

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Ingeniero en  
Biotecnología de los Recursos Naturales*

**TRABAJO EXPERIMENTAL:**

**“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN  
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO  
ENZIMÁTICO CON *Trichoderma* DEL JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*)  
PROVENIENTE DEL EMBALSE AMALUZA”**

**AUTOR:**

ANDRÉS PATRICIO CEVALLOS CABRERA

**TUTOR:**

PABLO WILSON ARÉVALO MOSCOSO, PhD

CUENCA - ECUADOR

2020

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Andrés Patricio Cevallos Cabrera con documento de identificación N° 0104890173, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO CON *Trichoderma* DEL JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*) PROVENIENTE DEL EMBALSE AMALUZA”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente..

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, febrero del 2020



Andrés Patricio Cevallos Cabrera

C.I. 0104890173

## CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO CON *Trichoderma* DEL JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*) PROVENIENTE DEL EMBALSE AMALUZA”**, realizado por Andrés Patricio Cevallos Cabrera, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, febrero del 2020



Pablo Arévalo Moscoso, PhD.

C.I. 0102156957

## DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Andrés Patricio Cevallos Cabrera con documento de identificación N° 0104890173, autor del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO CON *Trichoderma* DEL JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*) PROVENIENTE DEL EMBALSE AMALUZA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, febrero del 2020



---

Andrés Patricio Cevallos Cabrera

C.I. 0104890173

**DEDICATORIA**

A mis padres Patricio y Paz, por su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional.

A mis hermanos, tíos y abuelos, por brindarme su cariño, consejos y estar siempre en mis mejores y peores momentos.

## AGRADECIMIENTO

A Dios, por su bendición y fortaleza de lograr mi sueño profesional.

A mis padres Patricio y Paz, por su total apoyo a cumplir una de mis metas importantes en mi vida.

A mis hermanos José y David, por su amistad y amor presente en toda esta etapa universitaria.

A mis tíos, Hugo, Carlos, Miriam y Napo, por su apoyo en todo sentido y brindarme valiosos consejos que me sirvieron de mucho para superarme.

A mis abuelos, Alfredo, Rosa y Judith, por llenarme de felicidad en todo momento y colmarme de buenos valores.

A mis amigos, por todos los bellos y malos momentos de la vida universitaria, gracias por apoyarme en toda ocasión.

A los docentes de Biotecnología y en especial a la Dra. Inés y al Ing. Pablo, gracias a todos por compartir sus conocimientos y valores y saber formar a buenos profesionales.

## SIGLAS Y ACRÓNIMOS

**CCG:** Combustibles de cuarta generación

**CPG:** Combustibles de primera generación

**CSG:** Combustibles de segunda generación

**CTG:** Combustibles de tercera generación

**EE. UU.:** Estados Unidos

**FDA:** Fibra detergente ácido

**FDN:** Fibra detergente neutro

**GC:** Cromatografía de gases

**HFS:** Proceso en dos etapas

**INEN:** Instituto Ecuatoriano de Normalización

**mg% AA:** Miligramos por ciento de alcohol absoluto

**MON:** Número de octano motor

**MSR:** Metodología de superficie de respuesta

**PCI:** Poder calorífico inferior

**RCN:** Número de octano de investigación

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RVP:** Presión de vapor Reid

**T:** temperatura

**Tr:** Tiempo de reacción

**UE:** Unión Europea

## RESUMEN

El aligerado crecimiento del jacinto de agua o lechuguin (*Eicchornia crassipes*) causa un problema social, ambiental y económico, tanto para los habitantes de las zonas, como al Embalse Amaluza. Razón por la cual se plantea aprovechar dicha planta para obtener bioetanol.

Por otra parte, el bioetanol representa más del 94% de la producción mundial de biocombustibles, pero son la mayoría provenientes de la caña de azúcar. (IRGC, 2007). El jacinto de agua puede llegar a ser una alternativa tecnológica, amigable con el ambiente y la soberanía alimentaria, por el hecho de que este no compite con cultivos alimenticios (Terán & Solorzano, 2013).

Las plantas procedentes del Embalse Amaluza fueron sometidas a un pretratamiento físico y caracterización de su composición lignocelulósica mediante análisis bromatológicos, presentando un 27,03% de celulosa, 20,52% de hemicelulosa y 10,29% de lignina, siendo estos valores idóneos para continuar con la experimentación.

Una vez adecuadas las muestras de jacinto de agua, estas fueron hidrolizadas con el microorganismo *Trichoderma* spp. a una concentración de  $1-9 \times 10^7$  esporas/mL. Posterior a esto, se manipularon las condiciones establecidas (temperatura, pH y tiempo de fermentación) en el proceso de fermentación, donde se inoculó 0,5% de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con respecto al volumen del hidrolizado.

Mediante cromatografía de gases, todas las muestras destiladas fueron analizadas por duplicado para cuantificar el etanol producido, obteniendo un aproximado en la mayoría de las muestras 50% de etanol, independiente del volumen destilado.



En la fermentación en Erlenmeyer, se obtuvo 0,41 mL/g de etanol, a pH 5, 25°C y 3 días. Sin embargo, para maximizar este rendimiento, se planteó un diseño de superficie de respuesta. El diseño proyectó como condiciones óptimas: pH 4,2, 25°C y 3 días. En un biorreactor y bajo estas condiciones, el rendimiento de etanol alcanzó 0,42 mL/g.

**PALABRAS CLAVES:**

Jacinto de agua, *Trichoderma*, hidrólisis, fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol.

## ABSTRACT

The lightened growth of water hyacinth (*Eicchornia crassipes*) causes a social, environmental and economic problem, both for the inhabitants of the areas and the Amaluza Reservoir. This is the reason why, the idea of obtaining bioethanol from this mentioned plant is proposed.

On the other hand, bioethanol represents more than 94% of the world biofuel production, but the majority comes from sugar cane. (IRGC, 2007). Water hyacinth can become a technological alternative, environmental friendly and food sovereignty, due to the fact that it does not compete with food crops (Terán & Solorzano, 2013).

Plants from the Amaluza Reservoir were subjected to a physical pre-treatment and characterization of their lignocellulosic composition by bromatological analysis, presenting 27,03% cellulose, 20,52% hemicellulose and 10,29% lignin, being ideal values to continue with experimentation.

Once the water hyacinth samples were adequate, they were hydrolyzed with the microorganism *Trichoderma* spp. at a concentration of  $1-9 \times 10^7$  spores/mL. After this, the established conditions (temperature, pH and fermentation time) were manipulated in the fermentation process, where 0,5% of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was inoculated with respect to the volume of the hydrolysate.

By gas chromatography, all the distilled samples were analyzed in duplicate to quantify the ethanol produced, obtaining an approximate of 50% of ethanol in most of the samples, independently of the distilled volume.

In the Erlenmeyer fermentation, 0,41 mL/g of ethanol was obtained, at pH 5, 25°C and 3 days. However, to maximize this performance, a response surface design was proposed. The design projected as optimal conditions: pH 4,2, 25°C and 3 days. In a bioreactor and under these conditions, the ethanol yield reached 0.42 mL/g.

**KEY WORD:**

Water hyacinth, *Trichoderma*, hydrolysis, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol

**ÍNDICE**

CAPITULO 1 .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 ANTECEDENTES .....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	3
1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA .....	3
1.5 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.6 OBJETIVOS .....	5
1.6.1 GENERAL .....	5
1.6.2 ESPECÍFICOS .....	5
1.7 HIPÓTESIS .....	5
CAPITULO 2 .....	6
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. MARCO CONCEPTUAL.....	6
2.2 MARCO DE REFERENCIA .....	7
2.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	8
2.4 BASES TEÓRICAS .....	10
2.4.1 Energía .....	10
2.4.2 Combustibles.....	11
2.4.3 Poder calorífico de los combustibles.....	11
2.4.4 Clasificación de los combustibles .....	11

2.4.5 Biomasa.....	12
2.4.6 Biomasa lignocelulósica.....	12
2.4.7 Combustibles fósiles .....	13
2.4.8 Biocombustibles.....	13
2.4.8.1 Tipos de biocombustibles según la materia que se utiliza. ....	13
2.4.8.1.1 Combustibles de primera generación - CPG.....	13
2.4.8.1.2 Combustibles de segunda generación - CSG .....	14
2.4.8.1.3 Combustibles de tercera generación - CTG .....	14
2.4.8.1.4 Combustibles de cuarta generación - CCG .....	15
2.4.9 Producción de los biocombustibles.....	15
2.4.10 Biocombustibles de mayor importancia .....	15
2.4.11 Efectos ambientales y sociales de los biocombustibles .....	16
2.4.12 Materiales usados en la producción de bioetanol .....	16
2.4.13 Materia prima para la producción de bioetanol en Sudamérica .....	16
2.4.14 Producción de bioetanol en el Ecuador .....	17
2.4.15 Bioetanol .....	17
2.4.16 Características del bioetanol.....	17
2.4.17 Diferencias del bioetanol con respecto a la gasolina.....	19
2.4.18 Ventajas y desventajas del bioetanol.....	19
2.4.19 Bioetanol como combustible.....	20
2.4.20 Procesos de obtención del etanol .....	20
2.4.21 Pretratamiento del material lignocelulósico.....	20

2.4.22 Pretratamiento biológico .....	21
2.4.22.1 Etapas del pretratamiento biológico .....	21
2.4.22.2 Ventajas del pretratamiento biológico.....	21
2.4.23 Sacarificación (hidrólisis enzimática) .....	22
2.4.23.1 Grupos de celulasas involucrados en la hidrólisis.....	22
2.4.23.2 Proceso de la hidrólisis enzimática .....	22
2.4.23.3 Reacciones secundarias ocurridas durante la hidrólisis .....	23
2.4.24 Fermentación.....	23
2.4.24.1 Condiciones para la fermentación alcohólica.....	24
2.4.25 Generalidades, Taxonomía y Morfología del Jacinto de Agua .....	24
2.4.26 Materiales Lignocelulósicos.....	26
2.4.26.1 Componentes .....	26
2.4.26.2 Características fisicoquímicas del jacinto de agua .....	26
2.4.27 <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
2.4.27.1 Generalidades del <i>Trichoderma</i> spp.....	27
2.4.27.2 Fisiología del <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
2.4.27.3 Morfología.....	28
2.4.27.4 <i>Trichoderma</i> en la producción de celulasas .....	29
2.4.28 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
2.4.28.1 Taxonomía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
2.4.28.2 Aislamiento de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
2.4.28.3 Composición de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31

2.4.28.4 Usos de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
CAPITULO 3.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1 Metodología de investigación .....	33
3.1.1 Obtención de la materia prima .....	34
3.1.2 Pretratamiento del material vegetal.....	35
3.1.3 Análisis bromatológico .....	36
3.1.4 Hidrólisis enzimática.....	37
3.1.4.1 Resiembra del <i>Trichoderma</i> spp.....	37
3.1.4.2 Preparación del sustrato del jacinto de agua .....	37
3.1.4.3 Lavado de las esporas.....	37
3.1.4.4 Preparación del inóculo fúngico.....	38
3.1.4.5 Pasteurización del producto sacarificado .....	39
3.1.5 Prueba de Fehling.....	40
3.1.6 Fermentación.....	41
3.1.6.1 Destilación simple .....	42
3.1.7 Método de análisis.....	43
3.1.7.1 Cuantificación de etanol.....	43
3.1.8 Método de análisis de datos .....	43
3.1.9 Optimización en Biorreactor .....	44
CAPITULO 4.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45

4.1 Composición de la biomasa del jacinto de agua ( <i>Eichhornia crassipe</i> ).....	45
4.2 Establecimiento del pH, temperatura y tiempo que permitan un rendimiento alto de etanol. ....	46
4.3 Efectos del pH, temperatura y tiempo en el rendimiento de etanol. ....	47
4.3.1 Optimización de las variables independientes .....	57
4.4 Optimización en biorreactor.....	61
CAPITULO 5 .....	62
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	62
5.1 Conclusiones .....	62
5.2 Recomendaciones.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS.....	73
ANEXO I. Análisis bromatológico del jacinto de agua en los laboratorios del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias .....	73
ANEXO II. Características macroscópicas y microscópicas del hongo <i>Trichoderma</i> spp.....	74
ANEXO III. Cálculo del título de Fehling y azúcares reductores totales en cada muestra.....	76
ANEXO IV. Sumario de resultados arrojados por el cromatógrafo (mg% AA).....	77
ANEXO V. Rendimiento en mL de etanol por cada gramo de muestra ocupada de jacinto de agua. ....	78



ANEXO VI. Cromatograma de la curva de calibración con etanol estándar al 50%. .....	79
ANEXO VII. Cromatograma de la muestra experimental con mayor mg% AA. ....	80
ANEXO VIII. Cromatograma de la muestra optimizada en el biorreactor.....	81
ANEXO IX. Cromatograma de comparación entre la muestra optimizada en el biorreactor y la mejor muestra experimental. ....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los combustibles.....	11
Tabla 2 Características fisicoquímicas del bioetanol.....	18
Tabla 3 Propiedades químicas y termodinámicas del bioetanol .....	19
Tabla 4 Clasificación científica del <i>Eichhornia crassipes</i> .....	25
Tabla 5 Composición fisicoquímica del jacinto de agua .....	27
Tabla 6 Taxonomía del <i>Trichoderma spp.</i> .....	28
Tabla 7 Taxonomía de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
Tabla 8 Composición de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
Tabla 9 Composición de la biomasa del jacinto de agua. ....	45
Tabla 10 Corridas experimentales obtenidas por el método de superficie de respuesta mediante Minitab®18. ....	46
Tabla 11 Prueba de falta de ajuste de los diferentes modelos estadísticos. ....	49
Tabla 12 ANOVA del modelo cuadrático completo para el rendimiento de etanol. ....	50
Tabla 13 Modelos ajustados.....	51
Tabla 14 ANOVA ajustado del modelo cuadrático completo para el rendimiento de etanol. .....	52
Tabla 15 Azúcares reductores totales en cada muestra. ....	76

**ÍNDICE DE ILUSTRACIONES**

Ilustración 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	12
Ilustración 2. Reacciones secundarias ocurridas durante la hidrólisis de lignocelulósicos. .....	23
Ilustración 3. Planta del jacinto de agua .....	25
Ilustración 4. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp utilizado para esta investigación.....	29
Ilustración 5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
Ilustración 6. Recolección de muestra de jacinto de agua en el Embalse Amaluza. ....	34
Ilustración 7. a) Triturado del jacinto de agua en una picadora del jacinto de agua. b) Secado al ambiente de la muestra.....	35
Ilustración 8. a) Molido y pulverizado de la muestra seca de jacinto de agua en un molino de corte Retch SM 100. b) Cribado de la muestra en un rango de 90 a 250 $\mu\text{m}$ . ....	36
Ilustración 9. Micelio esporulado y utilizado para el lavado de esporas. ....	38
Ilustración 10. a) Inoculación del <i>Trichoderma</i> spp en la muestra de jacinto de agua. b) Propagación del hongo y sacarificación por parte de este en la muestra de jacinto de agua. ....	39
Ilustración 11. a) Inactivación del <i>Trichoderma</i> spp mediante pasteurización a 80°C por quince minutos. b) Filtrado al vacío del producto sacarificado. ....	40
Ilustración 12. Prueba cuantitativa de azúcares reductores mediante el reactivo de Fehling. .....	41
Ilustración 13. Fermentación de los diferentes tratamientos en una incubadora con agitación. ....	42

Ilustración 14. Destilación de las diferentes muestras mediante un equipo de destilación simple.....	42
Ilustración 15. TRACE GC Ultra Gas Chromatograph - Thermo Fisher Scientific.....	43
Ilustración 16. Fermentación en Biorreactor LAMBADA MINIFOR .....	44
Ilustración 17. Test de Normalidad obtenido con el programa estadístico Minitab® 18.	47
Ilustración 18. Grafica de residuos vs. orden.....	48
Ilustración 19. Diagrama de Pareto: pH (A), temperatura (B), tiempo (C). .....	53
Ilustración 20. Gráfica de efectos normales absolutos estandarizados. ....	54
Ilustración 21. Gráfica normal de efecto estandarizados. ....	55
Ilustración 22. Efectos principales de las variables del diseño central compuesto: pH, temperatura (T) y tiempo. ....	56
Ilustración 23. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto: pH, temperatura (T) y tiempo. ....	57
Ilustración 24. Ecuación de regresión en unidades no codificadas.....	57
Ilustración 25. Optimización de las variables de estudio mediante Minitab® 18: pH, temperatura (T) y tiempo. ....	58
Ilustración 26. Gráfica de superficie de respuesta de rendimiento de etanol vs. tiempo y pH.....	60
Ilustración 27. Gráfica de superficie de respuesta de rendimiento de etanol vs. tiempo y temperatura (T). ....	60

## **CAPITULO 1**

### **1. INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 ANTECEDENTES**

Estados Unidos y Brasil, fueron los primeros mercados de biocombustibles en el mundo. El origen de estos mercados sucedió a raíz de la primera crisis petrolera en 1973, cuando el petróleo se encareció, afectando a todos los países del mundo, especialmente a aquellos sin reservas, así mismo, surgió como un estrategia para la mitigación de los efectos negativos a la atmósfera producida por los combustibles derivados del petróleo (Agüero, Tepetla & Torres, 2015). Los biocombustibles se consideraron desde entonces como energías limpias, renovables y sustentables, debido a que su producción es a base de diversos cultivos y por medio de vías ógicas y químicas (Faba, Díaz & Ordóñez, 2014). Sin embargo, es importante aclarar que el etanol ya había sido utilizado como combustible en estos dos países: en Brasil de forma experimental entre 1905 y 1925 y mezclado con gasolina en un 5% desde 1931; en Estados Unidos el uso experimental del etanol para vehículos comenzó a finales del siglo XIX (Maciel, 2009). Hoy en día Brasil y Estados Unidos son dos grandes potencias en la producción de etanol, y debido a la expectativa frente al fin de los combustibles fósiles otros países alrededor del mundo comenzaron a desarrollar sus propios mercados de biocombustibles, entre ellos Ecuador.

La producción de biocombustibles en Ecuador es mínima en relación con los países antes mencionados. Cultivos como la caña de azúcar son destinados para la elaboración de etanol mediante la fermentación de azúcares (Bravo, 2006). Cabe recalcar que, en el país, desde el 2010 se desplegó el proyecto de producción y comercialización del

biocombustible nombrado “Ecopaís”, el cual está constituido del 95% de gasolina premezclada y 5% de etanol procedente de la caña de azúcar, cumpliendo con la norma establecida por el “Instituto Ecuatoriano de Normalización” (NTE INEN. 0935) (Mora, 2018).

El jacinto de agua cuenta con una composición apropiada para la producción de etanol, por su potencial para producir azúcares reductores y contenidos bajos de lignina.

Es una planta acuática que crece rápidamente y lo hace en cualquier hábitat, con poco o ningún tipo de mantenimiento especial (Bhattacharya, 2010), su utilización no afectaría la soberanía alimentaria de ninguna forma, debido a que no se usa para consumo humano.

Estudios previos han abordado la posibilidad de utilizar el jacinto de agua como biomasa para biocombustibles debido a su buena composición lignocelulósica (Terán & Solorzano, 2013; Villalba & Ríos, 2012).

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La planta de estudio puede llegar a duplicar el número de retoños de 6 a 15 días con una aligerada adaptación a los cuerpos de agua dulce, convirtiéndose en una planta invasiva acarreado distintas consecuencias negativas para el medio ambiente (Reales et al., 2013).

