



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DEL LIXIVIADO
GENERADO DE LOS RESIDUOS URBANOS ORGÁNICOS PROVENIENTES DEL
MERCADO MUNICIPAL EL ARENAL DEL CANTÓN CUENCA

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

AUTOR: PAULO ANDRÉS ARIAS NAZARENO

TUTOR: ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2022

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Paulo Andrés Arias Nazareno con documento de identificación N° 0104782560, manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 4 de agosto del 2022

Atentamente,



Paulo Andrés Arias Nazareno

0104782560

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA**

Yo, Paulo Andrés Arias Nazareno con documento de identificación N° 0104782560, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del lixiviado generado de los residuos urbanos orgánicos provenientes del mercado municipal El Arenal del cantón Cuenca”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Ambiental, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 4 de agosto del 2022

Atentamente,



Paulo Andrés Arias Nazareno

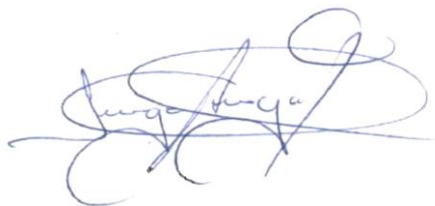
0104782560

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Braulio Amaya Pinos con documento de identificación N° 0103444923, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DEL LIXIVIADO GENERADO DE LOS RESIDUOS URBANOS ORGÁNICOS PROVENIENTES DEL MERCADO MUNICIPAL EL ARENAL DEL CANTÓN CUENCA, realizado por Paulo Andrés Arias Nazareno con documento de identificación N° 0104782560, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 4 de agosto del 2022

Atentamente,



Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD.

0103444923

DEDICATORIA

A mis familiares Joel Arias, Marlene Nazareno, Karla Arias, por su amor, motivación, por nunca rendirse conmigo y no dejar que yo me rinda, por mostrarme su apoyo incondicional para poder culminar mi carrera frente a cualquier adversidad, por ser un ejemplo de lucha, dedicación, constancia, superación, esfuerzo moral y económico, son mi vida y todo esto es posible gracias a ustedes.

A mis amigos en especial Andrés Armijos y Jorge castillo que han sido una motivación para poder seguir adelante en mis proyectos, por apoyarme durante mi carrera universitaria, brindarme un poco de su sabiduría y compartirme anécdotas de sus experiencias, pero sobre todo por su confianza y cariño.

A mi mascota Snooks por permanecer conmigo cada noche mientras realizaba mis tareas y trabajos universitarios.

Paulo Arias

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a mi tutor Ing. Jorge Amaya, PhD por su entera disposición en el desarrollo de mi trabajo experimental.

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional, por estar siempre pendiente de mí durante el proceso de mi carrera universitaria, a mis amigos y compañeros con los que compartí los mejores momentos durante mi formación como profesional.

Al equipo de laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana conformado por la Dra. Mónica Espadero, Ing. Sandy Gavilanes e Ing. Marlon Loayza por todo el apoyo recibido y por sus conocimientos brindados en los procedimientos realizados en los laboratorios.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad determinar las condiciones óptimas y la calidad de bioetanol obtenido a partir de la fracción orgánica de los residuos urbanos.

Se inició con el desarrollo de dos tipos de hidrólisis: Enzimática y Química en la cual se utilizó varias concentraciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4) por medio de dilución y amilasa con la finalidad de romper los enlaces de los carbohidratos complejos (almidones) en azúcares simples como lo es la glucosa, una vez que se haya realizado este proceso se verifica mediante las reacciones de Fehling y se cuantifica su concentración con ayuda del espectrofotómetro de luz UV – visible. Luego se procede a realizar el proceso de fermentación con la ayuda de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante el cultivo Agar dextrosa, tomando en consideración factores fundamentales como la temperatura que no debe variar entre los 30 y 35 ° C y pH entre 4.0 y 4.7.

La medición de los grados Brix es de vital importancia durante el proceso de fermentación ya que indica que la muestra está lista para la destilación alcohólica. Esta destilación alcohólica es de carácter simple.

Por consiguiente, el volumen de destilación de cada muestra es medido para conocer la cantidad del mismo con precisión, luego será analizada mediante picnometría para conocer su densidad y grado alcohólico aplicado la Normativa Ecuatoriana INEN 360 mediante tablas descritas por el equipo de reflectometría.

Abstract

The purpose of this work is to determine the optimal conditions and the quality of bioethanol obtained from the organic fraction of urban waste. It began with the development of two types of hydrolysis: Enzymatic and Chemical in which various concentrations of sulfuric acid (H_2SO_4) were used by means of dilution and amylase in order to break the bonds of complex carbohydrates (starches) into simple sugars. such as glucose, once this process has been carried out, it is verified by Fehling reactions and its concentration is quantified with the help of the UV-visible light spectrophotometer. Then, the fermentation process is carried out with the help of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast through the Dextrose Agar culture, taking into consideration fundamental factors such as temperature, which should not vary between 30 and 35° C, and pH between 4.0 and 4.7.

The measurement of Brix degrees is of vital importance during the fermentation process since it indicates that the sample is ready for alcoholic distillation. This alcoholic distillation is simple in nature.

Therefore, the volume of distillation of each sample is measured to know the quantity of the same with precision, then it will be analyzed by means of pycnometry to know its density and alcoholic degree, applying the Ecuadorian Regulation INEN 360 through tables described by the reflectometry team.

TABLA DE CONTENIDOS

1	CAPÍTULO I	16
	INTROUCCIÓ	16
	JUSTIFICACION	17
	ANTECEDENTES	18
1.1	Objetivos	20
1.1.1	Objetivo general	20
1.1.2	Objetivos específicos	20
2	Capítulo II	21
2.1	Marco teórico	21
2.1.1	Características de los lixiviados	21
2.1.2	Aprovechamiento energético de los residuos	22
2.1.3	Residuos orgánicos como fuente de bioetanol	23
2.1.4	Generalidades de los carbohidratos	28
2.1.5	Disacáridos	31
2.1.6	Polisacáridos	32
2.2	Tipos de hidrólisis	32
2.2.1	Hidrólisis enzimática	32
2.2.1	Hidrólisis química	33
2.3	Determinación de azúcares reductores mediante el método de Miller (DNS)	34

2.3.1	Método de Beer Lamber	35
2.4	Prueba de Fehling.....	35
2.5	Fermentación Alcohólica	36
2.5.1	Clases de microorganismos usados en la fermentación	38
2.5.2	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.5.3	Generalidades.....	38
2.5.4	Taxonomía	39
2.5.5	Requisitos físicos de <i>S. cerevisiae</i>	39
2.5.6	Requerimientos Nutricionales de <i>S. cerevisiae</i>	40
2.6	Destilación	41
2.7	Biocombustibles.....	42
2.7.1	El Bioetanol	43
2.7.2	Primera generación de biocombustibles.....	45
2.7.3	Segunda generación de biocombustibles.	45
2.8	Biomasa.....	45
2.8.1	Tipos de biomasa.	46
3	CAPÍTULO III	47
3.1	METODOLOGÍA	47
3.2	Pre tratamiento	47
3.3	Primera etapa.....	48
3.3.1	Filtración y medición de pH.....	48

3.3.2	Prueba de Fehling	50
3.3.3	Determinación de azúcares reductores.....	51
3.4	Hidrólisis química.....	53
3.5	Hidrólisis enzimática.....	55
3.6	Fermentación alcohólica	58
3.6.1	Destilación del biocombustible.....	61
4	Capítulo IV.....	62
4.1	ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	62
4.1.1	Azúcares reductores	62
4.1.2	Glucosa presente en el mosto hidrolizado.....	66
4.1.3	Determinación de azúcares reductores.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1.4	Grados Brix.....	72
4.1.5	Resultados de la destilación	74
5	Discusión.....	76
6	Conclusiones	78
7	Recomendaciones.....	79
8	Bibliografía	79
9	Anexos	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción real y proyectada de bioetanol en Ecuador (Mml).	19
Figura 2. Conductividad eléctrica en los lixiviados agroecológico y convencional.	22
Figura 3. Porcentaje de composición de azúcar en diversas frutas y verduras.	25
Figura 4. Presentación esquemática de los pasos involucrados en la producción de bioetanol a partir de materias primas de primera y segunda generación.	26
Figura 5. Estructura de la D-ribosa.	29
Figura 6. Configuración química de las hexosas: D-glucosa, D-galactosa, D-Manosa, D-fructosa.	30
Figura 7. Configuración adicional del grupo hidroxilo de α -D-Glucose a β -D-Glucose.	30
Figura 8. Configuración estructural de: α -Maltosa y β -Lactosa.	32
Figura 9. Interacción enzima - sustrato.	33
Figura 10. Reacciones de hidrólisis de celulosa y xilano. La hidrólisis química de celulosa y hemicelulosa en azúcares monoméricos procede a través de oligómeros y va acompañada de reacciones secundarias que forman furanos y otros productos de degradación..	34
Figura 11. Reacción química para la determinación de los azúcares reductores.	34
Figura 12. Esquema de la utilización del reactivo de Fehling.	36
Figura 13. Esquema de fermentación y desviación alcohólica. Línea negra: vía alcohólica; línea roja: vía glicerol-pirúvica; cuadro amarillo: metabolitos intermediarios implicados en la fermentación alcohólica.	37
Figura 14. Características principales de una célula típica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Figura 15. Esquema destilación simple.	42
Figura 16. Biocombustibles de primera generación.	45
Figura 17. Biocombustibles de tercera generación.	45
Figura 18. Adecuación de la materia prima previo al análisis.	48
Figura 19. Filtración del lixiviado.	49
Figura 20. Lixiviado después del proceso de filtración.	49
Figura 21. Medición del pH inicial de la muestra de lixiviado.	50
Figura 22. Prueba de Fehling aplicada al lixiviado.	62
Figura 23. Reactivo DNS aforado a 250 mL.	52

Figura 24. Determinación de azúcares reductores mediante método DNS	52
Figura 25. Hidrólisis del ácido diluido	54
Figura 26. Complejo enzimático amilasa	55
Figura 27. Ajuste del pH del liciviado previo a la hidrólisis enzimática.....	56
Figura 28. Proceso de hidrólisis enzimática y control de temperatura	56
Figura 29. Esterilización e los matraces erlenmeyer en autoclave.	57
Figura 30. Muestras hidrolizadas con la enzima amilasa	57
Figura 31. Prueba de Fehling aplicado a los mostos hidrolizados	58
Figura 32. Activación de la levadura en agua destilada..	58
Figura 33. Activación de levadura en medio de cultivo PDA	59
Figura 34. Adición de la levadura activada en agua destilada al mosto hidrolizado.	60
Figura 35. Incubación del mosto en la estufa previo a la fermentación.	60
Figura 36. Medición de los grados brix antes del proceso de fermentación	60
Figura 37. Obtención el bioetanol por medio de la destilación.	61
Figura 38. Análisis del destilado en el equipo FTIR	76
Figura 39. Solución patrón de glucosa	67
Figura 40. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 1 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia	68
Figura 41. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 3 y glucosa estándar con 75.94% de coincidencia	69
Figura 42. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 4 y glucosa estándar con 77.44% de coincidencia.....	69
Figura 43. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 5 y glucosa estándar con 77.66% de coincidencia.....	69
Figura 44. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 6 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia	70
Figura 45. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 7 y glucosa estándar con 77.42% de coincidencia	70

Figura 46. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 8 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia	70
Figura 47. Comparación global entre la glucosa obtenida de todas las muestras hidrolizada y glucosa.	71
Figura 48. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrólisis química y glucosa estándar	71
Figura 49. Subproductos presentes en la muestra hidrolizada mediante acido diluido al 60%	71
Figura 50. Curva de calibración a partir de la solución patrón de glucosa.	64
Figura 51. Mapas de curvas de residuo (cualitativos) para diferentes sistemas ternarios.....	75
Figura 52. Recolección de materia orgánica	90
Figura 53. Lixiviado recolectado	90
Figura 54. Filtración del lixiviado	91
Figura 55. Lixiviado filtrado	91
Figura 56. Preparación del reactivo DNS	91
Figura 57. Determinación de azúcares reductores - Curva de calibración	92
Figura 58. Determinación de azúcares reductores	92
Figura 59. Azúcares reductores - Prueba de Fehling	92
Figura 60. Enzima Alfa-amilasa	93
Figura 61. Medición de grados brix	93
Figura 62. Dilución del ácido sulfúrico	94
Figura 63. Hidrólisis enzimática	94
Figura 64. Muestras Hidrolizadas	95
Figura 65. Levadura de cerveza.	95
Figura 66. Activación de levadura en agua destilada	96
Figura 67. Activación de levadura en cultivo PDA.	96
Figura 68. Equipo de destilación simple.	96
Figura 69. Prueba de lucas	97
Figura 70. Espectro de la solución glucosa	97
Figura 71. Porcentaje de coincidencia de la solución patrón glucosa.....	97
Figura 72. Comparación de la muestra hidrolizada N° 3.	99

Figura 73. Comparación de la muestra hidrolizada N° 5.	100
Figura 74.. Comparación de la muestra hidrolizada N° 6.	100
Figura 75. . Comparación de la muestra hidrolizada N° 7.	101
Figura 76. . Comparación de la muestra hidrolizada N° 8.	101
Figura 77. . Comparación de la muestra hidrolizada mediante acido diluido.	102
Figura 78. . Comparación de todas las muestras hidrolizadas.	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la fermentación alcohólica con diferentes tecnologías de conversión de residuos y biomasa.	27
Tabla 2. Taxonomía de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas del etanol.....	44
Tabla 4. Pre tratamiento de los residuos orgánicos.....	47
Tabla 5. Creación de la curva patrón de glucosa	53
Tabla 6. Determinación de la cantidad de glucosa en las muestras del lixiviado.	¡Error!

Marcador no definido.

Tabla 7. Condiciones de trabajo para el proceso de hidrólisis química.	54
Tabla 8. Determinación de azúcares de muestras hidrolizadas.....	54
Tabla 9. Dosificación de los mostos hidrolizados.....	56
Tabla 10. Eficiencia de hidrólisis.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 11. Datos experimentales del proceso de fermentación con levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 12. Datos para la curva de calibración	63
Tabla 13. Concentración de las muestras de hidrólisis enzimática	65
Tabla 14. Datos experimentales de la fermentación alcohólica.	72
Tabla 15. Análisis de varianza para Azúcares fermentables.....	73

1 CAPÍTULO I

INTROUCCIÓN

En el mundo se producen aproximadamente 1600 millones de toneladas por año de residuos sólidos caracterizada por un crecimiento exponencial y a su vez una nocividad creciente (J. Chen et al., 2021), los cuales traen consigo graves problemas, no solo el deterioro progresivo del medio ambiente, sino también desde el ámbito económico puesto que los costos de recolección, transporte y disposición final son cada vez mayores.

En los últimos años la población del Ecuador se ha incrementado notablemente, generándose una gran cantidad de residuos sólidos que val alrededor de 4.5 millones de toneladas por año, de las cuales 3.375 millones (75%) son orgánicos y 1.125 millones (25%) tienen el potencial de ser reciclado (Solíz Torre, 2015) de tal forma que es evidente que la fracción orgánica predomina dentro de la composición de los residuos sólidos municipales y al no poseer una adecuada disposición, genera problemas ambientales como la contaminación del aire, suelo y agua, generación de malos olores, emisión de gases de efecto invernadero, entre otros(Garcés, s. f.).

En el caso del cantón Cuenca, la generación de residuos sólidos anual asciende a 127.044 toneladas, 85.119,5 toneladas (67%) son residuos orgánicos y 41.924,5 toneladas (33%) son materiales potencialmente reciclables. En base a las cifras mencionadas se considera que es de suma importancia realizar proyectos enfocados al aprovechamiento de la fracción orgánica puesto a que permite recuperar el valor bioquímico y emplearlos en varias aplicaciones ya sean de valor económico como ambiental trayendo beneficios como extender la vida útil de rellenos sanitarios y a su vez disminuir impactos ambientales.

Con el tratamiento de este tipo de residuos orgánicos pueden ser transformados en productos de carácter energético tales como; eléctrica, térmica y biocombustibles trayendo consigo beneficios para la población(García, 2018).

El presente proyecto de investigación consiste en la obtención de biocombustible (bioetanol) a partir de la fracción orgánica de los RSM provenientes de los mercados municipales, mediante procesos de hidrólisis enzimática y posterior a la fermentación, generando así una alternativa diferente a los métodos tradicionales como son el compost y la lumbricultura.

El bioetanol tiene varias aplicaciones como disoluciones, disolventes de colorantes, disolventes de resinas, jabón, aceites, etc., También puede ser mezclado con combustibles fósiles para mejorar sus propiedades cuya mezcla recomendada en proporción del 10 al 25 % obteniendo un octano entre 70 y 75, mayor que el de la gasolina sin ser mezclada (J. Chen et al., 2021).

JUSTIFICACION

El crecimiento de la población en el Ecuador y en la ciudad de Cuenca tanto del centro urbano, así como de los sectores rurales ha originado que se requiera un mayor consumo de alimentos como también una serie de diversos productos para satisfacer las necesidades y garantizar un desarrollo normal (Coronel, 2020). Al requerir cada vez más alimentos, esta actividad de producción alcanza niveles industrializados que generan una gran cantidad de residuos de origen orgánico e inorgánico (Oswaldo, 2017). Que en su mayoría son generados en 5 los mercados municipales estos al ser de concurrencia pública. La población acude a suministrarse de una variedad de productos. Los pequeños y grandes productores y detallistas que realizan sus ferias generan un sinnúmero de desechos producto de sus ventas.

La participación activa de la comunidad como responsable directa del consumo de recursos y la generación de residuos, es muy limitada. La población se limita a pagar por un servicio municipal de aseo (barrido de calles, recolección de desechos), pero no por una buena disposición y tratamiento de los mismos.

En la ciudad de Cuenca capital de la provincia del Azuay, fundada el 12 de abril de 1557, declarada Patrimonio cultural de la Humanidad por la UNESCO, en la actualidad ha crecido el número de actividades que buscan la implementación de varios sistemas para el aprovechamiento y valorización de los desechos

con la finalidad de que no todos los residuos estén destinados al relleno sanitario de Pichacay, ampliando de esta manera las cadenas de reciclaje, recuperación y reutilización de materiales orgánicos e inorgánicos.

En la actualidad, la materia orgánica se usa en la producción de compost o de humus a través de lumbricultivos, sin embargo, deben buscarse otras alternativas que permitan generar nuevos emprendimientos. El tema de las energías alternativas, ha generado una gran expectativa en cuanto a las oportunidades que se tienen de aprovechar los residuos sólidos orgánicos, generar alto impacto ambiental, económico y social, e impulsar el uso y desarrollo de los biocombustibles.

ANTECEDENTES

En el año 2010, en la provincia de Guayas, se inició el plan piloto Ecopaís con el propósito de probar la mezcla de combustible E5, compuesta por un 5 % (v/v) de bioetanol y 95 % de gasolina, que finalizó en el año 2014 (Paredes, 2015). En el año 2016, se planteó extender el uso del E5 a todo el país y, posteriormente, incrementar al 10 y al 15 % el porcentaje de bioetanol en la mezcla, en pos de la sustitución total de la demanda de la gasolina para el año 2019, la cual representa el 79 % del consumo de gasolinas y alrededor del 46 % de la demanda de combustibles líquidos del país para el año 2014 (Ministerio Coordinador de Sectores Estratégicos, 2015). Para ello, la producción de bioetanol debería incrementarse en una cifra cercana al 200 % en el lapso 2017-2019 (figura 1), lo cual evidencia la magnitud del reto a superar y al cual este estudio aspira a contribuir proponiendo una ruta alterna de producción de bioetanol.

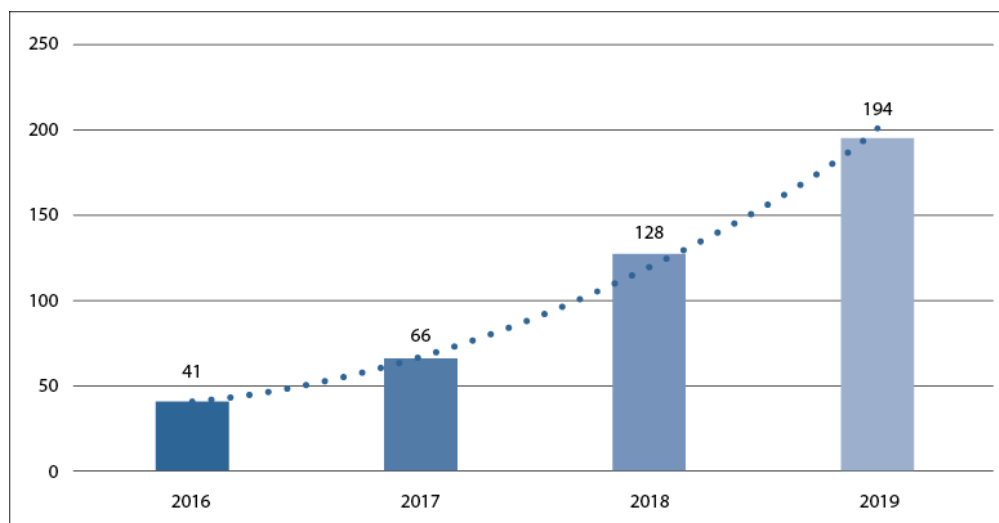


Figura 1. Producción real y proyectada de bioetanol en Ecuador (Mml).
Fuente: (Paredes, 2015)

Se han realizado varios estudios en el Ecuador sobre la producción de bioetanol teniendo en consideración varios tipos de biomasa: (García M. et al., 2013) estima la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas de arroz, banano y caña de azúcar. (Guerrero & Muñoz, 2018) estimaron la sustentabilidad ambiental con el fin de demostrar la capacidad de reducir los gases de efectos de invernadero (GEI) con resultados favorables para ambos casos. También se han estudiado ciertas especies como la paja *Stipa ichu* como fuente primaria para la producción de bioetanol (Albarracín et al., 2015). De igual manera (Pérez et al., 2017) ha realizado estimaciones de varios cultivos con gran potencial energético como en el caso de la provincia del Chimborazo el cual se evaluó la producción de bioetanol a partir de la papa como también la debida valoración de uso alternativo en respuesta a la sobreproducción de este cultivo, que ocasiona la disminución de aproximadamente el 50 % en el precio de comercialización e incluso se considera la utilización de desechos o productos fuera de especificación.

Con lo anterior expuesto es evidente que se pretende minimizar el problema ambiental que ocasiona los combustibles fósiles creando fuentes de energía renovable, como es el caso del bioetanol el cual genera una economía sostenible y sustentable a base de la reutilización de subproductos.

