

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

Producción y análisis de bioetanol fabricado a partir de la fermentación de los residuos provenientes de la explosión de vapor de las hojas maduras y cogollos de la caña de azúcar, previamente hidrolizados con enzima

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Químico

Autores:

Daniel Paúl Robles Ortega

Alexander Sebastián Salamea Cárdenas

Director:

Jorge Washington Delgado Noboa

ORCID:  0000-0002-4765-8868

Cuenca, Ecuador

2023-10-27

Resumen

La caña de azúcar es un monocultivo que se da en el territorio ecuatoriano a gran escala y que cuando se utiliza en la industria azucarera, genera residuos como los cogollos y hojas, las cuales son generalmente considerados como desechos. Sin embargo, estos residuos agroindustriales pueden convertirse en materia prima para ser aprovechados en los procesos de producción de biocombustibles. Este es el caso de la generación de bioetanol. En este trabajo, para aprovechar los residuos primero se partió del pretratamiento de la biomasa a través del proceso de explosión de vapor, el pretratamiento se realizó a temperaturas de 150, 155, 165 y 180 °C por 1 s y 10 min de tiempo de residencia. Dicho proceso produce un líquido residual rico en productos de la degradación de celulosa y hemicelulosa. Estos productos fueron hidrolizados por 72 h en un reactor, a dos temperaturas (45 y 50 °C) y velocidad de agitado (50 y 200 rpm), en presencia de celulasa y B-glucosidasa, (enzimas que rompen los enlaces entre los monosacáridos para obtener azúcares capaces de ser fermentados en un biorreactor a distintas condiciones de temperatura (25-35 °C)). Los azúcares resultantes fueron cuantificados con el método de Dubois (fenol-sulfúrico). Para la mejor condición evaluada se obtuvo un aumento de 71.7 g/L de azúcares, con respecto a la concentración inicial de la hidrólisis (50 °C, 200 rpm, enzima Cellic Ctec 2) que empleó los líquidos de explosión por vapor a 180 °C por 10 minutos, con tres recirculaciones. El líquido rico en azúcares fue luego usado para producir etanol, el mismo que se cuantificó utilizando el método de destilado y el método del picnómetro, obteniendo una concentración de 87 g/L.

Palabras clave: biocombustible, residuos agroindustriales, cuantificación de azúcares, proceso de producción



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no comprende el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad de la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio institucional : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Sugar cane is a monoculture that occurs in Ecuador on a large scale and when used in the sugar industry, it generates residues such as buds and leaves, which are generally considered as waste. However, these agro-industrial wastes can be converted into feedstock for biofuel production processes. This is the case with the generation of bioethanol. In this work, in order to take advantage of the residues, we first started from the pretreatment of the biomass through the process of steam explosion, the pretreatment was carried out at temperatures of 150, 155, 165 and 180 °C for 1 s and 10 min of residence time. This process produces a residual liquid rich in degradation products of cellulose and hemicellulose. These products were hydrolyzed for 72 h in a reactor, at two temperatures (45 and 50 °C) and agitation speed (50 and 200 rpm), in the presence of cellulase and B-glucosidase, (enzymes that break the bonds between the monosaccharides to obtain sugars capable of being fermented in a bioreactor at different temperature conditions (25-35 °C)). The resulting sugars were quantified using the Dubois method (phenol-sulfuric). For the best condition evaluated, an increase of 71. 7 g/L of sugars was obtained, with respect to the initial concentration of hydrolysis (50 °C, 200 rpm, enzyme Cellic Ctec 2) which used the vapour explosion liquids at 180 °C for 10 minutes, with three recirculations. The sugar-rich liquid was then used to produce ethanol, which was quantified using the distillation method and the pycnometer method, obtaining a concentration of 87 g/L.

Keywords: biofuel, agroindustrial waste, sugars quantification, production process



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not understand the institutional thinking of the University of Cuenca nor does it reveal its responsibility towards third parties. The authors assume responsibility for intellectual property and copyright.

Institutional Repository : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Dedicatoria	9
Capítulo 1: Introducción	11
1.1. Combustibles fósiles.....	11
1.2. Etanol como combustible alternativo	11
1.3. Biomasa para biocombustibles.....	12
1.4. Residuos de la caña de azúcar en los ingenios.....	13
1.5. Aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos para obtener bioetanol	14
1.6. Objetivos del trabajo	15
1.6.1 Objetivos Específicos	15
Capítulo 2: Marco teórico.....	17
2.1. Generación de bioetanol.....	17
2.2. Métodos de pretratamiento de biomasa.....	17
2.2.1. Métodos más utilizados para tratar biomasa lignocelulósica	18
2.2.2. Explosión de vapor como pretratamiento de biomasa lignocelulósica	19
2.3. Hidrólisis enzimática	20
2.3.1. Compuestos de la estructura vegetal de la biomasa lignocelulósica	21
2.4. Métodos de cuantificación de azúcares.....	21
2.4.1 Método de Dubois para cuantificar azúcares.....	23
2.5. Fermentación alcohólica	23
2.6. Método de micro difusión para cuantificar alcohol (método Winnick).....	24
2.7. Método de destilación simple	25
2.8. Método del picnómetro para determinación de densidades	26
Capítulo 3: Metodología.....	28
3.1. Recolección del sustrato	28
3.2. Explosión de vapor del sustrato.....	28
3.3. Hidrólisis enzimática ácida.....	32
3.3.1. Preparación del buffer para hidrólisis.....	32
3.3.2. Hidrólisis enzimática ácida del residuo sólido o líquido de la explosión de vapor	32
3.3.2.1. Hidrólisis 1: Sólido residual de explosión de vapor a 180 oC.....	33
3.3.2.2. Hidrólisis 2: Sólido residual de explosión de vapor a 180 oC.....	34
3.3.2.3. Hidrólisis 3: Líquido residual de explosión de vapor a 180 oC.....	34
3.3.2.4. Hidrólisis 4: Líquido residual de explosión de vapor a 165 oC.....	35
3.3.2.5. Hidrólisis 5: Líquido residual de explosión de vapor a 180 oC con recirculación.	35

3.4. Cuantificación de azúcares.....	35
3.5. Fermentación.....	36
3.6. Cuantificación de etanol por micro difusión.....	37
3.7. Método de destilación simple	40
3.8. Método del picnómetro para determinar densidad de líquidos.	41
Capítulo IV: Resultados y cálculos	42
4.1. Sustrato recolectado de la molienda	42
4.2. Residuos recolectados de la explosión de vapor a distintas temperaturas.....	42
4.2.1. Explosión de vapor a 180 oC	42
4.2.2. Explosión de vapor a 165 oC	43
4.2.3. Explosión de vapor a 155 oC	44
4.2.4. Explosión de vapor a 180 oC con recirculación.....	44
4.3. Cuantificación de azúcares.....	44
4.3.1. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 1.....	44
4.3.2. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 2.....	46
4.3.3. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 3.....	48
4.3.4. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 4.....	50
4.3.5. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 5.....	51
4.4. Análisis experimental para la hidrólisis enzimática ácida	53
4.4.1. Factores de estudio: enzima utilizada.....	53
4.4.2. Factor de estudio: Estado físico del sustrato	55
4.5.3. Factor de estudio: Temperatura del pretratamiento	56
4.4.4. Factor de estudio: Número de recirculaciones	58
4.5. Cuantificación de azúcares en las muestras tomadas durante la fermentación.....	60
4.6. Cuantificación de alcohol: método de micro difusión.....	61
4.7. Cuantificación de etanol: Destilación simple y método del picnómetro	63
Capítulo 5. Discusiones.....	64
5.1.-Discusión resultados explosión con vapor.....	64
5.2. Discusión de los resultados de la hidrólisis	65
5.3. Discusión de resultados fermentación	66
5.3. Discusión de resultados de cuantificación de etanol	68
Capítulo 6. Conclusiones	69
6.1.-Conclusión resultados explosión de vapor	69
6.2.- Conclusión proceso de cuantificación de azúcares y ANOVA.....	69
6.3.- Conclusión obtención y cuantificación de bioetanol.....	70
Referencias	71

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de un equipo de destilación simple para separar una mezcla de dos componentes con distintos puntos de ebullición (Santana, 2010)	26
Figura 2. Tabla de Windisch utilizada para conocer la cantidad de alcohol (Espinosa et al., 2010).....	27
Figura 3. Zona destinada para muestreo, vista satelital. La zona delimitada con línea roja fue el área de muestreo para la recolección de las hojas maduras de la caña de azúcar...	28
Figura 4. Equipo para explosión de vapor utilizado para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Marca PG-WOOD Elecon.....	30
Figura 5. Diagrama para realizar recirculaciones en el equipo de explosión de vapor	31
Figura 6. Fotografía de la pantalla mostrando las condiciones de operación y de tiempo real, usada en todas las hidrólisis realizadas	34
Figura 7. Espectrofotómetro UV-visible para cuantificación de azúcares totales (Método de Dubois)	36
Figura 8. Biorreactor tipo Batch Biotron GX utilizado durante la hidrólisis enzimática ácida y la fermentación para obtención de bioetanol	37
Figura 9. Titulación del procedimiento: método de Winnick, titulando yodo liberado proporcional a la cantidad de etanol en la muestra	39
Figura 10. Hojas, tallos y cogollos secos, de caña de azúcar, recolectados de la molienda “D’ Abad”	42
Figura 11. a) Residuo sólido húmedo obtenido de la explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos, b) Residuo líquido y c) Residuo sólido seco después de secado en mufla a 80 °C por 24 h, con fibras visibles y aglomeradas.....	43
Figura 12. Residuo sólido obtenido de la explosión de vapor a 165 °C por 10 minutos y b) Residuo líquido obtenido del mismo proceso	43
Figura 13. Residuo líquido obtenido mediante recirculación con vapor a 180 °C	44
Figura 14. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 1	46
Figura 15. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 2	48
Figura 16. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 3	50
Figura 17. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 4	51
Figura 18. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 5	53
Figura 19. Evolución gráfica de la concentración de azúcares durante la fermentación de la hidrólisis 5.....	61

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones para los pretratamientos realizados en la explosión de vapor.....	29
Tabla 2. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 1	45
Tabla 3. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 1.....	46
Tabla 4. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 2	47
Tabla 5. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 2.....	47
Tabla 6. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 3	48
Tabla 7. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 3.....	49
Tabla 8. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 4	50
Tabla 9. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 4.....	51
Tabla 10. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 5	52
Tabla 11. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 5.....	52
Tabla 12. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 1 y 2.....	53
Tabla 13. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 1 y 2	54
Tabla 14. Análisis ANOVA de un factor: Enzima.....	54
Tabla 15. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 2 y 3.....	55
Tabla 16. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 2 y 3	55
Tabla 17. Análisis ANOVA de un factor: Estado físico del sustrato.....	56
Tabla 18. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 3 y 4.....	57
Tabla 19. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 3 y 4	57
Tabla 20. Análisis ANOVA de un factor: Temperatura de severidad.....	58
Tabla 21. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 3 y 5.....	59
Tabla 22. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 3 y 5	59
Tabla 23. Análisis ANOVA de un factor: Número de recirculaciones en el pretratamiento.....	59
Tabla 24. Concentración de azúcares en el sustrato durante la fermentación de la hidrólisis 5.....	60
Tabla 25. Volúmenes de titulación para cada muestra.....	62

Tabla 26. Etanol cuantificado	62
Tabla 27. Volúmenes de titulación para cada muestra	62
Tabla 28. Etanol cuantificado	62
Tabla 29. Tabla de pesos y densidades del método del picnómetro	63

Dedicatoria

El trabajo realizado va dedicado para el Doctor Wilson Oswaldo Robles Robles y la Tecnóloga Gloria Marina Ortega Ramírez, padres cuyo esfuerzo por educar a sus hijos y brindarles la oportunidad de demostrar su valía ahora es correspondido por su hijo Daniel Paúl Robles Ortega. Agradezco también a todos aquellos miembros de mi familia, amigos y relativos que me apoyaron durante todo el proceso. Agradezco a Ariel Calvopiña por su constante apoyo durante los últimos ciclos de mi carrera y por la entrega incondicional de su amor y cariño. Gracias por todo.

Daniel Robles

Agradezco a toda mi familia en especial a mis padres Ing. René Salamea e Ing. Romelia Cárdenas quienes me permitieron descubrir el mundo de la ingeniería y se esfuerzan por brindarme siempre los recursos necesarios para culminar con éxito toda etapa académica y profesional en mi vida, así como el apoyo moral para alcanzar el grado de Ingeniero Químico. Además, un especial reconocimiento a mi hermano Ing. Adrián Salamea fuente de inspiración y motivación. También, es justo y necesario dedicar este trabajo de titulación a mi abuela y tías quienes siempre estuvieron presentes y pendientes en todo el proceso universitario. Finalmente, a todas las amistades y personas que supieron apoyarme en distintos momentos para alcanzar este objetivo.

Alexander Salamea

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado como parte del proyecto “*Aprovechamiento de desechos lignocelulósicos agroindustriales y materiales poliméricos de reciclaje para la producción de compósitos plástico-madera y bioetanol*”, llevado a cabo entre la Universidad de Cuenca (Proyecto No. DIUC2020_014_UPS_PELAEZ_RAUL) y la Universidad Politécnica Salesiana (Proyecto No. 009-008-2021-11-11). Dejamos constancia de nuestro agradecimiento al director del proyecto (Dr. Raúl Peláez Samaniego) y los investigadores del mismo.

A nuestro docente y tutor, Dr. Jorge Delgado Noboa, quien nos ha motivado e inspirado en todo el proceso universitario. Siempre estaremos agradecidos con su guía, gestión y liderazgo.

A la Universidad Politécnica Salesiana, en especial al Dr. Jorge Fajardo Seminario y al Ing. Cesar Paltán, por abrirnos las puertas a los laboratorios y guiarnos en el trabajo experimental relacionado con los procesos de explosión por vapor.

Capítulo 1: Introducción

1.1. Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles son una fuente de energía generada a partir de la descomposición de materia orgánica hace millones de años. A esta categoría pertenecen el petróleo, gas natural y el carbón. Según datos de las Naciones Unidas, estos combustibles representan el 80% del consumo energético a nivel mundial. Con la llegada de la revolución industrial en el siglo XIX empezó el auge del uso del carbón y del diésel, pero en el año de 1973 empezó la crisis del petróleo debido a conflictos sociopolíticos y económicos, lo que causó un incremento en el costo de estas fuentes energéticas y los países con escasos recursos se vieron afectados porque toda su fuerza industrial dependía directamente de estos combustibles (Abas et al., 2015).

Entre las principales desventajas del uso de combustibles fósiles se encuentra el aumento del efecto invernadero, provocado por la emisión de dióxido de carbono. Además, en el proceso de combustión se generan óxidos de azufre y óxido de nitrógeno los cuales, al reaccionar con los gases de la atmósfera, producen precipitación ácida. El sector energético es responsable aproximadamente del 75% de las emisiones del efecto invernadero (Silva, 2020). Por lo que, dentro de ese porcentaje, los combustibles fósiles representan más del 85% de emisiones de nitratos, metano, dióxido de azufre, entre otros (Paraschiv et al., 2020).

Se requiere de acciones alineadas a las políticas que permitan mitigar los efectos ambientales negativos mencionados, con el objetivo de que en el 2050 sean reducidas las emisiones en un 51%. Es decir, una disminución de 169.44 millones de toneladas de gases de efecto invernadero (González & Spicio, 2022). Con relación a las emisiones de metano, se estiman que corresponden a 110 millones de toneladas al año. Este valor es resultado solo de la industria de producción y manufactura, debido a que el metano es el principal componente del gas natural; sin embargo, alrededor de un 8% de la producción de gas natural se pierde por fugas de metano hacia la atmósfera. Ningún proceso de combustión es eficiente al 100%, además de que existen fugas de metano, lo que aumenta las emisiones en sistemas energéticos a base de combustibles fósiles (Casco et al., 2022).

1.2. Etanol como combustible alternativo

El etanol es un producto químico orgánico generado por la oxidación de la glucosa con capacidad de funcionar como combustible para generar electricidad (combustión térmica), combustible para celdas por medio de reacción termoquímica y para sistemas de cogeneración. También se puede destacar sus aplicaciones para motores de combustión (cuando se mezcla con gasolina), por ejemplo, como oxigenante (Ortiz, 2017). El etanol también es utilizado en la industria para el transporte, este se mezcla con gasolina para incrementar el octanaje del combustible. Así se disminuye la emisión de monóxido de carbono, óxidos de azufre, carcinógenos e hidrocarburos sin quemar (Ortiz, 2017).

Además, el costo de la materia prima para generar etanol es bajo con respecto al costo de producción de combustibles tradicionales, desde este punto de vista, el etanol es la forma más económica de combustible. Sin embargo, el costo de producción también depende de otros factores como la tecnología o proceso utilizado. Lo más importante es contar con gran cantidad de biomasa obtenida a partir de residuos agroindustriales como por ejemplo del maíz, de la caña de azúcar, de la remolacha, o de otros productos agroindustriales. Entonces, el generar este combustible permite mejorar la economía del sector industrial al reducir las importaciones de combustible de carácter fósil (Aguilar, 2007).

1.3. Biomasa para biocombustibles.

La biomasa es una alternativa para la generación de combustibles debido a que la mayoría de residuos orgánicos y estiércol se consideran como una fuente importante de energía. La biomasa es una fuente de energía renovable. Esta energía se obtiene rompiendo los enlaces de los compuestos orgánicos, ya sea por combustión directa de biomasa o por la combustión de productos obtenidos con transformaciones fisicoquímicas que dan dióxido de carbono y agua como subproducto (Popa, 2018).

La biomasa posee características energéticas como su composición química porque dentro de la estructura se encuentran compuestos orgánicos, los cuales tienen elementos como carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. La biomasa se caracteriza por el contenido de humedad que se define como la relación de la masa de agua que tiene un kilogramo de biomasa. El poder calorífico de la biomasa depende directamente de la composición de esta y el contenido de humedad define si el poder calorífico de la biomasa es superior o inferior. Para trabajar con biomasa, la condición fundamental es que el contenido de humedad sea inferior al 30% para evitar realizar operaciones de acondicionamiento o pretratamiento como secado (Kheang, 2016).

Las ventajas del uso de biomasa es que permiten disminuir las emisiones de CO₂ en comparación a los combustibles fósiles, no existen contaminantes sulfurados o

nitrogenados. Permiten disminuir los residuos agroindustriales gracias a su reciclaje para la generación de biocombustibles y también permite evitar la erosión en los suelos si es que se procede a sembrar cultivos energéticos en suelos abandonados (Romanelli et al., 2016).

Existen desventajas como el menor rendimiento energético al compararlo con otros combustibles, se requieren procesos de acondicionamiento para utilizarlo. Para la producción de biocombustibles se requiere 2 tipos de biomasa dependiendo del motor para el que va a funcionar. Los residuos o cultivos que dentro de su estructura tiene gran cantidad de azúcares como la remolacha, caña de azúcar, maíz, batata y trigo son la principal materia prima para los biocombustibles de primera y segunda generación (Faba & Ordoñez, 2014).