Dentro de sus consecuencias negativas, encontramos las siguientes: provocan una evapotranspiración tres o cuatro veces superior a lo normal consumiendo el cuerpo de agua, causando putrefacción; reduce la biodiversidad; provoca oclusión de ríos y alcantarillados; bloquea la luz impidiendo el desarrollo del fitoplancton; absorbe el oxígeno que produce las plantas acuáticas sumergidas, alterando la química del agua, por otra parte, en Ecuador se ha evidenciado problemas en las hidroeléctricas ya que el jacinto de agua invade gran

parte del cuerpo de agua y como consecuencia de esto genera daños en las turbinas de las presas, provocando estragos a nivel social y económico (Terán & Solorzano, 2013). En la actualidad Ecuador produce biocombustibles provenientes de la caña de azúcar y de otros cultivos alimenticios, afectando a la soberanía alimentaria.

Existen pocos proyectos que aprovechan el jacinto de agua para la producción de bioetanol, con esta investigación se pretende utilizar dicha planta proveniente del Embalse Amaluza para obtener un mayor rendimiento de este biocombustible.

### **1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las condiciones óptimas de fermentación para obtener un mayor rendimiento de bioetanol a partir del hidrolizado enzimático con *Trichoderma* spp del jacinto de agua?

### **1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, durante el lapso de nueve meses; debido a esto los limitantes son: el tiempo, uso de cromatógrafo de gases y la accesibilidad al jacinto de agua.

### **1.5 JUSTIFICACIÓN**

El acelerado crecimiento del jacinto de agua causa un problema social, ambiental y económico, tanto para los habitantes de las zonas, como al Embalse Amaluza. Razón por la cual se plantea aprovechar dicha planta para obtener bioetanol.

Por otra parte, el bioetanol representa más del 94% de la producción mundial de biocombustibles, la mayoría provenientes de la caña de azúcar (IRGC, 2007).

Los biocombustibles reciben una clasificación de acuerdo con la naturaleza de su materia prima, en base a esto existen biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Los biocombustibles que forman parte de la primera generación se fabrican con insumos de procedencia agrícola y están conformados por partes alimenticias de las plantas, de manera que el etanol de primera generación se puede producir a partir de la caña de azúcar, granos de maíz, remolacha y más. Este tipo de biocombustibles compiten directamente con productos del sector alimentario, lo cual genera un impacto social negativo.

Los biocombustibles de segunda generación abarcan generalmente desechos agrícolas formados por celulosa, por ejemplo, la paja de trigo, el aserrín, las hojas y ramas secas de árboles, entre otros. Finalmente, los biocombustibles de tercera y cuarta generación comprenden vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética entre los cuales se encuentran pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido (Villalba & Ríos, 2012).

El jacinto de agua al ser biomasa para la producción de biocombustible de tercera y cuarta generación y al no competir con cultivos alimenticios debido a que es una planta acuática cuya producción no requiere cuidados especiales, puede llegar a ser una alternativa tecnológica amigable con el ambiente y la soberanía alimentaria (Terán & Solorzano, 2013).

Con la presente investigación se pretende obtener bioetanol, optimizando los factores que intervienen en la fermentación a nivel de laboratorio, de ser favorable los resultados, llevar la producción a gran escala.



## **1.6 OBJETIVOS**

### **1.6.1 GENERAL**

Determinar las condiciones óptimas del proceso de fermentación a partir del hidrolizado enzimático con *Trichoderma* del jacinto de agua (*Eichhornia crassipe*) proveniente del Embalse Amaluzá para la obtención de un buen rendimiento de etanol.

### **1.6.2 ESPECÍFICOS**

Determinar la composición de la biomasa del jacinto de agua (*Eichhornia crassipe*) mediante análisis bromatológicos para la caracterización de su composición lignocelulósica.

Evaluar las condiciones óptimas en el proceso de fermentación (pH, temperatura, tiempo de fermentación), a partir del hidrolizado enzimático con *Trichoderma* del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), mediante pruebas de laboratorio para la identificación de los parámetros que aporten un mayor rendimiento de bioetanol.

Establecer el modelo estadístico más apropiado para la optimización a través de pruebas estadísticas (diseño de superficie de respuesta) estableciendo las condiciones óptimas.

## **1.7 HIPÓTESIS**

El rendimiento de bioetanol depende de los factores del proceso de fermentación a partir del hidrolizado enzimático con *Trichoderma*.

## CAPITULO 2

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. MARCO CONCEPTUAL

Uno de los términos claves en la presente investigación es el bioetanol, el cual se produce por fermentación con ayuda de microorganismos, el presente proyecto usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como biomasa se utiliza ciertos materiales de origen vegetal alimenticio, vegetales no alimenticios de crecimiento rápido, entre otros.

El bioetanol en el Ecuador se consigue mediante la caña de azúcar, pero en este trabajo experimental se utiliza el jacinto de agua, el mismo que posee propiedades fisicoquímicas que permiten realizar la fermentación debido a que poseen azúcares que se transforman en bioetanol.

Para conocer las características que posee la planta antes mencionada, es necesario realizar un análisis bromatológico, el cual permite conocer la humedad, cenizas, proteínas, porcentaje de celulosa y lignina, entre otros, estos factores intervienen en la obtención del bioetanol.

Para la obtención del bioetanol existen dos fases fundamentales en el proceso; la primera es la hidrólisis, la misma que puede ser enzimática y ácida, en este caso se usa la enzimática, cuyo fin es la transformación de los polisacáridos a unidades monoméricas para que puedan ser metabolizados por la levadura antes mencionada para conseguir etanol, la segunda fase es la fermentación alcohólica, en la cual se da la conversión de la glucosa a etanol.

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se ejecuta una destilación por arrastre de vapor para adquirir etanol y por consiguiente se realiza a las muestras un análisis cromatográfico de gases para cuantificar la cantidad de etanol producido.

## **2.2 MARCO DE REFERENCIA**

Al realizar un análisis de investigaciones elaboradas sobre la producción de biocombustibles (bioetanol), encontramos estudios en los cuales utilizan diferentes materiales vegetales, microorganismos y métodos para la hidrólisis y fermentación.

En la investigación de Libreros & Mendieta (2017), tomaron como materia vegetal las algas, la mismas que se sometieron a pretratamiento de temperatura y tiempo para la extracción de lípidos y proteínas, la optimización de la producción de biocombustible se ejecutó a partir de cuatro factores: temperatura, N y CO<sub>2</sub>. Concluyendo que la mayor producción del biocombustible se formó con estas condiciones: T° > 25°C, N < 50 mg L<sup>-1</sup> y CO<sub>2</sub> > 18 mL d<sup>-1</sup>.

También Vásquez, Ruiz y Torres (2015), en su estudio, utilizan residuos lignocelulósicos agroindustriales potenciales como materias primas para la obtención de bioetanol, concluyen que el maíz amarillo-broza tiene una concentración de azúcares reductores totales 53,930 g/L, seguido por la caña de azúcar-hojas (29,215 g/L), arroz-cascarilla (24,189 g/L) y maíz amarillo-coronta (20,220 g/L), resultando así como las materias primas más idóneas para la producción de bioetanol, debido a su alto contenido de azúcares reductores totales que son fermentados en alcohol.

Otro estudio realizado por Linares (2018), el cual utiliza como sustrato los residuos de orujos de uva blanca, el cual aplicó varios tiramientos térmicos, químicos y enzimáticos

con el fin de degradar los polisacáridos, los residuos se secaron a una temperatura de 40°C para utilizar en el procedimiento final, los tratamientos aplicados en la hidrólisis son: T (25°C, 55°C, 97°C), ácido sulfúrico (1 M y 0,06 M) y enzimas pectolíticas.

La suspensión de orujo de uva blanca se fermentó a 28°C usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con lo cual se obtuvo 434 L por tonelada de orujo seco procesado.

### **2.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

En la investigación de Terán y Solorzano (2013), las plantas de jancito de agua fueron sometidas a un pretratamiento físico, posteriormente se realizó un análisis bromatológico, cuando las muestras se adecuaron fueron hidrolizadas con *Trichoderma* en tres concentraciones ( $1,5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ ,  $3,4 \times 10^{-3} \text{ m}^3$  y  $4,5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ ), a temperatura ambiente y con un tiempo de reacción de 840 horas, por consiguiente se efectuó la fermentación de las muestras, añadieron 0,001 m<sup>3</sup> de agua e inocularon a cada muestra hidrolizada 0,01 kg de *Saccharomyces cereviceae* durante 360 horas. Concluyendo que lograron obtener un máximo de 16 G° de alcohol a partir del jacinto de agua mediante el proceso enzimático.

En el estudio de Meléndez et al. (2017), concluyen que *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua), es materia de primera mano en la producción de bicomcombustibles, debido a que su alto contenido de azúcar puede ser fermentado por medio de microorganismos, y por el bajo contenido de lignina la cual retarda el proceso de degradación. El proceso que se realiza es el siguiente: trituración del material vegetal, hidrólisis enzimática de la cual se obtiene una solución azucarada fermentable; fermentación, destilación y obtención de bioetanol puro.

Según Arenas, Yagüe, & Sanz (2017), realizan por separado la fermentación e hidrólisis, con condiciones óptimas de operación, para la ejecución del ensayo utilizó paja de trigo. El proceso de la hidrólisis enzimática lo realizaron en reactores a temperatura de 50°C, pH 4.8, a 48 h y a 175 rpm, previo a la fermentación, sometieron a una pasteurización de 80°C por 30 min para obtener condiciones estériles, se coloca el microorganismo (*P. stipitis*) y se ajusta a una temperatura de 30°C y pH 5, una agitación de 175 rpm durante 7 días. El resultado en el rendimiento del etanol es de 0,48 g/L.

Japa (2015), en su investigación utilizó como material vegetal cáscara de banano, realizando una hidrólisis enzimática de biomasa mediante *Trichoderma sp*, posterior a esto se realizó la fermentación considerando dos factores: concentración de sustrato y concentración del inóculo. Los tres tratamientos realizados fueron T1: 2,5 g/L de Glucosa, 4 g/L inóculo; T2: 2,3 g/L de Glucosa, 4 g/L inóculo; T3: 2,3 g/L de Glucosa, 4 g/L inóculo, a una temperatura ambiente, pH 4 para su posterior hidrólisis. La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* se ejecutó a una temperatura de 40°C y un pH 4.3, anterior a esto se pasteurizo a 80°C por 5 minutos, con el propósito de eliminar el hongo *Trichoderma sp*. El tratamiento con el que se obtuvo mayor rendimiento de etanol fue el de la muestra D3 (16% de levadura *Saccharomyces cerevisiae*) con un valor de 5,18 G° de etanol producido durante la fermentación alcohólica.

Asimismo Morales (2014), en su investigación manejó como material vegetal *Moringa oleífera*, el cual utilizó tres diferentes pretratamientos (agua caliente líquida manejando una T de 185 a 205°C y Tr de 0 a 30 min, ácido diluido empelando una T 175 a 195°C con intervalos de 10°C, Tr de 2 a 5 min, con intervalos de 2.5 min, CA de 2 a 4% con intervalos

de 1% y alcalino con concentraciones de NaOH entre 5 a 12%, T° 50 y 115°C y Tr de 2 y 8 min) posterior a esto, se efectuó la hidrólisis enzimática y finalmente una fermentación, el investigador antes de aplicar los pretratamientos realizó un secado y molido de la materia vegetal, ejecutó varios análisis como: pruebas de sólidos totales, cenizas, análisis bromatológico y tamaño de la partícula con el fin de conocer las características de la materia prima. A su vez tomó en cuenta seis variables para elaborar el estudio que son: temperatura, carga del material, concentración del catalizador, tiempo de reacción y tamaño de la partícula. Concluyendo que la fermentación del hidrolizado tuvo una concentración de 6,92 g/L, lo cual indica un rendimiento del 98,57% en la fermentación frente al rendimiento teórico. Y con un resultado global de 14,76 g de etanol a partir de 113,28 g de *Moringa oleífera* pretratada, lo cual indica un rendimiento de 0,13 g de etanol por cada gramo de moringa.

## **2.4 BASES TEÓRICAS**

### **2.4.1 Energía**

La energía representa uno de los recursos más importantes debido a que es indispensables en la actividad productiva a nivel mundial. La mayor parte de energía que emplea el planeta se obtiene a través de recursos no renovables. En la actualidad, con el conocimiento de que los recursos no renovables están en decadencia, se ha tomado alternativas y una de ellas es la producción de energía con recursos renovables (Armenta, 2009).

### 2.4.2 Combustibles

Es aquel material que puede ser quemado y al hacerlo produce calor liberando energía mecánica o térmica, la misma que se aprovecha en diversos campos.

Estas sustancias pueden ser naturales o artificiales, consiguen apreciarse en estado sólido, líquido o gaseoso, y al combinarse con el oxígeno produce una reacción con desprendimiento de calor (Rangel & Portilla, 2016).

### 2.4.3 Poder calorífico de los combustibles

Es la energía que se genera a través de una completa unidad de combustión una vez que los productos se llevan a las mismas condiciones de temperatura y presión que los reactivos (Castillo, Mendoza & Caballero, 2012).

### 2.4.4 Clasificación de los combustibles

*Tabla 1 Clasificación de los combustibles.*

Sólidos	Líquidos	Gaseosos
Naturales: madera, carbón mineral, esquistos bituminosos.	Naturales: petróleo	Naturales: gas natural
Elaborados: carbón vegetal, subproductos (aserrín, cáscaras de arroz).	Elaborados: gasolina, alcohol, biodiesel.	Elaborados: biogás, gas de gasógeno.

**Fuente:** (Matías, 2006).

### 2.4.5 Biomasa

Material orgánico generado en procesos biológicos, en los cuales se lleva a cabo la producción de energía, combustibles, productos químicos y materiales. La biomasa se puede clasificar en dos grandes grupos, natural la misma que procede de ecosistemas y residual, desechos generados por las actividades humanas (Fernández, 2017).

### 2.4.6 Biomasa lignocelulósica

Representan una fuente de azúcares de gran disponibilidad, muchos de estos materiales son residuos de diferentes actividades económicas del hombre, por lo cual su utilización para la obtención de los biocombustibles representa un aprovechamiento de material vegetal no destinado a la producción de alimentos. Estos constan principalmente de tres componentes: lignina, hemicelulosa y celulosa, los cuales forman una matriz sólida confiriéndole al material propiedades de dureza y flexibilidad (Liscano, 2014).

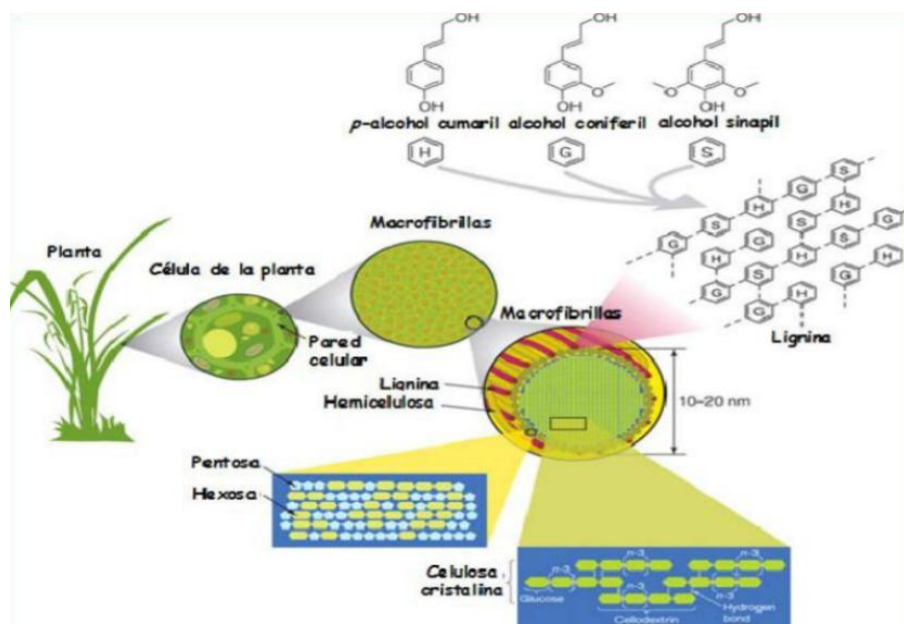


Ilustración 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.

Fuente: (Bacariza, 2016).



### **2.4.7 Combustibles fósiles**

Son aquellos que se formaron a partir de plantas y organismos que existieron hace millones de años en la Tierra, estos elementos se utilizan para la combustión con el fin de generar energía. Son no renovables, lo cual es una fuente limitada, su formación se ha dado bajo varias condiciones como: nivel de oxígeno y reacciones químicas, dando como resultado los hidrocarburos, dependiendo de la formación pueden ser: sólidos, líquidos o gaseosos, estos representan el 80% de la energía consumida en el mundo. Los combustibles fósiles más comunes son el petróleo, carbón, gas natural y gas licuado del petróleo (Calvo, 2006).

### **2.4.8 Biocombustibles**

Son combustibles derivados de fuentes renovables pueden ser elaborados a partir de los residuos agrícolas, granos de maíz, paja, legumbres y semillas oleaginosas, entre otros. Estos suelen ser líquidos y/o gaseosos, pueden utilizarse en la generación de calor, electricidad y energía (Fernández et al., 2012).

#### **2.4.8.1 Tipos de biocombustibles según la materia que se utiliza.**

##### **2.4.8.1.1 Combustibles de primera generación - CPG**

Estos biocombustibles son elaborados principalmente de cultivos alimenticios como: cereales, remolachas y semillas oleaginosas, los representantes son bioetanol, biodiesel y biogás, pero estos no simbolizaron futuro debido a que competían con la alimentación de la humanidad, colocando en riesgo la misma ya que la destinación de terrenos que se usaban para la producción agrícola de alimentos dirigidos a la sociedad se emplearon para cultivar los vegetales para la fabricación de biocombustibles, generando una alza de precios de

alimentos, deforestación para los monocultivos e inclusive en determinados casos, emitieron gases de efecto invernadero igual o mayor a la de carburantes fósiles (Castro, 2012).

#### **2.4.8.1.2 Combustibles de segunda generación - CSG**

Son provenientes de material lignocelulósico, incluyendo residuos de cultivos y producción maderera (cáscara de arroz, maíz o aserrín), plantas no comestibles, de los cuales se obtiene el etanol, mientras que el biodiesel se produce de microalgas y del piñón (Castro, 2012). En estudios realizados sobre las emisiones generadas por el biocombustible de SG son menores que de los fósiles, produciendo pequeños impactos ambientales, ya que los suelos que se usan son marginados, degradados y el agua es residual (Sathaye et al., 2011). Un inconveniente que muestran es que requieren mayor cantidad de agua para el proceso de conversión que el combustible de primera generación (Castro, 2012).

Entre los biocombustibles que se producen están el etanol, biodiesel, biobutanol y metanol (Hackenberg, 2008).

#### **2.4.8.1.3 Combustibles de tercera generación - CTG**

Son conocidos también como combustibles avanzados debido a sus procesos y materia prima usada para su generación (Gonzalez, Kafarov & Guzmán, 2009), filosóficamente es aprovechar plantas acuáticas con crecimiento acelerado, cultivos energéticos y residuos agrícolas, forestales, industriales o urbanos, los cuales no son alimenticias (Montaño, 2014), actualmente se encuentran desarrollando tecnologías nuevas para producir lípidos mediante microorganismos como bacterias, hongos y algas con el propósito de aplicar a

escala industrial, los materiales utilizados se caracterizan por su alto contenido en lípidos o azúcares (Machado, 2010).

#### **2.4.8.1.4 Combustibles de cuarta generación - CCG**

La UNESCO señala que los CCG, aparte de optimizar la eficiencia, estos se diseñan para aumentar la captación de CO<sub>2</sub> (Mundo, 2013). Se utilizan bacterias que hayan sido modificadas genéticamente que usan dióxido de carbono para la producción de biocombustible.

Con estos se busca no sólo minimizar el impacto del uso de los carburantes, sino incluso llegar a revertir casi el proceso y capturar más CO<sub>2</sub> que el que se llegue a emitir en el proceso (Coca, 2011).

