

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 ANTECEDENTES

El etanol es un líquido inflamable, incoloro, de olor característico y es el alcohol de menor toxicidad. Tiene aspecto similar al agua pero bastante más volátil que esta.

El etanol también conocido como alcohol etílico o de grano, se obtiene de cuatro tipos de materia prima; los productos ricos en sacarosa, como la caña de azúcar y la remolacha; fuentes ricas en almidón, como cereales (maíz, trigo, cebada, etc.) y tubérculos (**yuca, papa, biomato, etc.**); materiales ricos en celulosa, madera y los residuos agrícolas; y mediante procesos petroquímicos de hidratación del etileno.

### 1.2 ETANOL COMO FUENTE DE ENERGÍA

El bioetanol, como combustible de transporte, se utiliza de diferentes formas: por ejemplo, la mezcla con gasolina en bajos porcentajes no requiere de modificaciones en los vehículos (menores del 5-10%).

Los alcoholes aumentan el contenido de oxígeno de la gasolina y con ello su octanaje. Así arden mejor y mejoran las prestaciones del vehículo sin que haya que modificar los motores, al mismo tiempo que se reduce el consumo y las emisiones contaminantes (Ballesteros, M. 2006).

La mezcla al 10 % recibe el nombre de "gasohol". El etanol desempeña un papel de aditivo oxigenado de modo indirecto: En forma de ETBE (etil-terciario-butil-eter), que se fabrica a partir de una mezcla de etanol e isobuteno (Ballesteros, M. 2006).

La mezcla del etanol con la gasolina en porcentajes desde el 10 al 85 %, requiere modificaciones en los vehículos. El E-85 es un combustible que contiene hasta el 85% de etanol y solo un 15 % de gasolina (Ballesteros, M. 2006).

En términos energéticos la producción mundial de biocombustibles equivale a 1 % del uso total de combustibles en el transporte terrestre. Brasil y Estados Unidos producen

conjuntamente 85% de la oferta global. (Ver tabla I-1); en ambos países el etanol representa la mayor parte de la producción de biocombustibles (Castro, A. 2015)

Tabla I-1 Producción mundial bioetanol

<b>N</b>	<b>PAISES</b>	<b>2015 ('000 m<sup>3</sup>)</b>
1	Estados Unidos	54,500
2	Guatemala	15
3	Canadá	1,800
4	China	2,800
5	Argentina	8,000
6	Brasil	27,000
7	Colombia	450
8	Perú	130
9	Paraguay	200
10	Tailandia	1,800
11	Unión Europea	5,100
12	India	600
13	Australia	220
14	Filipinas	160
15	Pakistán	10
16	Korea del Sur	5
17	Japón	5
18	Sudáfrica	5
<b>Total Mundo</b>		<b>9,500</b>

Fuente: Bioeconomía - Región Centro, 2015

### **1.3 POLÍTICAS PÚBLICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE**

Un aspecto fundamental para impulsar la producción y el consumo de biocombustibles son las políticas públicas. Entre otras, políticas de consumo obligatorio de biocombustibles, políticas de ayuda a la actividad productiva y a la investigación, políticas comerciales y a las normas técnicas que se establezca (IICA, 2007).

Los países líderes en la producción de bioetanol cuentan con un marco regulatorio para la producción, uso y manejo del etanol, han establecido porcentajes de mezcla de gasolina y etanol y brindan incentivos para su producción (IICA, 2007).

## 1.4 NUEVAS FUENTES DE BIOENERGIA

En la Conferencia de Bioenergía de Georgia en 2006, la discusión fue más allá del etanol derivado del maíz, incluyendo el biodiesel y otras formas de etanol. Por ejemplo, Peterson, de la Universidad de Georgia, está trabajando en producir etanol a partir de la remolacha. Otro investigador, Brad Buchanan, un granjero de la región central de Georgia, produjo etanol a partir de los residuos de durazno de Lane Packing Co. Una empresa que cultiva duraznos. Stuckey resaltó la cantidad de desperdicios existentes en la industria del durazno debido a la rapidez con que se maduran.

En la tabla I-2 se compara la producción potencial etanol de varios posibles sustratos

Tabla I-2 Materia prima para la producción de bioetanol.

<b>Materia prima</b>	<b>Producción potencial de bioetanol (L/T)</b>
Caña de azúcar	81
Remolacha azucarera	103
Boniato	125
Papa	110
Mandioca	180
Maíz	410
Aceite de palma	430
Girasol	418
Ricino	393
Algodón	103

Fuente: FAO, 2008.

## 1.5 PRODUCCIÓN DE PAPA EN BOLIVIA

La producción de papa en Bolivia genera 335 millones de dólares al Producto Interno Bruto (PIB) de Bolivia. El cultivo del tubérculo representa el 10 por ciento del PIB agrícola del país (INE, 2015).

La producción de papa en Bolivia del 2009 a 2014 según el Instituto Nacional de Estadística (INE), ha crecido un 18% (ver tabla I-3).

Tabla I-3 Superficie cultivada, producción y rendimiento de la papa.

<b>Descripción</b>	<b>2009-2010</b>	<b>2010-2011</b>	<b>2011-2012</b>	<b>2012-2013</b>	<b>2013-2014</b>
superficie (ha)	182,942	180,416	182,896	187,520	190,209
producción (T)	956,953	975,418	906,413	1.030,839	1.080,050
rendimiento (T/ha)	5.231	5.406	5.284	5.897	5.678

Fuente: Instituto Nacional Estadísticas (INE), 2015

Según los datos del Instituto Boliviano de Comercio Exterior (IBCE) Bolivia requiere de al menos 490 mil toneladas del tubérculo para el abastecer su mercado interno.

La producción de papa en la campaña 2013-2014 alcanzó 1,080`050.0 toneladas que se cultivan en un superficie de 190.209,0 hectáreas en toda Bolivia obteniendo un rendimiento del 5.678 T/ha (INE, 2014).

## **1.6 OBJETIVOS**

### **1.6.1 OBJETIVOS GENERAL**

Obtener bioetanol a escala laboratorio, por hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal.

### **1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar el análisis físico-químico de la variedad de papa cardenal.
- Determinar los parámetros necesarios para el proceso de hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal.
- Realizar una optimización del tiempo del proceso de hidrolisis enzimática
- Realizar el proceso de fermentación alcohólica del producto obtenido del proceso de hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal.
- Efectuar el análisis físico-químico del producto final.

## 1.7 JUSTIFICACIÓN

En la industria de los biocombustibles es preciso establecer un modelo sostenible a partir del uso de fuentes renovables para proporcionar mayor seguridad al suministro de energía (biogás, biodiesel y etanol).

El bioetanol obtenido a partir del almidón de papa cardenal es una fuente renovable, sostenible y una alternativa económicamente viable debido a su alto rendimiento en la producción de bioetanol. Un estudio realizado por la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el 2008 indica que por cada tonelada métrica de papa se producen 110 litros de bioetanol que es mayor a la producida por la caña de azúcar.

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) en nuestro país la producción de papa se realiza en dos temporadas al año con un promedio de producción de 1.080,050 toneladas en un superficie de 190,209 ha.

Según los datos del Instituto Boliviano de Comercio Exterior (IBCE) Bolivia requiere de al menos 490 mil toneladas del tubérculo para abastecer su mercado interno.

La demanda anual de papa en Bolivia es de 490 mil toneladas que equivale aproximadamente a un medio de la oferta del producto en el mercado interno alcanzando un excedente de producción en Bolivia de 590,050 toneladas al año que equivalen en caso de ser procesadas, alrededor de 64.905,500 litros de alcohol al año.

A continuación se mencionan las razones más relevantes por las cuales este proyecto debe realizarse:

**Aspecto social:** Los productores de papa en las regiones tendrán una nueva alternativa para la venta de su producto como materia prima para la elaboración de bioetanol garantizando la compra del mismo; esto conlleva la ampliación de nuevas tierras agrícolas la generación de empleo en las regiones, mejorando la calidad de vida de los agricultores.

**Aspecto ambiental:** El etanol en la mezcla con gasolina reduce las emisiones de monóxido de carbono (CO) sin incrementar la de Óxidos Nitrosos (NO<sub>x</sub>). La mezcla de 10% de etanol al combustible trae los siguientes beneficios: reducción de un 30% de las emisiones de monóxido de carbono y disminución entre un 6% y un 10% de reducción de las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a la atmósfera.

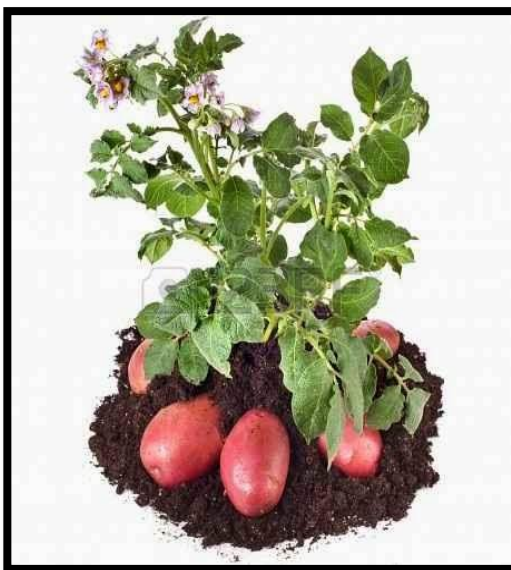
## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 DESCRIPCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La papa (*Solanum tuberosum*) es una planta herbácea anual que crece hasta los 100 cm de alto. Durante el crecimiento de la planta de papa, sus hojas compuestas van preparando el almidón que es transferido posteriormente hacia los tallos subterráneos (o estolones). Estos tallos se engrosan para formar tubérculos cerca de la superficie del suelo. Se pueden llegar a formar de unos pocos hasta 20 tubérculos (figura 2-1). El número de tubérculos que llegan a la madurez depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes en el suelo.

Figura 2-1 La papa (*Solanum tuberosum*)



Fuente: Paperblog.com (2012).

Posee un importante contenido de almidón, que en promedio puede alcanzar el 18%. Su contenido en proteína y grasa es bajo y presenta una gran variedad de posibilidades para ser industrializada y obtener productos con valor agregado de gran aceptación por parte del consumidor en general.

### **2.1.1 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA**

La papa (*Solanum tuberosum*), tiene como nombre común patata y según el Centro Internacional de la Papa con sede en Perú mantiene clasificada de la siguiente manera:

- Reino: Vegetal
- Clase: Angiospermae
- Subclase: Dicotyledoneae
- Orden: Tubiflorae
- Familia: Solanaceae
- Género: Solanum
- Nombre científico: (*Tuberosum solanum*)

### **2.1.2 COMPOSICIÓN DE LA PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM*)**

En la papa se encuentran componentes nutritivos (energía, macro y micronutrientes) y componentes no nutritivos (agua, celulosa, hemicelulosa, pectina, glucoalcaloides, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros minoritarios. Luego de su cosecha los tubérculos contienen en promedio 80% de agua y 20% de materia seca (60% de esta corresponde a almidón) (Pertuz, S. 2014).

En la Tabla II-1 se muestra la composición química de la papa que incluye la cascara.



Tabla II-1 Composición química de la papa.

<b>Nutriente</b>	<b>100 Gramos de parte comestible (incluye cáscara)</b>
Calorías	84 kcal/g
Agua	76
Proteína	1,9
Grasa	0,1
Carbohidratos	19,3
Azúcares invertidos	0,11
Fibra	1
Ceniza	1
Minerales	mg/100 gramos de parte comestible (incluye cáscara)
Calcio	4
Fosforo	26
Hierro	1,1
Ácido ascórbico	20

Fuente: Moreno. B, 1986

La composición se puede modificar por factores tales como la variedad, la localidad donde se produce, el tipo de suelo, el clima y las condiciones de cultivo. Las enfermedades, las plagas, la duración de los ciclos productivos también afectan. De igual manera la composición se modifica con la preparación a nivel casero y con su procesamiento a nivel industrial (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.3 ENERGÍA**

Tradicionalmente se ha reconocido que los tubérculos cumplen un rol energético en la alimentación por cuanto su componente mayoritario en materia seca corresponde al almidón. A pesar de ello, comparado con alimentos equivalentes tales como el plátano y la yuca, su aporte calórico es menor y se le considera de baja densidad calórica (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.4 CARBOHIDRATOS**

La papa es un alimento que contiene cantidades importantes de carbohidratos los cuales se encuentran mayoritariamente como almidón y un pequeño porcentaje como azúcares (Sacarosa, fructosa, glucosa) (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.5 PROTEÍNA**

El contenido de proteína de la papa, aunque inferior al aportado por alimentos de origen animal, es superior al aportado por la mayoría de los cereales, tubérculos y raíces. La calidad de la proteína es inferior por la presencia de glucoalcaloides y de inhibidores de las proteínas. Para mejorar el perfil de aminoácidos de su proteína y por ende la calidad de la proteína consumida, se recomienda el consumo de papa en preparaciones que se combinen o incluyan ingredientes como leguminosos, carnes, leche o derivados (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.6 GRASA**

El contenido de grasa de las papas es muy bajo lo cual constituye una ventaja para individuos con restricciones de calorías y/o de grasas dietarias. Dado el incremento en la 3 población de morbilidad por enfermedades crónicas no transmisibles, patologías que requieren limitar el consumo de calorías, se recomienda la moderación en el consumo de papas fritas (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.7 VITAMINAS**

Los tubérculos aunque contienen vitaminas, no son considerados alimentos fuente de estos nutrientes. Las vitaminas que se encuentran en el tubérculo son el ácido ascórbico, B1, B6 y niacina. Se concentran principalmente en la piel y en la cáscara. La vitamina C sobresale por su alta reactividad y por las altas pérdidas por oxidación. Tras la cocción o el procesamiento a nivel industrial las pérdidas son significativas (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.8 MINERALES**

El contenido de minerales en el tubérculo depende directamente de la naturaleza del suelo donde es cultivado, por tal razón el contenido de minerales es variable. Sobresalen los altos aportes de potasio, fósforo y el bajo contenido de ácido fítico y de sodio. Este último aspecto es una ventaja para personas con regímenes alimentarios que restringen el aporte de sodio en la dieta (Pertuz, S. 2014).