1.4. Residuos de la caña de azúcar en los ingenios

El azúcar es un ingrediente básico para la elaboración de alimentos y bebidas, por lo que su industria ha trabajado de manera ininterrumpida desde su establecimiento en el siglo XVI. Esta producción se considera agroindustrial, ya que es dependiente del cultivo de la caña de azúcar. Los residuos generados, como hojas o tallos secos de cultivos energéticos en las distintas etapas del proceso es una problemática a nivel mundial debido a su impacto ambiental. Sin embargo, la ventaja de estos residuos es que pueden ser fuente de generación de biocombustibles, energía eléctrica y calorífica (Díaz, 2008; Muñoz, 2019).

Algunos residuos como hojas, vinazas y cogollos de los cultivos energéticos y de los procesos de producción agroindustriales respectivos afectan a los ecosistemas y comunidades aledaños a la localización de esta industria. Específicamente, en el terreno aledaño a los ingenios azucareros los residuos tienen un efecto negativo cuando se da el vertido de residuos al medio. Esta biomasa requiere ser aprovechada para convertirla en productos útiles y de valor agregado que solucione necesidades y para generar recursos económicos.

En general, los residuos de esta industria son enfocados en la investigación para la elaboración de abonos orgánicos, energías renovables y biocombustibles (Ramos et al., 2022). Para lograr esto, es necesario implementar un proceso tecnológico alternativo con pretratamientos, como la hidrólisis enzimática, que permitan facilitar la generación de este tipo de combustibles. El objetivo de estos procesos es aprovechar al máximo los cultivos energéticos. En el Ecuador los datos estimados hasta el 2018 indican que se generan aproximadamente 2.2 millones de toneladas anuales de residuos de tipo agroindustrial, como hojas y cogollos, los cuales son desechos que dentro de su estructura contienen compuestos

lignocelulósicos importantes para fabricar productos biotecnológicos e innovadores (Aguilar et al., 2022).

Según el INEC, en nuestro país, la producción de caña de azúcar en el año 2021 fue de 11.4 millones de toneladas métricas de caña de azúcar, destinados principalmente para los ingenios azucareros, que utilizan el 90% de la producción nacional (INEC, 2021). La biomasa obtenida como subproducto de la industria azucarera es la mayor fuente de materia prima para nuestro estudio. Aproximadamente el 28 % de una tonelada de caña fresca son hojas y cogollos, los cuales requieren ser estudiados con fines energéticos para la producción de combustible (Coronel, 2020).

En el año 2021, en el Ecuador, la superficie destinada para el cultivo de caña de azúcar para la producción de azúcar fue de aproximadamente 130 mil hectáreas. La característica física más destacable de este monocultivo es la cantidad de follaje y para evitarlo se realiza su respectiva incineración lo que elimina gran cantidad de biomasa producida; es decir, un 30% de la estructura de la planta que incluye puntas, cogollos y hojas (Guerrero, 2017). Como un ejemplo de la cantidad de biomasa que se puede aprovechar, en el ingenio Veracruz (en Mexico), durante cada zafra se pueden producir de 50 a 100 toneladas por hectárea de residuos que podrían ser aprovechados con fines energéticos (Mora, 2015).

1.5. Aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos para obtener bioetanol

Se emplean distintos métodos para la obtención de biocombustibles, en dependencia de si son considerados como de primera, segunda o tercera generación. En el caso de los combustibles de primera generación en donde se usa biomasa rica en azúcares se utiliza la fermentación, en el caso que la biomasa tenga gran cantidad de grasa se usa el proceso de transesterificación, donde se combinan los lípidos con alcohol para generar biodiesel (Callejas & Quezada, 2009).

En relación a los biocombustibles de segunda generación, estos parten del uso de biomasa rica en celulosa, hemicelulosa y lignina (principalmente residuos agroindustriales) que en la actualidad tienen un uso muy bajo o son considerados residuos de poco valor. Luego, mediante procesos mecánicos, seguidos de procesos termoquímicos o enzimáticos, se rompe la estructura lignocelulósica, principalmente para hacer que la biomasa sea menos recalcitrante al efecto de enzimas que se emplean para producir azúcares.. Estos azúcares son luego sometidos a un posterior proceso fermentativo para producir etanol, o para otras aplicaciones, incluyendo la producción de químicos. La tecnología más utilizada para obtener bioetanol es la fermentación (Serrano & De Sotomayor, 2011). Los biocombustibles de tercera

generación son obtenidos en la biomasa presente en el agua, como son las algas marinas, y se dan procesos que incluye la fermentación de los carbohidratos de su estructura. (Montero de la Cruz, 2017).

En la industria de la caña de azúcar se generan diferentes residuos y subproductos. Los residuos de la caña de azúcar en el proceso de corte de la misma son materiales que en la actualidad tienen muy poco uso y están constituidos principalmente por los tallos fibrosos y hojas. Estos residuos, dentro de su estructura, tienen aproximadamente 50% de celulosa, 25% de lignina y 25% de hemicelulosa (Estrada & Weber, 2022). La liberación de la celulosa y la hemicelulosa de esta estructura permitirá la producción de biocombustibles (específicamente etanol). Sin embargo, es necesario encontrar un método eficaz y económicamente viable para la producción de biocombustibles, considerando que estos son una fuente de energía renovable cuyo uso permitirá la reducción de emisiones de CO₂, en comparación al de los combustibles fósiles, y la no generación de residuos (Estrada & Weber, 2022).

El presente estudio busca aprovechar las hojas maduras y cogollos de la caña de azúcar para la producción de bioetanol. A través de un pretratamiento con vapor a relativamente altas temperaturas (en el rango de 155 a 180 °C) se consigue la ruptura de polímeros en la estructura vegetal de la biomasa. Mediante este pretratamiento se busca disminuir los niveles de lignina y liberar la celulosa y la hemicelulosa presentes en la estructura fibrosa de estos residuos. La lignina tiene una estructura resistente a la hidrólisis ácida. Por lo tanto, disminuir la presencia de lignina permite facilitar una posterior hidrólisis de los productos de la degradación termoquímica de la celulosa y la hemicelulosa, utilizando enzimas celulasa y B-glucosidasa, para obtener azúcares que se puedan fermentar en un biorreactor. Estos azúcares incluyen principalmente glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa, que son derivados de la celulosa y la hemicelulosa.

1.6. Objetivos del trabajo

Objetivos General.

El objetivo general de este trabajo es obtener bioetanol a partir de la hidrólisis y fermentación de los productos del proceso explosión de vapor de las hojas maduras y cogollos de la caña de azúcar.

1.6.1 Objetivos Específicos.

Para alcanzar el objetivo principal del trabajo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Obtener fibras y líquidos pretratados a partir de las hojas de caña de azúcar mediante el método de explosión con vapor, variando la temperatura y el tiempo de residencia en el reactor, con o sin recirculación de los líquidos.
- Realizar la hidrólisis de los productos sólidos y líquidos de la explosión con vapor, utilizando la enzima CTEC (celulasa y B-glucosidasa).
- Identificar las mejores condiciones (enzima, estado físico del residuo, temperatura de pretratamiento y número de recirculaciones) para obtener la mayor concentración de azúcares fermentables.
- Cuantificar los azúcares presentes en los productos de la hidrólisis enzimática de sólidos y líquidos.
- Producir y cuantificar bioetanol en condiciones de operación constantes.

Se espera que los resultados obtenidos permitan sugerir rutas para el aprovechamiento de las hojas y puntas de la caña de azúcar para la producción de azúcares, los mismos que pueden ser luego usados no solo para la producción de etanol, sino también de otros productos que requieren la disponibilidad de azúcares.

Capítulo 2: Marco teórico

2.1. Generación de bioetanol

Uno de los métodos para obtener el bioetanol es sintetizarlo bioquímicamente con el uso de levaduras, luego de haber generado un proceso de glucólisis. Es decir, que se puede obtener etanol a partir de cualquier carbohidrato, ya sea de productos sólidos o solubles de origen vegetal como la sacarosa o el almidón que se encuentran en los frutos y tubérculos. Estos cultivos se utilizan como materia prima para generar biocombustibles de primera generación (Velasco, 2020). Los biocombustibles de segunda generación son producidos, por ejemplo, a partir de los residuos agroindustriales lignocelulósicos. Este el caso del etanol que se obtiene de los carbohidratos complejos como la hemicelulosa y la celulosa que se encuentran en las hojas, aserrín y residuos agrícolas de cultivos que no son utilizados directamente para la generación de combustibles (Luzardo et al., 2022).

La materia prima para generar etanol de primera generación se puede clasificar en 4 grupos.

- Cultivos energéticos
- Tubérculos
- Residuos agroindustriales
- Extracción de la pulpa y jugos frutales

Todas estas biomásas, como materia prima, se ha utilizado desde épocas milenarias en la fermentación de los jugos de tipo frutal utilizando la destilación fraccionada. En el caso de jugos vegetales a partir de la caña de azúcar y remolacha, estos son simples de fermentar debido a que contienen gran cantidad de carbohidratos, azúcares, almidón y celulosa. Finalmente, la materia prima proveniente de la industria; es decir, los residuos agroindustriales resultan ser los más complejos debido a que se requiere destruir la estructura de los carbohidratos complejos como la lignina (Zamora et al., 2014).

2.2. Métodos de pretratamiento de biomasa.

La biomasa lignocelulósica está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina y pequeñas cantidades de minerales en forma de sales. La lignina se encuentra distribuida a lo largo de la pared celular y la concentración máxima está en la lámina media de las células de la biomasa. Entonces, la complejidad de esta estructura genera una limitación que significa la rotura del complejo de lignina con la celulosa e inclusive la hemicelulosa (Gandara et al., 2017).

Los métodos más comunes para degradar y remover la lignina de la estructura celular, buscan aislarla con procesos mecánicos y químicos. Los mecánicos son aquellos que usan modelos de solubilización dejando a la lignina como un componente insoluble y en los químicos ocurre lo contrario donde la celulosa y hemicelulosa son insolubles. Debido a que la lignina se encuentra en diferentes proporciones en función del tipo de biomasa, no existe un método cuantitativo para aislar este componente y por ende siempre se la va a modificar estructuralmente (Bauer et al., 2012).

2.2.1. Métodos más utilizados para tratar biomasa lignocelulósica

Los métodos tradicionales para el tratamiento de la biomasa incluyen a) la extracción de manera acuosa con un rendimiento del 20%, b) disolución en medio alcalino de fibras el cual es válido para ligninas de bajo peso molecular, y c) técnica de hidrólisis de los carbohidratos de la madera con un rendimiento del 95% pero contiene carbohidratos residuales (Chávez & Domine, 2013). Existen varios métodos de pretratamiento de biomasa, entre ellos se destaca el pretratamiento químico y pretratamiento termoquímico. El pretratamiento químico permite fragmentar los biopolímeros usando reactivos químicos a presión y a temperatura ambiente. Otro método usado es el pretratamiento tipo ácido usando ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido clorhídrico. También, se utiliza el pretratamiento alcalino usando sales de hidróxido de potasio y peróxido de hidrógeno para eliminar el grupo acetil en la hemicelulosa y así tener accesibilidad a la celulosa (Velasco, 2020).

Dentro de los métodos de pretratamiento termoquímico, la explosión con vapor se considera como un método eficiente y rentable para trabajar con la biomasa lignocelulósica debido a que no se trabaja con algún tipo de reactivo o químico que funcione como catalizador. En este proceso se emplea únicamente agua. El proceso empieza con calentar la biomasa a altas temperaturas y presiones, se prepara la biomasa con el agua en distintas proporciones (por ejemplo 100 g de biomasa seca por 1 L). Una vez alcanzada la temperatura predeterminada, normalmente en un rango de 150 a 200 °C y pasado el tiempo de tratamiento, se provoca una explosión que genera una ruptura mecánica en la estructura de la biomasa. Esta explosión es causada por la presión generada por el vapor de agua que al terminar el tratamiento se libera a un contenedor de mayor volumen.

La explosión de vapor es una técnica que permite auto hidrolizar la hemicelulosa mediante la descompresión instantánea para que la lignina se elimine o se redistribuya parcialmente en toda la matriz vegetal y así mejorar la accesibilidad a la celulosa, dando como resultado la recuperación significativa de azúcares o productos de degradación de celulosa y

hemicelulosa que pueden ser fácilmente hidrolizados usando enzimas (Hazel et al., 2023). En la explosión de vapor es importante considerar variables como la temperatura, tamaño, espesor de la fibra, contenido de humedad y tiempo promedio de explosión. El tratamiento es más efectivo cuando el tamaño de la biomasa es pequeño porque el calentamiento es más homogéneo. El contenido de humedad se encuentra relacionada con la retención de vapor de agua en los espacios porosos de la biomasa lignocelulósica y su capacidad higroscópica (Estrada et al., 2022). La explosión de vapor fue utilizada en el desarrollo del presente trabajo.

2.2.2. Explosión de vapor como pretratamiento de biomasa lignocelulósica

El pretratamiento por de explosión de vapor permite aumentar el rendimiento del azúcar para futuros procesos como la hidrólisis, debido a que mejora el acceso a la celulosa (Horn et al., 2011). Es un método que fue descubierto y patentado por Manson, en el año de 1926, con el fin de producir tableros de madera. La combinación del efecto hidrolítico con la descomposición mecánica de la fibra lignocelulósica inyectando vapor a presión al sustrato resulta en el aumento de la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la celulosa (Negro et al., 1990).

La explosión de vapor es un proceso tecnológico que permite deconstruir toda la estructura de la pared celular vegetal para fraccionar los componentes de la biomasa. Este proceso fue utilizado dentro de la industria del papel y en el tratamiento de subproductos agrícolas, alimentos procesados para animales, y en el pretratamiento de hierbas medicinales. Sin embargo, también se ha estudiado y utilizado para obtener biomasa baja en lignina para múltiples procesos de bioenergía (Yu et al., 2022). Este proceso para obtener biomasa baja en lignina es considerado como un proceso fisicoquímico que actúa en 2 etapas, a partir de la hidrólisis a base de ácido y la degradación térmica, respectivamente.

El vapor generado penetra los materiales para causar esta hidrólisis ácida y degradación de la matriz, rompiendo los enlaces internos de la estructura de la fibra. Respecto a la segunda etapa en la explosión mecánica el vapor saturado con alta presión se libera en un contenedor, con un volumen hasta diez veces mayor, de modo instantáneo. El resultado es un sólido y un líquido ricos en polisacáridos conteniendo lignina degradada que ya no interfiere de manera significativa en el proceso posterior de hidrólisis enzimática. Finalmente, este proceso tiene la ventaja de modificar las propiedades fisicoquímicas y las composiciones químicas de las materias primas, sin agregar productos químicos y catalizadores, convirtiéndose en un proceso de baja contaminación, bajo costo y de factibilidad a nivel industrial (Wang et al., 2023).

2.3. Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática es un proceso químico muy utilizado para simplificar moléculas complejas como los polisacáridos. Para la biomasa lignocelulósica, el proceso es realizado por un conjunto de enzimas de tipo celulasas en medio ácido, las cuales son producidas a partir de los hongos, bacterias y protozoos. Estos tipos de enzimas hacen posible realizar una serie de reacciones hidrolíticas que permiten la degradación de la celulosa, ya sea de tipo cristalina o amorfa. La lignina es un limitante ya que la accesibilidad de las enzimas celulasas es compleja porque reduce la eficacia de la hidrólisis, por lo que es necesario separar la lignina de la celulosa y hemicelulosa. Los materiales lignocelulósicos requieren ser pretratados e hidrolizados con ácidos que permiten que los hidratos de carbono sean accesibles para los microorganismos.

Para la hidrólisis se requiere de un catalizador o medio ácido para hidrolizar químicamente la celulosa porque este es un polímero compuesto por monómeros glucopiranosil con enlaces de tipo glucosídico, los cuales se pueden romper en un medio ácido. Luego de este proceso requieren ser combinados con procesos fermentativos para transformar los azúcares en productos secundarios (De la Rosa, 2015). Una enzima comercial ampliamente utilizada es el conjunto Cellic CTEC 2 que dentro de su estructura tiene celulasas, B-glucosidasa y hemicelulasa, lo que permite la degradación de celulosa a azúcares que pueden ser fermentables; la característica de esta enzima comercial es que su campo de aplicación permite usarse en toda biomasa lignocelulósica pretratada (Rodriges et al., 2015).

Las reacciones enzimáticas para la operación de despolimerizar materiales de tipo lignocelulósicos están dirigidas por acciones de una serie de enzimas activas de carbohidratos considerados CAZymes, los cuales están formados por hidrolasas de glucósido (GH), polisacáridos de liasas (PL) y otras actividades auxiliares (Shi et al., 2023). La hidrólisis enzimática principalmente descompone la celulosa y hemicelulosa en azúcares y estos se liberan rompiendo la cadena de carbohidratos antes de que se fermentan para producir bioetanol (Estrada & Weber, 2022).

Las variables que afectan a este proceso son la composición y estructura del sustrato, así como la carga enzimática, temperatura y pH. Por lo tanto, para descomponer las cadenas poliméricas en azúcares simples se requieren pretratamientos para que el proceso sea viable. El pretratamiento puede ser de procesos físicos, químicos y biológicos, así como una combinación con los mecánicos. Los pretratamientos que son mecánicos hacen que la

celulosa presente en la estructura sea accesible. Dentro de las modificaciones mecánicas estas aumentan el área superficial y altera la morfología de la fibra (González et al., 2023)

La hidrólisis enzimática, también considerada como sacarificación de biomasa, convierte la celulosa en glucosa y/o la hemicelulosa en componentes orgánicos como la xilosa. Para cada conjunto enzimático se utiliza un grupo de enzimas con diferentes tipos de celulasas como las Endo celulasas, B-glucosidasa, celobiohidrolasas (Álvaro et al., 2022).

2.3.1. Compuestos de la estructura vegetal de la biomasa lignocelulósica.

La lignina es un polímero complejo formado por alcoholes fenilpropílicos y ácidos que se encuentra dentro de la estructura de la pared celular de los vegetales. Es la responsable de generar resistencia a la degradación de la biomasa por microorganismos enzimáticos, otorgando protección física a la celulosa y hemicelulosa. Con el fin de generar su degradación se requiere usar enzimas de carácter oxidasas y peroxidasas que rompen la estructura de la molécula y así permiten catalizar la degradación de lignina (Orozco et al., 2015).

La celulosa es un compuesto polisacárido sintetizado naturalmente por la mayoría de las plantas y se encuentra dentro de su estructura en un porcentaje de 35 a 50% del peso seco. La celulosa es un polisacárido formado por 8 moléculas de D-Glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos y 8 unidades de glucosa con unidades monoméricas. En este compuesto, para la liberación de carbohidratos simples se requiere realizar una hidrólisis enzimática con enzimas denominadas celulasas de la familia glicosil hidrolasas que permiten la ruptura del enlace glucosídico de los hidratos de carbono. El *Aspergillus Níger* es el microorganismo del cual se obtiene la enzima celulasa, necesaria para hidrolizar celulosa (Gutiérrez et al., 2015). La celulosa y la lignina están enlazadas por las cadenas de hemicelulosa. La hemicelulosa es un polisacárido que difiere de la celulosa por tener diferentes azúcares como la D-Xilosa, D-Manosa, D-arabinosa y D-glucosa compuestos quirales con cadena de ramificación amorfa que incluyen un grado de polimerización de hasta 200 unidades de azúcar (Da silva et al., 2013).

