

Yo Giron Chuyes Junior Giancarlo con DNI 70082706 y código N° 1126120104 autorizo la publicación de la tesis titulada **“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CASCARILLA DE CEBADA MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA Y FERMENTACIÓN”**.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



TÍTULO

**“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CASCARILLA DE
CEBADA MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA Y FERMENTACIÓN”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO**

ACUÑA ARIZA MILER ANTONI
GIRON CHUYES JUNIOR GIANCARLO
MILLA MENACHO ANTONIO HUMBERTO

Callao – 2019

PERÚ

PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue Sustentada por los señores Bachiller **ACUÑA ARIZA MILER ANTONI, GIRON CHUYES JUNIOR GIANCARLO** y **MILLA MENACHO ANTONIO HUMBERTO** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

ING CARLOS ALEJANDRO ANCIETA DEXTRE	PRESIDENTE
ING JULIO CÉSAR CALDERÓN CRUZ	SECRETARIO
ING RICARDO RODRIGUEZ VILCHEZ	VOCAL
ING LIDA CARMEN SANEZ FALCÓN	ASESORA

Tal como está asentado en el Libro de Actas N° 1 de Tesis con Ciclo de Tesis Folio N° 50 y Acta N° 49 de fecha **TREINTA Y UNO DE AGOSTO DE 2019**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Titulación de Tesis con Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de Grados y Títulos aprobado con Resolución N° 309–2017–CU de fecha 24 de octubre de 2017 y en su Cuarta Disposición Transitoria, norman los requisitos de los expedientes para la obtención del Grado Académico de Bachiller.

DEDICATORIA

A Dios y nuestra familia por su amor, trabajo y sacrificio del día a día para ser los mejores profesionales.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.1 Descripción de la realidad problemática	10
1.2 Formulación del problema	10
1.2.1 Problema general	10
1.2.2 Problema específico.	11
1.3 Objetivos	11
1.3.1 Objetivo general	11
1.3.2 Objetivos específicos	11
1.4 Limitantes de la investigación	11
II. MARCO TEORICO	12
2.1 Antecedentes	12
2.1.1 Antecedentes Internacionales	12
2.1.2 Antecedentes Nacionales	15
2.2 Bases Teóricas	18
2.2.1 Proceso de fermentación	18
2.2.2 Hidrólisis Ácida	30
2.2.3 Cascarilla de Cebada.	33
2.2.4 Bioetanol.	34
2.3 Conceptual	39
2.4 Definición de términos básicos	40
III. HIPOTESIS Y VARIABLES	43
3.1 Hipótesis	43
3.1.1 Hipótesis General	43

3.1.2	Hipótesis Específicas	43
3.2	Definición conceptual de variables	43
3.2.1	Operacionalización de Variables	44
IV.	DISEÑO METODOLÓGICO	45
4.1.	Tipo y diseño de investigación	45
4.1.1	Tipo de investigación	45
4.1.2	Diseño experimental	45
4.2	Método de Investigación	46
4.2.1	Metodología para determinar parámetros óptimos de hidrólisis ácida de cascarilla de cebada.	46
4.2.2	Metodología para determinar parámetros óptimos de la fermentación del hidrolizado.	47
4.2.3	Determinación de concentración final de etanol	49
4.2.4	Determinación de las características fisicoquímicos de etanol obtenido	49
4.3	Población y muestra	49
4.4	Lugar de estudio y periodo desarrollado	49
4.5	Técnicas e instrumentos para la recolección de información	50
4.5.1	Instrumentos de recolección de datos	50
4.5.2	Procedimiento para determinar parámetros óptimos de la hidrolisis ácida.	51
4.5.3	Procedimiento para determinar los parámetros óptimos de fermentación.	55
4.5.4	Procedimiento para determinar grado de pureza de etanol obtenido.	57
4.5.5	Procedimiento para determinar las características fisicoquímicos del etanol obtenido.	58
4.6	Análisis y procesamiento de datos.	60

4.6.1	Procesamiento estadístico	60
4.6.2	Análisis de Datos	60
V.	RESULTADOS	61
5.1	Resultados descriptivos	61
5.1.1	Resultado de los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de cascarilla de cebada	61
5.1.2	Resultado de los parámetros óptimos de Fermentación de hidrolizado	63
5.1.3	Resultado del % de pureza de etanol obtenido	64
5.1.4	Resultado de las características fisicoquímicas del etanol obtenido	65
5.2	Resultados Inferenciales	67
VI.	DISCUSION DE RESULTADOS	82
6.1	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados obtenidos	82
6.1.1	Parámetros óptimos de hidrolisis acida.	82
6.1.2	Parámetros óptimos de fermentación.	82
6.1.3	Porcentaje de pureza del etanol obtenido.	82
6.1.4	Parámetros fisicoquímicos del bioetanol obtenido.	83
6.2	Contrastación de los resultados con otros estudios Similares	83
6.3	Responsabilidad y ética de acuerdo con los reglamentos vigentes.	83
	CONCLUSIONES	84
	RECOMENDACIONES	85
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	86
	ANEXOS	90
	- Anexo 1 Matriz de consistencia	91
	-Anexo 2 Propiedades de mezcla etanol – agua	92
	-Anexo 3 Orden de servicio de alquiler de laboratorio	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición promedio en polímeros	34
Tabla 2. Operacionalización de Variables.....	44
Tabla 3. Diseño de la investigación.....	46
Tabla 4. Análisis de variables.....	60
Tabla 5. Curva patrón de glucosa	61
Tabla 6. Resultados del proceso de hidrolisis	62
Tabla 7. Resultados del proceso de fermentación	63
Tabla 8. Curva patrón de etanol.....	64
Tabla 9. Densidad relativa de etanol a diferentes concentraciones	65

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana.	22
Figura 2. Ruta metabólica para la fermentación y producción de etanol empleando.	28
Figura 3. Despolimerización de la Celulosa	32
Figura 4. Cascarilla de cebada.	33
Figura 5. Estructura básica de los carbohidratos. Polihidroxialdehído y polihidroxiacetona.	36
Figura 6. Estructura de la glucosa y la fructosa.	37
Figura 7. Estructura de la sacarosa y la lactosa.	37
Figura 8. Estructura del almidón.	38
Figura 9. Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores.	39
Figura 10. Pre-tratamiento de la cascarilla de cebada	51
Figura 11. Hidrólisis ácida	52
Figura 12. Muestras más reactivo DNS.	53
Figura 13. Muestras en baño María	54
Figura 14. Muestras enrazadas a 5ml para la lectura en el espectrofotómetro.	54
Figura 15. Lectura de muestras por espectrofotometría	55
Figura 16. Regulación de pH	55
Figura 17. Activación de la levadura	56
Figura 18. Fermentación.	56
Figura 19. Lectura del azúcares fermentables.	57
Figura 20. Destilación de la muestra.	57
Figura 21. Muestra destilada	58
Figura 22. Puntos de ebullición de soluciones de alcohol etílico y agua a 20°	59
Figura 23. Curva patrón de glucosa	61
Figura 24. Concentración de azúcares fermentables luego de la hidrólisis	62
Figura 25. Concentración de azúcares fermentables luego de la fermentación	63
Figura 26. Curva patrón etanol-agua	64

Figura 27. Curva de densidad relativa vs concentración	65
Figura 28. Correlación entre el segundo y tercer punto.	66
Figura 29. Puntos de ebullición de la muestra de alcohol etílico y agua	66
Figura 30. Resultados de las concentraciones de glucosa mediante hidrólisis.	68
Figura 31. Factores inter-sujetos	68
Figura 32. Análisis de varianza (ANOVA)	69
Figura 33. Pruebas de efectos	70
Figura 34. Comparaciones múltiples	70
Figura 35. Subconjuntos homogéneos	71
Figura 36. Prueba de Tukey	71
Figura 37. Prueba de Turkey-subconjuntos-concentración de glucosa	72
Figura 38. Concentraciones medias de azúcares fermentables.	73
Figura 39. Medias marginales estimadas de Concentración de azúcares fermentables.	74
Figura 40. Resultados de Fermentación	75
Figura 41. Factores inter-sujetos	76
Figura 42. Análisis de varianza	77
Figura 43. Comparaciones múltiples	78
Figura 44. Medias de concentración de glucosa según el tiempo	78
Figura 45. Comparaciones múltiples - Prueba de Tukey	79
Figura 46. Prueba de Turkey-subconjuntos concentración de glucosa	79
Figura 47. Concentraciones medias de azúcares fermentables.	80
Figura 48. Medias marginales estimadas de concentración de azúcares fermentables.	81

RESUMEN

Para poder aprovechar al máximo y de manera diferente el residuo lignocelulósico que posee la cascarilla de cebada, en la presente investigación se tiene como objetivo principal la obtención de bioetanol a partir de la cascarilla de cebada mediante la hidrólisis ácida y fermentación.

Al realizar la parte experimental de la investigación, se obtuvo como resultado un 30 % de pureza del grado de bioetanol; Para ello se trabajó en dos etapas, la primera, hidrolisis acida en donde se obtuvo la máxima concentración de azucares fermentables (12.26 g/L) a las condiciones de: relación cascarilla/ acido igual a 1 a 10, concentración de ácido de 1%, temperatura de 110°C y un tiempo de 210 minutos. La segunda etapa es la fermentación donde se obtuvo la mínima concentración de azucares fermentables (3,62 g/L) a las condiciones de: PH igual a 4.8, concentración de levadura igual a 10 g/L, temperatura de 25 °C y un tiempo de 48 horas.

Realizando el estudio estadístico de los datos obtenidos en proceso de hidrólisis y fermentación con el programa IBM SPSS Statistics 25 se comprobó la veracidad de los resultados obtenidos de forma experimental, garantizando la credibilidad del porcentaje de pureza del grado de etanol obtenido el cual fue del 30%.

Palabras Claves: *Bioetanol, hidrólisis ácida, cascarilla de cebada, glucosa, azucares fermentables, fermentación.*

ABSTRACT

In order to take full advantage of the lignocellulosic residue that the barley husk possesses in a different way, the main objective of this research is to obtain bioethanol from the barley husk by means of acid hydrolysis and fermentation.

When carrying out the experimental part of the research and carrying out the statistical study of the data obtained with the IBM SPSS Statistics 25 program, a result of 30% purity of the bioethanol grade was obtained; For this purpose, the first, acid hydrolysis, where the maximum concentration of fermentable sugars (12.26 g / L) was obtained, was carried out under the conditions of: scale / acid ratio equal to 1 to 10, acid concentration of 1% , temperature of 110 ° C and a time of 210 minutes. The second stage is the fermentation where the minimum concentration of fermentable sugars (3.62g / L) was obtained under the conditions of: PH equal to 4.8, yeast concentration equal to 10 g / L, temperature of 25 ° C and a 48 hours time.

Performing the statistical study of the data obtained in the process of hydrolysis and fermentation with the IBM SPSS Statistics 25 program, the veracity of the results obtained in an experimental manner was verified, guaranteeing the credibility of the percentage of purity of the degree of ethanol obtained which was 30 %.

Keywords: Bioethanol, acid hydrolysis, barley husk, glucose, fermentation.

INTRODUCCIÓN

En la industria cervecera aproximadamente solo el 60% del grano de la cebada es utilizado para la producción de la cerveza mientras que el otro 40% se pierde en la cascarilla. Estos residuos (cascarilla) son utilizados para la producción de alimentos balanceados para animales.

El presente trabajo tiene un fin diferente; estos residuos contienen celulosa, el cual puede ser transformado a glucosa mediante hidrólisis ácida y seguidamente a alcohol.

Para la producción de alcohol a partir de la cascarilla de cebada se utilizan diferentes métodos para producir glucosa a partir de la celulosa que contiene la cascarilla tales como la hidrólisis catalítica, hidrólisis enzimática, hidrólisis química y la hidrólisis térmica. En la cual la hidrólisis química cuenta con dos métodos: hidrólisis ácida y la hidrólisis básica, en el presente proyecto se utilizará la hidrólisis ácida ya que es mucho más rápida y no necesita pretratamientos sofisticados a comparación de la hidrólisis básica; precedido por un pre – tratamiento muy sofisticado y más costoso.

Con los azúcares fermentables obtenidos por la hidrólisis ácida, posteriormente se realiza una fermentación alcohólica utilizando como microorganismo capaz de descomponer el sustrato, a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; y poder producir bioetanol a partir de la cascarilla de cebada.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

Los residuos sólidos en el mundo constituyen un problema del que muchos países han desarrollado tecnología ya que gracias a estos residuos se puede generar energía más limpia y a menor costo para ello es necesario optimizar el proceso de producción.

El Perú tiene un déficit en la producción de biocombustibles, los materiales lignocelulósicos son una fuente renovable para la producción de bioetanol como alternativa energética. Los residuos sólidos (cascarilla de cebada) son generados en grandes cantidades en las industrias cerveceras que procesan la cebada como materia prima; estos residuos sólidos contienen gran cantidad de celulosa que puede ser transformado a sacarosa mediante la hidrólisis seguido de la fermentación para la producción de alcohol.

Las empresas que procesan la cebada con fines cerveceros eliminan la cascarilla para elaboración de alimentos balanceados, así como los molinos de generación de harina dejan el afrecho que está constituido por la cascarilla.

El grado de conversión de celulosa a glucosa que se obtenga dependerá de las condiciones óptimas de operación.

Los procesos fermentativos para transformar los materiales lignocelulósicos en alcohol requieren de un adecuado acondicionamiento del sustrato constituyéndose en un problema que requiere definir la hidrólisis de la cascarilla de cebada, para poder hidrolizar la unión de lignina con celulosa.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿Cómo se obtendrá bioetanol a partir de la cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación?

1.2.2 Problema específico.

- ¿Cómo determinar los parámetros óptimos del proceso de hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada?
- ¿Cómo determinar los parámetros óptimos del proceso de fermentación de la cascarilla de cebada?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Obtener bioetanol a partir de la cascarilla de cebada mediante la hidrólisis ácida y fermentación.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros óptimos del proceso de hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada.
- Determinar los parámetros óptimos del proceso de fermentación de la cascarilla de cebada.

1.4 Limitantes de la investigación

Los limitantes de la investigación propuesta son las siguientes:

- a) Espacial:** La presente investigación se desarrolló específicamente en el laboratorio de alimentos ubicado en la Universidad Nacional del Callao ubicada en el distrito y Provincia Constitucional del Callao.
- b) Temporal:** La presente investigación, se llevó a cabo desde julio del 2017 hasta agosto del 2019.
- c) Teórica:** Una de las limitaciones en el Perú es el acceso a los residuos lignocelulósicos ya que estos en su mayoría son utilizados para la elaboración de productos balanceados para animales.

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes Internacionales

Candler C., Villalobos Nercy, (2012, Venezuela) en *Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables*. El objetivo de esta investigación fue obtener azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida diluida en dos etapas del bagazo de caña de azúcar. La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor autoclave de 100mL de capacidad con ácido sulfúrico 1%v/v, relación líquido-sólido de 15:1 y tiempo de reacción de 3 minutos. La primera etapa de la hidrólisis se realizó en un rango de temperatura de 100-160°C. La fase sólida se separó de la fase líquida mediante filtración al vacío y el hidrolizado se almacenó bajo refrigeración a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. El sólido remanente se utilizó en la segunda etapa, la cual se realizó a dos temperaturas: 160 y 180°C, manteniendo constante el resto de las condiciones. Se encontró que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores, así como también en la generación de algunos subproductos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos. Los mejores valores de temperatura para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar mediante dos etapas secuenciales por carga fueron 140°C para la primera etapa y 180°C para la segunda. La presencia de furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y compuestos fenólicos indica que se producen reacciones de degradación asociadas tanto a pentosas como a hexosas derivadas de la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa respectivamente. La conversión total de azúcares reductores, expresados como glucosa, a partir de las dos etapas secuenciales de hidrólisis fue de 306,07 g/kg de bagazo seco, equivalente al 39,41% del valor teórico.

M. Ballesteros, J. M. Oliva, P. Manzanares, (2003, Madrid) *Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875*.

El proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) para la producción de etanol a partir de diversos materiales leñosos lignocelulósicos (álamo y eucalipto) y herbáceos (*Sorghum* sp. Bagasse, trigo paja y *Brassica carinata*) se ha analizado utilizando la cepa de levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Biomasa las muestras se trataron previamente en una planta piloto de explosión de vapor para proporcionar biomasa pretratada con un mayor contenido de celulosa en relación con los materiales no tratados y para mejorar la accesibilidad de la celulosa. Los experimentos de SSF se realizaron en condiciones de laboratorio a 42 ° C, 10% (p / v) de concentración de sustrato y 15 FPU / g de sustrato de celulosa comercial. Los resultados indican que es posible alcanzar rendimientos de SSF en el rango de 50–72% del rendimiento teórico máximo de SSF, basado en la glucosa disponible en materiales pretratados, en 72–82 h. Los contenidos máximos de etanol de 16 a 19 g / l se obtuvieron en medios de fermentación, dependiendo del material probado.

Domínguez María Magdalena (2011, Colombia). *Estudio de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores*, Realizó a escala laboratorio el proceso de obtención de azúcares reductores por medio de la hidrólisis ácida del bagazo de caña, sin realizar pre – tratamiento, utilizando ácido sulfúrico diluido en condiciones de ebullición a reflujo y a presión de la atmosfera con el propósito de alcanzar una alta conversión del bagazo a azúcares reductores. En el estudio analizó la influencia de tres variables independientes: tiempo de reacción, temperatura sobre el proceso y concentración del ácido sulfúrico. Concluyó que la eficiencia del proceso de hidrólisis ácida de bagazo de caña sin tratamiento en términos de conversión de carbohidratos originales (celulosa y hemicelulosa) del residuo lignocelulósico azucarero (bagazo de caña) a azúcares reductores del total presentes en el bagazo en base seca fue de 4,18%. El punto máximo de conversión a ART se alcanzó entre una temperatura de 45°C

y 75°C y un tiempo entre 60 y 90 minutos, respectivamente, ambos a una concentración de H₂SO₄ de 2%.

López Infante Michael, García Cruz Ariel (2012, México) en *Cinética del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto del árbol moringa oleífera, para el cálculo de los parámetros de un reactor*. En este trabajo los materiales lignocelulósicos son sometidos a pretratamientos donde la hidrólisis ácida es uno de los más utilizados, a pesar de producirse productos inhibidores de la fermentación. También se estudia la cinética del pre – tratamiento a: concentración de ácido sulfúrico (2% y 4%), desde (0 a 240 min.), y la relación de líquido/sólido es de 10 a 1 y una temperatura de 121°C La concentración máxima obtenida de polisacáridos hidrolizados para un tiempo máximo de 65 min y una concentración de ácido de 4% reportan conversiones de un 90% aproximadamente.

Se concluyó que el pretratamiento ácido diluido, donde se obtuvo la máxima conversión de polisacáridos, a un tiempo de 65,49 min. y una concentración de ácido sulfúrico de 4%, mediante el estudio cinético del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto de la M. Oleífera se determinó los valores de las constantes de velocidad k₁ y k₂ para así ser utilizadas en la propuesta del reactor. Se realiza los cálculos y gráficos correspondientes con vistas a proponer un reactor de pretratamiento.

P. Dagnino, Ester R. Chamorro, Fernando E. Felissia, María C. (2014, Colombia). en *Obtención de bioetanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo*. Muestra que la cascarilla de arroz y el aserrín de algarrobo son residuos muy abundantes y podrían ser aprovechados, utilizándolos como materia prima para la producción de bioetanol combustible. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la obtención de bioetanol a partir de estos residuos lignocelulósicos a través de un proceso de pretratamiento ácido, seguido de hidrólisis enzimática y fermentación, evaluando la conveniencia de la primera etapa. Los

rendimientos de la fermentación de los hidrolizados fueron aproximadamente del 100% en todos los casos.

Al final de este estudio se concluyó lo siguiente que En el desarrollo del proceso completo de obtención de bioetanol a partir de cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo se realizó una etapa de pretratamiento con solución ácida diluida de H_2SO_4 y calentamiento con vapor saturado a 5atm ($152^\circ C$) que condujo a un sólido con 52,8% de glucanos, 20% de cenizas y el porcentaje restante de lignina para el caso de cascarilla de arroz y un sólido con 51,2% de glucanos, 0,5% de cenizas y el porcentaje restante de lignina para aserrín de algarrobo.

La hidrólisis enzimática del sólido tratado de cascarilla de arroz alcanzó un 55,7% de conversión máxima a las 72 h, mientras que la conversión alcanzada en el material sin pretratamiento fue solo de un 19,7% a las 20 h y luego disminuyó hasta 6,9% a las 44 h En el caso de aserrín de algarrobo la hidrólisis enzimática del sólido tratado alcanzó un 41,5% de conversión máxima, mientras que el aserrín sin tratar alcanzó un 9,6%, ambos a las 72h.

Por último, los rendimientos de la fermentación fueron cercanos al 100% en todos los casos.