Cabe recalcar que la producción de bioetanol también fue propuesta en el programa “Programa de Formulación de gasolina Extra con bioetanol anhidro” el cual fue planteado en dos etapas:

- La primera consiste en que a partir de los 800 000 litros diarios de gasolina extra se de adoptar el 5 % de bioetanol, es decir que se estimaría alrededor de 40 000 litros diarios de este biocombustible.
- La segunda etapa consiste en lo anterior mencionando, pero con la intención de incrementar el gradualmente hasta un 10% de bioetanol trayendo consigo un crecimiento considerable a nivel nacional de bioetanol el cual se pretende llegar hasta los 590 000 litros por día (Cornejo et al., 2017).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Analizar la obtención de bioetanol a partir del lixiviado generado por los residuos urbanos orgánicos provenientes del mercado municipal “El Arenal” mediante procesos de fermentación con la finalidad de reducir la generación de desechos orgánicos y promover un uso efectivo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar y analizar las condiciones óptimas de trabajo que favorezcan al proceso de hidrólisis enzimática aplicada a la fracción orgánica de los residuos (lixiviados) como también el debido análisis de los parámetros físico-químicos que garanticen una correcta eficiencia en el proceso de fermentación alcohólica.
- Evaluar el comportamiento del proceso de fermentación del sustrato mediante el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentador.
- Realizar el análisis físico-químico de los principales parámetros del biocombustible obtenido con la especie empleada (*Saccharomyces cerevisiae*).

2 Capítulo II

2.1 Marco teórico

2.1.1 Características de los lixiviados

El crecimiento de la población ha originado que se requiera un mayor consumo de alimentos como también una serie de diversos productos para satisfacer las necesidades y garantizar un desarrollo normal, al requerir cada vez más alimentos, esta actividad de producción alcanza niveles industrializados ha aumentado la tasa de eliminación de residuos orgánicos. En base a lo anterior se evidencia un fenómeno de alto consumo y gran parte de los desechos sólidos están constituidos por residuos orgánicos, cuyo inadecuado manejo se convierte en un factor altamente contaminante por la elevada segregación de lixiviados (Abiriga et al., 2021).

Los residuos orgánicos generan problemas medio ambientales a la hora de su disposición final, afectando los ecosistemas y la salud de las poblaciones aledañas, debido a que, en su proceso de descomposición liberan agua que se mezcla con los demás desechos, lo que produce lixiviados con altas cargas contaminantes, y los rellenos sanitarios, en su mayoría no cuentan con una planta de tratamiento (Granada Torres & Prada Millán, 2015).

Los lixiviados contienen concentraciones elevadas de contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluyendo ácidos húmicos, sustancias orgánicas, nutrientes y metales pesados, así como sales inorgánicas que elevan la conductividad eléctrica y generan agentes infecciosos (Universidad del Quindío et al., 2018). Los rellenos sanitarios son la alternativa mayormente implementada, por su viabilidad técnica y económica, para la disposición final de residuos.

La Figura 2 muestra los niveles de la conductividad eléctrica para cada tipo de lixiviado, analizando los niveles del lixiviado convencional, si se parte de la situación práctica de una eventual dilución presenta cierto carácter salinizador el suelo pueden llevar a una considerable adición de sales al suelo, lo cual

generará problemas en la disponibilidad de agua para las plantas, debido al efecto de retención de agua por los complejos salinos que se agregan al suelo

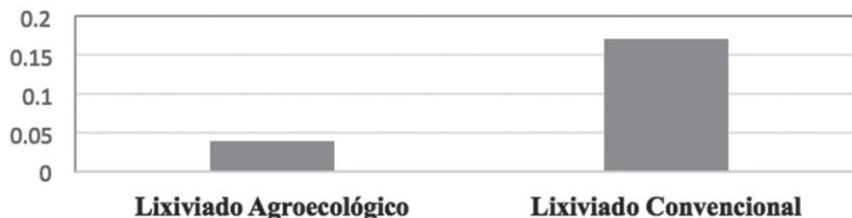


Figura 2. Conductividad eléctrica en los lixiviados agroecológico y convencional.

Fuente: (Universidad del Quindío et al., 2018)

Los procesos llevados a cabo en los rellenos sanitarios generan una gran cantidad de lixiviados. Los lixiviados se pueden definir como cualquier líquido con la capacidad de filtrarse en el suelo cuando éste tiene contacto con los residuos (Abiriga et al., 2021). Se forma a partir de la percolación del agua (lluvia) llegando a ser un líquido contaminante ya que contiene importantes cantidades de sólidos disueltos, suspendidos como también sustancias inorgánicas y una alta concentración de sustancias orgánicas (Gu et al., 2019).

Como ya se mencionó, una gran parte de materia orgánica presente en los lixiviados está compuesta de materia similar al humus con alto peso molecular predominantemente asociada con los coloides. Los residuos orgánicos se pueden descomponer de dos maneras ya sea en presencia de oxígeno (aerobia) o en ausencia del mismo (anaerobia) lo cual genera amonio y posteriormente gases de efecto invernadero (CH_4). La materia orgánica en general como son los restos de frutas y vegetales producen una cantidad importante de residuos lo cual ha llegado a ser un tema de preocupación ya que tales residuos originan problemas medioambientales.

2.1.2 Aprovechamiento energético de los residuos

El mundo necesita urgentemente recurrir a otra opción de fuentes de energía en respuesta al rápido agotamiento del suministro mundial de energía. Debido al agotamiento del petróleo, el calentamiento global mundial y los efectos de gases de invernadero hacen que la tierra esté en condiciones alarmantes a

pesar de que depende, en su mayoría, de las fuentes limitadas de combustible de origen fósil (petróleo) que luego no podrán satisfacer las demandas futuras (Llenque-Díaz et al., 2020). La situación es cada vez más crítica por el cambio climático y por consiguiente surge la necesidad de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, lo que conlleva al uso del bioetanol como alternativa o sustitución del combustible fósil.

El concepto de producir energía mediante la utilización de los residuos es asequible, barato y eficiente. Recientemente, una enorme cantidad de fuentes renovables (biomasa) de energía está creciendo rápidamente en base a tecnologías de energía renovable que incluyen biomasa sólida, combustibles líquidos y biogases (Khandaker et al., 2018). En el espectro de tecnologías nuevas y existentes acerca de la gestión de residuos se han abarcado estrategias para el mantenimiento de la calidad del ambiente y sostenimiento de metas futuras.

Dentro de la perspectiva de aumentar la energía renovable para mitigar el calentamiento global y en relación al desarrollo de alternativas de energía sostenible, la biomasa se ha considerado como una posible fuente de energía renovable (Arias et al., 2018). La energía es un bien esencial para el bienestar del hombre por ello el aumento en la producción y consumo de energía renovable y no renovable conduce a la investigación de nuevos medios de utilización y reutilización de nuevas fuentes de energía (Lu et al., 2014).

2.1.3 Residuos orgánicos como fuente de bioetanol

Los desechos vegetales surgen a lo largo de la cadena de suministro a partir del productor al consumidor y varían ampliamente dependiendo de su cosecha, procesamiento y comercialización. Estos desechos se generan durante la producción, cosecha, clasificación, almacenamiento, comercialización hasta el consumo, todos los residuos vegetales tienen como destino final los rellenos sanitarios esto a su vez difunden olores desagradables lo cual producen metano (CH_4) que es un gas de efecto invernadero común, y también produce una gran cantidad de lixiviados dañinos, que como ya se mencionó anteriormente, pueden contaminar el agua y el suelo (Koc-Jurczyk & Jurczyk, 2020).

Luego de que varios residuos hayan sido utilizados y desechados, las partes restantes de los mismos como las frutas sirven como una rica fuente de material lignocelulósico y también se utilizan como materia prima para procesos simultáneos de sacarificación y fermentación mediante el empleo de enzimas y levaduras para la obtención del bioetanol. Al igual que otros tipos de residuos vegetales como: cáscaras, tallos y hojas también es un tipo de desperdicio vegetal biodegradable que genera grandes cantidades, si bien no emiten un olor tan desagradable, lo que ocasiona originar un problema de plagas al atraer; ratas, insectos, así como vectores de diversas enfermedades humanas (Lozinski et al., 2019).

Los residuos vegetales se generan principalmente durante el procesamiento, envasado de hortalizas, y pérdidas postcosecha por falta de instalaciones de almacenamiento. La descomposición microbiana de los residuos vegetales genera bioetanol por su alto contenido en humus, muchos investigadores han afirmado que los residuos vegetales es una biomasa rica en carbohidratos, uno de los sustratos para la generación de energía renovable. La investigación sobre el uso de residuos de frutas y verduras para la fabricación de biocombustibles está resultando atractiva en diferentes países (Sulaiman et al., 2014).

En el caso de los residuos alimentarios con almidón, se requiere una etapa de hidrólisis para obtener azúcares (glucosa) antes de la fermentación alcohólica. Convencionalmente, se realiza un proceso mediante el empleo de enzimas como las alfa-amilasas. Como se puede apreciar en la figura 3, los residuos orgánicos tienen un gran potencial químico debido a la gran cantidad de sacáridos que contienen.

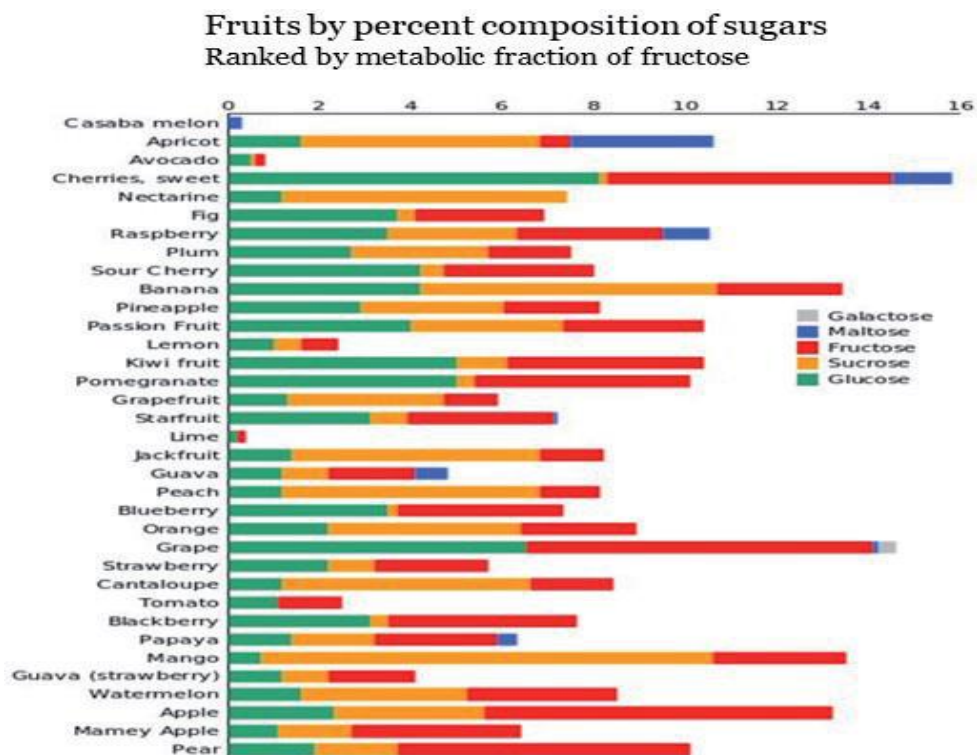


Figura 3. Porcentaje de composición de azúcar en diversas frutas y verduras.
Fuente: (Khandaker et al., 2020)

(Promon et al., 2018) menciona que los desechos vegetales son una fuente importante material de lignocelulosa y que podrían hidrolizarse en D-xilosa y glucosa. Parte de su composición también presenta una reconocida fuente de lípidos, aminoácidos, almidones, carbohidratos y fosfatos (Pleissner et al., 2014). Los desechos azucarados se pueden convertir directamente en bioetanol utilizando cepas adecuadas, como *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de los residuos ricos en almidón, el proceso de hidrólisis es requerida para obtener azúcares (glucosa) antes de la fermentación alcohólica. (Kazemi Shariat Panahi et al., 2022).

Convencionalmente, se realiza un proceso simultáneo de gelatinización y licuefacción utilizando alfa-amilasas termoestables. Por el contrario, los procesos industriales más recientes implican la hidrólisis del almidón por alfa-amilasa en presencia de agua. Después de calentar la mezcla a 140-180 °C, se produce azúcar, mediante la adición de glucoamilasa (Soltanian et al., 2020).

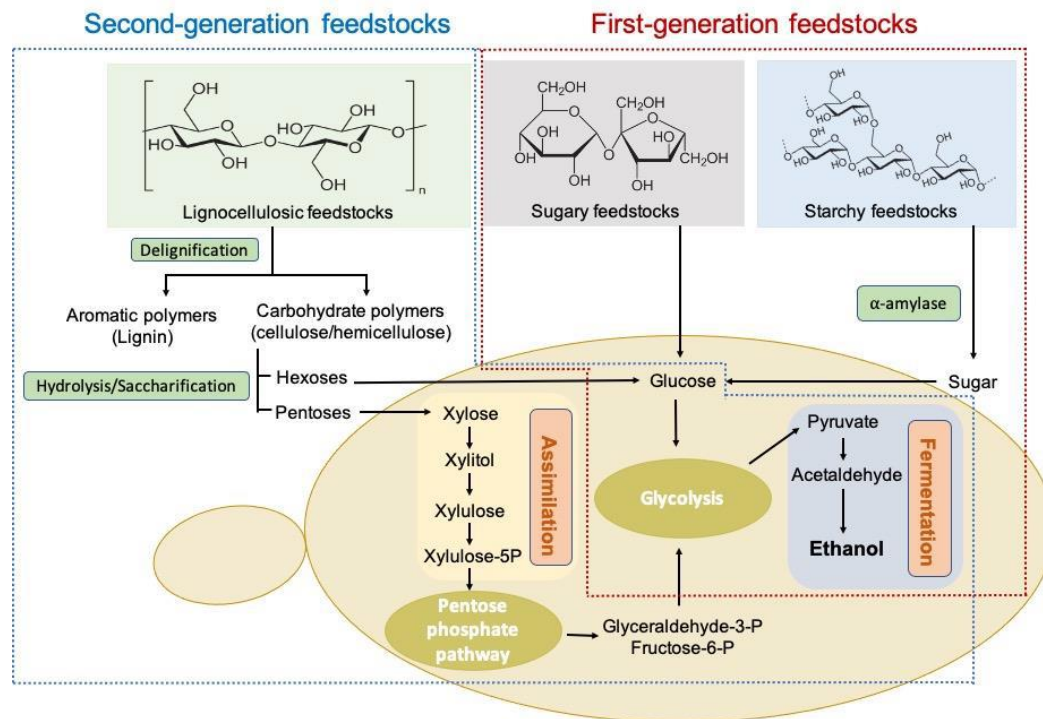


Figura 4. Presentación esquemática de los pasos involucrados en la producción de bioetanol a partir de materias primas de primera y segunda generación.

Fuente: (Kazemi Shariat Panahi et al., 2022)

Para obtener etanol a partir de almidón es necesario romper las cadenas de este polisacárido para obtener azúcares fermentables, por ello, se debe incluir una etapa fundamental de hidrólisis (rompimiento, degradación). Por cada 100g de almidón se pueden obtener teóricamente 111g de glucosa, lo que implica una relación estequiométrica de 9:10 (Gupta et al., 2009). Tradicionalmente se solía emplear el proceso de hidrólisis mediante ácidos diluidos a distintas concentraciones, pero la especificidad de las enzimas, en base a sus condiciones suaves de reacción y la ausencia de reacciones secundarias y subproductos no deseados a diferencia de la hidrólisis ácida, han hecho que las amilasas sean los catalizadores usados para llevar a cabo este proceso. Después de la producción de glucosa y otros azúcares simples a partir de todas las fuentes de azúcar ya antes mencionadas, la bioconversión perdura hasta que el bioetanol se haya producido (Sarkar et al., 2012). Este proceso presenta muchas ventajas incluyendo alto rendimiento energético y subproductos valiosos. En la Tabla 1 se compara la fermentación alcohólica con varias tecnologías de conversión de residuos y biomasa

Tabla 1. Comparación de la fermentación alcohólica con diferentes tecnologías de conversión de residuos y biomasa.

Tecnología	Efecto GEI	Olor	Contaminación Aire agua	Condiciones de conversión	Velocidad del proceso	Rendimiento energético	Costo	Portador de energía primaria	Por producto	Eficiencia general	Madurez del mercado	Principales desventajas
Fermentación Etanólica	++++	++	+++++	30 – 35°C pH 4.5-6.0 Anaeróbico	+++	+++	++	Etanol	Alimentación Animal	Sobre el 85%	Operado comercialmente	-Complejidad especialmente biomasa lignocelulósica
Digestión Aeróbica	++++	+	++++	30-35°C Anaeróbico	+	+	++	Gases Combustibles (CH ₄ y H ₂)	Biofertilizante	10-16%	Operado comercialmente	-Bajos niveles de sustrato en el reactor - Posible mal olor
Gasificación	+++	++++	+++	350-1800°C Aire, oxígeno vapor	+++++	+++	+++	Carbón, gas combustibles (CH ₄ y H ₂)	Ceniza	40-50%	Operado comercialmente	-Complejidad especialmente masa lignocelulósica -Altas emisiones de NO _x y CO ₂
Pirólisis	+++	++++	+++	250 – 750°C Aeróbico	+++++	+++	+++	Bioaceite	Ceniza	80 – 94%	Operado comercialmente	-Corrosividad -Condiciones de biomasa desfavorables Relativamente caro
Combustión	ND	ND	ND	374 – 900°C	ND	ND	ND	Gas (CO, hidrocarburos, Óxidos de nitrógeno y azufre)	Ceniza	ND	Operado Comercialmente	Formación significativa e contaminantes

*ND: no disponible

Fuente: (Kazemi Shariat Panahi et al., 2022)

Como se puede apreciar en la tabla 1 analizando las distintas tecnologías existentes en cuanto a energías renovables se refiere, se puede notar un valor importante en cuanto al rendimiento que se le atribuye a la fermentación alcohólica teniendo en consideración ciertas limitaciones a la hora de considerar la materia prima, es decir el tipo de biomasa con su respectivo pretratamiento.

2.1.4 Generalidades de los carbohidratos

Los carbohidratos cumplen funciones clave en la naturaleza incluyendo una amplia gama de procesos biológicos, como el reconocimiento entre células y la degradación de proteínas como también respuestas inmunitarias/huésped-patógeno y metabolismo (Wu et al., 2021). En comparación con otras biomoléculas, los polímeros y oligómeros de carbohidratos son estructuralmente más complejos debido a su amplia gama de diferencias estereoquímicas, configuración absoluta (D o L) configuraciones anoméricas (α o β).

Los carbohidratos representan un amplio grupo de sustancias que incluyen los azúcares, almidones, polímeros y celulosas. Los atributos comunes de los carbohidratos son que contienen solo elementos de carbono, hidrógeno y oxígeno, y que su combustión produce dióxido de carbono más una o varias moléculas de agua (Das & Kayastha, 2019).

Los carbohidratos más simples son los azúcares de tres carbonos que ocupan un lugar importante en el metabolismo intermedio y los más complejos son los polisacáridos naturales, principalmente de origen vegetal. En la dieta de animales y peces, dos clases de polisacáridos son importantes:

- Polisacáridos estructurales digeribles por especies herbívoras: celulosa, lignina, dextranos, mananos, inulina, pentosanos, ácidos pépticos, agar y quitina; y
- Polisacáridos universalmente digeribles, principalmente almidón.

Los carbohidratos se clasifican generalmente según su grado de complejidad. Por lo tanto, los azúcares libres como la glucosa y la fructosa se denominan monosacáridos; sacarosa y maltosa, disacáridos; y los almidones y celulosas, polisacáridos (Y. Chen et al., 2011). Los hidratos de carbono de cadena corta como la rafinosa, la estaquirosa, que son polímeros de tres, cuatro y cinco azúcares respectivamente, se clasifican como oligosacáridos (Abedi & Pourmohammadi, 2020).

2.1.4.1 Pentosas

Las pentosas son azúcares de cinco carbonos que rara vez se encuentran en estado libre en la naturaleza. En las plantas se presentan en formas poliméricas así, la xilosa y la arabinosa son los constituyentes de los pentosanos presentes en las fibras vegetales y las gomas vegetales, respectivamente (Dura & Rosell, 2016). Como restos de azúcar en los ácidos nucleicos y la riboflavina, la ribosa y la desoxirribosa son constituyentes indispensables del proceso vital. La D-ribosa tiene la siguiente estructura química:

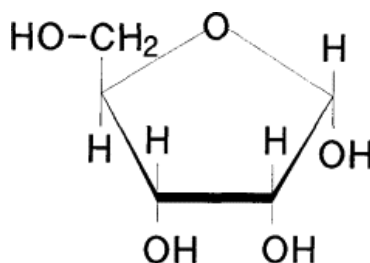


Figura 5. Estructura de la D-ribosa.
Fuente: (Baek et al., 2004)

2.1.4.2 Hexosas

Las hexosas comprenden un gran grupo de azúcares, los principales entre estos son: glucosa, fructosa, galactosa. Mientras que la glucosa y la fructosa se encuentran libres en la naturaleza, la galactosa se encuentra solo en forma combinada. Las hexosas se dividen en aldosas y cetosas según posean grupos aldehídicos o cetónicos, por lo tanto, la glucosa es un azúcar aldo y la fructosa es un azúcar ceto (Nagy & Pohl, 2015).

Todos los azúcares con tres o más átomos de carbono dan lugar a los estereoisómeros. La galactosa y la manosa son estereoisómeros de glucosa que, en teoría, es solo uno de los 16 estereoisómeros. Debido a que las ceto hexosas tienen solo tres centros asimétricos, la fructosa es uno de los ocho estereoisómeros. Las configuraciones químicas de las cuatro hexosas mencionadas son las siguientes:

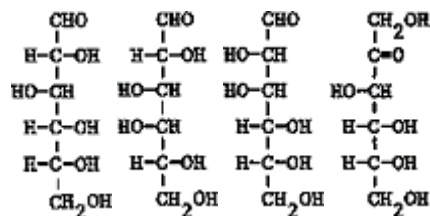


Figura 6. Configuración química de las hexosas: D-glucosa, D-galactosa, D-Manosa, D-fructosa.

La glucosa, generalmente denominada simplemente glucosa, es el azúcar más abundante que se encuentra en la naturaleza; la mayoría de los carbohidratos se convierten eventualmente en una serie de reacciones bioquímicas que producen energía para las células. También se le conoce como dextrosa, por el hecho de que hace girar la luz polarizada en un plano en el sentido de las agujas del reloj (dextrógiro)(Rivera et al., 2010). Un fenómeno general, conocido como mutarrotación, se observa en una variedad de pentosas y hexosas, así como en ciertos disacáridos. (Nagy & Pohl, 2015) ha establecido que existen dos isómeros de D-glucosa, por lo que se requiere un centro asimétrico adicional en este azúcar. Se hizo evidente que la D-glucosa y la mayoría de los demás azúcares tienen estructuras cíclicas. La posición del grupo hidroxilo en relación con el oxígeno del anillo caracteriza esta modificación de configuraciones adicionales. Por convención, el posicionamiento del grupo hidroxilo en el átomo de carbono 1 en el mismo lado de la estructura que el anillo de oxígeno describe una modificación y la colocación del mismo grupo hidroxilo en el lado opuesto del oxígeno del anillo describe una modificación β .

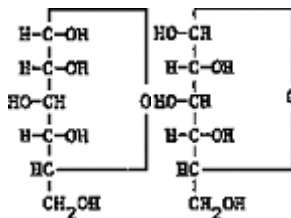


Figura 7. Configuración adicional del grupo hidroxilo de α -D-Glucosa a β -D-Glucosa.