2.4. Métodos de cuantificación de azúcares.

La cuantificación de azúcares permite dar un seguimiento y control de proceso en el desarrollo tanto de la hidrólisis como de la fermentación. Para esto existen varios métodos cuyo objetivo es determinar la cantidad de glucosa, maltosa, dextrosa, entre otras. Las técnicas usadas en

la gran mayoría de estudios son de carácter volumétrico, colorimétrico y cromatográfico (Marín Morales, 2008). El uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite separar los compuestos mediante la serie de interacciones que se dan entre la muestra a analizar y una fase estacionaria que se encuentra dentro del equipo. Los componentes de la muestra recorren la columna a distintas velocidades determinando así la cantidad de sacarosa, y azúcares reductores como la glucosa y fructosa. Es un método selectivo y de carácter específico que determina cada analito del azúcar por separado los cuales, al identificarlos, permiten determinar si existe la cantidad necesaria de azúcares para fermentarlos (Urbaneja et al., 1997).

Otro de los métodos es la espectroscopía infrarroja que permite que la radiación electromagnética mida las longitudes de onda en función de la absorción, dando como resultado un espectro específico para cada compuesto o analito. Se puede hacer mediciones de carácter cualitativo y cuantitativo, debido a que el haz de luz permite que las partículas sean directamente proporcionales a la distancia y concentración entre la zona visible y de la región del infrarrojo.

En relación con el uso de los espectrofotómetros IR se usan de 2 tipos: Espectroscopia Infrarroja de Reflectancia Media (MIR) y Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR). El tipo de espectrofotometría FTIR es más sensible y con alta resolución para ser más rápida en obtener datos, pero requiere utilizar la transformada matemática de Fourier para expresar los resultados. Este tipo de equipos son costosos y la interpretación de los espectros infrarrojos puede ser complicada y requerir experiencia en la identificación de bandas características. Por lo que, la prueba más accesible para una investigación en curso es la cuantificación de azúcares mediante el método de Dubois (Horvath, 1988). Este método requiere hacer diluciones de la muestra para que los resultados se encuentren dentro del rango del espectrofotómetro (488 nm a 492 nm) (Bonilla et al., 2019).

Para la cuantificación de azúcares se presentan algunos métodos como el de Miller, el cual es especialmente utilizado para determinar azúcares reductores. El método de Miller es colorimétrico, donde los azúcares se reducen al ácido 3,5-DinitroSalicílico apareciendo un color café amarillento. Esta coloración es medida con lecturas de espectrofotometría a una determinada longitud de onda. Otro método consiste con pruebas de cromatografía de alta resolución donde se consideran siete azúcares dentro de ellos la glucosa, fructosa, xilosa,

maltosa, sacarosa y arabinosa. Estos azúcares se identifican porque presentan picos en la fase móvil de concentración.

2.4.1 Método de Dubois para cuantificar azúcares

El método de Dubois es usado es un método colorimétrico que permite determinar los oligosacáridos y polisacáridos debido a que después de realizar una hidrólisis ácida se generan monosacáridos cuantificables (celulosa, hemicelulosa, glucosa, entre otros). Para cuantificar estos azúcares se agrega ácido (fosfórico, clorhídrico, o sulfúrico) a estos compuestos se da la deshidratación de los carbohidratos para formar furfural y 5-hidroximetilfurfural. Este método puede determinar todos los azúcares tanto oligosacáridos como polisacáridos y sus derivados. Al agregar fenol se da la formación de complejos de coloración de la solución para determinar la cantidad de carbohidratos a través de la espectrofotometría (Núñez et al., 2012).

El ácido sulfúrico es el más utilizado en este método. El ácido se agrega a la muestra para provocar una deshidratación, produciendo derivados de furano que luego reaccionarán con el fenol para dar complejos de color que serán medidos por espectrofotometría y se conserva la longitud de onda de 490 nm para permitir la respectiva absorbancia (López et al., 2017). Es importante mencionar que la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de carbohidratos existentes por lo que deben ser medidos a una longitud de onda dentro del rango de 488 a 492 nm; de lo contrario se deben realizar las respectivas diluciones. El método de Dubois es un método confiable para la cuantificación de azúcares totales y depende de la estructura de los azúcares a cuantificar por lo que se requiere de una curva patrón de concentración previa de glucosa estándar. Para el blanco en el equipo UV se utiliza agua destilada y se hacen los ensayos por triplicado para garantizar la veracidad de los datos obtenidos (Núñez et al., 2012).

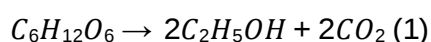
2.5. Fermentación alcohólica

El bioetanol es un alcohol obtenido con un proceso de fermentación usando como sustratos los hidratos de carbono con diferentes estructuras moleculares. El bioetanol es generado a partir de materias primas con gran cantidad de almidón como el maíz, trigo, papa y azúcar (ya sea de caña de azúcar o remolacha). En la fermentación, los hidratos de carbono se transforman en etanol y dióxido de carbono con la ayuda de enzimas (como la levadura) en ausencia de oxígeno. Las variables que afectan a este proceso son la concentración o

cantidad del sustrato, temperatura y pH (Martínez et al.,1995). Las levaduras involucradas en el proceso son de tipo *Saccharomyces cerevisiae* debido a la tolerancia a concentraciones altas de etanol y la resistencia a bajos potenciales de hidrógeno en un ambiente ácido (Serrano et al., 2023).

Las levaduras tienen la capacidad de metabolizar los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos generando el etanol como principal producto e hidrocarburos como producto secundario. El primero en metabolizarse son los azúcares simples como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. La fermentación sigue su ritmo hasta que ya no exista azúcar que consumir y la actividad microbiana de la levadura se detenga paulatinamente (Dybiński et al., 2023).

A continuación, en la reacción (1), se presenta la biorreacción que ocurre cuando existe una fermentación alcohólica con la acción de la *Saccharomyces Cerevisiae*. El rendimiento teórico de la reacción, donde se transforma la glucosa en etanol, es de 0.51 g de etanol con 0.48 g de CO₂ por 1 g de glucosa convertido según Gay Lussac. Aunque en la práctica el rendimiento no es el mismo y se encuentran en un rango del 87 al 93% del rendimiento teórico debido a que depende del tipo de microorganismo fermentativo y los metabolitos producidos (Vásquez & Dacosta, 2007).



En la fermentación los sustratos que han sido utilizados como fuentes de carbono son los azúcares de mandioca, sorgo, pata de elefante, desechos de papa, almidón, caña de azúcar, cáscara de cacao, cáscara de calabaza y el trigo. Estos sustratos requieren un pretratamiento e hidrólisis para que sean descompuestos en azúcares simples para el proceso de fermentación (Betiko et al.,2023).

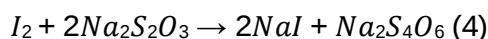
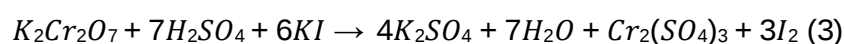
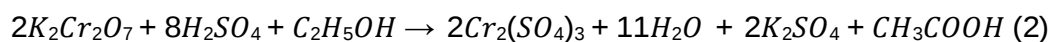
2.6. Método de micro difusión para cuantificar alcohol (método Winnick).

El método de Winnick permite determinar sustancias oxidantes como el amoníaco, nitrógeno total, urea, aminos, glucosa, etanol, metanol y otro tipo de alcoholes (López et al., 2016). Por lo que para determinar sólo el etanol es importante primero generar un blanco. Se utiliza una cámara cerrada que permite determinar las sustancias a volatilizarse (confinando estos vapores a estar en contacto constante con reactivos como dicromato de potasio) porque si el solvente puro y una sustancia volátil comparten el mismo recipiente y están por ende en la

misma atmósfera, la sustancia volátil pasa de la solución a la atmósfera y se disuelve en el solvente puro para el equilibrio dinámico.

El equipo principal es la celda conway, que tiene 2 cámaras donde se encuentra el alcohol que se volatiliza (a 50 °C y en presencia de carbonato de sodio) a la segunda cámara; el medio de la segunda cámara es oxidante (dicromato de potasio y ácido sulfúrico) por lo que remueve el etanol convirtiéndolo en ácido acético. Esta sustancia se cuantifica por foto colorimetría, potenciometría o titulación con tiosulfato de sodio y almidón como indicador.

Las reacciones químicas que se dan en este proceso es la reacción de óxido reducción donde el alcohol se difunde a la mezcla de dicromato de potasio en ácido sulfúrico oxidación del ion crómico al ion cromoso con un cambio de coloración de amarillo anaranjado a verde azulado por lo que el etanol también sufre una oxidación a acetaldehído, ácido acético y agua. En la reacción (2) se visualiza la reacción del dicromato de potasio y el ácido sulfúrico con el etanol, luego el exceso de dicromato de potasio reacciona con el yoduro de potasio para liberar yodo en la reacción (3). Finalmente, según la reacción (4), el yodo liberado se valora con titulación usando tiosulfato de sodio y el indicador es el almidón (Gros, 2011).



2.7. Método de destilación simple

Debido a que la cantidad de bioetanol a cuantificar se encuentra fuera de rango de resultados del método de micro difusión se procede a realizar una destilación simple para obtener etanol y cuantificarlo con la técnica de Windisch. La destilación es una técnica para separar sustancias miscibles, para ello se debe hacer hervir la mezcla que se desea separar. Para ellos primero se debe hervir a una temperatura intermedia entre los 2 puntos de ebullición generando vapor el de más volatilidad, para que la condensación exista luego del enfriamiento de los vapores producidos. El componente más volátil siempre se evapora y condensa, mientras que el compuesto no volátil se encuentra en el matraz (Santana, 2010). Existen diferentes tipos de destilación que parten de la más sencilla hasta la fraccionada que involucra procesos demorados y complejos estos tipos de destilación dependen de los solventes a separar y la estabilidad de estos (Verdugo & Ortiz, 2019). La Figura 1 muestra un esquema de un sistema de destilación simple comúnmente empleado en el laboratorio.

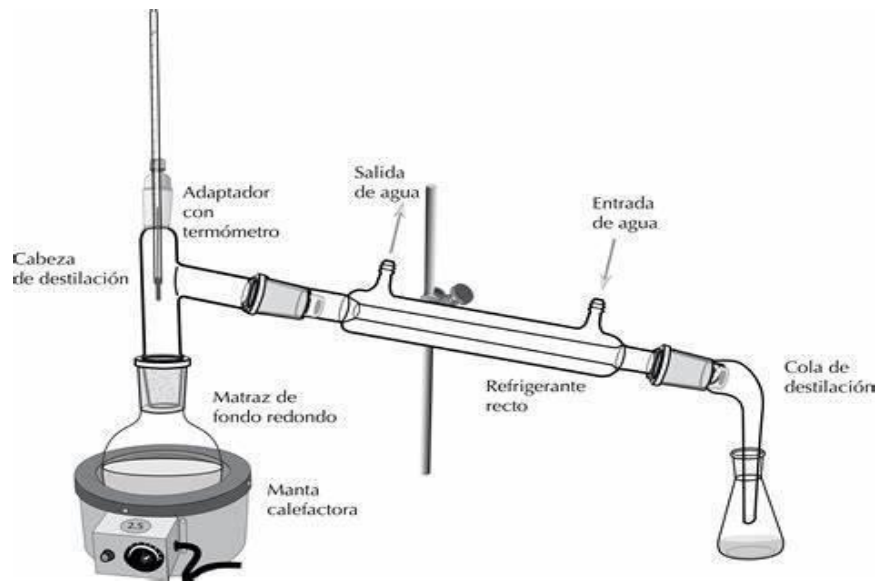


Figura 1. Diagrama de un equipo de destilación simple para separar una mezcla de dos componentes con distintos puntos de ebullición (Santana, 2010).

2.8. Método del picnómetro para determinación de densidades

Al obtener el etanol se requiere medir la densidad de este mediante el método del picnómetro para luego usar el dato en la tabla de Windisch. La tabla de la Figura 2 indica que se obtiene el grado alcohólico en porcentaje de peso y en porcentaje de volumen. Todo líquido tiene la propiedad intensiva denominada densidad. Existen varios métodos para determinar las densidades. Uno de ellos es el método del picnómetro, que se fundamenta en mediciones gravimétricas mediante el pesaje del picnómetro vacío, pesaje del picnómetro lleno con un líquido de densidad conocida (en la mayoría de casos agua a 20 °C) y del picnómetro lleno con la sustancia que se requiere calcular la densidad (Espinosa et al., 2010).

Cálculo del grado alcohólico (Windisch)

Peso específico a 15°/15°	Alcohol por ciento en volumen	Gramos de alcohol en 100 cm ³	Alcohol por ciento en peso	Peso específico a 15°/15°	Alcohol por ciento en volumen	Gramos de alcohol en 100 cm ³	Alcohol por ciento en peso
0,9999	0,07	0,05	0,05	0,9949	3,49	2,77	2,79
8	0,13	0,11	0,11	8	3,56	2,82	2,84
7	0,20	0,16	0,16	7	3,64	2,88	2,90
6	0,27	0,21	0,21	6	3,71	2,94	2,96
5	0,33	0,26	0,26	5	3,78	3,00	3,02
4	0,40	0,32	0,32	4	3,85	3,06	3,08
3	0,47	0,37	0,37	3	3,93	3,12	3,14
2	0,53	0,42	0,42	2	4,00	3,17	3,19
1	0,60	0,47	0,48	1	4,07	3,23	3,25
0	0,67	0,53	0,53	0	4,14	3,29	3,31
0,9989	0,73	0,58	0,58	0,9939	4,22	3,35	3,37
8	0,80	0,64	0,64	8	4,29	3,40	3,43
7	0,87	0,69	0,69	7	4,36	3,46	3,49
6	0,93	0,74	0,74	6	4,43	3,52	3,55
5	1,00	0,80	0,80	5	4,51	3,58	3,60
4	1,07	0,85	0,85	4	4,58	3,64	3,66
3	1,14	0,90	0,90	3	4,65	3,69	3,72
2	1,20	0,96	0,96	2	4,73	3,75	3,78
1	1,27	1,01	1,01	1	4,80	3,81	3,84
0	1,34	1,06	1,06	0	4,88	3,87	3,90
0,9979	1,41	1,12	1,12	0,9929	4,95	3,93	3,96
8	1,48	1,17	1,17	8	5,03	3,99	4,02
7	1,54	1,22	1,23	7	5,10	4,05	4,08
6	1,61	1,28	1,28	6	5,18	4,11	4,14
5	1,68	1,33	1,34	5	5,25	4,17	4,20
4	1,75	1,39	1,39	4	5,33	4,23	4,26
3	1,82	1,44	1,45	3	5,40	4,29	4,32
2	1,88	1,50	1,50	2	5,48	4,35	4,39
1	1,95	1,55	1,56	1	5,55	4,41	4,45
0	2,02	1,60	1,61	0	5,63	4,47	4,51
0,9969	2,09	1,66	1,67	0,9919	5,70	4,53	4,57
8	2,16	1,71	1,72	8	5,78	4,59	4,63
7	2,23	1,77	1,78	7	5,86	4,65	4,69
6	2,30	1,82	1,83	6	5,93	4,71	4,75
5	2,37	1,88	1,89	5	6,01	4,77	4,81
4	2,44	1,93	1,94	4	6,09	4,83	4,88
3	2,51	1,99	2,00	3	6,16	4,89	4,94
2	2,58	2,04	2,05	2	6,24	4,95	5,00
1	2,65	2,10	2,11	1	6,32	5,01	5,06
0	2,72	2,16	2,17	0	6,40	5,08	5,13

Figura 2. Tabla de Windisch utilizada para conocer la cantidad de alcohol (Espinosa et al., 2010).

Capítulo 3: Metodología

3.1. Recolección del sustrato

Se seleccionaron hojas y cogollos de las cañas de azúcar maduras de las plantaciones de la molienda “D’ Abad”, ubicada en el sector Lacay en el cantón de Santa Isabel (-3.2877175, -79.3107691). La especie de caña es *Saccharum Officinarum* y fue cultivada a una altitud aproximada de 1600 m.s.n.m a una temperatura entre 23 y 24 °C. Se delimitó una zona de 10 m x 10 m de cultivo, que se puede apreciar en la Figura 3, buscando la mayor cantidad de plantas maduras. Para el muestreo, se desechó la primera capa de hojas de la planta, se recolectó de 5 a 10 hojas maduras desde los cogollos de la planta hasta las hojas más altas. Se evitó recolectar hojas que estén por debajo de los 30 cm de altura (desde la base de la planta) para evitar posibles contaminantes (por ejemplo tierra). En total se recogieron 4 kg de hojas maduras que fueron almacenadas en bolsas con ventilación para evitar la acumulación de humedad y degradación espontánea de los materiales.



Figura 3. Zona destinada para muestreo, vista satelital. La zona delimitada con línea roja fue el área de muestreo para la recolección de las hojas maduras de la caña de azúcar.

3.2. Explosión de vapor del sustrato.

La explosión de vapor se realizó en el equipo PG-WOOD (*Steam explosion ESE-01 Elecon*), que se puede observar en la Figura 4, ubicado en el laboratorio de operaciones de la Universidad Politécnica Salesiana de la ciudad de Cuenca. Para esto se cortaron las hojas en porciones para facilitar el contacto con el agua y el vapor y se secaron (usando una mufla,

a 80 °C por 24 h). Las cantidades de sustrato y agua que se agregaron al equipo variaron entre las corridas experimentales. El equipo requería entre 1 a 3 L de agua y entre 100 a 300 g de sustrato para funcionar correctamente, según experiencia previa de los investigadores de la Universidad Politécnica Salesiana que nos asesoraron sobre el uso del equipo. La temperatura de trabajo se reguló entre 150 °C y 180 °C. Estos límites de agua y masa vegetal fueron establecidos en trabajos previos por investigadores de la Universidad Politécnica Salesiana que ya han realizado varias pruebas y determinaron que estos rangos son los que mejor resultado han tenido para el proceso de pretratamiento. Así mismo, fueron estos investigadores quienes establecieron el rango de temperatura, basándose en la severidad del daño en la materia vegetal durante el tratamiento. El tiempo recomendado para este tipo de características operacionales es de 30 segundos a 10 minutos para que tenga efecto la explosión de vapor. Para la presente investigación se realizó un total de 4 pruebas donde en cada una de ellas se modificó la temperatura del equipo de explosión de vapor, la cantidad de agua y la cantidad de biomasa a explotar y el tiempo de explosión. La Tabla 1 muestra las condiciones de los pretratamientos realizados.

Tabla 1. Condiciones para los pretratamientos realizados en la explosión de vapor

Temperatura	Proporción agua (L) /biomasa (g)	Residuo sólido (g)	Residuo Líquido (ml)	Tiempo
180	1 :100	86	150	10 min
165	3 :100	90	1500	10 min
155	3 :100	90	1490	10 min
180*	3:100*	135	1500	1 s

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Preparación del equipo:
 - a. Colocar 3 litros de agua dentro del equipo de explosión.
 - b. Encender las niquelinas mediante el software.

- c. Calentar hasta la temperatura de trabajo y realizar la explosión.
- d. Limpiar los residuos de otras operaciones previas.
- 2. Explosión de vapor con sustrato:
 - a. Colocar el sustrato junto con el agua en las cantidades requeridas.
 - b. Encender las niquelinas mediante el software.
 - c. Calentar hasta la temperatura de trabajo, mantener la temperatura durante el tiempo requerido y realizar la explosión.
 - d. Recolectar los residuos sólidos y/o líquidos según se requiera.
 - e. Limpiar el equipo.