2.1.2 Antecedentes Nacionales

Aurora, E., Barrera, E. (2015, Perú) en *Obtención de bioetanol a partir de los residuos fermentables de mango y determinación de parámetros óptimos de destilación*, estudia la obtención de Bioetanol a partir de los residuos fermentables de Mango (*mangifera indica*), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo fermentador, aplicando para la primera fase un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3×2 , teniendo como variables a la concentración de levadura (0.1 y 0.2 % v/v) y relación de Agua: Mosto (0:100; 35:65 y 50:50 %v/v). La caracterización de los residuos fermentables es: pH = 4.02 ± 0.2 , °Brix = 17 ± 1.2 ; Azúcares reductores = 110 ± 2.2 gr/L, Acidez titulable = 0.5 ± 0.1 , %Humedad = 79 ± 2.1 , cenizas = 3.5 ± 0.1 y %recuperación de pulpa = 7.8 %,

aplicando los métodos de análisis de la AOAC. La fermentación de los residuos (mosto), se realizó en un bioreactor de 2 Lt de capacidad (volumen de trabajo 1.5 Lt); a $T^{\circ}= 27^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica; obteniéndose parámetros óptimos de: Levadura = 0.2% y una Relación Agua: Mosto (35:65); con una concentración de etanol (5.25%). La obtención de Bioetanol se realizó por destilación rectificadora en continuo, manejando como variables al flujo de alimentación (3, 4 y 5 L/h) y razón de reflujo (0.2, 0.5 y 0.8), resultando 9 tratamientos de los cuales se determinó que a un flujo de alimentación de 3 L/h y un reflujo de destilado de 0.8 en una columna de rectificación iniciando con 4 Lt. de fermentado, se obtiene el mejor destilado con un volumen de 994.625 mL, con una concentración de alcohol de 64.25% (p/v) y rendimiento de 60.85% de Etanol.

Zola M., Barranzuela M., Girón C., Guerrero D., (2017, Perú) en *Estudio experimental de la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de plátano en Piura*, muestra el resultado del proyecto de innovación e investigación, que tiene como objetivo principal realizar un estudio experimental para la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de plátano, con la finalidad de brindar una oportunidad de negocio a las empresas productoras de chifles en la ciudad de Piura. Uno de los procesos clave en la etapa experimental es la fermentación, la cual debe desarrollarse en un medio controlado (pH entre 4 y 6); puesto que, si el medio es muy ácido produce la muerte de la levadura, teniendo como consecuencia una fermentación incompleta. Por ello, al neutralizar el ácido sulfúrico con bicarbonato de sodio el valor del pH se eleva hasta 5.5, permitiendo que la levadura se desarrolle y funcione como facilitadora en la conversión de glucosa en alcohol durante la fermentación. La investigación presenta como resultado la obtención de bioetanol, incoloro y con una pureza de 95%, que sería propuesto para su aplicación en cocinas acondicionadas en la elaboración de chifles.

Odgar M. (2018,Peru) en la *Evaluación del Rendimiento de la fermentación alcohólica a partir del almidón de la papa (Solanumtuberosum), camote (Ipomoea batata)*, describe que ante la gran demanda proyectada de bioetanol a nivel mundial y al déficit de materias primas para su obtención, en el presente trabajo se planteó el objetivo de evaluar el rendimiento de la fermentación alcohólica a partir del almidón de la papa (solanum tuberosum), camote (ipomoea batata) y olluco(ullucus tuberosus)” en la Región Lambayeque. La obtención del etanol a partir de papa, camote y olluco se realizaron en tres etapas: extracción del almidón de los tubérculos, sacarificación del almidón obtenido y finalmente fermentación y destilación del etanol obtenido a partir de la glucosa obtenida de cada almidón.

Se seleccionó 2 kg de cada tubérculo previamente lavadas y secadas en forma natural. La sacarificación se realizó en tres etapas consecutivas: gelatinización (90°C y 30 minutos), licuefacción con alfa-amilasa (70°C y 120 minutos) y finalmente la sacarificación con glucoamilasa (65°C y 24horas). El mosto obtenido en la etapa de sacarificación se estandarizo y fermento con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Finalmente se procedió a la destilación.

En la etapa de extracción el camote tuvo un rendimiento de 18,84% de almidón respecto al tubérculo en comparación de 10,53 y 5,26 para la papa y olluco respectivamente. En la etapa de sacarificación el rendimiento fue de 89,37% de glucosa basado en el peso de almidón consumido y 80,91% respecto al rendimiento estequiométrico. En la etapa de fermentación el rendimiento promedio de los tres almidones fue de 50,00% respecto al teórico.

Se obtuvieron los siguientes resultados, el camote tuvo un rendimiento de 0.0719 litros de etanol por kg de tubérculo, mayor que 0,0413 de la papa y 0,0196 del olluco. Se concluye que el camote es el tubérculo con mayor rendimiento en la obtención de alcohol.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Proceso de fermentación

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica de origen vegetal como los carbohidratos o sus derivados por medio de ciertos microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) y que generalmente van acompañadas de un desprendimiento gaseoso y producción de energía. En 1810 Gay-Lussac, señaló que para la fermentación alcohólica, es necesaria la presencia de una sustancia azucarada y un fermento particular de naturaleza animal (bacterias, mohos o levaduras), (Campbell, 2007).

En las tecnologías de fermentación las materias primas proceden principalmente de las plantas que contienen carbohidratos y se utiliza la actividad metabólica y enzimática de microorganismos para transformar compuestos orgánicos en diferentes productos de interés. La fermentación implica la degradación del sustrato inicial conduciendo a la formación de productos finales metabólicos específicos, como etanol, ácido láctico y glicerol.

a) Tipos de fermentación

Hay muchos tipos de fermentación que difieren en los productos finales. Dos tipos comunes son la fermentación alcohólica y la fermentación láctica en las que se obtiene etanol y lactato respectivamente (Campbell, 2007).

Durante la **fermentación alcohólica** la glucosa es transformada en alcohol etílico y dióxido de carbono a través de reacciones de óxido-reducción



- **Fermentación láctica** es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el Ácido Láctico (Campbell, 2007).
- **Fermentación acética** es la fermentación bacteriana por Acetobacter, un género de bacterias aeróbicas, que transforma el alcohol en ÁCIDO ACÉTICO. La fermentación acética del vino proporciona el vinagre debido a un exceso de O₂ (Shirai, 2013).
- **Fermentación butírica** es la conversión de los Glúcidos en ÁCIDO BUTÍRICO por acción de bacterias Clostridium butyricum en ausencia de O₂. Se produce a partir de la lactosa con formación de Ácido Butírico y CO₂. (Shirai, 2013).

b) Sustratos naturales para la producción de bioetanol

En un sentido amplio se denomina biomasa a toda la materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales procedentes de su transformación natural o artificial. Puede ser clasificada en: biomasa natural, producida en la naturaleza sin la intervención humana, biomasa primaria, cultivada con el propósito de obtener biomasa transformada en combustible, en lugar de alimentos, biomasa secundaria o residual generada por cualquier actividad humana en procesos agrícolas, ganaderos y residuos sólidos urbanos (Galvis M. 2009).

La utilización de biomasa con fines energéticos requiere de tratamientos adecuados para utilizarla en los sistemas convencionales como combustibles sólidos (leña, carbón vegetal), líquidos (biocarburantes, aceites, cetonas) o gaseosos (biogás, hidrógeno). El poder calorífico de la biomasa depende de su procedencia y humedad, este puede oscilar entre 3000 y 3500 Kcal/Kg para residuos lignocelulósicos, entre 2000 y 2500 Kcal/kg para residuos urbanos y alrededor de 10000 Kcal/kg para los combustibles líquidos provenientes de cultivos energéticos. Estas características, junto con el bajo contenido de azufre de la biomasa, la

convierten en un producto especialmente atractivo para ser aprovechado energéticamente (Galvis M. 2009).

Desde el punto de vista ambiental, el aprovechamiento energético de la biomasa contribuye a la disminución de los gases de invernadero dado que el balance de emisiones de CO₂ a la atmósfera es neutro. En efecto, el CO₂ generado en la combustión de biomasa es reciclado mediante la fotosíntesis en el crecimiento de las plantas necesarias para su producción y por lo tanto, no se incrementa la cantidad de CO₂ en la atmósfera (Galvis M. 2009).

c) Principales nutrientes requeridos por los microorganismos en el proceso de fermentación

Las células se caracterizan por tener la capacidad de llevar a cabo reacciones químicas y organizar sus moléculas para formar estructuras específicas. En las células deben ocurrir varios tipos de reacciones anabólicas y catabólicas para su duplicación o crecimiento, para ello se requiere de una nutrición microbiana específica. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos tanto para macronutrientes, aquellos de los que se precisan grandes cantidades, como para micronutrientes de los que se requieren pequeñas cantidades o en ocasiones trazas (Brock, 2005).

Dentro de los macronutrientes más importantes están las fuentes de carbono y de nitrógeno. Los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los azúcares, las bases nitrogenadas, los compuestos aromáticos y un sinnúmero de compuestos orgánicos pueden ser usados por uno u otro microorganismo. En peso seco una célula típica contiene un 50% de carbono. Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en la célula es el nitrógeno con cerca del 12% en peso seco (Brock, 2005).

Entre otros macronutrientes necesarios para la célula se encuentra el Fósforo (P), azufre (S), potasio (K), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), sodio

(Na) y el Hierro (Fe). Por su parte los micronutrientes o elementos traza (Co, Mn, Zn), aunque se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes como los macronutrientes para el funcionamiento celular (Brock, 2005).

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se emplean para el cultivo de los microorganismos. En microbiología se usan dos tipos generales de medios: *los químicamente definidos* y *los complejos*. En los primeros se conoce la composición química exacta del mismo, ya que están precisadas las cantidades de los diferentes compuestos tanto orgánicos como inorgánicos del medio. A menudo los medios complejos son hidrolizados de caseína, carne, soja, extracto de levadura u otras sustancias muy nutritivas, más químicamente indefinidas (Scragg, 2007).

La preparación de los medios de cultivo y su esterilización es muy importante en las fermentaciones industriales. La esterilización consiste en la eliminación de todos los microorganismos por remoción o muerte, así como la inactivación de virus en o sobre un producto. Muchas fermentaciones industriales y casi todas las fermentaciones de laboratorio usan cultivos puros simples que necesitan un medio estéril y el mantenimiento de condiciones de esterilidad. Estas condiciones se requieren puesto que un medio contaminado sufrirá debido a que (Scragg, 2007):

- Los nutrientes disponibles son usados por los contaminantes y convertidos a células y productos indeseables.
- Las condiciones del medio cambian a menudo.
- Las enzimas producidas por los contaminantes pueden degradar cualquier producto formado.

d) Crecimiento microbiano

La palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células. Una célula microbiana no viable se define como aquella que incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un periodo de tiempo suficientemente largo es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse. Una curva de crecimiento típica puede dividirse en distintas fases llamadas *fases de latencia*, *fase exponencial*, *fase estacionaria* y *fase de muerte* (Brock, 2005).

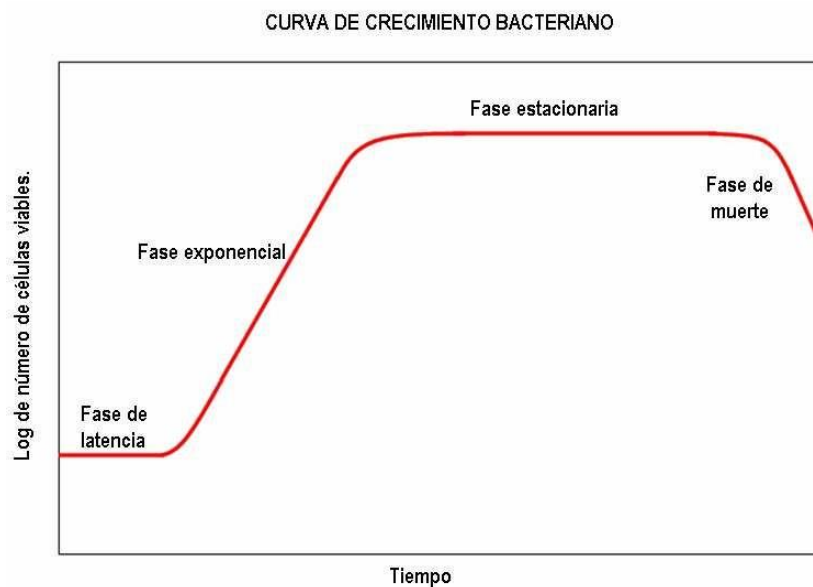


Figura 1. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana.
Galvis, M. (2009)

Cuando se inocula una población microbiana en un determinado medio de cultivo el crecimiento comienza tras un periodo de tiempo llamado *fase de latencia* la cual puede ser breve o larga dependiendo de las condiciones de crecimiento y la procedencia del cultivo (Brock, 2005).

Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y en condiciones similares, el crecimiento exponencial se inicia de inmediato reduciendo el tiempo en la fase de latencia (Brock, 2005).

Por su parte, si un inóculo se toma desde su fase estacionaria y se inocula en el mismo medio de cultivo se observa un retraso, aunque todas las

células sean viables, como resultado la fase de latencia se hace mayor. Es probable apreciar un retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente a causa de la temperatura o compuestos tóxicos (Brock, 2005).

Las células en *crecimiento exponencial* están en el estado fisiológico más sano y por ello las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. Durante la *fase exponencial* cada célula se divide para formar dos, cada una de las nuevas células se divide para formar otras dos y así sucesivamente. La velocidad de este tipo de crecimiento exponencial está directamente influenciada por las condiciones del medio de cultivo (Brock, 2005).

El crecimiento exponencial no puede prolongarse de modo indefinido, por lo que en el ambiente de las células se generan diferentes factores que limitan el crecimiento celular. Generalmente un nutriente esencial del medio de cultivo llega a ser un factor limitante del crecimiento o bien pueden acumularse en el medio algunos productos de deshecho hasta niveles inhibitorios que hagan que cese el crecimiento exponencial. Al producirse esto la población alcanza la *fase estacionaria* (Brock, 2005).

Si la incubación continúa después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si esto último ocurre se dice que la población está en *fase de muerte* (Brock, 2005).

e) Factores que influyen en el crecimiento del microorganismo.

El crecimiento y actividades de los microorganismos se ven muy afectadas por las condiciones físicas y químicas del medio en el que se desarrollan. Entre los factores de mayor relevancia se encuentran la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y de oxígeno entre otros (Galvis M. 2009).

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Existe una diversidad de microorganismos de acuerdo con su temperatura óptima, desde los que pueden sobrevivir a temperaturas muy bajas o los que su temperatura óptima es muy alta. Según este criterio se pueden distinguir cuatro grupos de microorganismos: *Psicrófilos* con temperaturas óptimas bajas (0-10 °C), *Mesófilos*, con temperaturas óptimas moderadas (12-45°C), *Termófilos*, con temperaturas óptimas altas (40-70 °C), *Hipertermófilo*, con elevadas temperaturas óptimas (70-100 °C) (Galvis M. 2009).

En relación con el pH, cada microorganismo tiene un rango dentro del cual se hace posible su crecimiento y normalmente posee un pH óptimo definido. Los microorganismos tienden a crecer en un intervalo limitado de pH y aún dentro de este intervalo frecuentemente cambian su metabolismo como resultado de un cambio de incluso 1 a 1.5 unidades de pH. En general las bacterias crecen en un intervalo de pH de 4 a 8, las levaduras de 3 a 6 y los mohos de 3 a 7. Estos intervalos de pH para el crecimiento se pueden usar ventajosamente durante las fermentaciones para reducir las posibilidades de contaminación (Galvis M. 2009).

En relación con la disponibilidad de agua, todos los organismos la necesitan y la disponibilidad de la misma es un factor importante que en la naturaleza determina el crecimiento de los microorganismos. La disponibilidad del agua no solo es función del contenido presente en el medio, sino que también depende de la concentración de solutos presentes. Esto se debe a que las sustancias disueltas tengan cierta afinidad por el agua que hace que el agua asociada no esté disponible para los microorganismos (Galvis M. 2009).

La disponibilidad del agua se expresa en términos de la actividad acuosa (a_w). El agua difunde desde una región con alta concentración de agua hasta una región con baja concentración de agua y mayor concentración de solutos por el proceso denominado *Ósmosis*. La mayoría de

microorganismos son incapaces de existir en ambientes con actividad de agua muy baja y mueren o se deshidratan pasando a un estado de latencia en tales circunstancias (Galvis M. 2009).

f) Microorganismos en la producción de etanol

La fermentación alcohólica, puede iniciarse espontáneamente o mediante la inoculación de levaduras nativas o comerciales. Generalmente la producción de etanol se realiza utilizando la segunda forma de fermentación, es decir, empleando inóculos a base de cepas seleccionadas para la producción de etanol (López et al., 2009).

Entre los muchos microorganismos que han sido utilizados para la producción de etanol, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la especie de mayor uso. *Zymomonas Mobilis* también se ha estudiado intensamente durante las últimas tres décadas (López et al., 2009).

En los sistemas de fermentación las levaduras requieren como principales nutrientes una fuente de carbono o glucosa. Sin embargo, una alta concentración de éste último sustrato puede inhibir el crecimiento de la levadura y la fermentación como resultado de una elevada presión osmótica. Este efecto puede ocurrir a concentraciones de azúcares fermentables en el rango de 125 y 250 g/l (López et al., 2009).

Las levaduras usualmente presentan su pH óptimo entre 4 y 6, pero pueden crecer en un amplio intervalo de pH, de 2,5 a 8,5. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie mesófila que puede crecer a temperaturas moderadas (20-40°C). A estos niveles de pH y temperatura ocurre la producción de etanol (Mohanty et al., 2009).

En lo que respecta a la contaminación por parte de otros microorganismos en los medios de fermentación, las levaduras presentan un carácter *Killer* que radica en la capacidad que tienen ciertas cepas de sintetizar y secretar una toxina proteica (factor *killer*) que resulta letal para otras cepas

de levaduras, de su mismo género y especie o no, denominadas estas últimas cepas sensibles. Las levaduras productoras del factor *killer* son inmunes a las toxinas que ellas mismas producen (Galvis M. 2009)..

Las toxinas requieren unirse a receptores específicos de la pared celular de sus células blanco para que las mismas resulten sensibles a ellas. De la descripción del fenómeno surgen inmediatamente los potenciales campos de aplicación de estas toxinas: en clínica médica (profilaxis y terapéutica) y en tecnología de los alimentos (conservación, preservación y enología). En el primer caso, en los últimos años se han comenzado a desarrollar estrategias de control de micosis humanas basadas en el uso de dichas “toxinas *killer*” o de anticuerpos desarrollados a partir de ellas. En el segundo caso, estas toxinas *killer* aparecen como una herramienta útil y efectiva en el control de levaduras contaminantes de bodegas que producen defectos graves en los vinos (Galvis M. 2009).

g) Ruta metabólica para la producción de Bioetanol

La producción de etanol está íntimamente ligada con el crecimiento celular lo que significa que la levadura se presenta como un coproducto del proceso de fermentación.

Saccharomyces cerevisiae ha sido uno de los microorganismos más utilizados en la producción de etanol. Esta emplea como ruta metabólica la *Glicólisis* para la fermentación y/o producción de bioetanol. Bajo condiciones anaeróbicas el piruvato es reducido a etanol con la liberación de CO₂. Teóricamente el rendimiento es de 0,511 y 0,489 para etanol y CO₂ respectivamente a partir de un mol de glucosa metabolizada.

De acuerdo con la vía glucolítica que se muestra en la Figura 6, por cada molécula de glucosa se hidrolizan o se gastan dos de ATP y se producen cuatro moléculas de ATP por lo que existe una ganancia de energía de dos ATP. Los últimos son utilizados para conducir la biosíntesis de células de levadura que implica una variedad de biorreacciones que requieren energía (Bai et al., 2007).

Sin el continuo consumo de ATP para el crecimiento de células de levadura la ruta metabólica o glucolítica se ve interrumpida de inmediato debido a la acumulación intracelular de ATP, inhibiendo la acción de la enzima fosfofructoquinasa (PFK) y ejerciendo así una de las tres regulaciones más importantes en la glicólisis. Cuando hay un alto nivel de ATP en la célula, queda disponible considerable energía química para la hidrólisis de ATP, luego la célula no necesita metabolizar glucosa para obtener energía, de modo que la presencia de ATP inhibe la vía glucolítica en este punto (Galvis M. 2009).

Uno de los aspectos más importantes acerca de cualquier vía metabólica se refiere a los puntos donde se ejercita el control o regulación. Las vías pueden dejar de funcionar cuando el organismo no tiene necesidad inmediata de esos productos ahorrando así energía al organismo.