La galactosa se libera cuando se hidroliza la lactosa, un disacárido que se encuentra en la leche y se obtiene por la conversión metabólica de D-glucosa en D-galactosa. La estructura de la D-galactosa como se muestra en la Figura 6, difiere de la glucosa solo en el cuarto átomo de carbono.

Los azúcares que contienen el grupo aldo o ceto son capaces de reducir el cobre en soluciones alcalinas (solución de Fehling) para producir la coloración rojo ladrillo de los iones cuprosos. Estos azúcares se denominan azúcares reductores y la reacción, aunque no es específica para azúcares reductores, tiene uso tanto para determinaciones cualitativas como cuantitativas.

La fructosa es la única cetohexosa importante y se encuentra en estado libre junto con la glucosa en las frutas con cierto estado de madurez y en la miel. Cuando se combina con la glucosa se forma sacarosa. La fructosa es algo más dulce que la sacarosa y se produce comercialmente en cantidades crecientes como edulcorante.

2.1.5 Disacáridos

Los disacáridos son productos de condensación de dos moléculas de monosacáridos. La sacarosa es el disacárido predominante que se presenta en forma libre y es la sustancia principal de la caña de azúcar y la remolacha azucarera. También se forma durante la germinación de semillas de leguminosas. Otros disacáridos comunes son la maltosa y la lactosa. La maltosa es un dímero de glucosa y la lactosa es un copolímero de galactosa y glucosa. Las dos moléculas de glucosa en la maltosa se mantienen unidas en un enlace glucosídico α -1,4, mientras que las dos entidades de hexosa de la galactosa se unen en la posición β -1,4.

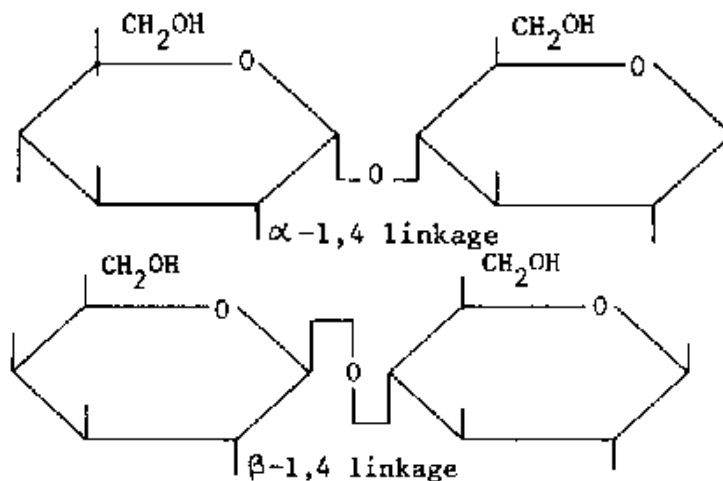


Figura 8. Configuración estructural de: α - Maltosa y β - Lactosa.

2.1.6 Polisacáridos

Los polisacáridos representan un gran grupo de carbohidratos complejos que son productos de condensación de un número indeterminado de moléculas de azúcar. La mayoría de los polisacáridos son insolubles en agua. Tras la hidrólisis con ácidos o enzimas, eventualmente producen sus monosacáridos constituyentes. El almidón es un polímero de D-glucosa de alto peso molecular y es el principal carbohidrato de reserva en las plantas. La mayoría de los almidones consisten en una mezcla de dos tipos de polímeros, a saber; amilosa y amilopectina, cuya proporción es generalmente una parte de amilosa y tres partes de amilopectina.

Otros polisacáridos complejos de ocurrencia común son las hemicelulosas y los pentosanos. La hemicelulosa representa un grupo de carbohidratos que incluyen araban, xilano, ciertos hexosános y poliurónidos. Estas sustancias son generalmente menos resistentes al tratamiento químico y sufren cierto grado de hidrólisis enzimática durante los procesos digestivos normales. Los pentosanos son polímeros de xilosa o arabinosa como constituyentes del material estructural de plantas.

2.2 Tipos de hidrólisis

2.2.1 Hidrólisis enzimática

Es el proceso de transformación de estructuras complejas (rompimiento de enlaces) a estructuras más simples y depende de la química, solubilidad, pH y el potencial de oxido-reducción del compuesto

como, por ejemplo, la amilosa y la amilopectina puede hidrolizarse en azúcares fermentables que posteriormente pueden ser convertidos en bioalcohol mediante la acción metabólica de bacterias y levaduras. Este proceso presenta las siguientes etapas considerando un medio heterogéneo:

- Transferencia de las moléculas de enzima (E) de la solución acuosa a la superficie del sustrato de celulosa (S).
 - Formación del complejo enzima - sustrato (ES), previa adsorción de las moléculas de enzima sobre la celulosa.
 - Transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo ES.
 - Reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P). glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hacia el medio dispersante acuoso.
 - Descomposición de la celobiosa en glucosa por medio de β – glucosidasas (Carrillo Navarrete, 2002).
- Adsorción: $(S) + (E) \leftrightarrow [(ES)]$
 - Reacción: $[(ES)] \rightarrow (E) + (P)$



Figura 9. Interacción enzima - sustrato.
Fuente:(Carrillo Navarrete, 2002)

2.2.1 Hidrólisis química

La química proporciona un medio alternativo para hidrolizar la biomasa, en 1819 Braconnot demostró que el lino disuelto en H_2SO_4 concentrado, diluido en agua y calentado se transformaba en un azúcar fermentable (Binder & Raines, 2010). En una reacción a base de sustancias químicas con alta concentración, la más conocida y utilizada es el ácido sulfúrico (H_2SO_4) el problema de utilizar esta sustancia es su alta toxicidad y a la vez peligroso por el carácter corrosivo. Una vez realizado el proceso de

hidrólisis es necesario regular su pH para evitar la inhibición. La segunda sustancia empleada como agente corrosivo es el ácido clorhídrico (HCL) (Vegi & Shastri, 2017).

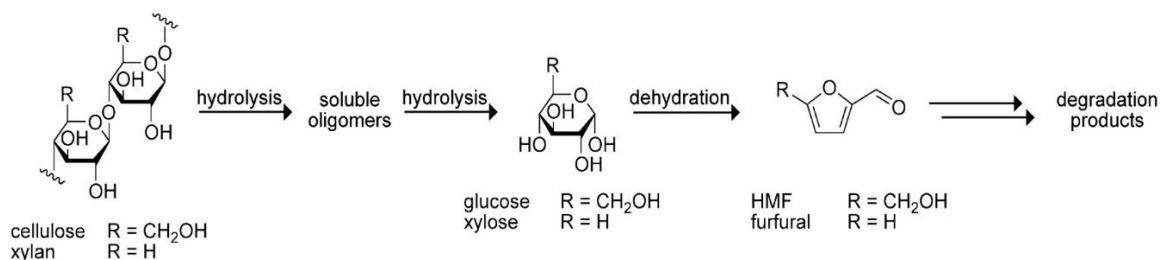


Figura 10. Reacciones de hidrólisis de celulosa y xilano. La hidrólisis química de celulosa y hemicelulosa en azúcares monoméricos procede a través de oligómeros y va acompañada de reacciones secundarias que forman furanos y otros productos de degradación.

Fuente: (Vegi & Shastri, 2017).

2.3 Determinación de azúcares reductores mediante el método de Miller (DNS)

Los azúcares reductores pueden describirse como aquellos azúcares que contienen grupos funcionales capaces de ser oxidados y, a su vez, provocando la reducción de otros componentes en condiciones específicas de análisis (cobre, como Cu II). La propiedad característica de los azúcares reductores es que, en medio acuoso, generan uno o más compuestos que contienen un grupo aldehído (Durmazel et al., 2019).

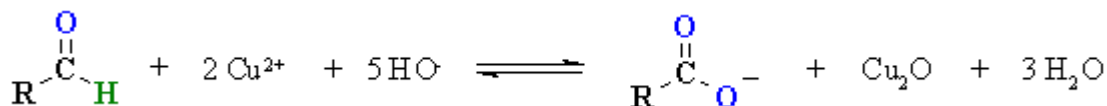


Figura 11. Reacción química para la determinación de los azúcares reductores.

Fuente: (Durmazel et al., 2019).

El método DNS es una técnica colorimétrica cuyo reactivo empleado es el 3,5 ácido dinitrosalicílico para hidrolizar polisacáridos en una muestra originando un color característico que puede ser captado a una longitud de onda de 540 nm (Deshavath et al., 2020). Esta técnica de carácter cualitativo ayuda a estimar la cantidad de azúcares reductores formados ya sea a través de un proceso de hidrólisis enzimática, en base a las características mencionadas se consideró aplicar este método en el presente trabajo de titulación.

2.3.1 Método de Beer Lamber

Este método nos dice que se debe partir de una solución patrón de glucosa en el cual se distribuirá de 1 a 10 mL de manera ascendente y de manera descendente 10 a 1 mL del reactivo DNS obteniendo así diferentes concentraciones, pero conservando la misma cantidad de volumen para todas las muestras.

Finalmente son transferidos a celdas donde se procede a medir las absorbancias mediante el espectrofotómetro ajustado la longitud de onda a 540 nm. Los resultados son valores en una gráfica de la solución patrón de glucosa.

Cuando se haya obtenido la curva de calibración, en base a la ecuación de la recta, se despeja la variable “x”, que representa la cantidad de glucosa mientras que la variable “y” viene representada por las absorbancias previamente medidas.

2.4 Prueba de Fehling

El reactivo de Fehling se utiliza para la determinación de azúcares reductores, sirve para demostrar la presencia de azúcares reductores y derivados como la sacarosa o la fructosa y consiste en dos soluciones acuosas:

- Sulfato de cobre cristalizado, 35g y se afora con agua destilada a 1.000 mL.
- Tartrato de sodio y potasio 150g, solución de hidróxido de sodio al 40%, 3g y agua hasta 1.000 mL.

Este ensayo consiste en el poder reductor el grupo carbonilo de los aldehídos, oxidándose a ácido y reduce las sales de cobre en un medio alcalino de Cu^{+2} a Cu^{+} formando un precipitado color rojo ladrillo (figura 12) (Nieblas-Morfa et al., 2017). Se puede acelerar la reacción cuando la muestra es sometida al calor.

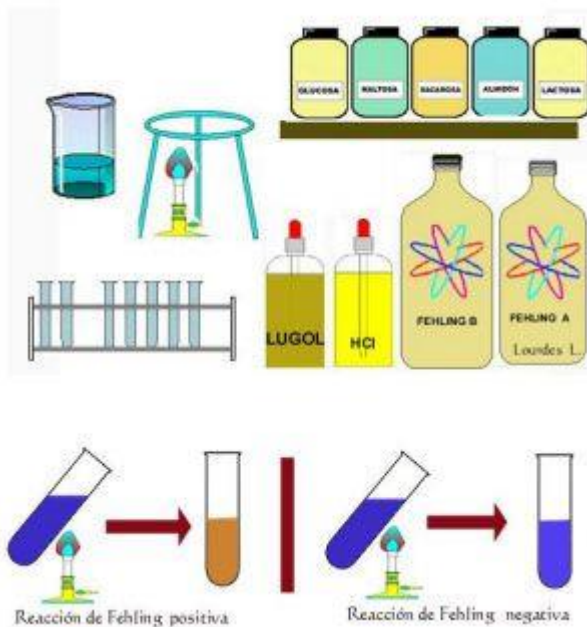
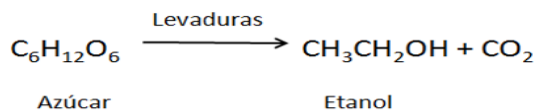


Figura 12. Esquema de la utilización del reactivo de Fehling.
Fuente: (Lorén, 2011)

2.5 Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



La fermentación alcohólica es el más conocido de los procesos de fermentación y está involucrada en varios procesos importantes como; transformación, estabilización y conservación para sustratos ricos en azúcar como; frutas, jugos de frutas y verduras (Martínez-Avila et al., 2019). La fermentación alcohólica se lleva a cabo por levaduras, algunos otros hongos y bacterias. El primer paso de la vía de la fermentación alcohólica implica piruvato que se descarboxila a acetaldehído en una reacción que es catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa (Ciani et al., 2016). El equilibrio redox de la fermentación alcohólica se logra mediante la regeneración de NAD^+ durante la reducción de acetaldehído a etanol, que es catalizada por alcohol deshidrogenasa. El rendimiento de ATP de la fermentación alcohólica es de 1 ó 2 mol de ATP por mol de glucosa oxidada.

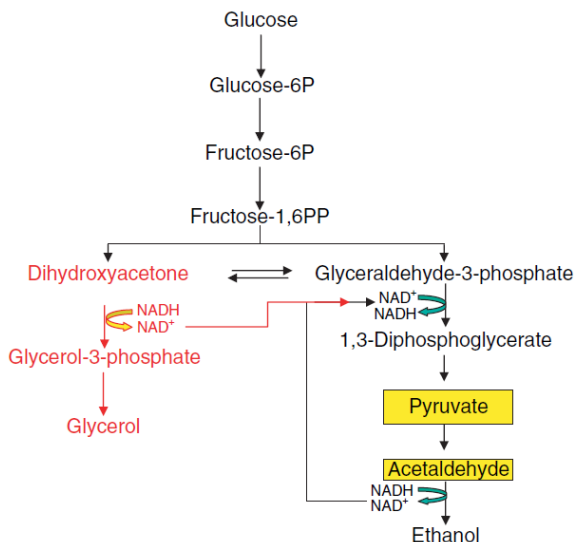


Figura 13. Esquema de fermentación y desviación alcohólica. Línea negra: vía alcohólica; línea roja: vía glicérol-pirúvica; cuadro amarillo: metabolitos intermediarios implicados en la fermentación alcohólica.

Fuente: (Cheng & Brewer, 2021)

Para el proceso de obtención de etanol a partir de los procesos biológicos ya antes mencionados, requiere de dos etapas adicionales que se describen a continuación:

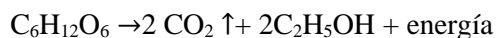
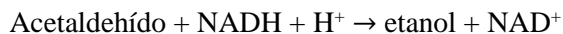
- Primera etapa

El átomo de carbono del piruvato es atacado por el pirofosfato de tiamina y sufre una descarboxilación, la coenzima queda en forma de 2-hidroxi-etil que puede considerarse una forma del acetaldehído ligado a la coenzima



- Segunda etapa

Finalmente, esta segunda etapa el acetaldehído se reduce a etanol y el potencial de reducción es proporcionado por el $\text{NADH} + \text{H}^+$; en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenada.



2.5.1 Clases de microorganismos usados en la fermentación

Gracias a diversos proyectos de investigación que buscan mejorar la producción de etanol sobre todo a escalas industrializadas, se ha logrado determinar las capacidades que tiene un organismo a la hora de ser empleado en esta tarea, como, por ejemplo; temperatura óptima, velocidad de crecimiento, y el tipo de sustrato utilizado, el pH, entre otros (Laluce & Mattoon, 1984).

- Bacterias empleadas en la fermentación

Entre algunas empleadas en la productividad tenemos: *Zimomonas mobilis*, *Erwinia amilovora*, *Spitocheta auraiia*, *Streptococcus lactis*, *Spirocheta litorales*

- Levaduras empleadas en la fermentación

Como bien se sabe, son los microorganismos mayormente empleados en la producción de etanol, si bien los procesos bioquímicos son lentos, presentan ciertas ventajas a la hora de la separación después del proceso de fermentación a más de su alta eficiencia y su capacidad para operar a temperaturas mayores a los 40°C. Entre los géneros más importantes son: *Candida (seudotropicalis)*, *Saccharomyces (ceresviceae, ellipsoideus, anamensis, carlsbergensis)*.

2.5.2 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.3 Generalidades

S. cerevisiae, la levadura predominante empleada en la producción de bebidas fermentadas, es generalmente en forma de elipsoide con un gran diámetro de 5 a 10 μm y un diámetro más pequeño de alrededor de 5 μm (Ciani et al., 2016). Todas las levaduras son hongos unicelulares que tienen características de ultraestructura similares a las de las células eucariotas superiores, es decir, comprenden una pared celular, núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, vacuolas, micro cuerpos y vesículas secretoras junto con un complejo extracelular e intracelular red de membranas (Figura 14).

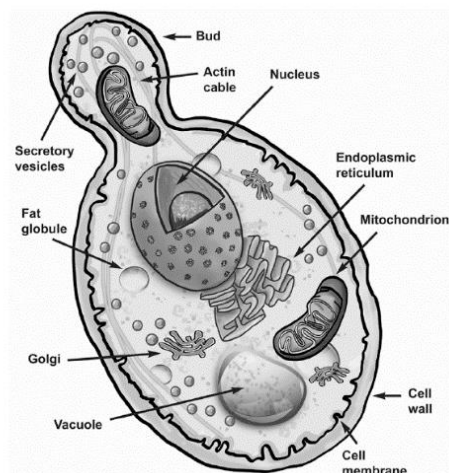


Figura 14. Características principales de una célula típica de *Saccharomyces cerevisiae*.
Fuente: (den Haan et al., 2013)

2.5.4 Taxonomía

De acuerdo a la tabla 2, taxonómicamente esta levadura tiene las siguientes características

Tabla 2. Taxonomía de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Género	Saccharomyces
Especie	<i>S. cerevisiae</i>

Fuente (Inga, 2009)

2.5.5 Requisitos físicos de *S. cerevisiae*

Se requiere una alta actividad de agua para las células de *S. cerevisiae* que normalmente poseen (0.65). El agua es absolutamente esencial para la fermentación, y los medios con alto contenido de azúcar pueden imponer estrés osmótico (reducción de la disponibilidad de agua) en las células para afectar negativamente la fisiología celular (Li et al., 2021).

Las células de levadura pueden responder a la falta de agua produciendo en exceso glicerol u otros compuestos osmóticos, como la trihalosa, que actúan para proteger las membranas de la levadura de la desecación. Dichos compuestos pueden reemplazar efectivamente el agua celular, restaurar el volumen celular y permitir que continúe el metabolismo de la levadura.

Sin embargo, la sobreproducción de glicerol puede (aunque no siempre) restar valor al rendimiento de etanol en fermentaciones de alta gravedad. Con respecto a los requisitos de temperatura y pH para las fermentaciones alcohólicas, las levaduras prosperan en ambientes cálidos y ácidos y la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* crecen bien entre 20 y 30 C y pH 4,5 y 6,5 (Jansen et al., 2017).

Con respecto a los requisitos de oxígeno, aunque *S. cerevisiae* a veces se denomina anaerobio facultativo, esta levadura no puede crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas, esto se debe a que el oxígeno es absolutamente necesario como factor de crecimiento para la biosíntesis de ácidos grasos de membrana como, por ejemplo, ácido oleico y esterol (ergosterol).

Según (Jansen et al., 2017) *S. cerevisiae* es auxotrófica para ácido oleico y ergosterol en condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, para fermentaciones alcohólicas efectivas, se puede suministrar algo de oxígeno al comienzo de la fermentación, o se pueden complementar el medio con ácidos grasos y factores de crecimiento de esterol (usando alimentos de levadura disponibles en el mercado).

2.5.6 Requerimientos Nutricionales de *S. cerevisiae*

Las levaduras son micro hongos quimioorganotróficos que obtienen su carbono y energía metabolizando sustratos orgánicos. Las levaduras también requieren de otros nutrientes principales, secundarios y traza, junto con agua, para llevar a cabo la fermentación de manera eficiente (Sablayrolles & Mouret, 2022). La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* pueden crecer si se les suministra glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento (Reis et al., 2013). Los macronutrientes deben suministrarse a concentraciones milimolares, y estas comprenden fuentes de carbono, nitrógeno amino libre.

Según (Ciani et al., 2016) presenta los siguientes requerimientos nutricionales:

- **Carbono:** es utilizado como fuente energía ya que requieren azúcares como por ejemplo hexosas (glucosa, fructosa, manosa, etc.)
- **Nitrógeno:** el nitrógeno garantiza un óptimo desarrollo, forma aproximadamente el 10% del peso seco de la levadura, de tal manera que es asimilado como ion amonio y puede provenir de otras fuentes como; aminoácidos, dipéptidos, etc.
- **Fosforo:** permite conservar las propiedades de la pared celular en cuanto a la regulación de síntesis en lípidos y carbohidratos y se encuentran almacenadas en forma de dihidrógeno fosfato.
- **Elementos traza:** El potasio estimula la fermentación y la respiración, el magnesio promueve la asimilación de ácidos grasos, así como otros elementos; cloro, calcio, hierro, zinc desempeñan su papel como macronutrientes.

2.6 Destilación

La destilación es una técnica de laboratorio utilizada en la separación de sustancias miscibles. Consiste en hacer hervir una mezcla, normalmente una disolución, y condensar después, por enfriamiento, los vapores que han producido. El componente más volátil se recogerá por condensación del vapor y el compuesto no volátil quedará en el matraz de destilación.

La mezcla comenzará a hervir a una temperatura intermedia entre los puntos de ebullición de los dos componentes, produciendo un vapor que es más rico en el componente más volátil (de menor punto de ebullición). Para este estudio se considerará el proceso de destilación fraccionada (destilado y residuo) como se puede observar en la figura 15 este tipo de destilación fraccionada se utiliza cuando la mezcla de productos líquidos que se pretende destilar contiene sustancias volátiles de diferentes puntos de ebullición con una diferencia entre ellos menor a 80 °C.

Este tipo de destilación contienen una columna de fraccionamiento de un tubo de vidrio que permite el intercambio de calor, entre el vapor ascendente (más caliente) y el condensado descendente (más frío), permitiendo que se dé el equilibrio líquido – vapor con el objetivo que a medida que asciende en la columna, el vapor es cada vez más rico en uno de los componentes de interés, en este caso el etanol, éstos a su vez pueden ser componentes puros o un componente puro y un azeótropo y esto va a depender ya sea si se trata de una mezcla ideal o no ideal según (Guerra, 2008).

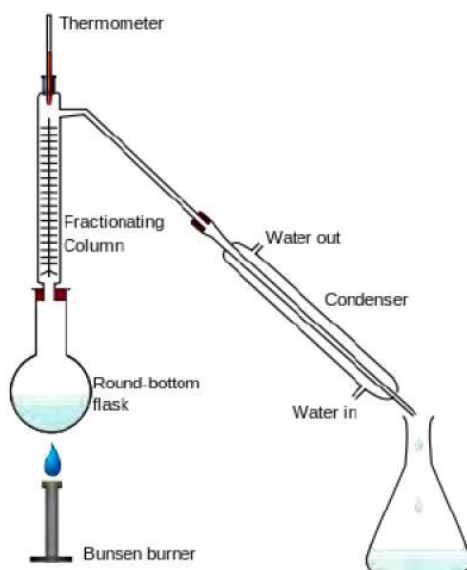


Figura 15. Esquema destilación simple. Fuente: (Escalante, 2013)

2.7 Biocombustibles

Se denominan combustibles alternos debido a la materia base utilizada para su obtención (maíz, caña de azúcar), son empleados conjuntamente con combustibles derivados del petróleo específicamente con gasolinas o naftas, se conoce con las siglas EX si la mezcla es de bioetanol, por otro lado, se tiene con las siglas BX si es de biodiésel, siendo X el porcentaje de biocombustible, representando una potencial opción para obtener una mejora en el rendimiento del motor de combustión interna, además de una disminución considerable de la emisión de gases tóxicos al medio ambiente, lo cual promueve su investigación y utilización en campos industriales a nivel mundial (Velásquez, 2017). Entre algunas ventajas y desventajas tenemos:

a. Ventajas

- Brinda energía a fuentes recíclales y por lo tanto inagotables
- Su obtención favorece al suministro de combustibles
- Reducen la dependencia de combustibles de origen fósil
- Son menos contaminantes que los combustibles tradicionales
- Ayudan a reducir los gases de efecto invernadero
- Crecimiento en la mano de obra en el campo y en la industria de transformación

b. Desventajas

- Los combustibles etanólicos se quedan cortos como amigables con el medio ambiente cuando se considera que la producción de etanol implica el uso de combustibles fósiles.