### **2.1.9 COMPONENTES NO NUTRITIVOS**

Incluyen los siguientes componentes:

#### **2.1.10 FIBRA**

En la cáscara o piel los tubérculos tienen pectina en forma de pectatos solubles de calcio que favorecen la adhesión a la médula, celulosa, lignina y hemicelulosas. Aunque los tubérculos aportan estos componentes se hace necesario complementar dicha ingesta con el consumo de alimentos tipo leguminosas, frutas y hortalizas (Pertuz, S. 2014).

#### **2.1.11 ÁCIDOS ORGÁNICOS**

Los ácidos orgánicos contribuyen con el pH característico del alimento: pH de 5.6-6.2. Los más representativos son el málico, el cítrico y el clorogénico que reacciona con iones de hierro (Pertuz, S. 2014).

Otro compuesto presente en él es la solanina, producida en pequeñas cantidades (menos de 0,2 mg/g de producto), pero que se incrementa hasta 1 mg/g o más en determinadas condiciones (por exposición prolongada a la luz o lesiones mecánicas). Aunque a estas

concentraciones la patata es tóxica, el pelado y el tratamiento térmico (como la cocción o la fritura) permiten destruir esta sustancia; sin embargo, permanece su sabor amargo (Pertuz, S. 2014).

## **2.2 ALMIDÓN**

El almidón “es un hidrato de carbono complejo  $(C_6H_{10}O_5)_n$  inodoro e insípido, en forma de grano o polvo. El almidón es el principal carbohidrato de reserva en la mayoría de las plantas” (Brumovsky, L. 2010).

El almidón proviene de diversas fuentes con diferentes estructuras cristalinas. Los granos de cereal como maíz, trigo o arroz son fuentes de almidón, como lo son raíces y tubérculos. Por ejemplo la tapioca y la papa se usan frecuentemente en la preparación de alimentos sin gluten (Brumovsky, L. 2010).

### **2.2.1 COMPOSICIÓN DEL ALMIDÓN**

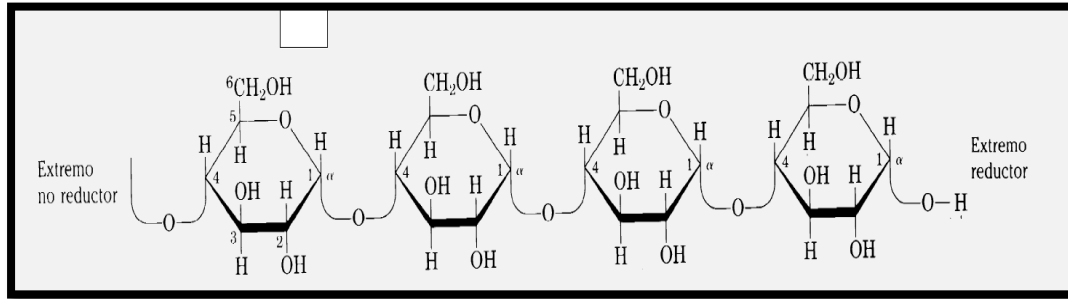
El almidón está constituido por dos moléculas, amilosa y amilopectina, y ambas partes están conectadas por uniones glicosídicas (Brumovsky, L. 2010).

#### **2.2.2 AMILOSOSA**

Las moléculas de amilosa supone aproximadamente la cuarta parte del almidón (en algunas variedades como ser los almidones céreos no contienen amilosa). La amilosa es una cadena lineal compuesta por miles de unidades de glucosa con uniones entre carbono 1 y el carbono 4 de las unidades glucosa (ver la figura 2-2) y, por lo tanto, constituida por uniones glicosídicas  $\alpha$ -1,4. La amilosa forma una red tridimensional cuando se asocian las moléculas al enfriarse y es responsable de la gelificación de la pasta cocidas frías de almidón (Brumovsky, L. 2010).

Los almidones ricos en amilosa mantienen su forma cuando se moldean; gelifican, mientras que los almidones sin amilosa espesan pero no gelificar (Brumovsky, L. 2010).

Figura 2-2 Amilosa, polímero de unidades de D – glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1.4.

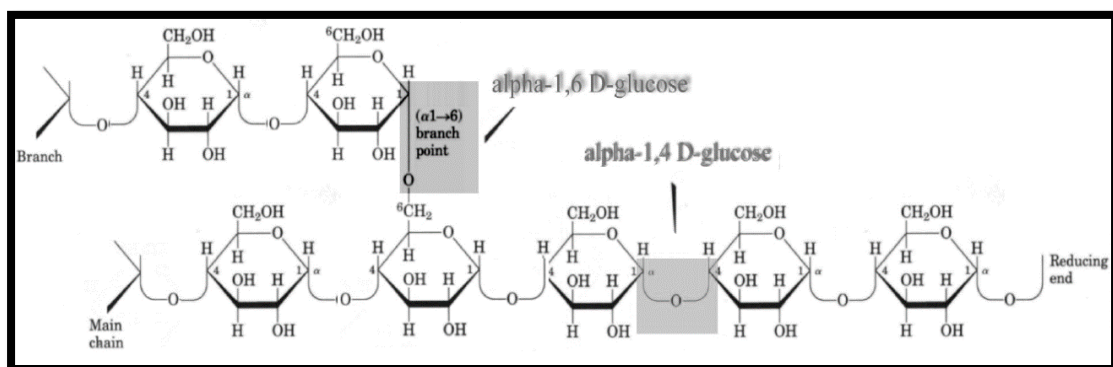


Fuente: Brumovsky, L. 2010.

### 2.2.3 AMILOPECTINA

Las moléculas de amilopectina suponen aproximadamente tres cuartos de los polímeros en un granulo de almidón. La cadena de glucosa de la amilopectina contiene uniones  $\alpha$ -1,4 con ramificaciones  $\alpha$ -1,6 cada 15-30 unidades de glucosa de la cadena (ver la figura 2-3). Las uniones son entre el carbono 1 de la glucosa y el carbono 6 de la ramificación. Las cadenas son muy ramificadas (pero menos ramificadas que la forma de carbohidratos de reserva animal, el glucógeno). Los almidones con un alto contenido de amilopectina espesaran una mezcla pero no formaran un gel porque, a diferencia de la amilosa, las moléculas de amilopectina no se asocian y forman enlaces químicos (Brumovsky, L. 2010).

Figura 2-3 Amilopectina ramificación con enlace  $\alpha$ -1,6.



Fuente: Brumovsky, L. 2010.

### 2.3 CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN ALMIDÓN

Las propiedades tecnológicas del almidón dependen mucho de su origen, y de la relación amilosa/ amilopectina, tanto cuando forma parte de un material complejo (harina). En la tabla II-2 se muestra el contenido de amilosa y amilopectina de distintas fuentes (Brumovsky, L. 2010).

Tabla II-2 Contenido de amilosa y amilopectina en almidón.

Tipo de almidón	Contenido de amilosa %	Contenido de amilopectina %
Maíz	25	75
Mandioca	17	83
Papa	20	80
Trigo	25	75
Arroz	19	81
Maíz de alta amilosa	55-90	45-10

Fuente: Brumovsky, L. 2010.

### 2.4 HIDRÓLISIS

Se denomina hidrólisis a las reacciones de la química inorgánica, en donde el agua efectúa una doble descomposición con otro compuesto, (el H<sup>+</sup> va en un componente y el OH<sup>-</sup> va en el otro). Este término también puede aplicarse a reacciones en donde un ácido se añade al agua, en mayor o menor cantidad para acelerar la reacción; esta hidrólisis puede llevarse a cabo con ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos o por acción enzimática, la cual es la más utilizada industrialmente.

Con la finalidad de transformar las moléculas del almidón en azúcares fermentables los cuales son asimilados por las levaduras o bacterias el almidón es sometido a un proceso de hidrolisis mediante el cual ocurre un desdoblamiento ya sea por un exceso de agua o por la presencia de una pequeña cantidad de fermento o acido.

### **2.4.1 HIDROLISIS QUÍMICA DEL ALMIDÓN**

El almidón tratado con ácidos se rompe en cadenas cortas de dextrina. El grado de degradación depende de la concentración del ácido, la temperatura, y el tiempo de hidrólisis. A medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta (Vasquez, M. 2012).

Los ácidos utilizados para la producción de dextrinas son el Ácido clorhídrico y el Ácido Nítrico. Si hervimos el almidón con ácido Clorhídrico 1N durante 1 hora, el almidón se rompe totalmente y se reduce a glucosa; esta reacción es conocida como hidrólisis intensa (Vasquez, M. 2012).

Los productos de degradación son principalmente el hidroximetulfurtutal, el ácido levulinico, y el ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo. La recombinación de unidades de D-glucosa o de esta con fragmentos como maltosas, conducen a la formación de productos de reversión los cuales pueden ser hidrolizados, un ejemplo de estos productos en la Genciobiosa (Vasquez, M. 2012).

Mediante este procedimiento se logra el desdoblamiento de las moléculas de almidón por la acción de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico diluidos. La clase de ácido, su concentración, la cantidad empleada referida a la cantidad de almidón, así como la presión y la temperatura ejercen gran influencia en la duración de la sacarificación. Por lo general, la cantidad de ácido empleado es tal que el valor de pH se ajuste a 1.5 paz una solución al 33% de almidón (Vasquez, M. 2012).

El agua utilizada, de ser lo más pura posible y libre de hierro, ya que el ácido fosfórico que existe en el almidón forma después de neutralizarse fosfatos de hierro insolubles, finamente dividido, quedando en suspensión en el jarabe y es muy difícil su separación por filtración (Vasquez, M. 2012).

## 2.4.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN

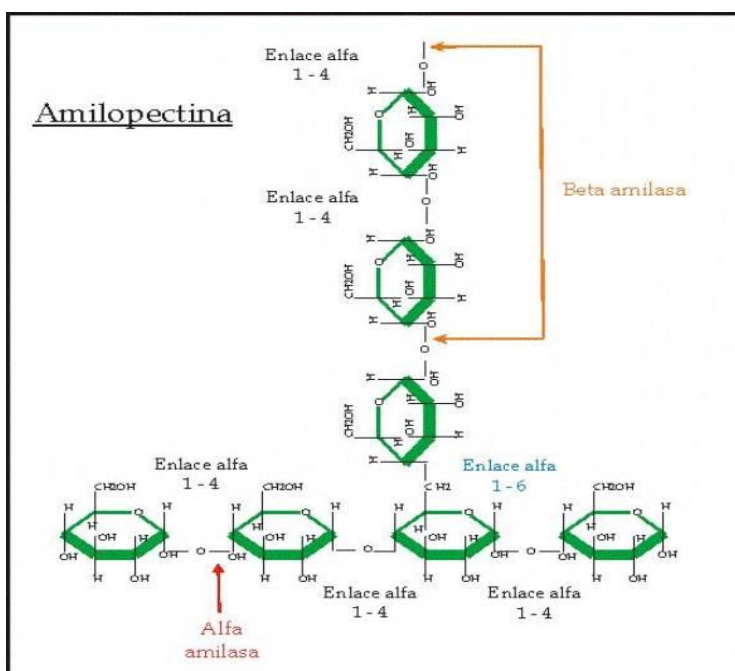
Para obtener etanol a partir del almidón es necesario romper las cadenas de este polisacárido para obtener jarabe de glucosa, el cual se puede convertir en etanol mediante las levaduras.

De cada 100 g de almidón se puede obtener teóricamente 111g de glucosa lo que implica una relación estequiometría de 9:10 (Sánchez, O. 2005).

El etanol se obtiene de mayor medida a partir del almidón de maíz. El almidón fue tradicionalmente hidrolizado mediante ácido, pero la especificidad de las enzimas, sus condiciones suaves de reacción y la ausencia de reacciones secundarias han hecho que las  $\alpha$ -amilasa sean las catalizadoras usadas para esta tarea (Sánchez, O. 2005).

Para la hidrólisis del almidón se usa la  $\alpha$ -amilasa lo que le hace idea para la primera etapa de la hidrólisis de la suspensión del almidón que tienen que ser llevadas a las temperaturas de (70 - 90) °C para el rompimiento de estos gránulos de almidón provenientes de un tubérculo. (Ver figura 2-4) (Carrera, C. 2004)

Figura 2-4 Hidrólisis de amilopectina por acción de alfa y beta amilasa

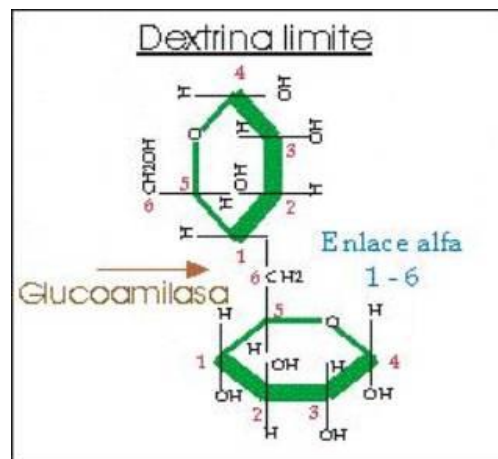


Fuente: cervezadeargentina.com (2010)



El producto de esta etapa o licuefacción es una solución de almidón que contiene dextrinas (oligosacáridos compuesto por varias unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de glucosa. El almidón licuado se somete a sacarificación a menor temperatura (60-70) °C con la segunda enzima glucoamilasa la cual hidroliza la dextrina hasta glucosa (ver la figura 2-5) (Sánchez, O. 2005).

Figura 2-5 La transformación de la dextrina a glucosa por acción de la glucoamilasa.



Fuente: cervezadeargentina.com (2010)

## 2.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación tiene por objeto modificar la condición química de la materia susceptible de transformación, como los azúcares, por acción de la levadura, convirtiéndola en alcohol etílico y gas carbónico (CO<sub>2</sub>). Este proceso va acompañado de una disminución del peso del mosto, conociéndose como atenuación del porcentaje de extracto que se modifica durante el transcurso de la fermentación.

A medida que la fermentación alcohólica transcurre (3°GL) la población de levadura decrece y va siendo sustituida como población dominante por *S. Cereviciae*, particularmente del tipo *Ellipsoideus*; cuando alcanza los (6°GL) la población inicial desaparece. Al final de la fermentación predominan cepas altamente resistentes al alcohol como *S. bayanus* y *S. Cereviciae* como *uvarum* y en ocasiones *Italicus* (Villada, P. 2010).