En la glicólisis hay tres reacciones que constituyen puntos de control. La primera es la reacción de la glucosa para producir Glucosa 6-fosfato catalizada por la hexoquinasa; la segunda la producción de fructosa-1,6-bisfosfato, es catalizada por la fosfofructoquinasa y la última es la reacción que permite la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, catalizada por el piruvato quinasa.

Las hexoquinasas presentan características reguladoras, siendo los reguladores uno de los sustratos y dos de los productos de la reacción: ATP, ADP y Glucosa 6- fosfato (G6P) respectivamente. Cuando el consumo de energía es alto el aumento de ADP activa a la hexoquinasa y aumenta la velocidad de movilización de glucosa para ir al mismo paso con la demanda por más ATP. Cuando el consumo de energía declina el nivel intracelular de Glucosa 6-fosfato (G6P) se incrementa en respuesta a una menor demanda de energía.

La elevación del nivel de ATP y G6P inhibe el funcionamiento de la hexoquinasa y disminuye la movilidad de glucosa, dando lugar al primer control de la vía glucolítica (Bohinski, 1987).

El piruvato quinasa es la enzima que cataliza la última reacción o el tercer punto de control de la vía glucolítica. Es una enzima alostérica que se inhibe en presencia de ATP. La conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato se hace más lenta cuando la célula tiene alta concentración de ATP, es decir cuando la célula no tiene gran necesidad de energía en forma de ATP (Campbell, 2007).

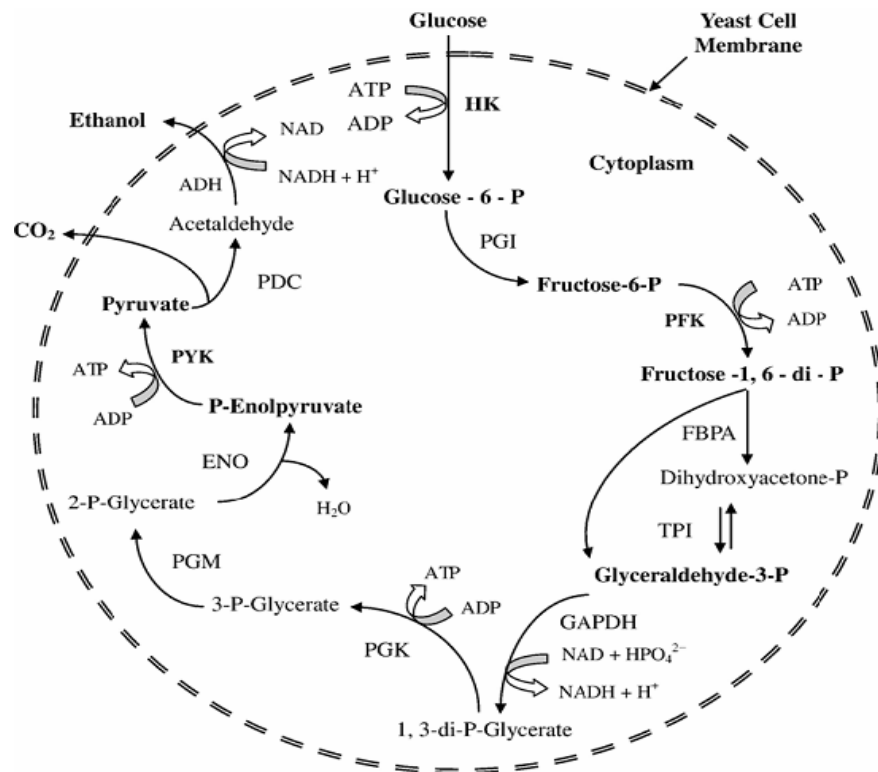


Figura 2. Ruta metabólica para la fermentación y producción de etanol empleando Galvis, M. (2009)

S. cerevisiae. Abreviaturas: HK: Hexoquinasa; PGI: Glucosa fosfato isomerasa; PFK: Fosfofructoquinasa; FBPA: fructosa bifosfato aldolasa; TPI: Triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGM: fosfogliceratomutasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato quinasa; PDC: Piruvato decarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa (Bai et al., 2007).

h) Condiciones adversas para los microorganismos durante la producción de bioetanol

Durante la fermentación alcohólica las células de levadura están expuestas a condiciones adversas o de estrés provocadas por el cambiante medio exterior, algunas hacen referencia al medio ambiente en el que se encuentran las mismas, incluyendo las altas temperaturas, limitaciones de nitrógeno o fuente de carbono, deficiencia de nutrientes y contaminación. La capacidad para tolerar diversas condiciones suele ser uno de los criterios más importantes para la selección de cepas que permitan una eficiente fermentación y producción de etanol (Zhao y Bai, 2009).

Existen condiciones de estrés en el metabolismo celular debido a la acumulación de etanol y su correspondiente inhibición en el crecimiento de las células de levadura.

La membrana citoplasmática es la única barrera existente entre el citoplasma intracelular y el medio exterior. Esta desempeña una importante función ayudando a la célula en su lucha contra los efectos del etanol y de acidez del medio que le rodea. Esta membrana por si sola no es permeable a macromoléculas o iones con excepción de los protones (H^+).

La acumulación de etanol en el medio de fermentación interacciona con el funcionamiento de la membrana plasmática al ser la interfaz entre el medio y la parte interna de la célula.

El principal efecto del etanol es hacer que la membrana permita el paso de protones e inhibir la actividad de la bomba de protones ATPasa, la cual se encarga de mantener la homeóstasis del pH de la célula de levadura. Por lo tanto, las células se encuentran en la obligación de consumir más energía

Para mantener la homeostasis de pH, hasta que el equilibrio entre la entrada pasiva de electrones y su expulsión por la actividad de la bomba de protones ATPasa no puede ser mantenido dando lugar a la muerte de la célula (Galvis M. 2009).

2.2.2 Hidrólisis Ácida

La biomasa lignocelulósica, que viene de la parte estructural de las plantas, puede ser hidrolizada para producir componentes químicos que a su vez pueden ser utilizados como fuentes renovables de carbono para producir biocombustibles y compuestos químicos. En apartados anteriores, se ha estudiado que la biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La ruptura de estos da lugar a la formación de compuestos químicos que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles y compuestos químicos. La celulosa es un polímero de glucosa que puede ser despolimerizado a través de hidrólisis en monómeros, estos se pueden utilizar en una biorrefinería de azúcares para producir combustibles con alta densidad de energía y productos químicos (Morales S., 2015).

El enfoque conceptual para despolimerizar celulosa en monómeros de azúcar es similar a la seguida durante décadas en las refinerías de petróleo convencionales para producir combustibles y productos químicos. Por lo tanto, se cree que, en el futuro, diferentes plataformas de biorrefinería (termoquímica, lípidos y/o bioquímica) puede suministrar biocombustibles renovables y productos bioquímicos para sustituir, al menos en parte, a los obtenidos a partir de recursos fósiles. El desarrollo de los biocombustibles de segunda y tercera generación solo será posible mediante el uso eficiente de la biomasa lignocelulósica y las microalgas para la producción de biocombustibles a gran escala, estas fuentes de biomasa no compiten de forma directa con la producción de alimentos como es el caso de algunos biocombustibles de primera generación hecho de maíz, caña de azúcar y soja. Uno de los cuellos de botella más importantes en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica es la

dificultad de realizar de una manera efectiva y económica en la hidrólisis de la celulosa. Los enlaces β - glicosídicos de las moléculas de azúcar contenidas en la celulosa o lignocelulosa son muy fuertes, además, la celulosa en las materias primas se encuentra formando una estructura de cadenas de celulosa en microfibras, que a su vez están unidas por numerosos puentes de hidrógeno entre ellas, lo que hace que sea muy difícil su hidrólisis. La manera más simple para hidrolizar químicamente la celulosa en glucosa es mediante la utilización de un catalizador ácido. El polímero de celulosa está compuesto por monómeros glucopiranosilo unidos por enlaces β -(1,4) glicosídicos, y estos enlaces se pueden romper en presencia de un catalizador ácido. La hidrólisis de la celulosa catalizada químicamente ha visto varios períodos de renacimiento y de vez en cuando se ha combinado con etapas de fermentación biocatalíticas para convertir azúcares en compuestos químicos secundarios. Industrialmente hablando, el proceso más importante es la hidrólisis con ácidos minerales concentrados o diluidos, predominantemente ácido sulfúrico. Una ventaja de este proceso sobre la hidrólisis enzimática es su alta velocidad de hidrólisis. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de reacción, la glucosa se puede transformar en otras moléculas más pequeñas, disminuyendo así el rendimiento. Además, algunos productos de degradación de la glucosa actúan como los inhibidores frente a transformaciones biológicas de los azúcares obtenidos, como puede ser una etapa de fermentación para obtener etanol. (Morales S, 2015).

La disolución de la celulosa o la biomasa lignocelulósica en líquidos iónicos facilita de una forma extraordinaria la hidrólisis de los biopolímeros (celulosa y hemicelulosa) debido a la eliminación de las barreras de protección estructurales, enlaces de Van der Waals y por puentes de hidrógeno, de los centros de hidrólisis. Así, una vez que se disuelve en líquido iónico, la hidrólisis ácida se produce incluso a temperaturas por debajo de 100 °C. En la Figura N° 3 se muestra la cadena de reacciones de la celulosa catalizada por ácidos. En la primera etapa, la celulosa se hidroliza hacia oligómeros (1,4- β -glucanos) y glucosa. La glucosa no es

suficiente estable en condiciones ácidas y es propensa a sufrir deshidratación hacia 5-hidroximetil furfural (5-HMF) y otros productos diferentes. El 5-HMF a su vez, se puede descomponer en dos moléculas: en ácido levulínico y en ácido fórmico en medios acuosos. Estos compuestos y los azúcares pueden reaccionar formando polímeros indefinidos, llamados húmicos. (Morales S., 2015).

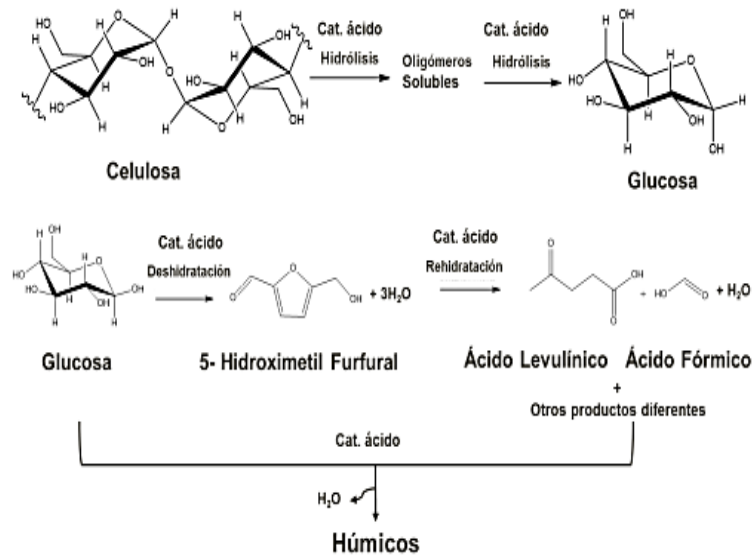


Figura 3. Despolimerización de la Celulosa
Morales S., Madrid (2015)

Sin embargo, cuando se trabaja con biomasa lignocelulósica, uno de los obstáculos más importantes es la necesidad de separar la lignina, que está presente como una cubierta protectora en las células de las plantas y hace que la celulosa y la hemicelulosa sean resistentes a la hidrólisis enzimática. Esta es una de las razones por las que se suelen llevar a cabo procedimientos de tratamiento previos a la hidrólisis ácida, como la disolución en líquidos iónicos, para romper el marco estructural de las plantas y despolimerizar la biomasa lignocelulósica (Morales S., 2015).

2.2.3 Cascarilla de Cebada.

Compuestos principalmente de tres tipos diferentes de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina (Fengel y Wegener, 1984), envueltos en una compleja estructura. Este tipo de materiales son los más abundantes en la naturaleza.



Figura 4. Cascarilla de cebada.
Elaboración propia

a) Celulosa

Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por b-1,4 glicosídicos (Fengely Wegener, 1984), monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cepas de celulosa son “empaquetados” denominados fi brillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrogeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

b) Hemicelulosa

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), azúcar y ácidos, entrelazadas entre si glucosidicamente. Muchas de ellas, en la degradación hidrolítica, dan,

junto a glucosa, manosa, galactosa, etc (Palacio,1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Laureano-Perez *et al.*, 2005).

c) *Lignina*

Heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El Heteropolímero amorfo no es soluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Fengel y Wegener, 1984).

Composición

Las propiedades fisicoquímicas de los subproductos en mención dependen de las condiciones climáticas y del terreno donde se hayan generado. En la tabla 1, se muestran valores promedio reportados en la literatura.

Tabla 1.
Composición promedio en polímeros

Material	%(w/w) BS	%(w/w) BS	%(w/w) BS
Lignocelulósico	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Cascarilla De cebada	25.89-35.5	18.1-21.35	18.20-24.6
Bagazo de Caña	48.81	24.42	25.82
Subproductos de plátano	13.2	14.8	14.00

Sánchez R, Perú (2010)

2.2.4 Bioetanol.

Se define como el etanol generado a partir de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa o en la fracción biodegradable de los residuos. Es un compuesto volátil, inflamable, incoloro, que en

condiciones ambientales se encuentra en estado líquido (Hernández C., 2017), y se puede mezclar con agua y solventes no polares. Es el biocombustible más utilizado actualmente, ya que se combina con gasolina con el fin de aumentar el rendimiento de los vehículos y disminuir la contaminación (Stratta, 2000).

Materias primas para la producción de bioetanol: Carbohidratos

La mayoría de la producción mundial de biocombustible deriva de la caña de azúcar o el maíz, utilizados en Brasil y Estados Unidos respectivamente. Otros cultivos que también se utilizan para producir este bioetanol (Hernández C., 2017), son, la yuca, el arroz, la remolacha azucarera y el trigo. A nivel general, como materia prima para obtener bioetanol, se puede utilizar cualquier material que contenga hidratos de carbono fermentables. Por ello es preciso comentar los diferentes tipos de carbohidratos (Hernández C., 2017).

¿Qué son los carbohidratos?

Los carbohidratos son compuestos esenciales de los organismos vivos y son la clase más abundante de moléculas biológicas cuya composición química es $(CH_2O)_n$, donde n es mayor o igual a 3. Desde el punto de vista químico se diferencian (Hernández C., 2017):

Aldehídos o polihidroxialdehidos: cadenas de carbono que contienen un grupo aldehído y varios grupos hidroxilos (Hernández C., 2017).

Cetonas o polihidroxicetonas: cadenas de carbono que contienen un grupo cetónico y varios grupos hidroxilos (Hernández C., 2017). (Fig. 5).

Productos derivados de aldehídos y cetonas por oxidación, reducción, sustitución o polimerización.

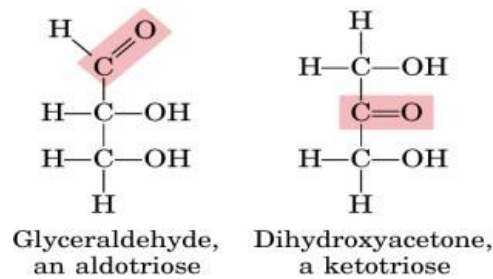


Figura 5. Estructura básica de los carbohidratos. Polihidroxialdehído y polihidroxiacetona.

Hernández C., España (2017)

Tienen una amplia diversidad de funciones biológicas, como fuentes de energía, elementos estructurales y como precursores de la producción de otras biomoléculas (Hernández C., 2017).

Tipos de carbohidratos

Según el número de unidades de azúcares sencillos que contengan, se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacárido (Hernández C., 2017).

a) Monosacáridos

Son azúcares no hidrolizables puesto que son las unidades más pequeñas y son moléculas cristalizables, solubles en agua y directamente fermentables (Hernández C., 2017).

Ejemplos de monosacáridos son la glucosa y la fructosa (Fig. 6).

Atendiendo a la naturaleza química del grupo funcional carbonílico recibe el nombre de aldosa, si éste es aldehído, y si es cetónico se le designa como cetosa. Dependiendo del número de átomos de carbono se denominan (Hernández C., 2017): cuando tienen tres carbonos son triosas; cuando tienen cuatro, tetrasas; cuando tienen cinco carbonos, pentosas; y así sucesivamente hasta los monosacáridos de ocho carbonos. Los más abundantes en las células son las pentosas y las hexosas. Estos últimos tienen la capacidad de formar estructuras de anillo muy estables (Hernández C, España, 2017).

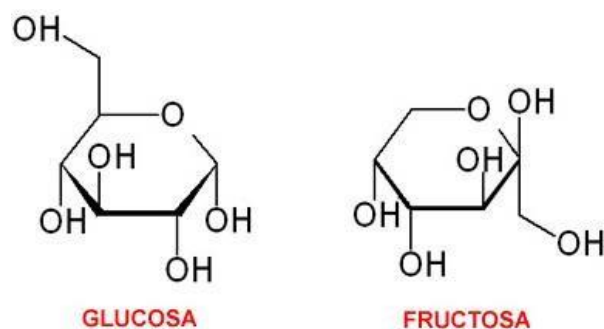


Figura 6. Estructura de la glucosa y la fructosa.
Hernández C., España (2017)

b) Disacáridos

Son moléculas formadas por dos monosacáridos, iguales o diferentes, unidos mediante un enlace glucosídico. Debido a que el grupo hidroxilo anomérico potencialmente puede estar en configuración alfa o beta, pueden formarse dos disacáridos posibles cuando se unen dos moléculas de azúcar: $\alpha(1,4)$ o $\beta(1,4)$. Este aspecto es muy importante si se analizan sus propiedades reductoras, como veremos a continuación (Hernández C., España, 2017).

Ejemplos de disacáridos son la sacarosa y la lactosa (Fig. 7).

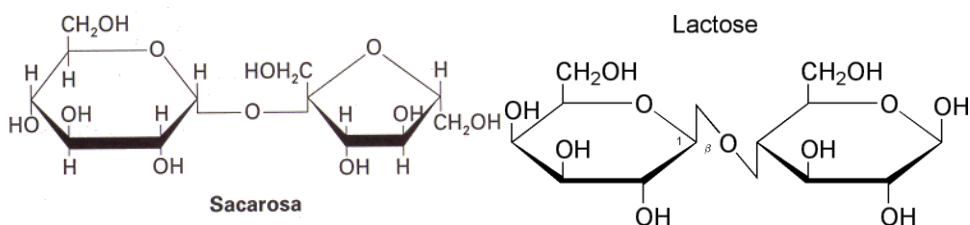


Figura 7. Estructura de la sacarosa y la lactosa.
Hernández C., España (2017)

c) Polisacáridos

Están formados por grandes cantidades de monosacáridos conectados por enlaces glucosídicos. Los más pequeños, llamados oligosacáridos, contienen hasta unos 10 o 15 monosacáridos. Los polisacáridos pueden tener estructura lineal o ramificada. Pueden dividirse en dos clases: homoglicanos, formados por un solo tipo de monosacáridos, y

heteroglucanos, que contienen dos o más tipos de monosacáridos (Hernández C, España, 2017)

El almidón (Fig. 8) y la celulosa son algunos de los polisacáridos más comunes.

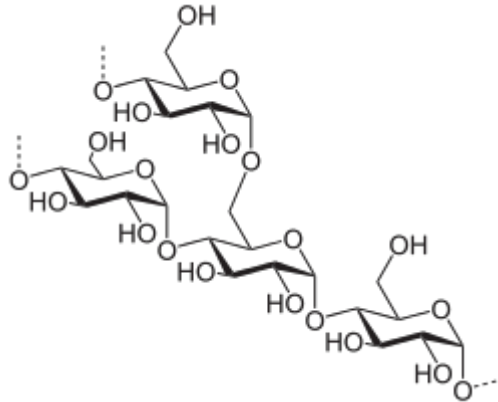


Figura 8. Estructura del almidón.
Hernández C, España (2017)

Para que los azúcares sean directamente fermentables, deben de poseer un carácter reductor. Los azúcares reductores son aquellos cuyo grupo funcional no está involucrado en la unión de dos monosacáridos y por tanto conservan el carácter reductor de la molécula (Hernández C., 2017), como se observa en la Fig. 9.

Los monosacáridos y los disacáridos, a excepción de la sacarosa, poseen su grupo carbonilo intacto y a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas en procesos de fermentación. Los polisacáridos como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, tienen el grupo carbonilo involucrado en el enlace de los distintos monosacáridos para la formación de la molécula y por tanto pierden el carácter reductor (Hernández C., 2017).

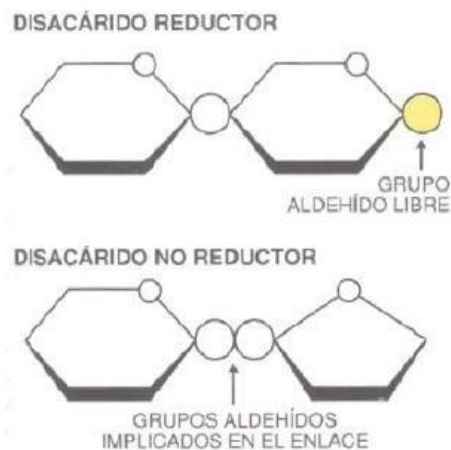


Figura 9. Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores.