- El etanol se mezcla fácilmente con el agua, incluida el agua que se encuentra en el aire que respiramos. La humedad presenta un problema porque la empresa generadora de etanol debe gastar dinero y energía para transportar el agua no deseada que se mezcla con el producto de etanol. La eliminación del agua en este punto sería económicamente inviable, requiriendo otro paso de destilación que necesitaría más energía de combustible.

- Su cultivo prioritario puede llegar a pérdidas de la biodiversidad y a ciertos recursos naturales de la zona

- Para un determinado tipo de biomasa la demanda en cuanto a extensión de terrenos es extensa.

2.7.1 El Bioetanol

Es un biocombustible que puede ser obtenido a partir de biomasa o la fermentación de materia orgánica biodegradable natural no tóxica, rica en azúcares e hidratos de carbono además de almidón,

se suele utilizar netamente como combustible o como un potenciador del mismo, sus materias primas de obtención se pueden clasificar en: azúcares, amiláceas tales como el cereal o tubérculos y lignocelulósicas tales como madera o plantas. Este tipo de combustible actúa como un potenciador de combustible al ser empleado conjuntamente con un combustible derivado del petróleo, por ejemplo, la gasolina, obteniéndose así un biocombustible con características de alta capacidad energética, se lo identifica con las siglas EX (Abril & Navarro, 2012).

El etanol al ser biodegradable, cuando existan episodios de contaminación, es decir, vertidos accidentales tienen a ser menos contaminante, por lo tanto es el combustible mayormente utilizado (Solarte-Toro et al., 2018).

2.7.1.1 Propiedades físico químicas del bioetanol

El etanol o bioetanol es un líquido incoloro e inflamable, en la **Tabla 3** se observan sus propiedades tanto físicas como químicas.

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas del etanol.

Propiedades Físicas y Químicas del Bioetanol	
Apariencia	Líquido claro
Olor	Alcohol concentrado
Gravedad específica (20°C)	0.78 g/cm ³ .
Punto de Ebullición, a 760mm Hg (1atm)	78°C
Densidad Relativa de vapor:	1.6 (Aire = 1)
Solubilidad en agua:	Miscible en agua
pH a 10g/l H₂O (20°C)	7.0
Flash point⁶:	13°C
Temperatura de auto ignición:	363 °C
Límite inferior de inflamabilidad	3.5 (% Vol. en aire)
Límite superior de inflamabilidad	19 (% Vol. en aire)
Punto de Fusión	-117°C
Densidad relativa mezclas vapor/aire	1.03 (aire = 1, a 20°C)

(*Quimpac*, s. f.)

⁶ **flash Point:** Punto de inflamabilidad o de destello (conjunto de las condiciones de presión, temperatura, mezcla gaseosa, entre otros que incitan el peligro de explosión)

2.7.2 Primera generación de biocombustibles.

Se denomina de primera generación a los biocombustibles que se producen en base de almidones, grasas animales, azúcar o aceites vegetales utilizando tecnología tradicional (Acosta, 2012), se tienen los siguientes ejemplos.



Caña de Azúcar

Maíz

Soja

*Figura 16. Biocombustibles de primera generación.
(Acosta, 2015, pág. 30)*

2.7.3 Segunda generación de biocombustibles.

Los biocombustibles de segunda generación son elaborados a partir de materias primas los cuales no representan un riesgo para la alimentación de la sociedad, esta puede ser la BRA (biomasa residual agrícola) como por ejemplo la que se obtiene en plantaciones de maíz, de yuca o de papa (Acosta, 2012), se tienen los siguientes ejemplos.



*Figura 17. Biocombustibles de tercera generación.
(Acosta, 2015, pág. 32)*

2.8 Biomasa

Se determina como biomasa a la materia orgánica renovable originada por cultivos energéticos como plantas, animales o de la transformación artificial, natural de seres vivos; de igual manera se puede

catalogar a la biomasa como todo material de origen biológico descartando aquellos que hayan sufrido un proceso de mineralización en formaciones geológicas. Si bien la biomasa simboliza solo una pequeña parte de la masa total del planeta, su recuperación es vital para sustentar la vida de los seres vivos ya que es una gran fuente de energía renovable, a pesar de que solo utiliza una pequeña parte de la energía que entrega el sol (Castro Martínez, 2018).

2.8.1 Tipos de biomasa.

Para clasificar la biomasa se tomará en cuenta el origen de la misma, de la siguiente manera:

- Biomasa natural.

Esta biomasa es obtenida en el ambiente natural, es decir se produce sin la necesidad de la intervención o manipulación del hombre, pero el aprovechamiento intensivo de la misma no es compatible con la protección y conservación del ecosistema, en su gran mayoría se trata de recursos forestales.

- Biomasa residual.

Se refiere a todo residuo de materia orgánica que se produce al realizar una actividad humana, teniendo como un claro ejemplo a procesos ganaderos, agrícolas y las del mismo ser humano como son los desechos.

- Biomasa lignocelulósica.

El aprovechamiento de este tipo de biomasa es una de las ideas más promisorias para la producción de biocombustibles, ya que está compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina, siendo los dos primeros una fuente latente de azúcares fermentables, este tipo de biomasa se puede agrupar en las siguientes categorías:

- Residuos industriales y desechos forestales primarios.
- Residuos agroindustriales y agrícolas.

- Desperdicios urbanos.
- Cultivos energéticos, tales como hierbas y árboles de ciclo corto.

3 CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA

El desarrollo del presente trabajo de investigación está basado en una metodología experimental, en el cual se llevará a cabo una serie de procesos y pruebas bajo términos del investigador como también el fundamento científico existente con el fin de cumplir con el objetivo principal del proyecto.

En este presente proyecto se utilizó como materia prima el lixiviado extraído de los residuos orgánicos provenientes del Mercado Municipal “El Arenal”, esta muestra debe ser filtrada previo a los procesos de hidrólisis y posteriormente fermentada con la ayuda de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El producto de la fermentación alcohólica será extraído por medio de un equipo de destilación simple.

3.2 Pre tratamiento

Los residuos orgánicos fueron recolectados de uno de los mayores centros de abasto de la ciudad de Cuenca. Se inició seleccionando residuos vegetales al azar hasta alcanzar un peso de 18 Kg, entre los cuales contenían, cascara de frutas, tallos de verduras, frutas en alto estado de madurez, y tubérculos.

Los residuos fueron lavados con agua potable con la intención de eliminar bacterias que puedan comprometer el proceso de fermentación y depositados en un contenedor de 1m³ de capacidad. En el fondo del contenedor se colocó una maya que separe la fracción sólida con respecto a la líquida (lixiviado) por un lapso de 30 días. En la **Tabla 4** se observa el proceso mencionado.

Tabla 4. Pre tratamiento de los residuos orgánicos

			
Residuos orgánicos recolectados	Contenedor para la recolección de los lixiviados	Residuos deshidratados al cabo de 30 días (1 mes)	Recolección e la fracción orgánica (Lixiviado)

Fuente: (Autor, 2022)

3.3 Primera etapa

Se recolectó 4.000 mL de lixiviado y fue transportado hasta las inmediaciones del laboratorio Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca en donde se realizaron diversos procesos para determinar su pH, contenido de azúcares presentes en la muestra.



Figura 18. Adecuación de la materia prima previo al análisis
Fuente: Autor

3.3.1 Filtración y medición de pH

En el proceso de filtración se separó los sólidos suspendidos que estaban presentes en el lixiviado recolectado.

Materiales y métodos

- Papel Filtro
- Soporte universal
- Embudo
- Vaso de precipitación 500 y 1000 mL
- pH metro de sobremesa

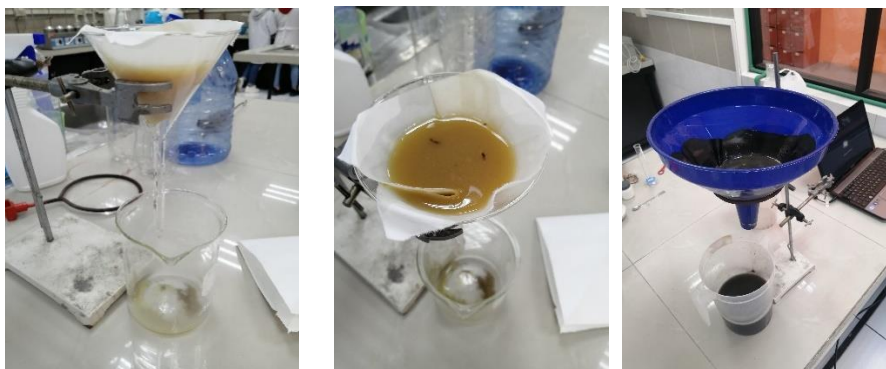


Figura 19. Filtración del lixiviado.

Fuente: Autor

El tiempo de filtrado fue de 8 días en el cual se redujo la cantidad de lixiviado recolectado a 2.5 L puesto a las pérdidas por evaporación y principalmente parte de este quedaba impregnado en los filtros.



Figura 20. Lixiviado después del proceso de filtración.

Fuente: Autor.

Para la determinación del pH se utilizó el equipo pH-metro de sobremesa marca Mettler-Toledo S220 obteniendo así un pH inicial del lixiviado de 4.92, como se observa en la figura



Figura 21. Medición del pH inicial de la muestra de lixiviado
Fuente: Autor

3.3.2 Prueba de Fehling

Para la determinación de azúcares reductores de manera cualitativa se realizó la prueba de Fehling antes y después del proceso de hidrolizado

Materiales y Métodos

- Tubos de ensayo x 4
- Soporte
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Vortex
- Metodología Prueba de Fehling

Procedimiento

En cada uno de los tubos de ensayo se añadió simultáneamente; 1mL de solución de glucosa (solo en el primer tubo) 1 mL del lixiviado filtrado, 1 mL del reactivo Fehling A y 1 mL de reactivo Fehling B. Luego se procedió a realizar la mezcla en el vortex y posteriormente las muestras fueron sometidas a baño maría por 15 min para agilitar la reacción.

Luego de los 15 minutos se pudo observar claramente el cambio de coloración a rojo ladrillo de la solución de glucosa que sirve como referencia en comparación a las muestras del lixiviado, obteniendo un resultado negativo.

3.3.3 Determinación de azúcares reductores

Para llevar a cabo la determinación de los azúcares reductores presentes en el lixiviado se realizó aplicó la metodología del ácido 3.5 dinitro salicílico (DNS) propuesta por (Deshavath et al., 2020). Es una técnica instrumental que describe la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Este método tiene su inicio a partir de una solución patrón de glucosa para la respectiva curva de calibración.

Preparación del reactivo DNS

Materiales y métodos

- Balón de aforo 250 mL
- Espátula
- 2.5 g de Ácido nítrico Salicílico
- 2.5 g de Hidróxido de sodio
- 0.3 g de Tartrato sodio – potasio
- Agua destilada
- Papel filtro
- Embudo
- Agitador magnético

Procedimiento

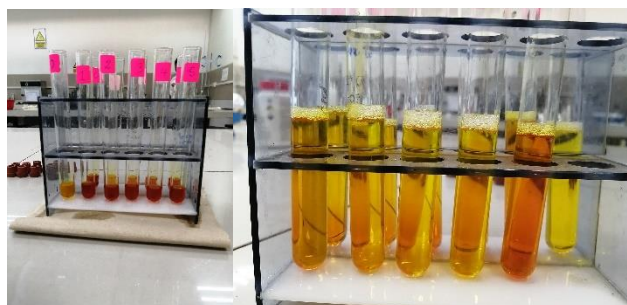
Se mezcló los 2.5 g de ácido nítrico salicílico con 2.5 g de hidróxido de sodio, 0.30 g de tartrato de sodio – potasio y agua destilada con ayuda del agitador magnético, se filtró y se aforó a 250 mL. Debe estar protegido de la luz y almacenado en condiciones ambientales.



*Figura 22. Reactivo DNS aforado a 250 mL
Fuente: Autor*

Cuerva de calibración

Para la realización de la curva de calibración se preparó una solución patrón de glucosa en la cual se añadió 1.0 g de glucosa disueltos en 100 mL de agua destilada con ayuda del agitador magnético a 50 °C para garantizar una completa disolución y se distribuyó en 10 tubos rotulados desde el 1 hasta el 10 a diferentes concentraciones de glucosa y agua destilada conservando el mismo volumen (1mL) como se aprecia en la Tabla 5, luego se añade 1 mL de reactivo DNS y es sometido a baño maría por 15 minutos, luego se deja enfriar y se nota claramente el cambio de coloración, cada uno más intenso con respecto al otro debido a las distintas concentraciones de glucosa contenidos en los tubos de ensayo, seguido se añaden 8 mL de agua destilada a cada tubo rotulado como se observa en la Figura 23



*Figura 23. Determinación de azúcares reductores mediante método DNS
Fuente: Autor*

Tabla 5. Creación de la curva patrón de glucosa

Tubo de ensayo etiquetado	mL Solución Patrón	mL Agua destilada
0	0.0	1
1	0.1	0.9
2	0.2	0.8
3	0.3	0.7
4	0.4	0.6
5	0.5	0.5
6	0.6	0.4
7	0.7	0.3
8	0.8	0.2
9	0.9	0.1
10	1	0
Muestra Lixiviado 1.1	2	5
Muestra Lixiviado 1.2	2	10
Muestra Lixiviado 1.3	2	12

Fuente: Autor

Para las muestras del lixiviado 1.1, 1.2, 1.3 se utilizó 2 mL de cada una y posteriormente se diluyó con 5, 10 y 12 mL de agua destilada respectivamente para cada una de las muestras, luego de añadir 3 mL de reactivo DNS se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro.

3.4 Hidrólisis química

Para incrementar los niveles de glucosa en el lixiviado, puesto a que la mayoría de los azúcares contenidos están almacenados en forma de almidones, carbohidratos y celulosa por parte de los residuos vegetales.

Para este proceso se consideró realizar el método de hidrólisis del ácido diluido empleando el ácido sulfúrico (H_2SO_4) y agua destilada obteniendo así diferentes concentraciones: 40%, 60% y 80%. Según (Amiri & Karimi, 2013) establecen las condiciones de trabajo para llevar a cabo del proceso de hidrólisis química, en el cual se establecen diferentes tiempos de reacción que varía en base a las concentraciones mencionadas anteriormente, partiendo de 40, 80 y 120 minutos respectivamente, a una temperatura de $80^\circ C$ para todas las muestras. Se emplearon tres muestras de 120 mL de lixiviados vasos de precipitación de 250 mL, manteniendo una relación líquido/líquido de 6/4, es decir por cada 6 partes de lixiviado, se añade 4 partes de ácido sulfúrico.

Tabla 6. Condiciones de trabajo para el proceso de hidrólisis química.

Parámetros	Rangos		
	Min	Med	Max
Concentración del ácido (%v/v)	40 %	60%	80%
Tiempo de reacción (minutos)	40	80	120

Fuente: Autor.

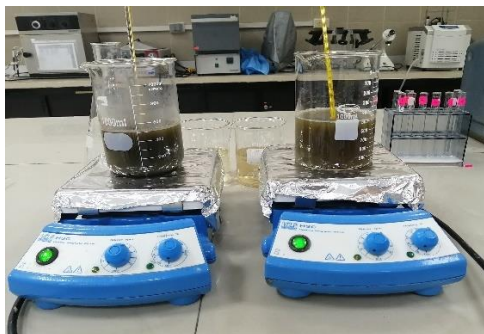


Figura 24. Hidrólisis del ácido diluido

Fuente: Autor.

Al completar el tiempo de reacción se enfrió rápidamente para detener el proceso de hidrólisis y se procedió a neutralizar el pH mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 40%. Se realizó nuevamente la medición de azúcares reductores por el método DNS.

3.5 Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática se empleó un producto comercial alfa-amilasa obtenido de la compañía LD Carlson – USA como se aprecia en la Figura 25. Según (Tomasik & Horton, 2012) la hidrólisis del almidón por amilasas proporciona solo productos que contienen dextrosa (D-glucosa) y no se forman otros subcomponentes, además esta enzima se desempeña muy bien a temperaturas de 50 – 60°C. Las alfa amilasas pueden operar a un pH más bajo, ya que su rendimiento óptimo suele rondar el pH 4,5 – 5.0. Un pH más bajo suprime la formación de maltotetraosa y productos de oligosacáridos superiores y si el pH aumenta, el rendimiento de maltotetraosa y mayores oligosacáridos aumenta (Guo, 2018).



Figura 25. Complejo enzimático amilasa
Fuente: Autor

Procedimiento

Para llevar a cabo este proceso de hidrólisis enzimática se consideró 8 muestras en las cuales se procedió a dosificar diferentes concentraciones de la enzima a una temperatura de 50°C y se ajustó el pH con agua destilada hasta alcanzar el valor de 5.0 como se aprecia en la Figura 28.



Figura 26. Ajuste del pH del lixiviado previo a la hidrólisis enzimática
Fuente: Autor

Una vez que el pH haya sido ajustado se procedió a calentar la muestra en un calefactor regulando hasta alcanzar la temperatura óptima para el proceso de hidrolizado como se muestra en la Figura 27.



Figura 27. Proceso de hidrólisis enzimática y control de temperatura
Fuente: Autor.

En el transcurso del proceso, con la ayuda del agitador magnético y la placa calefactora, se efectuó un tiempo de reacción de 60 minutos para cada muestra a hidrolizar. Se adicionaron 20 mL de buffer para garantizar una estabilización iónica como también un surfactante conocido comercialmente como Tween 20, para diluir posibles sustancias oleosas que se formen en el proceso y también se añadió citrato de sodio para evitar la aparición de bacterias en los mostos hidrolizados. En la **Tabla 7** se puede observar las respectivas dosificaciones de las sustancias mencionadas anteriormente:

Tabla 7. Dosificación de los mostos hidrolizados

No. Muestra	Enzima (g)	Vol. Muestra (mL)	Buffer (mL)	Agua (mL)	Citrato de sodio (mL) ~ 1M	Tween 20 (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Ácido Fosfórico (mL)
1	10	40	15	20	0,3	0,1	50	5,02	1

2	15	40	15	0	0,3	0,1	50	4,98	1
3	20	70	20	35	0,5	0,2	50	5,03	1
4	25	70	20	40	0,5	0,2	50	4,9	1
5	15	40	15	20	0,3	0,1	50	4,9	1
6	20	40	15	20	0,3	0,1	50	4,9	1
7	30	70	20	30	0,3	0,2	50	4,9	1
8	35	70	20	30	0,3	0,2	50	4,9	1

Fuente: Autor

Una vez que el tiempo de reacción haya culminado se añadió 1 mL de ácido fosfórico para detener la acción de la enzima y posteriormente se midieron los grados °Brix con la ayuda de un refractómetro de mesa facilitado por los laboratorios Ciencias de la Vida. Finalmente, las muestras fueron almacenados en matraces Erlenmeyer de 100 mL anteriormente esterilizados hasta el tiempo de uso como se observa en la **Figura 28 y 29.**



Figura 28. Esterilización e los matraces erlenmeyer en autoclave.

Fuente: Autor



Figura 29. Muestras hidrolizadas con la enzima amilasa

Fuente: Autor

Al cabo de 72 horas las muestras fueron filtradas con papel filtro y se efectuó la prueba de Fehling a cada uno de los mostos hidrolizados para evidenciar la acción que tuvo la enzima alfa amilasa en el lixiviado como se puede apreciar en la Figura 30, obteniendo así resultados positivos en cada muestra con la formación del precipitado.



Figura 30. Prueba de Fehling aplicado a los mostos hidrolizados

3.6 Fermentación alcohólica

Para la fermentación de los mostos hidrolizados se utilizó levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* facilitada por “Brau Supplies” para lo cual se tuvo que realizar una activación de la misma en diferentes medios:

Activación en agua destilada

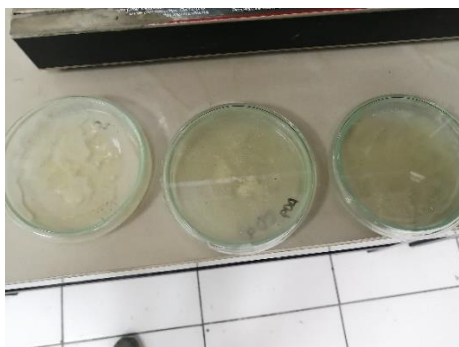
Para la activación de la levadura se utilizaron 200 mL de agua destilada, se calentó a una temperatura de 30°C y se adicionó 5g. de levadura y una cucharadita (5g) de azúcar se agitó la mezcla por 30 minutos como se puede observar en la Figura 31.



Figura 31. Activación de la levadura en agua destilada.
Fuente: Autor.

Activación de la levadura cultivo PDA

Para la activación de la levadura en cultivo PDA se realizó en tres cajas pétril previamente esterilizadas, adicionando 15 mL del medio de cultivo más 0.2 g. de levadura aproximadamente. Las levaduras fueron incubadas en la estufa por al menos 3 días a una temperatura de 35 °C.



*Figura 32. Activación de levadura en medio de cultivo PDA
fuente: Autor*

Antes de colocar los mostos hidrolizados con la levadura activada en la estufa, se procedió a medir los grados °Brix antes y después del proceso de fermentación.

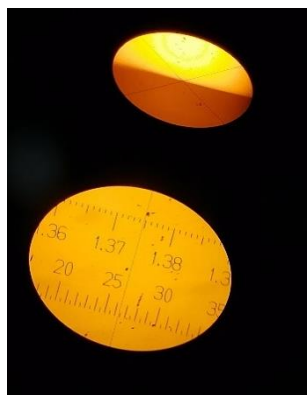
Cabe mencionar que el mosto en el cual se le aplicó la hidrólisis química, se le adicionó el cultivo de levaduras en PDA, sin embargo, se presentaron dificultades en el proceso de fermentación ya sea por una mala activación, o por falta de nitrógeno, por lo tanto los posteriores análisis serán enfocados en el mosto que atravesó el proceso enzimático y se le aplicó la levadura activada con agua destilada, adicional a ello las muestras fueron suplementadas con sales de amonio (sulfato de amonio) para garantizar un óptimo desarrollo, se cubrió con papel aluminio para proteger contra la luz y fueron colocados en la estufa a 35°C por un mínimo de 7 días como se observa en la Figura 33.



