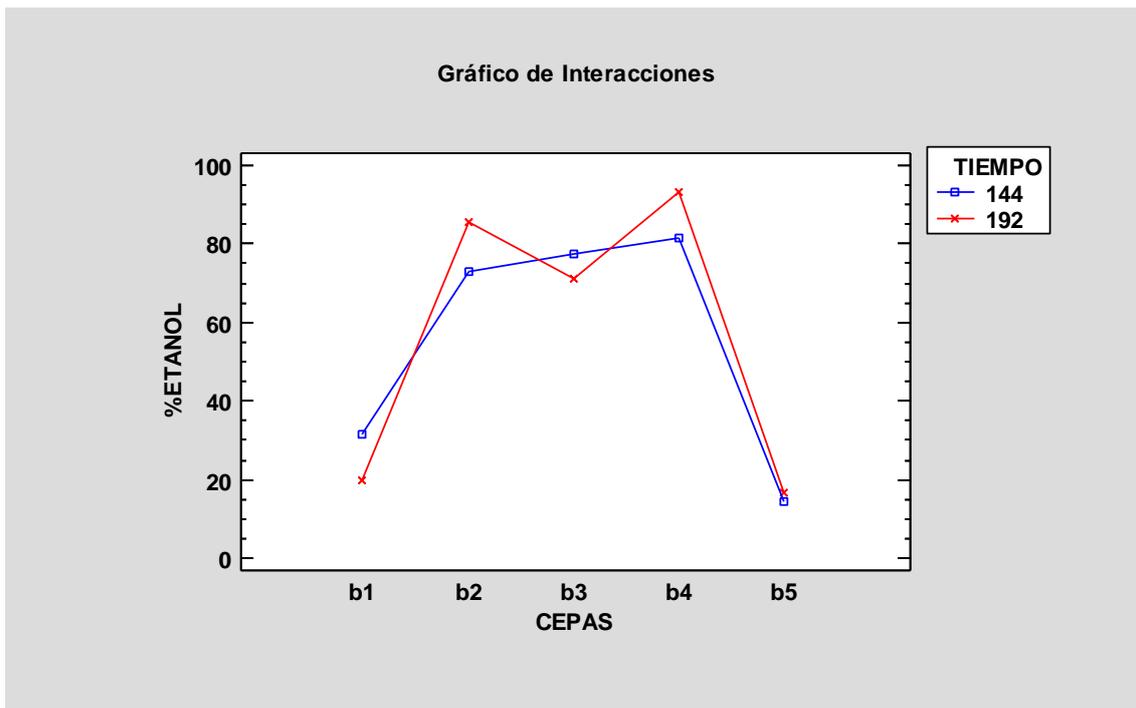


Figura 4-14. Interacción Cepas vs Tiempo y % Etanol

Realizado por: Ronquillo María, 2020

De acuerdo a los resultados que nos muestra la gráfica se observa con certeza que las mejores interacciones se muestran en las cepas b2, b3 y b4 en un tiempo de 192 h para producir un rendimiento cercano al 100%, sin embargo, se muestra la mejor interacción que es b4 * 192h el cual pertenece al tratamiento 4 seguida de b2 *192h el cual pertenece al tratamiento 2 luego sigue el b3*144h perteneciente al tratamiento 3, también se aprecia una diferencia significativa grande con las cepas b1 y b5.