Las levaduras transforman los azúcares mayoritarios del mosto (fructosa, glucosa) en etanol y CO<sub>2</sub>; paralelamente transforman al principio de la fermentación parte de los azúcares en glicerina y ácido pirúvico dando lugar a la denominada fermentación glicero - piruvica: el ácido pirúvico a su vez da lugar a otros productos secundarios que se forman principalmente cuando existe una deficiencia de tiamina en el medio. Además, se produce por rutas alternativas otros ácidos orgánicos entre los que se destacan el ácido málico, succínico y fumarico, que posteriormente puede sufrir transformaciones por reacciones químicas (láctica, succínico y málico generan respectivamente, lactato de etilo, succinato de dietilo y malato de dietilo) o microbiológica por acción de las bacterias malolácticas (Villada, P. 2010).

Para que la fermentación alcohólica se produzca de manera favorable son necesarias varias condiciones, comprendidas en tres formas:

- Condiciones biológicas: levaduras, su selección, desarrollo y acción.
- Condiciones físicas: temperatura, presión y operación mecánica.
- Condiciones químicas: ácidos, oxígeno, sustancias y proceso químicos.

### **2.5.1 CINÉTICA DE FORMACIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO**

El proceso por el cual las células degradan las moléculas de alimento para obtener energía recibe el nombre de respiración celular.

La respiración celular es una reacción exergónica, donde parte de la energía contenida en las moléculas de alimento es utilizada por la célula para sintetizar ATP. Decimos parte de la energía porque no toda es utilizada, sino que una parte se pierde (Márquez, S. 2008).

La respiración ocurre en distintas estructuras celulares. La primera de ellas es la **glucólisis** que ocurre en el citoplasma. La segunda etapa dependerá de la presencia o ausencia de O<sub>2</sub> en el medio, determinando en el primer caso la respiración aeróbica (ocurre en las mitocondrias), y en el segundo caso la respiración anaeróbica o fermentación (ocurre en el citoplasma) (Márquez, S. 2008).

### 2.5.1.1 GLUCÓLISIS

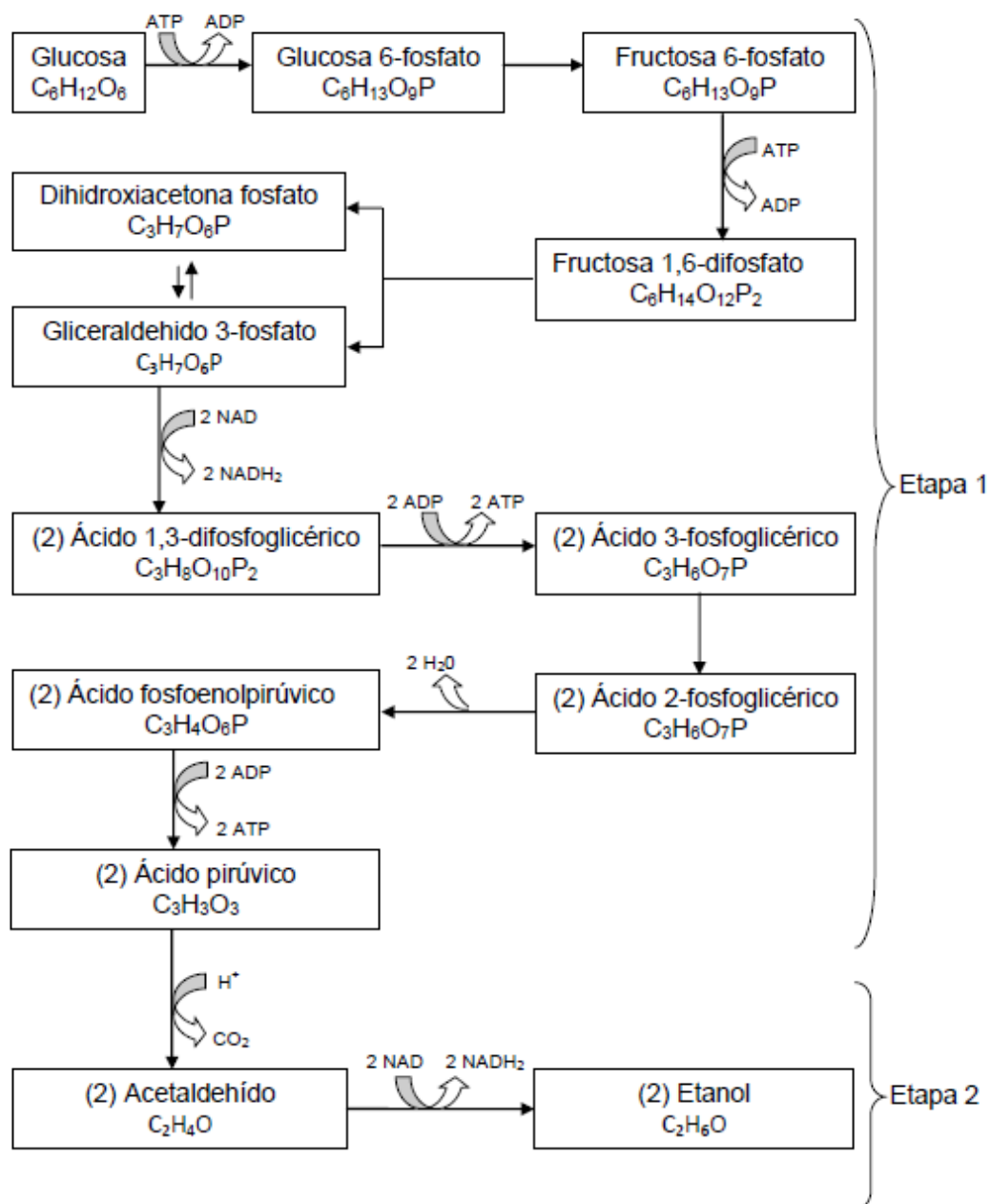
La glucólisis o **escisión de la glucosa**, tiene lugar en una serie de nueve reacciones, cada una catalizada por una enzima específica, hasta formar dos moléculas de ácido pirúvico, con la producción concomitante de ATP. La ganancia neta es de dos moléculas de ATP, y dos de NADH por cada molécula de glucosa (Márquez, S. 2008).

Las reacciones de la glucólisis se realizan en el citoplasma, como ya adelantáramos y pueden darse en condiciones anaerobias; es decir en ausencia de oxígeno.

Los primeros cuatro pasos de la glucólisis sirven para fosforilar (incorporar fosfatos) a la glucosa y convertirla en dos moléculas del compuesto de 3 carbonos gliceraldehído fosfato (PGAL). En estas reacciones se invierten dos moléculas de ATP a fin de activar la molécula de glucosa y prepararla para su ruptura (Márquez, S. 2008).

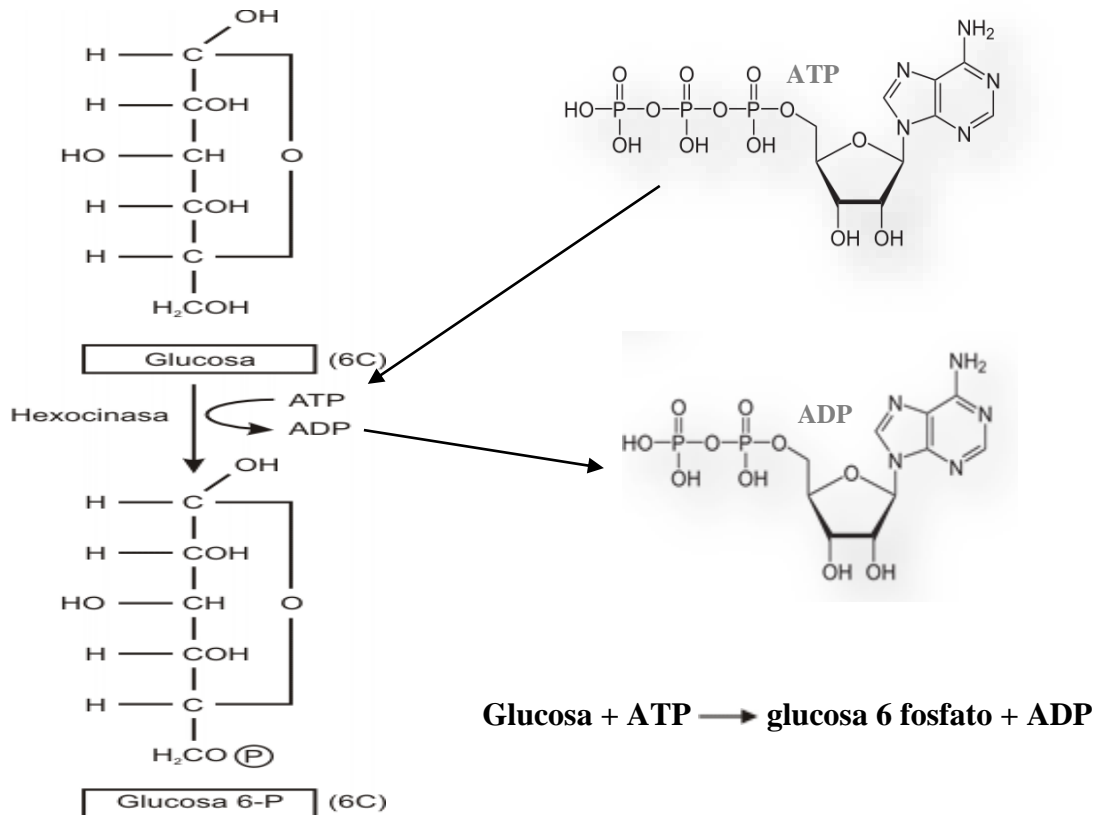
Como ejemplo se muestra la ruta metabólica de formación del alcohol por acción de una levadura (ver figura 2-6)

Figura: 2-6 Ruta metabólica de formación del alcohol



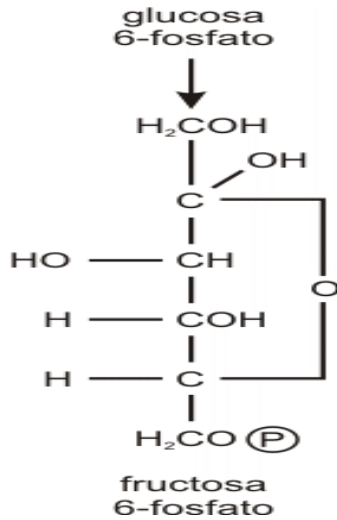
Ruta metabólica de formación de la glucosa a ácido pirúvico requiere nueve pasos que describiremos a continuación

**Paso 1** La serie de reacciones glucolíticas se inicia con la activación de la glucosa (Márquez, S. 2008).



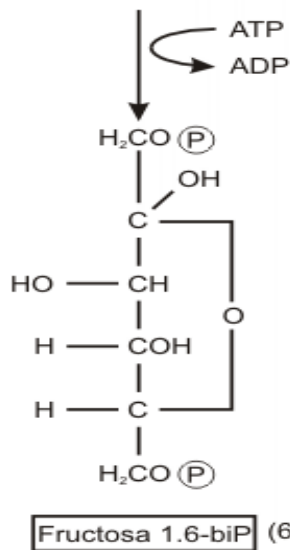
La reacción del ATP con la glucosa para producir glucosa 6-fosfato y ADP es exergónica. Parte de la energía liberada se conserva en el enlace que une al fosfato con la molécula de glucosa que entonces se energiza (Márquez, S. 2008).

**ATP o trifosfato de adenosina** es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular. Está formado por una base nitrogenada (adenina) unida al carbono 1 de un azúcar de tipo pentosa, la ribosa, que en su carbono 5 tiene enlazados tres grupos fosfato. Es la principal fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares.

**Paso 2**

La glucosa 6-fosfato sufre una reacción de reordenamiento catalizada por una isomerasa, con lo que se forma fructosa 6-fosfato (Márquez, S. 2008).

Fructosa 6-P (6C) **Paso 3**



La fructosa 6-fosfato acepta un segundo fosfato del ATP, con lo que se genera fructosa 1,6-difosfato; es decir fructosa con fosfatos en las posiciones 1 y 6.

La enzima que regula esta reacción es la fosfofructocinasa (Márquez, S. 2008).

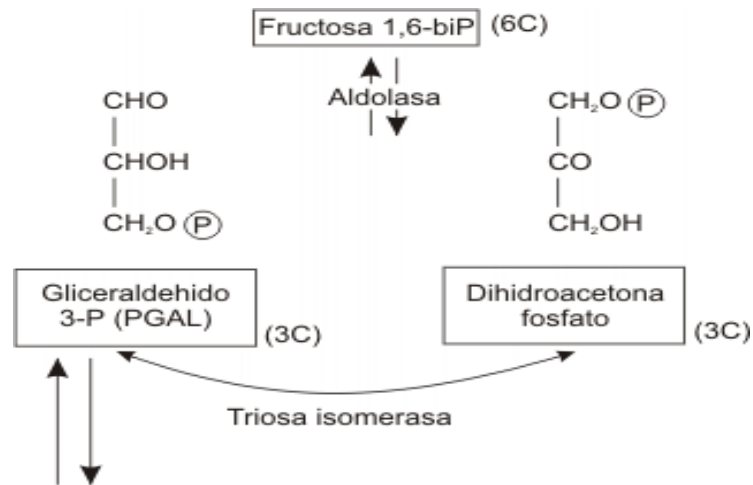
**Nota:** hasta ahora se han invertido dos moléculas de ATP y no se ha recuperado energía.

La fosfofructocinasa o **fosfofructoquinasa** es la enzima quinasa que fosforila a la fructosa 6-fosfato en la glicólisis.

Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la fructosa 6-fosfato para formar un derivado bisfosfato. (Márquez, S. 2008).