*Figura 33. Adición de la levadura activada en agua destilada al mosto hidrolizado.
Fuente: Autor.*



*Figura 34. Incubación del mosto en la estufa previo a la fermentación.
Fuente: Autor.*



*Figura 35. Medición de los grados brix antes del proceso de fermentación
Fuente: Autor.*

Por último, se cita la fórmula de transformación de los grados ° brix a grados alcohólicos.

$$\%vol = (0.6757 \times \text{°Brix}) - 2.083$$

3.6.1 Destilación del biocombustible

Para la obtención del biocombustible (etanol) se montó el equipo de destilación simple como se ilustra en la Figura 36, cabe mencionar que las muestras atravesaron un proceso de filtrado a manera de evitar productos no deseados en el resultado final. Se configuró la temperatura óptima en la cual alcanza el punto de ebullición del etanol que oscila entre 78 y 80 °C, si se llega a superar esta temperatura podría comprometerse la separación e ingresaría agua en la muestra.



Figura 36. Obtención el bioetanol por medio de la destilación.
Fuente: Autor

En base al producto obtenido en la destilación, la muestra fue analizada en el equipo FTIR para determinar el porcentaje de coincidencia del compuesto deseado. En base al resultado obtenido se presentaron dificultades en el proceso de fermentación, mediante el análisis en el equipo infrarrojo (FTIR) se pudo apreciar un elevado porcentaje (98.44%) de vinagre, y nulas concentraciones del compuesto de interés (etanol).

Por lo tanto, al no tener un porcentaje considerable de bioetanol se omitieron algunos análisis que estaban previstos en esta investigación como; cromatografía gaseosa para su respectiva cuantificación de alcoholes, poder calorífico, grado alcohólico como también su inflamabilidad.

4 Capítulo IV

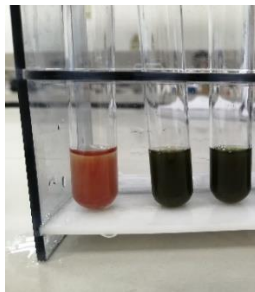
4.1 ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1.1 Azúcares reductores

Los azúcares reductores tienen esa denominación ya que, al ser sometidos a procesos químicos o enzimáticos, pasan de ser azúcares almacenados en forma de carbohidratos a azúcares simples, en este caso la glucosa. Estos azúcares se analizaron por las técnicas de hidrólisis mencionadas anteriormente descritas en la metodología.

4.1.2 Prueba de Fehling

Cuando la muestra sin hidrolizar fue sometida a la prueba de Fehling al término la reacción se puede observar claramente el cambio de coloración a rojo ladrillo de la solución de glucosa que sirvió como referencia en comparación a las muestras del lixiviado, al no tener la misma tonalidad en cuanto a la solución de referencia se obtuvo un resultado negativo.



*Figura 37. Prueba de Fehling aplicada al lixiviado.
Fuente: Autor*

4.1.3 Cuantificación de azúcares en el lixiviado sin hidrolizar mediante el método DNS

A partir de la curva de calibración que se realizó anteriormente se procedió a medir la concentración de los azúcares fermentables presentes en la muestra de lixiviado sin hidrolizar, los valores iniciales se pueden apreciar en la tabla 8.

Tabla 8. Determinación de la cantidad de glucosa en las muestras del lixiviado.

Rotulo	Concentración (ppm)	Absorbancia	Concentración (g/L)
Muestra Lixiviado 1.1	818.82	0.18004	0.817
Muestra Lixiviado 1.2	442.302	0.0928142	0.440
Muestra Lixiviado 1.3	401.81	0.0834337	0.401
Promedio Total:	554.3	0.118762	0.421

Fuente: Autor

4.1.4 Cuantificación de azúcares de la hidrólisis química

Los resultados obtenidos del equipo de espectrofotometría de radiación UV-visible a las muestras que atravesaron las hidrólisis química se detallan a continuación:

Tabla 9. Determinación de azúcares de muestras hidrolizadas con el ácido diluido.

Rotulo	Concentración (ppm)	Absorbancia	Concentración (g/L)
Muestra Hidrolizada (80%)	487.81	0.08334337	0.487
Muestra Hidrolizada (60%)	1680.19	0.379587	1.68
Muestra Hidrolizada (40%)	692.45	0.150765	0.692

Fuente: Autor.

Como se puede apreciar en la Tabla 9, existe un incremento en cuanto a la concentración de azúcares fermentables debido a que las cadenas de carbohidratos, almidones y celulosa se lograron fraccionar por la acción del ácido empleado cuya concentración fue del 60% proporciona mayores niveles de glucosa en la muestra.

4.1.5 Cuantificación de azúcares de la hidrólisis enzimática

A partir de los datos de la solución patrón de glucosa detallados en la tabla de la tabla 12, se logró obtener las nuevas concentraciones de glucosa obtenidas a partir del proceso la hidrólisis enzimática se muestran en la tabla 11.

Tabla 10. Datos para la curva de calibración

Tubo de ensayo etiquetado	mL Solución Patrón	mL Agua destilada	Volumen DNS (mL)	Concentración (g/L)	Absorbancia
0	0.0	1	1	0	0
1	0.1	0.9	1	0,136	0.0219069
2	0.2	0.8	1	0,210	0.0389742
3	0.3	0.7	1	0,283	0.0559911
4	0.4	0.6	1	0,373	0.0768173
5	0.5	0.5	1	0,496	0.105158
6	0.6	0.4	1	0,547	0.116962
7	0.7	0.3	1	0,688	0.149803
8	0.8	0.2	1	0,861	0.189772
9	0.9	0.1	1	0,921	0.203771
10	1	0	1	0,985	0.218484

Fuente: Autor

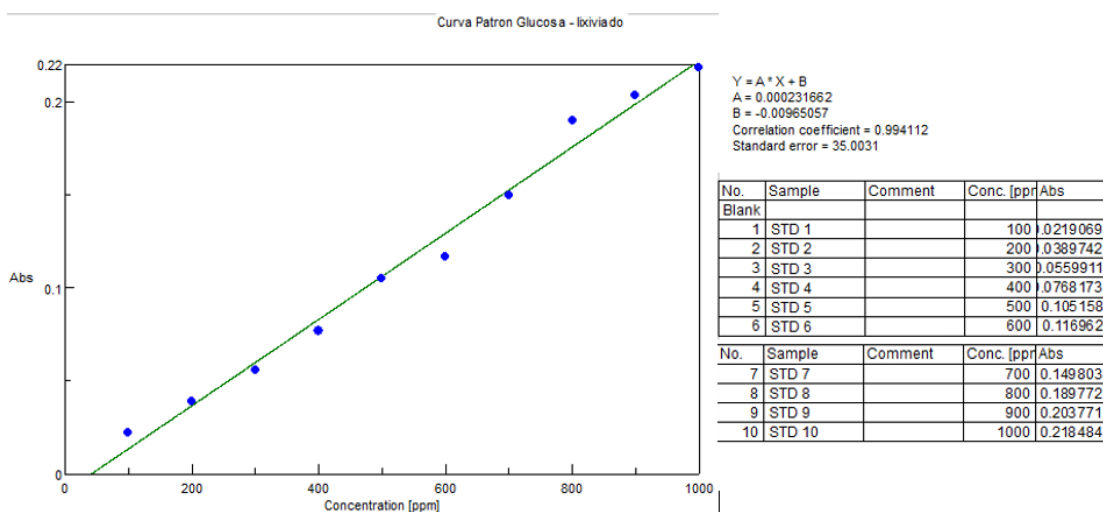


Figura 38. Curva de calibración a partir de la solución patrón de glucosa.

La información que proporciona la curva de calibración elaborada en la Figura 38, está representada por una ecuación matemática (ecuación de la recta) la cual nos ayuda a determinar la cantidad total de glucosa contenidas en las muestras.

$$Y = A * X + B$$

En donde a la variable “Y” representa las absorbancias medidas en el equipo, mientras que la variable “X” representa el contenido de glucosa. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 12 y gráfica asociada (Grafico 1.)

Tabla 11. Concentración de las muestras de hidrólisis enzimática

N.º Muestra	Volumen		DNS (mL)	Concentración (g/L)	Absorbancia
	mL Muestra	mL Agua destilada			
1 (H. Enzimática)	3	5	4	0,48	0.3640
2 (H. Enzimática)	3	5	4	0,23	0.1740
3 (H. Enzimática)	3	5	4	1,53	1.1593
4 (H. Enzimática)	3	10	4	1,84	1.3977
5 (H. Enzimática)	3	10	4	0,74	0.5585
6 (H. Enzimática)	3	10	4	1,36	1.0352
7 (H. Enzimática)	3	12	4	1,15	0.8765
8 (H. Enzimática)	3	12	4	1,61	1.2266

Fuente: Autor

Como se puede notar los valores arrojados por las nuevas mediciones en el equipo UV-visible, se pueden destacar que las muestras 3, 4, 6, 7, y 8 alcanzan las mayores concentraciones de: 1.53, 1.84, 1.36, 1.15, 1.16 g/L respectivamente, y están en función de las diferentes dosificaciones de la enzima alfa amilasa.

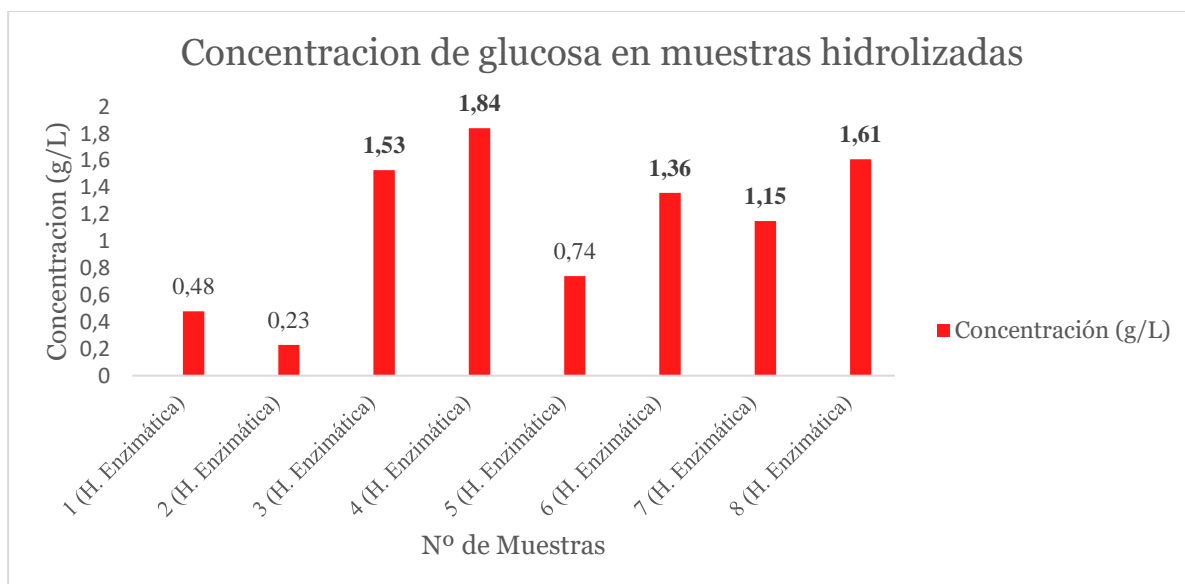


Gráfico 1. Comparación e la glucosa obtenida a partir de la hidrolisis enzimática
Fuente: Autor

4.1.6 Comparación de glucosa presente en el mosto hidrolizado mediante la enzima alfa amilasa

Mediante el empleo del equipo de espectrofotometría FTIR se realizó el análisis de los resultados obtenidos en las 8 muestras que fueron sometidos a procesos de hidrólisis a diferentes dosificaciones de la enzima alfa amilasa.

Como se observa en la Figura 39, la región de la parte izquierda el pico de absorción se encuentra delimitado entre 3400 y 3200 cm^{-1} lo cual indica que está relacionada con las moléculas de los azúcares presentes principalmente glucosa, con respecto al otro pico de 1633 cm^{-1} indica la relación existente con la molécula de agua y se encuentra de manera menos pronunciada debido a la vibración de estiramiento del enlace H-O-H (Sills & Gossett, 2012).

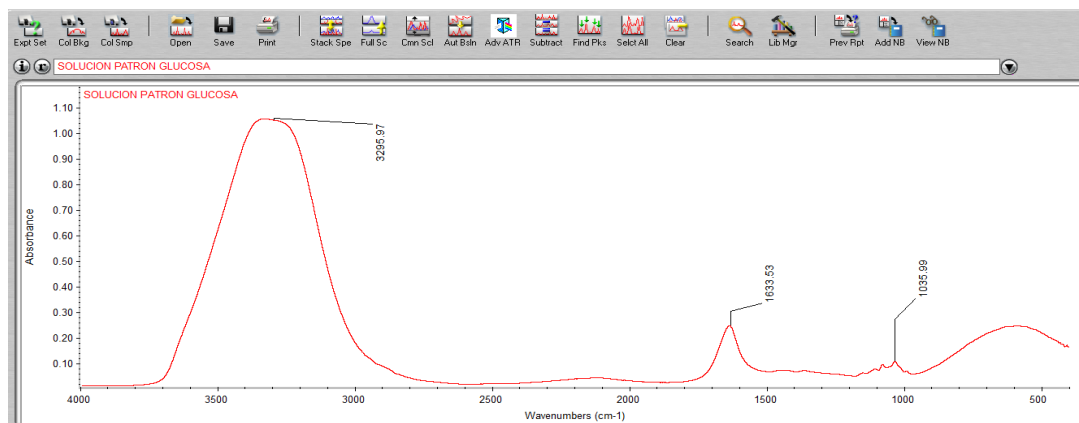


Figura 39. Solución patrón de glucosa

Fuente: Autor

Los resultados proporcionados por el equipo FTIR establecen porcentajes de coincidencia en función de las estructuras y el componente que mayormente se encuentre y vienen caracterizados por sus picos. Los porcentajes de coincidencia para cada una de las muestras hidrolizadas tanto química como enzimáticamente se detallan en la tabla 13, con sus respectivas bandas de espectros.

Tabla 12. Porcentaje de coincidencia de glucosa

Muestra	Porcentaje de coincidencia
1	78.30%
2	77.43%
3	75.94%,
4	77.44%,
5	77.66%,
6	77.42%,
7	76.06%,
8	75.47%

Fuente: Autor

En base al espectro de la solución patrón de glucosa que sirvió como modelo de comparación con la glucosa presente en cada una de las muestras hidrolizadas estableciendo sus respectivos porcentajes de coincidencia: para las muestras; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 que fueron hidrolizadas mediante el empleo de la

enzima alfa amilasa se reportaron el porcentaje de coincidencia de las muestras: 78.30%, 77,43%, 75.94%, 77.44%, 77.66%, 77.42%, 76.06%, 75.47%, respectivamente.

Cabe mencionar que la muestra sometida la hidrólisis química, el equipo de espectrofotometría no arrojó ningún valor de coincidencia con respecto a la glucosa, por lo cual indica que el mosto no pudo ser aprovechado como sustrato energético por las levaduras que se adicionaron, dificultando el proceso de fermentación.

Esto se debe a que los reactivos empleados para ajustar el pH (NaOH) no fueron aplicados con el grado de pureza requerido, debido a la limitación existente a la hora de adquirir sustancias que son controladas y sujetas a fiscalización, por lo tanto el acceso a la obtención del hidróxido de sodio fue un factor limitante , como alternativa se utilizó ciertos productos que contenían, en parte, el reactivo requerido para llevar acabo el ajuste de pH como lo son las lejías pero adicionado a ello otros subproductos. Con lo anterior mencionado queda descartado posteriores análisis al mosto hidrolizado mediante el ácido sulfúrico diluido, enfocando los resultados a las muestras que se les hidrolizó con la enzima alfa amilasa.

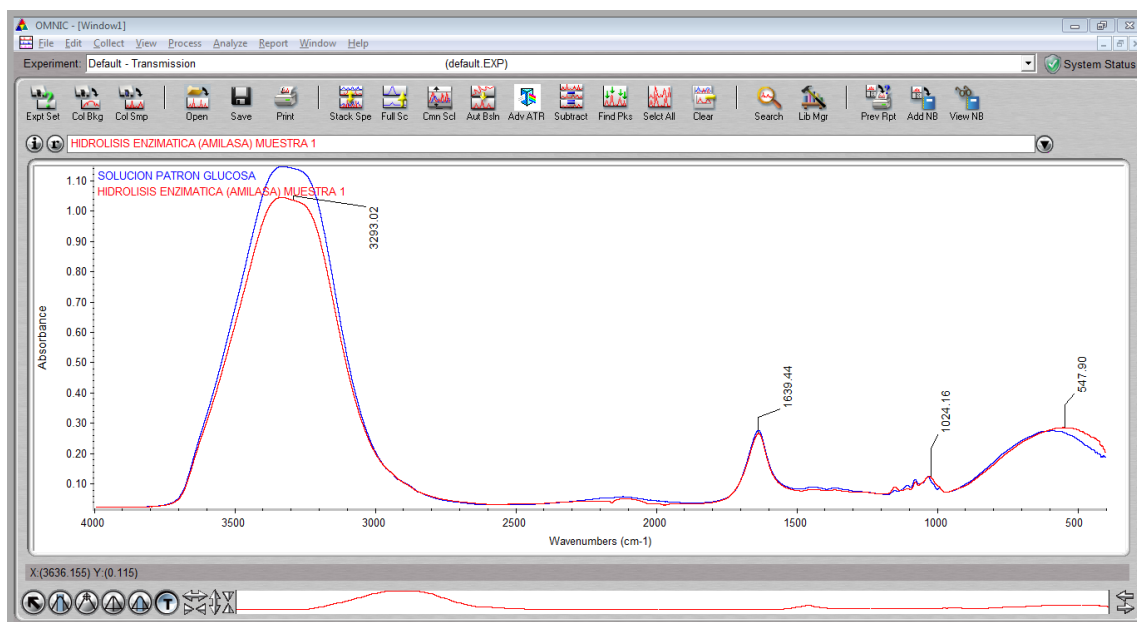


Figura 40. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 1 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia
Fuente: Autor

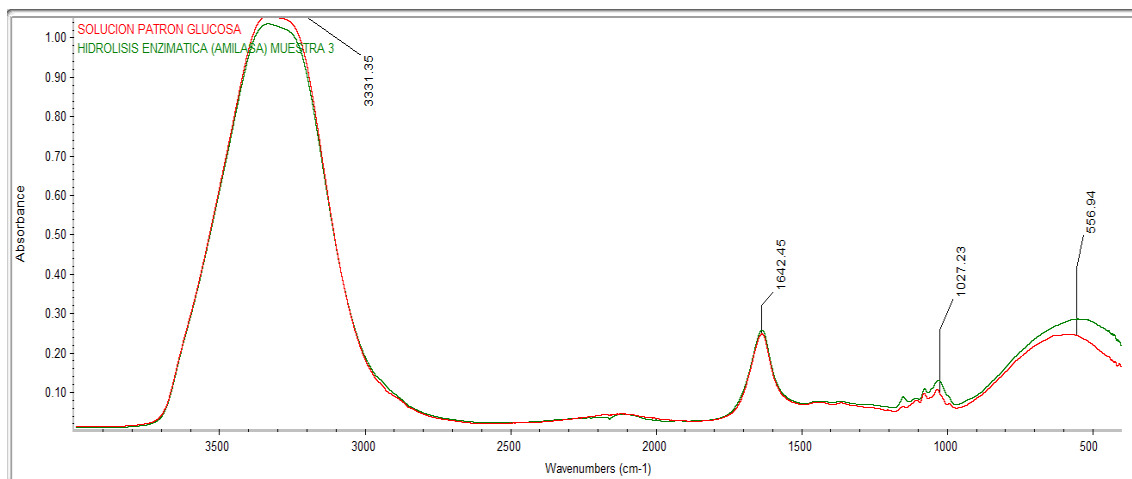


Figura 41. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 3 y glucosa estándar con 75.94% de coincidencia
Fuente: Autor

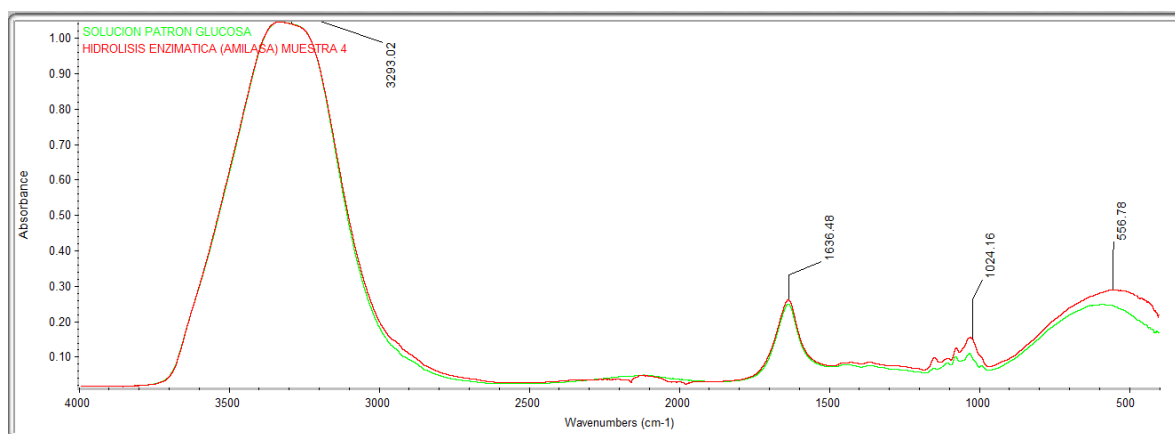


Figura 42. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 4 y glucosa estándar con 77.44% de coincidencia
Fuente: Autor

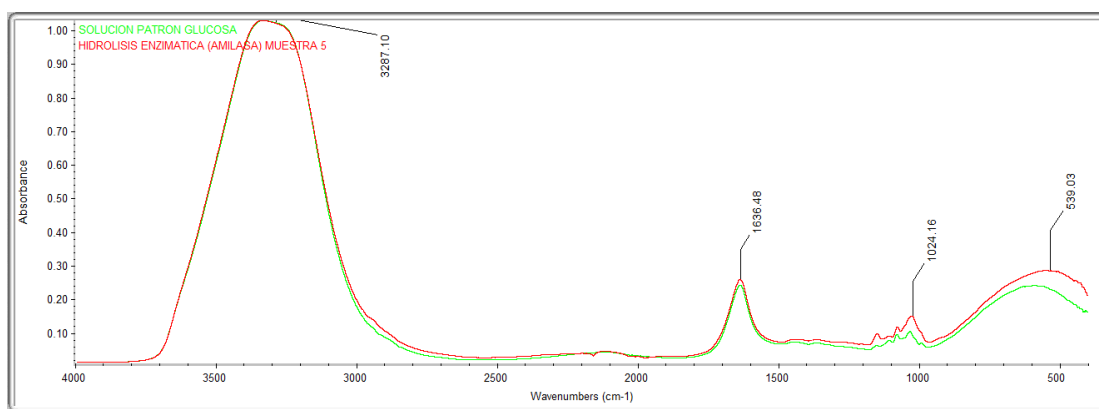


Figura 43. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 5 y glucosa estándar con 77.66% de coincidencia
Fuente: Autor