Para el último experimento, se realizó una serie de tres recirculaciones del producto líquido de la explosión con vapor. Primero, se ejecutó una primera explosión de vapor con las condiciones de la Tabla 1. De los residuos resultantes de esta explosión, se tomó el líquido y se utilizó como parte del agua de la segunda explosión de vapor. Por ejemplo, si de la primera explosión se obtienen 1.5 L de líquido residual, se añadía 1.5 L de agua adicional junto con otros 100 g de sólido (respetando la relación de la tabla) y se realizaba una segunda explosión. La explosión se realizó apenas se alcanzaba la temperatura de 180 °C, se mantuvo la temperatura durante 1 s y el sólido residual de cada explosión no era empleado nuevamente, esto con el objetivo de evitar que se queme la biomasa. Así se procedió hasta una tercera explosión de vapor (cada vez usando biomasa nueva) de la cual se obtuvo el líquido residual de tres recirculaciones. Un ejemplo del procedimiento de recirculación se puede apreciar en la Figura 5.



Figura 4. Equipo para explosión de vapor utilizado para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Marca PG-WOOD Elecon.

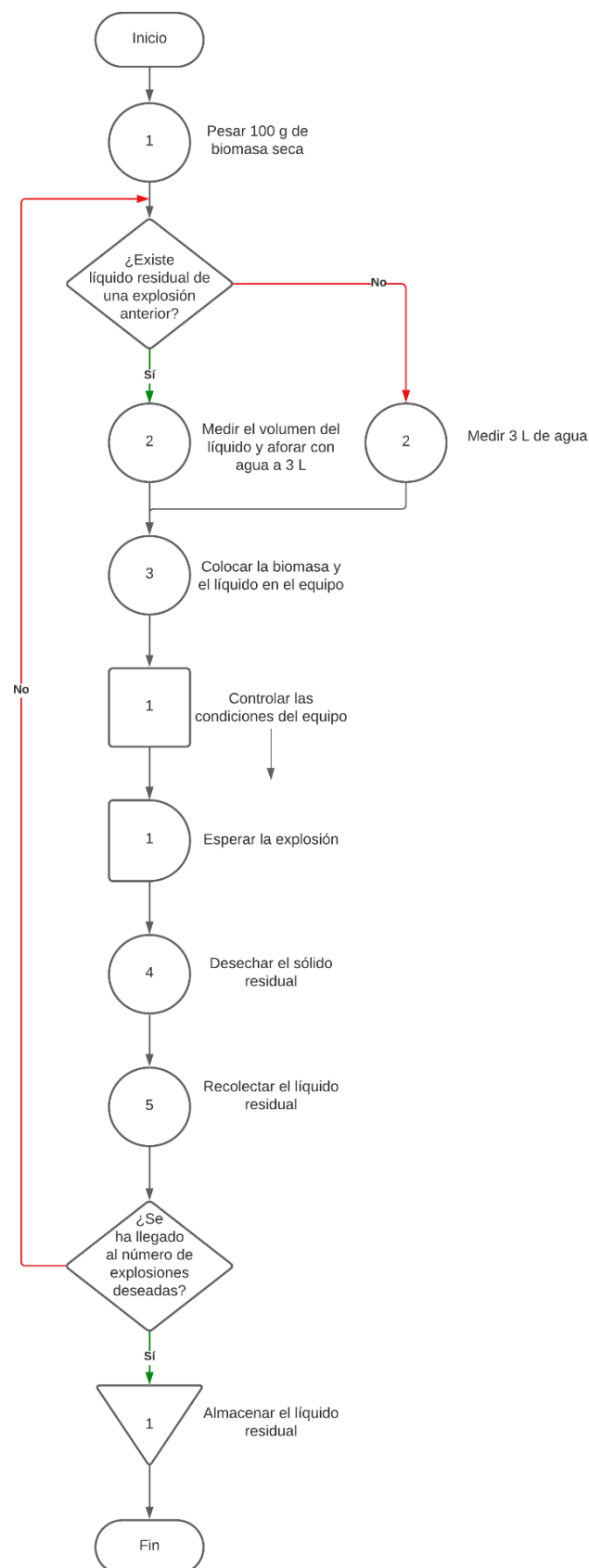


Figura 5. Diagrama para realizar recirculaciones en el equipo de explosión de vapor.

3.3. Hidrólisis enzimática ácida

La hidrólisis enzimática ácida del sólido y del líquido obtenido en el proceso de explosión con vapor fue realizada en base a tres estudios. Para la preparación del buffer de pH 4.8 se siguió la metodología de Carranza (2013). Las condiciones y las relaciones de sustrato/buffer se obtuvieron a partir de las metodologías de Oliveira et al. (2014) y Oliveira et al. (2012).

3.3.1. Preparación del buffer para hidrólisis

Para alcanzar el pH de trabajo para las enzimas, fue necesario preparar un buffer pH 4.8 de citrato de sodio 0.01 M. El buffer se preparó utilizando ácido cítrico, hidróxido de sodio químicamente puro en escamas y agua destilada.

Para la preparación de una solución madre 0.6 M se siguió el siguiente proceso:

1. Pesar 210 g de ácido cítrico.
2. Disolver en un volumen de 500 ml de agua destilada.
3. Pesar 70 g de hidróxido de sodio (NaOH) presentación en escamas con pureza del 97%.
4. Agregar poco a poco a la solución anterior y medir pH constantemente hasta marcar 4.8.
5. Aforar la solución de citrato a 1 litro con agua destilada.

La solución madre fue guardada en un envase de vidrio ámbar para evitar cualquier alteración. A partir de esta solución se preparó la solución buffer para cada una de las hidrólisis que se realizaron. Se aforó 28.3 ml de solución madre a 1700 ml con agua destilada para obtener un buffer pH 4.8 de citrato de sodio 0.01 M.

3.3.2. Hidrólisis enzimática ácida del residuo sólido o líquido de la explosión de vapor

El proceso de hidrólisis fue realizado en un biorreactor Batch agitado del laboratorio de Ingeniería de la Reacción Química ubicado en el Laboratorio Tecnológico de la Universidad de Cuenca. Las condiciones del biorreactor discontinuo de marca (*Biotron GX*). En la Figura 8 se presenta el montaje del equipo. Según las necesidades de cada experimento se reguló temperaturas, agitación, pH y tiempo de reacción. La enzima utilizada fue CTec 2 son enzimas (de marca Cellic), que contienen celulasas, b-glucosidasa y hemicelulasa se aplica como

degradante a azúcares fermentables y para convertir los carbohidratos en azúcares simples antes de la fermentación (Castillo et al., 2019).

El procedimiento para la hidrólisis fue el siguiente:

1. Armar el biorreactor, verificar todas las conexiones (agua para enfriamiento, pH, calefactor, agitación y termocupla).
2. Medir 20 g de muestra por cada litro de buffer que se vaya a emplear.
3. Medir 0.08 ml de enzima CTec 2 por cada gramo de muestra, como se realizó en el estudio de Castillo et al. (2019).
4. Agregar 850 ml del buffer en el biorreactor.
5. Agregar 34 ml de muestra, 2.7 ml de la enzima CTec 2 y completar el volumen con 850 ml restante de buffer.
6. Regular la temperatura a 50 °C, la agitación a 200 rpm y controlar que el pH no sea mayor a 5.

Para poder comparar el rendimiento del residuo sólido y líquido se estableció que la relación entre la masa y volumen es de 1 g/ml. La duración total de la hidrólisis fue de 72 horas y se tomaron muestras de la mezcla en intervalos distintos, dependiendo de la hidrólisis. Estos intervalos están especificados a continuación.

3.3.2.1. Hidrólisis 1: Sólido residual de explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos

Para la primera hidrólisis se utilizaron 50 g de sólido. Se aforó a un volumen de 1.6 L completando con buffer citrato de sodio de pH 4.8. Se utilizó la enzima celulasa *Aspergillus Níger*, en proporción con la cantidad de sólido. Las condiciones del biorreactor fueron monitoreadas para verificar y tomar muestras para análisis. Se mantuvieron las siguientes condiciones para la reacción: temperatura de reacción 45 °C, velocidad de agitación 50 rpm, tiempo de reacción 72 h. Estas condiciones se muestran en la Figura 6, al igual que las condiciones en tiempo real. A lo largo de esta hidrólisis se recolectaron 3 muestras del líquido hidrolizado, una cada 24 h. Las muestras se utilizaron durante la cuantificación de azúcares posterior. Para tomar una muestra se detuvo la agitación y se extrajo 10 ml de mezcla con una pipeta, luego se reanudó la agitación.



Figura 6. Fotografía de la pantalla mostrando las condiciones de operación y de tiempo real, usada en todas las hidrólisis realizadas.

3.2.2.2 Hidrólisis 2: Sólido residual de explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos

Para la segunda hidrólisis se utilizaron 50 g de sólido residual. Se aforó a un volumen de 1.6 L completando con buffer citrato de sodio de pH 4.8. Se utilizó 4 ml de la enzima CTec 2. Las condiciones del biorreactor fueron las siguientes: temperatura de reacción 50 °C, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de reacción 72 h fueron monitoreadas para verificar y tomar muestras para análisis. A lo largo de esta hidrólisis se recolectaron 4 muestras del líquido hidrolizado, una cada 12 h. Las muestras se tomaron de la misma manera que en la hidrólisis

1. Todas las muestras tomadas de la hidrólisis fueron utilizadas en la cuantificación de azúcares.

3.2.2.3 Hidrólisis 3: Líquido residual de explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos

Para la tercera hidrólisis se utilizaron 34 ml de líquido residual del proceso de explosión con vapor a 180 °C por 10 min. Se aforó a un volumen de 1.7 L completando con buffer citrato de sodio de pH 4.8. Se utilizó 2.7 ml de la enzima CTec 2. Las condiciones del biorreactor fueron monitoreadas (temperatura de reacción 50 °C, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de reacción 72 h) para verificar y tomar muestras para análisis. A lo largo de esta hidrólisis se recolectaron 7 muestras de líquido hidrolizado, una cada 10 h. Las muestras se tomaron de

la misma manera que la hidrólisis 1. Todas las muestras tomadas de la hidrólisis fueron utilizadas en la cuantificación de azúcares.

3.2.2.4 Hidrólisis 4: Líquido residual de explosión de vapor a 165 °C por 10 minutos

Para la cuarta hidrólisis se utilizaron 34 ml de líquido residual del proceso de explosión con vapor a 165°C por 10 min. Se aforó a un volumen de 1.7 litros completando con buffer citrato de sodio de pH 4.8. Se utilizó 2.7 ml de la enzima CTec 2. Las condiciones del biorreactor (temperatura de reacción 50 °C, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de reacción 72 h) fueron monitoreadas para verificar y tomar muestras para análisis. A lo largo de esta hidrólisis se recolectaron 2 muestras de líquido hidrolizado, una cada 36 horas. Las muestras se tomaron de la misma manera que la hidrólisis 1. Todas las muestras tomadas de la hidrólisis fueron utilizadas en la cuantificación de azúcares.

3.2.2.5. Hidrólisis 5: Líquido residual de explosión de vapor a 180 °C con recirculación, por 1 s.

Para la quinta hidrólisis se utilizaron 34 ml de líquido residual de procesos consecutivos de explosión con vapor a 180°C por 1 s. Se aforó a un volumen de 1.7 litros completando con buffer citrato de sodio de pH 4.8. Se utilizó 2.7 ml de la enzima CTec 2. Las condiciones del biorreactor (temperatura de reacción 50 °C, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de reacción 72 has) fueron monitoreadas para verificar y tomar muestras para análisis. A lo largo de esta hidrólisis se recolectaron 2 muestras de líquido hidrolizado, una cada 36 horas. Las muestras se tomaron de la misma manera que la hidrólisis 1. Todas las muestras tomadas de la hidrólisis fueron utilizadas en la cuantificación de azúcares.

3.4. Cuantificación de azúcares

Una vez la muestra fue hidrolizada, se cuantificó la cantidad de azúcares presentes en el líquido obtenido luego de la hidrólisis, según lo descrito en las subsecciones 3.2.2.1 a 3.2.2.4. Para esto se utilizó el método fenol sulfúrico, también conocido como método de Dubois. Para este método se utilizó ácido sulfúrico concentrado, una solución de fenol al 1% y un espectrofotómetro UV (*GENESYS 180 UV-Vis Thermo Scientific*) que se puede observar en

la Figura 7. Se utilizó una curva de calibración de glucosa programada previamente, utilizando el manual de guía para el equipo (Thermo Fisher Scientific, 2018). El equipo está ubicado en el laboratorio de Ingeniería de la reacción química ubicado en el laboratorio tecnológico de la Universidad de Cuenca. Las muestras fueron diluidas hasta que el equipo pueda realizar la lectura.



Figura 7. Espectrofotómetro UV-visible para cuantificación de azúcares totales (Método de Dubois).

El procedimiento para realizar la cuantización de los azúcares, en triplicado, fue el siguiente:

1. Colocar una alícuota diluida de 2 ml en un tubo de ensayo.
2. Agregar 1 ml de fenol 1% y, enseguida, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado.
3. Reposar por 10 minutos.
4. Homogeneizar por 1 minuto y reposar nuevamente por 20 minutos más en un baño de agua fría.
5. Colocar agua destilada en una celda para el blanco, colocar el contenido del tubo de ensayo en otra celda.
6. Leer la absorbancia en el espectrofotómetro UV.

3.5. Fermentación

Para el proceso de fermentación se usó un biorreactor (*Biotron GX*) (Ver Figura 8), donde se establecieron manualmente las condiciones de temperatura, revoluciones por minuto y flujo de nitrógeno suministrado para que la fermentación se desarrolle en un ambiente anaeróbico. Se fermentó todo el volumen de hidrolizado; es decir, incluyendo el buffer y el líquido

hidrolizado utilizando como microorganismo fermentativo a la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* en proporción de 10 g por litro de muestra según el estudio de Phukoetphim et al.(2017). Previamente se debe activar la levadura con agua a temperatura ligeramente elevada aproximadamente a unos 45 °C.



Figura 8. Biorreactor tipo Batch Biotron GX utilizado durante la hidrólisis enzimática ácida y la fermentación para obtención de bioetanol.

El procedimiento para la fermentación fue:

1. Armar el biorreactor sellando todas las salidas de aire con las mangueras etiquetadas.
2. Colocar el líquido a fermentar dentro del biorreactor.
3. Colocar la *Saccharomyces cerevisiae*; en total se coloca 17 g por la relación de 10 g/L
4. Establecer las condiciones de fermentación
 - Temperatura 35 °C
 - pH 4,8
 - Tiempo 48 h
 - Flujo de nitrógeno 0.5 L/min

3.6. Cuantificación de etanol por micro difusión

Posterior a la fermentación se utilizó el método de Winnick para cuantificar etanol. Este método fue realizado según los estudios de Delgado et al. (2018) y Hernández (2015). El método requirió de los siguientes reactivos: dicromato de potasio, ácido sulfúrico, carbonato

de sodio, yoduro de potasio, almidón y tiosulfato de sodio. La titulación de yodo liberado se realizó en laboratorio usando el equipo de la Figura 9. Fue necesario preparar las concentraciones requeridas para cada reactivo in situ, como se detalla a continuación y para cuantificar el alcohol presente, se utilizó la ecuación (5). La preparación de los reactantes se describe a continuación:

- Ácido sulfúrico 10 N
 - Colocar agua destilada en un balón de aforo, tratando de llenar cerca de la mitad del volumen total.
 - Medir 13.3 ml de ácido sulfúrico concentrado con ayuda de una pipeta y cuidadosamente colocar directamente sobre el agua del balón de aforo.
 - Aforar a 50 ml con agua destilada.
 - Homogeneizar.
- Dicromato de potasio 0.4 N en solución de ácido sulfúrico
 - Pesar 0.9806 g de dicromato de potasio puro (usando una balanza analítica).
 - Colocar en un balón de aforo con ayuda de una espátula.
 - Aforar a 50 ml con la solución de ácido sulfúrico 10 N.
 - Homogeneizar.
- Carbonato de sodio 20% p/v
 - Pesar 10 g de carbonato de sodio puro.
 - Colocar en un balón de aforo con ayuda de una espátula.
 - Aforar a 50 ml con agua destilada.
 - Homogeneizar.
- Yoduro de potasio 3 N.
 - Pesar 24.9 g de yoduro de potasio.
 - Colocar en un balón de aforo con ayuda de una espátula.
 - Aforar a 50 ml con agua destilada.
 - Homogeneizar.
- Almidón (indicador 1%)
 - Pesar 0.3 g de almidón soluble.
 - Colocar en un gotero ámbar de 30 ml.
 - Aforar con agua destilada.
 - Homogeneizar.
- Tiosulfato de sodio 0.1 N
 - Pesar 7.9 g de tiosulfato de sodio pentahidratado.

- Colocar en un balón de aforo con ayuda de una espátula.
- Aforar a 1 litro con agua destilada.
- Homogeneizar y guardar en un frasco de vidrio ámbar.



Figura 9. Titulación del procedimiento: método de Winnick, titulando yodo liberado proporcional a la cantidad de etanol en la muestra.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Colocar 7 ml de muestra en un tubo plástico para centrifuga y centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos.
2. Tomar el líquido sobrenadante con ayuda de una pipeta.
3. Diluir el líquido con agua destilada en relación 1:100.
4. Tomar 4 ml del líquido diluido, colocar en una caja Petri con división en una de las cámaras que llamaremos A.
5. Colocar 4 ml de la solución de carbonato de sodio al 20% en la cámara A directamente sobre el líquido.
6. Colocar 4 ml de dicromato de sodio 0.4 N en la segunda cámara, que llamaremos B.
7. Tapar la caja Petri y aislarla con cinta herméticamente.
8. Colocar la caja Petri en una mufla a 50°C durante 2 h. Realizar con cuidado para evitar que los líquidos de la cámara A se mezclen con la cámara B.

9. Retirar la cinta aislante.
10. Agregar 2 ml de yoduro de potasio 3 N a la cámara B.
11. Agregar 3 o 4 gotas del indicador de almidón a la cámara B.
12. Titular la cámara B con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta el viraje de color de amarillo anaranjado o amarillo ocre a verde azulado.
13. Anotar el volumen consumido de tiosulfato.
14. Realizar por triplicado.
15. Realizar el mismo procedimiento usando agua destilada para marcar el blanco.

$$Etanol (g/L) = \frac{N \cdot 11.51 \cdot (V_b - V_m)}{V_M} \quad (5)$$

Donde:

N- Normalidad del tiosulfato de sodio.

V_b- Volumen de tiosulfato usado en la titulación del blanco.

V_m- Volumen de tiosulfato usado en la titulación de la muestra.

V_M- Volumen de la muestra.

3.7. Método de destilación simple

La destilación simple requiere de un equipo de destilación formado por un refrigerante, set de 2 mangueras, 2 soportes universales con sus respectivas pinzas, 1 balón de aforo de 100 ml de capacidad, una fuente de calor que en este caso es una lámpara de alcohol, termómetro y corchos para evitar la fuga de vapor. El equipo y el procedimiento fue realizado según la normativa de la Organización Internacional de Estandarización (1983).

El procedimiento fue:

1. Armar el equipo de destilación asegurándose que los corchos se encuentren colocados de manera correcta y que existe un flujo de agua ininterrumpido en las mangueras.
2. Colocar 100 ml de la muestra a destilar en el balón de aforo.
3. Encender la fuente de calor en este caso la lámpara de alcohol.
4. Verificar constantemente que la temperatura en el termómetro esté entre 80 °C y 92 °C.
5. Almacenar el destilado en el vaso de precipitación para posteriormente medir su volumen.