#### **2.4.9 Producción de los biocombustibles**

El biocombustible es producido bajo un modelo de agronegocio (Calvo, 2006) desarrollando tecnologías sustentables que respondan a realidades y necesidades de los países (Fernández et al., 2012).

#### **2.4.10 Biocombustibles de mayor importancia**

Los biocombustibles que en la actualidad representan mayor interés a nivel comercial son: el bioetanol el cual se obtiene a partir de caña de azúcar, maíz, trigo, cebada, remolacha, entre otros. El biodiesel, en cambio se origina a partir de aceites vegetales (soja, canola entre otros). Se cree que podrían sustituir los combustibles fósiles, debido a sus altas características de renovación y poco deterioro ambiental (Núñez & García, 2006).

#### **2.4.11 Efectos ambientales y sociales de los biocombustibles**

Uno de los beneficios más sobresalientes es la mitigación del cambio climático, reduciendo la liberación de CO<sub>2</sub>, minimizando el efecto invernadero y contribuyendo a la seguridad energética, también ocasiona efectos negativos como el aumento en los costos de los alimentos, competencia por la tierra, el agua, y la deforestación, se ha visualizado en la actualidad una generación de competencia entre la producción agrícola y la de biocombustibles (Hernández & Hernández, 2008).

#### **2.4.12 Materiales usados en la producción de bioetanol**

Las materias primas que principalmente se utilizan en la producción de biocombustible son de origen agroindustrial o agropecuario y estos deben cumplir con ciertos estándares de calidad (Calvo, 2006).

En la elaboración de los biocombustibles se manipula varias fuentes, las principales a nivel mundial son: cereales, mandioca, remolacha azucarera, caña de azúcar, aceites vegetales, en la actualidad los países con mayor producción son: EE. UU., Brasil y UE. A nivel mundial en la producción de bioetanol la participación de las diferentes materias primas en porcentajes son la siguientes: alcohol de vino (0,04%), cereales (20,4%), mandioca (0,07%), remolacha azucarera (0,93%), mezclas de caña y remolacha (4,1%) y caña de azúcar (74,5%) (Machado, 2010).

#### **2.4.13 Materia prima para la producción de bioetanol en Sudamérica**

En Sudamérica, para la fabricación de etanol se maneja la caña de azúcar (635530273 toneladas), maíz (80016184 toneladas), mandioca (36495443 toneladas), sorgo (5361594

toneladas), Ñame (619242 toneladas) y remolacha azucarera (1833150 toneladas) por año (FAO, 2013).

#### **2.4.14 Producción de bioetanol en el Ecuador**

En el Ecuador la producción de bioetanol empezó en el 2010, utilizando la caña de azúcar como principal materia prima, el biocombustible se denominó Ecopaís, el cual contiene 95% de gasolina y 5% de etanol, este biocombustible cumple con la normativa establecida por el NTE INEN-935 para la gasolina extra (Paredes, 2015).

#### **2.4.15 Bioetanol**

Actualmente es el biocombustible más utilizado, es un alcohol etílico obtenido a partir de una fermentación compuesta por azúcares simples presentes en la materia orgánica, que se caracteriza por su alto contenido de energía (FAO, 2013).

Es un biocarburante el cual es producido a partir de fracciones de materia biodegradable de los residuos, la biomasa se divide en celulósicas, amiláceas y sacaríferas, las cuales son susceptibles al proceso de fermentación, pudiendo ser de manera directa o por un proceso de hidrólisis (Junta de Andalucía, 2017).

#### **2.4.16 Características del bioetanol.**

El bioetanol es un líquido incoloro, muy inflamable, de olor ardiente. A continuación, se describe sus características fisicoquímicas.

*Tabla 2 Características fisicoquímicas del bioetanol.*

<b>Etanol</b>	
<b>Fórmula</b>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> OH
<b>Peso molecular</b>	46,07 g/mol
<b>Oxígeno (%)</b>	34,6
<b>Densidad (kg/m<sup>3</sup>)</b>	794
<b>P.C.I. (kJ/kg)</b>	26.800
<b>Dosado estequiométrico</b>	9
<b>Solubilidad en agua (%)</b>	100
<b>Calor latente de vaporización (kJ/kg)</b>	850
<b>T ebullición (°C)</b>	78
<b>RVP a 38°C (kPa)</b>	16
<b>Índice RON</b>	120/135
<b>Índice MON</b>	100/106
<b>Punto de fusión (°C)</b>	-114
<b>Temperatura crítica</b>	241°C
<b>Presión crítica</b>	63 atm
<b>Viscosidad</b>	1.074 mPa a 20°C
<b>Índice de refracción</b>	1,3611
<b>Estructura</b>	Estructura cristalina monoclínico

**Fuente:** (Fernández, 2017).

*Tabla 3 Propiedades químicas y termodinámicas del bioetanol*

<b>Propiedad</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Acidez</b>	15,9 pKa
<b>Solubilidad</b>	Miscible
<b>Entalpía vaporización</b>	-235,3 kJ/mol
<b>Entalpía de líquido</b>	-277,6 kJ/mol

**Fuente:** (Fernández, 2017).

#### **2.4.17 Diferencias del bioetanol con respecto a la gasolina**

Las principales diferencias son: el bioetanol presenta mayor capacidad antidetonante que la gasolina debido a su alto contenido de octano; la volatilidad del bioetanol es superior a la de la gasolina, generando como ventaja una carburación más veloz y homogénea (Tamers, 2006).

#### **2.4.18 Ventajas y desventajas del bioetanol**

- Es soluble en todas las gasolinas.
- Posee alto índice de octanaje.
- Es libre de compuestos aromáticos, de benceno y azufre.
- Se disminuye la generación del ácido sulfúrico.
- Ahorra energía en la refinación.
- Reduce emisiones tóxicas.
- Aumento de consumo específico de combustible al freno cuando no se modifica el motor.

- El etanol al ser higroscópico puede producir oxidación en los tanques de transporte o motores.
- El etanol es volátil por lo que puede haber pérdidas por vaporización (Montaño, 2014).

#### **2.4.19 Bioetanol como combustible**

Este se puede usar tanto como bioetanol o con las gasolinas e incluso una mezcla de ambos (Montaño, 2014).

Cuando se usa como aditivo, el etanol mejora las características de los otros combustibles, uno de los objetivos por el cual se mezcla, es disminuir las emisiones nocivas y para esto se debe acortar el número de octanos (Paredes, 2015).

#### **2.4.20 Procesos de obtención del etanol**

Se pueden obtener de las materias primas siguientes:

- Azúcares: son de origen de la remolacha y la caña de azúcar.
- Cereales y biomasa: se realiza a partir de la fermentación de azúcares presentes en el almidón (Cardona, Sánchez, Montoya & Quintero, 2005).

#### **2.4.21 Pretratamiento del material lignocelulósico**

El objetivo del pretratamiento es modificar la estructura de la celulosa, incitando la solubilización de la lignina. Para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica existen varios métodos, tales como: biológicos, físicos y químicos (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

El pretratamiento biológico utiliza principalmente a los hongos de podredumbre blanca, ya que estos son idóneos para la degradación de lignina (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).



En cuanto al pretratamiento físico, la trituración usa determinadas fuerzas para reducir la cristalinidad de la celulosa (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

Los pretratamientos químicos manejan principalmente solventes orgánicos, ácidos, ozono, entre otros compuestos químicos. Varios estudios trabajan con ácido diluido, ya que mejora de manera positiva la hidrólisis enzimática (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

#### **2.4.22 Pretratamiento biológico**

Se usa principalmente hongos específicos productores de enzimas para realizar la degradación de la lignina, este factor se debe a la acción oxidativa de las enzimas sobre los anillos aromáticos de la lignina, aumentando la porosidad de la biomasa y reduciendo la cristalinidad de la celulosa (Cortínez, 2010).

El pretratamiento biológico es una buena alternativa a los químicos ya que posee un menor gasto energético, su operación se realiza en condiciones amigables e integra las actividades hidrolíticas y despolimerización de la celulosa (Juri, 2011).

##### **2.4.22.1 Etapas del pretratamiento biológico**

- Desplazar, remover la lignina
- Dejar al descubierto, remover la hemicelulosa
- Reducir, eliminar la cristalinidad de la celulosa (Cortínez, 2010).

##### **2.4.22.2 Ventajas del pretratamiento biológico**

- Aumenta la digestión de la celulosa para una siguiente hidrólisis enzimática.
- Evita la degradación de los carbohidratos.
- Evita la creación de productos inhibidores, tanto para el proceso de hidrólisis enzimática como para la fermentación de azúcares (Cortínez, 2010).

### 2.4.23 Sacarificación (hidrólisis enzimática)

Se lleva a cabo mediante enzimas celulasas producidas por microorganismos, las mismas que poseen una alta especificidad. Los productos de la hidrólisis son azúcares simples, principalmente la glucosa, como también pentosas y hexosas, pudiendo ser fermentados por levaduras o bacterias a etanol (Cortínez, 2010).

#### 2.4.23.1 Grupos de celulasas involucrados en la hidrólisis

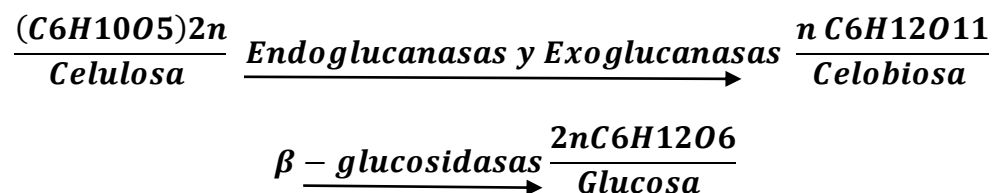
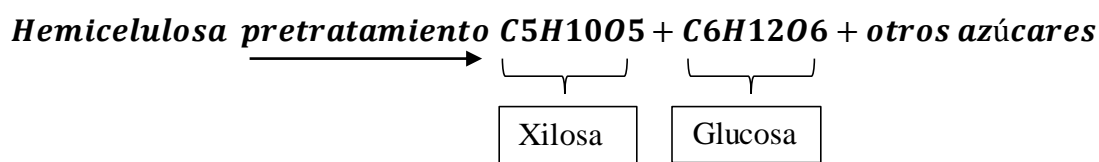
- **Endoglucanasas:** crean cadenas libres de enlaces al atacar a regiones internas con baja cristalinidad de la celulosa.

- **Exoglucanasas:** atacan los extremos libres, removiendo unidades de moléculas de celobiosa.

-  **$\beta$ -glucosidasas:** hidrolizan la celobiosa para producir glucosa.

Otras enzimas además de las antes mencionadas que están presentes en la hidrólisis atacando la hemicelulosa son: glucoronidasas, acetilsterasas, xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, galactomanasas y glucomasas (Cortínez, 2010).

#### 2.4.23.2 Proceso de la hidrólisis enzimática



Cortínez (2010).

### 2.4.23.3 Reacciones secundarias ocurridas durante la hidrólisis

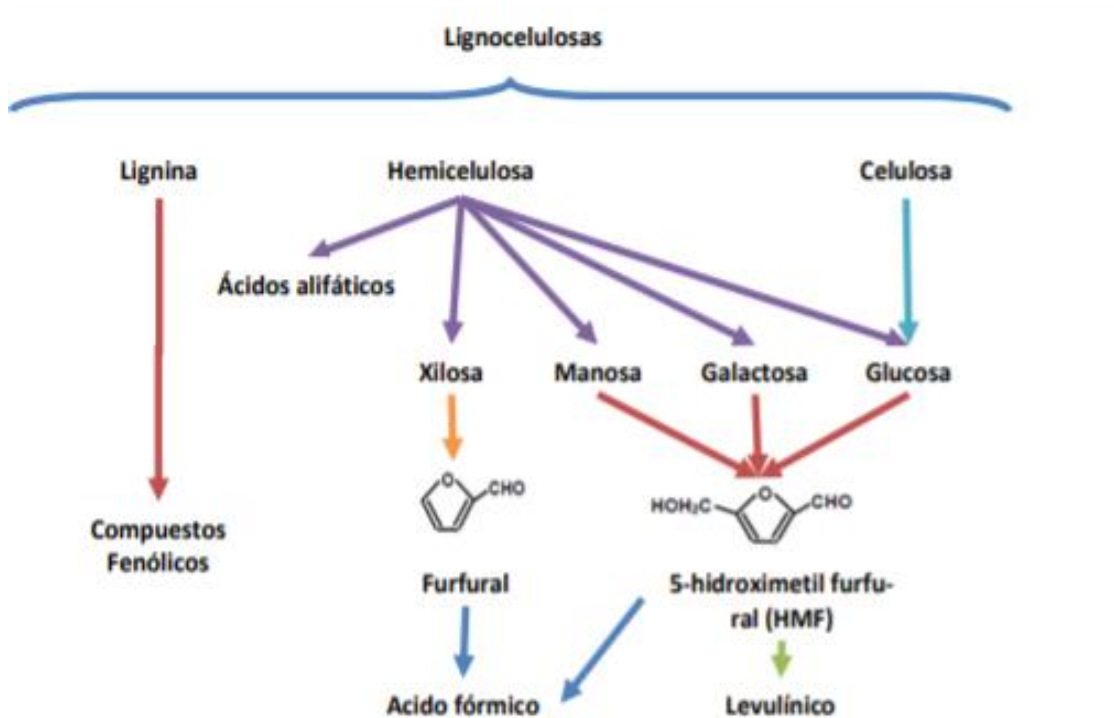


Ilustración 2. Reacciones secundarias ocurridas durante la hidrólisis de lignocelulósicos.

Fuente: (Purwadi, 2006).

### 2.4.24 Fermentación

Es un proceso biológico de oxidación incompleta llevada a cabo por microorganismos, los mismos que obtienen energía a partir de una fuente de carbono. Existen varios tipos de fermentaciones, pero la más importante en este estudio es la fermentación alcohólica la cual se lleva a cabo por medio de microorganismos que en ausencia de oxígeno transforma la glucosa en etanol y CO<sub>2</sub>, obteniendo energía para llevar a cabo el metabolismo (Juri, 2011).

La siguiente ecuación representa la estequiometría de la fermentación alcohólica.



#### **2.4.24.1 Condiciones para la fermentación alcohólica**

- **pH:** el óptimo para este tipo de fermentación varía entre el mínimo de 2.8 y un máximo 3.8.

- **Temperatura:** este factor es muy importante debido a que si aumentada notablemente, se disminuye la producción de etanol y aumenta la de productos secundarios, por lo contrario, si es muy baja las levaduras no se activan.

- **Nutrientes:** se requiere azúcares, compuestos nitrogenados, sales y vitaminas para obtener una fermentación óptima.

- **Aireación:** las levaduras poseen oxígeno suficiente para reproducirse, cuando este se agota, se inicia el proceso de conversión de los hidratos de carbono en alcohol (Contreras & Campo, 2014).

#### **2.4.25 Generalidades, Taxonomía y Morfología del Jacinto de Agua**

Es una hierba perenne acuática de reproducción rápida. Tiene tallos de hasta 20 cm de largo aproximadamente y sus hojas son pecioladas flotantes, de textura membranosa, bulbosa e hinchada. Su raíz es de coloración café claro a oscuro (Torres, 2009).

La clasificación científica del jacinto de agua se facilita en la Tabla 4.

Tabla 4 Clasificación científica del *Eichhornia crassipes*.

Clasificación Científica	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Lilipsida
<b>Orden</b>	Commelinales
<b>Familia</b>	Pontederiaceae
<b>Género</b>	<i>Eichhornia</i>
<b>Especie</b>	<i>E. Crassipes</i>

Fuente: (López, 2012).



Ilustración 3. Planta de jacinto de agua

Fuente: Autor

### **2.4.26 Materiales Lignocelulósicos**

Uno de los principales componentes de la pared celular es la lignocelulosa (lignina, celulosa y hemicelulosa) y es el compuesto más abundante de la biomasa, formando cada año aproximadamente 200,000 millones de toneladas a nivel mundial (Terán & Solorzano, 2013).

#### **2.4.26.1 Componentes**

La celulosa es el componente principal de la lignocelulosa. Es un polímero que posee largas cadenas lineales unidas por fuerzas de Van der Waals o también conocido como puentes de hidrógeno por lo que da como resultado una estructura cristalina que resiste a la hidrólisis debido a que posee regiones ideales para la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005).

La hemicelulosa es un polímero que está compuesto por heteropolisacáridos y hexosas ramificadas que están unidas gracias a enlaces  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3 y ácidos (Nogués, García & Rezeau, 2010).

La lignina posee una estructura amorfa debido a que es un heteropolímero tridimensional ramificado, compuesto por alcoholes aromáticos que proporcionan rigidez a los polisacáridos, su estructura cuenta con una resistencia a la degradación biológica y química, una de las características más importantes en la producción de bioetanol (Nogués, García & Rezeau, 2010).

#### **2.4.26.2 Características fisicoquímicas del jacinto de agua**

El jacinto de agua se compone por agua de un 93 a 97%. La composición fisicoquímica según Bhattacharya & Kumar (2010), se aprecia en la Tabla 5.

Tabla 5 Composición fisicoquímica del jacinto de agua

Componentes	Composición (%)
Lignina	10
Celulosa	25
Hemicelulosa	35
Ceniza	20
Nitrógeno	03

Fuente: (Bhattacharya & Kumar, 2010).

Bhattacharya & Kumar (2010), refiere que el jacinto de agua posee características fisicoquímicas idóneas para la obtención de bioetanol.

#### **2.4.27 *Trichoderma* spp.**

##### **2.4.27.1 Generalidades del *Trichoderma* spp.**

Este hongo fue descrito por Persoon en 1794, posteriormente Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que es utilizado hasta hoy en día. Son hongos saprofitos del suelo y la madera, de rápido crecimiento (Villegas, 2005). El *Trichoderma* puede ser anaerobio facultativo pudiendo adaptarse a las diversas condiciones ambientales y sustratos (Martínez, Infante & Peteira, 2015).

##### **2.4.27.2 Fisiología del *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* es un hongo aeróbico que resiste a temperaturas entre 25 y 30°C. La relación que existe entre el desarrollo del *Trichoderma* y la temperatura depende de la especie de este (Torres, Iannacone, Gomez, 2008).

El pH en la especie de *Trichoderma* no es un factor altamente exigente debido a que puede crecer con un pH desde 5,5 a 8,5 (Martínez, Infante & Reyes, 2013), pero el óptimo se encuentra en un rango ligeramente ácido, siendo de 5,5 a 6,5 (Vásquez, 2010).

*Tabla 6 Taxonomía del Trichoderma spp.*

<b>Super reino</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filum</b>	Ascomycota
<b>Subfilum</b>	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden</b>	Hipocreales
<b>Familia</b>	Hipocreaceae
<b>Genero</b>	<i>Trichoderma</i>

**Fuente:** (Vásquez, 2010).

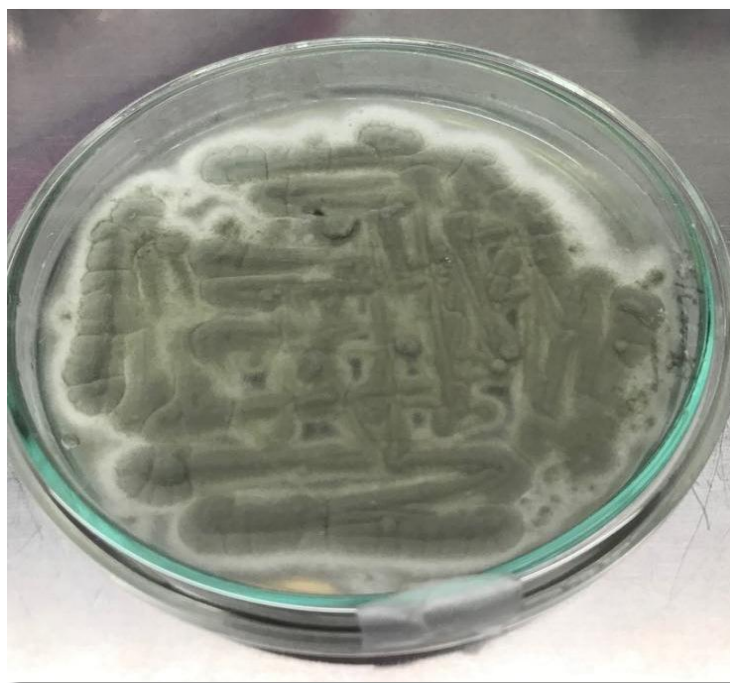
### 2.4.27.3 Morfología

*Trichoderma* presenta un crecimiento rápido, su color inicial es blanco y después se torna verde oscuro con un nivel alto de esporulación (Ilustración 4). Presenta un olor característico a coco. En su proceso de desarrollo producen hifas de 5 a 10  $\mu\text{m}$  que conforman un micelio septado formado por quitina y glucano (Martínez, Infante & Peteira, 2015).