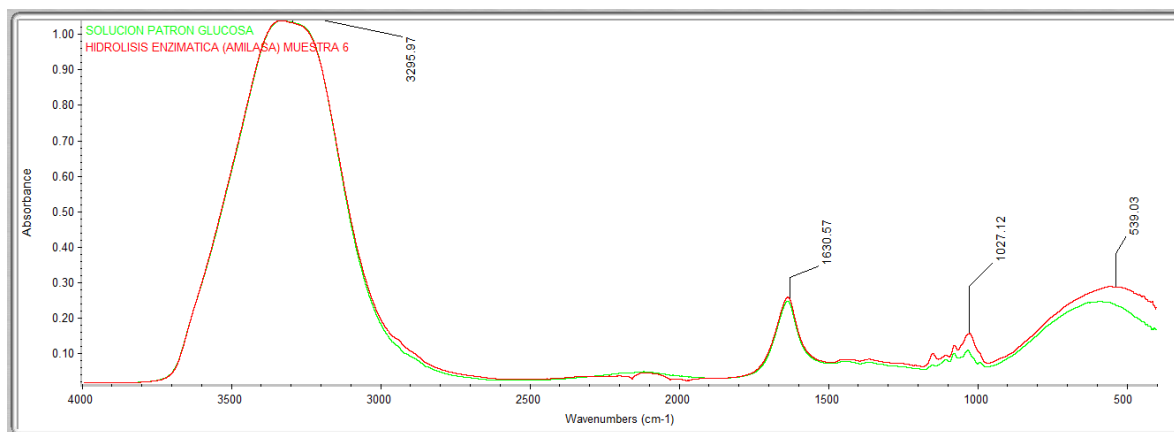


Figura 44. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 6 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia
Fuente: Autor

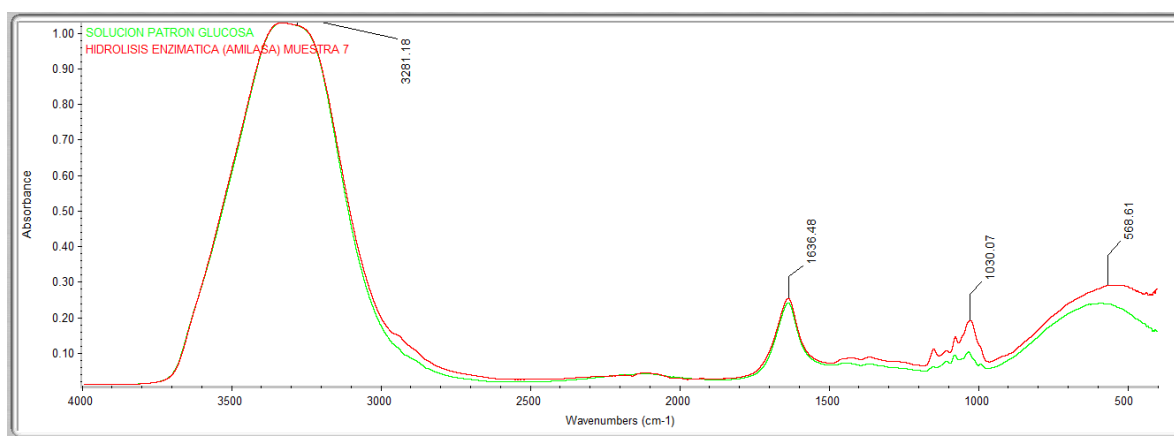


Figura 45. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 7 y glucosa estándar con 77.42% de coincidencia
Fuente: Autor

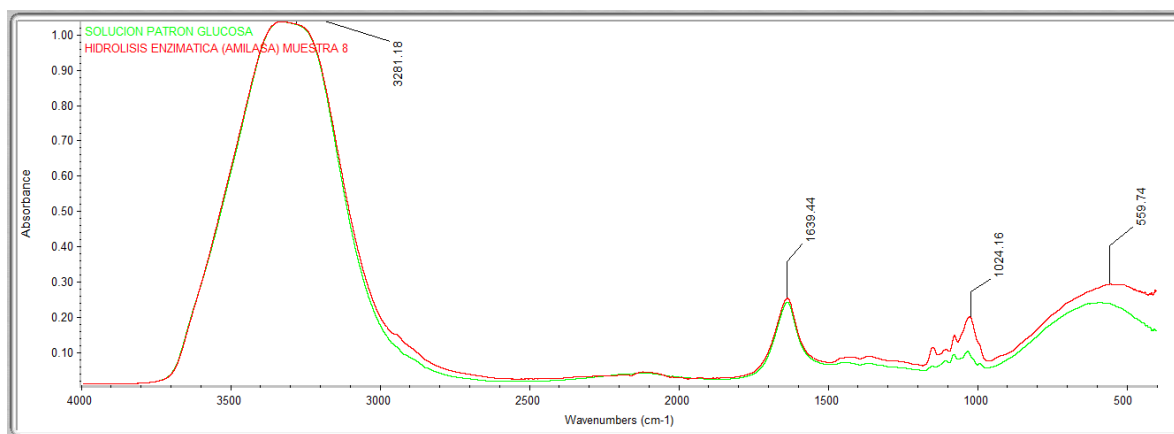


Figura 46. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrolizada 8 y glucosa estándar con 78.30% de coincidencia
Fuente: Autor

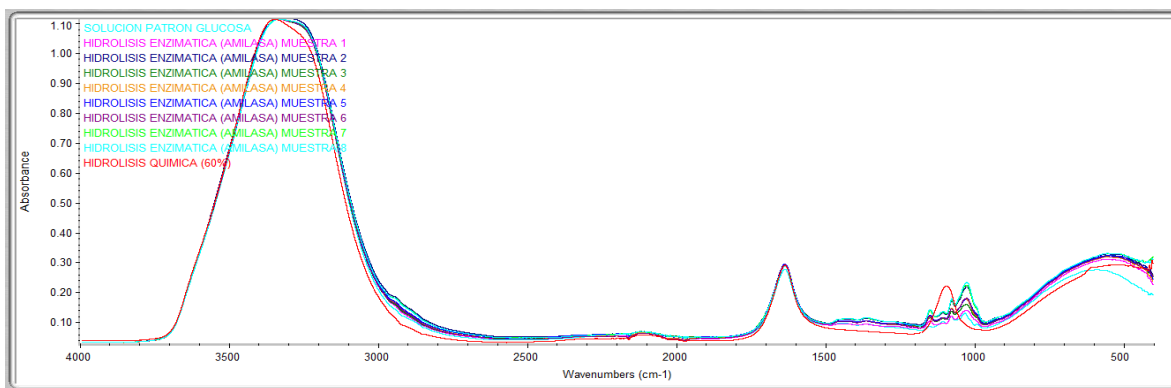


Figura 47. Comparación global entre la glucosa obtenida de todas las muestras hidrolizada y glucosa.

Fuente: Autor

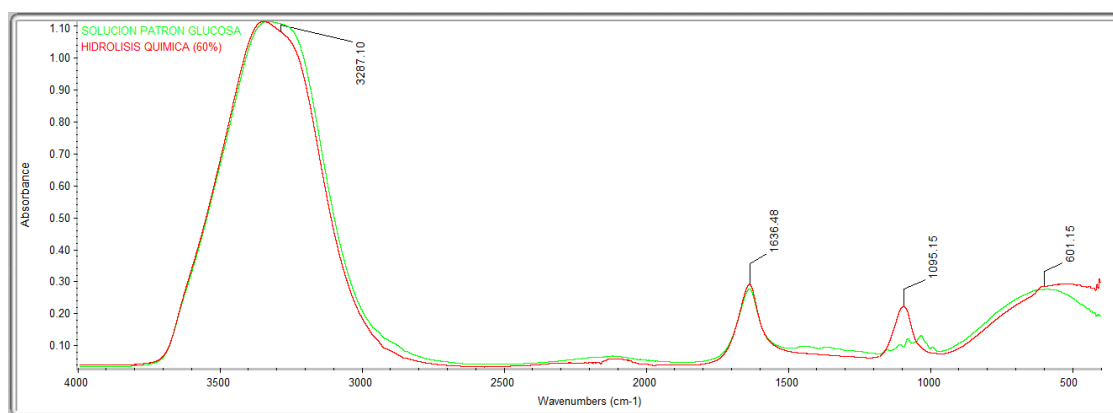


Figura 48. Comparación entre la glucosa obtenida de la muestra hidrólisis química y glucosa estándar.

Fuente: Autor

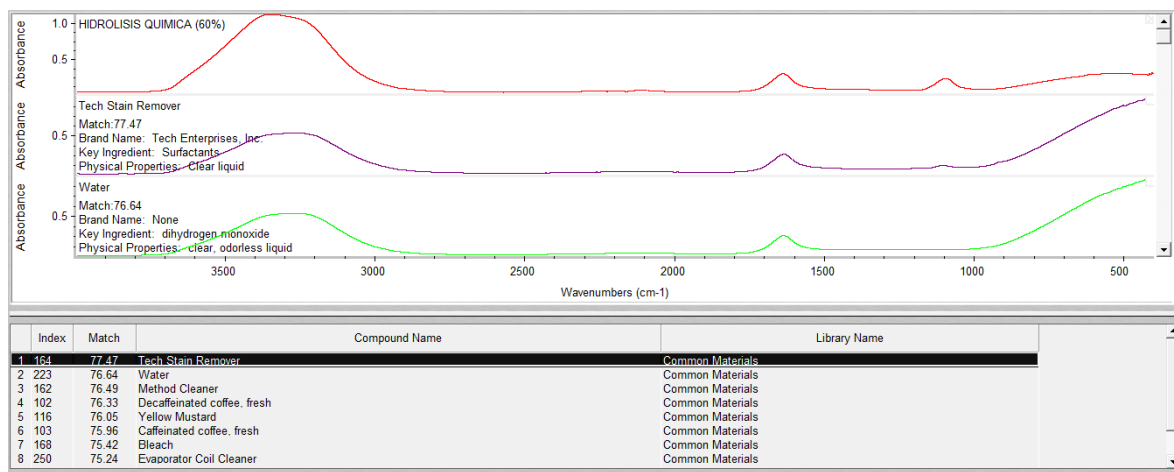


Figura 49. Subproductos presentes en la muestra hidrolizada mediante acido diluido al 60%

Fuente: Autor.

4.1.7 Grados Brix

Los grados Brix (°Brix) desempeñan un importante papel, no solo para la obtención de los grados alcohólicos probables, sino que también en base su tasa de disminución se determina que el mosto está listo para su destilación. Mediante el proceso de hidrólisis enzimática se dejó reposar las muestras por un lapso de tiempo de 72 horas (3 días) para posteriormente realizar las mediciones de los grados brix (°Brix), los resultados se detallan en la tabla 13.

Tabla 13. Eficiencia de hidrólisis

No. Muestra	o Brix (%)	% Hidrolisis
0 (Sin hidrolizar)	3	---
1	14	79%
2	26,75	89%
3	15,5	81%
4	17,5	83%
5	14,5	79%
6	21	86%
7	21,5	86%
8	25	88%

Fuente: Autor

En base a las mediciones se puede notar un considerable incremento del contenido de azúcar en cada una de las muestras con sus respectivos porcentajes, entre los cuales cabe destacar que los mejores rendimientos pertenecen a las muestras; 2 y 8 con eficiencias del 89.0 y 88.0 % respectivamente.

Luego de la etapa de fermentación alcohólica deriva de la glucosa presente en cada mosto se percibió un olor característico a fermentado y muy poco el alcohol.

Tabla 14. Datos experimentales de la fermentación alcohólica.

Mosto	Cantidad de hidrolizado (mL)	Contenido de azúcar (g)	Contenido de sulfato de amonio (g)	Olor característico a etanol	Grados Brix Antes de la fermentación (Día 1)	Grados brix después de la fermentación (Día 7)
1	400	2.5	4	NO	24	16

2 400 2.5 6 NO 25,5 15,5

Fuente: Autor

Luego de haber transcurrido los 7 días bajo condiciones anóxicas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* logró consumir en el transcurso de la fermentación una diferencia en el mosto 1 y 2 un 8 y 10 % de los azúcares presentes, fermentando ambas muestras de manera no significativa. El producto final depende de la naturaleza específica de la levadura que se desarrolla durante el proceso de adaptación y de la fermentación del mosto.

4.1.8 Análisis Estadístico

El Proceso de información fue realizado mediante el software “IBM SPSS Statistics 25” cuyos resultados fueron expresados mediante el análisis ANOVA. El análisis estadístico fue aplicado al proceso de hidrólisis enzimática como se ilustra en la Tabla 16.

Tabla 15. Análisis de varianza para Azúcares fermentables hidrólisis enzimática

Azúcares (g/L)								
Enzima Amilasa (g)	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0	1	0,11					0	0
10	1	0,48					0	0
15	2	0,49	0,361	0,255	-2,76	3,73	0	1
20	2	1,45	0,120	0,085	0,36	2,53	1	2
25	1	1,84					2	2
30	1	1,15					1	1
35	1	1,61					2	2
Total	9	1,01	0,636	0,212	0,52	1,49	0	2

ANOVA					
Azúcares (g/L)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	3,089	6	0,515	7,126	0,000128
Dentro de grupos	0,145	2	0,072		

Total	3,233	8
-------	-------	---

Fuente: Autor.

En esta tabla nos centraremos en el valor P ya que este nos muestra el valor de significancia. Para que estas variables sean significantes deben cumplir con la condición de $p < 0.05$. La tabla ANOVA particiona la variabilidad de azúcares obtenidos en cada una de las muestras a partir de diferentes dosificaciones con la enzima amilasa, para cada efecto obtenido prueba la significancia estadística comparando su cuadrado medio contra un error experimental. En este caso para el efecto dado se tiene un valor -P menor a 0.05 indicando que si existe una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de azucares fermentables obtenidos en base las distintas concentraciones de la enzima con un nivel de confianza del 95.0%.

4.1.9 Resultados de la destilación

En el proceso de destilación se logró recolectar 130 mL del producto de interés por cada 200 mL utilizados, sin embargo, los resultados fueron negativos debido a que existió una oxidación del bioalcohol. Esta transformación del biocombustible se involucraron 2 reacciones bioquímicas: el etanol fue transformado primero en un acetaldehído en una reacción catalizada por la alcoholdehidrogenasa y el acetaldehído se transforma en ácido acético por la aldehíodeshidrogenasa. Según (Nurgel et al., 2002) ambas reacciones implican transferencia de electrones a oxígeno molecular.

Sin embargo, la etapa de separación de los bioproductos obtenidos por este último proceso (destilación) fue complicado, por el hecho de que el etanol forma azeótropos con el agua y con el acetato de etilo que la hidrolizarse forma ácido acético, según (Corazza et al., 2016) esta mezcla se comporta como si estuviese formada por un solo componente por lo que al tratar de regular la temperatura del punto de ebullición en específico para cada componente su fase de vapor tendrá la misma composición que su fase líquida, si bien, este puede hervir a una temperatura superior, intermedia o inferior de cada uno de los constituyentes de la mezcla, permanecerá el líquido con la misma composición inicial, al igual que el vapor, por lo que no es posible separarlos por destilación simple (Vera-Rozo et al., 2022).

En la mayoría de los casos, para llevar a cabo esta separación de mezclas líquidas, según (Ghosh et al., 2010) una opción posible es la de emplear un agente de separación que consiste en una membrana selectiva de polietileno de baja densidad, la mezcla que es alimentada a un módulo de separación que está parcialmente dividida por una barrera semipermeable (la membrana), donde solo permite el paso al componente que es permeable a ella.

La separación del ácido acético y el etanol es difícil debido que sus puntos de ebullición son cercanos y también por las formaciones de azeótropos. El uso de las herramientas basadas en el análisis de los diagramas de equilibrio vapor-líquido permiten evaluar la posibilidad de separar mezclas azeotrópicas como se ilustra en la Figura 50.

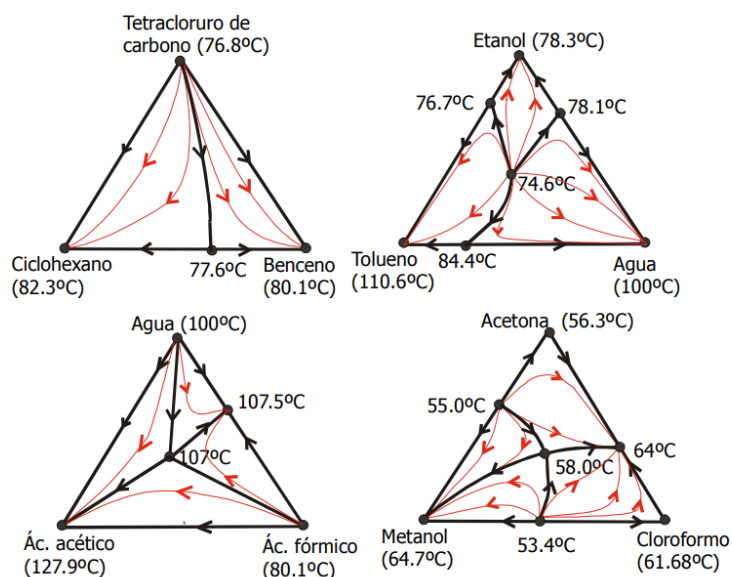


Figura 50. Mapas de curvas de residuo (cualitativos) para diferentes sistemas ternarios

Fuente: (Doherty & Knapp, 2000)

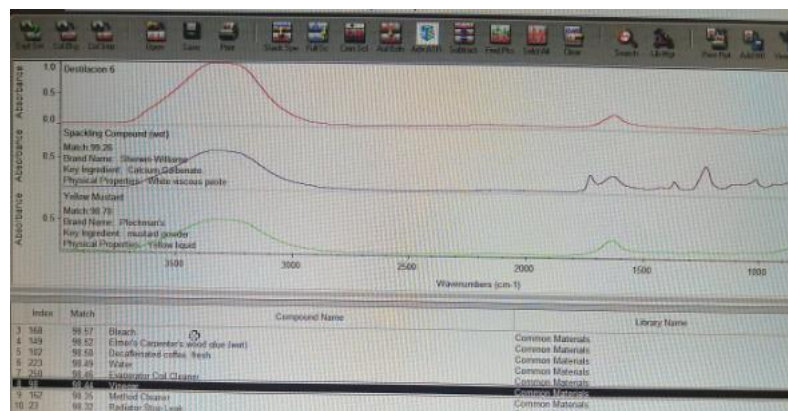


Figura 51. Análisis del destilado en el equipo FTIR. Fuente: Autor

Como se puede apreciar en la figura 51, el análisis obtenido a partir del proceso de destilación en el equipo F-ITR, tanto la composición del producto final como los picos que lo caracterizan no hubo coincidencia alguna con el bioetanol, sin embargo, se mostró un alto valor del 93.44% de coincidencia con el vinagre.

5 Discusión

En el presente trabajo de investigación se consideró a los lixiviados con cierto potencial energético que puede ser aprovechado en el campo de las energías renovables debido que los residuos orgánicos se incrementan en base al crecimiento poblacional y en se pueden plantear alternativas diferentes a los métodos tradicionales que ya se conocen para su remediación como son: compostaje y lumbricultura. Es importante caracterizar los residuos orgánicos municipales para poder identificar de qué manera están almacenados los azúcares fermentables y posterior a ello seleccionar el mejor método de hidrólisis para su obtención.

Se debe llevar a cabo un pre tratamiento de la materia prima antes de iniciar la etapa de hidrólisis enzimática, el porcentaje de azúcares fermentables obtenidos en dicho proceso podría variar dependiendo de la composición del lixiviado y que tan complejas sean las cadenas de carbohidratos y otras estructuras de almacenamiento como la celulosa y lignina. Esta investigación arrojó porcentajes de glucosa menores en comparación con otras investigaciones como la de (Arias et al., 2018) si bien en el proceso de hidrolizado

se empearon enzimas y condiciones de trabajo diferentes el rendimiento se ve directamente influenciado de tales complejos enzimáticos por el contenido de estructuras resistentes como por ejemplo la celulosa.

En cuanto a los procesos de hidrólisis tanto químico como enzimático, la hidrólisis enzimática proporcionó los mejores resultados bajo las condiciones de trabajo previamente descritas, según (Delatte et al., 2019) esta enzima degrada los polímeros de carbohidratos a glucosa sin ningún otro tipo de producto secundario a comparación de la hidrólisis química mediante el empleo del ácido sulfúrico diluido en diferentes concentraciones (40%, 60%, 80%) se originan sub productos no deseados en la reacción y debido a la naturaleza exotérmica tiene su incidencia sobre la disolución de las moléculas de glucosa (Vegi & Shastri, 2017). Este tipo de hidrólisis debe ser empleado cuando las hexosas se encuentren almacenadas en estructuras más resistentes como la lignina y celulosa.

En cuanto al proceso de fermentación se dieron resultados tanto positivos como negativos referente a la producción del bioalcohol mediante el empleo de levadura de cerveza teniendo en consideración algunos factores que limitaron el proceso como la suplementación de sales de amonio (Sulfato de amonio) para la nutrición de las levaduras y un alto contenido de azúcares presentes en la muestra, sin embargo, la eficiencia de la fermentación también pudo verse afectada ya sea por contaminación del mosto o un exceso de las sales nitrogenadas, originando así la aparición de ácidos orgánicos volátiles y la muerte de la levadura (Sablayrolles & Mouret, 2022).

En cuanto a la recuperación del bioetanol el resultado fue negativo debido a los factores ya antes mencionados en el proceso de fermentación, debido la naturaleza azeotrópica del etanol y considerado las perdidas producidas en el escape del CO₂, al realizar la separación de esta mezcla entre agua, alcohol y ácido acético en función de temperatura del punto de ebullición que es cercano para cada componente en específico (excepto para el agua), al final del proceso se tendrá la misma composición por lo que no se pudo recuperar el etanol por medio del equipo de destilación simple.

Según un estudio realizado (Universidad Autónoma de Querétaro et al., 2020) expresan que existe otras variables que afectan al proceso: transporte de los nutrientes al interior de la célula, actividad y eficiencia de las diferentes vías metabólicas implicadas en la fermentación, etc. Algunos de estos factores implican “paradas” en el proceso fermentativo, se considera también a más de los factores ya mencionados como; toxicidad de ácidos grasos, falta de agitación, altas concentraciones de SO_2 debido al sulfato de amonio con el que se suplementó el mosto en el presente estudio. ((Borrull et al., 2015; Castilleja et al., 2017; de Melo Pereira et al., 2014)

6 Conclusiones

El crecimiento de la población origina que se requiera un mayor consumo de alimentos como también una serie de diversos productos para satisfacer las necesidades y garantizar un desarrollo normal. Los residuos orgánicos generan problemas medio ambientales en su proceso de descomposición liberan lixiviados con altas cargas contaminantes. Estos lixiviados sirven como una rica fuente de azúcares almacenados que pueden atravesar procesos simultáneos de sacarificación y fermentación mediante el empleo de enzimas y levaduras.

El complejo enzimático alfa amilasa proporcionó los mejores resultados teniendo en cuenta los rangos de pH entre 4.5 y 5.5 y rangos de temperatura de 50 – 60°C esta enzima degrada los polímeros de carbohidratos a glucosa sin ningún otro tipo de producto secundario. Mediante el análisis estadístico realizado a la cantidad de azúcares obtenidos, se obtuvo un valor del factor de significancia inferior a 0.05 lo cual indica que existe una diferencia significativa en el aumento de concentración de glucosa.