Hernández C, España (2017)

2.3 Conceptual

En la actualidad, la biomasa lignocelulósica y en especial los subproductos agroindustriales han dejado de ser productos de desecho – problema, para transformarse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, convirtiendo de esta manera a la producción de alcohol carburante en uno de los más importantes. No obstante, han sido muchos los problemas que se han presentado en torno a la obtención de etanol a partir de este tipo de materiales de estructura lignocelulósica.

Debido a estos problemas, ha surgido una gran diversidad investigaciones, que engloban distintas problemáticas y proponen grandes alternativas de solución que poco a poco han abierto el camino hacia el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de alcohol.

Producir bioetanol a partir de residuos agroindustriales es una alternativa valiosa. La cascarilla de arroz y el aserrín de algarrobo podrían ser aprovechados también como materia prima para la producción de bioetanol combustible. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue la obtención de bioetanol a partir de los residuos lignocelulósicos a través de un proceso de hidrólisis ácida, seguido de un proceso de fermentación

alcohólica. Así como la cascarilla de arroz, la cascarilla de cebada es considerada un desecho, sin embargo, este residuo posee una considerable cantidad de biomasa lignocelulósica el cual puede ser aprovechado como materia prima para la producción de bioetanol.

En investigaciones revisadas para el tratamiento previo a la fermentación, se encuentra evidencia bibliográfica en la cual se propone que la biomasa sea sometida a pretratamientos, donde la hidrólisis ácida es uno de los más utilizados.

La fermentación es el procedimiento fundamental para la obtención del bioetanol. Donde según la bibliografía revisada, sugieren que la temperatura y tiempo de fermentación, así como el tipo de levadura utilizada son de gran relevancia al producir el bioetanol.

Para el desarrollo del presente trabajo se considera como parámetros fundamentales el tiempo de fermentación, así como la temperatura en la que se realiza la fermentación.

2.4 Definición de términos básicos

- **Bioetanol.** Es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o biomasa (<http://www.plantasdebiomasa.net/bioetan.html>).
- **Cascarilla de cebada.** Se llama cascarilla a la capa que protege al grano, y está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, Se forma durante el desarrollo del grano y comprende a palea que lo cubre y el lema que lo envuelve (Rojas L. 2018).
- **Celulosa.** La celulosa en una planta se compone de piezas con una estructura cristalina (Cortes W. 2011).
- **Fermentación.** La Fermentación alcohólica. Denominada también como fermentación del etanol o fermentación etílica, es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras, mohos y algunas clases de bacterias, que producen cambios químicos en las sustancias orgánicas (Galvis M. 2009).

- **Glucosa.** La glucosa es un monosacárido, un tipo de azúcar simple, de color blanco, cristalina, soluble en agua y muy poco en el alcohol, que se halla en las células de muchos frutos, miel, sangre y líquidos tisulares de animales (Tillery, Bill W.2001).
- **Hemicelulosa.** La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en polímeros de diferentes azúcares como xilosa y arabinosa (pentosas), manosa, glucosa y galactosa (hexosas) y ácidos de azúcar. E. (Cortes W. 2011).
- **Hidrolisis ácida.** Es una forma de pretratamiento la cual permite principalmente dos cosas. Primero desordenar la estructura celular del material para dejar expuesta la celulosa con el objetivo de facilitar la acción de los ácidos en el proceso de la hidrolisis. Segundo, hidrolizar la hemicelulosa hasta glucosa y xilosa principalmente (Morales S. 2015).
- **IBM SPSS Statistics 25:** Programa informativo estadístico. Es uno de los programas estadísticos más conocidos teniendo en cuenta su capacidad para trabajar con grandes bases de datos y una sencilla interfaz para la mayoría de los análisis. Contiene una amplia biblioteca de algoritmos de aprendizaje automático, análisis de texto, extensibilidad de código abierto, integración con big data e implementación sin inconvenientes en las aplicaciones (Pérez W. 2019).
- **Lignina.** Es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. El objetivo principal de la lignina es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad, y la resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Cortes W. 2011).
- **Material lignocelulósico.** El material lignocelulósico consiste en tres tipos diferentes de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa está compuesta por subunidades de D-glucosa unidas por un enlace glucosídico β 1-4 (Cortes W. 2011).

- **Saccharomyces cerevisiae.** Es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (Chicas, M.2003).

III. HIPOTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis General

- Si determinamos las condiciones óptimas de operación (concentración, temperatura y tiempo) en el proceso de hidrólisis ácida y fermentación se obtendrá bioetanol con el grado de pureza más alta para esta investigación.

3.1.2 Hipótesis Específicas

- Mediante la variación de concentración de ácido se determina la temperatura y el tiempo óptimo para la hidrólisis, en donde se obtiene la mayor concentración de azúcares fermentables.
- Mediante la variación de concentración de levadura se determina la temperatura y el tiempo óptimo para la fermentación, en donde se obtiene la menor concentración de azúcares fermentables.

3.2 Definición conceptual de variables

✓ Variables de la Investigación Independientes

X1: Parámetros óptimos de hidrólisis ácida.

X2: Parámetros óptimos de fermentación.

✓ Variables de la Investigación Dependientes

Y=F(X): Obtención de bioetanol a partir de cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación.

3.2.1 Operacionalización de Variables

Tabla 2.
Operacionalización de Variables.

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODOS
VARIABLE INDEPENDIENTE			
X ₁ : Parámetros óptimos de hidrolisis	-Físicos -Químicos	- Masa cascarilla /volumen solución. - Temperatura de Hidrolisis. - Tiempo hidrolisis. - Concentración de ácido para Hidrolisis. - Concentración de Glucosa formada en la Hidrolisis.	- Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible. - Revisión de publicaciones. -
X ₂ : Parámetros óptimos de fermentación.	-Físicos. -Químicos. -Biológicos.	- PH de Fermentación. - Concentración de levadura. - Temperatura de Fermentación. - Tiempo de Fermentación. - Concentración de Azucares fermentables residuos de la fermentación.	Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible
VARIABLES DEPENDIENTES			
F(x)=Obtención de Bioetanol a partir de cascarilla de cebada mediante hidrolisis acida y fermentación.	-Grado de etanol. -Características Físicoquímicas.	-Concentración final de etanol. -Densidad. -Color. -T° de ebullición.	-Refractometría -Picnómetro. -Visual. -Revisión de publicaciones.

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo y diseño de investigación

4.1.1 Tipo de investigación

La presente investigación se tipifica:

- a. **Por la naturaleza** del procedimiento es de tipo tecnológica y aplicada, puesto que aplica los conocimientos científicos para resolver los problemas industriales, obtención de etanol a partir de la hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada;
- b. **Por el nivel de investigación** (diseño interpretativo) es experimental porque es exploratorio utiliza la observación para la recolección de datos en el desarrollo de la investigación;
- c. **Por el análisis de las variables** estas son cuantitativas porque son medibles y de razón (concentración, pH, temperatura, tiempo, etc.).
- d. **Por el espacio** se localiza la procedencia de la muestra (cascarilla de cebada) y temporal es transversal debido a que el proceso del desarrollo de la investigación es simultáneo y paralelo.

4.1.2 Diseño experimental

En el diseño de la presente investigación se ha considerado tres etapas las cuales se presenta en la tabla 3.

Tabla 3.
Diseño de la investigación

<h1 style="text-align: center;">TESIS PLANTEADA</h1>		
<p>1° ETAPA DE LA INVESTIGACION Determinar X1 Metodos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible. 	<p>2° ETAPA DE LA INVESTIGACION Determinar X2 Metodos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Revision de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible. 	<p>3° ETAPA DE LA INVESTIGACION Determinar F(x) Metodos</p> <ul style="list-style-type: none"> -Refractómetro. - Picnometro. - Revision de publicaciones.

Elaboración propia.

4.2 Método de Investigación

4.2.1 Metodología para determinar parámetros óptimos de hidrolisis acida de cascarilla de cebada.

- a. **Relación acido - cascarilla de cebada**, Se determinó a partir de revisión de la publicación.

López Infante Michael, García Cruz Ariel (2012, México) en *Cinética del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto del árbol moringa oleífera, para el cálculo de los parámetros de un reactor.*

b. Temperatura de hidrolisis, Se determinó a partir de revisión de las publicaciones.

Domínguez María Magdalena (2011, Colombia). *Estudio de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores* y López Infante Michael, García Cruz Ariel (2012, México) en *Cinética del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto del árbol moringa oleífera, para el cálculo de los parámetros de un reactor.*

c. Tiempo de Hidrolisis, Se determinó a partir de revisión de las publicaciones.

López Infante Michael, García Cruz Ariel (2012, México) en *Cinética del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto del árbol moringa oleífera, para el cálculo de los parámetros de un reactor.*

d. Concentración de ácido, Se determinó a partir de la revisión de la publicación.

Candler C., Villalobos Nercy, (2012, Venezuela) en *Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables.*

e. Concentración de glucosa o azúcares fermentables,

La cuantificación de azúcares fermentables se realizó según el método de MILLER, G. (1959). *Uso de reactivo de ácido dinitrosalicílico para la determinación de la reducción de azúcar.* *Anal. Quim.* 31: 426-428.

4.2.2 Metodología para determinar parámetros óptimos de la fermentación del hidrolizado.

a. Concentración de levadura, Se determinó a partir de la revisión de la publicación.

M.Ballesteros, J.M. Oliva, P. Manzanares, (2003, Madrid) *Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875.*

b. Temperatura de Fermentación, Se determinó a partir de la revisión de la publicación.

Aurora, E., Barrera, E. (2015, Perú) en *Obtención de bioetanol a partir de los residuos fermentables de mango y determinación de parámetros óptimos de destilación.*

c. PH de fermentación, Se determinó a partir de la revisión de la publicación.

Zola M., Barranzuela M., Girón C., Guerrero D., (2017, Perú) en *Estudio experimental de la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de plátano en Piura.*

d. Tiempo de fermentación, Se determinó a partir de la revisión de la publicación.

P. Dagnino, Ester R. Chamorro, Fernando E. Felissia, María C. (2014, Colombia). en *Obtención de bioetanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo.*

e. Concentración de glucosa o azúcares fermentables,

La cuantificación de azúcares fermentables se realizó según el método de MILLER, G. (1959). *Uso de reactivo de ácido dinitrosalicílico para la determinación de la reducción de azúcar. Anal. Quim. 31: 426-428.*

4.2.3 Determinación de concentración final de etanol

Para la determinación final de la concentración de etanol se utilizó el método de refractómetro descrito en Olsen D. (1990, España) *Métodos ópticos de análisis*.

4.2.4 Determinación de características fisicoquímicos de etanol obtenido

Densidad, se determinó mediante el método del picnómetro descrito en el artículo de la universidad politécnica de valencia en *Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro*.

Color, Se determinó visualmente

Temperatura de ebullición, Se determinó usando como referencia la tabla 5.7 del manual del ingeniero químico *punto de ebullición de soluciones de alcohol etílico y agua*.

4.3 Población y muestra

Se usa como población La cascarilla de cebada como desecho de las cosechas de Cebada de 10 hectáreas del Departamento de Ancash (Provincia Antonio Raymondi).

Para efectos del desarrollo de la presente investigación se toma muestra de 250 gr de cascarilla de cebada.

4.4 Lugar de estudio y periodo desarrollado

El lugar de estudio de las etapas de investigación (Hidrolisis acida y fermentación) se realizó en el laboratorio de la Universidad Nacional del Callao, la parte de las lecturas espectrofotométricas y el resto de análisis se realizaron en las instalaciones de la empresa "ANOBA soluciones analíticas y consultaría."

En cuanto al periodo de desarrollo de la presente investigación se realizó en el periodo enero-julio de 2019, cabe mencionar que ya se venía haciendo pruebas con respecto al tema de investigación desde el año 2016.

4.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de información

4.5.1 Instrumentos de recolección de datos

a. Equipos

- Espectrofotómetro uv-visible.
- Refractómetro.
- Reactor de Vidrio.
- Plancha eléctrica.
- Potenciómetro (rango 1-14).
- Termómetro (rango 0-200°C).
- Balanza analítica (sensibilidad: 0.1mg).
- Picnómetro.
- Equipo de destilación.
- Equipo de baño maría.

b. Insumos y reactivos Químicos

- Ácido sulfúrico 98%
- Soda caustica en perlas
- Reactivo DNS
- Agua destilada
- Levadura (*saccharomyces cerevisiae*)
- Glucosa
- Etanol.

c. Materiales

- Fiolas (1L, 0.5L Y 100 ml)
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Vaso precipitado
- Probetas

4.5.2 Procedimiento para determinar parámetros óptimos de la hidrólisis ácida.

a) Pretratamiento de la muestra para la obtención de alcohol a partir de la hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada.

- ✓ Molienda de cebada en un molino industrial.
- ✓ Tamizado de la muestra de cebada.
- ✓ Secado de la cáscara de cebada.



Figura 10. Pre-tratamiento de la cascarilla de cebada
Elaboración propia

b) Tratamiento: Método hidrólisis ácida

En esta etapa se adiciona la muestra pretratada (secada) al reactor (250 gr) seguidamente el ácido sulfúrico (2500 ml) a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%) luego se procede a hidrolizar a diferentes temperaturas (100 y 110°C) a la vez variando los tiempos (180, 210 y 240 min) posterior mente evaluar la cantidad de azúcares fermentables obtenido en cada caso

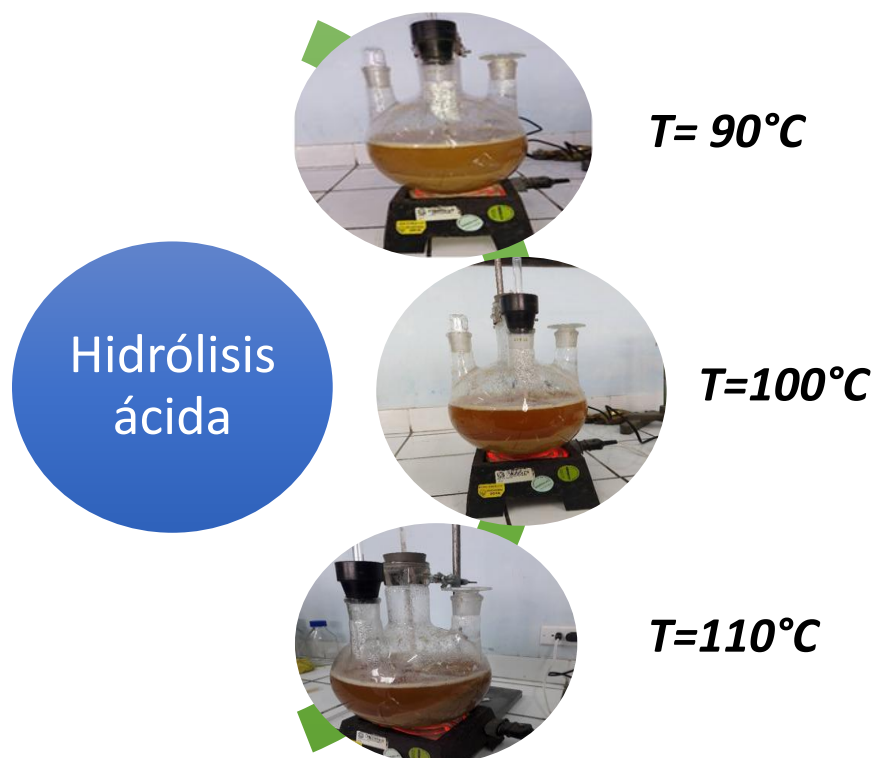


Figura 11. Hidrólisis ácida
Elaboración propia

c) Cuantificación de azúcares fermentables

La concentración de azúcares reductores se determina utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L, utilizando glucosa como estándar. A estas soluciones se les aplicó el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de

ellas en un espectrofotómetro (Genesys 10vis) a una longitud de onda 540 nm. Una vez construida la curva patrón se aplicó el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezclaron 0,5 mL de cada una con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se reconstruyeron las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada.

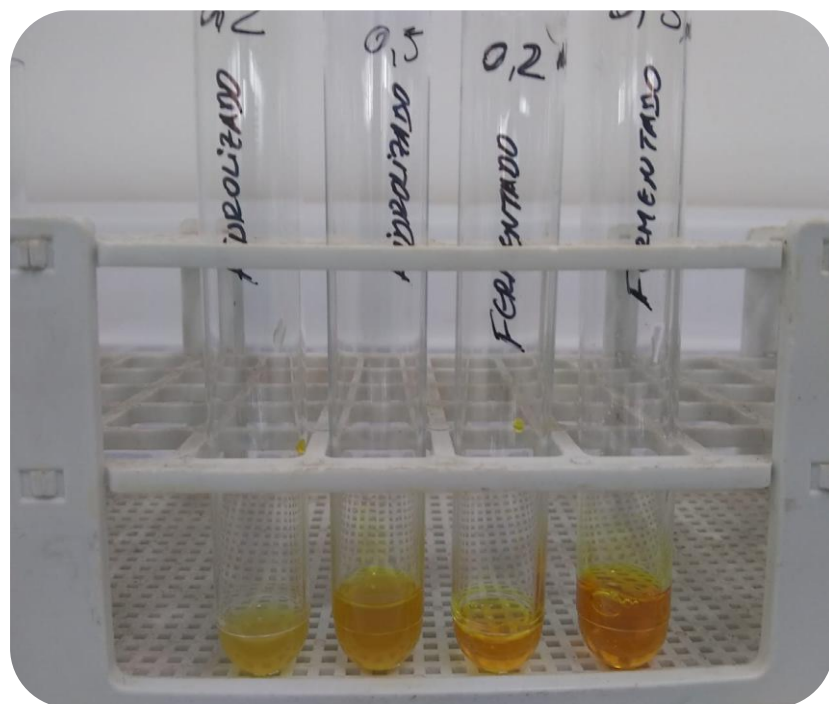


Figura 12. Muestras más reactivo DNS.
Elaboración propia

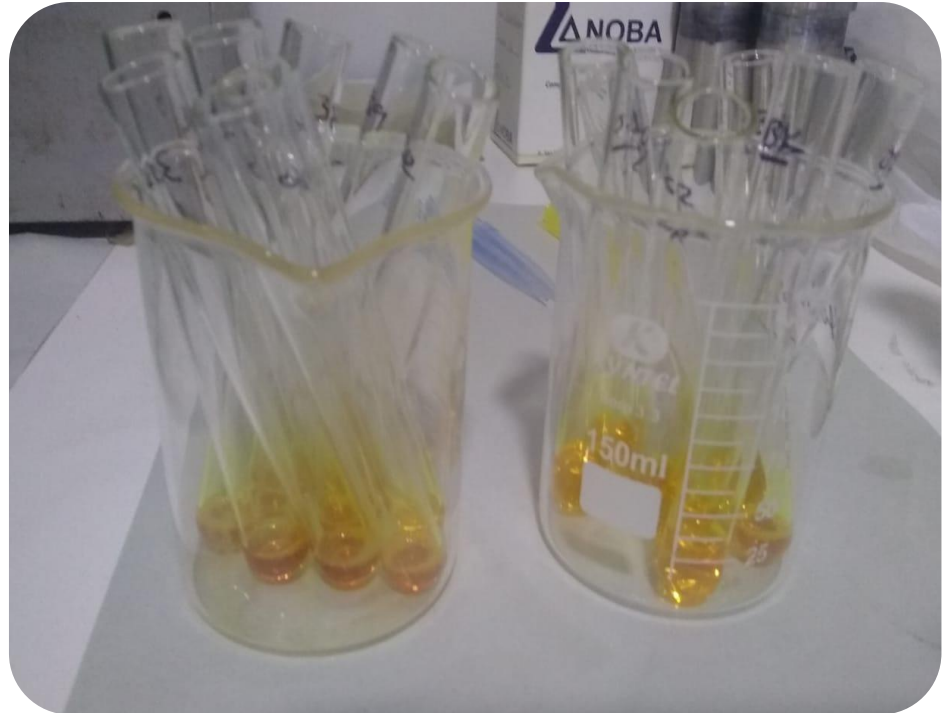


Figura 13. Muestras en baño María
Elaboración propia

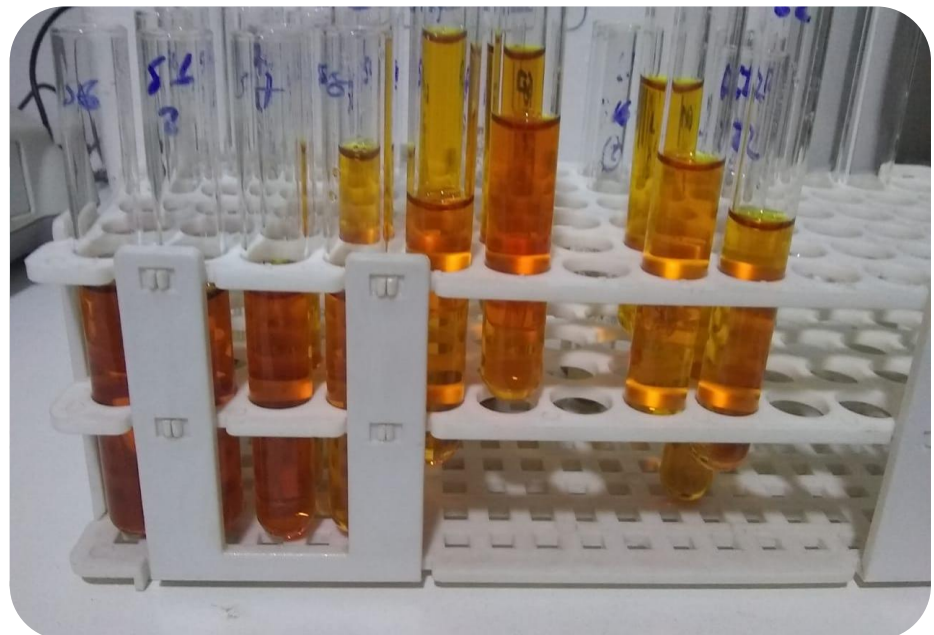


Figura 14. Muestras enrazadas a 5 ml para la lectura en el espectrofotómetro.
Elaboración propia



Figura 15. Lectura de muestras por espectrofotometría
Elaboración propia

4.5.3 Procedimiento para determinar los parámetros óptimos de fermentación.

a) Regular el PH

El hidrolizado con mayor cantidad de azúcares fermentables es tomado para el proceso de fermentación para lo cual se necesita regular el PH ya que inicialmente se encuentra a un pH de 2.0 el cual no es óptimo y se elevara a 4.8 para poder fermentar.