Los conidióforos tienen una forma cónica al ser visualizadas en el microscopio y desarrollan abundantes conidios asexuales unicelulares de color verde o hialinos,



subglobosos, oblongos, cilíndricos, con un diámetro promedio de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Estos se ubican en los extremos de los conidióforos y son muy ramificados, además no verticilados y se originan de células conidiógenas y fiálides. Este hongo posee clamidosporas unicelulares que pueden ser intercalares o terminales con un tono verdoso en los extremos de las hifas y con un diámetro menor a 15  $\mu\text{m}$  (Martínez, Infante & Peteira, 2015).



*Ilustración 4. Cepa de Trichoderma spp utilizado para esta investigación*

*Fuente: Autor*

#### **2.4.27.4 Trichoderma en la producción de celulasas**

Las celulasas utilizadas en la hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos son producidas a partir de bacterias u hongos; estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios y mesófilos o termófilos. Algunas bacterias utilizadas en la producción de celulasas son por ejemplo *Clostridium*, *Cellulomonas* y *Bacillus* y entre los hongos se encuentran *Sclerotium rolfsii* y la especie *Trichoderma* subespecies *T. viride*, *T. reesei* y *T.*

*longibrachiatum* han sido considerados por mucho tiempo como los destructores más productivos y poderosos de la celulosa (Balat, 2011).

#### **2.4.28 *Saccharomyces cerevisiae***

Es un hongo eucariota unicelular, del grupo de los ascomicetos, de forma ovalada, esférica, cilíndrica o elíptica, con un diámetro de 4 a 5 µm. Su reproducción se da por fisión binaria o gemación, creciendo como micelio. Poseen resistencia a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos de forma natural.

En cuanto a lo genético se conoce la secuencia completa de su genoma lo que ha permitido la manipulación de casi 6600 genes, los macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas y ácidos nucleicos. La masa seca de la levadura está comprendida entre el 15 y 25% de su pared celular.

La levadura es heterótrofa, debido a que obtiene energía de la glucosa y posee una capacidad fermentativa elevada (Suárez et al., 2016).



*Ilustración 5. Saccharomyces cerevisiae*

**Fuente:** Autor

### 2.4.28.1 Taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 7 Taxonomía de la *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Amastogomycota
<b>Clase</b>	Ascomycetes
<b>Subclase</b>	Hemiascomycetidae
<b>Orden</b>	Endomycetales
<b>Familia</b>	Saccharomycetaceae
<b>Subfamilia</b>	Saccharomycetidae
<b>Genero</b>	<i>Saccharomyces</i>
<b>Especie</b>	<i>Cerevisiae</i>

Fuente: (Carballo, 2000).

### 2.4.28.2 Aislamiento de la *Saccharomyces cerevisiae*

Se puede aislar con facilidad del tracto intestinal, genital humano, plantas y la tierra (Suárez et al., 2016).

### 2.4.28.3 Composición de la *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 8 Composición de la *Saccharomyces cerevisiae*

<b>Componentes (%)</b>	
<b>Polisacáridos</b>	34,1
<b>Trehalosa</b>	5
<b>Ácidos nucleicos y nucleótidos</b>	10,8
<b>Fosfolípidos</b>	4,5
<b>Triglicéridos</b>	2,5
<b>Esteroles</b>	1
<b>Ceniza</b>	3,1
<b>Proteína</b>	39

Fuente: (Gálvez, 2000).

#### **2.4.28.4 Usos de la *Saccharomyces cerevisiae*.**

El uso más común se da en la panificación y en la industria de fabricación de bebidas alcohólicas, en la actualidad por lo general se utiliza para la producción de alcohol deshidrogenasa, coenzima A, glucosa-6-fosfato, entre otros (Suárez et al., 2016).

## CAPITULO 3

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Metodología de investigación

La siguiente investigación se basa en el método cuantitativo científico, el cual consiste en la recolección de datos con el propósito de definir las acciones y pasos a seguir para llevar a cabo el tema planteado que es: " Determinación de las condiciones óptimas para la obtención de bioetanol a partir del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) proveniente del Embalse Amaluza mediante proceso enzimático con *Trichoderma spp*".

La metodología aplicada en el desarrollo de la presente investigación es: actividades de campo, observación, experimentación.

Las técnicas de investigación consistieron en efectuar un recorrido del lugar en donde se presenta el problema, el cual es la acumulación del jacinto de agua en el Embalse Amaluza, posteriormente se obtuvo información conceptual primaria sobre el objeto de estudio mediante el uso de fuentes bibliográficas como: libros, revistas, folletos, tesis, internet, entre otros, a continuación se realizó las actividades de laboratorio de manera experimental, empezando con el pretratamiento físico y análisis bromatológico de las muestras, seguido de la hidrólisis enzimática con *Trichoderma spp.*, posterior a esto se manipularon las condiciones establecidas en el proceso de fermentación, se destiló y filtró el producto. Las muestras se analizaron por GC con el fin de cuantificar el etanol. El objetivo de optimizar la variable dependiente de interés: rendimiento de bioetanol, mediante la determinación de las condiciones óptimas de las variables independientes:

temperatura pH, y tiempo de fermentación, se alcanzó aplicando la metodología de superficie de respuesta.

### 3.1.1 Obtención de la materia prima

Mediante el Departamento de Gestión Ambiental de CELEC se acordó la ubicación en el Embalse Amaluza para la recolección de las muestras de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*).

Se analizó el lugar para la extracción del jacinto de agua, con el fin de conseguir una masa homogénea, tomando aproximadamente 50 kilogramos.



*Ilustración 6. Recolección de muestra de jacinto de agua en el Embalse Amaluza.*

*Fuente: Autor*



### 3.1.2 Pretratamiento del material vegetal

Se procedió a lavar toda la muestra con agua potable con el propósito de eliminar toda impureza.

Seguidamente se trituro al jacinto de agua mediante una picadora eléctrica. Las muestras fueron ubicadas en una zona adecuada con el fin de secarlas al ambiente durante un periodo de 7 días, se procedió al deshidratado de las mismas mediante una estufa a 70°C por 24 horas.



*Ilustración 7. a) Triturado del jacinto de agua en una picadora del jacinto de agua. b) Secado al ambiente de la muestra.*

**Fuente:** Autor

Una vez que la muestra se secó por completo, se realizó la trituración en un molino de corte Retsch SM 100 con el fin de reducir su tamaño de 90 a 250  $\mu\text{m}$ .



*Ilustración 8. a) Molido y pulverizado de la muestra seca de jacinto de agua en un molino de corte Retsch SM 100. b) Cribado de la muestra en un rango de 90 a 250  $\mu\text{m}$ .*

*Fuente: Autor*

### **3.1.3 Análisis bromatológico**

A través del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias se realizó el análisis bromatológico del jacinto de agua, siendo los siguientes parámetros para analizar mediante el método MO-LSAIA-0202 U. Florida 1970 para celulosa, MO-LSAIA-0201 U. Florida 1970 para hemicelulosa, MO-LSAIA-02.03 U. Florida 1970 para lignina, MO-LSAIA-01.01 U. Florida 1970 para humedad, MO-LSAIA-01.02 U. Florida 1970 para cenizas, MO-LSAIA-01.03 U. Florida 1970 para proteína,

MO-LSAIA-02.01 U. Florida 1970 para F.D.N., MO-LSAIA-02.02 U. Florida 1970 para F.D.A., dichos análisis se pueden apreciar en el Anexo I.



### **3.1.4 Hidrólisis enzimática**

#### **3.1.4.1 Resiembra del *Trichoderma* spp.**

A partir de una cepa de *Trichoderma* spp., se realizó repliques en matraces con medio PDA, incubando a 26°C durante 7 días hasta obtener alta esporulación para ejecutar la posterior sacarificación del jacinto de agua.

Las características macroscópicas y microscópicas del hongo utilizado en esta investigación se pueden visualizar en el Anexo II.

#### **3.1.4.2 Preparación del sustrato del jacinto de agua**

Se trabajó con 15 g de sustrato de jacinto de agua para todas las muestras.

El sustrato de jacinto de agua que va a ser sacarificado con *Trichoderma* spp., se ajustó la humedad del 48 al 58% y un pH de 4 a 5 con ayuda de buffer pH 4, posteriormente se esterilizó en la autoclave a 120°C, 1 atm de presión por un periodo de tiempo de 15 minutos.

#### **3.1.4.3 Lavado de las esporas**

Para obtener la suspensión de esporas se colocó 10 mL de suero fisiológico en el medio con el *Trichoderma* spp. por duplicado, se realizó una remoción mecánica de las esporas. La suspensión se ajustó a una concentración entre  $1-9 \times 10^7$  esporas/mL, mediante el recuento en la cámara de Neubauer.

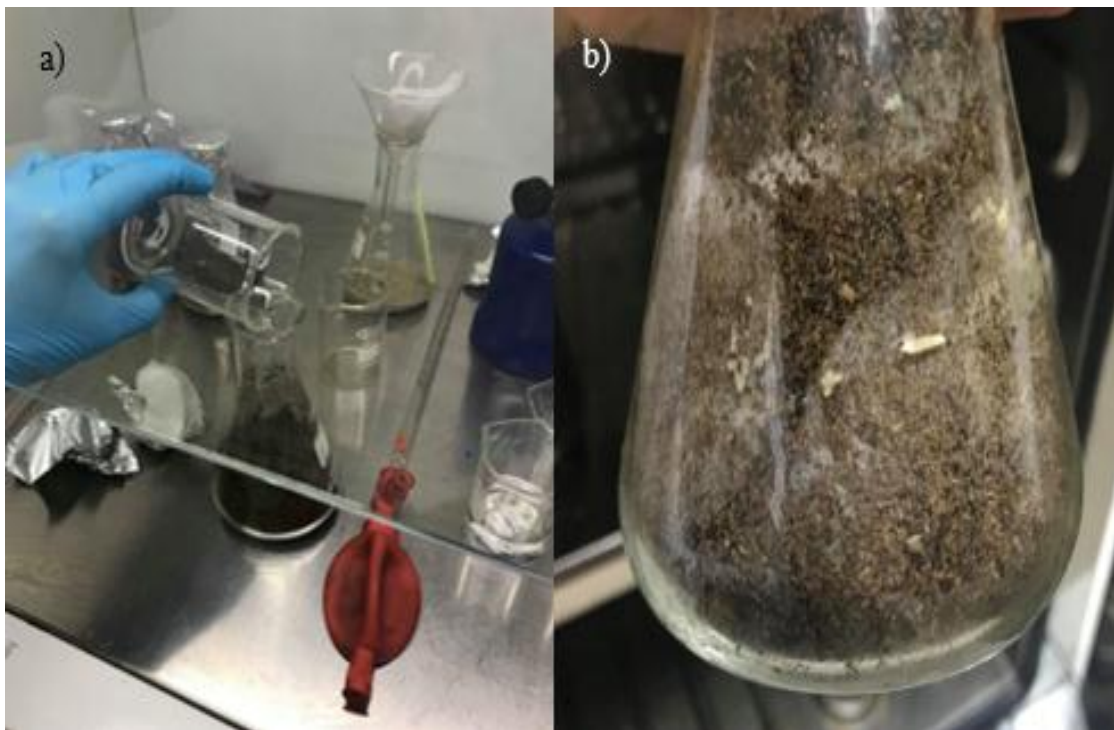


*Ilustración 9. Micelio esporulado y utilizado para el lavado de esporas.*

*Fuente: Autor*

#### **3.1.4.4 Preparación del inóculo fúngico**

Una vez que se ajustó la concentración del inóculo, se colocó el 10% en el sustrato del jacinto de agua previamente estandarizado a una humedad del 60 al 70% y un pH de 4 a 5, posterior a esto se procedió a incubar a 29°C durante 6 días, este tiempo es necesario para que se produzca la sacarificación por parte del hongo.



*Ilustración 10. a) Inoculación del *Trichoderma spp* en la muestra de jacinto de agua. b) Propagación del hongo y sacarificación por parte de este en la muestra de jacinto de agua.*

*Fuente: Autor*

#### **3.1.4.5 Pasteurización del producto sacarificado**

Al producto previamente sacarificado se le adicionó 150 mL de agua estéril, y se sometió a una temperatura a 80°C por 15 minutos con el fin de inactivar al hongo *Trichoderma spp* para su posterior fermentación, a continuación, se filtra al vacío el producto para obtener la solución procedente de la sacarificación, la misma que contiene compuestos para ser fermentados y para producir etanol.



*Ilustración 11. a) Inactivación del *Trichoderma spp* mediante pasteurización a 80°C por quince minutos. b) Filtrado al vacío del producto sacarificado.*

*Fuente: Autor*

### **3.1.5 Prueba de Fehling**

La cuantificación de azúcares reductores se realizó empleando el procedimiento según Concha (2014). Como primer paso, en una bureta de 25 mL se coloca el producto sacarificado obtenido. Posteriormente se agregan 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B y 25 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer sometiéndolo al calor hasta una ebullición constante. Gota a gota se vierte el contenido de la bureta sobre el matraz hasta visualizar el viraje de color azul a pardo o rojo ladrillo. Por último, se registra el volumen

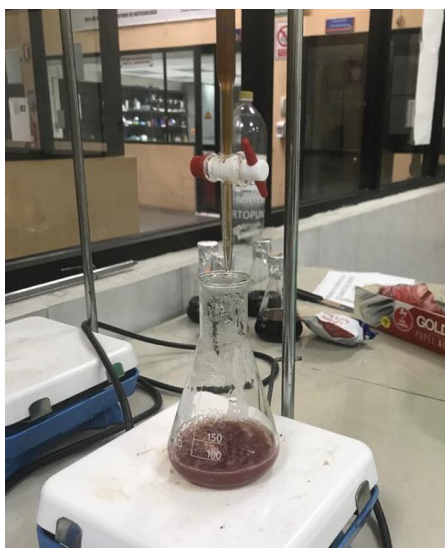
gastado del producto sacarificado del jacinto de agua y se aplica en la siguiente fórmula para obtener los azúcares reductores totales (Anexo III):

***g de azúcares reductores totales***

$$= \frac{\text{Titulo de Fehling}}{\text{Gasto de solución sacarificada del jacinto de agua}} \times 100$$

Concha, 2014, p. 97

El cálculo del título de Fehling se encuentra en el Anexo III.



*Ilustración 12. Prueba cuantitativa de azúcares reductores mediante el reactivo de Fehling.*

*Fuente: Autor*

### **3.1.6 Fermentación**

Previo a la fermentación se regula el pH de cada muestra según las variables de trabajo con buffer pH 4 y ácido cítrico. Regulado el pH, se activó la *Saccharomyces cerevisiae*, colocando el 0,5% con respecto al volumen sacarificado en 10 mL de agua a 30°C por 15 minutos, para la verificación de que se ha activado se observa un burbujeo. Se procedió a colocar en el producto sacarificado, con movimientos manuales se homogenizó y se colocó en la incubadora, con agitación programada a diferentes temperaturas y tiempos.



*Ilustración 13. Fermentación de los diferentes tratamientos en una incubadora con agitación.*

*Fuente: Autor*

### **3.1.6.1 Destilación simple**

Se preparó el equipo de destilación y se trabajó con temperatura ebullición para obtener etanol. Se midió el volumen de cada producto, a los mismos se les etiquetó y almacenó con refrigeración para posteriores análisis.



*Ilustración 14. Destilación de las diferentes muestras mediante un equipo de destilación simple.*

*Fuente: Autor*



### 3.1.7 Método de análisis

#### 3.1.7.1 Cuantificación de etanol

Las muestras fueron analizadas por GC para cuantificar el etanol producido, mediante el equipo TRACE GC Ultra Gas Chromatograph - Thermo Fisher Scientific, arrojó valores en mg% AA (Anexo IV), mismos que permitieron obtener el rendimiento en mL de etanol por cada gramo de muestra ocupada de jacinto de agua (Anexo V).

Previo al análisis de las muestras se configuró una curva de calibración con etanol estándar al 50% (Anexo VI) que sirvió para comparar con las muestras y determinar la concentración de etanol.



*Ilustración 15. TRACE GC Ultra Gas Chromatograph - Thermo Fisher Scientific.*

*Fuente: Autor*

### 3.1.8 Método de análisis de datos

El objetivo de optimizar la variable de interés, rendimiento de etanol, mediante la determinación de las condiciones óptimas: pH, temperatura y tiempo, se alcanzó aplicando

la metodología de Superficie de Respuesta. Los datos obtenidos de las unidades experimentales fueron analizados en el software estadístico Minitab® 18 con el fin de analizar la superficie de respuesta y determinar la ecuación polinomial que calcule valores óptimos de rendimiento de etanol en función de los factores y sus niveles analizados.

### **3.1.9 Optimización en Biorreactor**

Una vez con los valores óptimos arrojados mediante el diseño de superficie de respuesta, se replicó el proceso a mayor escala, tanto en la hidrólisis enzimática como la fermentación. Se preparó 2 L de muestra y se fermentó en el Biorreactor LAMBADA MINIFOR, este cuenta con la ventaja de medir y controlar los parámetros importantes requeridos en la fermentación.

El producto fermentado de igual manera se destiló, midió el volumen del producto, etiquetó y almacenó en refrigeración.



*Ilustración 16. Fermentación en Biorreactor LAMBADA MINIFOR*

*Fuente: Autor*



## CAPITULO 4

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Composición de la biomasa del jacinto de agua (*Eichhornia crassipe*).

En la Tabla 9 se aprecia la composición de la biomasa del jacinto de agua en porcentajes por medio de análisis bromatológicos.

*Tabla 9 Composición de la biomasa del jacinto de agua.*

Muestra	Análisis	Método	Resultado (%)
Jacinto de agua	Celulosa	MO-LSAIA-0202 U. Florida 1970	27.03
	Hemicelulosa	MO-LSAIA-0201 U. Florida 1970	20.52
	Lignina	MO-LSAIA-02.03 U. Florida 1970	10.29
	Cenizas	MO-LSAIA-01.02 U. Florida 1970	18.95
	Proteína	MO-LSAIA-01.03 U. Florida 1970	13.03
	Humedad	MO-LSAIA-01.01 U. Florida 1970	5.66
	F.D.N.	MO-LSAIA-02.01 U. Florida 1970	57.84
	F.D.A.	MO-LSAIA-02.02 U. Florida 1970	37.32

*Fuente: Autor*

Según los resultados bromatológicos obtenidos, el jacinto de agua proveniente del Embalse Amaluza tiene un porcentaje de celulosa del 27.03%, mientras que de lignina un 10.29%, el mayor porcentaje de celulosa es beneficioso para la transformación a azúcares reductores, los mismos que por la fermentación son procesados a etanol. Al relacionar con varios estudios como de Terán y Solorsano (2013), los porcentajes de los componentes antes mencionados pueden variar según donde provenga el material vegetal, es decir, en su investigación obtuvieron celulosa en un 40.24% y de lignina 19.13% por lo cual queda demostrado las variaciones existentes.