La fermentación fue realizada en dos medios aislados rotulados como Mosto 1 y 2, fueron suplementadas con sales de amonio para la nutrición de las levaduras, sin embargo, el resultado fue negativo debido a la aparición de ácido acético en las muestras.

La recuperación el bioetanol no pudo ser posible debido a la naturaleza azeotrópica de los fluidos en especial el bioetanol con el agua y ácido acético, esto provoca que los componentes presentes en el

destilado actúen como uno solo y al tener puntos de ebullición cercanos es difícil recuperar el alcohol por medio de destilación simple.

7 Recomendaciones

La materia prima a utilizar debe ser pre tratada mediante un lavado simple a manera de eliminar microorganismos o bacterias ajenas al proceso de fermentación.

Al realizar la hidrólisis química se debe contar con equipo de seguridad como guantes y gafas antes de manipular las sustancias corrosivas. En cuanto a la hidrólisis enzimática se debe establecer una metodología en base a experimentos que hayan sido previamente realizados para poder establecer las condiciones de trabajo óptimas como pH y temperatura para un mejor rendimiento de la enzima.

En el proceso de fermentación se debe tener en cuenta que existen rangos de pH (4.5 – 6) y temperatura (35°C) que favorecen en el crecimiento/desarrollo y metabolismo de las levaduras, como también la ausencia de luz al ser organismos que no cumplen con la función de fotosíntesis. Es recomendable esterilizar los materiales y equipos a utilizar para evitar la contaminación del mosto con aparición de microorganismos no deseados y que puedan comprometer el proceso. Cabe recalcar que a la hora de nutrir las levaduras, estas requieren de concentraciones mínimas independientemente de la fuente nitrogenada que se utilice, por lo que su exceso conlleva a la muerte de las mismas.

Durante la etapa de destilación es importante no exceder el punto de ebullición del producto a recuperar ya que al superarlo podría dar paso a otro tipo de compuestos e incrementar la cantidad de agua.

8 Bibliografía

Abedi, E., & Pourmohammadi, K. (2020). Aggregation behaviors of sonicated tapioca starch with various strengths of Hofmeister salts under pre- and post-ultrasonic treatment. *Food Hydrocolloids*, 105, 105826. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105826>

Abiriga, D., Jenkins, A., Vestgarden, L. S., & Klempe, H. (2021). A nature-based solution to a landfill-leachate contamination of a confined aquifer. *Scientific Reports*, *11*(1), 14896. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94041-7>

Albarracín, K. G., Jaramillo, L., & Albuja, M. (2015). *Obtención de Bioetanol Anhidro a Partir de Paja (Stipa ichu)*. <https://doi.org/10.33333/RP.V36I2.526>

Amiri, H., & Karimi, K. (2013). Efficient Dilute-Acid Hydrolysis of Cellulose Using Solvent Pretreatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *52*(33), 11494-11501. <https://doi.org/10.1021/ie4017368>

Arias, A., Burbano, E., Bustamante, J. C., & Lozada, M. (2018). *Obtención de alcoholes a partir de la fermentación del lixiviado de residuos orgánicos*. 7.

Baek, M. H., Yoo, B., & Lim, S.-T. (2004). Effects of sugars and sugar alcohols on thermal transition and cold stability of corn starch gel. *Food Hydrocolloids*, *18*(1), 133-142. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00058-4)

Binder, J. B., & Raines, R. T. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(10), 4516-4521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912073107>

Borrull, A., Poblet, M., & Rozès, N. (2015). New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiology*, *48*, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.006>

Carrillo Navarrete, F. (2002). Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación [Ph.D. Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya]. En *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/6428>

Castilleja, D. E. M., Tapia, J. A. A., Medrano, S. M. A., Iturriaga, M. H., Muñoz, L. S., & Peniche, R. Á. M. (2017). Growth Kinetics for the Selection of Yeast Strains for Fermented Beverages. En A. Morata & I. Loira (Eds.), *Yeast—Industrial Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70224>

Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Wang, X., & Lü, X. (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *149*, 111370. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>

Chen, Y., Huang, S., Tang, Z., Chen, X., & Zhang, Z. (2011). Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α -amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, *85*(1), 272-275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.047>

Cheng, F., & Brewer, C. E. (2021). Conversion of protein-rich lignocellulosic wastes to bio-energy: Review and recommendations for hydrolysis + fermentation and anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *146*, 111167. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111167>

Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>

Corazza, M. L., Fouad, W. A., & Chapman, W. G. (2016). PC-SAFT predictions of VLE and LLE of systems related to biodiesel production. *Fluid Phase Equilibria*, *416*, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.09.044>

Cornejo, A., Barrio, I., Campoy, M., Lázaro, J., & Navarrete, B. (2017). Oxygenated fuel additives from glycerol valorization. Main production pathways and effects on fuel properties and

engine performance: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1400-1413. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.005>

Das, R., & Kayastha, A. M. (2019). Enzymatic hydrolysis of native granular starches by a new β -amylase from peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Chemistry*, 276, 583-590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.058>

de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>

Delatte, S., Doran, L., Blecker, C., De Mol, G., Roiseux, O., Gofflot, S., & Malumba, P. (2019). Effect of pilot-scale steam treatment and endogenous alpha-amylase activity on wheat flour functional properties. *Journal of Cereal Science*, 88, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.05.002>

den Haan, R., Kroukamp, H., Mert, M., Bloom, M., Görgens, J. F., & van Zyl, W. H. (2013). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for next generation ethanol production: Engineering *S. cerevisiae* for next generation ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(6), 983-991. <https://doi.org/10.1002/jctb.4068>

Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>

Doherty, M. F., & Knapp, J. P. (2000). Distillation, Azeotropic and Extractive. En John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (p.

0409192004150805.a01). John Wiley & Sons, Inc.

<https://doi.org/10.1002/0471238961.0409192004150805.a01>

Dura, A., & Rosell, C. M. (2016). Physico-chemical properties of corn starch modified with cyclodextrin glycosyltransferase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.012>

Durmazel, S., Üzer, A., Erbil, B., Sayın, B., & Apak, R. (2019). Silver Nanoparticle Formation-Based Colorimetric Determination of Reducing Sugars in Food Extracts via Tollens' Reagent. *ACS Omega*, 4(4), 7596-7604. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00761>

Garcés, L. M. (s. f.). *Manual de aprovechamiento de residuos orgánicos municipales*. 79.

García M., J., Machimura, T., & Matsui, T. (2013). A Nation-wide Planning of Agro-residue Utility for Bioethanol Production and Power Generation in Ecuador. *Energy Procedia*, 34, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.733>

García, Y. E. V. (2018). *OBTENCIÓN DE PRODUCTOS CON VALOR AGREGADO A PARTIR DE BANANO DE RECHAZO EN EL CONTEXTO ECUATORIANO*. 36.

Ghosh, U. K., Pradhan, N. C., & Adhikari, B. (2010). Pervaporative separation of furfural from aqueous solution using modified polyurethaneurea membrane. *Desalination*, 252(1-3), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.11.009>

Granada Torres, C. A., & Prada Millán, Y. (2015). Caracterización del lixiviado agroecológico a partir de residuos orgánicos de cultivos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2), 169. <https://doi.org/10.22490/21456453.1414>

Gu, Z., Chen, W., Wang, F., & Li, Q. (2019). Transformation and degradation of recalcitrant organic matter in membrane bioreactor leachate effluent by the O₃/H₂O₂ process.

Environmental Science: Water Research & Technology, 5(10), 1748-1757.
<https://doi.org/10.1039/C9EW00552H>

Guerrero, A., & Muñoz, E. (2018). Life cycle assessment of second generation ethanol derived from banana agricultural waste: Environmental impacts and energy balance. *Journal of Cleaner Production*, 174, 710-717. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.298>

Guo, L. (2018). Sweet potato starch modified by branching enzyme, β -amylase and transglucosidase. *Food Hydrocolloids*, 83, 182-189.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.005>

Gupta, R., Sharma, K. K., & Kuhad, R. C. (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100(3), 1214-1220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.033>

Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., van Maris, A. J. A., Klaassen, P., & Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: From academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 17(5). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>

Kazemi Shariat Panahi, H., Dehghani, M., Guillemin, G. J., Gupta, V. K., Lam, S. S., Aghbashlo, M., & Tabatabaei, M. (2022). Bioethanol production from food wastes rich in carbohydrates. *Current Opinion in Food Science*, 43, 71-81.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.001>

Khandaker, M., Abdullahi, U., Abdulrahman, M., Badaluddin, N. A., & Mohd, K. (2020). *Bio-Ethanol Production from Fruit and Vegetable Waste by Using Saccharomyces cerevisiae* (pp. 1-17). <https://doi.org/10.5772/intechopen.94358>

Khandaker, M., Qiamuddin, K., Majrashi, A., Dalorima, T., Hailmi M.S., M. H. S., & Hossain, A. B. M. S. (2018). Bio-ethanol production from fruit and vegetable waste by using *saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Research*, *15*, 1703-1711.

Koc-Jurczyk, J., & Jurczyk, Ł. (2020). The Characteristics of Organic Compounds in Landfill Leachate Biologically Treated in Different Technological Conditions. *Journal of Ecological Engineering*, *21*(3), 104-111. <https://doi.org/10.12911/22998993/118291>

Laluce, C., & Mattoon, J. R. (1984). Development of Rapidly Fermenting Strains of *Saccharomyces diastaticus* for Direct Conversion of Starch and Dextrins to Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.17-25.1984>

Li, J., Tang, X., Qian, H., Yang, Y., Zhu, X., Wu, Q., Mu, Y., & Huang, Z. (2021). Analysis of Saccharification Products of High-Concentration Glutinous Rice Fermentation by *Rhizopus nigricans* Q3 and Alcoholic Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GY-1. *ACS Omega*, *6*(12), 8038-8044. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05452>

Llenque-Díaz, L. A., Quintana, A., Torres, L., & Segura, R. (2020). BIOETHANOL PRODUCTION FROM ORGANIC PLANT WASTE. *REBIOL*, *40*(1), 21-29. <https://doi.org/10.17268/rebiol.2020.40.01.03>

Lozinski, D., Bolyard, S. C., Reinhart, D. R., & Motlagh, A. M. (2019). Treatment of leachate organic matter through sunlight driven processes. *Waste Management*, *94*, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.015>

Lu, W., Ma, Y., & Holger, B. (2014). Technological Options to Ameliorate Waste Treatment of Intensive Pig Production in China: An Analysis Based on Bio-Economic Model. *Journal of Integrative Agriculture*, *13*(2), 443-454. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60582-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60582-1)

Martínez-Avila, O., Sánchez, A., Font, X., & Barrena, R. (2019). Fed-Batch and Sequential-Batch Approaches To Enhance the Bioproduction of 2-Phenylethanol and 2-Phenethyl Acetate in

Solid-State Fermentation Residue-Based Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(12), 3389-3399. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00524>

Nagy, G., & Pohl, N. L. B. (2015). Complete Hexose Isomer Identification with Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(4), 677-685. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1072-z>

Nieblas-Morfa, C., Aguilar, I. G., Rodríguez, L. R., Sarría-Quesada, F., Almeida, J. B. de, & Pentón, M. P. (2017). Obtención de jarabes glucosados por hidrólisis enzimática empleando almidón de sorgo CIAPR-132. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 74(580), Article 580. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/329845>

Nurgel, C., Erten, H., Canba?, A., Cabaro?lu, T., & Selli, S. (2002). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavor compounds of white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 28-33. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000258>

Pérez, J. C., Altamirano, M., Nejer, J., & Castelo, D. (2017). Potencialidad de la provincia de Chimborazo para la producción de bioetanol a partir de la papa. *Revista Bases de la Ciencia. e-ISSN 2588-0764*, 2(1), 15. https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v2i1.730

Pleissner, D., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Fungal hydrolysis in submerged fermentation for food waste treatment and fermentation feedstock preparation. *Bioresource Technology*, 158, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.139>

Promon, S., Kamal, W., Rahman, S. S., Hossain, M., & Chowdhury, N. (2018). Bioethanol production using vegetable peels medium and the effective role of cellulolytic bacterial (*Bacillus subtilis*) pre-treatment. *F1000Research*, 7, 271. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13952.2>

Quimpac. (s. f.). Recuperado 17 de mayo de 2022, de <https://www.quimpac.com.ec/>

Reis, V. R., Bassi, A. P. G., Silva, J. C. G. da, & Ceccato-Antonini, S. R. (2013). Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1121-1131. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>

Rivera, E. C., Rabelo, S. C., dos Reis Garcia, D., Filho, R. M., & da Costa, A. C. (2010). Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: Determining optimal enzyme loading using neural networks. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(7), 983-992. <https://doi.org/10.1002/jctb.2391>

Sablayrolles, J.-M., & Mouret, J.-R. (2022). Nitrogen management during fermentation. En *White Wine Technology* (pp. 143-154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00027-2>

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>

Sills, D. L., & Gossett, J. M. (2012). Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 353-362. <https://doi.org/10.1002/bit.23314>

Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., Susmozas, A., Ruiz, E., Castro, E., & Cardona-Alzate, C. A. (2018). Techno-economic feasibility of bioethanol production via biorefinery of olive tree prunings (OTP): Optimization of the pretreatment stage. *Holzforschung*, 73(1), 3-13. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0096>

Solíz Torre, M. F. (2015). Ecología política y geografía crítica de la basura en el Ecuador. *Letras Verdes. Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales*, 17. <https://doi.org/10.17141/letrasverdes.17.2015.1259>

Soltanian, S., Aghbashlo, M., Almasi, F., Hosseinzadeh-Bandbafha, H., Nizami, A.-S., Ok, Y. S., Lam, S. S., & Tabatabaei, M. (2020). A critical review of the effects of pretreatment methods on the exergetic aspects of lignocellulosic biofuels. *Energy Conversion and Management*, *212*, 112792. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112792>

Sulaiman, A., Othman, N., Baharuddin, A. S., Mokhtar, M. N., & Tabatabaei, M. (2014). Enhancing the Halal Food Industry by Utilizing Food Wastes to Produce Value-added Bioproducts. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, *121*, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1106>

Tomasik, P., & Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. En *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 68, pp. 59-436). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4>

Universidad Autónoma de Querétaro, León-Teutli, A. K., Hernández-Iturriaga, M., Universidad Autónoma de Querétaro, Miranda-Castilleja, D. E., Universidad Autónoma de Querétaro, Aldrete-Tapia, J. A., Universidad Autónoma de Querétaro, Soto-Muñoz, L., Universidad Autónoma de Querétaro, Martínez-Peniche, R. Á., & Universidad Autónoma de Querétaro. (2020). Selection of native yeasts for the production of sparkling ciders from apple varieties established in Querétaro, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *26*(1), 29-47. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2019.06.010>

Universidad del Quindío, Mayor Torrez, V., Agudelo Tejada, A., Universidad del Quindío, García-Alzate, L., Universidad del Quindío, Padilla Sanabria, L., & Universidad del Quindío. (2018). Caracterización de lixiviados como alternativa que contribuya a la mitigación de contaminantes. *Revista ION*, *31*(1), 59-63. <https://doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018010>

Vegi, S., & Shastri, Y. (2017). Optimal control of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis for processing lignocellulosic feedstock. *Journal of Process Control*, 56, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2017.05.012>

Vera-Rozo, J. R., Sáez-Bastante, J., Carmona-Cabello, M., Riesco-Ávila, J. M., Avellaneda, F., Pinzi, S., & Dorado, M. P. (2022). Cetane index prediction based on biodiesel distillation curve. *Fuel*, 321, 124063. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124063>

Wu, Y., Ge, S., Xia, C., Mei, C., Kim, K.-H., Cai, L., Smith, L. M., Lee, J., & Shi, S. Q. (2021). Application of intermittent ball milling to enzymatic hydrolysis for efficient conversion of lignocellulosic biomass into glucose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 136, 110442. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110442>



Figura 52. Recolección de materia orgánica
Fuente: Autor



Figura 53. Lixiviado recolectado
Fuente: Autor



Figura 54. Filtración del lixiviado
Fuente: Autor



Figura 55. Lixiviado filtrado
Fuente: Autor



Figura 56. Preparación del reactivo DNS
Fuente: Autor

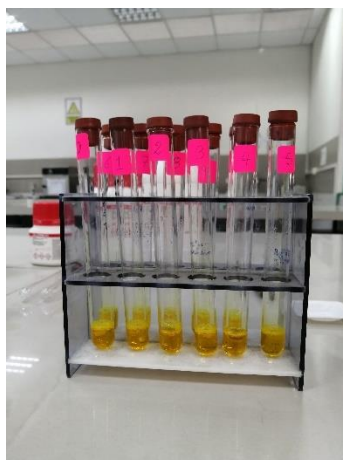


Figura 57. Determinación de azúcares reductores - Curva de calibración
Fuente: Autor