Residuos vs Niveles de Factor

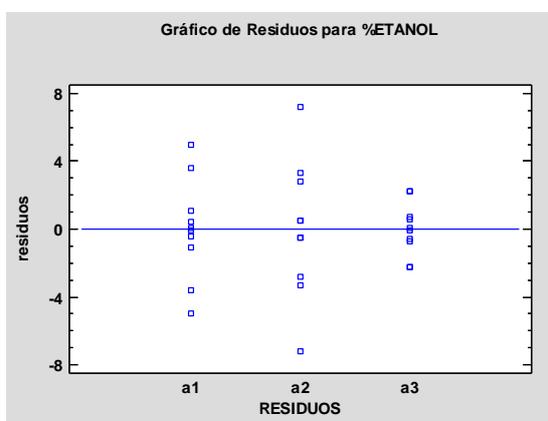


Figura 4-15. Residuos vs Residuos
Realizado por: Ronquillo María, 2020

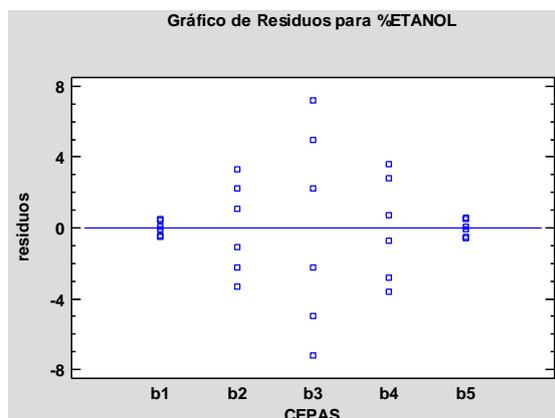


Figura 4-16. Cepas vs Residuos
Realizado por: Ronquillo María, 2020

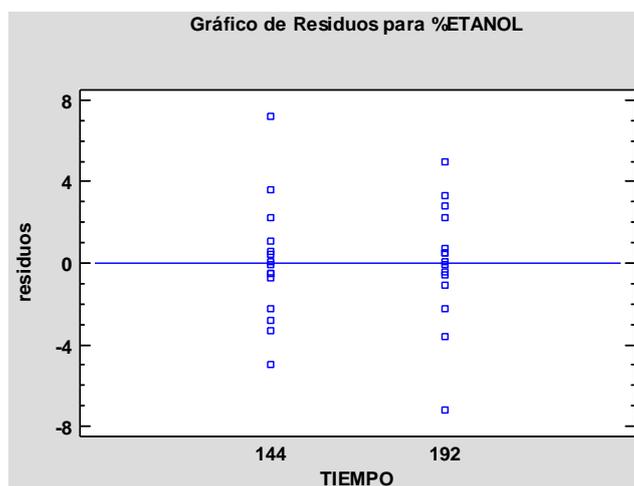


Figura 4-17. Tiempo vs % Residuos
Realizado por: Ronquillo María, 2020

Se puede observar que existe una normalidad en la distribución de los datos, ya que existe una misma dispersión tanto en la parte superior como inferior por tanto es válido el modelo ya que existe una independencia de los factores con los resultados que obtuvimos.

Después de haber realizado un análisis estadístico utilizando un diseño ANOVA Multifactorial se determina que este modelo debe operar bajo ciertas condiciones como son: residuo agrícola de maíz (a1) seguido de residuo agrícola de cebada (a3); cepas fungicas *Trichoderma Reseei* (b4), *Aspergillus Nidulans* (b2) y *Aspergillus Niger* (b3) en un tiempo de 192h resultando ser los tratamientos T4,T2,T3 los mejores para un mejor rendimiento de etanol.

Verificación de la hipótesis.

Los resultados obtenidos en el proceso de obtención de bioetanol aplicando diferentes tratamientos de aislados fúngicos nos indica que hay algunos tratamientos mejores que otros para la obtención de bioetanol con fines de biorefinería procedente de biomasa residual agrícola de maíz blanco, trigo y cebada mediante hidrólisis enzimática. Esto nos permite aceptar la hipótesis de la investigadora por cuanto se observó que los tratamientos T4,T2,T3 se obtuvo un mejor rendimiento de bioetanol con un porcentaje igual al 95%, residuo agrícola de maíz, tres tipos de hongos y 192 h, esto lo corrobora el análisis de varianza con $p < 0,05$ que se ajusta con los resultados reales obtenidos en laboratorio. El tiempo estimado para el proceso completo fue de 15-20 días.