3.8. Método del picnómetro para determinar densidad de líquidos.

El método del picnómetro consiste en una diferencia de pesaje usando como blanco al agua destilada cuya densidad se conoce en la literatura y como instrumento principal se usa un picnómetro de 50 ml, además de una balanza analítica. Este método fue realizado según la normativa vigente de la Organización Internacional de Estandarización (1981) y la ecuación (6) permite calcular la densidad del líquido.

El procedimiento consiste en:

1. Pesar el picnómetro vacío.
2. Llenar con agua destilada el picnómetro y pesarlo.
3. Vaciar el agua destilada y llenarlo con la muestra destilada para pesarlo nuevamente.
4. Aplicar la fórmula con los datos registrados.

$$\delta_{L(oT)} = \frac{m_{L+P} - m_P}{m_{W+P} - m_P} * \delta_{W(oT)} \quad (6)$$

Donde:

$\delta_{L(oT)}$ - la densidad del líquido a una temperatura T (°C).

m_{L+P} - la masa en g del picnómetro lleno de la muestra.

m_{W+P} - la masa en g del picnómetro lleno de agua.

m_P - la masa en g del picnómetro vacío.

$\delta_{W(oT)}$ - la densidad del agua a una temperatura T (°C).

Capítulo IV: Resultados y cálculos

4.1. Sustrato recolectado de la molienda

Se recolectó 4 kg de sustrato vegetal, de los cuales se seleccionaron las hojas con menor cantidad de daño, se desechó cualquier sustrato con aspecto deteriorado y de posible descomposición. En total, se obtuvo 3.8 kg de sustrato. El sustrato fue secado en mufla a 80

°C y almacenado en el laboratorio de operaciones de la Universidad Politécnica Salesiana de la ciudad de Cuenca, en condiciones y temperaturas adecuadas para evitar el deterioro posterior del sustrato. La Figura 10 es el resultado de la biomasa después de secarse.



Figura 10. Hojas, tallos y cogollos secos, de caña de azúcar, recolectados de la molienda “D’ Abad”.

4.2. Residuos recolectados de la explosión de vapor a distintas temperaturas

4.2.1. Explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos

En este experimento se obtuvo un volumen de residuo líquido de 150 ml, con aspecto turbio y restos de biomasa quemada, como se observa en la Figura 11. También se obtuvo un residuo sólido húmedo (Figura 12) que tiene textura algodonosa y rastros de quemaduras por la temperatura. El sólido fue secado en una mufla a 80 °C por 24 horas, resultando en un sólido fibroso como se observa en la figura 13.

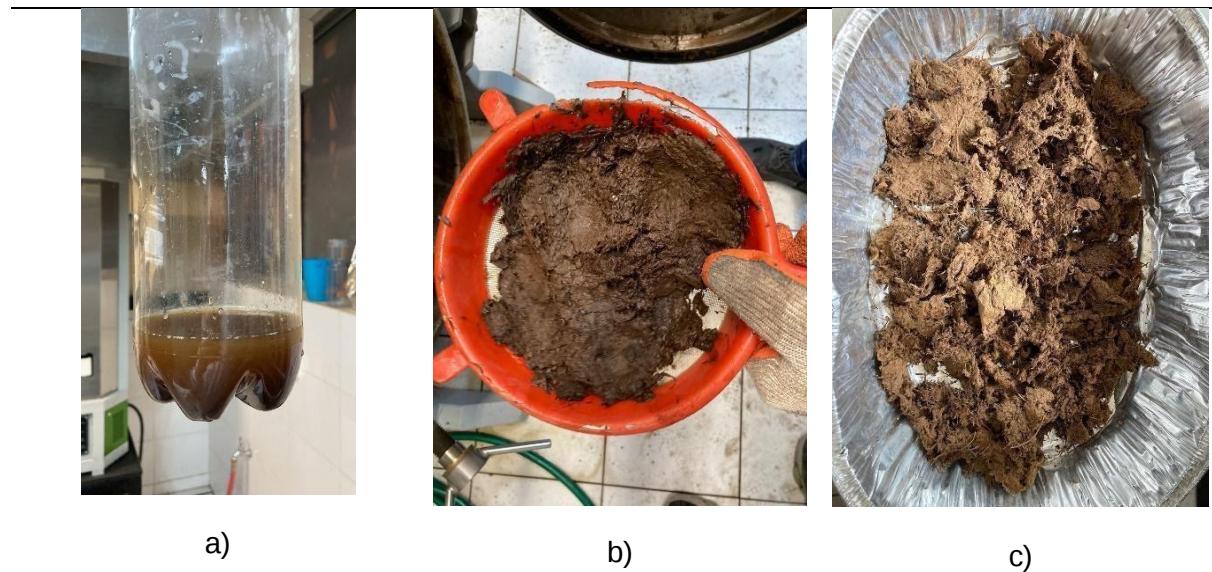


Figura 11. a) Residuo sólido húmedo obtenido de la explosión de vapor a 180 °C por 10 minutos, b) Residuo líquido y c) Residuo sólido seco después de secado en mufla a 80 °C por 24 h, con fibras visibles y aglomeradas.

4.2.2. Explosión de vapor a 165 °C por 10 minutos

En este experimento se obtuvo un volumen de residuo líquido de 1500 ml, con un aspecto más homogéneo, como se aprecia en la Figura 12, y un residuo sólido húmedo. El sólido fue secado en una mufla a 80 °C por 24 h, el peso del sólido seco fue de 90 g y sus fibras fueron más visibles.



Figura 12. Residuo sólido obtenido de la explosión de vapor a 165 °C por 10 minutos y b) Residuo líquido obtenido del mismo proceso.

4.2.3. Explosión de vapor a 155 °C por 10 minutos

En este experimento se obtuvo un volumen de residuo líquido de 1400 ml y un residuo sólido húmedo. El sólido fue secado en una mufla a 80 °C por 24 h. Finalmente, el peso del sólido seco fue de 90 g, el aspecto de líquido y sólido residual de este experimento fueron muy similares al experimento a 165 °C

4.2.4. Explosión de vapor a 180 °C por 1 s con recirculación

En este experimento se obtuvo un volumen de residuo líquido de 1450 ml (el color de este líquido fue mucho más intenso como se aprecia en la Figura 13) y un residuo sólido húmedo. El sólido residual, de todas las recirculaciones, no fue utilizado para el resto del análisis, por lo que fue desechado.



Figura 13. Residuo líquido obtenido mediante recirculación con vapor a 180 °C.

4.3. Cuantificación de azúcares

4.3.1. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 1

La primera cuantificación de azúcares se realizó utilizando las muestras obtenidas durante la hidrólisis 1 (Ver sección 3.3.2.1). Mediante el método fenol-sulfúrico se obtuvieron las absorbancias de la Tabla 2. La ecuación 7 se utilizó para calcular la concentración de azúcares. Esta ecuación representa una curva de calibración de glucosa realizada por García (2022).

$$Abs = 0.003X + 0.007 \quad (7)$$

Donde:

Abs - Absorbancia de la muestra

X - Concentración de glucosa en ug/ml

Por ejemplo, suponiendo una absorbancia de 0.5, se procede de la siguiente manera:

$$0.5 = 0.003 X + 0.007$$

$$X = \frac{0.5 - 0.007}{0.003}$$

$$X = 164.33 \text{ ug/ml}$$

Todos los cálculos realizados en esta sección se desarrollaron siguiendo este procedimiento. Para conocer la concentración de azúcares original de la muestra de sólido residual se realizó una regresión de la lectura del espectrofotómetro UV. Primero se realizó la dilución de los 50 g de sólido residual en el buffer para la hidrólisis. Luego, para lograr la lectura, cada muestra se diluyó en agua destilada hasta un 4% v/v de su concentración. Se obtuvieron las concentraciones mostradas en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra la evolución de las absorbancias y su proporcional concentración de azúcares obtenidas durante la primera hidrólisis a partir de la lectura en el espectrofotómetro UV, la desviación estándar de los datos se calculó a partir de tres mediciones. En la Figura 14 se puede apreciar un aumento de 53.06 g/l de azúcares, luego de 72 h de hidrólisis, que representa cerca del 43.6 % de incremento respecto a la concentración inicial.

Tabla 2. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 1.

Muestra	Absorbancia	Concentración (ug/ml)	Tiempo (h)
1	0.463±0.004	152.0±1.5	24
2	0.474±0.003	155.7±0.9	48
3	0.662±0.006	218.3±1.9	72

La columna de tiempo se refiere a cuantas horas pasaron desde que comenzó la hidrólisis, hasta la toma de la muestra. Esto se considera en todas las tablas de la sección 4.3.

Tabla 3. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 1.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Concentración (g/l)	Tiempo (h)
1	121600±1199.2	121.6±1.2	24
2	124536±699.9	124.5±0.7	48
3	174664±1575.1	174.6±1.6	72

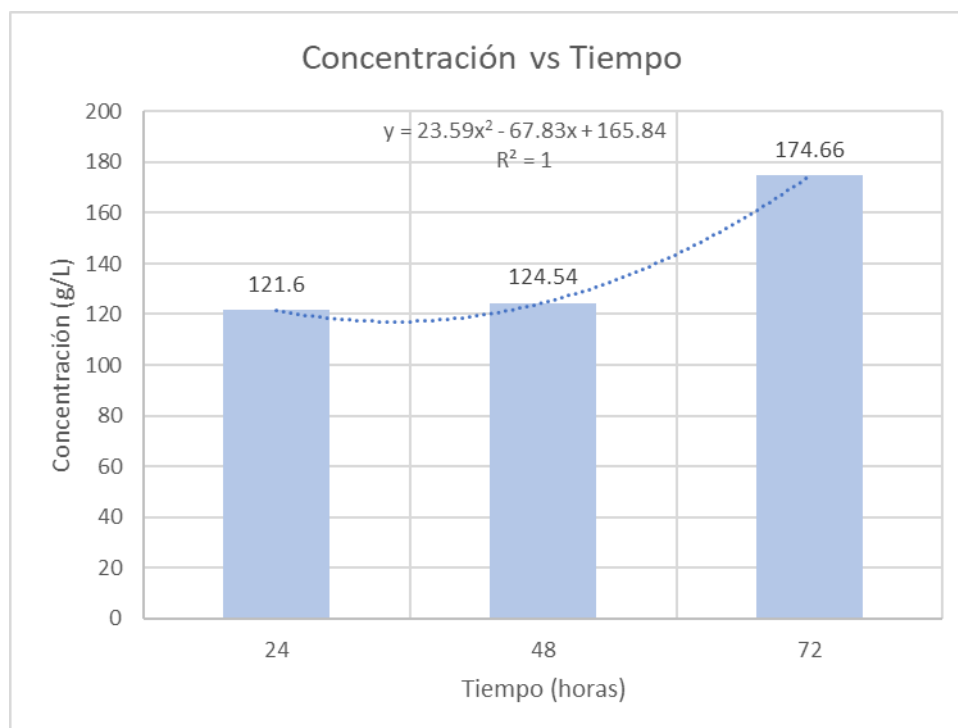


Figura 14. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 1.

4.3.2. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 2.

La segunda cuantificación de azúcares se realizó utilizando las muestras obtenidas durante la hidrólisis 2 (Sección 3.2.2.2). Mediante el método fenol-sulfúrico se obtuvieron las

absorbancias de la Tabla 4 y se calcularon las concentraciones con la ecuación 7. Para conocer la concentración de azúcares original de la muestra de sólido residual se realizó una regresión de la lectura del espectrofotómetro UV. Primero se realizó la dilución de los 50 g de sólido residual en el buffer para la hidrólisis. Luego, para lograr la lectura, cada muestra se diluyó en agua destilada hasta un 4% v/v de su concentración. Las concentraciones resultantes se muestran en las Tablas 4 y 5. La Figura 15 muestra que el aumento de azúcares fue de 68.28 g/l, lo que representa un incremento de aproximadamente 86.8 % con respecto a la concentración de azúcares de la primera muestra de esta hidrólisis.

Tabla 4. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 2.

Muestra	Absorbancia	Concentración (ug/ml)	Tiempo (h)
1	0.300±0.002	98.3±0.6	18
2	0.463±0.003	152.0±1.0	36
3	0.505±0.004	166.0±1.4	54
4	0.558±0.002	183.7±0.7	72

Tabla 5. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 2.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Concentración (g/l)	Tiempo (h)
1	78664.0±502.8	78.6±0.50	18
2	121600.0±824.3	121.6±0.8	36
3	132800.0±1117.3	132.8±1.1	54
4	146936.0±547.9	146.9±0.5	72

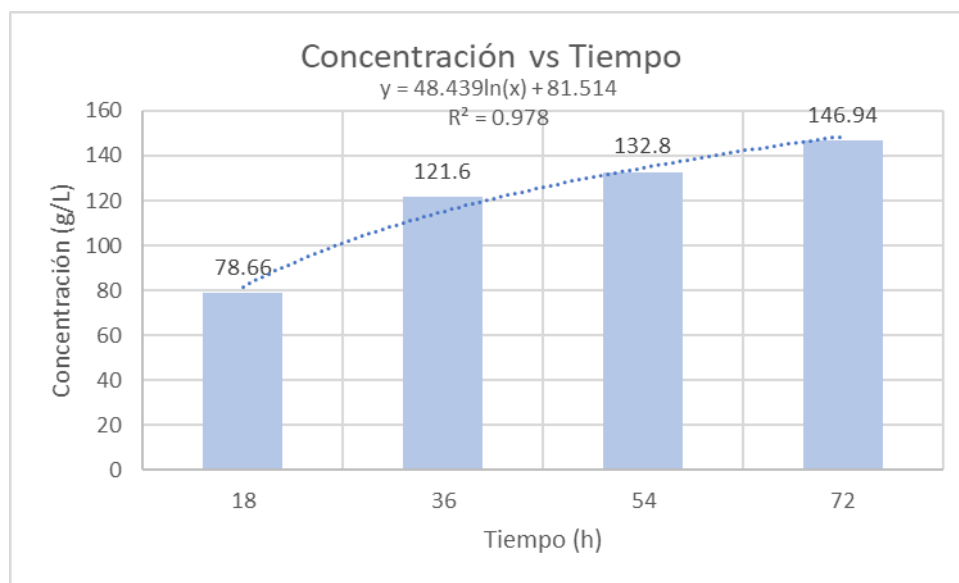


Figura 15. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 2.

4.3.3. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 3

La tercera cuantificación de azúcares se realizó utilizando las muestras obtenidas durante la hidrólisis 3 (Sección 3.2.2.3). Mediante el método fenol-sulfúrico se obtuvieron las absorbancias de la Tabla 6 y se calcularon las concentraciones utilizando la ecuación 7. Para conocer la concentración de azúcares original de la muestra de sólido residual se realizó una regresión de la lectura del espectrofotómetro UV. Primero se realizó la dilución de los 34 ml de líquido residual en el buffer para la hidrólisis. Luego, para lograr la lectura, cada muestra se diluyó en agua destilada hasta un 10% de su concentración. Las concentraciones resultantes se muestran en las Tablas 6 y 7. En la Figura 16 podemos apreciar un aumento de 41.5 g/l de azúcares, que representa cerca del 366 % de la concentración de la primera muestra de esta hidrólisis.

Tabla 6. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 3.

Muestra	Absorbancia	Concentración (ug/ml)	Tiempo (h)
1	0.075±0.002	24.2±0.7	10
2	0.15±0.01	47.7±3.4	20

3	0.164±0.003	52.3±1.1	30
4	0.187±0.004	60.0±1.3	40
5	0.254±0.003	82.3±1.1	50
6	0.29±0.015	94.3±4.9	60
7	0.324±0.004	105.7±1.5	70

Tabla 7. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 3.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Concentración (g/l)	Tiempo (h)
1	11330.0±360.0	11.3±0.4	10
2	23830.0±1701.5	23.8±1.7	20
3	26165.0±566.6	26.2±0.6	30
4	30000.0±671.3	30.0±0.7	40
5	41165.0±549.9	41.2±0.5	50
6	47165.0±2450.7	47.2±2.4	60
7	52835.0±749.5	52.8±0.7	70

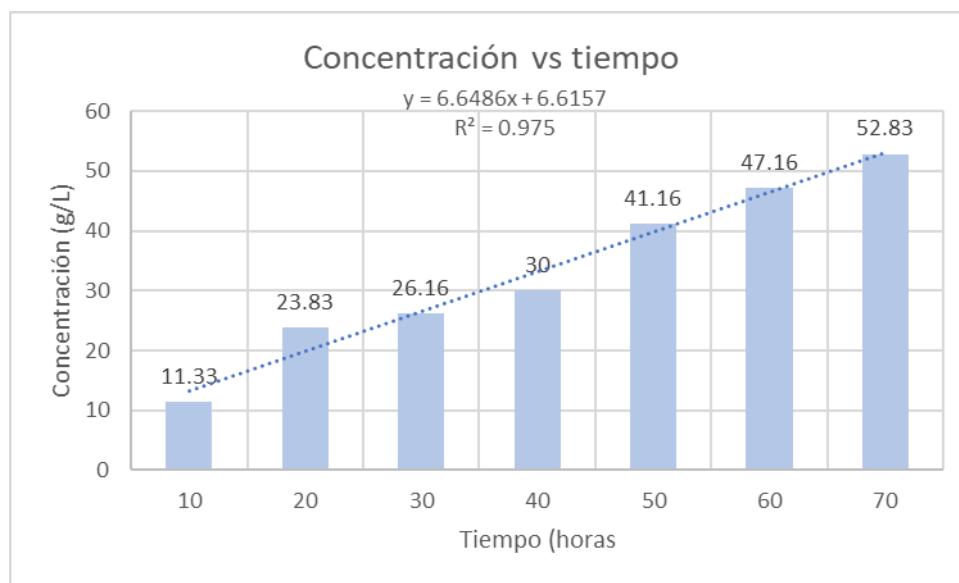


Figura 16. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 3.