#### Paso 4

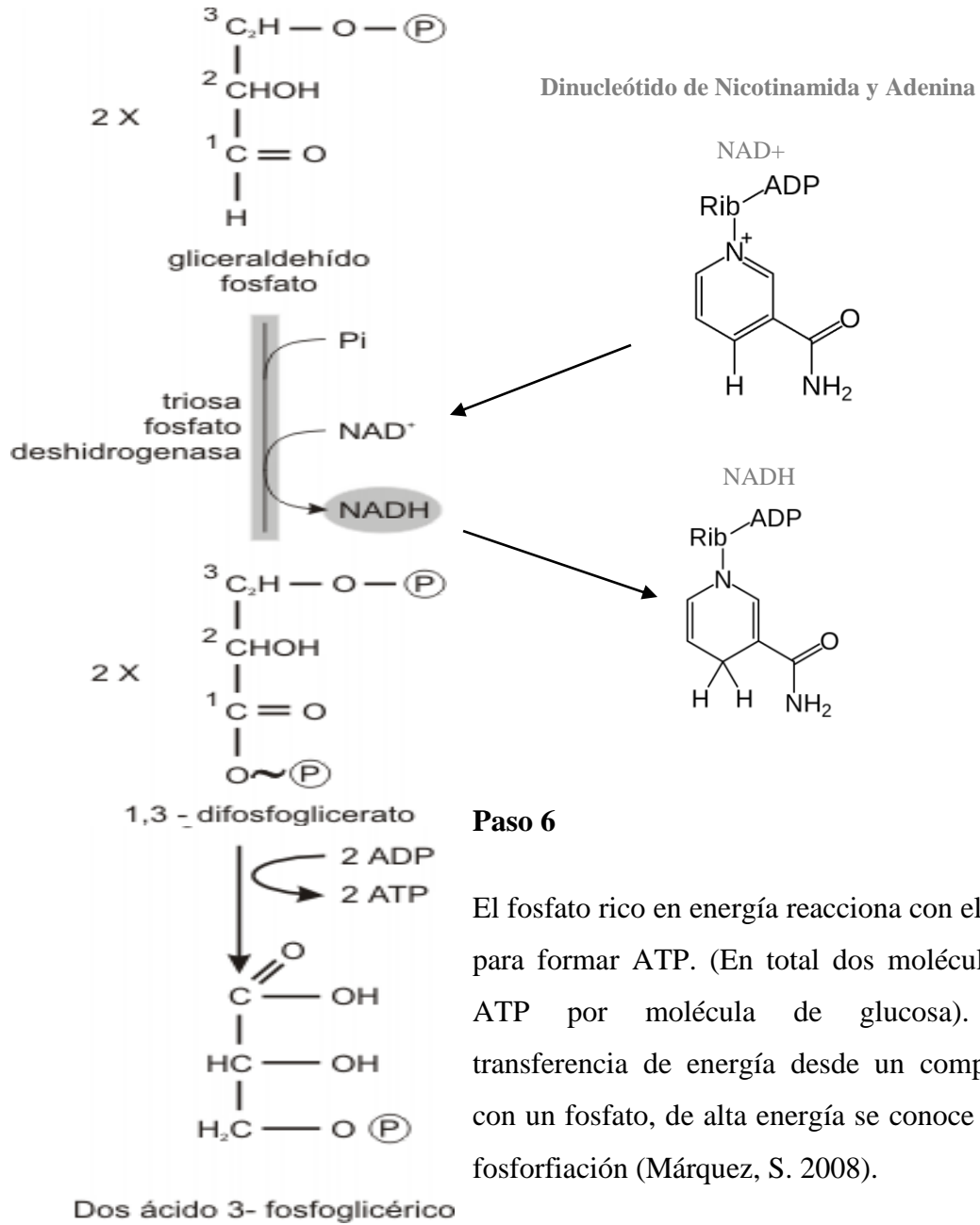
La fructosa 1,6 -difosfato se divide luego en dos azúcares de 3 carbonos, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. La dihidroxiacetona fosfato es convertida enzimáticamente (isomerasa) en gliceraldehído 3 fósforo. Todos los pasos siguientes deben contarse dos veces para tener en cuenta el destino de una molécula de glucosa (Márquez, S. 2008).



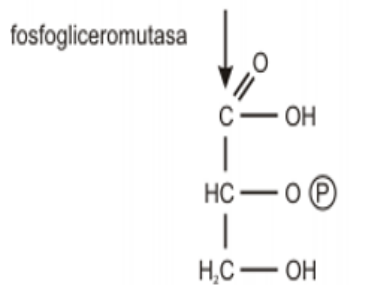
Se debe recordar que hasta el momento no se ha obtenido ninguna energía biológicamente útil. En reacciones subsecuentes, la célula recupera parte de la energía contenida en el PGAL.

#### Paso 5

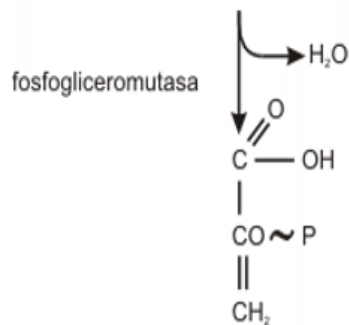
Las moléculas de PGAL se oxidan es decir, se eliminan átomos de hidrógeno con sus electrones, y el  $\text{NAD}^+$  se reduce a NADH. Esta es la primera reacción de la cual la célula cosecha energía. El producto de esta reacción es el fosfoglicerato. Este compuesto reacciona con un fosfato inorgánico (Pi) para formar 1,3 difosfoglicerato. El grupo fosfato recién incorporado se encuentra unido por medio de un enlace de alta energía (Márquez, S. 2008).





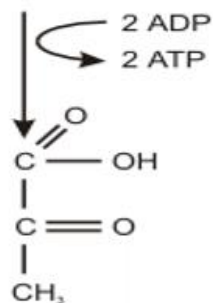


Dos ácido 2 - fosfoglicérico



Dos ácido fosfoenolpirúvico

Dos ácido fosfoenolpirúvico



Dos ácido pirúvico



Hacia la acetilcoenzima A

### Pasó 7

El grupo fosfato remanente se transfiere enzimáticamente de la posición 3 a la posición 2 (ácido 2-fosfoglicérico) (Márquez, S. 2008).

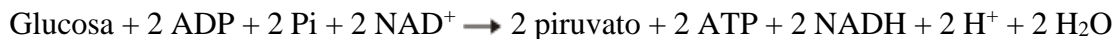
### Pasó 8

En este paso se elimina una molécula de agua del compuesto 3 carbonos. Este reordenamiento interno de la molécula concentra energía en la vecindad del grupo fosfato. El producto es el ácido fosfoenolpirúvico (PEP) (Márquez, S. 2008).

### Pasó 9

El ácido fosfoenolpirúvico tiene la capacidad de transferir su grupo fosfato a una molécula de ADP para formar ATP y ácido pirúvico. (Dos moléculas de ATP y ácido pirúvico por cada molécula de glucosa) (Márquez, S. 2008).

Ecuación de la glucólisis



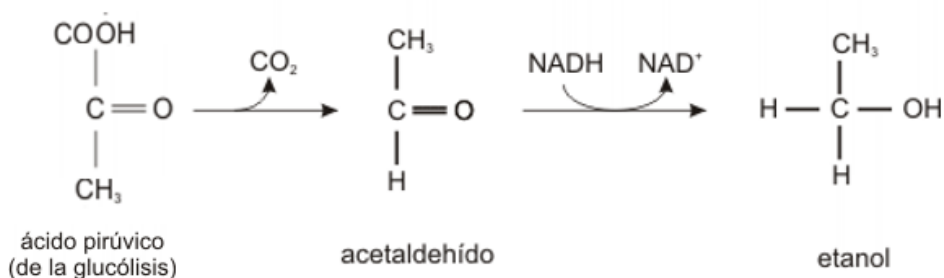
### 2.5.1.2 VÍAS ANAERÓBICAS

El ácido pirúvico puede ingresar o ser consumida por varias vías. Las dos son anaeróbicas (sin oxígeno) y se denomina fermentación alcohólica y fermentación láctica. A la falta de oxígeno, el ácido pirúvico puede convertirse en etanol (alcohol etílico) (ver figura 2-7) o ácido láctico (ver figura 2-8) según el tipo de célula.

### 2.5.1.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El ácido pirúvico formado en la glucólisis se convierte anaeróticamente en etanol. En el primer caso se libera dióxido de carbono, y en el segundo se oxida el NADH y se reduce a acetaldehído (Márquez, S. 2008).

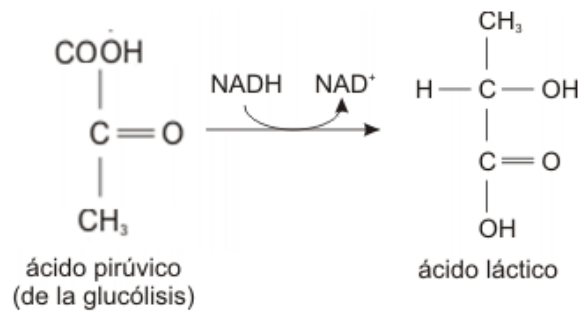
Figura 2-7 formación del etanol a partir del ácido pirúvico



### 2.5.1.4 FERMENTACIÓN LÁCTICA

En esta reacción el NADH se oxida y el ácido pirúvico se reduce transformándose en ácido láctico.

Figura 2-8 Formación del ácido láctico a partir del ácido pirúvico



El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono por 1 gramo de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac.

En realidad es difícil obtener este rendimiento porque, como se mencionó anteriormente, la levadura utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g (Vázquez. H. 2007).

## 2.6 LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN

Se denomina levadura a cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

### 2.6.1 LA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Es la especie de mayor uso en la industria vinícola. Se describe normalmente como un anaerobio facultativo, de modo que crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di-, y

oligo-sacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida, la cual metaboliza a etanol (ver figura 2-9). Se trata generalmente de levaduras apiculadas, es decir con forma de limón, que tienen un bajo poder fermentativo (hasta 4-5 % Vol.) (Dickinson, J. 2003).

Figura 2-9 *Saccharomyces cerevisiae*



Fuente: Dourbano (2015)

### **2.6.2 LA LEVADURA SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS**

Se desarrolla en el mosto de fermentación de la cerveza. Fermenta glucosa, maltosa y sacarosa (Dickinson, J. 2003).

### **2.6.3 LA LEVADURA SACCHAROMYCES PASTORIANUS**

Una vez que se han superado los 4-5 % Vol. de alcohol, otras especies de levaduras dominan el proceso como es el caso de *Saccharomyces pastorianus* y otras.

Hay 3 variedades, una de ellas produce vinos secos de sabor áspero. Las otras actúan sobre la cerveza produciendo líquidos turbios y de sabor amargo (Dickinson, J. 2003).

### **2.6.4 LA LEVADURA WILLIA ANÓMALA**

Se aisló en una levadura de cerveza. Forma velo gris en la superficie de los líquidos y produce olor a esencias y frutas. Fermenta la glucosa pero no descompone la maltosa y sacarosa (Dickinson, J. 2003).

Dado que la mayoría de las levaduras sólo actúan sobre la glucosa mientras que, muy pocas lo hacen sobre la maltosa y la dextrina, en la obtención de alcohol a escala industrial hay que recurrir a hongos ricos en amilasas (proteínas) que hidrolizan el

almidón y la dextrina. Algunos de estos hongos prosiguen la transformación descomponiendo los azúcares obtenidos en alcohol, como el *Aspergillus oryzae* que produce el sake (alcohol de arroz) (Dickinson, J. 2003).

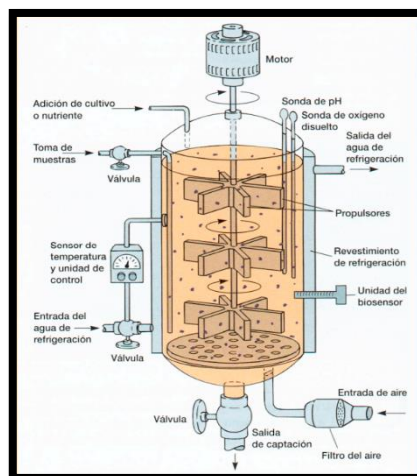
## 2.7 TIPOS DE FERMENTACION

El mantenimiento de un ambiente aséptico y de condiciones aeróbicas son, probablemente, los dos puntos de mayor relevancia que hay que considerar. Los fermentadores más ampliamente utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación así como de sistemas para el control de la temperatura, pH y formación de espuma.

### 2.7.1 FERMENTACIÓN DISCONTINUA

Una fermentación discontinua o batch puede ser considerada como un sistema cerrado (ver figura 2-9). Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade más nutrientes. En algunas ocasiones se añade un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH de la fermentación. (Mateos, P. 2010).

Figura 2-10 Reactor Batch



Fuente: Darwin, 2010.

### **2.7.2 FERMENTACIÓN CONTINÚA**

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al reactor y una cantidad equivalente del cultivo, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema (Mateos, P. 2010).

De este tipo tenemos los siguientes:

- Tanque Agitado.
- Columnas empacadas con enzima inmovilizada.
- Torres de lecho fluidizado donde el flujo del medio mantiene suspendidos los microorganismos.

Además tomando en cuenta el estado físico de la mezcla reaccionante, los fermentadores se pueden dividir en:

- Homogéneos.-En los cuales las reacciones ocurren en una solo fase.
- Heterogéneos.- Donde se presentan en dos o más fases.

### **2.8 DESTILACIÓN**

La destilación es una operación unitaria que consiste en la separación de los componentes de una mezcla líquida (en la que todos los compuestos son más o menos volátiles) por evaporación y condensación sucesivas. La separación se basa en la diferencia de volatilidades absolutas de los componentes, lo que tiene como consecuencia la formación de un vapor de composición diferente a la del líquido del que procede (Ocon, J. 2005).

Lógicamente, cuanto mayor sea la diferencia de volatilidades mayor será la separación que se puede conseguir (Ocon, J. 2005).

Los distintos métodos empleados en la destilación se pueden clasificar en los siguientes:

## **2.8.1 DESTILACIÓN SIMPLE**

Consiste en la evaporización parcial de una mezcla con producto de vapor más rico en componentes más volátiles que la mezcla líquida inicial quedando un residuo líquido más rico en componente menos volátiles; se puede llevar a cabo de dos maneras (Ocon, J. 2005).

### **2.8.1.1 DIFERENCIAL O ABIERTA**

Este método de destilación es el que se efectúa normalmente en los laboratorios cuando se trabaja sin reflujo. llenando continuamente los vapores producidos hasta un condensador. La operación se realiza calentando la mezcla líquida inicial hasta su temperatura de ebullición y retirando continuamente los vapores producidos. A medida que transcurre la operación el líquido se empobrece en componente más volátil elevándose continuamente la temperatura de ebullición de la mezcla; del mismo modo los vapores producidos son cada vez más pobre en componente más volátil y su temperatura de condensación aumenta continuamente (Ocon, J. 2005).