CONCLUSIONES

- Se pudo realizar una caracterización integral en la que se determinó que la biomasa de los residuos es la adecuada para la obtención de bioetanol, los parámetros más importantes que nos ayudó a reconocer que la biomasa es adecuada fueron: presencia de carbono y nitrógeno dentro del análisis elemental, cenizas dentro del análisis proximal y presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina dentro del análisis estructural, resultando tener las mejores características el residuo agrícola de maíz.
- La hidrólisis enzimática fue el cuello de botella al probar distintas cepas fúngicas con residuos agrícolas en dos tiempos, cuyos parámetros se determinó después de varios ensayos (prueba-error), los cuales permitieron que las enzimas celulasas y xilasas presentes en las cepas rompan las cadenas de polisacáridos de celulosa para la obtención de azúcares reductores, por espectrofotometría se pudo detectar la presencia de glucosa, no se descarta la presencia de otros azúcares presentes en las muestras. La glucosa fue disminuyendo a las 12 horas de fermentación, al aparecer etanol en un porcentaje inicial de 8 al 13%.
- Se pudo aplicar un diseño experimental de bloques completamente al azar, con tres factores de estudio, 30 tratamientos, 3 repeticiones, con 90 ensayos, las variables fueron analizadas según el diseño empleado mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) lo que permitió determinar la interacción de factores residuos agrícolas-cepas fúngicas-tiempo cuyo efecto combinado de los tres factores es estadísticamente significativo en la producción de bioetanol. Las pruebas de medias se evaluaron con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza, además se determinó en los tratamientos un efecto lineal. Como resultado se determina que este modelo debe operar bajo ciertas condiciones como son: residuo agrícola de maíz (a1) seguido de residuo agrícola de cebada (a3); cepas fúngicas *Trichoderma Reesei* (b4), *Aspergillus Nidulans* (b2) y *Aspergillus Niger* (b3); tiempo de 192h resultando ser los mejores los tratamientos T4, T2, T3 para un rendimiento de etanol al 95%.
- La pureza de etanol anhidro al 95% nos ayudó el método de rectificación de absorción física (carbón activado granulado de un 1mm) el cual permitió separar moléculas según su tamaño, se dejó reposar por 7 días en donde se pudo apreciar una mejor concentración, se calificó mediante características organolépticas como aroma y sabor además se cuantificó mediante alcoholímetro su porcentaje alcohólico, el resultado de pureza obtenido le hace susceptible a ser utilizado en biorefinería.
- El proyecto es viable ya que los recursos son los residuos y las cepas fúngicas.

RECOMENDACIONES

- Es necesario seguir investigando fuentes alternativas de combustibles no fósiles por su relación amigable con el ambiente, lo cual permite encontrar tratamientos ecológicos como el estudiado, que se den en tiempos más cortos ya que este factor es una limitante.
- Al momento de realizar el análisis estructural se ve la posibilidad de hacerlo mediante espectrofotometría, ya que el método de Van Soest es muy largo y el material utilizado en el equipo como bolsas de papel filtro son poco habituales en el mercado.
- Se recomienda montar las pruebas de fermentación en un birreactor que tenga un control automático para un adecuado control de las condiciones operacionales del proceso.
- Para comprobar tanto la presencia como el porcentaje de pureza de bioetanol y demás compuestos que se generan en las diferentes procesos y reacciones se recomienda hacerlo por cromatografía líquida de alta eficacia HPLC o por cromatografía de gases, para obtener mejores apreciaciones, a pesar de los altos costos.
- Sería importante continuar con este estudio para evaluar costos de producción y saber técnicamente si es posible llevar a mayor escala en biorefinería.

BIBLIOGRAFÍA

- A.D. Kambis y J.S. Levine.** (1996). "Biomass Burning and the Production of Carbon Dioxide: a Numerical Study", capítulo 17 en: Biomass Burning and Global Change Joel S. Levine (comp.), Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EU. vol. 1, pp. 170-177
- Abdel- Fattah, G. Shabana, Y. Ismail, A. Rashad, Y.** (2007) "Trichoderma harzianum: a biocontrol agent against Bipolaris orizae", Micopathologia, 164,81-89.
- Acharya S, Chaudhary A.** (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: review. Bras J Microbiol. 43:844-56.
- Annamalai N, Rajeswari MV, Elayaraja S, Balasubramanian T.** (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus halodurans CAS1 by conversion of lignocellulosic wastes. Carbohyd Polym. 94:409-15 assos, C. P., Ferreira, S. S., Serodio, A.,
- Baldrian, P. Valaskova, V.** (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 32, 501-521.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Manzaneres, P., Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, M.** (2006) Steam explosion pretreatment for cereal conversion to ethanol. Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132, 496-508.
- Ballesteros, M., J.M. Oliva, Negro M.J., Manzaneres P., Ballesteros I.** (2004).
- Banco Central del Ecuador.** Importaciones de Ecuador. (2007).
- Bashir Z, Kondapalli VK, Adlakha N, Sharma A, Bhatnagar RK, Chandel G, Yazdani SS.** (2013). Diversity and functional significance of cellulolytic microbes living in termite, pill-bug and stem-borer guts. Sci Rep. 3:2558.
- Behera BC, Parida S, Dutta SK, Thatoi HN.** (2014). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. Am J Microbiol Res. 2:41-6
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P.** (2009). Coffee, tea, cocoa. In: Belitz HD, Grosch W, Schieberle P, editors. Food chemistry. Leipzig: Springer; p. 938-51