4.3.4. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 4

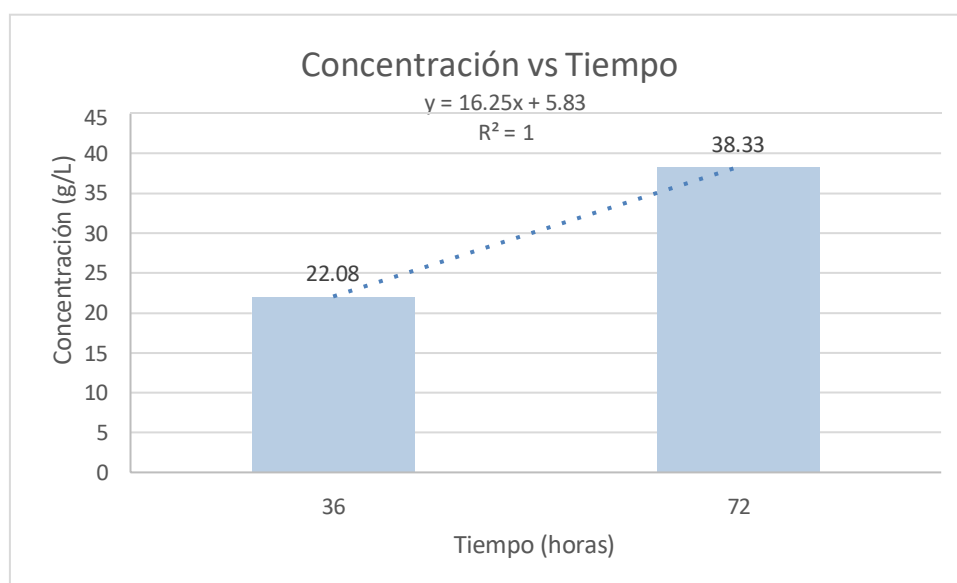
La cuarta cuantificación de azúcares se realizó utilizando las muestras obtenidas durante la hidrólisis 4 (Sección 3.2.2.4). Mediante el método fenol-sulfúrico se obtuvieron las absorbancias de la Tabla 8 y se calcularon las concentraciones utilizando la ecuación 7. Para conocer la concentración de azúcares original de la muestra de sólido residual se realizó una regresión de la lectura del espectrofotómetro UV. Primero se realizó la dilución de los 34 ml de líquido residual en el buffer para la hidrólisis. Luego, para lograr la lectura, cada muestra se diluyó en agua destilada hasta un 4% de su concentración. Las concentraciones resultantes se muestran en las Tablas 8 y 9. En la Figura 17 podemos apreciar un aumento de 16.25 g/l de azúcares, que representa cerca del 73.5 % de la concentración de la primera muestra de esta hidrólisis.

Tabla 8. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 4.

Muestra	Absorbancia	Concentración (ug/ml)	Tiempo (h)
1	0.060±0.005	17.7±1.5	36
2	0.099±0.002	30.7±0.5	72

Tabla 9. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 4.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Concentración (g/l)	Tiempo (h)
1	22083.7±1894.2	22.1±1.9	36
2	38333.7±680.4	38.3±0.7	72

**Figura 17.** Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 4.

4.3.5. Cuantificación de azúcares para hidrólisis 5

La cuarta cuantificación de azúcares se realizó utilizando las muestras obtenidas durante la hidrólisis 4 (Sección 3.2.2.5). Mediante el método fenol-sulfúrico se obtuvieron las absorbancias de la Tabla 10 y se calcularon las concentraciones utilizando la ecuación 7. Para conocer la concentración de azúcares original de la muestra de sólido residual se realizó una regresión de la lectura del espectrofotómetro UV. Primero se realizó la dilución de los 34 ml de líquido residual en el buffer para la hidrólisis. Luego, para lograr la lectura, las muestras fueron diluidas al 1%. Las concentraciones resultantes se muestran en las Tablas 10 y 11. En

la Figura 18 podemos apreciar un aumento de 71.7 g/l de azúcares, que representa cerca del 226 % de la concentración de la primera muestra de esta hidrólisis.

Tabla 10. Concentración de azúcares de las muestras diluidas de la hidrólisis 5.

Muestra	Absorbancia	Concentración (ug/ml)	Tiempo (h)
1	0.026±0.003	6.3±1.1	36
2	0.065±0.007	20.7±2.3	72

Tabla 11. Concentración de azúcares de las muestras de la hidrólisis 5.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Concentración (g/l)	Tiempo (h)
1	31650.0±5499.7	31.6±5.5	36
2	103350.0±11732.6	103.3±1.2	72

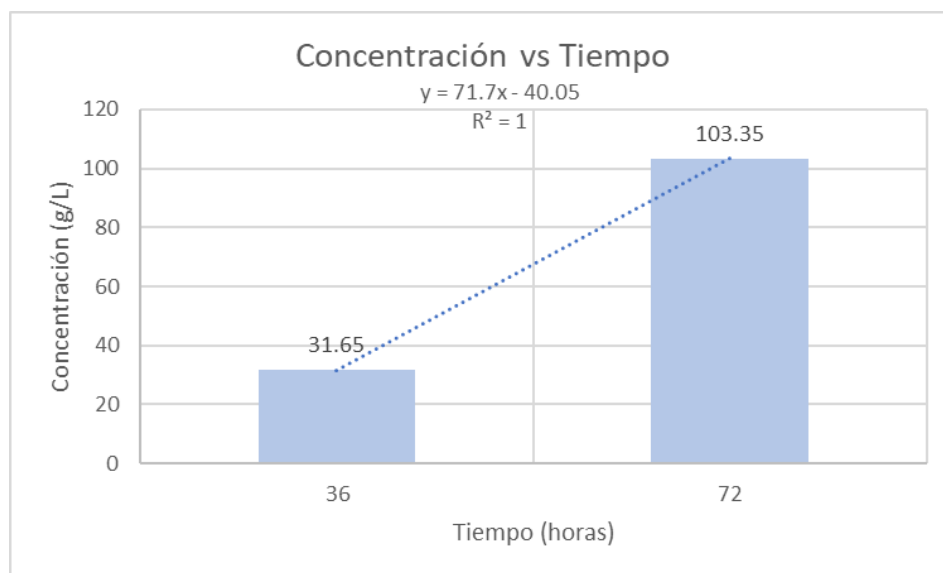


Figura 18. Gráfico del aumento de azúcares durante la hidrólisis 5.

4.4. Análisis experimental para la hidrólisis enzimática ácida.

El análisis de los resultados se realizó armando un diseño experimental analizando un factor para cada caso.

4.4.1. Factores de estudio: enzima utilizada

Para analizar el factor de la enzima utilizada se armó el siguiente diseño a partir de las lecturas de absorbancia y concentraciones de azúcar obtenidas al final de la hidrólisis 1 e hidrólisis 2.

Factor: Enzima.

Variantes: Enzima celulasa *Aspergillus Níger* y enzima Ctec 2.

Variable respuesta: Concentración de azúcares (g/L).

Objetivo: ¿Es el tipo de enzima un factor significativo para la concentración de azúcares que se obtiene al final de las hidrólisis 1 y 2?

La tabla 12 muestra las lecturas de absorbancia por triplicado de la muestra final de la hidrólisis 1 (usando la enzima celulasa de *Aspergillus Níger*) y de la hidrólisis 2 (usando la enzima CTec 2). La Tabla 13 muestra la concentración de azúcares de las lecturas de la Tabla 12. Estas concentraciones se utilizaron para armar el análisis de varianza (ANOVA) de la Tabla 14. Para el análisis de varianza se empleó el software Microsoft Excel. El resultado del análisis demuestra que sí existe diferencia significativa entre las concentraciones finales medias de la hidrólisis 1 y 2, al cambiar el tipo de enzima.

Tabla 12. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 1 y 2.

	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
Enzima celulasa <i>Aspergillus Níger</i>	0.658	0.657	0.670
Enzima CTec 2	0.561	0.556	0.558

Tabla 13. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 1 y 2.

	Lectura 1 (g/L)	Lectura 2 (g/L)	Lectura 3 (g/L)	Media (g/L)
Enzima celulasa Aspergillus Níger	173.6	173.3	176.8	174.6
Enzima CTec 2	147.7	146.4	146.9	147

Hipótesis nula: No existe diferencia entre las medias. ($F_{\text{ratio}} = F_{\text{Fisher}}$)

Hipótesis alterna: Existe diferencia entre las dos medias. ($F_{\text{ratio}} > F_{\text{Fisher}}$)

Tabla 14. Análisis ANOVA de un factor: Enzima.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F ratio
Total	1148.27	5	-	-
Tratamientos	3799.61	1	3799.61	1812.21
Residual	8.387	4	2.097	-

Tabla F 1,4 (5%) = 4.545

Como $F_{\text{ratio}} > F_{\text{Fisher}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.4.2. Factor de estudio: Estado físico del sustrato

Para analizar el factor del estado físico del sustrato utilizado se armó el siguiente diseño a partir de las lecturas de absorbancia y concentraciones de azúcar obtenidas al final de la hidrólisis 2 e hidrólisis 3.

Factor: Estado físico del sustrato

Variantes: Sustrato sólido y sustrato líquido

Variable respuesta: Concentración de azúcares (g/L).

Objetivo: ¿Es el estado físico del sustrato un factor significativo para la concentración de azúcares que se obtiene al final de las hidrólisis 2 y 3?

La Tabla 15 muestra las lecturas de absorbancia por triplicado de la muestra final de la hidrólisis 2 (usando el sustrato sólido de la explosión de vapor a 180 °C) y de la hidrólisis 3 (usando el sustrato líquido de la misma explosión de vapor). La Tabla 16 muestra la concentración de azúcares de las absorbancias de la Tabla 15. Estas concentraciones se utilizaron para armar el análisis de varianza de la Tabla 17. El resultado del análisis demuestra que sí existe diferencia significativa entre las concentraciones finales medias de la hidrólisis 2 y 3, al cambiar el estado físico del sustrato; es decir, si se usan los sólidos y los líquidos obtenidos en el proceso de explosión con vapor.

Tabla 15. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 2 y 3.

	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
Sustrato sólido	0.561	0.556	0.558
Sustrato líquido	0.318	0.328	0.327

Tabla 16. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 2 y 3.

	Lectura 1 (g/L)	Lectura 2 (g/L)	Lectura 3 (g/L)	Media (g/L)
--	-----------------	-----------------	-----------------	-------------

Sustrato sólido	147.7	146.4	146.9	147
Sustrato líquido	51.8	53.5	53.3	52.8

Hipótesis nula: No existe diferencia entre las medias. ($F_{ratio} = F_{Fisher}$)

Hipótesis alterna: Existe diferencia entre al menos dos medias. ($F_{ratio} > F_{Fisher}$)

Tabla 17. Análisis ANOVA de un factor: Estado físico del sustrato.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F ratio
Total	13291.33	5	-	-
Tratamientos	44296.01	1	44296.01	70220.1
Residual	2.523	4	0.630817	-

Tabla F 1,4 (5%) = 4.545

Como $F_{ratio} > F_{Fisher}$, entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.5.3. Factor de estudio: Temperatura del pretratamiento

Para analizar el factor de la temperatura del pretratamiento con explosión de vapor utilizado se armó el siguiente diseño a partir de las lecturas de absorbancia y concentraciones de azúcar obtenidas al final de la hidrólisis 3 e hidrólisis 4.

Factor: Temperatura de pretratamiento con explosión de vapor

Variantes: Temperatura de severidad de 180 °C por 10 minutos y temperatura de severidad de 165 °C por 10 minutos.

Variable respuesta: Concentración de azúcares (g/L).

Objetivo: ¿Es la temperatura del pretratamiento un factor significativo para la concentración de azúcares que se obtiene al final de las hidrólisis 3 y 4?

La Tabla 18 muestra las lecturas por triplicado de la muestra final de la hidrólisis 3 (usando el sustrato líquido de la explosión de vapor a 180 °C) y de la hidrólisis 4 (usando el sustrato líquido de la explosión de vapor a 165 °C). La Tabla 19 muestra la concentración de azúcares de las absorbancias de la Tabla 18. Estas concentraciones se utilizaron para armar el análisis de varianza de la Tabla 20. El resultado del análisis demuestra que sí existe diferencia significativa entre las concentraciones finales medias de la hidrólisis 3 y 4, al cambiar la temperatura del pretratamiento.

Tabla 18. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 3 y 4.

	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
Temperatura de severidad de 180 °C por 10 min.	0.318	0.328	0.327
Temperatura de severidad de 165 °C por 10 min	0.101	0.097	0.099

Tabla 19. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 3 y 4.

	Lectura 1 (g/L)	Lectura 2 (g/L)	Lectura 3 (g/L)	Media (g/L)
Temperatura de severidad de 180 °C por 10 minutos.	51.83	53.5	53.3	52.87
Temperatura de severidad de 165 °C por 10 minutos.	39.16	37.5	38.3	38.32

Hipótesis nula: No existe diferencia entre las medias. (F ratio = F Fisher)

Hipótesis alterna: Existe diferencia entre al menos dos medias. ($F_{\text{ratio}} > F_{\text{Fisher}}$)

Tabla 20. Análisis ANOVA de un factor: Temperatura de severidad.

	Suma cuadrados	de Grados libertad	de Cuadrado medio	F ratio
Total	320.88	5	-	-
Tratamientos	1059.48	1	1059.48	1393.29
Residual	3.042	4	0.76	-

Tabla F 1,4 (5%) = 4.545

Como $F_{\text{ratio}} > F_{\text{Fisher}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.4.4. Factor de estudio: Número de recirculaciones

Para analizar el factor de la recirculación del pretratamiento con explosión de vapor utilizado se armó el siguiente diseño a partir de las lecturas de absorbancia y concentraciones de azúcar obtenidas al final de la hidrólisis 3 e hidrólisis 5, pues sus condiciones de pretratamiento son las mismas.

Factor: Número de recirculaciones en el pretratamiento con explosión de vapor

Variantes: Una recirculación y tres recirculaciones.

Variable respuesta: Concentración de azúcares (g/L).

Objetivo: ¿Es el número de recirculaciones en el pretratamiento un factor significativo para la concentración de azúcares que se obtiene al final de las hidrólisis 3 y 5?

La Tabla 21 muestra las lecturas por triplicado de la muestra final de la hidrólisis 3 (realizando una recirculación en el pretratamiento) y de la hidrólisis 5 (realizando una triple recirculación en el pretratamiento). La Tabla 22 muestra la concentración de azúcares de las absorbancias de la Tabla 21. Estas concentraciones se utilizaron para armar el análisis de varianza de la Tabla 23. El resultado del análisis demuestra que sí existe diferencia significativa entre las concentraciones finales medias de la hidrólisis 3 y 5, al cambiar el número de recirculaciones en el pretratamiento.

Tabla 21. Lecturas de absorbancia final de las hidrólisis 3 y 5.

	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
Una recirculación a 180 °C por 10 minutos.	0.318	0.328	0.327
Tres recirculaciones a 180 °C por 1 segundo cada una.	0.067	0.061	0.078

Tabla 22. Concentración de azúcares final de las hidrólisis 3 y 5.

	Lectura 1 (g/L)	Lectura 2 (g/L)	Lectura 3 (g/L)	Media (g/L)
Una recirculación a 180 °C por 10 minutos.	51.83	53.5	53.3	52.87
Tres recirculaciones a 180 °C por 1 segundo cada una.	100	90	118.3	38.32

Hipótesis nula: No existe diferencia entre las medias. ($F \text{ ratio} = F \text{ Fisher}$)

Hipótesis alterna: Existe diferencia entre al menos dos medias. ($F \text{ ratio} > F \text{ Fisher}$)

Tabla 23. Análisis ANOVA de un factor: Número de recirculaciones en el pretratamiento.

Suma de cuadrados	de Grados libertad	de Cuadrado medio	F ratio
-------------------	--------------------	-------------------	---------

Total	4149.108	5	-	-
Tratamientos	12445.06	1	12445.06	120.36
Residual	416.59	4	103.39	-

Tabla F 1,4 (5%) = 4.545

Como $F \text{ ratio} > F \text{ Fisher}$, entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.5. Cuantificación de azúcares en las muestras tomadas durante la fermentación.

Posterior a los ensayos de hidrólisis, se realizó la fermentación del sustrato hidrolizado 5 (es decir, el producto líquido de la hidrólisis a 180 °C con tres recirculaciones, por 1 segundo cada una, durante el pretratamiento), por su mayor concentración de azúcares. Aunque el líquido de la hidrólisis 3 presenta un mayor porcentaje de azúcares finales con respecto a la concentración inicial de la primera muestra, la cantidad neta de azúcares no es suficiente para tener cantidades medibles de etanol, por esta razón no se eligió este líquido hidrolizado para la fermentación. Además, se decidió realizar la fermentación usando una hidrólisis del sustrato líquido obtenido de la explosión de vapor, esto con el objetivo de aprovechar los residuos de procesos de producción de biomateriales los cuales utilizan toda la porción sólida del pretratamiento.

La fermentación tuvo una duración total de 48 h. Se tomaron tres muestras de líquido, una al iniciar la fermentación y dos cada dos horas. Después, se tomó una muestra más pasadas tres horas desde la última toma. Finalmente, se tomaron tres muestras más a las 24, 36 y 48 horas después de iniciada la fermentación. Para conocer el avance de la fermentación se cuantificó el contenido de azúcares, de todas las muestras tomadas durante la fermentación, usando el método fenol sulfúrico. La Tabla 24 muestra la evolución de la concentración de azúcares durante la fermentación, la Figura 16 muestra una disminución de 67.19 g/l de azúcares con respecto a la primera muestra del líquido de la fermentación, dejando en evidencia el consumo de azúcares.

Tabla 24. Concentración de azúcares en el sustrato durante la fermentación de la hidrólisis 5 (a 180 °C con tres recirculaciones, por 1 segundo cada una).

Muestra	Absorbancia	Concentración (g/L)	Tiempo (h)
0	0.069	103.45	0
1	0.068	102.30	2
2	0.066	98.60	4
3	0.061	90.20	7
4	0.377	61.66	24
5	0.298	48.50	36
6	0.224	36.16	48

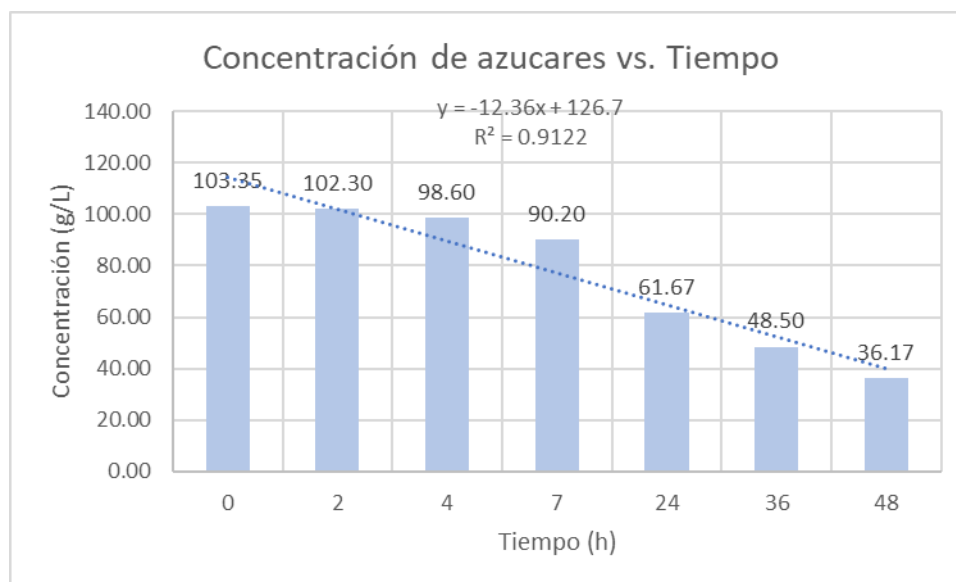


Figura 19. Evolución gráfica de la concentración de azúcares durante la fermentación de la hidrólisis 5.

4.6. Cuantificación de alcohol: método de micro difusión

Posterior a la fermentación, la cuantificación de alcohol presente se realizó utilizando el método de Winnick o de micro difusión. El método se aplicó para las muestras tomadas de la fermentación. Las muestras fueron diluidas al 1% v/v con agua destilada y el volumen de

titulación, que se observa en la tabla 25, es de tiosulfato 0.1 N. La Tabla 26 expresa las concentraciones de etanol obtenidos en cada muestra.