#### 4.2 Establecimiento del pH, temperatura y tiempo que permitan un rendimiento alto de etanol.

A través de las corridas experimentales (Tabla 10) se recolectaron los datos de rendimiento de etanol, los cuales permitieron evaluar los efectos de cada variable. Mediante cromatografía de gases, todas las muestras destiladas fueron analizadas por duplicado para cuantificar el etanol producido, obteniendo un aproximado en la mayoría de las muestras 50% de etanol, independiente del volumen destilado.

La corrida experimental con pH 5, 25°C y 3 días produjo un mayor rendimiento de 0,41 mL/g de etanol.

*Tabla 10 Corridas experimentales obtenidas por el método de superficie de respuesta mediante Minitab®18.*

<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>tiempo</b>
6	30	3
6	30	7
6	25	5
5	30	5
5	30	5
5	35	3
5	25	7
5	25	3
4	30	3
5	30	5
4	35	5
4	25	5
4	30	7
5	35	7
6	35	5

*Fuente: Autor*

### 4.3 Efectos del pH, temperatura y tiempo en el rendimiento de etanol.

Una vez conseguidos los resultados de las corridas experimentales (Anexo IV y V), se realizó el análisis, modelado y optimización del diseño, manejando los datos con metodología de superficie de respuesta (MSR).

Con la finalidad de corroborar la validez de los resultados de los diferentes tratamientos, se aplicó la prueba de Anderson-Darling para determinar si se cumple el supuesto de normalidad en los datos obtenidos.

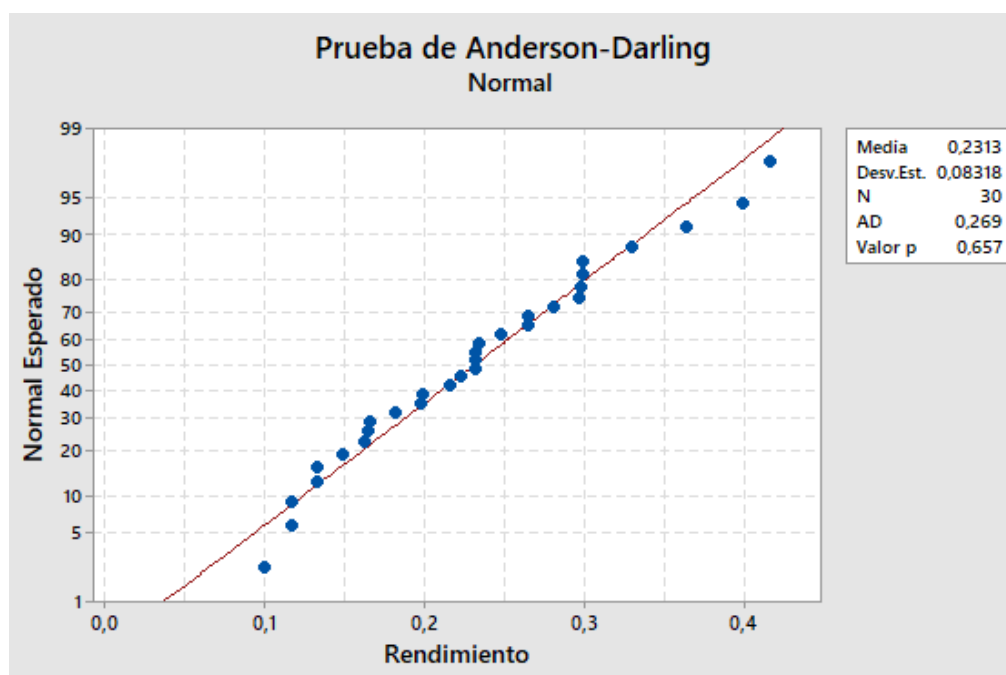
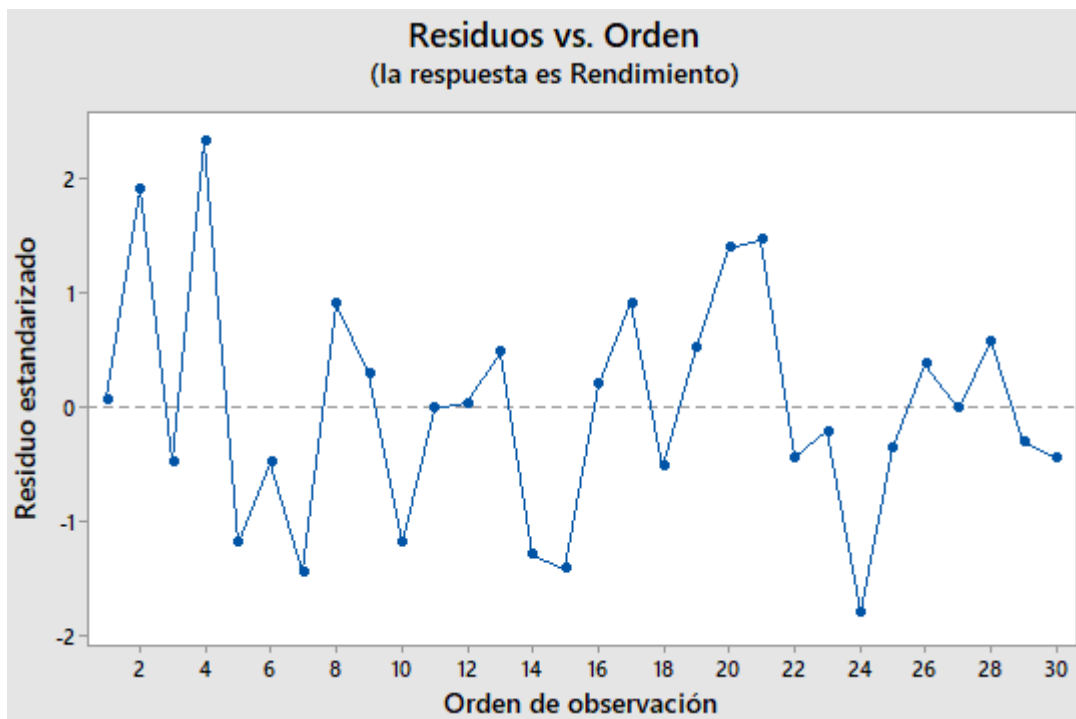


Ilustración 17. Test de Normalidad obtenido con el programa estadístico Minitab® 18.

*Fuente: Autor*

El valor p de 0,657 obtenido en la prueba de Anderson-Darling (Ilustración 17) es mayor al valor de significancia 0,05. Demostrando el cumplimiento del supuesto de normalidad y por ende la existencia de una distribución normal en los resultados.

A demás, se corrobora el supuesto de que los residuos son independientes entre sí mediante la gráfica de residuos vs. orden. Los residuos no muestran tendencias ni patrones, se ubican aleatoriamente alrededor de la línea central, lo que indica que no hay un orden o correlación en los residuos y por lo tanto son independientes (Ilustración 18).



*Ilustración 18. Grafica de residuos vs. orden.*

*Fuente: Autor*

Luego de demostrar la normalidad y la independencia de los datos, se procedió a efectuar el análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta. Como primer punto, para establecer cual modelo es el más apropiado para describir los datos de la investigación se utilizó la prueba de falta de ajuste. Para ello se probaron cuatro diferentes modelos estadísticos: cuadrático completo, lineal, lineal más cuadrados y lineal más interacciones. En la Tabla 11 se muestra el valor p para la falta de ajuste para cada uno de los modelos

antes mencionados, como se puede observar, todos los modelos presentan valor p para la falta de ajuste mayor que 0,05; el modelo cuadrático completo y lineal más cuadrados muestran un porcentaje mayor a 90% de variabilidad ( $R^2$ ); sin embargo, el modelo cuadrático completo presenta valores más altos en las dos partes, razón por la cual se le consideró el más idóneo.

*Tabla 11 Prueba de falta de ajuste de los diferentes modelos estadísticos.*

<b>Modelo</b>	<b>Valor p para la falta de ajuste</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>)</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>) ajustado</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>) predicción</b>
Cuadrático completo	0,954	96,02%	94,22%	91,83%
Lineal	0,415	85,09%	83,37%	80,36%
Lineal + cuadrados	0,728	92,38%	90,40%	87,07%
Lineal + interacciones	0,496	88,72%	85,78%	81,67%

*Fuente: Autor*

Una vez definido el modelo estadístico adecuado, se ejecutó un ANOVA (Tabla 12) para realizar un análisis de significancia estadística de sus datos.

*Tabla 12 ANOVA del modelo cuadrático completo para el rendimiento de etanol.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Modelo</b>	9	0,192650	0,021406	53,56	0,000
<b>Lineal</b>	3	0,170729	0,056910	142,38	0,000
<b>pH</b>	1	0,032964	0,032964	82,47	0,000
<b>T</b>	1	0,027180	0,027180	68,00	0,000
<b>tiempo</b>	1	0,110584	0,110584	276,68	0,000
<b>Cuadrado</b>	3	0,014634	0,004878	12,20	0,000
<b>pH*pH</b>	1	0,014154	0,014154	35,41	0,000
<b>T*T</b>	1	0,000688	0,000688	1,72	0,204
<b>tiempo*tiempo</b>	1	0,000010	0,000010	0,03	0,874
<b>Interacción de 2 factores</b>	3	0,007287	0,002429	6,08	0,004
<b>pH*T</b>	1	0,000058	0,000058	0,15	0,707
<b>pH*tiempo</b>	1	0,002852	0,002852	7,14	0,015
<b>T*tiempo</b>	1	0,004377	0,004377	10,95	0,004
<b>Error</b>	20	0,007994	0,000400		
<b>Falta de ajuste</b>	16	0,004515	0,000282	0,32	0,954
<b>Error puro</b>	4	0,003479	0,000870		
<b>Total</b>	29	0,200643			

*Fuente: Autor*

En este caso, se encontraron términos con valores p menor a 0,05 (pH, temperatura, tiempo; interacciones pH-pH, pH-tiempo y temperatura-tiempo) lo que indica que son significativos en el rendimiento de etanol, sin embargo, hay interacciones con valores p mayores a 0,05 que no cumplen significancia estadística, estas son: temperatura-temperatura, tiempo-tiempo y pH-temperatura. Razón por la cual se procedió a quitar los términos que no cumplen una significancia estadística. De la misma manera se procedió a

ajustar los demás modelos, obteniendo nuevos valores p para la falta de ajuste y  $R^2$ , comprobando finalmente que el modelo cuadrático completo es el óptimo (Tabla 13).

*Tabla 13 Modelos ajustados.*

<b>Modelo</b>	<b>Valor p para la falta de ajuste</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>)</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>) ajustado</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>R^2</math>) predicción</b>
Cuadrático completo	0,961	95,63%	94,49%	92,76%
Lineal	0,415	85,09%	83,37%	80,36%
Lineal + cuadrados	0,750	92,03%	90,75%	88,49%
Lineal + interacciones	0,478	87,27%	85,24%	82,16%

*Fuente: Autor*

Pulido & Salazar (2008) refiere a que cuando existe varios factores se opta por el estadístico  $R^2_{aj}$  en lugar del  $R^2$ , ya que este último aumenta con cada término que se agrega al modelo, aunque este no contribuya a la explicación de la respuesta. En cambio, el  $R^2_{aj}$  baja de valor cuando el término que se agrega no aporta lo suficiente.

El modelo cuadrático completo arrojó un nuevo análisis de varianza (Tabla 14) y demás pruebas estadísticas.

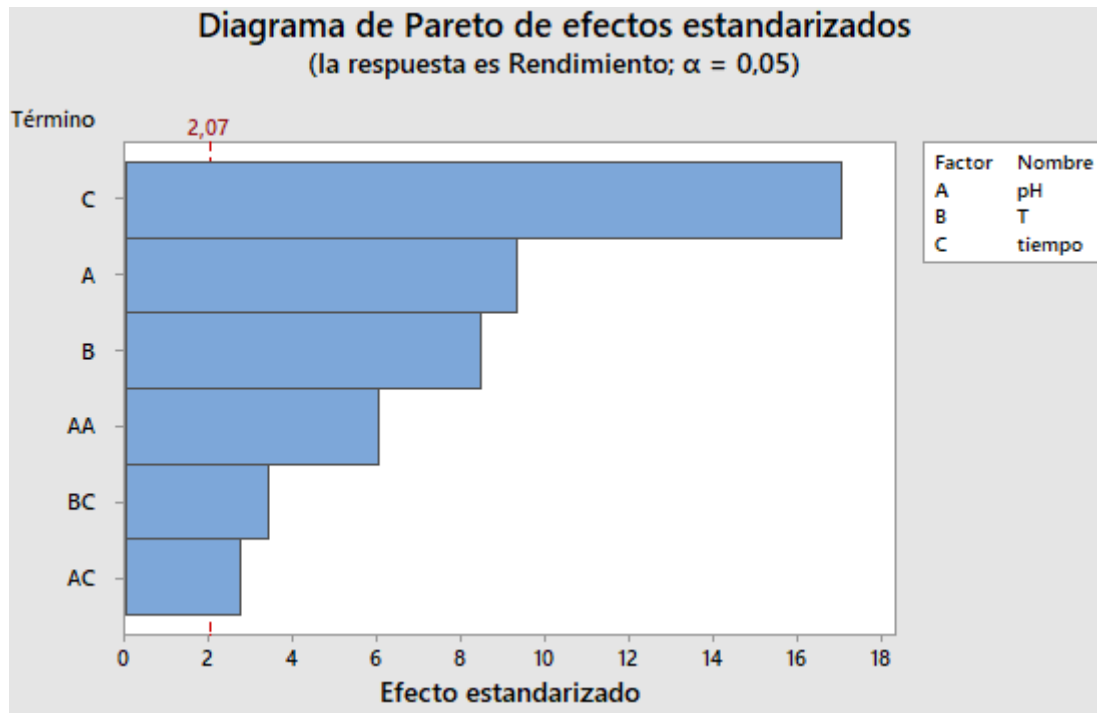
Tabla 14 ANOVA ajustado del modelo cuadrático completo para el rendimiento de etanol.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Modelo</b>	6	0,191876	0,031979	83,89	0,000
<b>Lineal</b>	3	0,170729	0,056910	149,29	0,000
<b>pH</b>	1	0,032964	0,032964	86,48	0,000
<b>T</b>	1	0,027180	0,027180	71,30	0,000
<b>tiempo</b>	1	0,110584	0,110584	290,10	0,000
<b>Cuadrado</b>	1	0,013919	0,013919	36,51	0,000
<b>pH*pH</b>	1	0,013919	0,013919	36,51	0,000
<b>Interacción de 2 factores</b>	2	0,007229	0,003614	9,48	0,001
<b>pH*tiempo</b>	1	0,002852	0,002852	7,48	0,012
<b>T*tiempo</b>	1	0,004377	0,004377	11,48	0,003
<b>Error</b>	23	0,008767	0,000381		
<b>Falta de ajuste</b>	19	0,005288	0,000278	0,32	0,961
<b>Error puro</b>	4	0,003479	0,000870		
<b>Total</b>	29	0,200643			

*Fuente: Autor*

Una vez determinado el nuevo análisis de varianza ajustado, se evidencia que el modelo es altamente significativo. De esta manera el coeficiente de determinación  $R^2_{aj}$  alcanzado con este modelo explica el 94,49% de la variabilidad de rendimiento de etanol, por lo cual es un ajuste aceptable ya que según Pulido & Salazar (2008) para fines de predicción lo ideal es un coeficiente de determinación de por lo menos un 70%.

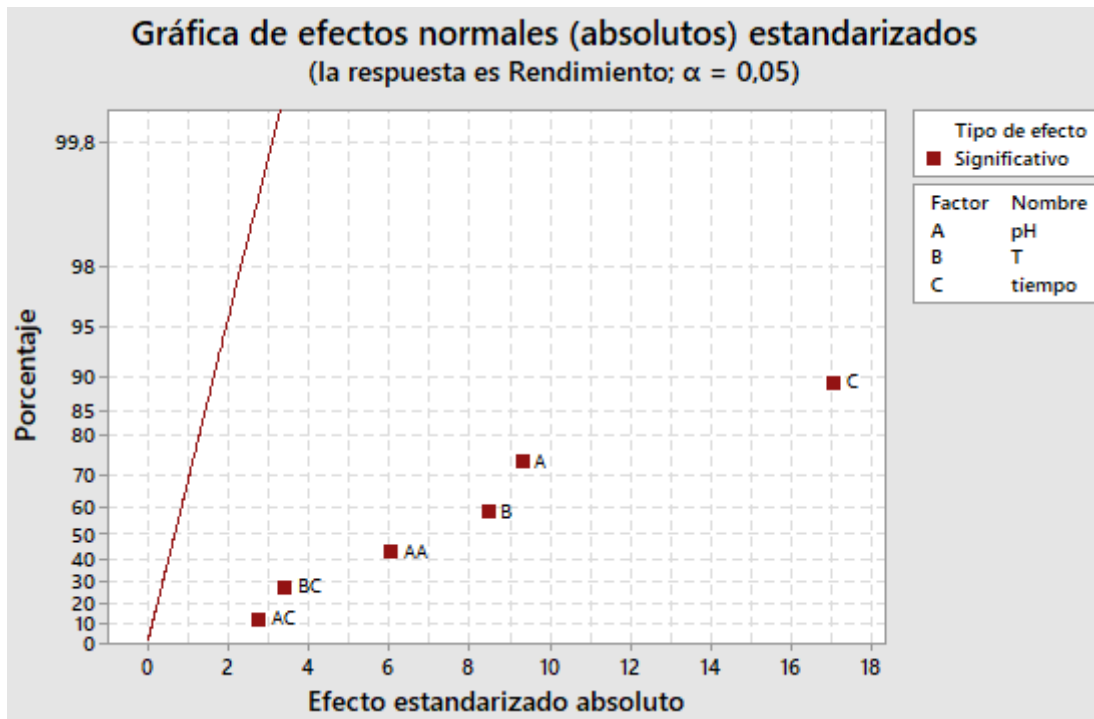




*Ilustración 19. Diagrama de Pareto: pH (A), temperatura (B), tiempo (C).*

*Fuente: Autor*

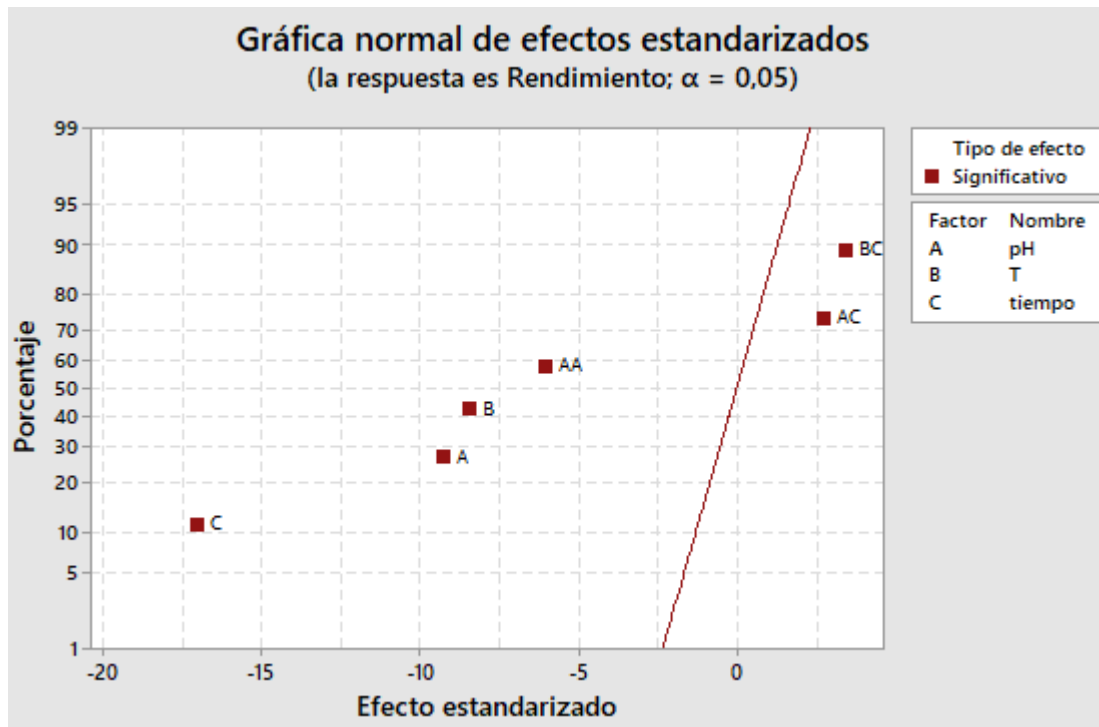
En el Diagrama de Pareto (Ilustración 19) se pueden visualizar los factores que tienen mayor influencia en el rendimiento de etanol. Como se evidencia, los factores individuales influyen más que las interacciones entre ellos; especialmente el tiempo demuestra ser la variable más significativa, seguida del pH, temperatura, a estos les siguen las interacciones pH- pH, temperatura-tiempo, y finalmente la interacción pH-tiempo.