- Bhat MK.** (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18:355-83
- Bhattacharya A, Pletschke BI.** (2014). Thermophilic Bacilli and their enzymes in composting. In: Maheshwari DK, editor. *Composting for sustainable agriculture, sustainable development and biodiversity*, vol. 3. Springer. p. 103-24
- CEDRSSA** (2020). Recuperado de: www.cedrssa.gob.mx › files › Production y comercio de biocombustibles. Pdf-cedrssa
- Cristancho, L, Monroy, R.** (2014). Manual de métodos Generales para determinación de Carbohidratos. Recuperado de [https://es.slideshare.net/LeidyCristancho /manual-de-métodos-generales-para-determinación-de-carbohidratos](https://es.slideshare.net/LeidyCristancho/manual-de-métodos-generales-para-determinación-de-carbohidratos)
- Diario El telégrafo,** (2010). Recuperado de <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/la-gasolina-ecopais-significara-un-ahorro-de-96-millones>
- Dube, H. C.** (2009). *Introduction To Fungi*. Vikas Publicación Casa Pvt Ltd.
- Eida MF, Nagaoka T, Wasaki J, Kouno K.** (2012). Isolation and characterization of cellulose decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes Environ*, 27:226-33.
- Espinosa, J.** (2013). Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad musa paradisiaca. Tesis de graduación. U.C.E. Facultad de Ingeniería Química.
- F. Figueroa.** (2008). "Tablero de comando para la promoción de los biocombustibles en Ecuador", Recuperado de: <http://www.eclac.org/publicaciones/xml/9/33219/lcw189e.pdf>
- FAO.** (2008). *Bosques y energía: cuestiones clave*. Estudio FAO: Montes 154, Roma.
- FAO.** (2017). *La producción mundial total de cereales*.
- FAO.** (2014). Estimaciones de la FAO sobre los gases de efecto invernadero, Recuperado de <http://www.fao.org/news/story/es/item/218907/icode/>
- FAO.** (2019). *Situación alimenticia mundial*, Recuperado de <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>

- Fengel, D. and Wegener, G.** (1984) *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: De Gruyter.
- Gaitán, D., Pérez, L.** (2007) Aislamiento Y Evaluación De Microorganismos Celulolíticos a Partir De Residuos Vegetales Frescos Y En Compost Generados En Un Cultivo De Crisantemo (*Dendranthema Grandiflora*). Pontificia universidad Javeriana
- Garzón, G.** (2018). Evaluación del proceso de pirolisis de material lignoceluloso proveniente del eucalipto en atmosfera de dióxido de carbono. Instname: Universidad Libre, 80. Retrieved from <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/11026>
- Ghnimi, S., Al-Shibli, M., Al-Yammahi, H.R., Al-Dhaheri, A., Al-Jaberi, F., Jobe, B., Kamal-Eldin, A.** Reducing sugars, organic acids, size, color, and texture of 21 Emirati date fruit varieties (*Phoenix dactylifera*, L.) NFS Journal. 2018. Vol 12 pp 1-10
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R.,** (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775-4800.
- Gobierno Federal de México.** (2010). Estrategia Intersectorial de los Bioenergéticos, México D.F.
- Gómez E.A., L.A. Ríos y J.D. Peña.** (2012). Madera, un potencial material lignocelulósico para la producción de biocombustibles en Colombia. *Información Tecnológica* 23(6):73-86.
- Gómez E.A., L.A. Ríos y J.D. Peña.** 2013. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. *Información Tecnológica* 24(5):113-122.
- Griffin, D.** (1996). *Fungal physiology* (Segunda ed.). John Wiley & Sons.
- Gutierrez-Rojas I, et al,** (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Rev Iberoam.* Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- H.P.S. Abdul Khalil., Y. Davoudpour., Chaturbhuj K. Saurabh., Md. S. Hossain., A. SAdnan., R. Dungani., M.T. Paridah., Md. Z. Islam Sarker., M. RNurul Fazita., M. ISyakir., M.K.M. Haafiz.** Fibras nanocelulósicas como nuevo material para el empaque

sostenible: procesos y aplicaciones. Recuperado de:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116303045?via%3Dih>

Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 937-953.

Helmenstine, A., Molecular Sieve Definition - Definition of Molecular Sieve - What Is a Molecular Sieve. (2020). Recuperado de: <http://chemistry.about.com/bio/Anne-Marie-Helmenstine-Ph-D-7815.htm>

Hernández-Salas, J. M., M. S. Villa-Ramírez, J. S. Veloz-Rendón, K. N. Rivera-Hernández, R. A. González-César., M. A. Plascencia-Espinoza, and S. R. Trejo-Estrada. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse. *Biores. Technol.* 100: 1238-1245.