Tabla 25. Volúmenes de titulación para cada muestra

Muestra	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Vol. (ml)	24	23.1	23.7	23	24.1	24	24	23.6

Tabla 26. Etanol cuantificado

Muestra	1	2	3	4	5	6	7
C. (g/L)	1.0359	0.3453	1.151	-	-	-	0.4606

Se realizó una segunda cuantificación de las mismas muestras, cambiando el porcentaje de dilución. Las muestras fueron diluidas al 10% v/v con agua destilada y el volumen de titulación, que se observa en la tabla 27, es de tiosulfato 0.1 N. La Tabla 28 expresa las concentraciones de etanol obtenidos en cada muestra.

Tabla 27. Volúmenes de titulación para cada muestra.

Muestra	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Vol. (ml)	24	19.2	19.6	20	19.6	19.5	19.8	19.5

Tabla 28. Etanol cuantificado

Muestra	1	2	3	4	5	6	7
C. (g/L)	0.5525	0.5064	0.4604	0.5064	0.5179	0.4834	0.5179

Se realizó una tercera cuantificación de las mismas muestras, cambiando el porcentaje de dilución. Las muestras fueron diluidas al 50% v/v con agua destilada; sin embargo, en esta cuantificación no hubo viraje.

4.7. Cuantificación de etanol: Destilación simple y método del picnómetro

Como alternativa al primer método de cuantificación, se realizaron dos destilaciones simples del líquido al final de la fermentación. El contenido extraído por la destilación fue aforado en un picnómetro de 50 ml. Luego se obtuvieron los resultados indicados en la tabla 30, estos valores de contenido de etanol son resultados de la fermentación del líquido de la hidrólisis 5. En total, el volumen fermentado fue de 1600 ml (34 ml de sustrato líquido y 1566 ml de buffer). Considerando estas diluciones, el contenido de etanol se expresa en la última columna como gramos por mililitro de sustrato líquido.

Tabla 29. Tabla de pesos y densidades del método del picnómetro.

Muestra	Masa del picnómetro o vacío (g)	Masa del picnómetro con destilado (g)	Masa del picnómetro con agua (g)	Densidad del líquido a 15 °C.	Gramos de etanol por 100 ml de solución	Concentra ción de etanol (g/ml)
1	40.9143	91.1903	91.2130	0.9995	0.26	0.061
2	32.7897	82.2719	82.3063	0.9993	0.37	0.087

Capítulo 5. Discusiones

5.1. Discusión resultados explosión con vapor

Con relación a la explosión con vapor luego de realizar las corridas experimentales modificando condiciones de operación como la temperatura, tiempo de residencia, cantidad de materia prima y cantidad de agua que se usa en el equipo de explosión con vapor se menciona que los valores de las mejores condiciones son a 180 °C por 1 segundo cuando el equipo alcanza dicha temperatura, relación de agua: biomasa de 3: 1 usando 150 g de materia prima y empleando método de recirculación para enriquecer con azúcares el líquido residual. Luego se establecen las siguientes comparaciones teniendo en cuenta que la explosión de vapor se considera un proceso de pretratamiento para el desarrollo eficiente de una posterior hidrólisis enzimática.

Al revisar las condiciones de pretratamiento de explosión con vapor que presentan los artículos que se mencionan en los siguientes párrafos, se observa que las condiciones utilizadas para esta investigación fueron las adecuadas y se encuentran dentro del rango de operación de temperatura desde los 150 a 210 °C, al igual que los tiempos de residencia que dependen de la presión y se encuentran dentro de un rango de 6 minutos hasta los 25 minutos, siendo la mejor un tiempo de 10 minutos en la mayoría de los casos porque permite un correcto fraccionamiento de las fibras. En relación con la cantidad de sustrato colocado en el equipo depende de los procesos posteriores a realizar y de las enzimas que se utilizan, así como de las limitaciones del equipo.

En el trabajo de Estrada & Weber (2022), donde se emplea bagazo de agave, se menciona que las condiciones de operación de la explosión con vapor fueron a 179 °C de temperatura, durante un periodo de tiempo de 22 minutos y con una presión de trabajo de 0.98 MPa, dando como resultado la cantidad necesaria de inóculo para sus hidrólisis el cual está en una relación 2:1 de agua: bagazo. En otro trabajo se indica que las condiciones de operación varían levemente dependiendo del equipo empleado; sin embargo, las condiciones de operación de temperatura son de 210 °C durante un tiempo de residencia de 10 minutos almacenando el material obtenido de manera residual en bolsas plásticas evitando el ingreso de aire, usando como materia prima las astillas de madera de abedul (Mulat et al., 2018). Adicionalmente, Espinoza et al. (2021) menciona que para el tratamiento del sustrato de biomasa de paja de arroz en varios estudios analizados se trabaja con condiciones de 200

°C con diferentes tiempos de 1, 1.5 y 2 minutos dando como resultado una eficacia mayor a 45% en los procesos posteriores. En este trabajo se empleó una relación agua: biomasa de 2:1.

En el caso de los tratamientos con cascarilla de arroz se presenta una relación de agua: biomasa de 5:1. Piñeros et al., (2011) y Naveda et al., (2019) mencionan que las condiciones de operación fueron a 190 °C durante un periodo de 10 a 25 minutos y de 130 a 180 °C durante un rango de 6 a 8 minutos colocando de manera inicial 300 g de sustrato de cascarilla de arroz.

5.2. Discusión de los resultados de la hidrólisis

El proceso de hidrólisis enzimática utilizado en la investigación presenta resultados exitosos ya que existe un aumento en la cantidad de azúcares en todos los casos. Las condiciones óptimas de este proceso se complementan con el residuo obtenido del pretratamiento de explosión con vapor. Por lo que, en la hidrólisis realizada, las variables fueron el tipo de enzima celulasa, la cantidad de enzima a utilizar en relación a la cantidad de muestra a hidrolizar, tiempo de hidrólisis en un rango de 36 a 72 h, número de revoluciones por minuto de las aspas del biorreactor y el pH del ambiente (buffer) en un rango de 4.5 a 4.8. Se tiene como mejor resultado la hidrólisis del experimento número 5 (es decir, cuando se emplea el líquido de la explosión con vapor a 180°C por 1 segundo, con recirculación del líquido por 3 veces) debido a que el residuo hidrolizado es obtenido mediante el método de recirculación. Se establecen comparaciones con los siguientes estudios donde ha hidrolizado biomasa que ha sido modificada con pretratamiento de explosión con vapor.

En el caso de estudio de Yao et al. (2021), se realiza una hidrólisis enzimática ácida para un sustrato de bagazo de caña en estado sólido con las siguientes condiciones: pH: 4.8, temperatura de operación: 50 °C, enzimas Celulasa y B-glucosidasa relación de agua: biomasa 3:1. Dicha combinación de enzimas es similar al cóctel enzimático CTec 2 utilizado en este trabajo. La principal diferencia entre las hidrólisis de bibliografía y este trabajo es la concentración de enzimas, el tiempo de hidrólisis y el contenido final de azúcares de la biomasa de bagazo de caña de azúcar, siendo el mejor contenido final el obtenido por las condiciones de la hidrólisis 1. Para el caso de la hidrólisis 1, la Tabla 3 nos muestra que al final de las 72 h la concentración de azúcares C5-C6 es de 174 g/L. La Figura 12 muestra el incremento de la concentración durante los tres días, resultando en un aumento de 53 g/L de C5-C6. Yao et al. (2021) consiguió un promedio de 38 g/L de C5-C6 en un tiempo similar de 70 h, cambiando la concentración de enzima celulasa entre 15 a 35 FPU por g de sólido.

En la hidrólisis 2, la tabla 5 y la figura 13 indican el aumento de la concentración de azúcares, obteniendo 68.28 mg por 50 g de sólido utilizado como materia prima. En el estudio de Durán-

Cruz et al. (2021) se realiza una hidrólisis enzimática ácida utilizando el mismo pretratamiento, un sustrato similar (bagazo) y una concentración de Cellic Ctec 2 variando desde 0.12 a 3.6 mg/g de sustrato. El valor de carbohidratos totales obtenidos en el caso estudiado es de 0.7 mg por cada gramo de sustrato mientras que, para el presente estudio, por cada gramo de sustrato sólido pretratado se puede obtener 1.37 mg de azúcares. Para el caso de las hidrólisis 3 y 4, las concentraciones obtenidas son muy inferiores debido a la diferencia en el sustrato utilizado. La razón por la que estas dos hidrólisis realizadas en nuestra investigación no son eficientes es por el residuo de explosión con vapor utilizado (para estos casos la porción líquida), siendo el contenido de azúcares muy inferior.

Comparando los resultados de Yao et al. (2021) y Duran-Cruz et al. (2021) con la última hidrólisis realizada en el trabajo, la concentración de azúcares aumenta notablemente al final de la hidrólisis 5. La producción de azúcares totales es de 71.7 g/L, obteniendo cerca de 2.1 mg por cada ml de líquido residual hidrolizado. La diferencia entre los estudios mencionados y este trabajo radica en la recirculación del líquido residual durante el pretratamiento de la muestra. Por otro lado, las condiciones de trabajo para la hidrólisis (como tiempo de reacción, temperaturas y velocidad de agitación) son similares.

5.3. Discusión de resultados fermentación

En el proceso de fermentación se trabajó a 35 °C, con un pH de 4.8 en un periodo de tiempo de 48 horas y flujo de nitrógeno de 0.5 L/min. En este proceso se fermentó todo el líquido hidrolizado incluyendo el buffer y el microorganismo fermentativo (levadura de *Saccharomyces cerevisiae* en proporción de 10 g por litro de muestra), dando como resultado una cantidad de 87 g/L. A continuación se procede a realizar la comparación con las condiciones y resultados del proceso de fermentación en diferentes artículos de la literatura académica.

Existen investigaciones de producción de bioetanol donde el proceso fermentativo es de tipo anaerobio y en biorreactores. En la investigación de Tejeda et al. (2010), los autores trabajan la fermentación a 30 °C en un tiempo de 5 h y los agitadores a 200 rpm, tomando muestras en un intervalo de 90 minutos. Como resultado se observó la formación de 13.98 g/L, usando cáscara de naranja como materia prima y 1.22 g/L con cáscara de piña.

Otro estudio empleando otros tipos de pretratamientos como el de líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca para disminuir la cantidad de lignina, seguidos de sacarificación y fermentación simultánea donde utiliza la levadura de tipo *S.Cerevisae* a una temperatura de 40 °C y a 72 h y 300 rpm para la agitación, dio como resultado una concentración de 1.2 g/L de etanol a partir de residuos forestales como eucalipto (Juri, 2011).

En relación a la fermentación alcohólica tradicional en el trabajo de Oscar et al. (2013) se usa 2 tipos de microorganismos, *Saccharomyce Cerevisiae* y *Clavispora Lusitanae*, dentro de un biorreactor con capacidad de volumen de 3 L a una temperatura de 25 °C y un valor de pH de 5.5 a una velocidad de agitación de 200 rpm en un periodo de 48 h, dando como resultado una producción de etanol de 10.68 g/L, usando como materia prima jugo de fique.

La selección de las condiciones de fermentación implica una serie de estudios de experimentación. Sin embargo, Niklitschek (2010) menciona que la fermentación se da en un agitador de tipo rotatorio a una velocidad de 300 rpm a una temperatura de 40 °C y un tiempo de 48 h, produciendo etanol a 10.4 g/L a partir del residuo forestal conocido como lenga. Los procesos fermentativos del almidón de vituca (Montenegro & Pérez, 2015) y la investigación de Herrea & Meers (2013) realizan fermentación en un pH ácido de 5.5 a 6, debido a que es el ambiente adecuado para que los microorganismos fermentativos actúen. El artículo de Olmedo (2017) menciona que se obtiene 15.33 g/L de etanol, donde el proceso de fermentación se realiza a una temperatura de 25 °C y un agitador magnético a 50 rpm, tomando muestras cada 2 h, para determinar la cantidad de azúcares y así terminar la fermentación a las 48 h.

En base a la revisión de resultados indicada, donde el proceso de fermentación tiene similares condiciones ya sea de tiempo (48 a 72 horas), temperatura (25 °C a 50 °C) y velocidad del agitador (200 a 300 rpm), y utilizando medios de cultivo en diferentes concentraciones de *S. Cerevisiae*, se observa que estas condiciones son semejantes a las utilizadas en esta investigación. Por lo tanto, los parámetros de trabajo son respaldados por la literatura académica. Sin embargo, los rendimientos de producción de etanol en el presente trabajo, usando explosión con vapor a 180 °C por 10 minutos y recirculando el líquido obtenido por 3 veces, son mayores a los reportados en la literatura, debido principalmente al efecto de la recirculación del líquido de trabajo; es decir, el empleo sucesivo (hasta 3 veces) del producto líquido del proceso de explosión con vapor de las hojas y puntas de la caña de azúcar. Estos resultados sugieren que la recirculación de dicho líquido favorece la producción y/o concentración de materiales que permiten la formación de azúcares en el proceso de hidrólisis. Al mismo tiempo, la recirculación permite ahorros significativos de agua empleado en el proceso de explosión por vapor, lo que es de interés desde el punto de vista ambiental.

5.3. Discusión de resultados de cuantificación de etanol

En esta sección se presenta la comparación de las condiciones de operación del biorreactor durante y luego del proceso de fermentación, así como la disminución de azúcares de la muestra para corroborar que existe la formación de bioetanol. En el artículo de Kumar & Prakash (2023) se realiza la fermentación de azúcares simples mediante la adición de levadura en proporción de 1% peso/volumen; es decir, 10 g de levadura por cada Litro de muestra previamente hidrolizada. El periodo de fermentación fue de 9 a 25 días, variando la temperatura desde 24 °C a 36 °C, teniendo como resultado un rendimiento de bioetanol de 0.21 ml/g. A su vez, en Gómez et al. (2022) el proceso fermentativo implica un periodo de 48 h a 37°C, utilizando como microorganismo fermentativo *Zimomonas mobilis* en proporción de 1% p/v, con un rendimiento del 12.5% p/p de bioetanol/bagazo. Eriola et al. (2023) usaron fruta del pan (del género *Artocarpus Altilis*) como sustrato para conseguir bioetanol en un rendimiento del 5% V/V considerando un tiempo de 20.41 h de fermentación a 30 °C y 200 rpm. Finalmente, otro tipo de biomasa considerada para la producción de bioetanol ha sido el mucílago de cacao que, con el uso de *Saccharomyces Cerevisiae* y las condiciones de operación que involucren el biorreactor discontinuo de capacidad de 2 Litros, el volumen de fermentación de 1,6 L con agitación continua de 200 rpm y un tiempo de 30 a 96 h, dio como resultado un rendimiento de 25.41 g/L (Delgado et al., 2021).

Todos los estudios indicados realizan la fermentación de sustratos previamente hidrolizados para la obtención de bioetanol empleando normalmente 1% p/v de levadura (es decir al menos 10 g de levadura por litro de muestra) dentro del biorreactor y una agitación de 200 rpm, a temperaturas entre 30 °C a 60 °C, por lo que los parámetros utilizados en los procesos de investigación son adecuados para obtener un porcentaje de bioetanol considerable. Estos parámetros de trabajo están en el rango de valores utilizados en el presente trabajo.

Capítulo 6. Conclusiones

6.1.-Conclusión resultados explosión de vapor

La explosión con vapor es un pretratamiento necesario para procesar la biomasa y así poder generar biocombustible, debido a que tiene como objetivo principal generar una ruptura mecánica de las fibras de la biomasa mediante una caída de presión y liberar la celulosa para que esta sea hidrolizada de manera eficiente. Este proceso se puede realizar con la mayoría de biomasa generada a partir de residuos agroindustriales; sin embargo, se requiere de diferentes condiciones de trabajo, que dependen de la estructura y origen de biomasa, por lo que es necesario realizar varias experimentaciones modificando tiempo, temperatura, o cantidad de agua en relación con la cantidad de masa previo a colocar en el equipo de explosión con vapor, todo ello relacionado con las características del equipo a utilizar.

Luego de realizar las pruebas posteriores de hidrólisis enzimática y la respectiva cuantificación de azúcares se concluye que las mejores condiciones para usar en el equipo y obtener residuos tanto sólidos como líquidos en buenas condiciones y aptos para continuar con la investigación fueron a 180 °C de temperatura por 1 segundo es decir que cuando el equipo alcanza la temperatura de 180 °C realiza la explosión de inmediato, 150 g de sustrato vegetal seco (hojas y cogollos de caña de azúcar) y 3 litros de líquido (agua y líquido recirculado) para que ocurra la explosión con vapor, dando como resultado 1450 ml de residuo líquido, usando el método de recirculación explicado en la sección 3.2 y en el diagrama de la figura 5.

6.2. Conclusiones de cuantificación de azúcares y análisis ANOVA

Al realizar un análisis de varianza con los resultados de la cuantificación de los azúcares posterior al proceso de hidrólisis enzimática (Tablas 12, 15, 18 y 21) se concluye que al considerar los factores: enzima, estado físico del sustrato, temperatura de pretratamiento y número de recirculaciones existen diferencias significativas en el análisis estadístico en valores del ANOVA. Esto implica que al usar un tipo diferente de enzima ya sea la *Aspergillus Níger* o la *Ctec 2* existe una diferencia notable en el aumento de la cantidad de azúcares ya que en la figura 14 se visualiza que el aumento total de azúcares es de 53.06 g/L usando la *Aspergillus Níger* y en el caso de la *Ctec 2* que se representa en la figura 18 el aumento es de 68.28 g/L. Entonces, se concluye que la enzima que arroja mejores resultados es la *Ctec 2*.

En relación con el factor del estado físico del sustrato existe una diferencia al usar el sustrato en estado sólido y en estado líquido, ya que al realizar el ANOVA representado en la tabla 17

existe diferencia ya que en la hidrólisis 2 según la figura 15 el aumento de los azúcares es de 68.28 g/L y en la hidrólisis 3 el aumento de los azúcares es de 41.5 g/L según la figura 16 por lo que se concluye que es mejor trabajar con el sustrato líquido. El factor de temperatura del pretratamiento de explosión con vapor es determinante para obtener condiciones ideales del líquido a hidrolizar. Esto se visualiza en la Tabla 20 según el ANOVA, además se evidencia el aumento de azúcares de 41.5 g/L según la figura 16 cuando el pretratamiento se da a una temperatura de 180 °C y a una temperatura de 165 °C durante 10 minutos, el aumento es de

16.25 g/L según la figura 17.

Finalmente, el factor del número de recirculaciones se evidencia en la Tabla 23 el ANOVA, donde se visualiza la diferencia entre usar 1 recirculación y 3 recirculaciones, ya que en la figura 16 el aumento de azúcares de la hidrólisis 3 es de 44.5 g/L y en la figura 16 el aumento de azúcares de la hidrólisis 5 es de 71.7 g/L concluyendo que es más eficaz realizar 3 recirculaciones. Finalmente, el mejor proceso de hidrólisis se dio en el experimento 5, donde se usó los residuos líquidos de la explosión de vapor a 180 °C por 1 segundo y con recirculación. Esto se concluye ya que en la cuantificación de azúcares resultó ser la muestra que más incrementa con relación a la cantidad de azúcares iniciales, la cantidad de azúcar inicial en la primera muestra de esta hidrólisis fue de 31.5 g/L y aumentaron a 103.45 g/L al final, estos datos se pueden apreciar en la figura 17.