*Ilustración 20. Gráfica de efectos normales absolutos estandarizados.*

*Fuente: Autor*

Lo expuesto en el Diagrama de Pareto se corrobora con la gráfica de efectos normales absolutos estandarizados (Ilustración 20), donde se pueden determinar las variables que muestran mayores efectos sobre el rendimiento de etanol. De tal manera, se comprueba nuevamente el mayor efecto que presenta el tiempo en comparación con las otras variables.



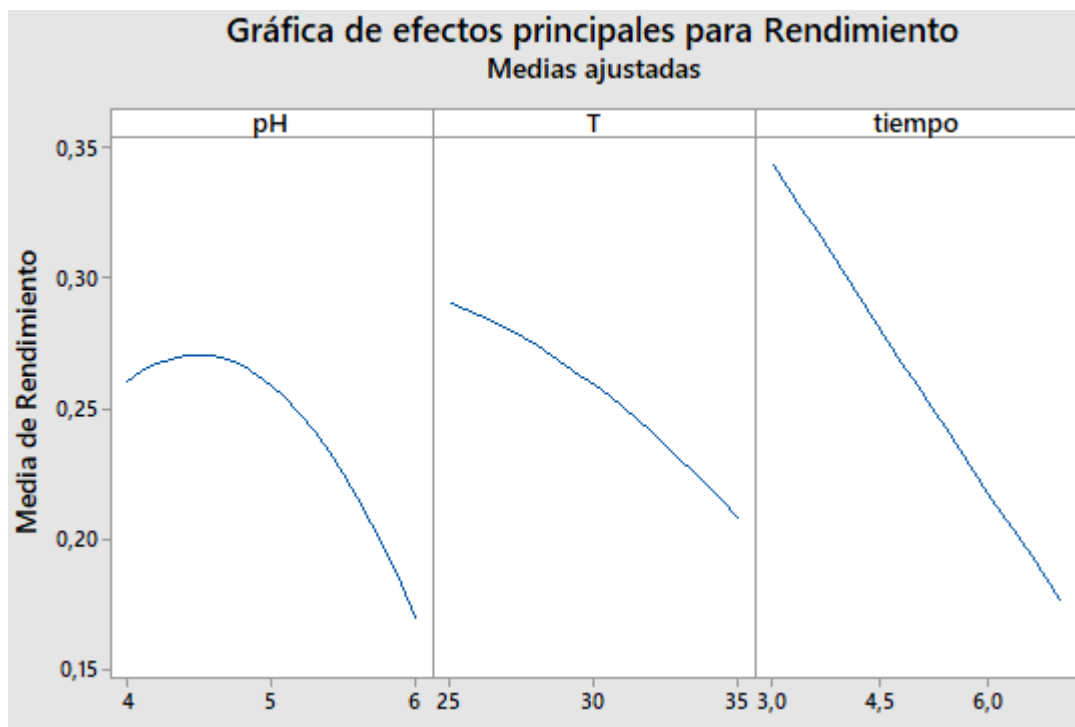
*Ilustración 21. Gráfica normal de efecto estandarizados.*

*Fuente: Autor*

La gráfica normal de efectos estandarizados (Ilustración 21) muestra la significancia de las variables, efectos positivos y negativos, al variar entre el nivel bajo y el nivel alto. Se evidencia que el pH, temperatura y tiempo presentan un efecto negativo, entonces al aumentar estos factores, el rendimiento de etanol disminuye.

Los efectos principales y las interacciones se interpretaron a partir de las Ilustraciones 22 y 23 en base a la pendiente presentada. La ilustración 22 muestra cómo afectan los cambios en un solo factor a la media de rendimiento de etanol, observándose gran diferencia entre los niveles altos y bajos del factor tiempo; el factor pH y temperatura (T) presentan un efecto diferente, afectando la respuesta de manera distinta, estos presentan un

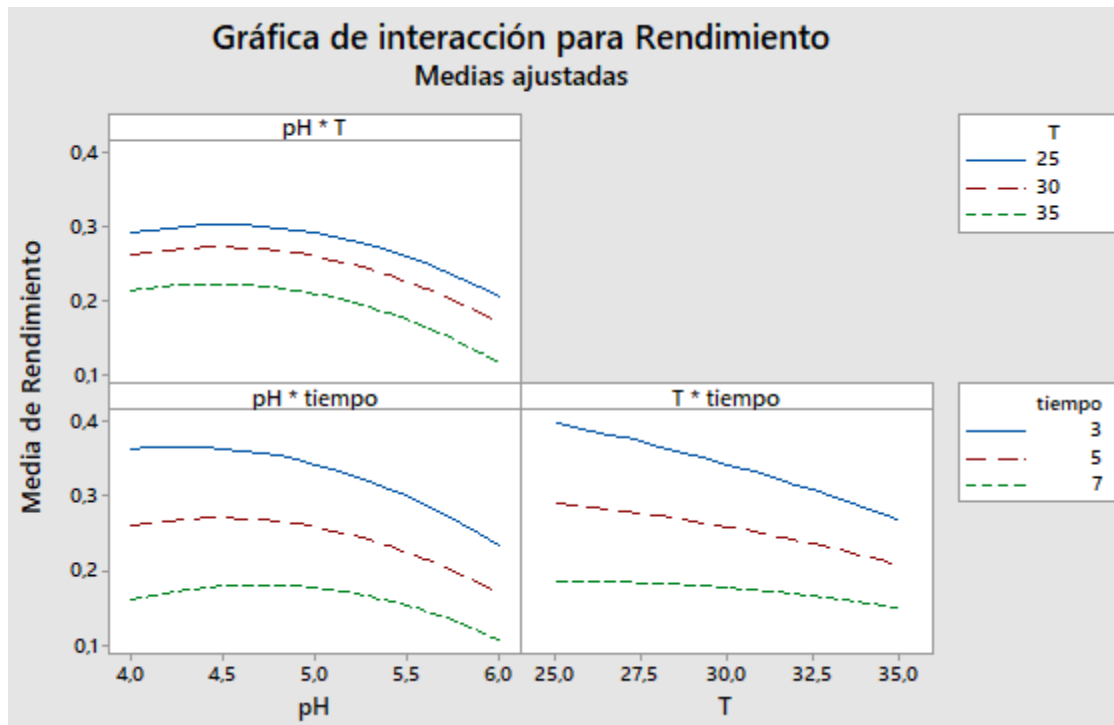
nivel alto y empiezan a decaer hacia un nivel bajo. De esta manera se deduce que, a un pH entre 4-5 y temperatura entre 25-30°C se obtienen mayores rendimientos de etanol.



*Ilustración 22. Efectos principales de las variables del diseño central compuesto: pH, temperatura (T) y tiempo.*

**Fuente:** Autor

Con relación a las interacciones de los factores y el cambio de media del etanol, mediante la gráfica de interacción (Ilustración 23) se puede notar que las interacciones con líneas a tendencia paralela presentaron ser no significativas en el análisis de varianza, mientras que las interacciones pH-tiempo y temperatura-tiempo, al ser significantes muestran líneas no paralelas. Ahora bien, se puede concluir que a pH entre 4-5 y temperatura entre 25-30°C favorece el rendimiento de etanol.



*Ilustración 23. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto: pH, temperatura (T) y tiempo.*

*Fuente: Autor*

#### 4.3.1 Optimización de las variables independientes

Con base en los datos de las variables ya trabajadas, se permite estimar la superficie de respuesta y el óptimo a través de la ecuación de regresión en unidades no codificadas expuesto en la Ilustración 24.

$$\text{Rendimiento} = 0,444 + 0,3392 \text{ pH} - 0,01994 \text{ T} - 0,1589 \text{ tiempo} - 0,04318 \text{ pH}^2 + 0,00944 \text{ pH} \cdot \text{tiempo} + 0,002339 \text{ T} \cdot \text{tiempo}$$

*Ilustración 24. Ecuación de regresión en unidades no codificadas.*

*Fuente: Autor*

Las condiciones óptimas para alcanzar una máxima respuesta (0,42 mL/g), obtenidas a partir de las relaciones entre los efectos de las tres variables estudiadas, fueron los siguientes: pH: 4,2, temperatura 25°C y tiempo de 3 días (Ilustración 25).

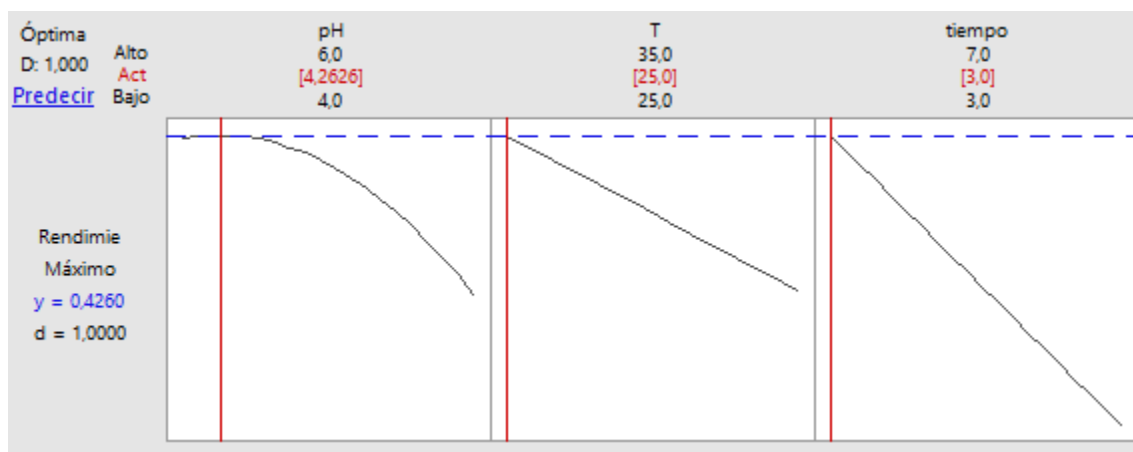


Ilustración 25. Optimización de las variables de estudio mediante Minitab® 18: pH, temperatura (T) y tiempo.

**Fuente:** Autor

Valdés et al. (2015) señala que existen estudios de cinética para la producción de etanol utilizando *S. cerevisiae*, donde se han registrado valores de 50,5 g/L a las 24 h, partiendo de 100 g/L con un rendimiento del 97,2%, en condiciones de fermentación, que han permitido conocer el tiempo en el que se consume el sustrato, así como la producción de etanol.

El tiempo de demora de la fermentación depende drásticamente de la cantidad del inóculo, si el inóculo es muy poco, la fermentación será mayor debido a un aumento en el periodo de latencia a diferencia de que si el inóculo es mayor esta demanda recursos, por lo que es recomendable trabajar con un porcentaje de inóculo menor a 10% (Nieto, 2009).

Según Suárez et al. (2016), las altas temperaturas causan una disminución de la biomasa, producto de un descenso en el contenido de proteínas, ARN, ADN y aminoácidos libres, provocando rigidez de la membrana celular.

En el trabajo de investigación de Nieto (2009), comenta que la baja producción de etanol a temperaturas como 35°C, puede deberse principalmente a la activación del metabolismo de las levaduras, acelerando la glucólisis, lo que aporta una mayor producción de piruvato con lo cual no permite que se realice el proceso de inicio de la fermentación alcohólica y dando como consecuencia que se creen otros productos en lugar de etanol; en contraste, las bajas temperaturas benefician la producción de etanol, ya que las vías metabólicas trabajan a una velocidad menor, por lo cual las fases iniciales de fermentación no se saturan como ocurre en las altas temperaturas.

En cuanto a el pH óptimo, Beltran et al. (2002), refiere a que se debe encontrar entre un rango de 4 a 5 para un mejor desarrollo de la *S. cerevisiae*.

Se presentan gráficos de superficie, los cuales describen el comportamiento del rendimiento de etanol sobre la región experimental. Cada curva representa combinaciones del tiempo y pH (Ilustración 26), tiempo y temperatura (Ilustración 27), donde el rendimiento de etanol tiende a aumentar.

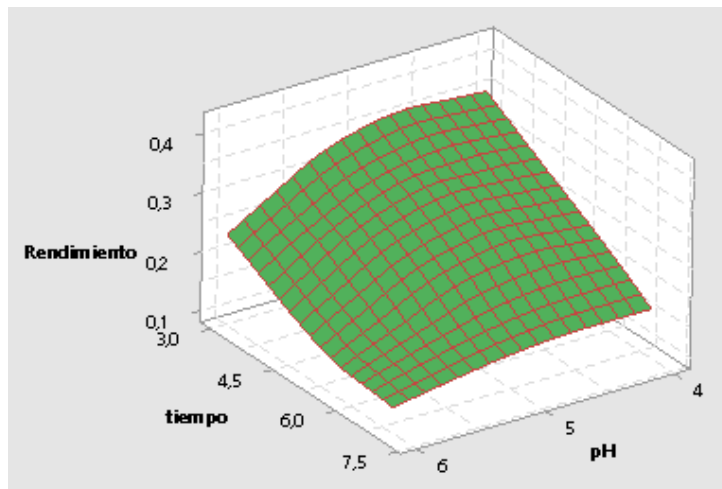


Ilustración 26. Gráfica de superficie de respuesta de rendimiento de etanol vs. tiempo y pH.

*Fuente: Autor*

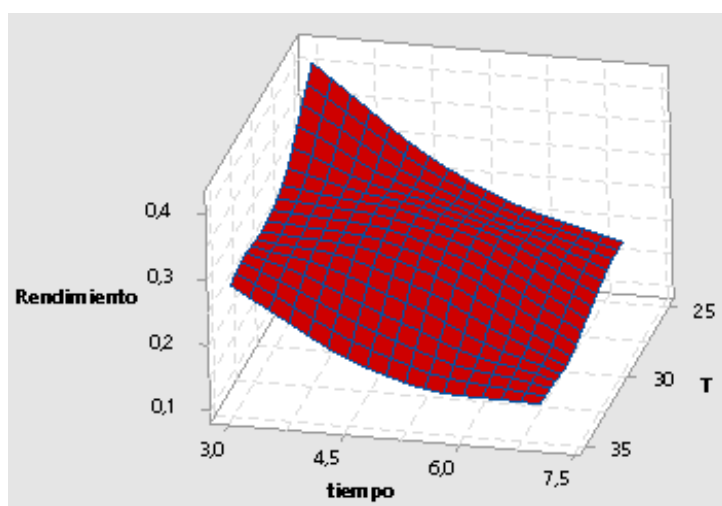


Ilustración 27. Gráfica de superficie de respuesta de rendimiento de etanol vs. tiempo y temperatura

(T).

*Fuente: Autor*



#### **4.4 Optimización en biorreactor**

A partir de los resultados obtenidos en la optimización del proceso, se replicó el proceso para 2 L de muestra y se estableció las condiciones óptimas para la fermentación en el Biorreactor LAMBADA MINIFOR.

El rendimiento de etanol en el biorreactor a pH 4,2, 25°C y 3 días tras la interpretación de los datos obtenidos alcanzó 0,42 mL/g, coincidiendo con la máxima respuesta obtenida a partir de las relaciones entre los efectos de las tres variables estudiadas.

## CAPITULO 5

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

La composición lignocelulósica del jacinto de agua presentó 27,03% de celulosa, 20,52% de hemicelulosa y 10,29% de lignina, siendo valores idóneos y fuente importante de carbohidratos para realizar un proceso de sacarificación.

Todas las muestras tienen un aproximado de 50% de etanol, independiente del volumen destilado.

Las condiciones establecidas de entre todas las corridas experimentales que generó un rendimiento máximo de 0,41 mL/g de etanol en el proceso de fermentación son: pH 5, 25°C y 3 días.

La optimización del rendimiento de etanol basada en el diseño experimental de superficie de respuesta planteó las siguientes condiciones de operación: pH de 4,2, temperatura de 25°C y tiempo de 3 días, que coincidió con el rendimiento de etanol producido en el biorreactor, alcanzando la respuesta optimizada de 0,42 mL/g.

El valor obtenido de respuesta (0,42 mL/g) supera al valor máximo obtenido en las corridas experimentales.

En base al análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa, la cual establece que el pH, la temperatura y el tiempo en el proceso de fermentación del hidrolizado enzimático con *Trichoderma* influyen significativamente en el rendimiento de etanol.

## 5.2 Recomendaciones

Las plantas que van a ser utilizadas como materia prima deben tener un correcto pretratamiento, especialmente en el tamaño de partícula, ya que de este proceso depende la composición lignocelulósica y fuente de carbohidrato para producir etanol en la fermentación.

En la fase de la hidrólisis enzimática, ajustar la humedad de la materia prima a un porcentaje adecuado (60-70%) para que el hongo *Trichoderma* pueda desarrollarse y realizar la sacarificación de la celulosa.

Considerar otras variables dentro de la fermentación, como la agitación, luz y nutrición, factores que afectan en la velocidad de fermentación.

Realizar un estudio enzimático del proceso de sacarificación con el propósito de encontrar los parámetros óptimos en este proceso.

Ejecutar un estudio económico del proceso planteado en este trabajo para determinar la rentabilidad a nivel industrial.

## BIBLIOGRAFÍA

Agüero, J., Tepetla, J., & Torres, B. (2015). Producción de biocombustibles a partir de la caña en Veracruz, México: perspectivas y riesgos socio-ambientales. *CienciaUAT*, 9(2), 74-84. Recuperado de: <https://bit.ly/2WR62YI>

Arenas, J., Yagüe, L., & Sanz, C. (2017). *Obtención de bioetanol a partir de paja de trigo: Estudio experimental y escalado a planta piloto* (tesis de maestría). Universidad De Valladolid, Valladolid, España.

Armenta, L. (2009). Energía y política pública. *EconoQuantum*, 6(1), 161-164.

Bacariza, A. (2016). *Celulosoma: implicaciones en la biorrefinería del futuro* (tesis de pregrado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. Recuperado de: <https://bit.ly/3bFO8wx>

Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287–293. Recuperado de: <https://bit.ly/3bG95rb>

Bhattacharya, A., & Kumar, P. (2010). Water hyacinth as a potential biofuel crop. *Electronic Journal of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(1), 112-122. Recuperado de <https://bit.ly/2Upq9vr>

Bravo, E., (2006). *Biocombustibles, Cultivos Energéticos y soberanía alimentaria en América Latina Encendiendo el debate sobre los biocombustibles*. Acción Ecológica, Quito, Ecuador.