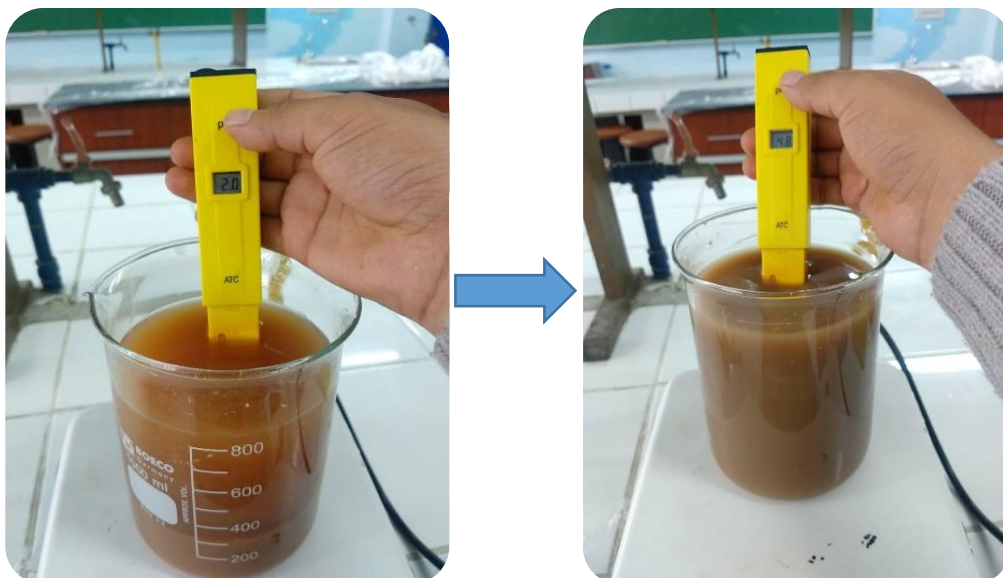


Figura 16. Regulación de pH
Elaboración propia

b) Fermentación.

Seguidamente se procede a activar la levadura (5, 10 y 15 g/L) para su adicción a la muestra hidrolizada.

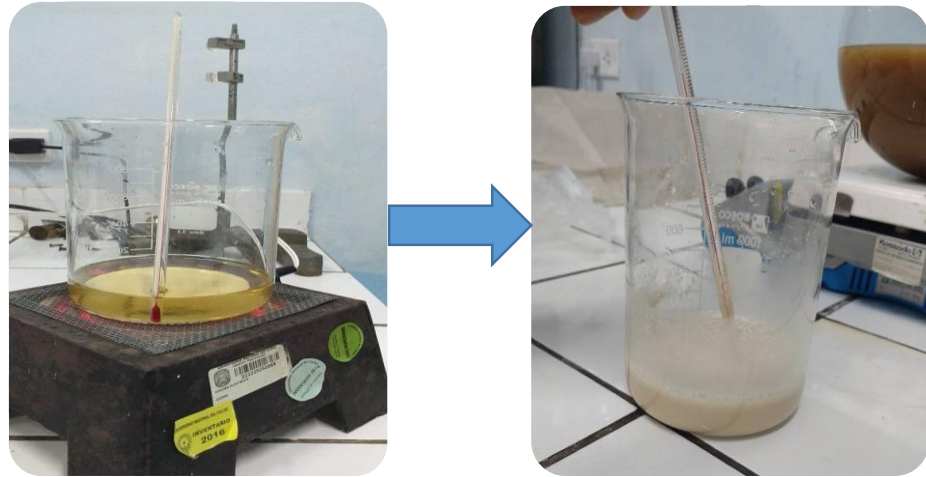


Figura 17. Activación de la levadura
Elaboración propia

Luego se procede a agregar la levadura activada a la muestra hidrolizada para entrar al proceso de fermentación a diferentes tiempos y temperaturas.

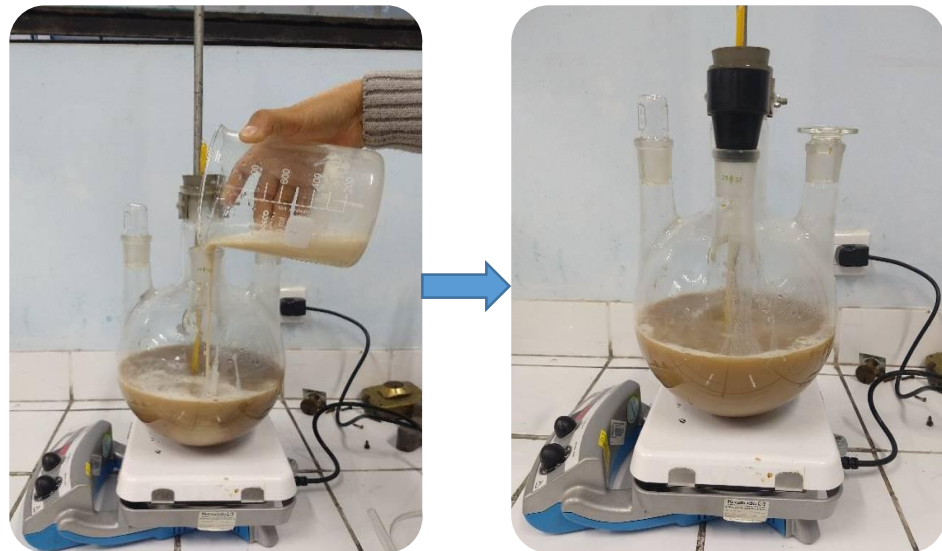


Figura 18. Fermentación.
Elaboración propia

c) Lectura de azúcares fermentables.

Una vez fermentada las muestras se procede a tomar lectura de azúcares fermentables como residuo de la fermentación usando el mismo método de las muestras hidrolizadas.



Figura 19. Lectura del azúcares fermentables.
Elaboración propia

4.5.4 Procedimiento para determinar grado de pureza de etanol obtenido.

Se toma 100 ml de muestra fermentado con menor cantidad de azúcares fermentables y se procede a Destilar con un equipo de destilación simple desde el inicio de destilación de etanol hasta llegar al punto de ebullición del agua y así asegurar que todo el etanol se ha destilado.



Figura 20. Destilación de la muestra.
Elaboración propia



Figura 21. Muestra destilada
Elaboración propia

Una vez finalizada la destilación en una probeta de 100 ml se enraza con agua hasta 100 ml.

Se procese hacer la lectura en el refractómetro para ello se prepararon soluciones de etanol de concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% con un volumen de 10 ml, y a cada una de estas se le midió el índice de refracción, así como a la muestra obtenida.

4.5.5 Procedimiento para determinar las características fisicoquímicas del etanol obtenido.

a. Densidad Para determinar la densidad de un líquido con el método del picnómetro, solamente se necesita la masa del mismo en tres situaciones diferentes. Todas las masas deben determinarse en balanza analítica y con la tapa.

1. Pesar el picnómetro vacío y anotar su masa (m_p).

2. Enrasar el picnómetro con agua (fluido de referencia) y anotar su masa (m_{p+w}). Enrasar el picnómetro significa llenarlo completamente, evitando la formación de burbujas en su interior. Al cerrarlo, el nivel de agua subirá por el capilar y ésta rebosará, quedando el capilar también lleno de agua. Una vez el agua haya

rebosado, habrá que secar el picnómetro por fuera antes de pesarlo.

3. Enrasar el picnómetro con disolución (líquido cuya densidad queremos hallar) y anotar su masa (mp+s). Se seguirá el mismo procedimiento y se tendrán las mismas precauciones que al enrasar el picnómetro con agua.

b. Color, Se determina visualmente

c. Temperatura de ebullición, Se determinó en la siguiente grafica interpolando con el porcentaje de etanol obtenido en la muestra.

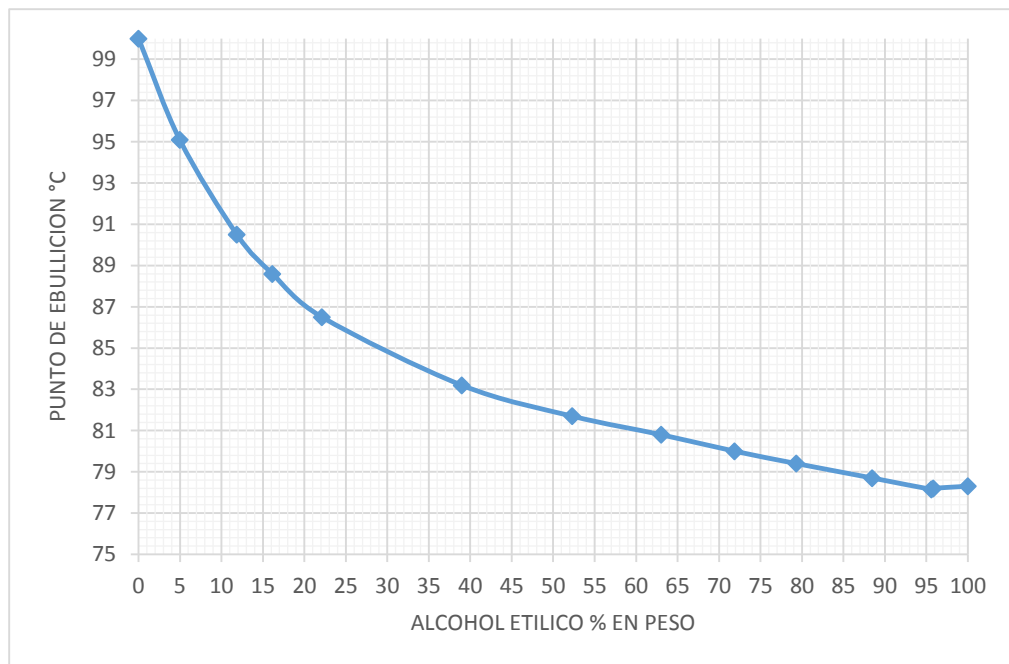


Figura 22. Puntos de ebullición de soluciones de alcohol etílico y agua a 20°C
Perry J. sexta edición (2001)

4.6 Análisis y procesamiento de datos.

4.6.1 Procesamiento estadístico

Debido a que la investigación contiene variables cuantitativas para el procesamiento de datos obtenidos se usó el software Excel y IBM SPSS Statistics 25,

4.6.2 Análisis de Datos

Para encontrar resultados y cumplir con los objetivos de la presente investigación se planteó el uso de la estadística descriptiva e inferencial. De acuerdo con el tipo de variables se tomará en cuenta el tipo de análisis a seguir conociendo las características de cada variable, como se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 4.
Análisis de variables

N de variables	Variables	Notación	Tipo de variable
1	Parámetros óptimos de la hidrolisis acida de la cascarilla de cebada	X1	Cuantitativo
2	Parámetros óptimos de la fermentación del hidrolizado	X2	Cuantitativo
3	Porcentaje de etanol obtenido y características fisicoquímicas	F(X)	Cuantitativo

Elaboración propia

V. RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos

5.1.1 Resultado de los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de cascarilla de cebada

Curva patrón de glucosa.

Tabla 5.
Curva patrón de glucosa

g/L	A
0.5	0.52
1	1.071
1.5	1.566
2	1.987

Elaboración propia

Se prepara la curva patrón de glucosa para hacer la lectura de las muestras hidrolizadas y fermentadas.

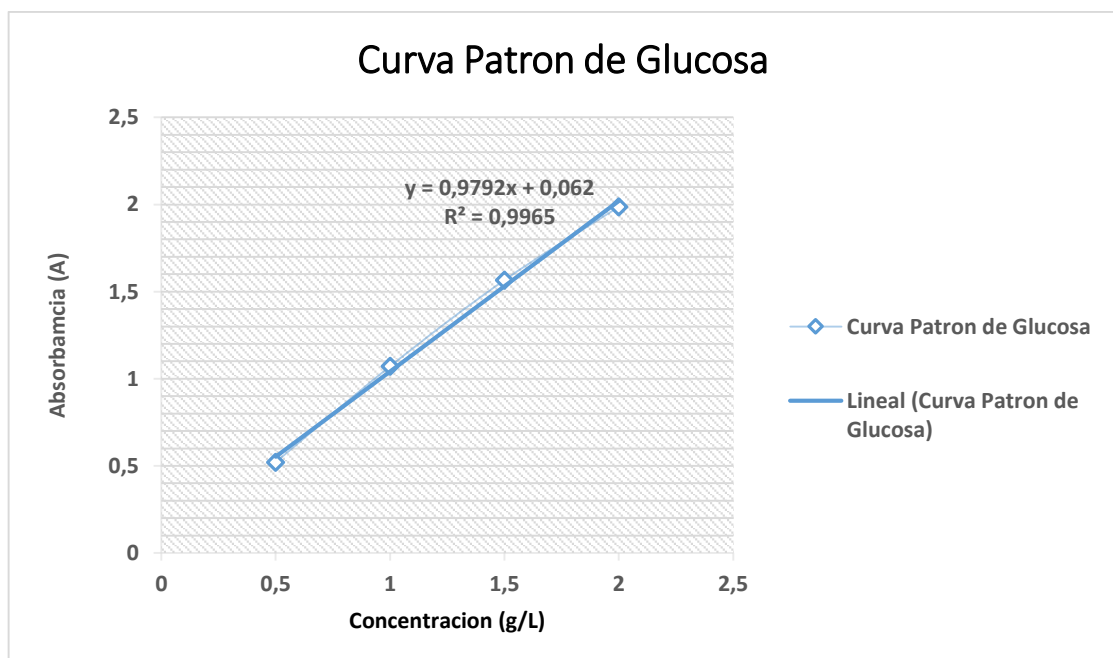


Figura 23. Curva patrón de glucosa
Elaboración propia

Tabla 6.
Resultados del proceso de hidrólisis

CONCENTRACIÓN DE ACIDO (%p/p)	0.5%		1.0%		1.5%	
TEMPERATURA (°C)	100	110	100	110	100	110
TIEMPO (MIN)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/L)					
180	1.54	4.83	8.30	10.40	7.43	6.23
210	4.26	6.63	9.63	12.26	8.64	6.30
240	5.24	7.26	10.15	11.30	9.42	7.28

Elaboración propia

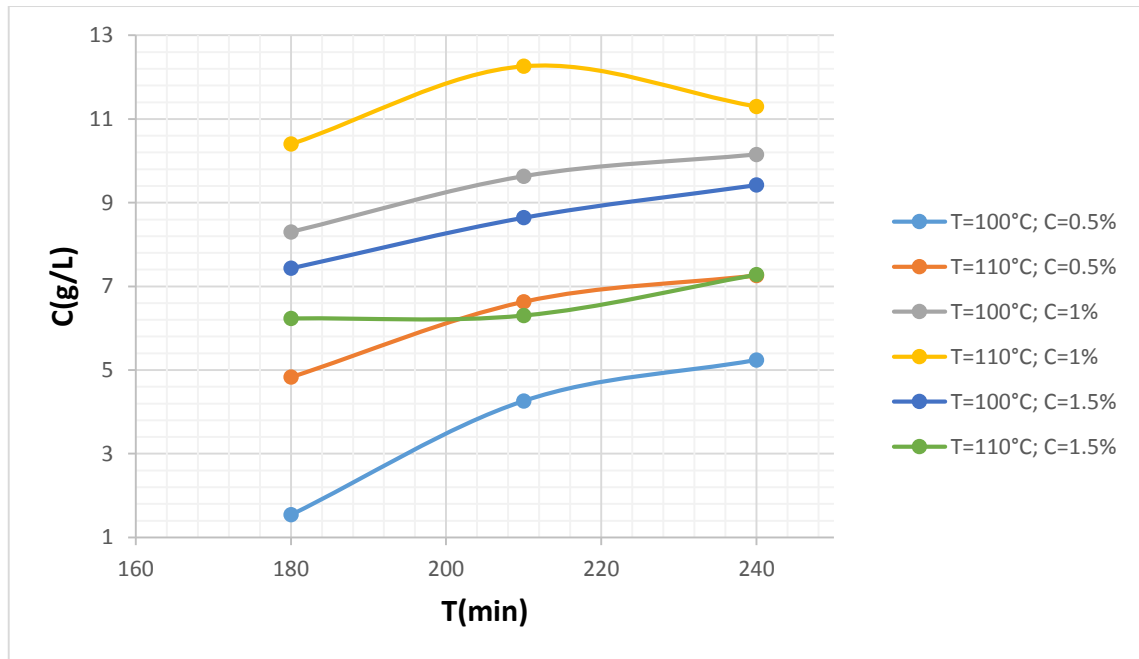


Figura 24. Concentración de azúcares fermentables luego de la hidrólisis
Elaboración propia

5.1.2 Resultado de los parámetros óptimos de Fermentación de hidrolizado

Tabla 7.
Resultados del proceso de fermentación

CONCENTRACIÓN DE LEVADURA (g/L)	5		10		15	
TEMPERATURA (°C)	20	25	20	25	20	25
TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/L)					
36	9.32	8.62	6.42	5.62	7.28	6.04
48	8.56	6.62	4.54	3.62	6.64	5.82
60	6.58	6.10	4.32	4.02	5.64	5.33

Elaboración propia

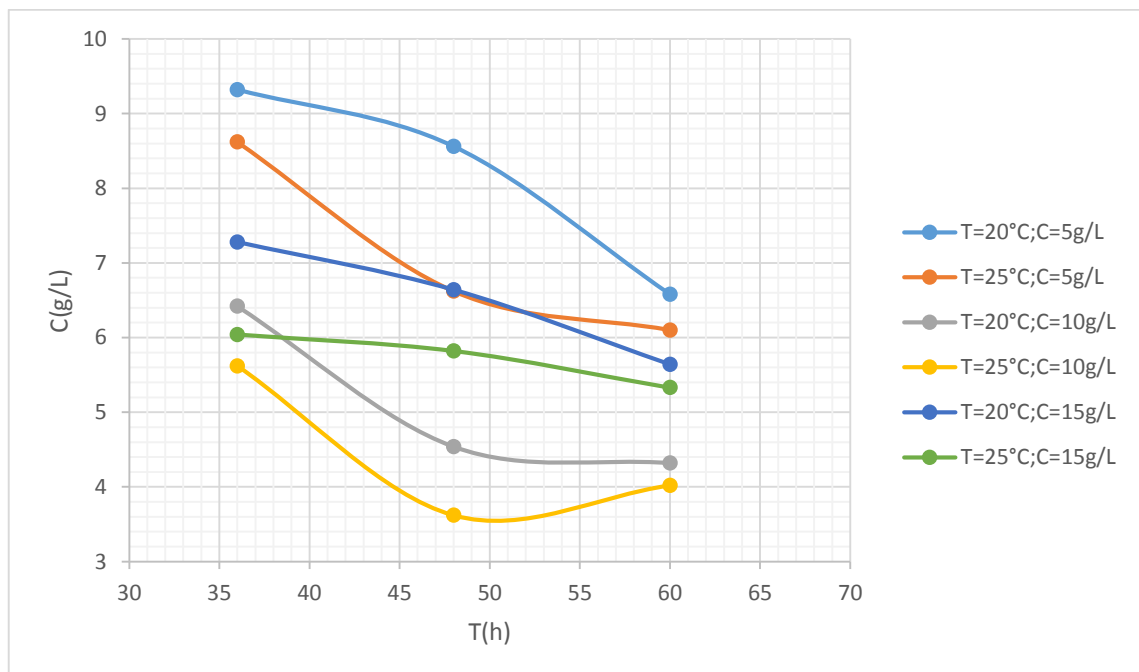


Figura 25. Concentración de azúcares fermentables luego de la fermentación
Elaboración propia

5.1.3 Resultado del % de pureza de etanol obtenido

Tabla 8.
Curva patrón de etanol

Concentración (%)	IR (ND)
0	1.333
10	1.337
20	1.3425
30	1.348
40	1.3535
50	1.357
60	1.3598
70	1.3617
80	1.3629
90	1.364
100	1.362

Elaboración propia

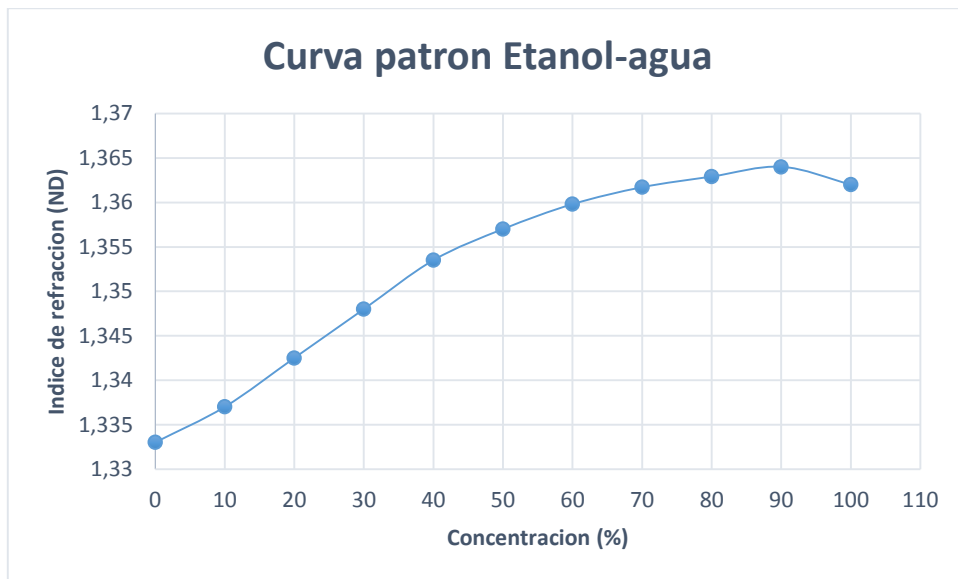


Figura 26. Curva patrón etanol-agua
Elaboración propia

El índice de refracción de la muestra es 1.348 esto es resultado de una **concentración de etanol a 30%**.