Javier, F., Agenjo, A., & L, T. B. E. S. (2014). Necesidades nutritivas de las levaduras. 1–9. Recuperado de www.biocor.es

Juturu V, Wu JC. (2014). Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 33:188-203.

Ladrón de cerebros. (2016). Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=exYit4HYmHw>

Lynd, L. R., and Y. Zhang. (2002). Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. *Biotechnol. Bioeng.* 77:467-475.

Mantilla, M. (2012). Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol. Tesis de graduación. U.C.E. Facultad de Ingeniería Química.

Martínez AC, Balcázar LE, Dantán GE, Folch MJL. (2008). Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev Latinoam Microbiol.* 50:119-31.

Ministerio coordinador de conocimiento y talento humano. (2012). Recuperado de <https://www.youtube.com/channel/UCw40zpQU4g0hnNrEoA9NRvQ>

- Mohtar, W., Muhannad, I., Kader, J.** (2018). Solid substrate and submerged culture fermentation of sugar cane bagasse for the production of cellulase and reducing sugars by a local isolate, *Aspergillus terreus* SUK-1. En: *Journal of Microbiology and Biotechnology*. vol. 10, no. 5, p. 770-775
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M.** (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673-686.
- Muniswaran, K., Ananda., S., Ptchaivelu Ch., Narasimha.** (2018). Production of cellulases from coconut coir pith in solid state fermentation. En: *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology*. Jun. vol. 60, no. 2, p. 147-151
- Navarro, G., & Navarro, S.** (2003). *Química Agrícola: El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*
- Nigam, P.S., Singh, A.** (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52-68.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G.** (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* 1,7.
- Palacios, A.** (2007). Utilización de residuos agroindustriales de la costa en la obtención de setas *Pleurotusostreatusvar florida* y *Pleurotuspulmonariusvar florida*. Tesis de graduación Universidad Técnica de Ambato-FCIAL.
- Palacios, A.** (2011). Evaluación y adecuación de un tanque con agitador y chaqueta de vapor de 0,9 m³ para la pasteurización de 880 kg de pulpa de fruta. ESPOL. Facultad de Ingeniería Mecánica. p.20.
- Parrales, A., Reyes Vera, M., & Pine Tobar, W.** (2012). *Cromatografía del gas natural*. Escuela Superior Politécnica del Litoral
- Passos, C. P., Ferreira, S. S., Serodio, A., Basil, E., Marková, K., Ciesarová, Z., Coimbra, M. A.** (2018) Pectic polyaccharides as an acrylamide mitigation strategy-competition between reducing sugars and sugar acids. *Food Hydrocollids*. Vol. 81 pp 113-119

- Perry.** (1994). Manual Del Ingeniero Químico. Sexta Edición. Mc Graw Hill. Capítulo III.
- Petersen, M.O., Larsen, J., Thomsen, M.H.** (2009). Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass & Bioenergy* 33, 834-840.
- Pham, H.N.; Doherty, M.F.** (1990). Design and synthesis of heterogeneous azeotropic distillations I Heterogeneous phase diagrams,» *Chem. Eng. Sci.*, vol. 45, pp. 1823-1836,
- Ramos, Fernando Daniel; Díaz, María Soledad; Villar, Marcelo Armando, Artículo biocombustibles, revista: *Ciencia*; ISSN: 1666-5171, 2016
- P Van Soest.**, (1963) “Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol.46. pp.825-829.
- Ramírez W,** (2020). Destilación de etanol. Recuperado de <https://licorerianaturalartesanal.blogspot.com/p/wagner-ramirezlicoreroartesano.html?showComment=1623175320337>.
- Ramos, S.** (2019) Evaluación de la obtención de azúcares reductores a partir del tallo de maíz de un cultivo ubicado en el municipio gutierrez, cundinamarca. Recuperado de <https://repositorio.unbosque.edu.co/handle/20.500.12495/2150>
- Rawat R, Tewari L.** (2012). Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles.* 16:637-44.
- Reid, I.D.** (1989). Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 786-803.
- Ruigang Zhao, Zou Huiling, Dong Xiuzhen.** (2004) Comparison of Biomedical Engineering Undergraduate Education between China and USA. *Information of Medical Equipment* (4): 1-4 2.
- Ruilova, M., Hernández, A** (2014) Evaluación de residuos agrícolas para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 2014, vol. 48, no. 1 (enero-abril), pp. 54- 59