### **2.8.1.2 CERRADA O DE EQUILIBRIO**

En este caso el líquido se lleva a una temperatura intermedia entre la de principio y fin de ebullición, dejando que la fase vapor formada alcance el equilibrio con la fase líquida a aquella temperatura. Por aplicación de un balance de materia aplicado a todo el sistema y al componente más volátil, llegamos a la expresión (Ocon, J. 2005).

$$L/V = (y - x_o) / (x_o - x)$$

que nos da la relación entre las cantidades de líquido residual L y la cantidad de vapor V, en función de la composición inicial del líquido  $x_o$ , y la composición del líquido y vapor en equilibrio a la temperatura y presión dada,  $x$  y  $y$ .

Sobre el diagrama de ebullición, construido a la presión de la operación, se leen directamente las composiciones del líquido y de vapor en equilibrio, en función de la composición del líquido inicial y de la temperatura de trabajo (Ocon, J. 2005).

También podemos mencionar otros métodos de destilación simple que son:

- Condensación parcial.
- Condensación diferencial o abierta.

### **2.8.2 DESTILACIÓN POR RECTIFICACIÓN**

La operación por rectificación consiste en hacer circular en contracorriente el vapor de una mezcla con el condensado procedente del mismo vapor, en un aparato denominado columna de rectificación (Ocon, J. 2005).

Las partes esenciales de una columna de rectificación son; la columna propiamente dicha, que es donde se verifica el contacto íntimo entre el líquido y el vapor; calderín, situado en la base de la columna en donde se hace hervir la mezcla a separar; y el condensador de reflujo situado en la cúspide de la columna, que se encarga de suministrar el líquido descendiente para su contacto con el vapor (Ocon, J. 2005).

Para logra el íntimo contacto entre las fases líquidas y vapor al objeto de establecer el intercambio de materia entre ambas fases interesa que la superficie y el tiempo de contacto sean suficientes; en la práctica este contacto se logra con dos dispositivos diferentes: el de los platos de borboteo que retiene el líquido a treves del cual se va a obligar a pasar el vapor, y el de los cuerpos de relleno, que llenan el interior de la columna verificándose el contacto entre las fase sobre la superficie de estos cuerpos de relleno (Ocon, J. 2005).

Podemos mencionar los siguientes procesos de destilación por rectificación:

- Rectificación continúa.
- Rectificación descontinua.
- Destilación con arrastre de vapor.



## CAPITULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación aplicada ha sido desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Operaciones Unitarias (LOU), dependiente del Departamento de Procesos Industriales Biotecnológicos y Ambientales (DPIBA) de la Facultad de Ciencias y Tecnología.

#### 3.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA PAPA CARDENAL

La papa empleada para la obtención de bioetanol es la variedad cardenal de alta productividad en el departamento de Tarija, adquirida del mercado local donde se determinó humedad, proteínas totales, almidón y azúcares totales (ver tabla III-1). Se muestra los resultados del análisis proximal de la materia prima realizada en el CEANID, el 2012 por María C. Jigena para el proyecto de grado Obtención de Almidón de Papa Cardenal.

Tabla III-1 Composición proximal

COMPONENTE	COMPOSICIÓN %
Almidón	17,49
Humedad	77,48
Proteínas total	2,12
Azúcares totales	0,50

Fuente: CEANID, 2012.

#### 3.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

El proceso de obtención de bioetanol a nivel laboratorio, por hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal contemplara los siguientes procesos: proceso de hidrólisis enzimática del almidón de papa, proceso de fermentación y destilación alcohólica.

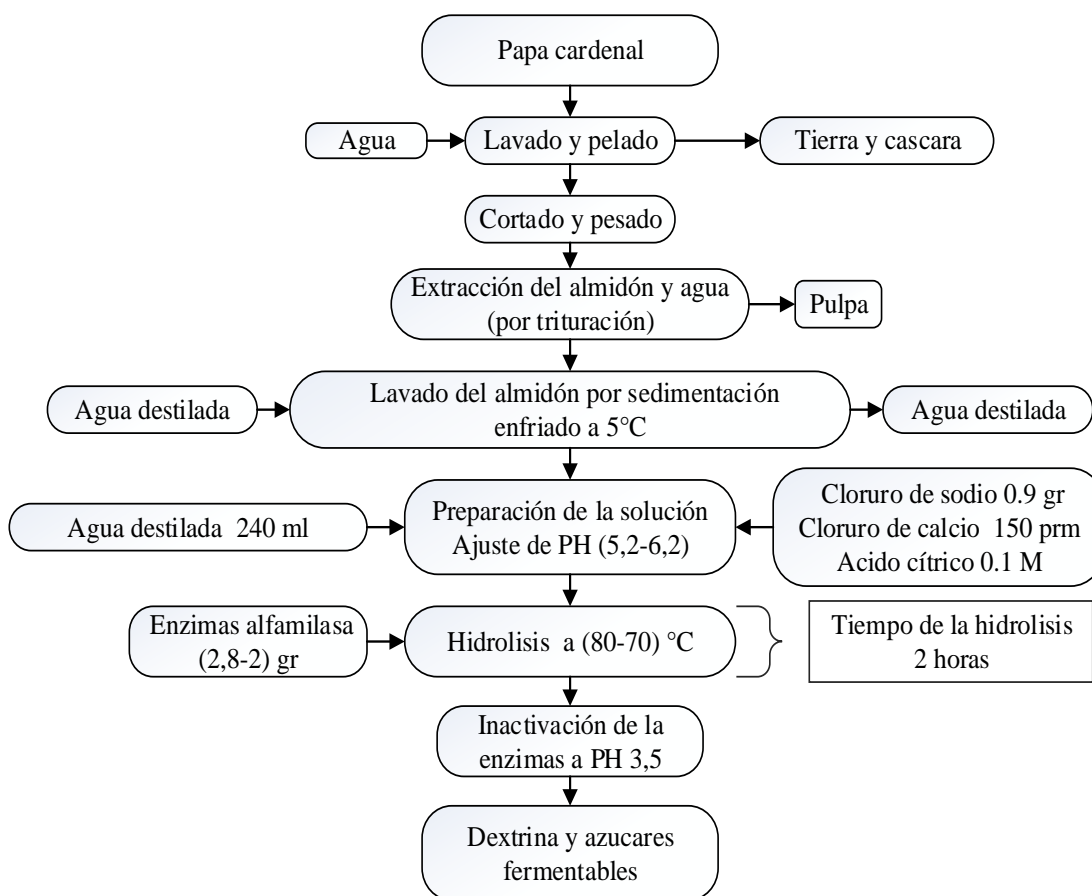
### 3.3 HIPÓTESIS

Es posible obtener bioetanol por hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal mediante el uso de la enzimas  $\alpha$ -amilasa.

### 3.4 PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

En la figura 3-1 se muestra el proceso de conversión del almidón a dextrina y azúcares fermentables. El proceso se realizó bajo acción de enzimas dextrinizantes  $\alpha$ -amilasa en cantidades de 8 gr/ litro recomendó por el fabricante. (VER ANEXO 7).

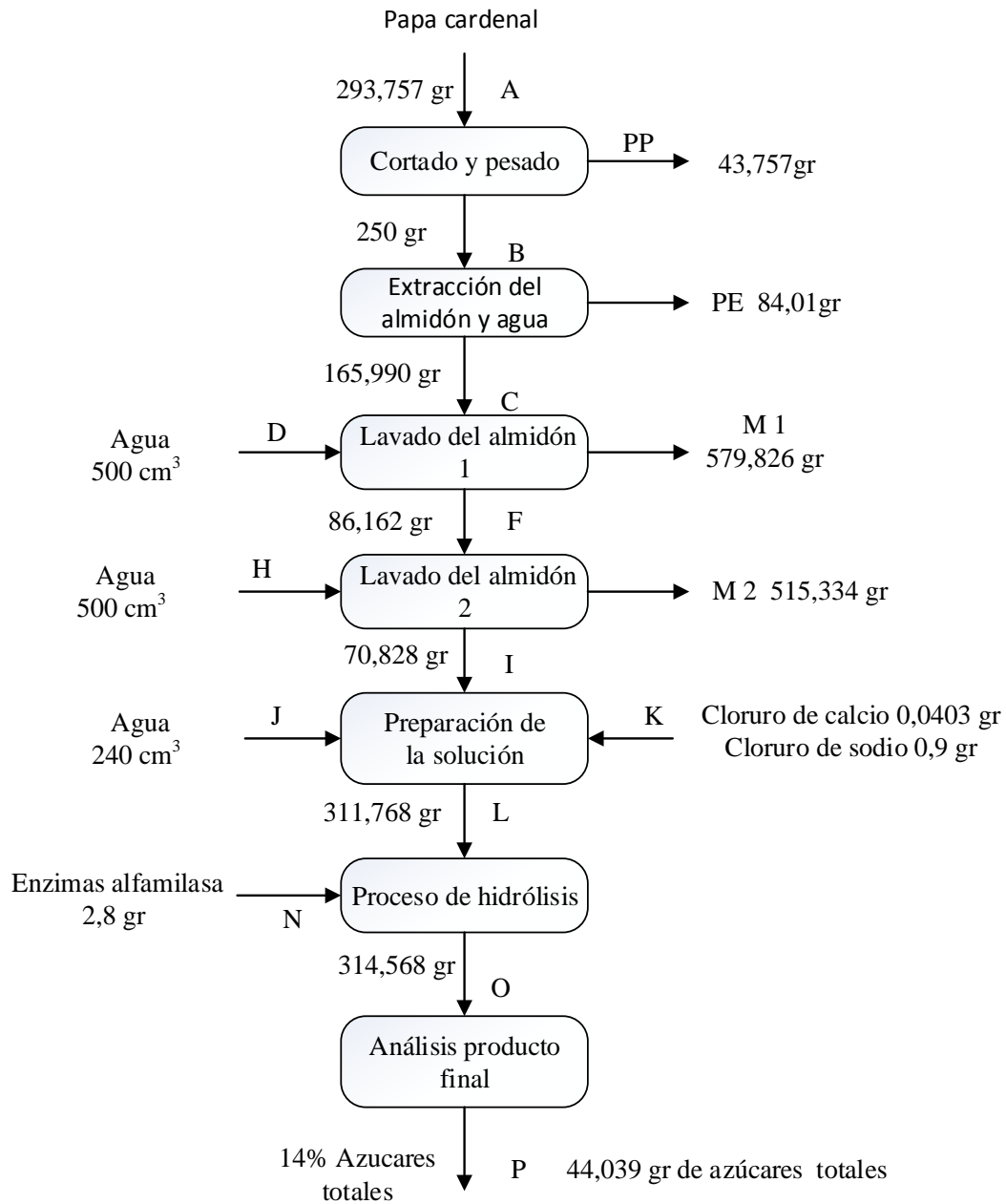
Figura 3-1 Diagrama de bloques del proceso de conversión del almidón a dextrina y azúcares fermentables.



Fuente: Elaboración propia, 2014

### 3.4.1 BALANCE DE MATERIA GENERAL

En la figura 3-2 se muestra el balance de materia del proceso (VER ANEXO 5)



Fuente: Elaboración propia

Balance global:  $A+D+H+J+N+K = PP+PE+M1+M2+P$

### **3.5 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS PARA LA OBTENCIÓN DE DEXTRINA Y AZÚCARES FERMENTABLES**

#### **3.5.1 LAVADO Y PELADO**

Una vez seleccionada la papa se procedió con el pelado, con una peladora manual que permite quitar finas capas de la cascara de la papa y así evitar una gran pérdida de materia prima.

#### **3.5.2 CORTADO Y PESADO**

Al concluir la etapa de lavado y pelado se procedió al cortado en pequeños trozos. Se procedió a pesar 250g de papa pelada que equivalen a 31,014 gramos de almidón en una balanza analítica Gibertini (ver figura 3-3).

Figura 3-3 Balanza Analítica



Fuente: Elaboración propia

### 3.5.3 EXTRACCIÓN DEL ALMIDON Y AGUA

El jugo de cada muestra de papa Cardenal se obtiene con una extractora de jugo Philips (ver figura 3-4) uso doméstico que permite extraer la mayor cantidad de jugo y tener una menor pérdida de esta . Una vez extraído el jugo este se mezcló con agua para ser lavado.

Figura 3-4 Extractora de jugo



Fuente: Elaboración propia

### 3.5.4 LAVADO DEL ALMIDON POR SEDIMENTADO

Se procedió a lavar el almidón con agua a 10 °C debido a que el almidón en agua fría es insoluble y facilita la sedimentación. Dejando reposar por 30 minutos luego de lo cual se eliminó toda el agua superficial (ver figura 3-5 y 3-6). Se debe repetir el proceso unas dos veces para eliminar la fibra y otras impurezas.

Figura 3-5 Sedimentación 1



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-6 Sedimentación 2



Fuente elaboración propia

En las figura 3-7 se muestra un equipo de enfriamiento J.P. Selecta el cual es un equipo que tiene una espiral que enfría la solución hasta 5 °C.

Figura 3-7 Equipo de enfriamiento



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-8 Enfriamiento de la solución



Fuente: Elaboración propia

### **3.5.5 CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE ALMIDON EN CADA MUESTRA**

Para cuantificar la cantidad de almidón que se encuentra en 250g de papa cardenal se procedió al secado en una estufa de 5 muestras, a 55 °C de temperatura y un tiempo determinado hasta obtener un peso constante de las muestras.

### **3.5.6 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN**

Una vez limpio el almidón se procedió a diluirlo con agua destilada en un porcentaje peso volumen de 1:10 1 gr de almidón por 9 ml de agua destilada. Se procedió a añadir el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en una cantidad de 150 rpm, cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) de 0.9 gr y se ajustó el pH con ácido cítrico al valor estimado en el diseño factorial.

La  $\alpha$ -amilasa purificada pierde actividad rápidamente por enzimas a los 50 °C pero esta inactivación puede ser retardada por la presencia de calcio y sodio para ser completamente resistente a los extremos de temperatura y pH. Además la  $\alpha$ -amilasa requiere de estos metales para la actividad catalítica (Vargas A, 2000).

### **3.5.7 PROCESO DE HIDROLIZADO.**

Una vez ajustado el PH se adiciono la enzima dextrinizante  $\alpha$ -amilasa se calentó la solución en baño maría (ver figura 3-9) a temperatura al valor estimado en el diseño factorial con agitación constante 300 rpm el proceso se lo realizo en un rota vapor Heidolph (ver figura 3-10) dejándola actuara por un periodo de 2 horas.