5.1.4 Resultado de las Características fisicoquímicos del etanol obtenido

- a. **Densidad:** Masas de las soluciones de etanol a diferentes concentraciones utilizando el picnómetro.

$$m_w = 9.7354 \text{ g a } 20^\circ \text{ C}$$

Tabla 9.

Densidad relativa de etanol a diferentes concentraciones

Concentración de etanol (%)	mp (g)	Mps (g)	ms (g)	densidad relativa
10	18.5794	28.155	9.5756	0.9835
30	18.5726	27.9185	9.3459	0.9599
50	18.586	27.6701	9.0841	0.9330
70	18.5654	27.1739	8.6085	0.8842
90	18.575	26.6109	8.0359	0.8254
Muestra	18.5730	27.9081	9.3351	0.9589

Elaboración propia.

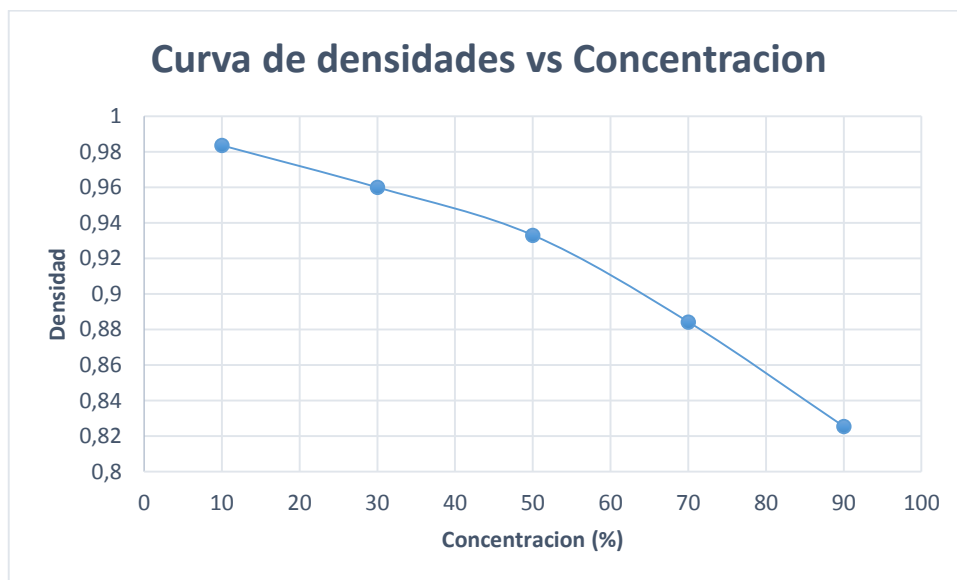


Figura 27. Curva de densidad relativa vs concentración
Elaboración propia

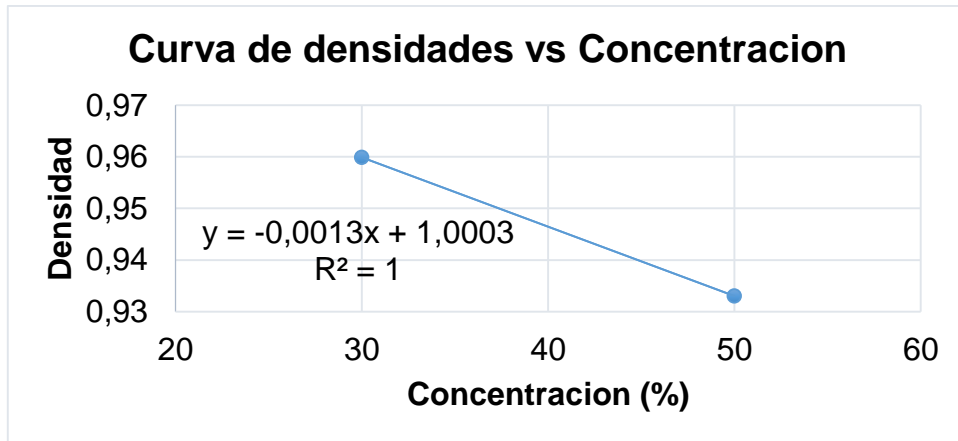


Figura 28. Correlación entre el segundo y tercer punto.
Elaboración propia

Usando la regresión la Concentración de etanol igual a 31.85%.

b. Color, se determinó visualmente la coloración luego de la fermentación es de color beige oscuro, luego de la destilación es de apariencia incolora.

c. Temperatura de ebullición, Se determinó interpolando en la siguiente gráfica.

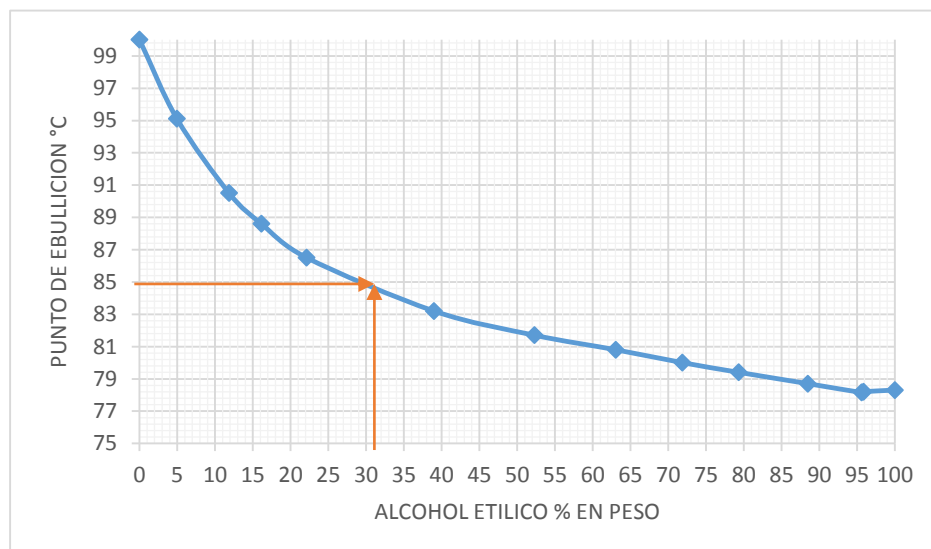


Figura 29. Puntos de ebullición de la muestra de alcohol etílico y agua
Elaboración propia

Según el grafico se tiene una temperatura de ebullición de 84.5°C

5.2 Resultados inferenciales

Se realizó el tratamiento estadístico haciendo uso del programa *IBM SPSS Statistics 25* y aplicando el diseño factorial con tres factores. El objetivo es obtener en el proceso de hidrólisis la mayor concentración de azúcares fermentables y en el proceso de fermentación la menor concentración de la misma. Para cada proceso se pueden controlar tres factores. En el proceso de hidrólisis: tiempo, temperatura y concentración de ácido sulfúrico. En el proceso de fermentación: tiempo, temperatura y concentración de levadura.

a. Hidrólisis

La variable respuesta en esta experimentación es la concentración de azúcares fermentables obtenida. Para obtener la mayor concentración de glucosa intervienen tres factores: el tiempo, que presenta tres niveles 180min, 210min y 240min; la concentración de ácido sulfúrico, con tres niveles 0.5%, 1% y 1.5%; y temperatura con dos niveles 100°C y 110°C. Los factores son efectos fijos. Se trata de un diseño trifactorial de efectos fijos donde el número de tratamientos es $3 \times 3 \times 2 = 18$. Donde el número de parámetros $3 \times 3 \times 2 + 1 = 19 > 18$. Por lo tanto algún parámetro no será estimable.

	Tiempo	Concentración	Temperatura	Glucosa
1	tiempo1	concent.1	Temp.1	1,54
2	tiempo1	concent.1	Temp.2	4,83
3	tiempo1	concent.2	Temp.1	8,30
4	tiempo1	concent.2	Temp.2	10,40
5	tiempo1	concent.3	Temp.1	7,43
6	tiempo1	concent.3	Temp.2	6,23
7	tiempo2	concent.1	Temp.1	4,26
8	tiempo2	concent.1	Temp.2	6,63
9	tiempo2	concent.2	Temp.1	9,63
10	tiempo2	concent.2	Temp.2	12,26
11	tiempo2	concent.3	Temp.1	8,64
12	tiempo2	concent.3	Temp.2	6,30
13	tiempo3	concent.1	Temp.1	5,24
14	tiempo3	concent.1	Temp.2	7,26
15	tiempo3	concent.2	Temp.1	10,15
16	tiempo3	concent.2	Temp.2	11,30
17	tiempo3	concent.3	Temp.1	9,42
18	tiempo3	concent.3	Temp.2	7,28

Figura 30. Resultados de las concentraciones de glucosa mediante hidrólisis.

Elaboración propia

Según el análisis de varianza de un factor (ANOVA) nos da a conocer la variabilidad debido a los efectos de cada uno de los factores y a las interacciones entre ellos. Si la significancia es: $Sig=p<0.05$ se rechaza H_0 (datos presentan distribución normal) y se acepta H_a (datos no presentan distribución normal).

		Etiqueta de valor	N
Tiempo	180,00	tiempo1	6
	210,00	tiempo2	6
	240,00	tiempo3	6
Conc. de ácido	,50	concent.1	6
	1,00	concent.2	6
	1,50	concent.3	6
Temperatura	100,00	Temp.1	9
	110,00	Temp.2	9

Figura 31. Factores inter-sujetos

Elaboración propia

Variable dependiente: Conc. de Glucosa

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	124,094 ^a	13	9,546	71,945	,000
Intersección	1044,245	1	1044,245	7870,370	,000
Tiempo	12,861	2	6,430	48,465	,002
Concentración	86,873	2	43,437	327,377	,000
Temperatura	3,450	1	3,450	26,000	,007
Tiempo * Concentración	2,558	4	,639	4,819	,078
Tiempo * Temperatura	,832	2	,416	3,137	,152
Concentración * Temperatura	17,520	2	8,760	66,024	,001
Error	,531	4	,133		
Total	1168,869	18			
Total corregido	124,624	17			

a. R al cuadrado = .996 (R al cuadrado ajustada = .982)

Figura 32. Análisis de varianza (ANOVA)
Elaboración propia

En dicha tabla se indica que para un nivel de significación del 5% los efectos que no son significativos del modelo planteado son las interacciones entre los factores tiempo*Temperatura y tiempo*concentración ya que los p-values correspondientes a estos efectos son 0.152 y 0.078 respectivamente mayores que el nivel de significación.

Como consecuencia de este resultado, replanteamos el modelo suprimiendo en primer lugar el efecto tiempo*Temperatura por tener el p-value más alto.

Por necesidad de síntesis; el resultado de la nueva tabla ANOVA indica que el efecto tiempo*concentración arroja un p-value de 0.124 y este valor sigue siendo no significativo por lo que suprimimos el modelo y replanteamos el siguiente modelo matemático.

La tabla ANOVA a este modelo es el siguiente:

Variable dependiente: Conc. de Glucosa

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	120,704 ^a	7	17,243	43,980	,000
Intersección	1044,245	1	1044,245	2663,415	,000
Tiempo	12,861	2	6,430	16,401	,001
Concentración	86,873	2	43,437	110,788	,000
Temperatura	3,450	1	3,450	8,799	,014
Concentración * Temperatura	17,520	2	8,760	22,343	,000
Error	3,921	10	,392		
Total	1168,869	18			
Total corregido	124,624	17			

a. R al cuadrado = .969 (R al cuadrado ajustada = .947)

Figura 33. Pruebas de efectos

Elaboración propia

Todos los efectos de este último modelo planteado son significativos y por lo tanto es en este modelo donde vamos a realizar el estudio. Existen diferencias significativas entre los distintos tiempos, temperaturas y concentraciones de ácido.

En primer lugar, estudiamos que **tiempos** son significativamente diferentes aplicando el método de comparaciones múltiples o posterior (**Post Hoc**) con la prueba de **Tukey**. Es uno de los métodos de mayor aceptación.

Variable dependiente: Conc. de Glucosa

HSD Tukey

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
tiempo1	tiempo2	-1,4983 [*]	,36151	,005	-2,4893	-,5073
	tiempo3	-1,9867 [*]	,36151	,001	-2,9777	-,9957
tiempo2	tiempo1	1,4983 [*]	,36151	,005	,5073	2,4893
	tiempo3	-,4883	,36151	,401	-1,4793	,5027
tiempo3	tiempo1	1,9867 [*]	,36151	,001	,9957	2,9777
	tiempo2	,4883	,36151	,401	-,5027	1,4793

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .392.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 34. Comparaciones múltiples

Elaboración propia

Subconjuntos homogéneos

Conc. de Glucosa

HSD Tukey^{a,b}

Tiempo	N	Subconjunto	
		1	2
tiempo1	6	6,4550	
tiempo2	6		7,9533
tiempo3	6		8,4417
Sig.		1,000	,401

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .392.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = 0.05.

Figura 35. Subconjuntos homogéneos
Elaboración propia

Este método nos indica quienes producen mayores concentraciones de glucosa son el tiempo 2 y el tiempo 3 y la menor concentración se da en el tiempo 1.

Ahora, estudiamos que **concentraciones** son significativamente diferentes aplicando el método de comparaciones múltiples o posterior (**Post Hoc**) con la prueba de **Tukey**.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Conc. de Glucosa

HSD Tukey

(I) Conc. de ácido	(J) Conc. de ácido	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
concent.1	concent.2	-5,3800*	,36151	,000	-6,3710	-4,3890
	concent.3	-2,5900*	,36151	,000	-3,5810	-1,5990
concent.2	concent.1	5,3800*	,36151	,000	4,3890	6,3710
	concent.3	2,7900*	,36151	,000	1,7990	3,7810
concent.3	concent.1	2,5900*	,36151	,000	1,5990	3,5810
	concent.2	-2,7900*	,36151	,000	-3,7810	-1,7990

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .392.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 36. Prueba de Tukey
Elaboración propia

HSD Tukey^{a,b}

Conc. de ácido	N	Subconjunto		
		1	2	3
concent.1	6	4,9600		
concent.3	6		7,5500	
concent.2	6			10,3400
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .392.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = 0.05.

Figura 37. Prueba de Turkey-subconjuntos-concentración de glucosa
Elaboración propia

Comprobamos que el porcentaje de ácido que produce mayores concentraciones de glucosa es la concentración 2 (1% Ac. Sulfúrico) y quien produce la menor concentración de glucosa es la concentración 1 (0.5% Ac. Sulfúrico). También podemos observar que si se encuentran diferencias significativas entre los tres porcentajes de ácido.

El factor **temperatura** tiene dos niveles por lo tanto no se puede aplicar ningún método de comparaciones múltiples para comprobar que nivel de temperatura produce mayor o menor concentración de glucosa. Se puede resolver calculando las concentraciones medias de glucosa de los niveles del factor.

		Temperatura	Estadístico	Desv. Error	
Conc. de Glucosa	Temp.1	Media	7,1789	,96745	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	4,9479	
			Límite superior	9,4098	
		Media recortada al 5%	7,3271		
		Mediana	8,3000		
		Varianza	8,424		
		Desv. Desviación	2,90235		
		Mínimo	1,54		
		Máximo	10,15		
		Rango	8,61		
		Rango intercuartil	4,78		
		Asimetría	-1,017	,717	
		Curtosis	,121	1,400	
		Temp.2	Media	8,0544	,86430
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,0614
	Límite superior			10,0475	
	Media recortada al 5%		7,9999		
	Mediana		7,2600		
	Varianza		6,723		
	Desv. Desviación		2,59291		
	Mínimo		4,83		
	Máximo	12,26			
	Rango	7,43			
Rango intercuartil	4,59				
Asimetría	,669	,717			
Curtosis	-1,090	1,400			

Figura 38. *Concentraciones medias de azúcares fermentables.*
Elaboración propia

Se comprueba que la temperatura 2 (110°C) produce mayor concentración de azúcares fermentables a comparación de la temperatura 1 (100°C) ya que su concentración media es de 8.05 g/L frente a 7.18 g/L respectivamente.

A continuación analizamos el efecto de interacción de los factores concentración*temperatura mediante el gráfico de medias.

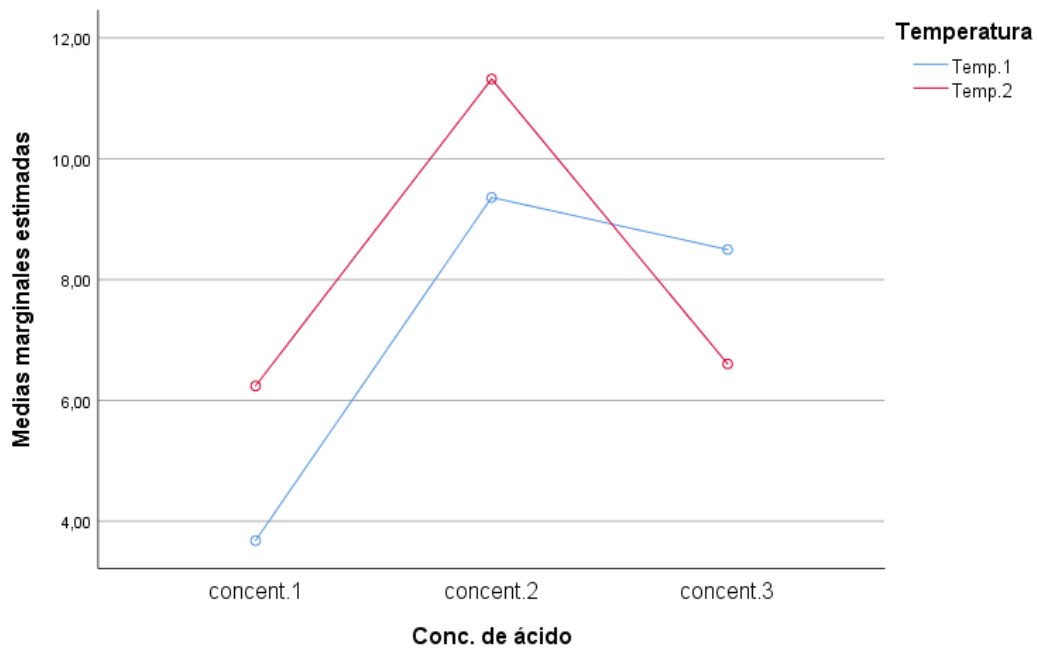


Figura 39. Medias marginales estimadas de Concentración de azúcares fermentables.
Elaboración propia

Al cruzarse las medias de las distintas temperaturas se confirma la presencia de interacción entre los factores concentración*temperatura, se observa que al variar el porcentaje de concentración de ácido sulfúrico desde concent.1 (0.5%) a la concent.3 (1.5%) y manteniendo una temp.2 (110°C) la concentración de glucosa varía según la concentración de ácido, obteniendo el pico más alto de concentración media de glucosa para una concent.2 (1%).