Figura 58. Determinación de azúcares reductores
Fuente: Autor



Figura 59. Azúcares reductores - Prueba de Fehling
Fuente: Autor



Figura 60. Enzima Alfa-amilasa
Fuente: Autor

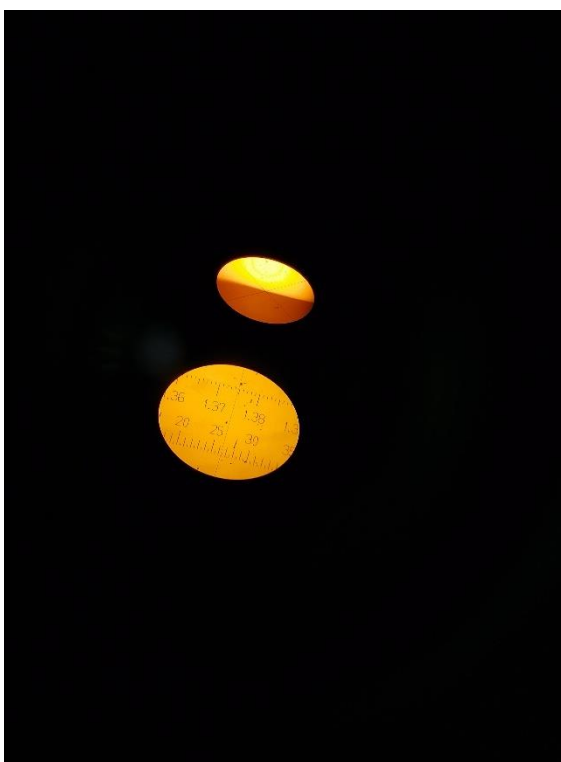


Figura 61. Medición de grados brix
Fuente: Autor

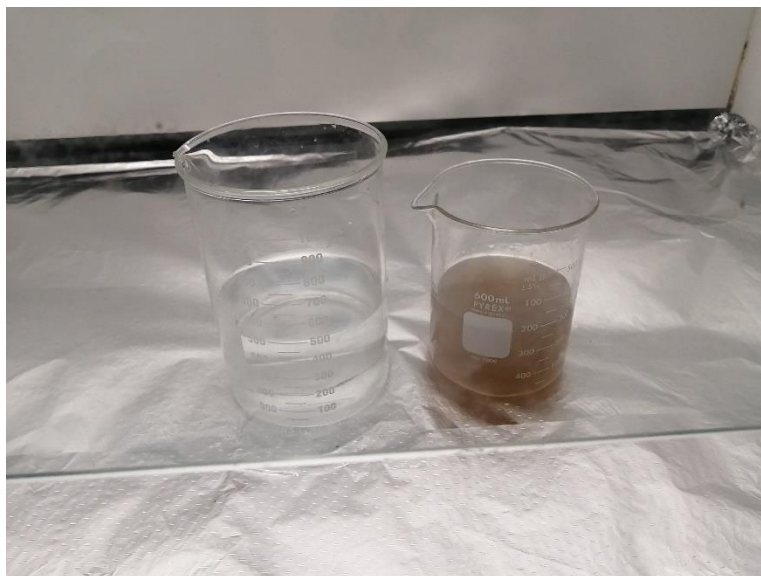


Figura 62. Dilución del ácido sulfúrico
Fuente: Autor

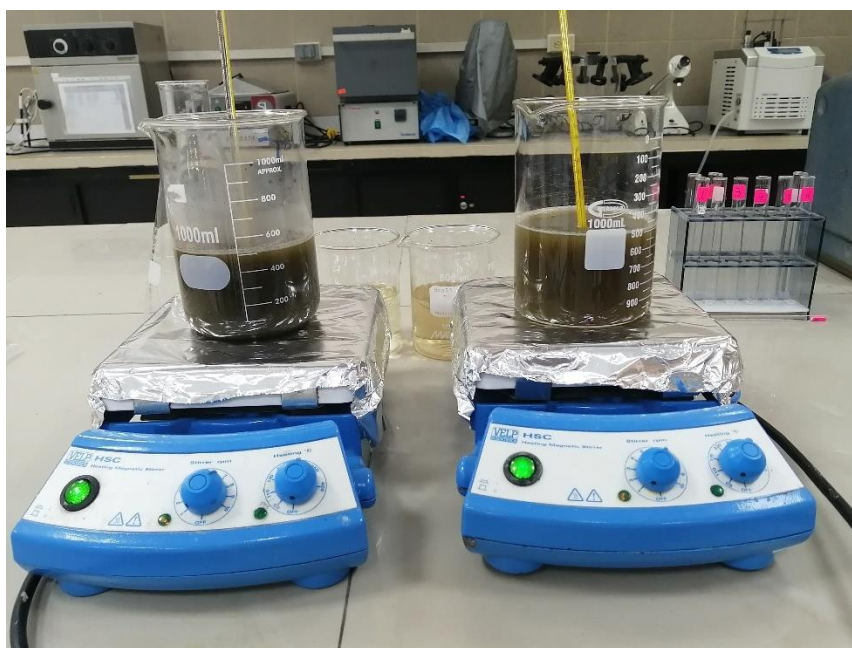


Figura 63. Hidrólisis enzimática
Fuente: Autor



Figura 64. Muestras Hidrolizadas
Fuente: Autor



Figura 65. Levadura de cerveza.
Fuente: Autor

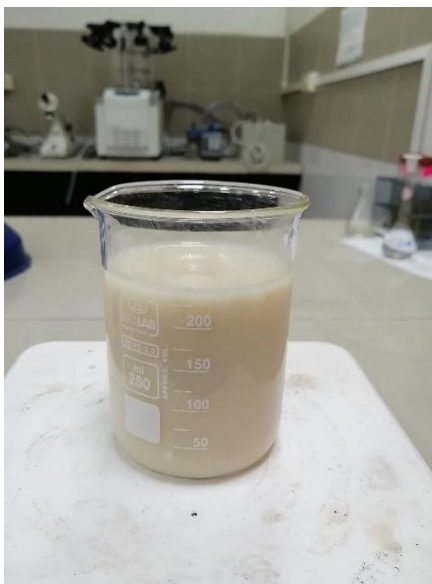


Figura 66. Activación de levadura en agua destilada
Fuente: Autor



Figura 67. Activación de levadura en cultivo PDA.
Fuente: Autor



Figura 68. Equipo de destilación simple.
Fuente: Autor

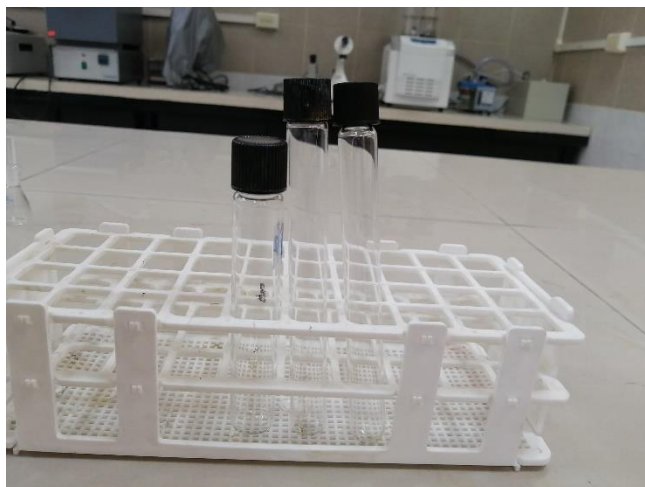


Figura 69. Prueba de lucas
Fuente: Autor

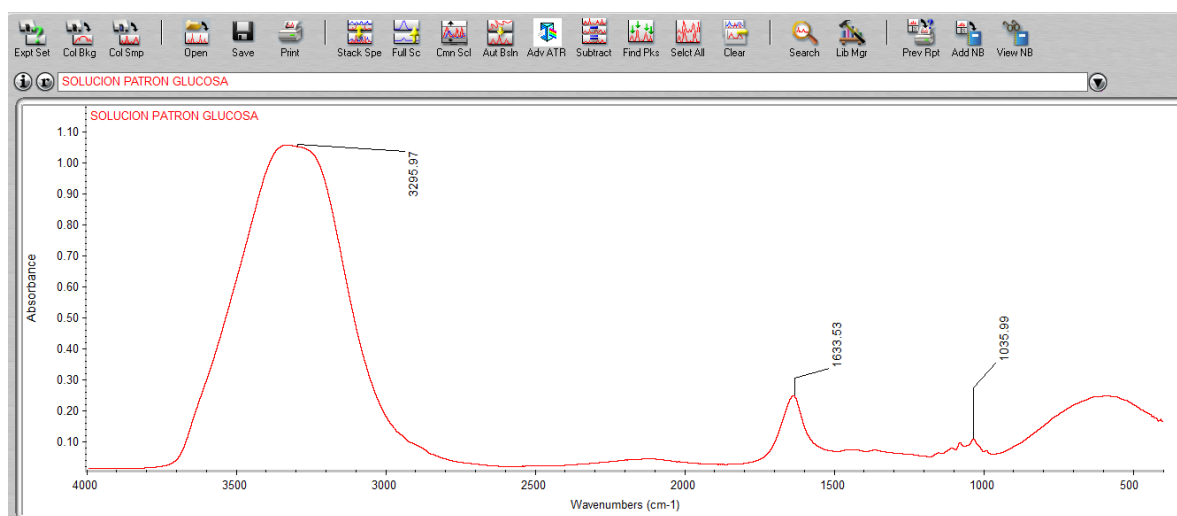


Figura 70. Espectro de la solución glucosa
Fuente: Autor

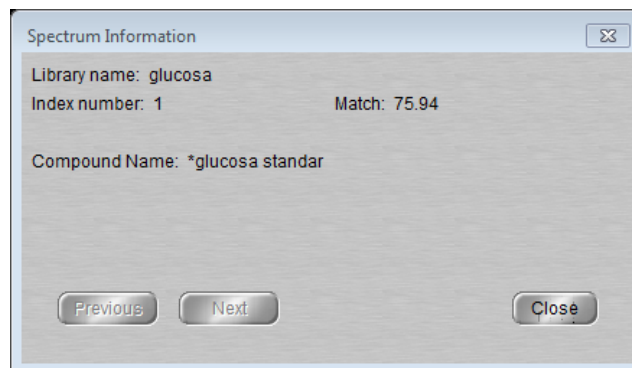
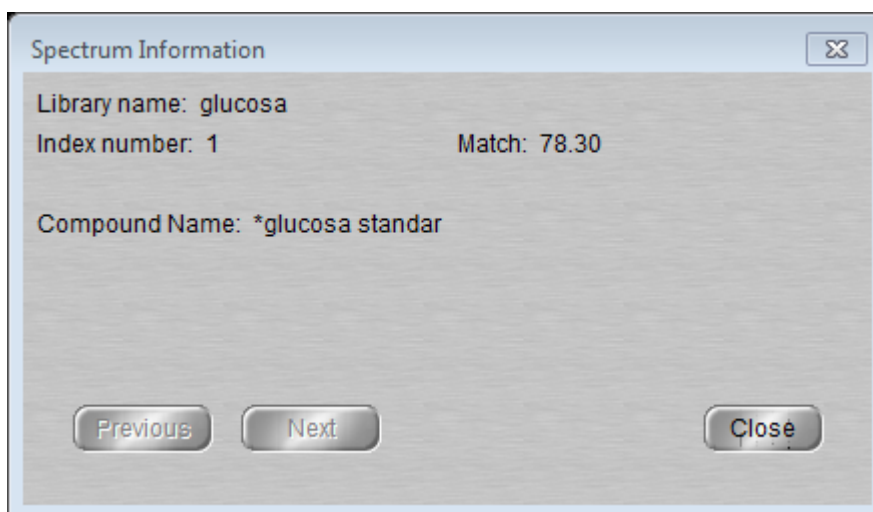
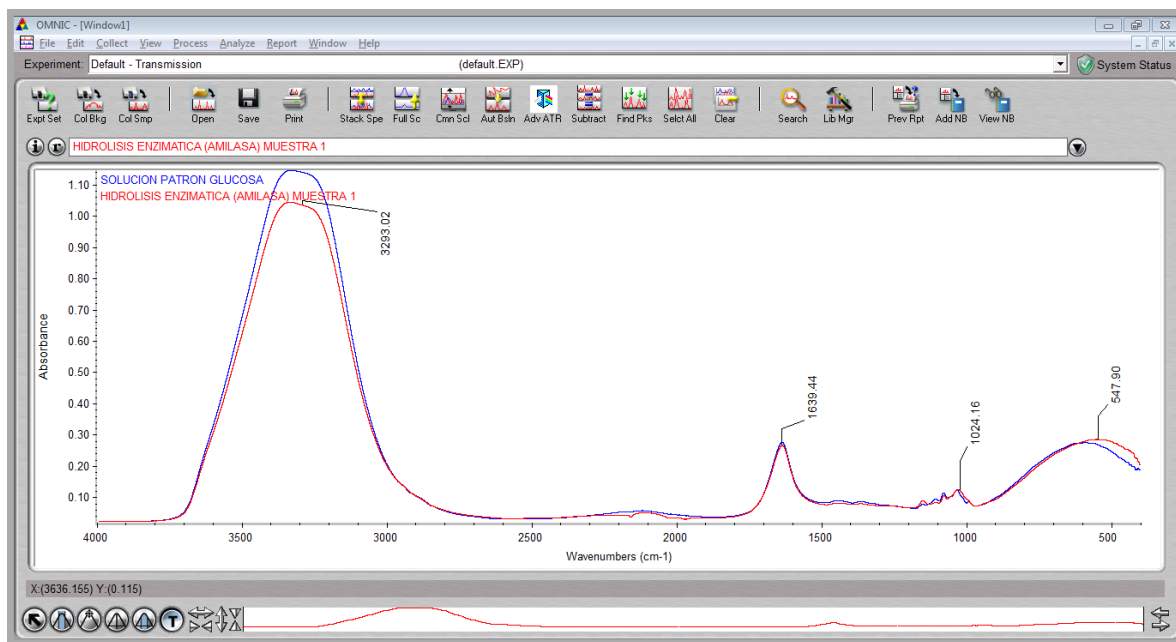


Figura 71. Porcentaje de coincidencia de la solución patrón glucosa
Fuente: Autor



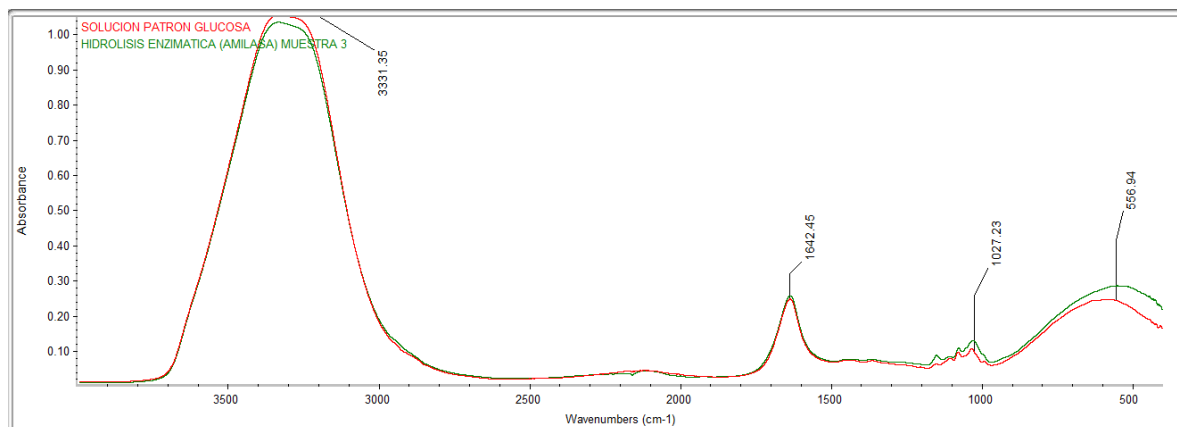
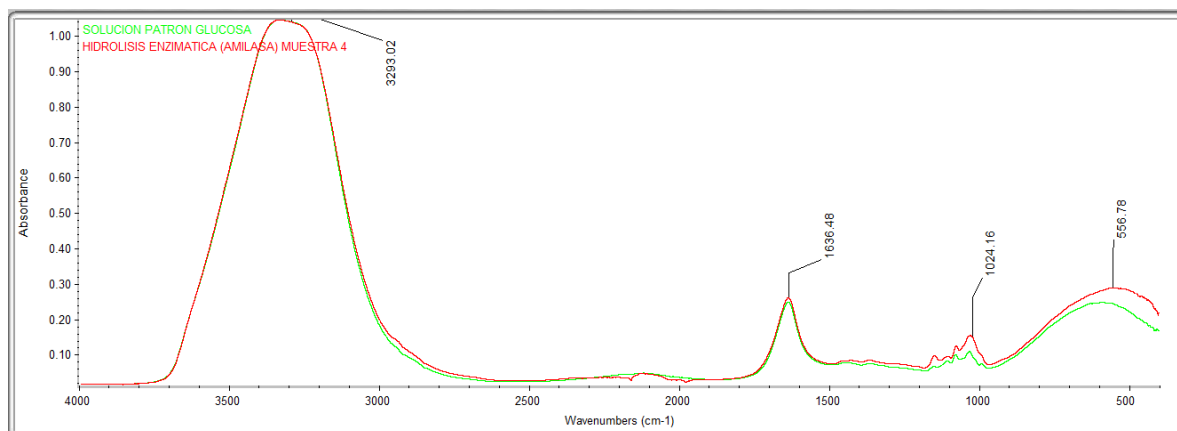


Figura 72. Comparación de la muestra hidrolizada N° 3.

Fuente: Autor



. Comparación de la muestra hidrolizada N° 4.

Fuente: Autor

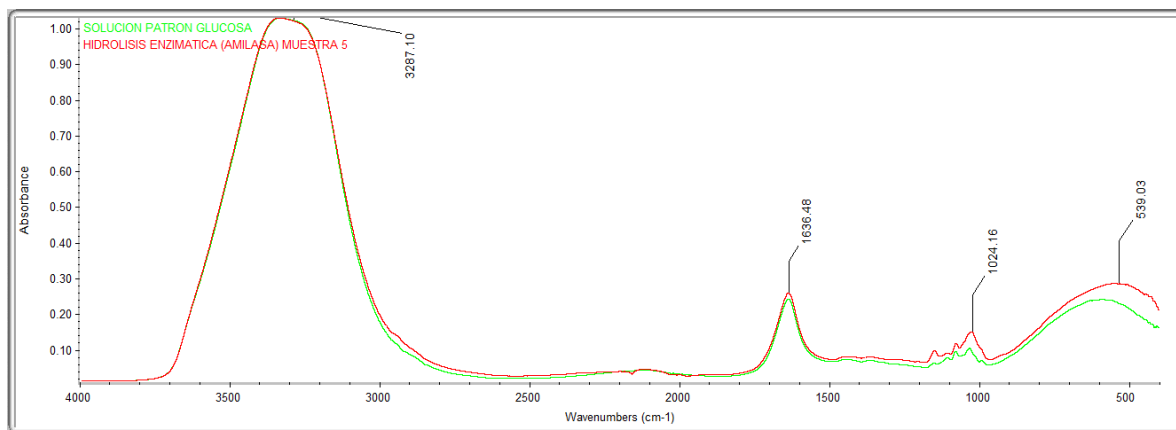


Figura 73. Comparación de la muestra hidrolizada N° 5.
Fuente: Autor

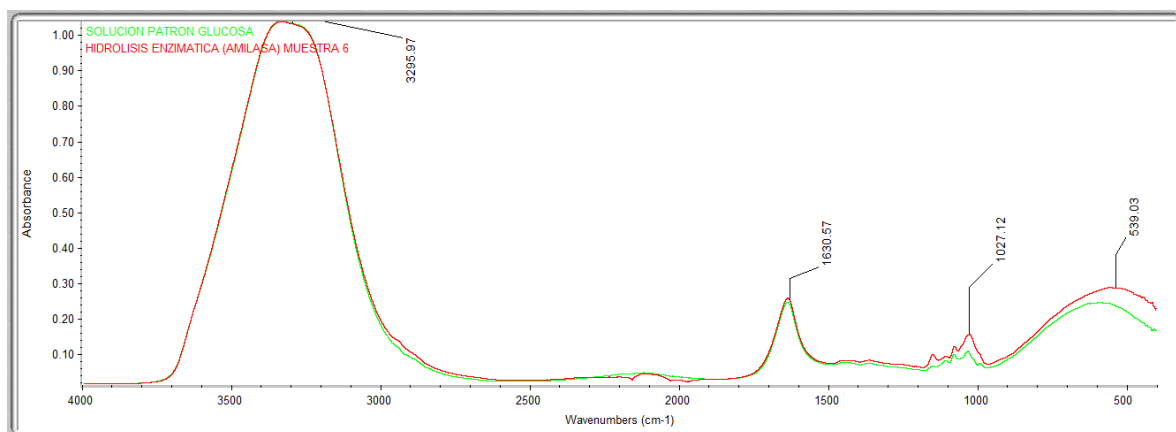


Figura 74.. Comparación de la muestra hidrolizada N° 6.
Fuente: Autor

Spectrum Information ✕

Library name: glucosa

Index number: 1 Match: 77.42

Compound Name: *glucosa standar

Previous
Next
Close

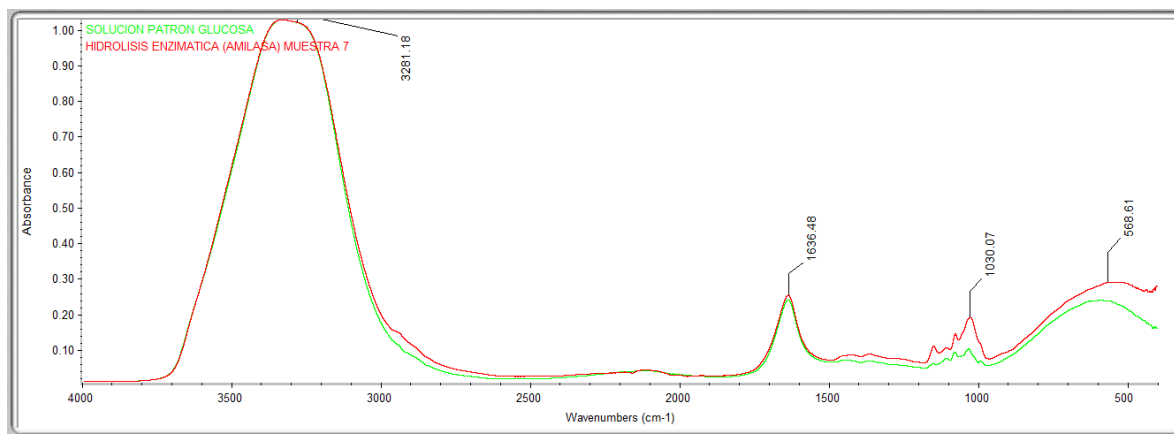


Figura 75. . Comparación de la muestra hidrolizada N° 7.
Fuente: Autor

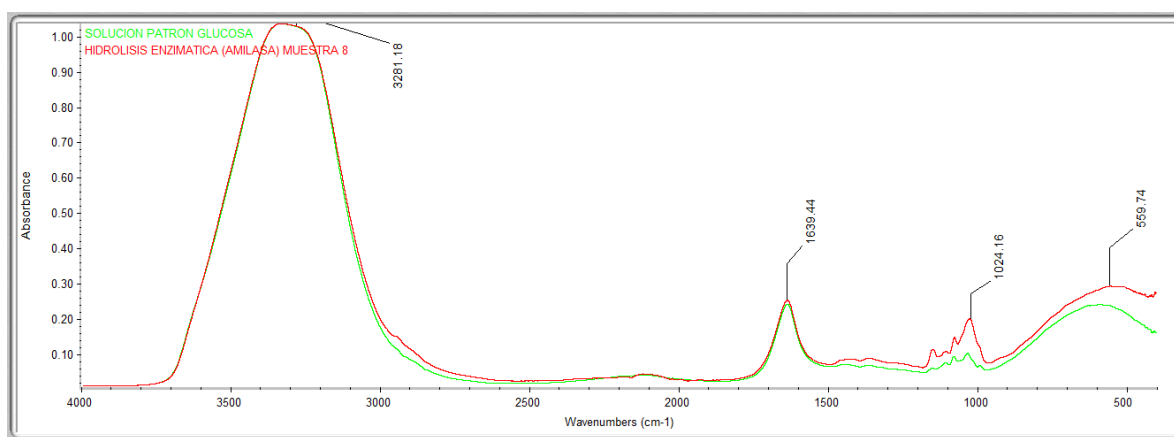


Figura 76. . Comparación de la muestra hidrolizada N° 8.
Fuente: Autor

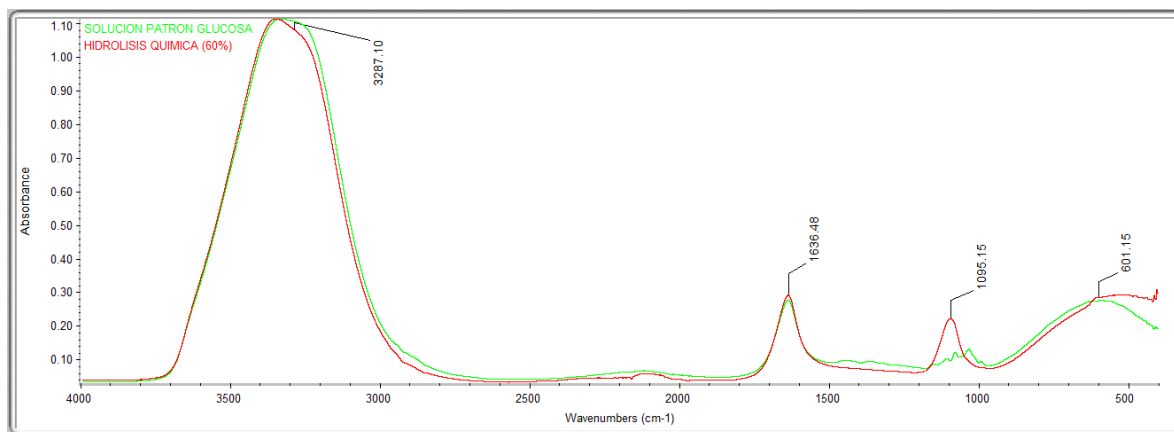


Figura 77. . Comparación de la muestra hidrolizada mediante acido diluido.

Fuente: Autor

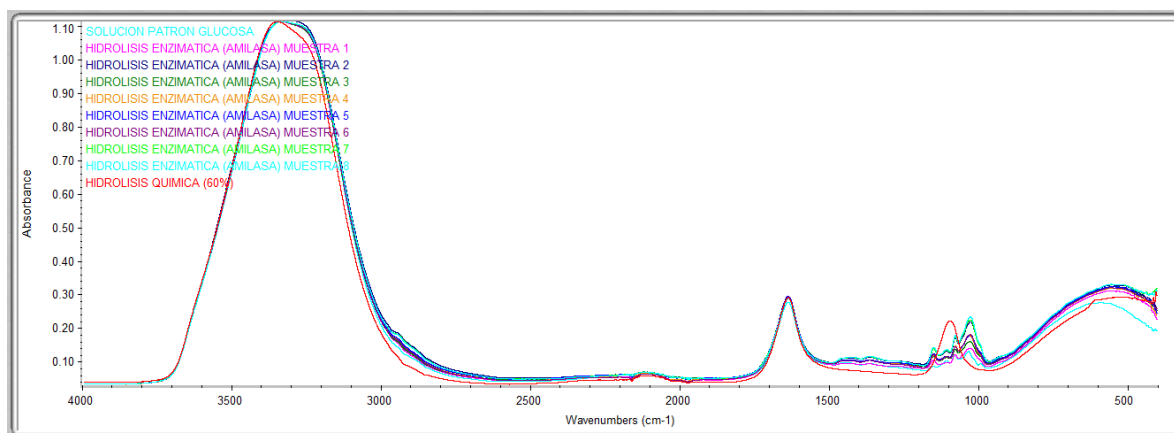
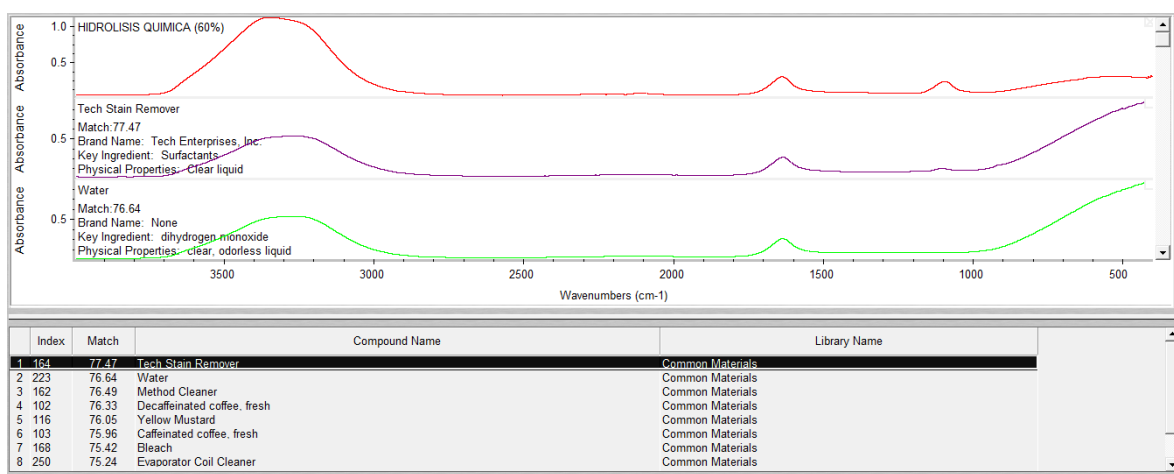


Figura 78. . Comparación de todas las muestras hidrolizadas.

Fuente: Autor