Calvo, B. (2006). Biocombustibles de plantas para producción de biodiesel. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 72(1), 44-48.

Carballo, F., Bouix, M., & Leveau, J. (2000). *Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.

Cardona, A., Sánchez, Ó., Montoya, M., & Quintero, J. (2005). Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. *Scientia et technica*, 2(28). Recuperado de: <https://bit.ly/2JoE7Yw>

Castillo, P., Mendoza, A., & Caballero, P. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(3), 293-306. Recuperado de <https://bit.ly/2yjSoDz>

Castillo, R. (2013). *Valores agregados de la biodigestión anaerobia del jacinto de agua* (tesis de posgrado). Universidad De Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Castro, M. (2012). Reflexiones en torno al desarrollo de los biocombustibles en Ecuador. *CEDA*. Recuperado de: <https://bit.ly/2xsXgFY>

Coca, J. (2011, febrero 17). Biotecnología para biocombustibles. *Tendencias21*. Recuperado de <https://bit.ly/2wNvVh6>

Concha, W. (2014). *Producción biológica de ácido cítrico a partir de lactosuero de residuo quesero entero y deproteinizado utilizando una cepafungal de Aspergillus niger*

*sp. en cultivo sumergido* (tesis de pregrado). Universidad Católica De Santa María, Arequipa, Perú.

Contreras, C., & Campo, M. (2014). *Productos de la fermentación alcohólica; un beneficio para la salud* (tesis doctoral). Universidad de San Buenaventura seccional Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cortínez, V. (2010). *Comparación de Pretratamientos en Residuos Forestales para la Producción de Bioetanol de Segunda Generación: Hidrólisis Ácida y Líquidos Iónicos* (tesis de maestría). Universidad De Chile, Santiago de Chile, Chile.

Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotechnología*, 13(3), 11-25. Recuperado de: <https://bit.ly/2UKhhQb>

Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y bosques*, 20(3), 11-24. Recuperado de: <https://bit.ly/2wLhFFZ>

FAO. (2013). La Bioenergía en América Latina y El Caribe, El estado de arte en países seleccionados. Recuperado de <https://bit.ly/2Wd9QUb>

Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101–116. Recuperado de: <https://bit.ly/2WRLXlm>

Fernández, R., (2017). *Estudio de la obtención de bioetanol a partir de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica. Matriz de reacciones y optimización* (tesis de grado). Universidad de Cantabria, Cantabria, España.

Gálvez, L. (Ed.). (2000). *Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar*. Tercera Edición. Habana, Cuba: Imprenta MINAZ.

Gonzalez, A., Kafarov, V., & Guzmán, A. (2009). Producción de biocombustibles de tercera generación: extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Recuperado de: <https://bit.ly/39rtNtc>

Hackenberg, N. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *Revista Virtual REDESMA*, 2(2), 49-62. Recuperado de: <https://bit.ly/2Jsv9Jr>

Hernández, M., & Hernández, J. (2008). Verdades y mitos de los biocombustibles. *Elementos*, 15(71), 15-18. Recuperado de: <https://bit.ly/39trpSy>

International Risk Governance Council (IRGC). (2007). *Governing the risks and opportunities of bioenergy*. IRGC's bioenergy Project, Geneva, Switzerland. Cited; available from: [/www.irgc.org/irgc/IMG/pdf/IRGC\\_ConceptNote\\_Bioenergy\\_140\\_8S](http://www.irgc.org/irgc/IMG/pdf/IRGC_ConceptNote_Bioenergy_140_8S)] August.

Japa, J. (2015). *Hidrólisis enzimática de biomasa celulosa obtenida de la cáscara de banano maduro mediante Trichoderma sp. para la obtención de bioetanol* (tesis de pregrado). Universidad Técnica De Machala, Machala, Ecuador.

Junta de Andalucía. (2017). *Los biocarburantes en Andalucía*. Agencia Andaluza de la Energía. Recuperado de: <https://bit.ly/2WVHKNI>

Juri, S. (2011). *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca* (tesis de pregrado). Universidad De Chile, Santiago de Chile, Chile.

Libreros, M., & Mendieta, L., (2017). Uso de algas para obtener biocombustible y bioenergía con base en biotecnología marina. RD-ICUAP. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Linares, J. (2018). *Producción de bioetanol a partir de subproductos de la industria vitivinícola. Utilización de orujos de uva blanca* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Liscano, Y. (2014). *Producción de bioetanol de tallos de yuca* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

López, D. (2012). *Aprovechamiento del Lechuguín ("Eichhornia Crassipes") para la generación de abono orgánico mediante la utilización de tres diseños diferentes de biodigestores* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.

Machado, C. (2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe. OLADE/IICA. Recuperado de: <https://bit.ly/2Jp4ptn>

Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63–89. Recuperado de: <https://bit.ly/2UshCYR>

Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 11-22. Recuperado de: <https://bit.ly/39RkILr>

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. Recuperado de: <https://bit.ly/39rxz5R>



Matías. (2006). Combustibles. Textos Científicos. Recuperado de <https://bit.ly/39RkJyZ>

Meléndez, A., Mestizo, F., Vega, J., & Betancourt, M. (2017). Aprovechamiento energético integral de la *Eichhornia crassipes* (Buchón de agua). *Ingenium*, 18(35), 134–152. Recuperado de: <https://bit.ly/2QVkJ33R>

Montaño, H. (2014). *Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de Moringa oleífera* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Mora, A., (2018). *Producción de bioetanol a partir de despojos de maíz en la provincia de Imbabura-Ecuador* (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

Morales, H. (2014). *Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Mundo, E. (2013, mayo 27). Biodiésel: el combustible del futuro. El Telégrafo. Recuperado de: <https://bit.ly/3aO1tCb>

Nieto, H. (2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol* (tesis de grado). Escuela Politécnica Del Ejército, Sangolqui, Ecuador.

Nogués, F., García D. y Rezeau A. (2010). *Energía de la Biomasa*. Zaragoza, España: Prensas de la Universidad de Zaragoza.

Núñez, M. & García, P. (2006). Biocombustibles: Bioetanol y biodiesel. *Boletín das Ciências*, 19(61), 179–180. Recuperado de: <https://bit.ly/33YdmTZ>

Ovando, S., & Waliszewski, K. (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 111-120. Recuperado de: <https://bit.ly/2UOrhYA>

Paredes, V. (2015). Estado del desarrollo de biocombustibles en el Ecuador. OLADE. Recuperado de: <https://bit.ly/2QUJUsH>

Pulido, H., & Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México DF, México: McGRAW HILL/INTERAMERICANA

Purwadi, R. (2006) *Continous ethanol production from dilute-acid hydrolyzates: detoxification and fermentation strategy* (tesis doctoral). University of Borås, Göteborg, Suecia.

Rangel, A., & Portilla, C. (2016). El proceso de sustitución de combustibles pesados por gas natural en el sector industrial del Valle del Cauca y del Cauca - Colombia 2004-2012. *Apuntes del CENES*, 35(61), 237-266. Recuperado de: <https://bit.ly/2wBp377>

Reales, J., Trujillo, L., Arzuaga, G., Castaño, H., & Polo, A. (2013). Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(2), 101–111. Recuperado de: <https://bit.ly/3arDg4V>

Sathaye, J., Lucon, O., Christensen, J., Rahman, A., Denton, F., Fujino, J., ... Masanet, E. (2011). Renewable Energy in the Context of Sustainable Energy. In O. Edenhofer, R. P. Madruga, & Y. Sokona (Eds.), *IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation* (pp. 707-790). Cambridge, MA: Cambridge University Press.

Suárez-Machín, Caridad, & Garrido-Carralero, Norge Antonio, & Guevara-Rodríguez, Carmen Amarilys (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol.

Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1),20-28.

Recuperado de: <https://bit.ly/39p4tUv>

Tamers, M. (2006). Distinguiendo entre el bioetanol y el etanol de petróleo. *Beta Analytic*. Recuperado de: <https://bit.ly/3cPWIKc>

Terán, J. & Solorzano, P. (2013). *Obtención de bioetanol del jacinto de agua (Eichhornia crassipe) proveniente del embalse Sixto Durán Ballen mediante proceso enzimático* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Manabí, Ecuador.

Torres, E., Iannacone, J., & Gomez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, 67(1), 169-178. Recuperado de: <https://bit.ly/2wKXqZb>

Torres, S. (2009). *Estudio de aprovechamiento del lechuguin Eichhornia crassipes, del embalse de la represa Daniel Palacios como biosorbente de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.

Valdés, A., Bruno, D., Mota, A., Cristóbal, N., Aguilar, C., Iliana, A., Teixeira, J., Ruiz, H. (2015). Cinética para la producción de bioetanol usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pe-2 para su escalamiento en reactores en Columna y gas-lift. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara. México.

Vásquez, C., Ruiz, C., & Torres, C. (2015). Evaluación de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales del departamento de la libertad, Perú como potenciales

materias primas para la obtención de bioetanol. *ARNALDOA*, 22(1), 225-232. Recuperado de: <https://bit.ly/3bzCOC4>

Vásquez, J. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal* (tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Villalba, K., & Ríos, L. (2012). Producción de bioetanol a partir de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) respecto a otros materiales lignocelulósicos. *Revista Agunkuya*, 2(1), 42–62. Recuperado de: <https://bit.ly/2WR9CIH>

Villegas, M. (2005). *Trichoderma*, características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Recuperado de <https://bit.ly/2yidCS8>

## ANEXOS

**ANEXO I.** Análisis bromatológico del jacinto de agua en los laboratorios del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

MC-LSAIA-2201-04

**ININAP**

**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS**  
**ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**  
**DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD**  
**LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS**  
 Panamericana Sur Km. 1, Cullaguayta, 2890691-3007134, Fax 3007134  
 Casilla postal 17-01-340

**LSAUDNCRESC**

**NOMBRE PETICIONARIO:** Sr. Andrés Cevallos  
**DIRECCION:** Cuenca  
**FECHA DE EMISION:** 31 de Mayo del 2019  
**FECHA DE ANALISIS:** Del 27 al 31 de Mayo del 2019

**INFORME DE ENSAYO No: 179**  
**INSTITUCION:**  
**ATENCION:**  
**FECHA DE RECEPCION:**  
**HORA DE RECEPCION:**  
**ANALISIS SOLICITADO**

Universidad Politécnica Salesiana  
 Sr. Andrés Cevallos  
 27 de Mayo del 2019  
 13h-45  
 Van Soests, Humedad, Cenizas, Proteína

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS <sup>u</sup>	PROTEÍNA <sup>v</sup>				IDENTIFICACION
METODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03				
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970				
UNIDAD	%	%	%				
19-0651	5.66	18.95	13.03				Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)
ANÁLISIS		F.D.N. <sup>o</sup>	F.D.A. <sup>o</sup>	LIGNINA <sup>o</sup>			
METODO		MO-LSAIA-02.01	MO-LSAIA-02.02	MO-LSAIA-02.03			
METODO REF.		U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970			
UNIDAD		%	%	%			
19-0651		57.84	37.32	10.29			Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)
ANÁLISIS		CELULOSA <sup>a</sup>	HEMICELULOSA <sup>a</sup>				
METODO		MO-LSAIA-02.02	MO-LSAIA-02.01				
METODO REF.		U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970				
UNIDAD		%	%				
19-0651		27.03	20.52				Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)

Los ensayos marcados con  $\Omega$  se reportan en base seca.  
 OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME

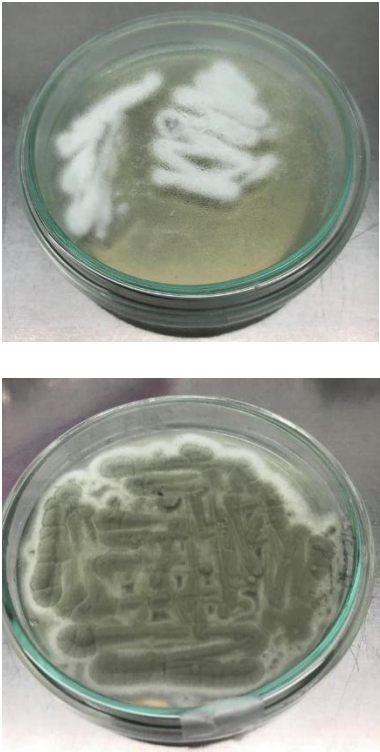
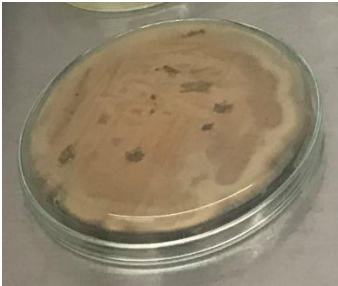
**Dr. Iván Samaniego MSc.**  
 RESPONSABLE TÉCNICO

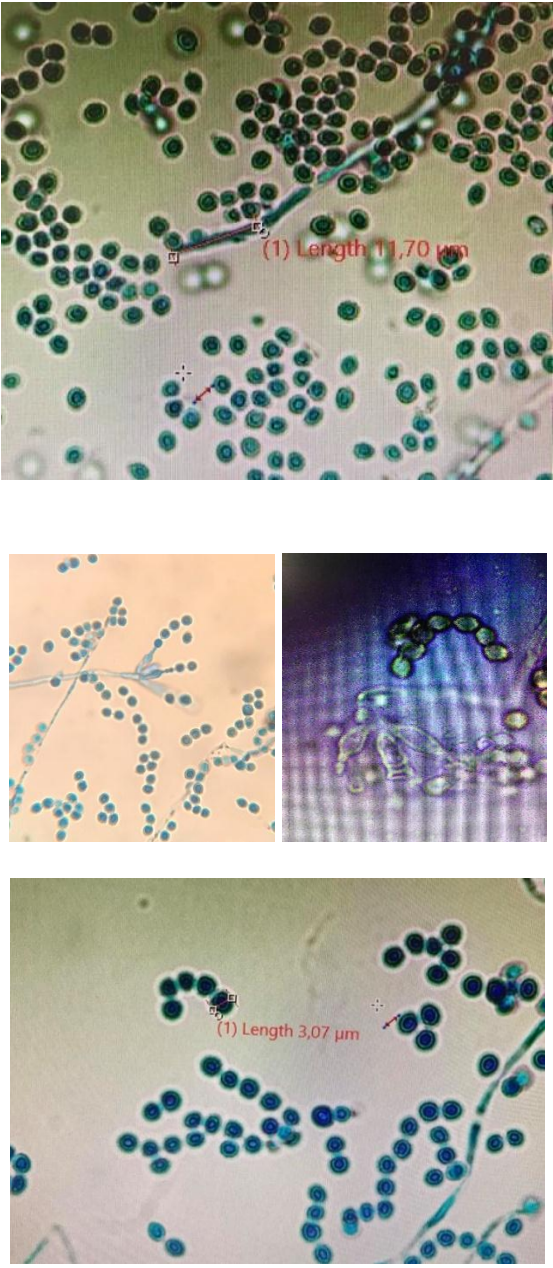


**Ing. Blasdimir Ortiz**  
 RESPONSABLE DE CALIDAD

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.  
 Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo.  
 NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial; esta dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

**ANEXO II.** Características macroscópicas y microscópicas del hongo *Trichoderma* spp.

Identificación macroscópica	Vista frontal	Vista posterior	Descripción
<p><i>Trichoderma</i> spp.</p>			<p>Las colonias mostraron un rápido crecimiento (5-8 cm), el micelio alcanzó a envolver el área de los medios de cultivo en 5 días a 26°C en Agar PDA. Al inicio las colonias desarrollaron un color blanco, posteriormente se aglomeraron y esporularon tornando a un color verde oscuro. Presentó olor característico a coco; al inverso de las colonias se puede observar visiblemente una coloración marrón-amarillenta. Resultados que concuerdan con las descripciones realizadas por (Martínez, Infante y Peteira, 2015), descritas en el punto 2.23.3 Morfología.</p>

Identificación microscópica	Descripción	Microscopia
<i>Trichoderma</i> spp.	<p>Según lo descrito por Martínez, Infante y Peteira (2015), concuerda con los resultados de identificación microscópica que se describen a continuación. Se constata la presencia de hifas unicelulares y septadas (11,70 <math>\mu\text{m}</math>); conidióforos ramificados; forma de las fiálides similar a un matraz ampliado en el medio y angosto en la punta; forma de los conidios subglobosos a ovoides (3,07 <math>\mu\text{m}</math>).</p>	 <p>The 'Microscopia' column contains three images. The top image shows a dense field of green, spherical conidia with a red line and text indicating '(1) Length 11,70 <math>\mu\text{m}</math>'. Below this are two smaller images: one on the left showing branched hyphae with blue-stained conidia, and one on the right showing a close-up of a branched structure with green conidia. At the bottom is another image showing blue-stained conidia with a red line and text indicating '(1) Length 3,07 <math>\mu\text{m}</math>'.</p>

*Fuente:* Autor

**ANEXO III.** Cálculo del título de Fehling y azúcares reductores totales en cada muestra.

El cálculo de Fehling se basó en el procedimiento utilizado por Concha (2014).