Concluyendo, la mayor concentración de glucosa se produce a una temperatura de 110°C y a una concentración de ácido de 1%.

b. Fermentación

La variable respuesta en esta experimentación es la concentración de glucosa obtenida. Para obtener la menor concentración de glucosa intervienen tres factores: el tiempo, que presenta tres niveles 2160min, 2880min y 3600min; la concentración de levadura, con tres niveles 5g/L, 10g/L y 15g/L; y temperatura con dos niveles 20°C y 25°C.

Los factores son efectos fijos. Se trata de un diseño trifactorial de efectos fijos donde el número de tratamientos es $3 \times 3 \times 2 = 18$. Donde el número de

parámetros $3 \times 3 \times 2 + 1 = 19 > 18$. Por lo tanto algún parámetro no será estimable.

	Tiempo	Concentración	Temperatura	Glucosa
1	tiempo1	concent.1	Temp.1	9,32
2	tiempo1	concent.1	Temp.2	8,62
3	tiempo1	concent.2	Temp.1	6,42
4	tiempo1	concent.2	Temp.2	5,62
5	tiempo1	concent.3	Temp.1	7,28
6	tiempo1	concent.3	Temp.2	6,04
7	tiempo2	concent.1	Temp.1	8,56
8	tiempo2	concent.1	Temp.2	6,62
9	tiempo2	concent.2	Temp.1	4,54
10	tiempo2	concent.2	Temp.2	3,62
11	tiempo2	concent.3	Temp.1	6,64
12	tiempo2	concent.3	Temp.2	5,82
13	tiempo3	concent.1	Temp.1	6,58
14	tiempo3	concent.1	Temp.2	6,10
15	tiempo3	concent.2	Temp.1	4,32
16	tiempo3	concent.2	Temp.2	4,02
17	tiempo3	concent.3	Temp.1	5,64
18	tiempo3	concent.3	Temp.2	5,33

Figura 40. Resultados de Fermentación
Elaboración propia

Según el análisis de varianza de un factor (ANOVA) nos da a conocer la variabilidad debido a los efectos de cada uno de los factores y a las interacciones entre ellos.

		Etiqueta de valor	N
Tiempo	2160,00	tiempo1	6
	2880,00	tiempo2	6
	3600,00	tiempo3	6
Conc. de levadura	5,00	concent.1	6
	10,00	concent.2	6
	15,00	concent.3	6
Temperatura	20,00	Temp.1	9
	25,00	Temp.2	9

Figura 41. Factores inter-sujetos
Elaboración propia

En dicha tabla se indica que para un nivel de significación del 5% los efectos que no son significativos del modelo planteado son las interacciones entre los factores concentración*temperatura, tiempo*Temperatura y tiempo*concentración ya que los p-values correspondientes a estos efectos son 0.607, 0.155 y 0.061 respectivamente mayores que el nivel de significación.

Como consecuencia de este resultado, replanteamos el modelo suprimiendo en primer lugar el efecto concentración*temperatura por tener el p-value más alto.

Por necesidad de síntesis; el resultado de la nueva tabla ANOVA indica que el efecto tiempo*concentración arroja un p-value de 0.094 y este valor sigue siendo no significativo por lo que suprimimos el modelo y replanteamos el siguiente modelo matemático.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	41,111 ^a	9	4,568	34,806	,000
Intersección	685,610	1	685,610	5224,141	,000
Tiempo	11,038	2	5,519	42,053	,000
Concentración	24,845	2	12,423	94,657	,000
Temperatura	3,133	1	3,133	23,875	,001
Tiempo * Concentración	2,094	4	,524	3,990	,046
Error	1,050	8	,131		
Total	727,771	18			
Total corregido	42,161	17			

a. R al cuadrado = .975 (R al cuadrado ajustada = .947)

Figura 42. Análisis de varianza

Elaboración propia

Todos los efectos de este último modelo planteado son significativos y por lo tanto es en este modelo donde vamos a realizar el estudio. Existen diferencias significativas entre los distintos tiempos, temperaturas y concentraciones de levadura.

En primer lugar, estudiamos que **tiempos** son significativamente diferentes aplicando el método de comparaciones múltiples o posterior (**Post Hoc**) con la prueba de **Tukey**. Es uno de los métodos de mayor aceptación.

Variable dependiente: Conc. de Glucosa
HSD Tukey

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
tiempo1	tiempo2	1,2500 [*]	,20916	,001	,6523	1,8477
	tiempo3	1,8850 [*]	,20916	,000	1,2873	2,4827
tiempo2	tiempo1	-1,2500 [*]	,20916	,001	-1,8477	-,6523
	tiempo3	,6350 [*]	,20916	,038	,0373	1,2327
tiempo3	tiempo1	-1,8850 [*]	,20916	,000	-2,4827	-1,2873
	tiempo2	-,6350 [*]	,20916	,038	-1,2327	-,0373

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,131.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 43. Comparaciones múltiples
Elaboración propia

HSD Tukey^{a,b}

Tiempo	N	Subconjunto		
		1	2	3
tiempo3	6	5,3317		
tiempo2	6		5,9667	
tiempo1	6			7,2167
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,131.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

b. Alfa = 0.05.

Figura 44. Medias de concentración de glucosa según el tiempo
Elaboración propia

Este método nos indica quienes producen menores concentraciones de azúcares fermentables son el tiempo 2 y el tiempo 3 y la mayor concentración se da en el tiempo 1. Y presentan diferencias significativas entre los tres tiempos.

Ahora, estudiamos que **concentraciones** son significativamente diferentes aplicando el método de comparaciones múltiples o posterior (**Post Hoc**) con la prueba de **Tukey**.

Variable dependiente: Conc. de Glucosa
HSD Tukey

(I) Conc. de levadura	(J) Conc. de levadura	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
concent.1	concent.2	2,8767*	,20916	,000	2,2790	3,4743
	concent.3	1,5083*	,20916	,000	,9107	2,1060
concent.2	concent.1	-2,8767*	,20916	,000	-3,4743	-2,2790
	concent.3	-1,3683*	,20916	,000	-1,9660	-,7707
concent.3	concent.1	-1,5083*	,20916	,000	-2,1060	-,9107
	concent.2	1,3683*	,20916	,000	,7707	1,9660

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,131.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 45. Comparaciones múltiples - Prueba de Tukey
Elaboración propia

HSD Tukey^{a,b}

Conc. de levadura	N	Subconjunto		
		1	2	3
concent.2	6	4,7567		
concent.3	6		6,1250	
concent.1	6			7,6333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,131.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

b. Alfa = 0.05.

Figura 46. Prueba de Turkey-subconjuntos concentración de glucosa
Elaboración propia

Comprobamos que el cantidad de azúcares fermentables que produce menores concentraciones de glucosa es la concentración 2 (10g/L de levadura) y quien produce la menor concentración de azúcares fermentables es la concentración 1 (0.5% Ac. Sulfúrico). También podemos observar que si se encuentran diferencias significativas entre los tres porcentajes de ácido.

El factor **temperatura** tiene dos niveles por lo tanto no se puede aplicar ningún método de comparaciones múltiples para comprobar que nivel de temperatura produce mayor o menor concentración de azúcares fermentables. Se puede resolver calculando las concentraciones medias de glucosa de los niveles del factor.

Temperatura		Estadístico	Desv. Error		
Conc. de Glucosa	Temp.1	Media	6,5889	,55402	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	5,3113	
			Límite superior	7,8665	
		Media recortada al 5%	6,5632		
		Mediana	6,5800		
		Varianza	2,762		
		Desv. Desviación	1,66205		
		Mínimo	4,32		
		Máximo	9,32		
		Rango	5,00		
		Rango intercuartil	2,83		
		Asimetría	,253	,717	
		Curtosis	-,503	1,400	
		Temp.2	Media	5,7544	,48489
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	4,6363	
	Límite superior		6,8726		
Media recortada al 5%	5,7138				
Mediana	5,8200				
Varianza	2,116				
Desv. Desviación	1,45466				
Mínimo	3,62				
Máximo	8,62				
Rango	5,00				
Rango intercuartil	1,68				
Asimetría	,482	,717			
Curtosis	1,282	1,400			

Figura 47. Concentraciones medias de azúcares fermentables.
Elaboración propia

Se comprueba que la temperatura 2 (25°C) produce menor concentración de azúcares fermentables a comparación de la temperatura 1 (20°C) ya que su concentración media es de 5.75 g/L frente a un valor medio de 6.59 g/L respectivamente.

A continuación, analizamos el efecto de interacción de los factores concentración*tiempo mediante el gráfico de medias.

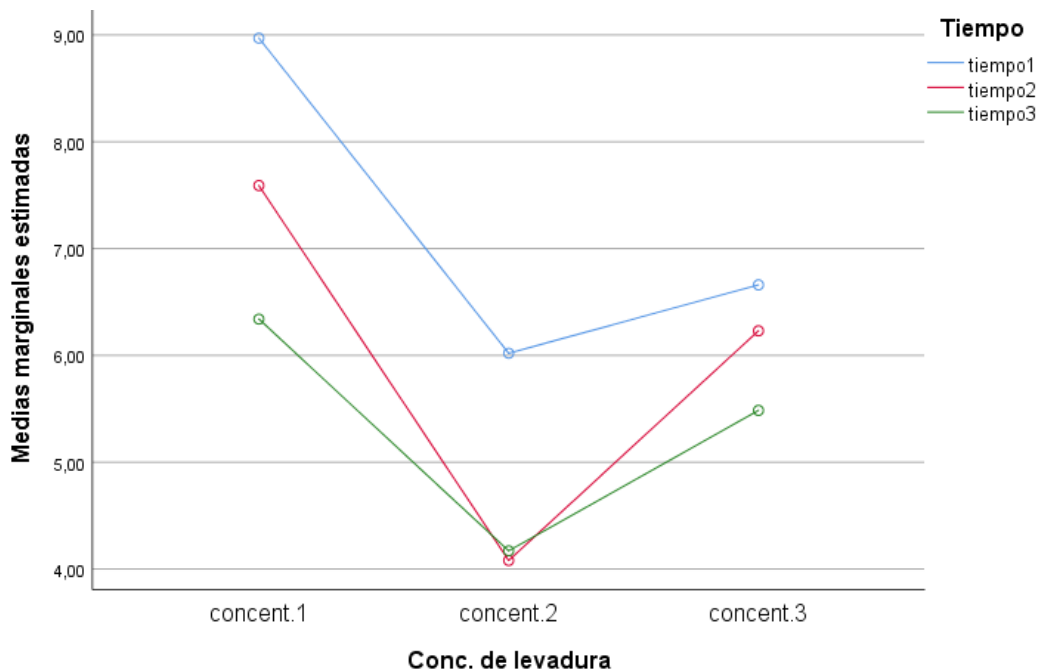


Figura 48. Medias marginales estimadas de concentración de azúcares fermentables.
Elaboración propia

Al cruzarse las medias de las distintos tiempos se confirma la presencia de interacción entre los factores concentración*tiempo, se observa que al variar la concentración de levadura desde concent.1 (5g/L) a la concent.3 (15g/L) y manteniendo el tiempo2 (2880 min) la concentración de azúcares fermentables varía dependiendo de la concentración de levadura, obteniendo el resultado más bajo de la concentración media de azúcares fermentables para una concent.2 (10g/L).

Concluyendo, la menor concentración de azúcares fermentables se produce a un tiempo de 2880 min (48h) y a una concentración de levadura de 10g/L.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.

6.1.1 Parámetros óptimos de hidrolisis acida.

En la tabla N° 5 Se puede observar los resultados de concentración de azúcares fermentables en donde se varía la concentración de ácido para encontrar el tiempo y temperatura optima de hidrolisis cuyos valores son: concentración de ácido igual a 1%, temperatura 110°C y tiempo igual a 210 minutos con estos valores se logró demostrar la hipótesis planteada.

El porcentaje de bioetanol depende de la cantidad de azúcares fermentables obtenidos en la hidrolisis acida para ello es importante encontrar en punto óptimo donde se producirá la mayor concentración de azúcares fermentables que posterior mente pasará a etanol.

6.1.2 Parámetros óptimos de fermentación.

En la tabla N° 6 se aprecia los resultados de concentración de azúcares fermentables, residuo de la fermentación en donde se varía la concentración de levadura para encontrar el tiempo y temperatura optima de fermentación cuyos valores son: concentración de levadura 10g/L. temperatura 25°C y tiempo igual a 48 horas cuyos valores demuestran la hipótesis planteada.

Para el caso de la fermentación sucede lo contrario a la hidrolisis acida se obtendrá el mayor porcentaje de etanol en el punto donde obtenemos la menor cantidad de azúcares fermentables ya que la mayor parte se convirtió a etanol.

6.1.3 Porcentaje de pureza del etanol obtenido.

En la tabla N° 7 y Figura N° 26 se puede observar mediante interpolación con los datos de la curva patrón que el porcentaje de

bioetanol obtenido es igual a 30 % el cual cumple con las expectativas en la hipótesis planteada en donde se esperaba superar el 20 %.

6.1.4 Parámetros fisicoquímicos del bioetanol obtenido.

En la tabla N° 8, figura N° 27, 28 y 29 se logra determinar los parámetros fisicoquímicos del etanol obtenido (densidad, color y temperatura de ebullición) estos valores se encuentran en un rango de 30-50 % y el grado de pureza del etanol es de 30 %, con lo cual se demuestra la hipótesis planteada.

6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios Similares

Se tomó como antecedente el estudio de M.Ballesteros, J.M. Oliva, P. Manzanares, (2003, Madrid) *Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875*, en donde sigue los procedimientos de hidrólisis ácida seguidamente de fermentación el cual nombra como “Sacarificación y fermentación simultánea” donde obtiene una concentración máxima de etanol de 19 %, en la presente investigación se obtiene un resultado de 30 %, por lo tanto podemos decir que se tiene resultados metodológicos similares.

6.3 Responsabilidad y ética de acuerdo con los reglamentos vigentes.

El presente informe de investigación de tesis: Obtención de Bioetanol a partir de cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación, para optar el título profesional de Ingeniero Químico ha sido desarrollado de acuerdo con los reglamentos y procedimientos vigentes de la Universidad Nacional del Callao, por lo tanto, los autores se responsabilizan por la información emitida en el presente informe de tesis.

CONCLUSIONES

- El máximo porcentaje de bioetanol se obtuvo determinando los parámetros óptimos de hidrólisis ácida y fermentación cuyo resultado fue de un 30% con características fisicoquímicas: densidad igual a 0.9589 g/L, incoloro y con una temperatura de ebullición igual a 84.5 °C todo perteneciente para dicho porcentaje de pureza.
- Los parámetros óptimos de hidrólisis ácida son: concentración de ácido 1%, temperatura 110 °C y tiempo de hidrólisis igual a 210 min en donde se obtuvo la máxima concentración de glucosa igual a 12.26 g/L.
- Los parámetros óptimos de la fermentación son: concentración de levadura 10 g/L, temperatura 25°C y tiempo de fermentación igual a 48 horas en donde se obtuvo la mínima concentración de azúcares fermentables igual a 3.62 g/L.

RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones similares se recomienda ampliar el rango de estudio de los parámetros tanto para la hidrólisis ácida, así como para la fermentación.
- Para la determinación del porcentaje de bioetanol obtenido se recomienda desarrollar por otros métodos para contrastar resultados con cada método de cuantificación.
- En la determinación de azúcares fermentables se utilizó el método DNS el cual tiene un costo alto, para reducir el costo se recomienda buscar un método alternativo.
- Para estudios como la presente investigación donde se cuantifica con equipos no muy comunes se recomienda tener instalaciones a disposición donde se pueda realizar ensayos constantes como es propio de este tipo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.O.A.C. (1980). Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.
- Aurora, E., Barrera, E. (2015). Obtención de bioetanol a partir de los residuos fermentables de mango y determinación de parámetros óptimos de destilación. Universidad Nacional de Santa. Chimbote.
- Bohinski, R. C. (1991). Bioquímica (No. 574.192 B676b). México, MX: Adison-Wesley Iberoamericana, 1987.
- Brock, T. & Martinko, J. (2005). Biología de los microorganismos. Madrid, España.
- Candler C. & Villalobos N. (2012) Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. Multiciencias, 245-253.
- Capdevila y otros. (2015) Simulación del proceso fermentativo para la obtención de bioetanol a partir de residuos de arroz. Avances en ciencia e Ingeniería. 6(2), 11-2.
- Castaño H. & Mejia C. (2008) Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación – fermentación simultánea (ssf). Revista VITAE. 251-258.
- Campbell, A. K., Naseem, R., Wann, K., Holland, I. B., & Matthews, S. B. (2007). Fermentation product butane 2, 3-diol induces Ca²⁺ transients in E. coli through activation of lanthanum-sensitive Ca²⁺ channels. Cell calcium, 41(2), 97-106.
- Cortes W. (2011) Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. TECNO ESUFA. 41-46

- Dagnino P. y otros. (2014) Obtención de bioetanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo. Avances en energías renovables y medio ambiente. 06.01-06.07
- Domínguez María M. (2011) Estudio de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. Revista iberoamericana de polímeros. 12(3).
- Fengel, D. y Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. Berlin.
- Galvis, M., Molina, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2009). Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol a partir de levaduras nativas. Trabajo de grado para optar el título de Química. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Hernández, L. H., & Pérez, C. G. (2002). Análisis instrumental. Madrid. Editorial Ariel.
- Hough, S. J. (1991). Biotecnología de la Cerveza y la Malta, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Jaramillo, G., & Zapata Márquez, L. M. (2008). Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia. Universidad de Antioquia. Colombia.
- Laureano, P.L., Teymouri, F., Alizadeh, H., y Dale, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology. 124(1-3): 1081–1099.
- López Infante M., & García Cruz A. (2012) Cinética del pretratamiento ácido diluido de la cáscara residual del fruto del árbol moringa oleífera, para el cálculo de los parámetros de un reactor. Universidad de Matanzas. Cuba.