6.3. Conclusiones proceso de fermentación y obtención de bioetanol

Finalmente, el proceso de fermentación fue exitoso porque se evidencia la disminución de azúcares y al cuantificar la muestra fermentada se determina la existencia de bioetanol.

Luego de realizar las pruebas necesarias a la muestra obtenida de la hidrólisis 5, como resultado de la fermentación se corrobora que corresponde a bioetanol de segunda generación. Se efectuaron 2 pruebas, el método de micro difusión y el método de destilación simple con picnómetro. La prueba que involucra el método de micro difusión no presentó resultados válidos debido a que la cantidad de etanol es mayor a la que puede medir a pesar de haber realizado las diluciones necesarias, por lo que la alternativa de destilación simple permite destilar la cantidad de alcohol y así con la tabla de densidades se concluye que existe

0.087 gramos de etanol por ml de sustrato líquido.

Referencias

- Abas, N., Kalair, A. & Khan, N. (2015). *Review of fossil fuels and future energy*. Futures. Volume 69. 31-49.
- Aguiar, S., Enríquez, M. & Uvidia, H. (2022). *Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento*. Universidad Estatal Amazónica. Puyo, Ecuador.
- Aguilar-Rivera, N. (2007). *Bioetanol de la caña de azúcar*. Avances en investigación Agropecuaria, 11(3), 25-39.
- Álvaro H.M. José, Esperidiana A.B. Moura, Durval Rodrigues Jr, Eduardo K. Kleingesinds, Rita C.L.B. Rodrigues.A (2022). *A residue-free and effective corncob extrusion pretreatment for the enhancement of high solids loading enzymatic hydrolysis to produce sugars*. Industrial Crops and Products, 188, 115655.
- Bauer, S., Sorek, H., Mitchell, V. D., Ibanez, A. B., & Wemmer, D. E. (2012). *Characterization of Miscanthus giganteus lignin isolated by ethanol organosolv process under reflux condition*. Journal of agricultural and food chemistry, 60(33), 8203-8212.
- Barrera Vela, R. N., & Reyes Muro, J. L. (2015). *Optimización de los parámetros del proceso de fermentación del jugo de caña para obtener bioetanol en la planta piloto de alcohol de la facultad de Ingeniería Química-UNAP*.
- Betiku, E., Olatoye, E. O., & Latinwo, L. M. (2023). *Bioprocessing of underutilized Artocarpus altilis fruit to bioethanol by Saccharomyces cerevisiae: A fermentation condition improvement study*. Journal of Bioresources and Bioproducts, 8(2), 125-135.
- Benítez, L. T., Tovar, C. T., Ortiz, Á. V., Dunoyer, A. T., Alvear, M., Castillo, C., ... & Madariaga, N. (2010). *Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña*. Revista Educación en Ingeniería, 5(10), 120-125.
- Bonilla, H. R., Balón, C. M., Moreno, A. P., & Pesantez, F. R. (2019). *Estudio cinético de la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales de la cáscara de banano maduro*. Industrial data, 22(1), 187-194.
- Caliz, C., & Jesús, O. (2017). *Obtencion de bioetanol a partir de tallos de maiz*.
- Carranza, A. (2013). *Obtención de glucosa a partir de aserrín de encino pretratado con reactivos alcalinos, seguido por hidrólisis enzimática*. Centro de investigación de materiales avanzados. Chihuahua, Chihuahua. 50.

- Callejas, E. S., & Quezada, V. G. (2009). *Los biocombustibles*. El cotidiano, (157), 75-82.
- Casco-Méndez, Gladys María, Diéguez-Santana, Karel, Sarduy-Pereira, Liliana, Vinocunga- Pillajo, Reni Danilo, Pomavilla-Guaminga, Shirley Isamar, & Pérez-Martínez, Amaury. (2022). *Diseño del proceso de obtención de bioetanol carburante mediante hidrólisis enzimática del bagazo de caña en Pastaza*. Centro Azúcar, 49(2), 35-46. Epub 01 de abril de 2022.
- Castillo, Y., Morales, J., Montalvo, P., & Visitación F, L. (2019). *Pretratamiento e hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 85(4), 476-488.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). *Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial*. Avances en ciencias e Ingeniería, 4(4), 15-46.
- Coronel, E. (2020). *Evaluación del potencial energético de los residuos agrícolas de cosecha (RAC) de la caña de azúcar para generar energía eléctrica en la Empresa Agroindustrial Pomalca S.A.A.* Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Da Silva, J., Chaves, R., Da Silva, A., Cunha, V., & De Amorim, A. (2013). *Extracción, adición y caracterización de hemicelulosas de mazorcas de maíz para el desarrollo de las propiedades de los papeles*. In Simposio Internacional Sobre Materiales Lignocelulósicos.
- De la Rosa, S. M. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos*.
- Delgado-Noboa, J., Bernal, T., Soler, J., & Peña, J. Á. (2021). *Kinetic modeling of batch bioethanol production from CCN-51 Cocoa Mucilage*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 128, 169-175.
- Delgado-Noboa, J., Peña, J. & Soler, J. (2018). *Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de cacao CCN-51 en un biorreactor tipo batch*. Actas de la VII Jornada de Jóvenes Investigadores del I3A. Vol. 6.
- Díaz, R. (2008). *Caracterización Energética del Bagazo de Caña de Azúcar del Ingenio Valdez*. Ecuador. CARBON, 24(23.48), 23-52.
- Duran-Cruz, V., Hernández, S. & Ortíz I. (2021). *Evaluation of steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis conditions for agave bagasse in biomethane production*. BioEnergy Research 14. 1328-1337.

- Dybiński, O., Milewski, J., Szczęśniak, A., Martsinchyk, A., & Szablowski, Ł. (2023). *Experimental investigation of porous anode degradation of a molten carbonate fuel cell fed with direct fermentation product composed of bioethanol*. International Journal of Hydrogen Energy.
- Espinosa, J., Pérez Rodríguez, J., Miret, J. J., & Caballero, M. T. (2010). *Medida de densidades con el picnómetro y de tensión superficial con el estalagmómetro*. Física.
- Espinosa Negrín, Ana María, López González, Lisbet Mailín, & Casdelo Gutiérrez, Neibys Lourdes. (2021). *Pretratamiento de biomásas celulósicas breve revisión de los principales métodos utilizados*. Centro Azúcar, 48(3), 108-119. Epub 01 de julio de 2021.
- Estrada-Maya, Andrea, & Weber, Bernd. (2022). *Biogás y bioetanol a partir de bagazo de agave sometido a explosión de vapor e hidrólisis enzimática*. Ingeniería, investigación y tecnología, 23(2), e1887. Epub 04 de noviembre de 2022.
- Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). *Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación*. Madera y bosques, 20(3), 11-24.
- Gandara, M., Goncalves, A. R., & Saron, C. (2017). *Composites of recycled PET and sugarcane fiber treated by steam explosion*. Matéria (Rio de Janeiro), 22(4).
- García, G. (2022). *Determinación de la cinética de fermentación y propiedades organolépticas de hidromiel*. Universidad de Cuenca.
- Gros, N. (2011). *Microdiffusion-based UV-LED spectrometric setup for determining low levels of ethanol in fruit juice*. Talanta, 87, 174-179.
- Gomes-da Silva, Z., Gálvez-Cantero, L., Gómez-Julián, A., Julián-Ricardo, M. & Ramos-Sánchez, L. *Análisis de alternativas tecnológicas de producción de etanol a partir de bagazo de caña*. Centro Azúcar, 49(2), 15-25.
- González-De León, M., & Scipio-Cimetta, S. (2022). *The role of natural gas in today's energy transition*. DYNA, 89(221), 92-100. Epub September 14, 2022.
- Gonzalez, R., Vera, R. E., Zambrano, F., Marquez, R., Vivas, K., Forfora, N. & Jameel, H. (2023). *Environmentally Friendly Oxidation Pretreatments to Produce Sugar-Based Building Blocks from Dyed Textile Wastes Via Enzymatic Hydrolysis*.
- Guerrero-Peña, A. (2017). *Residuos orgánicos de la agroindustria azucarera: retos y oportunidades*. Agro Productividad, 10(11).

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). *Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos*. Revista Iberoamericana de Micología, 32(1), 1-12.
- Hernández, J. (2015). *Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con Saccharomyces cerevisiae y simulación del proceso a escala industrial*. Universidad de Manizales. Colombia.
- Herrera Escobar, Á. D. J., & Meers Díaz, R. (2013). *Diseño de las etapas de hidrólisis de almidón y fermentación para producir bioetanol basado en la respuesta dinámica del sistema*. Universidad de Cartagena.
- Horn, S. J., Estevez, M. M., Nielsen, H. K., Linjordet, R., & Eijsink, V. G. (2011). *Biogas production and saccharification of Salix pretreated at different steam explosion conditions*. Bioresource Technology, 102(17), 7932-7936.
- Horvath, H. (1988). *Experimental investigation on the validity of the Lambert-Beer law at high particle concentrations*. Journal of Aerosol Science, 19(7), 837-840.
- INEC. (2021). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua*. Instituto nacional de estadística y censos.
- Juri Awad, S. A. (2011). *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca*.
- Kheang, L. S. (2016). *Biocombustibles de segunda generación de la biomasa de palma de aceite*. Palmas, 37, 137-148.
- Kumar, R., & Prakash, O. (2023). *Experimental investigation on effect of season on the production of bioethanol from wheat-stalk (WS) using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method*. Fuel, 351, 128958.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., Restrepo-Betancur, L. F. (2017). *Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales*. Revista Cubana de Química, 29(2), 180-198.
- López R., Torregroza, A., Salcedo, J., & Rodríguez, J. (2016). *Evaluación del rendimiento de alcohol por sacarificación-fermentación simultánea en ñame espinoso Alemán (Dioscorea rotundata P)*. Agronomía Colombiana, 34(1Supl), S577-S580.

- Luzardo, B., Ruíz, E. & Pérez, J. (2022). *Transformación de biomasa lignocelulósica en biocombustible de segunda generación: Estado del arte del pretratamiento*. Revista científica Facultad de ciencias básicas. Universidad Técnica de Manabí.
- Marín Morales, D. (2008). *Cuantificación de pérdidas indeterminadas de sacarosa y azúcares reductores totales en la producción de azúcar y Etanol y comparación de los métodos para la determinación de turbiedad y sacarosa real*.
- Martínez, M. P. S., Martín, R. L., Viguera, A. R. G., & Domínguez, E. G. E. (1995). *Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica*. Zubía, (7), 137-149.
- Montenegro Rojas, E. C., & Pérez Gavidia, Y. D. R. (2015). *Obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (Colacasia esculenta)*. Lambayeque.
- Montero De la Cruz, S. E. (2017). *Análisis de Ciclo de Vida de la Producción de Biocombustibles Líquidos (Butanol) a partir de Subproductos Lignocelulósicos (Pulpa de Remolacha)*.
- Mora, O. (2015). *Propuesta de alternativas hacia una producción sostenible de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia*. Revista Agricultura Orgánica.
- Mulat, D.G., Huerta, S.G., Kalyani, D. & Horn, S.J. (2018). Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. Biotechnology for biofuels, Vol. 11, 2018, pp. 1-15.
- Muñoz, M. (2019). *Recirculación de residuos de combustión al horno en calderas carboneras de ingenios azucareros*. Memora de presentación de resultados de investigación Zafra. Cengicaña. 507-514.
- Naveda Rengifo, Ricardo Aaron, Jorge Montalvo, Paola Aurelia, Flores del Pino, Lisveth, & Visitación Figueroa, Lizardo. (2019). *Remoción de lignina en el pretratamiento de cascarilla de arroz por explosión de vapor*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 85(3), 352-361.
- Negro, M. J., Martínez, J. M., Manero, J., Sáez, F., & Martín, C. (1990). *Efecto del pretratamiento con explosión por vapor en la hidrólisis enzimática de madera de eucalipto y bagazo de sorgo*. Centro de investigaciones energéticas, medioambientales, y tecnológicas.

- Niklitschek Contente, T. A. (2010). *Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol*.
- Núñez, R. Á., Pérez, B. R., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). *Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease*. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.
- Oliveira, L., Nascimento, V., Gonçalves, A. & Rocha, G. (2014). *Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw*. *Industrial crops and products* 58. 1-7.
- Oliveira, F., Pinheiro, I., Souto-Maior, A., Martin, C., Gonçalves, A. & Rocha, G. (2012). *Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products*. *Bioresource Technology* 130. 168-173.
- Organización Internacional de Estandarización. (1983). *Volatile organic liquids for industrial use-Determination of distillation characteristics (ISO 918:1983)*.
- Organización Internacional de Estandarización. (1981). *Ethanol for industrial use - Methods of test - Part 1: General (ISO 1388-1:1981)*.
- Orozco-Mosqueda, M., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-Pacheco, M., & Velázquez-Becerra, C. (2015). *La bacteria Arthrobacter agilis UMCV2 y diversas aminas inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera*. *Revista argentina de microbiología*, 47(3), 219-228.
- Ortiz, M., Moreno, G., Gómez, G. & Gonzáles, A. (2017). *Reporte de inteligencia tecnológica "Bioetanol"*. Instituto Mexicano del Petróleo.
- Paraschiv, S. & Paraschiv L. (2020). *Trends of carbon dioxide (CO₂) emissions from fossil fuels combustion (coal, gas and oil) in the EU member states from 1960 to 2018*. *Energy Reports*. Volume 6. 237-242.
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). *Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models*. *Journal of Biotechnology*, 243, 69-75.
- Piñeros-Castro, Yineth, Velasco, Gloria Amparo, Proaños, Jeimmy, Cortes, William, & Ballesteros, Ignacio. (2011). *Producción de azúcares fermentables por hidrólisis*

- enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión de vapor*. Revista ION, 24(2), 23-28.
- Popa, V. (2018). *1-Biomass for fuels and biomaterials. Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value*. Elsevier. 1-37.
- Ramos, C. G., Roque, V. Q., Mendoza, L. R., & Quiroz-Medina, C. R. (2022). *Los residuos generados en la producción de la industria azucarera en los últimos 25 años*. Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático, 8(16), 1979-1997.
- Romanelli, G. P., Ruiz, D. M., & Pasquale, G. A. (2016). *Química de la biomasa y los biocombustibles*. Series: Libros de Cátedra.
- Rodrigues, A. C., Haven, M. Ø., Lindedam, J., Felby, C., & Gama, M. (2015). Celluclast and Cellic® CTec2: saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and microbial technology*, 79, 70-77.
- Santana Castellano, D. (2010). *Simulación de una columna de destilación simple para una mezcla binaria de compuestos utilizados como biodiesel. Comparación entre un nuevo modelo propuesto y simuladores comerciales de ingeniería química*.
- Serrano-Jiménez, J., de la Osa, A. R., Rodríguez-Gómez, A., Sánchez, P., Romero, A., & de Lucas-Consuegra, A. (2023). *Electro-reforming of bioethanol produced by sugar fermentation on a Pt-Ni anodic catalyst supported on graphene nanoplatelets*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 11(3), 109703.
- Serrano-Ruiz, J. C., & de Sotomayor, R. L. Á. (2011). *Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías*. Anuales de la Real Sociedad Española de Química (No. 4, pp. 383-389). Real Sociedad Española de Química.
- Silva, A. (2020). *¿Cómo contabilizar el impacto ambiental de las empresas? El caso de las emisiones de gases de efecto invernadero*. Revista de Estudios Empresariales. Universitat Pompeu Fabra.
- Shi, Q., Abdel-Hamid, A. M., Sun, Z., Cheng, Y., Tu, T & Zhu, W. (2023). *Carbohydrate-binding modules facilitate the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Releasing reducing sugars and dissociative lignin available for producing biofuels and chemicals*. Biotechnology Advances, 108126.

- Hazel, J., Princess, J., Catalino G., Fidel, R., Ruby, L. & Jey, R. (2023). Hydrolysate production from sugarcane bagasse using steam explosion and sequential steam explosion-dilute acid pretreatment for polyhydroxyalkanoate fermentation. Volume 30.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *UV-VIS GENESYS Family Spectrophotometers user guide*. Revision A. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Urbaneja, G., Ferrer, J., Páez, G., Arenas, L., Colina, G., & Sandoval, L. (1997). *Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café*. Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Zulia.
- Vasco-Echeverri, O., Ramírez-Carmona, M., Vélez-Salazar, Y., & Giraldo-Ramírez, M. (2013). *Producción de bioetanol empleando fermentación tradicional y extractiva a partir de jugo de fique*. Hechos Microbiológicos, 4(2), 91-97.
- Vázquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. Ingeniería, investigación y tecnología, 8(4), 249-259.
- Velasco, A. (2020). *Una revisión general de los procesos para la producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulosa*. Universidad Santo Tomás. Colombia.
- Verdugo & Ortiz (2019). *Destilación simple y fraccionada: método de purificación de líquidos*.
- Wang, J., Zhang, X., Liu, J., Li, R., Zhou, J., Li, M. & Chen, H. (2023). *Steam explosion improves extractability, antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of the constituents of Java tea (*Clerodendranthus spicatus*)*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 86, 103350.
- Yao Liu, Xiaojie Zheng, Shunhui Tao, Lei Hu, Xiaodong Zhang & Xiaoqing Lin. (2021). *Process optimization for deep eutectic solvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse for cellulosic ethanol fermentation*. Renewable Energy, Volume 177. 259-267. ISSN 0960-1481.
- Yu, Y., Wu, J., Ren, X., Lau, A., Rezaer, H., Takada, M., Bi, X. & Sokhansanj, S. (2022). *Steam explosion of lignocellulosic biomass for multiple advanced bioenergy processes: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 154.
- Zamora-Hernández, T., Prado-Fuentes, A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., Peña- Castro, J. M. (2014). *Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la*

producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. Educación química, 25(2), 122-127.

Anexo A.

		Grados de libertad en el numerador																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	25	30	40	50	75	100	∞	
Grados de libertad en el denominador	1	161	199	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	245	246	248	249	250	251	252	253	253	254	
	2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	
	3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.73	8.71	8.70	8.66	8.63	8.62	8.59	8.58	8.56	8.55	8.53	
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.89	5.87	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.70	5.68	5.66	5.63	
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.66	4.64	4.62	4.56	4.52	4.50	4.46	4.44	4.42	4.41	4.37	
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.98	3.96	3.94	3.87	3.83	3.81	3.77	3.75	3.73	3.71	3.67	
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.55	3.53	3.51	3.44	3.40	3.38	3.34	3.32	3.29	3.27	3.23	
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.26	3.24	3.22	3.15	3.11	3.08	3.04	3.02	2.99	2.97	2.93	
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.05	3.03	3.01	2.94	2.89	2.86	2.83	2.80	2.77	2.76	2.71	
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.89	2.86	2.85	2.77	2.73	2.70	2.66	2.64	2.60	2.59	2.54	
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.72	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.47	2.46	2.41	
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.66	2.64	2.62	2.54	2.50	2.47	2.43	2.40	2.37	2.35	2.30	
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.58	2.55	2.53	2.46	2.41	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.21	
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.48	2.46	2.39	2.34	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.13	
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.33	2.28	2.25	2.20	2.18	2.14	2.12	2.07	
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.40	2.37	2.35	2.28	2.23	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	2.01	
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.35	2.33	2.31	2.23	2.18	2.15	2.10	2.08	2.04	2.02	1.96	
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.31	2.29	2.27	2.19	2.14	2.11	2.06	2.04	2.00	1.98	1.	