Figura 3-10 Rota vapor



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-9 Solución en baño maría



Fuente: Elaboración propia

### 3.5.8 DISEÑO FACTORIAL PARA LA HIDROLISIS

Para poder determinar las variables significativas en el presente trabajo experimental se plantea un diseño factorial de dos niveles y tres variables o parámetros con dos repeticiones.

Las variables que más influyen en el proceso de hidrólisis del almidón son el tipo de catalizadores (masa de enzimas), la temperatura de proceso y el pH.

Según Jorge Carrera C. el intervalo de temperatura del proceso de hidrólisis del almidón es de 70°C - 90°C para el rompimiento de los gránulos de almidón proveniente de un tubérculo y un pH del proceso de 6.

Por especificaciones del fabricante la cantidad del catalizador o masa de enzima  $\alpha$ -amilasa es de 8 gr/l, temperatura del proceso de 50°C -80°C y un pH de 5,7



En base al marco teórico realizado para el presente trabajo se fijó dos temperaturas del proceso de hidrólisis de 70°C y 80°C, masa de enzima  $\alpha$ -amilasa de (2 gr y 2,8 gr) y un pH del proceso de hidrólisis (5,2 y 6,2) que se encuentra dentro del intervalo que se estableció por Jorge Carrera y el fabricante (ver tabla III-2).

El tiempo de hidrólisis se mantuvo constante durante un tiempo de 2 horas que luego de conocer las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis se procedió a una optimización del tiempo.

Tabla III-2 Parámetros para la conversión del almidón a dextrina y azúcares fermentables.

<b>Nivel</b>	<b>masa de enzima <math>\alpha</math>-amilasa (MEA) en (gr)</b>	<b>pH de hidrólisis en (pH)</b>	<b>Temperatura de hidrólisis (T) en (C<sup>0</sup>)</b>
superior	2.8	6.2	80
inferior	2	5.2	70

Fuente: Elaboración propia.

Tomando estos datos como punto de partida se realiza un diseño factorial de  $2^3$  (dos niveles, tres variable).

$$\text{N}^\circ \text{ variables} = 3$$

$$\text{Niveles} = 2$$

$$\text{N}^\circ \text{ de experimentos} = 2^3 = 8$$

Como se harán dos repeticiones entonces.

$$\text{N}^\circ \text{ de experimentos} = 8 * 2 = 16 \text{ experimentos}$$

Considerando las combinaciones de estas variables se determinaran cuál de ellas es la más significativa cuando se analice la variable respuesta previo análisis de laboratorio de azúcares totales.

Tabla III-3 Diseño factorial para el proceso de la hidrolisis.

<b>Pruebas</b>	<b>MEA (gr)</b>	<b>pH (pH)</b>	<b>T (C°)</b>	<b>AZUCARES TOTALES (%)</b>
<b>1</b>	-	-	-	
<b>2</b>	-	+	-	
<b>3</b>	+	-	-	
<b>4</b>	+	+	-	
<b>5</b>	-	-	+	
<b>6</b>	-	+	+	
<b>7</b>	+	-	+	
<b>8</b>	+	+	+	

Fuente: elaboración propia, 2014.

Tabla III-4 Datos del diseño factorial en la hidrolisis.

<b>Pruebas</b>	<b>MEA (gr)</b>	<b>pH (pH)</b>	<b>T (C°)</b>	<b>AZUCARES TOTALES (%)</b>
<b>1</b>	2	5,2	70	
<b>2</b>	2	6,2	70	
<b>3</b>	2.8	5,2	70	
<b>4</b>	2.8	6,2	70	
<b>5</b>	2	5,2	80	
<b>6</b>	2	6,2	80	
<b>7</b>	2.8	5,2	80	
<b>8</b>	2.8	6,2	80	

Fuente: Elaboración propia.

### 3.5.8.1 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE HIDROLISIS.

Para la optimización del tiempo se tomó muestras de la solución a diferentes tiempos de reacción del proceso de hidrólisis para realizar un seguimiento del aumento de azúcares formados en la solución.

### 3.5.9 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA.

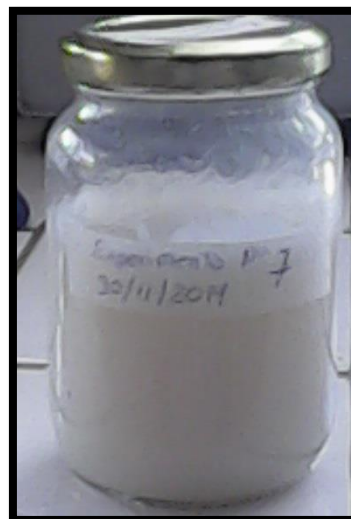
Al cabo de este tiempo se detuvo la acción enzimática mediante la adicción de HCl 0.1N para bajar el pH de la solución a 3,5 (ver figura 3-11) y luego se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

Figura 3-11 Inactivaciones de las enzimas



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-12 Muestra para el análisis.



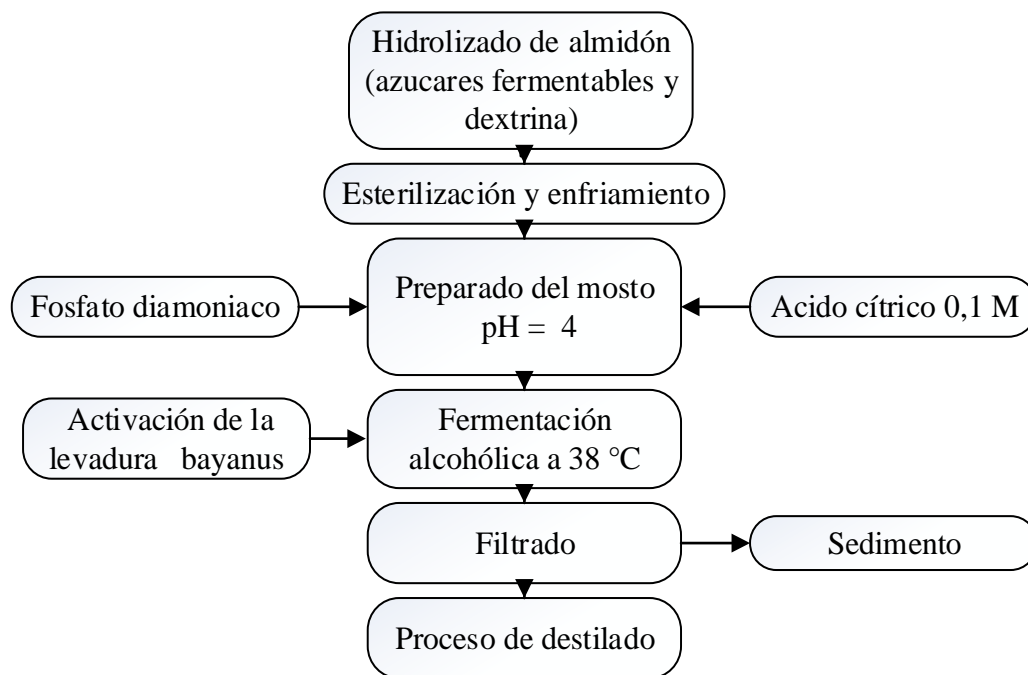
Fuente: Elaboración propia

### 3.6 PROCESO DE FERMENTACIÓN

Se realizó la fermentación del hidrolizado de almidón (dextrina y azúcares) utilizando las cantidades de levadura *Saccharomyces bayanus* PB2870 (máximo 30gr/hl - mínimo 20gr/hl), Temperatura de fermentación (máximo 40°C – mínimo 35°C) y pH máximo 4– mínimo 3.5 parámetros recomendados por el fabricante (VER ANEXO 8).

En la figura 3-13 se muestra el proceso de fermentación alcohólica y destilación.

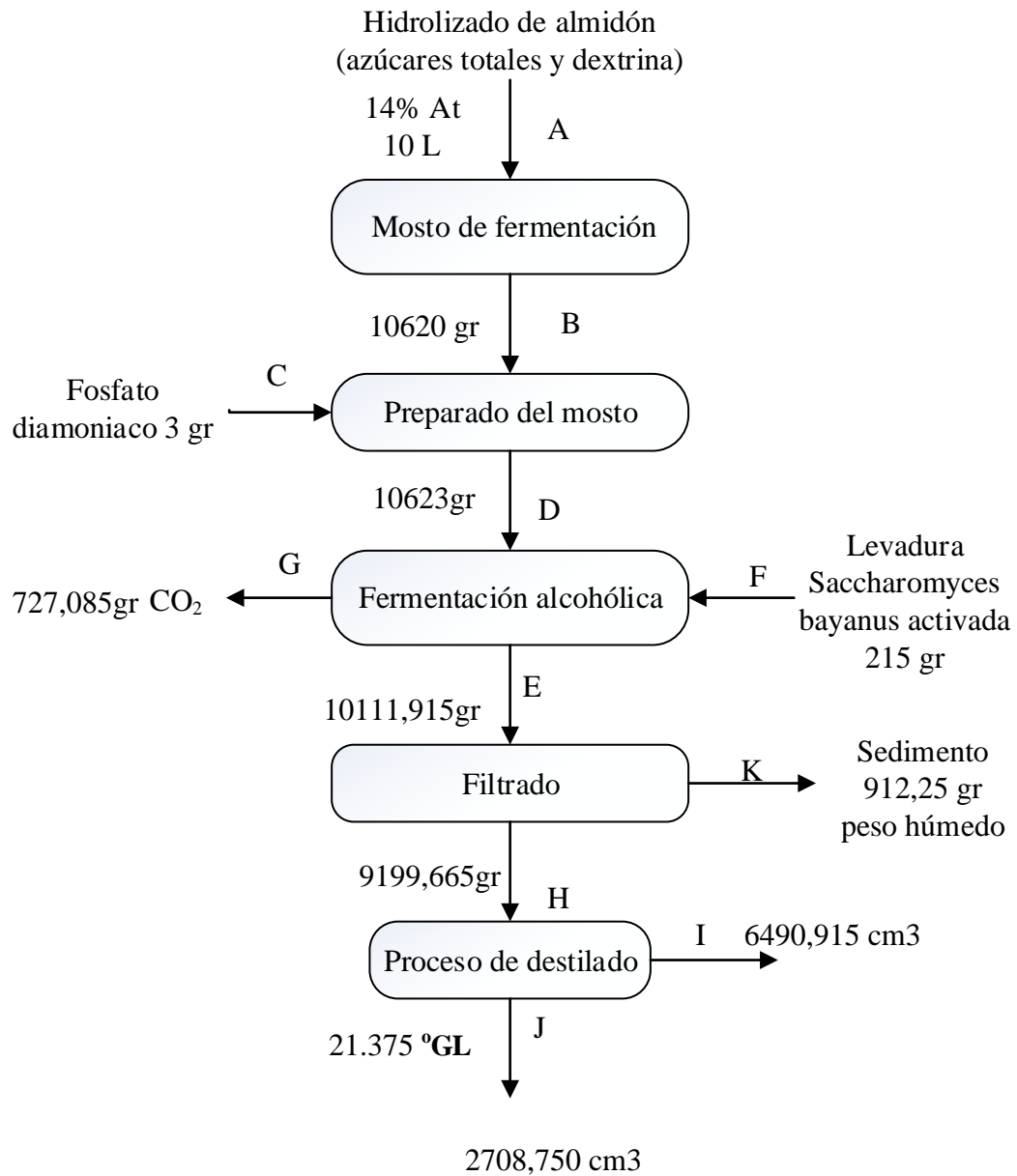
Figura 3-13 Diagrama de bloque del proceso de fermentación alcohólica y destilado.



Fuente: Elaboración propia, 2014

### 3.6.1 BALANCE DE MATERIA GENERAL

En la figura 3-14 se muestra el balance de materia del proceso (VER ANEXO 6)



Fuente: Elaboración propia.

Balance global:  $A + C + F = G + K + I + J$

### 3.6.2 ESTERILIZACIÓN DE LOS MATERIALES

La esterilización de los materiales se llevó a cabo en autoclave Raypa (ver la figura 3-15); el interior del autoclave debe contener agua destilada a temperatura ambiente cubriendo la resistencia del equipo: una vez colocados los materiales se procede a cerrar la tapa y programar el equipo a 120°C y una presión de 1.5 bares.

Figura 3-15 Autoclave Raypa



Fuente: Elaboración propia

### 3.6.3 PREPARACIÓN DEL MOSTO

Una vez esterilizados los materiales se procedió a introducir 10 litros el mosto (azúcar y dextrina) en un porcentaje de azúcares totales del 14 % en un reactor (Polipropileno PP de 10 litros).

Se emplear fosfato diamónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), como único nutriente en el proceso, para asegurar el aporte de nitrógeno y fosforo al mosto. En una cantidad de 30gr/hl se ajustó el pH de la solución con ácido cítrico en un valor de 4.

Una vez ajustado el pH se calentó el mosto en un termostato J.P. Selecta a temperatura de 38 °C (VER ANEXO 9)

### 3.6.4 ESTERILIZACIÓN Y ENFRIAMIENTO

Debido a la presencia de una variedad de células vegetales diferentes y de espora que proceden del medio del agua, aire y del recipiente estos microorganismos deben ser eliminados por un procedimiento adecuado antes de la inoculación de la levadura.

Se procedió a la esterilización del hidrolizado del almidón mediante calentamiento a 80°C una vez alcanzada la temperatura correcta. Se requiere 15 min para el proceso de muerte de los microorganismos, seguido del enfriamiento alcanzando una temperatura de fermentación de la levadura 38 °C.

### 3.6.5 ACTIVACIÓN LEVADURA SACCHAROMYCES BAYANUS

Activación del cultivo: se prepara 200 ml de solución que contenga 200 cm<sup>3</sup> de agua destilada, 4 gr de cloruro de sodio (NaCl) y 8 gr de sacarosa. Se le agregó 3 gr de liofilizado de cepa pura de *Saccharomyces bayanus* se incubó a 38°C. Se espera el tiempo necesario hasta que se active el inóculo que se puede establecer al observar formación de espuma y burbujeo (ver figura 3-16) dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Figura 3-16 *Saccharomyces bayanus* PB2870



Fuente: Elaboración propia.