1. En una bureta se coloca una solución de glucosa al 5 x 1000.
2. En un matraz Erlenmeyer se añade 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B, y 25 mL de agua destilada. Se somete a calor hasta ebullición constante.
3. A partir de la ebullición se deja caer gota a gota la solución de glucosa hasta que se evidencia el viraje de color azul a rojo ladrillo o pardo.
4. El volumen gastado de la solución de glucosa se aplica en la siguiente formula:

$$\text{Título de Fehling} = \frac{\text{gasto de azúcar reductor} \times 5}{1000}$$

*Tabla 15 Azúcares reductores totales en cada muestra.*

pH	T	tiempo	Solución sacarificada gastada (mL)	g de azúcares reductores totales (g/mL)
6	30	3	5,0	2,93
6	30	7	4,5	3,25
6	25	5	5,0	2,93
5	30	5	4,8	3,05
5	30	5	4,9	2,98
5	35	3	5,2	2,81
5	25	7	5,0	2,93
5	25	3	4,4	3,32
4	30	3	5,0	2,93
5	30	5	4,6	3,18
4	35	5	5,1	2,87
4	25	5	4,9	2,98
4	30	7	5,0	2,93
5	35	7	4,7	3,11
6	35	5	4,5	3,25

*Fuente: Autor*



## ANEXO IV. Sumario de resultados arrojados por el cromatógrafo (mg% AA).

Inj. No.	Injection Name Selected Peak:	Type	Ret.Time min	Amount mg%AA		Rel.Area %		Area mV <sup>2</sup> min		Height mV	Type	Width (50%) min		Asym. EP	Resol. EP
				GC_3 Etanol	GC_3 Etanol	GC_3 Etanol	GC_3 Etanol	GC_3 Etanol	GC_3 Etanol			GC_3 Etanol	GC_3 Etanol		
1	AA	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	A M 3.3%	Unknown	16.583	78403.6237	0.11	13.2309	67.13	BMB	0.198	0.88	1.49	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	A M 0.7%	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	Std 6.7% en Alc50%	Unknown	16.550	78407.2977	0.00	0.4653	2.55	BMB	0.185	0.95	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	Std 6.7% en Alc50% rep	Unknown	16.550	78407.2863	0.00	0.5048	2.68	BMB	0.193	0.90	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	Std 6.7% en Alc50% rep1	Unknown	16.550	78407.2924	0.00	0.4838	2.59	BMB	0.189	0.97	1.84	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7	Std 6.7% en Alc50% rep2	Unknown	16.550	78407.2781	0.01	0.5336	2.73	BMB	0.198	0.88	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
8	Std 6.7% en Alc50% rep3	Unknown	16.550	78407.2831	0.00	0.5161	2.69	BMB	0.194	0.92	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	Std 6.7% en Alc50% rep4	Unknown	16.567	78407.2816	0.00	0.5212	2.69	BMB	0.196	0.93	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	Std SM al 50%	Unknown	16.550	78406.4064	0.03	3.5621	18.59	BMB	0.194	0.90	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
11	Std SM al 50%	Unknown	16.550	78406.3575	0.03	3.7321	19.41	BMB	0.195	0.91	1.93	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
12	Std SM al 50% con STDI	Unknown	16.983	77830.6653	49.08	2004.0186	6753.84	BMB	0.298	1.05	1.20	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
13	Std 1 Alcoholes	Calibration	16.550	77962.1590	50.25	1547.1335	6527.45	BMB	0.237	1.05	1.35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
14	Std 1 Alcoholes rep	Calibration	16.567	77763.4802	74.43	2237.4583	7685.11	BMB	0.290	1.25	1.34	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
15	Std 2 Alcoholes	Calibration	16.600	77983.0231	49.46	1474.6398	6200.18	BMB	0.235	0.99	1.32	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
16	Std 2 Alcoholes rep	Calibration	16.567	78005.2407	48.78	1397.4430	6420.36	BMB	0.217	1.04	1.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
17	Std 3 Alcoholes	Calibration	16.567	78246.6152	19.03	558.7688	3537.25	BMB	0.155	0.72	1.33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
18	Std 3 Alcoholes rep	Calibration	16.567	77996.1715	48.12	1428.9548	6271.54	BMB	0.227	1.02	1.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
19	Std 4 Alcoholes	Calibration	16.567	77964.4574	52.96	1539.1476	6510.34	BMB	0.235	1.05	1.35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
20	Std 4 Alcoholes rep	Calibration	16.583	76604.7728	67.89	6263.4756	14244.65	BM	0.433	1.66	1.79	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
75	Muestra Pacho 1	Unknown	16.700	78407.4207	0.00	0.0381	0.51	BMB	0.076	0.58	1.47	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
76	Muestra Pacho 1 Rep	Unknown	16.533	77938.4379	49.66	1629.5543	7240.16	BMB	0.223	1.19	1.48	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
77	Muestra Pacho 2	Unknown	16.533	77882.2385	56.77	1824.8236	7611.88	BMB	0.238	1.26	1.52	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
78	Muestra Pacho 2 Rep	Unknown	16.567	77998.3099	44.61	1421.5246	6546.37	BMB	0.215	1.07	1.41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
79	Muestra Pacho 3	Unknown	16.550	77636.3428	85.54	2679.2070	8535.79	BMB	0.311	1.46	1.44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
80	Muestra Pacho 3 Rep	Unknown	16.533	77905.0246	52.05	1745.6516	7227.42	BMB	0.241	1.16	1.47	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
81	Muestra Pacho 4	Unknown	16.567	77987.2784	52.75	1459.8544	6338.12	BMB	0.228	1.03	1.30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
82	Muestra Pacho 4 Rep	Unknown	16.567	77921.0327	61.09	1690.0302	6830.55	BMB	0.244	1.10	1.32	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
83	Muestra Pacho 5	Unknown	16.550	77659.1913	86.03	2599.8180	8718.69	BMB	0.296	1.55	1.48	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
84	Muestra Pacho 5 Rep	Unknown	16.550	77713.5191	79.72	2411.0521	8352.04	BMB	0.286	1.44	1.46	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
85	Muestra Pacho 6	Unknown	16.550	77673.6111	80.80	2549.7155	8291.65	BMB	0.306	1.41	1.41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
86	Muestra Pacho 6 Rep	Unknown	16.550	77680.2892	80.40	2526.5119	8347.18	BMB	0.301	1.42	1.44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
87	Muestra Pacho 7	Unknown	16.550	77973.3972	48.96	1508.0857	6608.98	BMB	0.227	1.08	1.38	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
88	Muestra Pacho 7 Rep	Unknown	16.550	77948.3689	9.41	1595.0483	6538.26	BMB	0.241	1.05	1.33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
89	Muestra Pacho 8	Unknown	16.550	77939.9049	53.82	1624.4571	6528.56	BMB	0.247	1.03	1.33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
90	Muestra Pacho 8 Rep	Unknown	16.533	77748.8130	70.55	2288.4207	7910.95	BMB	0.289	1.29	1.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
91	Muestra Pacho 9	Unknown	16.550	77972.7370	11.10	1510.3795	6373.88	BMB	0.235	1.03	1.27	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
92	Muestra Pacho 9 Rep	Unknown	16.533	77949.1911	53.23	1592.1917	6800.15	BMB	0.232	1.09	1.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
93	Muestra Pacho 10	Unknown	16.533	77939.9389	50.98	1624.3391	6891.70	BMB	0.237	1.12	1.40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
94	Muestra Pacho 10 Rep	Unknown	16.550	77577.4462	87.46	2883.8478	8443.77	BMB	0.340	1.41	1.41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
95	Muestra Pacho 11	Unknown	16.550	77897.9604	55.73	1770.1967	6759.76	BMB	0.259	1.06	1.33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
96	Muestra Pacho 11 Rep	Unknown	16.567	77690.1109	86.00	2492.3854	8107.56	BMB	0.305	1.34	1.33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
97	Muestra Pacho 12	Unknown	16.933	78088.1919	45.14	1109.2229	7080.48	BMB	0.152	0.83	6.72	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
98	Muestra Pacho 12 Rep	Unknown	16.567	78030.3424	54.27	1310.2254	5863.35	BMB	0.220	0.94	1.19	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
99	Muestra Pacho 13	Unknown	16.567	77850.7454	74.93	1934.2487	7197.15	BMB	0.268	1.14	1.27	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
100	Muestra Pacho 13 Rep	Unknown	16.983	77927.1993	49.62	1668.6039	8347.43	BMB	0.195	0.73	5.84	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
101	Muestra Pacho 14	Unknown	16.500	77594.3508	81.62	2825.1114	8627.57	BMB	0.325	1.49	1.48	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
102	Muestra Pacho 14 Rep	Unknown	16.783	78142.4903	42.85	920.5589	5704.63	BMB	0.156	1.01	6.07	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
103	Muestra Pacho 15	Unknown	16.333	77589.4987	46.21	2841.9705	9441.73	BMB	0.299	1.83	1.80	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
104	Muestra Pacho 15 Rep	Unknown	16.433	77778.9139	51.55	2183.8329	8327.99	BMB	0.262	1.44	1.64	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
105	Muestra Pacho 16	Unknown	16.333	77581.5278	50.63	2869.6659	9311.52	BMB	0.307	1.80	1.79	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
106	Muestra Pacho 16 Rep	Unknown	16.567	78406.9142	0.06	1.7978	4.53	BMB	0.377	1.34	4.10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
107	Muestra Pacho 17	Unknown	17.083	77816.6843	45.01	2052.5966	8871.75	BMB	0.226	0.71	5.62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
108	Muestra Pacho 17 Rep	Unknown	17.200	77544.6650	49.62	2997.7484	10087.02	BMB	0.292	0.64	4.66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
109	Muestra Pacho 18	Unknown	16.350	77511.2919	50.33	3113.7060	9508.93	BMB	0.325	1.86	1.78	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
110	Muestra Pacho 18 Rep	Unknown	16.867	76859.0049	83.37	5380.1267	10565.67	BMB	0.508	2.40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
111	Muestra Pacho 19	Unknown	16.400	78406.8202	0.01	2.1245	2.25	BMB	0.879	1.42	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
112	Muestra Pacho 19 Rep	Unknown	16.417	77795.4019	45.47	2126.5438	8184.58	BMB	0.258	1.40	1.67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
113	Muestra Pacho 20	Unknown	16.383	77704.8524	47.76	2441.1652	8737.42	BMB	0.278	1.57	1.69	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
114	Muestra Pacho 20 Rep	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
115	Muestra Pacho 21	Unknown	16.367	77155.9649	84.65	4348.3166	10470.86	BMB	0.413	2.37	1.76	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
116	Muestra Pacho 21 Rep	Unknown	16.867	78406.8574	0.01	1.9952	2.73	BMB	0.755	1.64	1.41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
117	Muestra Pacho 22	Unknown	17.117	78208.9662	13.78	689.5832	6200.41	BMB	0.107	0.90	5.62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
118	Muestra Pacho 22 Rep	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
119	Muestra Pacho 23	Unknown	16.367	77501.4258	57.74	3147.9863	9508.36	BMB	0.329	1.81	1.71	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
120	Muestra Pacho 23 Rep	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
121	Muestra Pacho 24	Unknown	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
122	Muestra Pacho 24 Rep	Unknown	16.400	74587.2673	97.95	13273.4522	14150.99	BMB	0.926	2.82	1.59	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
123	Muestra Pacho 25	Unknown	17.050	78184.7518	18.45	773.7181	6438.95	BMB	0.116	0.85	7.76	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
124	Muestra Pacho 25 Rep	Unknown	16.850	78397.8673	1.56	33.2321	339.48	BMB	0.099	1.02	7.11	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
125	Muestra Pacho 26	Unknown	16.400	77692.4265	49.16	2484.3397	8660.28	BMB	0.284	1.51	1.65	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
126	Muestra Pacho 26 Rep	Unknown	16.433	74991.2862	98.63	11869.6578	14234.86	BMB	0.821	2.42	2.98	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
127	Muestra Pacho 27	Unknown	16.367	77685.8667	49.64	2507.1323	8909.82	BMB	0.280	1.65	1.74	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
128	Muestra Pacho 27 Rep	Unknown	16.833	78394.9352	2.59	43.4198	406.75	BMB	0.109	0.96	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

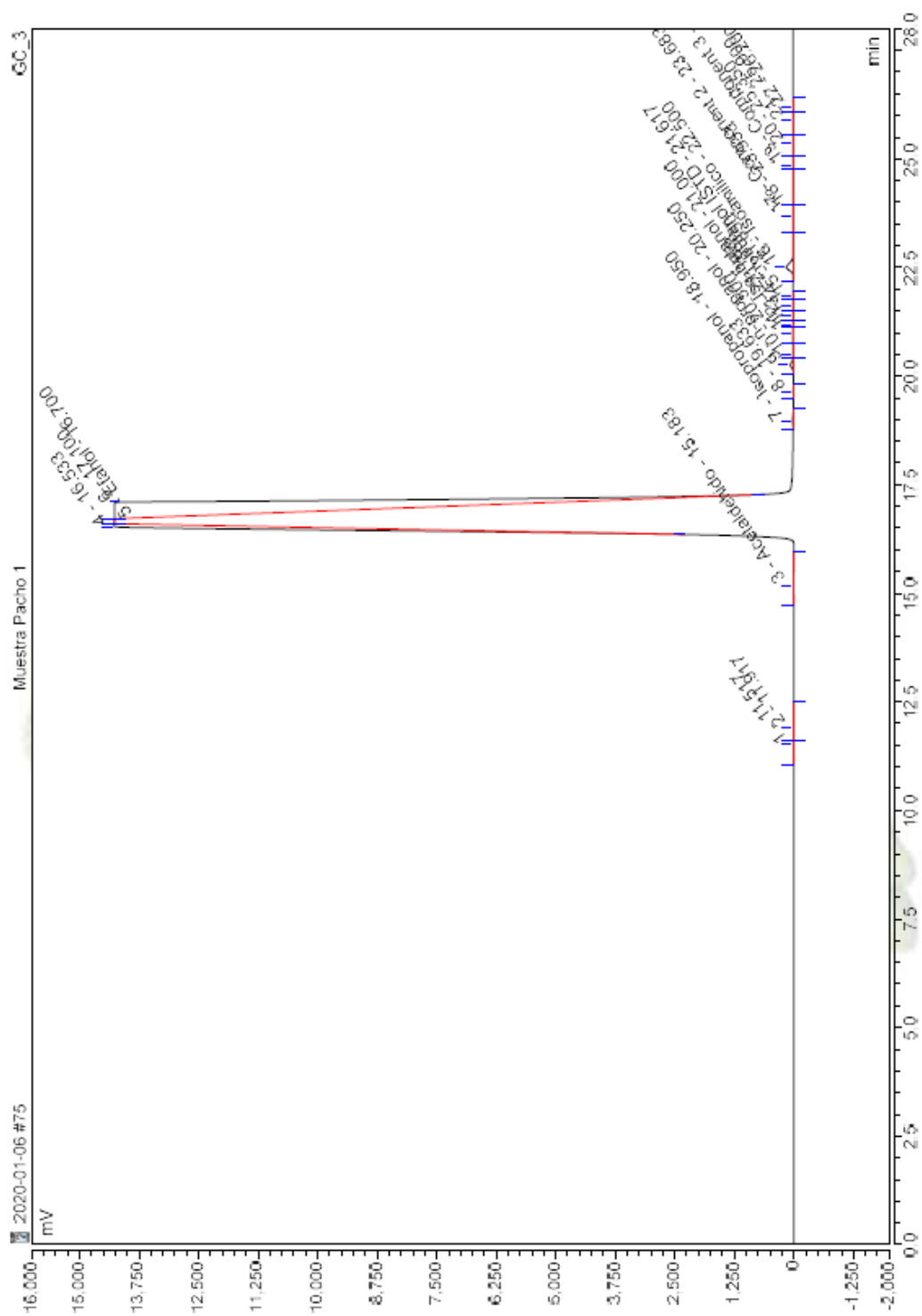
Nota: Los valores que no hay en la columna de mg% AA es debido a errores del cromatógrafo de gases.

**ANEXO V. Rendimiento en mL de etanol por cada gramo de muestra ocupada de jacinto de agua.**

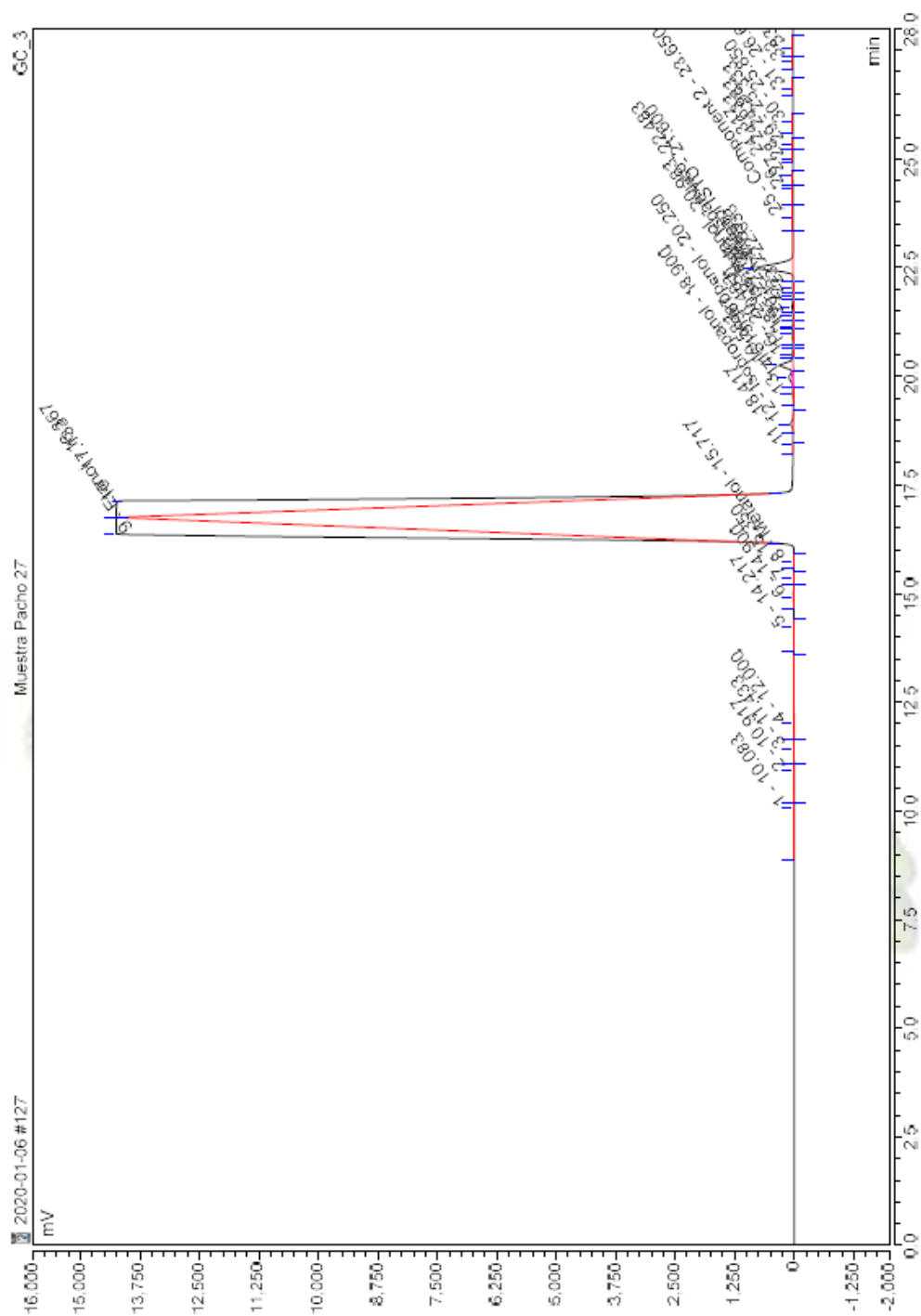
Condiciones establecidas								
pH	T	tiempo	Corridas (duplicado)	mL Destilado	% V/V	mL Etanol	Rendimiento mL/g	
6	30	3	1	7	49,54	3,47	0,23	
6	30	7	1	4	49,72	1,99	0,13	
6	25	5	1	6	49,68	2,98	0,20	
5	30	5	1	9	49,72	4,48	0,30	
5	30	5	1	7	49,71	3,48	0,23	
5	35	3	1	8	49,70	3,98	0,27	
5	25	7	1	5	49,73	2,49	0,17	
5	25	3	1	12,3	50,00	6,15	0,41	Rendimiento Max.
4	30	3	1	11	49,56	5,45	0,36	
5	30	5	1	7	49,72	3,48	0,23	
4	35	5	1	6,5	49,68	3,23	0,22	
4	25	5	1	9	49,74	4,48	0,30	
4	30	7	1	4,9	49,70	2,44	0,16	
5	35	7	1	4	49,69	1,99	0,13	
6	35	5	1	3	49,80	1,49	0,10	
6	30	3	2	7	50,00	3,50	0,23	
6	30	7	2	3,5	49,87	1,75	0,12	
6	25	5	2	6	49,47	2,97	0,20	
5	30	5	2	8	49,55	3,96	0,26	
5	30	5	2	8,5	49,55	4,21	0,28	
5	35	3	2	9	49,42	4,45	0,30	
5	25	7	2	5,5	49,62	2,73	0,18	
5	25	3	2	12	49,83	5,98	0,40	Rendimiento Max.
4	30	3	2	10	49,43	4,94	0,33	
5	30	5	2	7,5	49,55	3,72	0,25	
4	35	5	2	7	47,56	3,33	0,22	
4	25	5	2	9	49,60	4,46	0,30	
4	30	7	2	5	49,20	2,46	0,16	
5	35	7	2	4,5	49,54	2,23	0,15	
6	35	5	2	3,5	49,99	1,75	0,12	
4,2	25	3	1 (Biorreactor)	170	49,99	84,99	0,42	Rendimiento Max.
4,2	25	3	2 (Biorreactor)	170	49,54	84,22	0,42	Rendimiento Max.

*Fuente: Autor*



**ANEXO VII.** Cromatograma de la muestra experimental con mayor mg% AA.

Nota: Condiciones establecidas de la mejor muestra: pH 5, 25°C y 3 días.

**ANEXO VIII.** Cromatograma de la muestra optimizada en el biorreactor.

Nota: Condiciones establecidas de la muestra: pH 4,2, temperatura de 25°C y tiempo de 3 días.

**ANEXO IX.** Cromatograma de comparación entre la muestra optimizada en el biorreactor y la mejor muestra experimental.