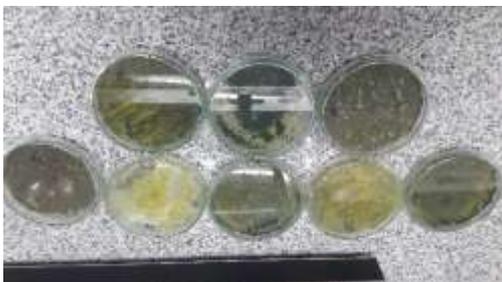
- Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, Declereq D, Coosemans J, Inson H, Swings J.** (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol.* 53:349-410
- Sadhu S, Maiti TK.** (2013). Cellulase production by bacteria: a review. *Br Microbiol Res J.* 3:235-58.
- Salinas C. E., Gasca Q. V.** (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*, 157, 75-82. doi: 32512739009
- Salinas E; Gasca V.** (2016). Los biocombustibles. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32512739009>
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, A.T., Martínez, M.J.** (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7500-7506.
- San, M., & Marín, M.** (2009). *Microbiología Ambiental*. Obtenido de Líquenes: <http://www.ugr.es/~cjl/liquenes.pdf>
- Sanz A.** (2019). Recuperado de: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>
- SIAP.** (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. Recuperado de: <http://www.siap.gob.mx>
- Solorzano S.** (2015). Laboratorio de Microbiología. Universidad Técnica de Machala. Recuperado de: <file:///C:/Users/ACER/Downloads/27%20LABORATORIO%20DE%20MICROBIOLOGIA.pdf>
- Song, M., An, Q., Zhang, W., Wang, Z. y Wu, J.** (2012). Environmental efficiency evaluation based on data envelopment analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(7), 4465–4469.
- Suárez-machín, C., Garrido-carralero, N. A., & Guevara-rodríguez, C. A.** (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica*, 10. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

- Sukumaran RK, Singhania RR, Pandey A.** (2005). Microbial cellulase production, applications and challenges. *J Sci Ind Res.* 64:832-44.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I.,** 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744-4753.
- UCR.** (2018) Analisis Proximal. Recuoerado de: <http://www.editorial.ucr.ac.cr/ciencias-naturales-y-exactas/item/1644-analisis-proximal-de-alimentos-serie-quimica.html>
- UNAM** (2008), Fundamentos y tecnicas de analisis de alimentos. Mexico. Recuperado http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf
- United States Department of Energy,** (2006). *Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol.* USDE, Rockville.
- Urresta, J.,** (2014). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012330332014000200008
- Velázquez Martí, B.** (2017). Aprovechamiento de la biomasa para uso energético. 2ª Ed Reverté-UPV. Barcelona-Valencia.
- Ventorino V, Aliberti A, Faraco V, Robertillo A, Giacobbe S, Ercolini D, Amore A, Fagnano M, Pepe O.** (2015). Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomass degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci Rep.* 5:8161
- Wan, C., Li, Y.** (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Advances.* doi.10.1016/j.biotechadv.2012.03.003
- Wang, K., Wei, Y. M. y Zhang, X.** (2012). Ancomparative analysis of China's regio- nalnenergy and emissionperformance: Which is the better way to deal with undesirable outputs? *Energy Policy,* 46,574–584
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q.** (2015). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 29-36.

Yacobucci, B. D. (2010). Intermediate-Level Blends of Ethanol in Gasoline, and the Ethanol “Blend Wall”. Congressional Research Service. <http://fas.org/sgp/crs/misc/R40445.pdf>

ANEXOS

Anexo A. Recolección de Cepas Fúngicas Nativas y Biomasa Residual Agrícola



Anexo B. Análisis Físico, Químico de Muestras.



Anexo C. Análisis Físico, Químico de Muestras.



Anexo D. Hidrólisis Enzimática



Anexo E. Esterilización y Fermentación de Muestras.



Anexo F. Destilación y Rectificación



Anexo G. Proceso en General





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 23 / 06 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>María Elena Ronquillo Ponce</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
<i>Instituto de Postgrado y Educación Continua</i>
Título a optar: <i>Magister en Ingeniería Química Aplicada</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.</i>

**LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**

Formado digitalmente por LUIS
ALBERTO CAMINOS VARGAS
Borrador de reconocimiento
ID# 2042, LUCHANARA,
Identificación: 0202780076,
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Fecha: 2021.06.23 16:00:06
-0100'



0079-DBRAI-UPT-IPEC-2021