**Nota:** Los materiales utilizados para la activación del liofilizado levadura *Saccharomyces bayanus* PB2870 fueron esterilizados para no realizar una contaminación cruzada al cultivo.

### 3.6.6 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Para el proceso de fermentación alcohólica se usó levadura *Saccharomyces bayanus* PB2870 previamente activada. Normalmente las levaduras actúan sobre la glucosa pero hay que considerar que el mosto obtenido por la hidrólisis del almidón es una mezcla de azúcares fermentables y dextrina. Por eso se recurrió a la levadura (hongo) *Saccharomyces bayanus* PB2870 que tiene una composición: levadura seca activa, lípidos, carbohidratos y enzima (proteínas) que hidroliza la dextrina del mosto de fermentación (VER ANEXO 8).

Una vez activada la levadura se adiciona al mosto (dextrina y azúcares) corregido que se encuentra en el recipiente de fermentación, se procedió a la agitación y tapar el recipiente; en la parte superior del recipiente de fermentación se debe tener una salida de gases ( $\text{CO}_2$ ) (ver figura 3-17) para disminuir la presión del interior del fermentador.

Figura 3-17 Reactor de fermentación de 10 litros



Fuente: Elaboración propia.



La fermentación generalmente dura varios días, dependiendo de dos factores: temperatura, cantidad de levadura. Para determinar la culminación de la fermentación alcohólica se utilizó un areómetro baume Nahita (rango 0-50 °Be, calibrado: 20°C longitud total: 240 mm); al culminar la fermentación la densidad relativa del mosto es constante.

A lo largo de la fermentación, se tomaron muestras de 150 cm<sup>3</sup> en un intervalo de tiempo de 48 horas para la determinación de la densidad relativa del mosto y el pH (VER ANEXO 3) y calcular el grado alcohólico.

### 3.6.7 FILTRADO

Posteriormente, culminada la fase de fermentación alcohólica se procedió al filtro al vacío de 5 litros de mosto con un equipo de filtrado equipado con: papel filtro, bomba de vacío modelo A 6611-04 (VER ANEXO 9), presión de vacío de 80 kPa por un tiempo aproximado de 5 horas. Para eliminar los sólidos presente (biomasa) (ver la figura 3-18).

Figura 3-18 Equipo de filtrado al vacío.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-19 Muestra filtrada



Fuente: Elaboración propia

### 3.6.8 DESTILACION

Se procedió a realizar la separación del producto de nuestro interés (etanol) mediante el proceso de destilación simple. Se lo realizó en un rota vapor Heidolph (ver figura 3-20) equipado con una bomba al vacío (VER ANEXO 9).

Se determinó la concentración de alcohol en grados Gay-Lussac (°GL) mediante el uso de un alcoholímetro Nahita (rango 0-100 % vol. (Gay Lussac) y 10-44° (Cartier), calibrado: 20°C, longitud total: 290 mm). Se tomó una muestra de 150 cm<sup>3</sup> del volumen de destilado para la medición del grado alcohólico del destilado (VER ANEXO 4).

Figura 3-20 Rota vapor



Fuente: Elaboración propia.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE ALMIDON EN CADA MUESTRA

Para la cuantificar de la cantidad de almidón que se encuentra en 250g de papa cardenal se procedió al secado en una estufa de 5 muestras, a 55 °C de temperatura y un tiempo determinado, hasta obtener un peso constante de las muestras (ver tabla IV-1).

Al extraer el almidón de papa cardenal se procedió a realizar el lavado con 500 cm<sup>3</sup> de agua, dejando reposar por un periodo de 30 min que dura el proceso de sedimentado del almidón; luego se eliminó toda el agua superficial, dejando una muestra humedad (almidón y agua) con un peso de la muestra 1 de 70,01 gr.

Para eliminación el agua de la muestra se procedió a realizar el secado de la muestra 1 en una estufa J.P selecta por un periodo de 24.5 horas y una temperatura constante de 55 °C. Al culminar el proceso de secado de la muestra 1 tiene un peso seco de 31,34 gr.

En la tabla IV-1 Resultados obtenidos en el secado.

Muestra	Cantidad de papa cardenal	Muestra		Humedad Relativa %
		Peso húmedo	Peso seco	
1	250gr	70,01gr	31,34gr	55,23%
2	250gr	69,50gr	30,02gr	56,80%
3	250gr	72,83gr	32,06gr	55,97%
4	250gr	69,97gr	31,20gr	55,40%
5	250gr	71,83gr	30,45gr	57,60%
<b>Masa de almidón en cada hidrólisis</b>			31.014	56,20%

Fuente: Elaboración propia

$$\text{Humedad relativa (US\%)} = \frac{\text{peso humedo} - \text{peso seco}}{\text{peso humedo}} * 100$$

$$\text{Humedad relativa (US\%)} = \frac{70.01\text{gr} - 31.34\text{gr}}{70.01\text{gr}} * 100 = 55.23 \%$$

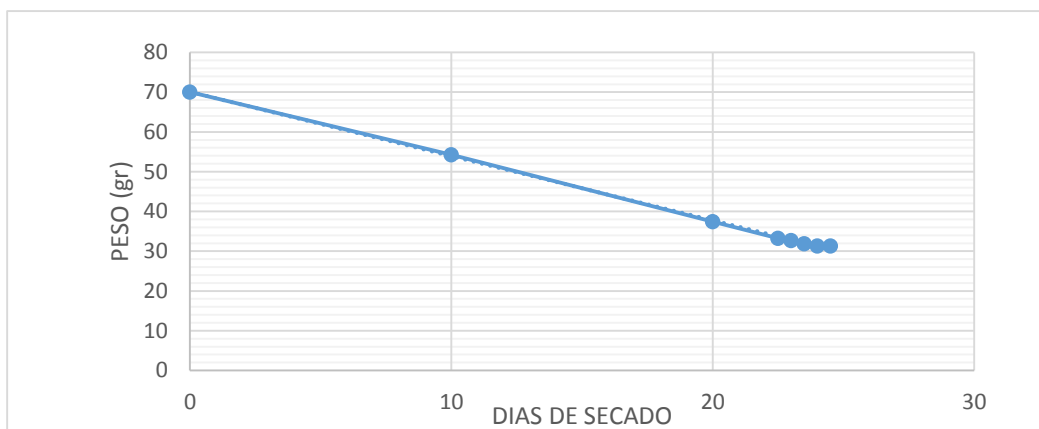
A partir de la curva de secado de la muestra 1 se procedió a calcular el tiempo óptimo de secado del almidón de papa cardenal que oscila entre los 24,5 horas (ver la gráfica IV-1).

En la tabla IV-2 Secado de la muestra 1

<b>Peso(g)</b>	70.01	54,23	37,40	33,29	32,7	31,85	31,34	31,34
<b>t(h)</b>	0	10	20	22,5	23	23,5	24	24,5

Fuente: Elaboración propia

Gráfico IV-1 Curva de secado muestra 1



Fuente: Elaboración propia

A partir de los datos obtenidos en el secado se pudo cuantificar la masa de almidón que contiene 250g de papa cardenal y poder cuantificar el volumen de agua destilada en la hidrólisis a partir de la relación 1:10 sólido –líquido.

#### 4.2 RESULTADOS DEL PROCESO DE HIDROLISIS

El grado de hidrolisis de un almidón se expresa generalmente en función del equivalente de dextrosa el cual está directamente relacionado con la cantidad de grupos libres de azúcares.

##### 4.2.1 ANÁLISIS DE AZUCARES TOTALES

Las muestras de hidrolizado de almidón de papa cardenal fueron analizadas por el Centro de Análisis Investigación y Desarrollo (CEANID), cuyo resultados se expresa en la tabla IV-3 sustraídos de los datos, cálculos y resultados de azúcares totales (VER ANEXO 2).

Tabla IV-3 Resultados de azúcares totales.

Muestra	MEA (gr)	pH-h (pH)	T (°C)	Azúcares Totales (%)	
				Análisis 1	Análisis 2
1	2	5,2	70	5,31	6,70
2	2	6,2	70	5,12	5,35
3	2,8	5,2	70	10,26	10,21
4	2,8	6,2	70	6,42	6,75
5	2	5,2	80	4,50	5,69
6	2	6,2	80	6,64	5,65
7	2,8	5,2	80	11,06	10,90
8	2,8	6,2	80	7,05	5,35

Fuente: Elaboración propia

Se pudo notar que el porcentaje de azúcares totales oscila entre 5.31% y 11,06%; estos valores se calcularon en un periodo de 2 horas.

#### 4.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE HIDROLISIS

Una vez definidos los parámetros óptimos de la fase de hidrolizado se procedió a optimización del tiempo del proceso.

Para la optimización del tiempo se tomó muestras de la solución a diferentes tiempos (ver tabla IV-4) de reacción de hidrolizado para realizar un seguimiento del aumento de azúcares formados en el proceso (VER ANEXO 1).

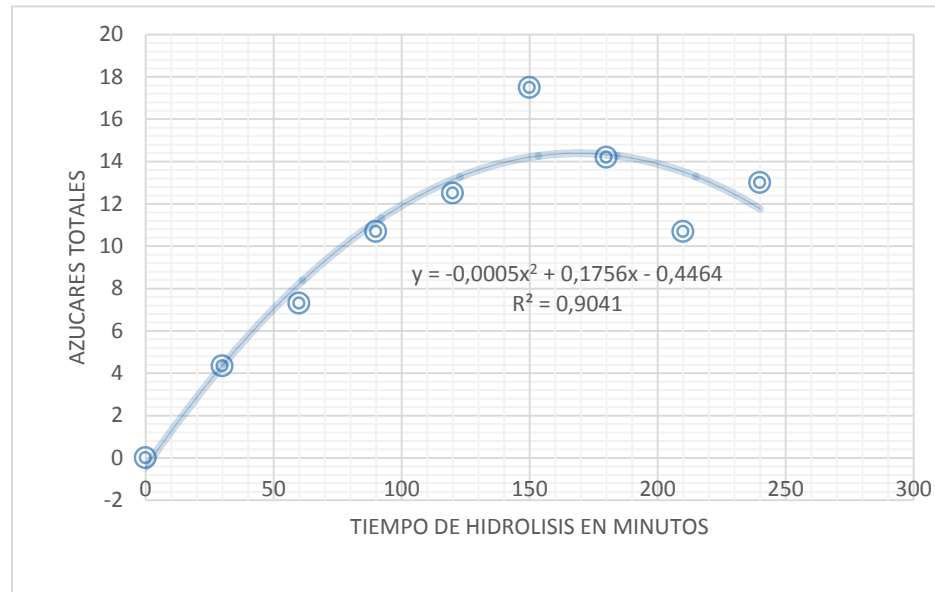
Tabla IV-4 Optimización del tiempo de hidrólisis

<b>Azúcares totales (%)</b>	0,0	4,35	7,30	10,70	12,50	17,50	14,20	10,70	13
<b>Tiempo (min)</b>	0	30	60	90	120	150	180	210	240

Fuente: Elaboración propia

A partir de la curva de hidrólisis del almidón de papa cardenal se procedió a calcular el tiempo óptimo del proceso de hidrólisis de 2 horas y 30 minutos (ver la gráfica IV-2) pasado este tiempo no se justifica seguir la reacción porque la producción no aumenta considerablemente.

Grafico IV-2 Curva de hidrólisis



Fuente: Elaboración propia

### 4.3 RESULTADOS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHOLICA

#### 4.3.1 DATOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA FERMENTACIÓN

Los datos obtenidos en la fermentación alcohólica fueron densidad relativa ( $\text{gr/cm}^3$ ) y pH del mosto (ver tabla IV-5) en un tiempo de fermentación de 22 días.

Tabla IV-5 Datos obtenidos en la primera fermentación.

Tiempo (días)	Grados Baume (°Be)	Densidad Relativa ( $\text{gr/cm}^3$ )	Grado Alcohólico (°GL)	pH Fermentación
0	8,03	1,059	0	4
5	6,48	1,047	1,575	3,96
7	6,08	1,044	1,968	3,95
9	5,68	1,041	2,362	3,92
11	5,28	1,038	2,756	3,91
13	5,01	1,036	3,018	3,87
15	3,51	1,025	4,462	3,74
17	3,1	1,022	4,856	3,68
19	2,82	1,02	5,118	3,6
21	2,55	1,018	5,381	3,55
22	2,55	1,018	5,381	3,48

Fuente: Elaboración propia

$$\text{Grado Alcohólico (°GL)} = (\text{Dr}_{\text{inicial}} - \text{Dr}_{\text{final}}) * 131.25 \quad \text{Ec 3-1}$$

$$\text{Grado Alcohólico (°GL)} = (1,059 \text{ gr/cm}^3 - 1,018 \text{ gr/cm}^3) * 131.25 = 5.38 \text{ °GL}$$

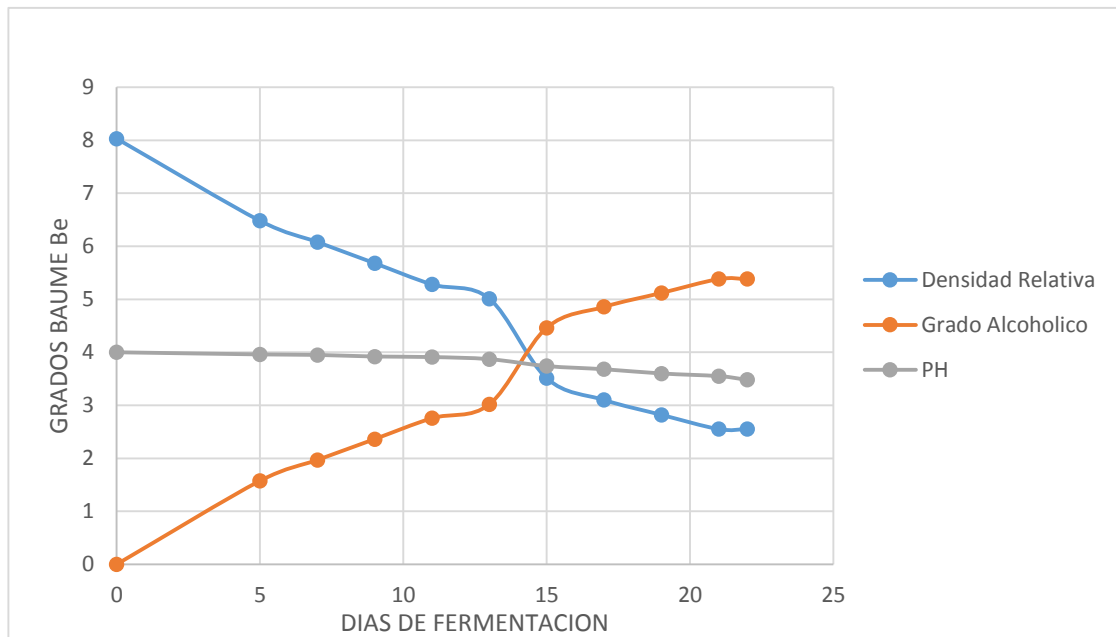
**Nota:** Cabe mencionar que le grado alcohólico (°GL) calculado por la ecuación 3-1 es la cantidad de alcohol probable en la solución.