- M.Ballesteros, J.M. Oliva, P. Manzanares, (2003) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.CIEMAT. Madrid
- Mohanty, S. K., Behera, S., Swain, M. R., & Ray, R. C. (2009). Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*, 86(5), 640-644.
- Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Muñoz, A. M., & Mendoza, M. E. (1990). Manual de prácticas de nutrición I. Lima (Perú): Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Nutrición. Lima.
- Odgar M. (2018). Evaluación del Rendimiento de la fermentación alcohólica a partir del almidón de la papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batata*). Universidad Nacional Pedro Ruis del Gallo. Lambayeque.
- Perry J. (2001). Manual del Ingeniero Químico. Madrid. Editorial McGraw-Hill.
- Ramirez, W. F., & Maciejowski, J. (2007). Optimal beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(3), 325-333.
- Rojas L. (2018). Valorización de la cascarilla de cebada del proceso cervecero para la producción de xilitol. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Sanchez A.; Gutierrez A. (2010); Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga* 5, 61-91

- Scragg, A. (2004). *Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Mexico. Editorial Limusa.
- Shirai K. (2013) *Tecnología de Fermentaciones Alimentarias*. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico.
- Tillery, B., Enger, E., Ross, C., (2001) *Integrated Science*, McGraw-Hill.
- Tejeda y otros. (2011) Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 14(1) 111-116
- Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2009). Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of biotechnology*, 144(1), 23-30.
- Zola M., Barranzuela M., Girón C., Guerrero D., (2017) Estudio experimental de la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de plátano en Piura. Universidad de Piura. Lima.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODOS
GENERAL ¿Cómo se obtendrá el bioetanol a partir de la cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación?	GENERAL Obtener bioetanol a partir de la cascarilla de cebada mediante hidrólisis y fermentación.	GENERAL Si determinamos las condiciones óptimas de operación (concentración, temperatura y tiempo) en el proceso de hidrólisis ácida y fermentación se obtendrá bioetanol con el grado de pureza más alta para esta investigación.	DEPENDIENTE Y = Obtención de bioetanol a partir de cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación.	-Grado de etanol. -Características fisicoquímicas del bioetanol obtenido	-Concentración final de etanol. -Densidad. -Color. -T° de ebullición.	-Refractometría -Picnómetro. -Visual. -Revisión de publicaciones.
ESPECÍFICO:	ESPECÍFICO:	ESPECÍFICO:	INDEPENDIENTE	INDEPENDIENTE	- Masa cascarilla /volumen solución.	- Revisión de publicaciones.
a. ¿Cómo determinar los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada?	a. Determinar los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada.	a. Mediante la variación de concentración de ácido se determina la temperatura y el tiempo óptimo para la hidrólisis, en donde se obtiene la mayor concentración de azúcares fermentables.	X1= Parámetros óptimos de hidrólisis ácida.	-Físicos. -Químicos.	- Temperatura de Hidrólisis. - Tiempo hidrólisis. - Concentración de ácido para Hidrólisis. - Concentración de Glucosa formada en la Hidrólisis.	- Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible.
b. ¿Cómo determinar los parámetros óptimos de fermentación de la cascarilla de cebada?	b. Determinar los parámetros óptimos de fermentación de la cascarilla de cebada.	b. Mediante la variación de concentración de levadura se determina la temperatura y el tiempo óptimo para la fermentación, en donde se obtiene la menor concentración de azúcares fermentables.	X2= Parámetros óptimos de fermentación.	-Físicos. -Químicos. -Biológicos.	- PH de Fermentación. - Concentración de levadura. - Temperatura de Fermentación. - Tiempo de Fermentación. - Concentración de Azúcares fermentables residuos de la fermentación.	- Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Revisión de publicaciones. - Espectrofotometría Uv – Visible

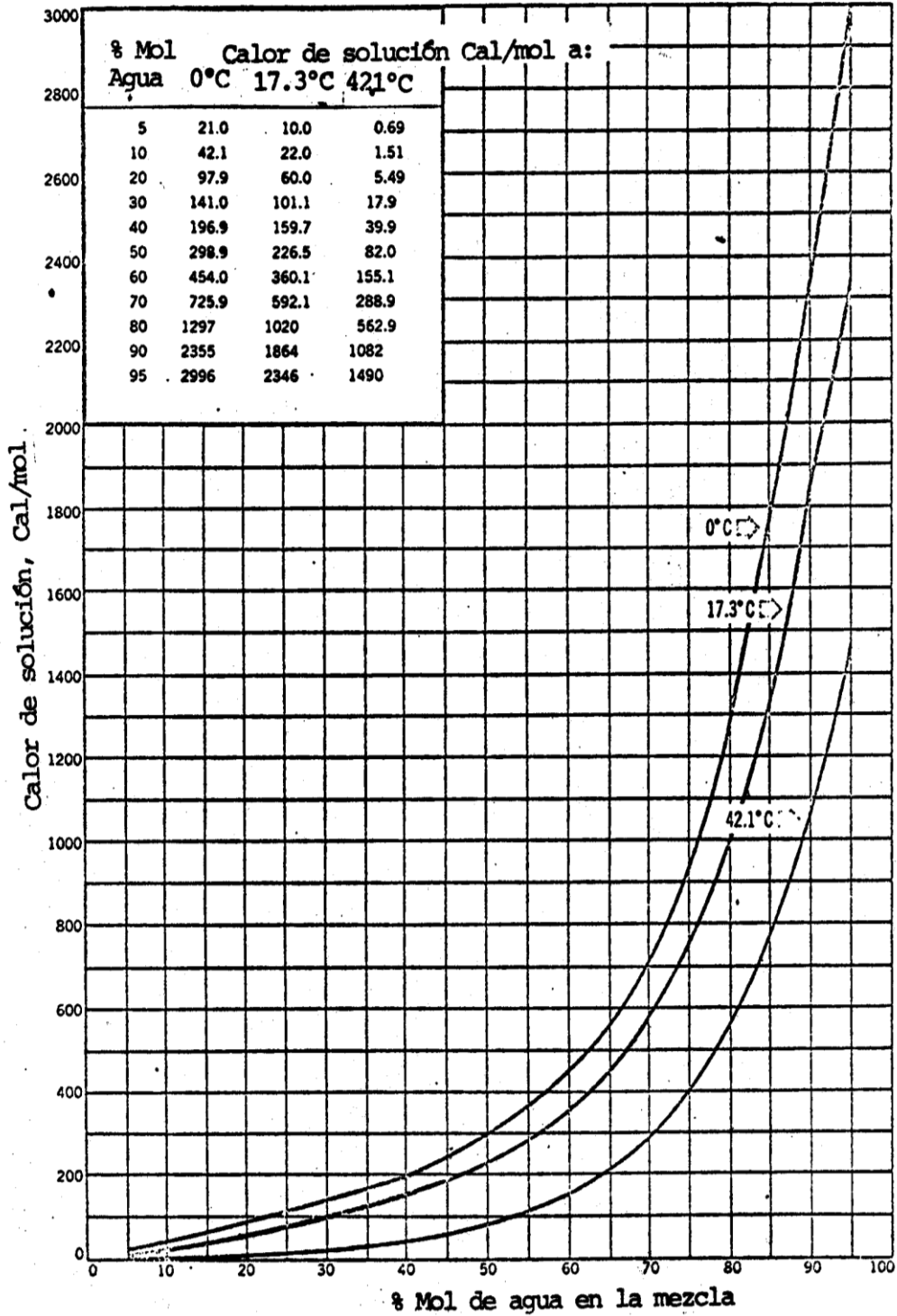
Título: Obtención de Bioetanol a partir de cascarilla de cebada mediante hidrólisis ácida y fermentación.

Anexo 2: Propiedades de mezcla etanol – agua

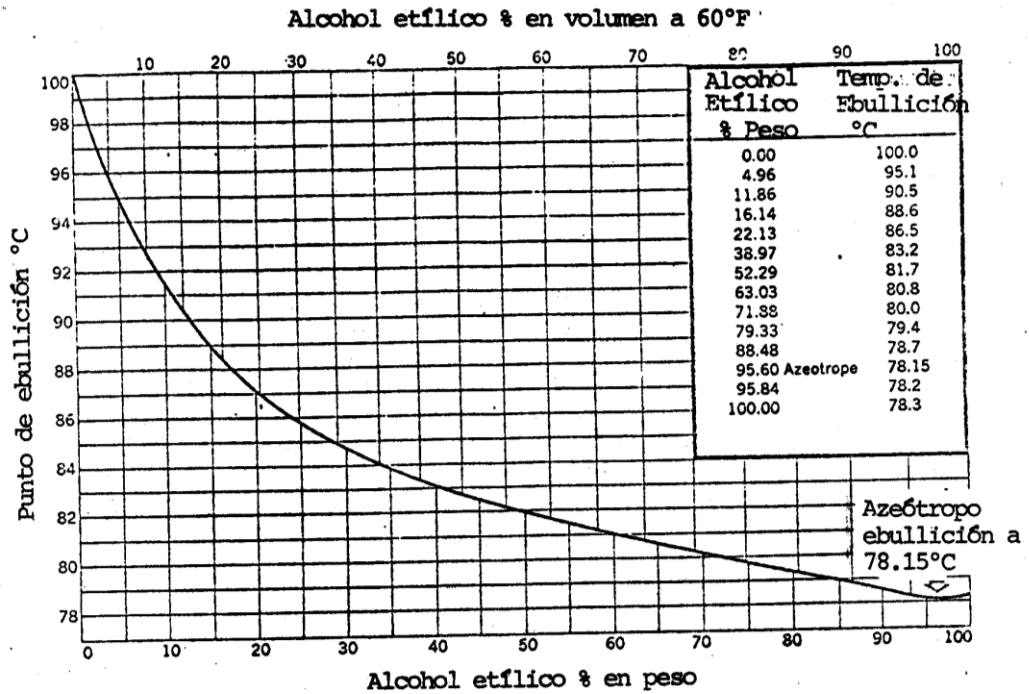
- Densidad de la solución etanol y agua a varias temperaturas.

% alcohol en peso	Densidad (g/ml) a:							% alcohol en peso	Densidad (g/ml) a:						
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
0	0.99973	0.99913	0.99823	0.99708	0.99568	0.99406	0.99225	50	0.92162	0.91776	0.91384	0.90985	0.90580	0.90168	0.89750
1	785	725	636	520	379	217	034	51	.91943	.555	.160	.700	.353	.6942	.519
2	602	542	453	336	194	031	.98846	52	.723	.333	.90336	.534	.125	.710	.203
3	426	365	275	157	014	.98849	.663	53	.502	.110	.711	.307	.89256	.475	.056
4	258	195	103	.98984	.98939	.672	.485	54	.279	.90885	.485	.079	.637	.246	.82223
5	.099	.032	.98938	.817	.670	.501	.311	55	.055	.659	.258	.89250	.437	.016	.589
6	.98946	.98877	.780	.656	.507	.335	.142	56	.90831	.433	.031	.621	.236	.68784	.256
7	.801	.729	.627	.500	.347	.172	.97975	57	.607	.207	.89803	.392	.88975	.592	.122
8	.650	.584	.478	.346	.189	.009	.808	58	.381	.89680	.574	.162	.744	.319	.87828
9	.524	.442	.331	.193	.031	.97846	.641	59	.154	.752	.344	.88931	.512	.655	.653
10	.393	.304	.187	.043	.97875	.685	.475	60	.89927	.523	.113	.699	.278	.87851	.417
11	.267	.171	.047	.97897	.725	.527	.312	61	.698	.293	.88882	.466	.644	.615	.160
12	.145	.041	.97910	.753	.573	.371	.150	62	.468	.062	.650	.233	.87809	.379	.88943
13	.026	.97914	.775	.611	.424	.216	.96989	63	.237	.88830	.417	.87998	.574	.142	.705
14	.97911	.790	.643	.472	.278	.063	.829	64	.006	.597	.183	.763	.337	.86905	.466
15	.800	.669	.514	.334	.133	.96911	.670	65	.88774	.364	.87948	.527	.100	.667	.227
16	.692	.552	.387	.199	.96990	.760	.512	66	.541	.130	.713	.291	.86863	.429	.85927
17	.583	.433	.259	.062	.844	.607	.352	67	.308	.87895	.477	.054	.625	.190	.747
18	.473	.313	.129	.96923	.697	.452	.189	68	.074	.660	.241	.86817	.337	.85950	.537
19	.363	.191	.96997	.782	.547	.294	.023	69	.87839	.424	.004	.579	.148	.710	.266
20	.252	.068	.864	.639	.395	.134	.95856	70	.602	.187	.86766	.340	.85908	.470	.025
21	.139	.96944	.729	.495	.242	.95973	.687	71	.365	.86949	.527	.100	.657	.226	.84763
22	.024	.818	.592	.348	.087	.809	.516	72	.127	.710	.287	.85859	.426	.84566	.540
23	.96907	.689	.453	.199	.95929	.643	.343	73	.86888	.470	.047	.618	.184	.743	.297
24	.787	.558	.312	.048	.769	.476	.168	74	.648	.229	.85806	.376	.84941	.500	.053
25	.665	.424	.168	.95895	.607	.306	.94991	75	.408	.85988	.564	.134	.698	.257	.83809
26	.539	.287	.020	.738	.442	.133	.810	76	.168	.747	.322	.84891	.455	.613	.564
27	.406	.144	.95867	.576	.272	.94555	.625	77	.85927	.505	.079	.647	.211	.83763	.319
28	.268	.95896	.710	.410	.098	.774	.438	78	.685	.262	.84835	.403	.83866	.525	.074
29	.125	.844	.548	.241	.94922	.560	.248	79	.442	.018	.590	.158	.720	.277	.82827
30	.95977	.686	.382	.067	.741	.403	.055	80	.197	.84772	.344	.83911	.473	.029	.578
31	.823	.524	.212	.94890	.557	.214	.93860	81	.84950	.525	.096	.664	.224	.82720	.329
32	.665	.357	.038	.709	.370	.021	.662	82	.702	.277	.83848	.415	.82974	.530	.079
33	.502	.186	.94860	.525	.180	.93825	.461	83	.453	.028	.599	.164	.724	.279	.81828
34	.334	.011	.679	.337	.93986	.626	.257	84	.203	.83777	.348	.82913	.473	.027	.576
35	.162	.94832	.494	.146	.790	.425	.051	85	.83951	.525	.095	.660	.220	.81774	.322
36	.94986	.650	.306	.93952	.591	.221	.92843	86	.697	.271	.82840	.405	.81965	.519	.057
37	.805	.464	.114	.756	.390	.016	.634	87	.441	.014	.583	.148	.708	.262	.80511
38	.620	.273	.93919	.556	.186	.92808	.422	88	.181	.82754	.323	.81888	.448	.033	.552
39	.431	.079	.720	.353	.92979	.597	.208	89	.82919	.492	.062	.626	.186	.80742	.291
40	.238	.93882	.518	.148	.770	.385	.91992	90	.654	.227	.81787	.362	.80922	.478	.028
41	.042	.682	.314	.92940	.558	.170	.774	91	.386	.81959	.529	.094	.655	.211	.79761
42	.93842	.478	.107	.729	.344	.91952	.554	92	.114	.688	.257	.80823	.384	.79941	.491
43	.639	.271	.92897	.516	.128	.733	.332	93	.81839	.413	.80883	.549	.111	.669	.220
44	.433	.062	.685	.301	.91910	.513	.108	94	.561	.134	.705	.272	.79835	.393	.78947
45	.226	.92852	.472	.085	.692	.291	.90884	95	.278	.80852	.424	.79991	.555	.114	.670
46	.017	.640	.257	.91868	.472	.069	.660	96	.80991	.566	.138	.706	.271	.78821	.328
47	.92806	.426	.041	.649	.250	.90845	.434	97	.698	.274	.79846	.415	.78991	.542	.160
48	.593	.211	.91822	.429	.028	.621	.207	98	.399	.79975	.547	.117	.694	.247	.77806
49	.379	.91995	.604	.208	.90805	.396	.89979	99	.094	.670	.243	.78814	.382	.77946	.507
								100	.79784	.360	.78534	.506	.075	.641	.263

- Calor de solución de etanol en agua



- Puntos de ebullición de soluciones de etanol y agua.

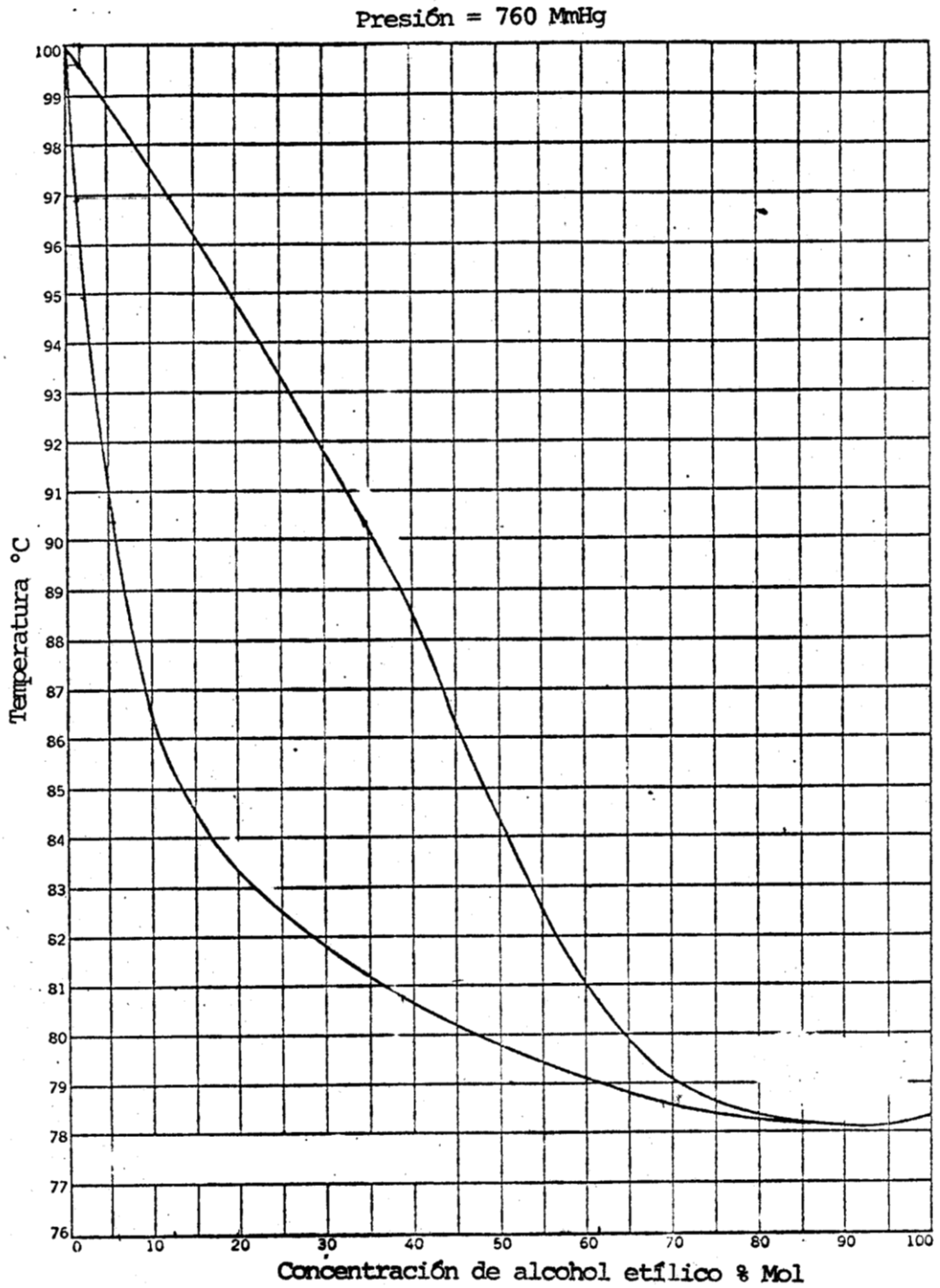


- Presiones Parciales de las soluciones de etanol y agua a 20°C


concentración de alcohol presión parcial mmHg

% Peso	% Mol	Alcohol	Agua
0	0.00	0	17.5
10	4.17	6.7*	16.8
20	8.91	12.6*	15.9
30	14.36	17.1*	15.1
40	20.68	20.7	14.7
50	28.12	23.5	14.5
60	36.97	25.6	14.1
70	47.72	28.0	13.1
80	61.02	31.2	11.3
90	77.87	35.8	7.5
98	95.04	42.3	1.9
100	100.00	43.6	0.0

- Diagrama de temperatura-composicion para soluciones de etanol agua



Anexo 3: Orden de servicio de alquiler de laboratorio

	ANNOBA LAB S.A.C.				
	Soluciones Analíticas y Consultoría				
	info@anoba.com.pe www.anoba.com.pe				
	LIMA-PERU				
ORDEN DE SERVICIO N° ABMA-0190601					
EMPRESA:	MILER ANTONI ACUÑA ARIZA	Fecha: 15/07/2019			
RUC:	47534183	Representante: Rosibel Gamarra			
E-MAIL:	antoniacunaariza@gmail.com	E-mail: comercial@anoba.com.pe			
Contacto:	-	Celular: 922 183 336			
Teléfono:	987348186				
SOLICITUD DE PEDIDO DE LABORATORIO					
FECHA:		HORARIO: 9:30 a 18:00			
ITEM	TIPO	ID ARTICULO	CANTIDAD	OBSERVACIONES	Costo
1		servicio de alquiler de labora	1	-	150
2		servicio de alquiler de materi	10	-	50
Página 1					
IMPORTANTE				Sub Total (\$/.)	164,00
* Condicion de venta: AL CONTADO				IGY 18% (\$/.)	36,00
				Total a cancelar (\$/.)	200,00
RESPONSABILIDADES DE LA EMPRESA					
<p>ANNOBA LAB SAC es responsable de entregar toda la equipulada en la localidad del cliente en condiciones optimas de uso y de operacion. Asi mismo, ANNOBA LAB SAC darlinda toda responsabilidad sobre las actividades del cliente por su corazon de utilizar camaron: corte de energia electrica, corte de servicio de agua, por lo que en estar corazon el cliente puede reprogramar las horas faltantes para complementar las horas de alquiler contratadas.</p>					
RESPONSABILIDADES DEL USUARIO					
<p>EL CLIENTE contrata el horario establecido previa pago por adelantada y debera respetar las normas de laboratorio en materia de higiene y seguridad, asi tambien debera cumplir con las normas de laboratorio. EL CLIENTE es quien es responsable de su material.</p>					
Nuestro Número de Cuenta (Salor):					
Banca de Credito del Perú		191-2331873-0-71			
		002 191 002331873071 52 CGI			
Enviar el comprobante de pago a comercial@anoba.com.pe La factura / Boleto electronicazera enviada por correo electrónico.					
ANNOBA LAB SAC					
Ruc: 20600645219		Dirección de laboratorio: Jr. San Isidro N° 384, Urb. San Carlos - Comas			
Telf: 01 504 0554		Dirección de recepción muestras: Calle San Luis N°132, Urb. Villa Marina - Chorrillos			
Comprometidos con la agricultura y el medio ambiente					