Se observa un descenso en la densidad relativa y pH del mosto en el transcurso de los días. La disminución de la densidad relativa se debe a la formación de etanol que tiene menor densidad que el agua.



Paralelamente se observa un incremento del grado alcohólico ( $^{\circ}$ GL) proporcional a la disminución en la densidad relativa (ver gráfico IV-3).

Gráfico IV-3 Primera fermentación alcohólica.



Fuente: Elaboración propia

### 4.3.2 DATOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA FERMENTACIÓN

Los datos obtenidos en la fermentación alcohólica fueron densidad relativa ( $\text{gr/cm}^3$ ) y pH del mosto (ver tabla IV-6) en un tiempo de fermentación de 24 días.

Tabla IV-6 Datos obtenidos en la segunda fermentación.

Tiempo (días)	Grados Baume ( $^{\circ}\text{Be}$ )	Densidad Relativa ( $\text{gr/cm}^3$ )	Grado Alcohólico ( $^{\circ}\text{GL}$ )	pH FERMENTACION
0	8,5	1,062	0	4
5	6,5	1,047	1,968	3,97
7	6,0	1,043	2,493	3,94
9	5,5	1,040	2,887	3,91
11	5,2	1,038	3,150	3,91
13	4,7	1,034	3,675	3,87
15	3,7	1,027	4,593	3,84
17	2,8	1,020	5,512	3,78
19	2,2	1,016	6,037	3,74
21	2,0	1,015	6,168	3,69
22	1,8	1,013	6,431	3,62
24	1,8	1,013	6,431	3,55

Fuente: Elaboración propia

$$\text{Grado Alcohólico } (^{\circ}\text{GL}) = (\text{Dr}_{\text{inicial}} - \text{Dr}_{\text{final}}) * 131.25$$

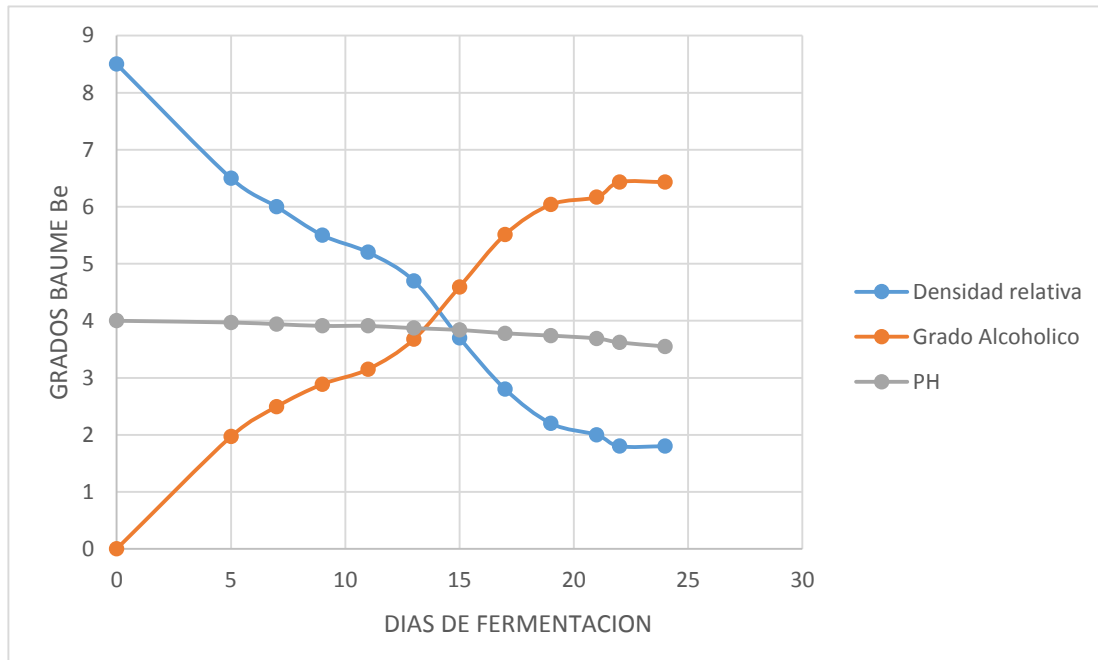
$$\text{Grado Alcohólico } (^{\circ}\text{GL}) = (1,062 \text{ gr/cm}^3 - 1,013 \text{ gr/cm}^3) * 131.25 = 6,431 \text{ } ^{\circ}\text{GL}$$

Al comparar los resultados obtenidos en la primera fermentación y segunda fermentación alcohólica.

Se evidencio que en la primera fermentación hubo un descenso de la densidad relativa de 8,03  $^{\circ}\text{Be}$  a 2,55  $^{\circ}\text{Be}$  en el transcurso de 22 días. En la segunda fermentación el descenso de la densidad relativa de 8,5  $^{\circ}\text{Be}$  e 1,8  $^{\circ}\text{Be}$  en el transcurso de 24 días.

La diferencia de 2 días de fermentación y una disminución mayor de la densidad relativa de la segunda fermentación alcohólica alcanzo una taza mayor de formación de alcohol a 6,43  $^{\circ}\text{GL}$  (ver gráfico IV-4)

Gráfico IV-4 Segunda fermentación alcohólica.



Fuente: Elaboración propia

Los factores físicos que se deben considerar en la fermentación alcohólica son esencialmente el pH y la temperatura de fermentación.

La temperatura de fermentación del mosto (dextrina y azúcares) se conserva a temperatura constante de 38 °C que se encuentra dentro del intervalo especificado por el fabricante de (40 °C a 35 °C).

El pH de fermentación alcohólica según el fabricante de la levadura *Saccharomyces Bayanus PB2870* tiene un pH óptimo comprendido entre 4,0 y 3,5.

En la fermentación alcohólica se evidenció el descenso del pH de un valor inicial de 4 a 3,5. Al alcanzar un pH inferior de 3,5 se detiene toda actividad de la levadura *Saccharomyces Bayanus PB2870* y la formación de alcohol manteniendo una densidad relativa del mosto constante que indica la finalización de la fermentación alcohólica.

Los resultados obtenidos en la primera fermentación y segunda fermentación alcohólica, fueron satisfactorios debido a una aproximación de los resultados, que comprueba, un procedimiento correcto de preparación del mosto (dextrina y azúcares) para su posterior fermentación y la activación correcta de la levadura *Saccharomyces Bayanus PB2870*.

#### 4.4 RESULTADOS DEL PROCESO DESTILACIÓN ALCOHÓLICA

##### 4.4.1 DESTILACION ALCOHÓLICA

Finalmente para determinar la concentración del etanol producido a lo largo de la fermentación del mosto, se procedió a la destilar de las muestras del mosto filtrado en un destilador discontinuo. Los resultados se muestran en la tabla IV-7

Tabla IV-7 Resultados de la destilación discontinua.

N	mosto filtrado (cm <sup>3</sup> )	Resultados de la destilación		Grado alcohólico producto de cabeza (°GL)	Volumen de alcohol destilado (cm <sup>3</sup> )
		Producto de cabeza (cm <sup>3</sup> )	Producto de cola (cm <sup>3</sup> )		
1	1000	278	722	22,5	62,55
2	1000	287,5	712,5	21,5	61,8125
3	1000	250,5	749,5	20,5	51,3525
4	1000	267,5	732,5	21	56,175
Promedio del Grado alcohólico				21.375	57,97

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO FACTORIAL.

El análisis estadístico se realizó mediante SPSS 17.0 (Statistical package for the Social Sciences), el mismo que permite un tratamiento integrado de todas las fases del análisis de datos obtenidos resultados más representativos y confiables.

Con el análisis de variación ANOVA se determina la influencia de los factores masa de enzimas, pH solución y temperatura de sus interacciones sobre la variable respuesta (azúcares totales %)

En la tabla IV-8 se muestra los datos introducidos al programa SPSS 17.0, de acuerdo al diseño factorial planteado: cada factor tiene un nivel superior (+1) y un nivel inferior (-1)

Tabla IV-8 Datos para el análisis de varianza

Nº ensayo	Factores			Variable respuestas
	Masa de enzimas (gr)	pH	Temperatura (°C)	Azúcares Totales (%)
1	-1	-1	-1	5,31
2	-1	+1	-1	5,12
3	+1	-1	-1	10,26
4	+1	+1	-1	6,42
5	-1	-1	+1	4,50
6	-1	+1	+1	6,64
7	+1	-1	+1	11,06
8	+1	+1	+1	7,05
9	-1	-1	-1	6,70
10	-1	+1	-1	5,35
11	+1	-1	-1	10,21
12	+1	+1	-1	6,75
13	-1	-1	+1	5,69
14	-1	+1	+1	5,65
15	+1	-1	+1	10,90
16	+1	+1	+1	5.35

Fuente: SPSS 17.0

En la tabla IV-9 se muestran las variables del diseño factorial y el número de experiencias para cada variable que está registrada mediante el programa y realizada en la parte experimental para un diseño de  $2^3$  con dos repeticiones y un total de 16 experimentos, con la variable respuesta.

Tabla IV-9 Factores inter-sujetos

		N
Masa de enzimas	-1,00	8
	1,00	8
pH	-1,00	8
	1,00	8
Temperatura	-1,00	8
	1,00	8

Fuente: SPSS 17.0

#### 4.5.1 VARIABLE RESPUESTA PORCENTAJES DE AZUCARES TOTALES

En la tabla IV-10 se puede observar el análisis de varianza para la variable dependiente o variable respuesta porcentajes de azúcares totales, tomando en cuenta los factores masa de enzimas, pH de solución y temperatura, así como sus interacciones.

Tabla IV-10 Análisis de varianza ANOVA  
(porcentajes de azúcares totales)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	68,933 <sup>a</sup>	6	11,489	17,586	,000
Intersección	797,498	1	797,498	1220,717	,000
Masa de enzimas	33,178	1	33,178	50,784	,000
pH	16,606	1	16,606	25,418	,001
Temperatura	,032	1	,032	,050	,829
Masa de enzimas * pH	18,966	1	18,966	29,031	,000
Masa enzimas* Temperatura	,032	1	,032	,050	,829
pH * Temperatura	,119	1	,119	,182	,680
Error	5,880	9	,653		
Total	872,310	16			
Total corregida	74,813	15			

a. R cuadrado = ,921 (R cuadrado corregida = ,869)

Fuente: SPSS 17.0

Es posible señalar a las variable más significativa con un nivel de confianza del 95%, es decir, variable que poseen una significancia menor al 5% (0,05). La variable temperatura tiene un nivel de significancia mayor al 5% (0.829); por tanto, queda descartada, así como su interacción.

Se realiza nuevamente el análisis de varianza con los factores masa de enzimas y pH

Tabla IV-11 Factores inter-sujetos

		N
Masa de enzimas	-1,00	8
	1,00	8
pH	-1,00	8
	1,00	8

Fuente: SPSS 17.0



En la tabla IV-12 se puede observar el análisis de varianza para la variable dependiente o variables respuestas porcentajes de azúcares totales.

Tabla IV-12 Análisis de Variable ANOVA

Variable dependiente: azúcares totales

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	68,749 <sup>a</sup>	3	22,916	45,352	,000
Intersección	797,498	1	797,498	1578,279	,000
Masa de enzimas	33,178	1	33,178	65,660	,000
pH	16,606	1	16,606	32,863	,000
Masa de enzimas* pH	18,966	1	18,966	37,534	,000
Error	6,064	12	,505		
Total	872,310	16			
Total corregida	74,813	15			

a. R cuadrado = .919 (R cuadrado corregida = .899)

Fuente: SPSS 17.0

Se puede verificar que al 95% del nivel de confianza, las variables masa de enzimas y pH, así como sus interacciones son significativas.

#### 4.5.2 ANALISIS DE REGRESION LINEAL MULTIPLE

El modelo de regresión establece el modelo matemático que relaciona las variables más significativas con la variable respuestas. Para el análisis de regresión, se introdujo al SPSS las variables masa de enzimas y pH.

Tabla IV-13 Variables Introducidas/Eliminadas <sup>b</sup>

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Masa de enzimas, pH, Masa,	.	Introducir

- a. Todas las variables solicitadas introducidas.
- b. Variables dependiente: azúcares totales

Fuente: SPSS 17.0

Tabla IV-14 Resumen del Modelo <sup>b</sup>

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,959 <sup>a</sup>	,919	,899	,71084

- a. Variables predictoras (constante), masa de enzimas, masa de enzimas y pH
- b. Variables dependiente azúcares totales

Fuente: SPSS 17.0

Tabla IV-15 ANOVA <sup>b</sup>

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	68,749	3	22,916	45,352	,000 <sup>a</sup>
Residual	6,064	12	,505		
Total	74,813	15			

a. Variables predictoras: masa de enzimas, pH, masa de enzimas y pH

b. Variables dependiente azúcares totales

Fuente: SPSS 17.0

Tabla IV-16 Coeficiente <sup>a</sup>

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	7,060	,178		39,728	,000
Masa de enzimas	1,440	,178	,666	8,103	,000
pH	-1,019	,178	-,471	-5,733	,000
Masa de enzimas*pH	-1,089	,178	-,504	-6,127	,000

a. Variables dependiente azúcares totales

Fuente: SPSS 17.0

Por lo tanto, a partir de los coeficientes proporcionados en la tabla IV-16 la ecuación matemática es la siguiente.

$$\% \text{ azúcares totales} = 7,060 + 1,440 * A - 1,019 * B - 1,089 * A * B$$

Donde A es la masa de enzimas y B es el pH de la solución; a partir de esta ecuación se puede enunciar que a mayor masa de enzimas  $\alpha$ -amilasa mayor es el porcentaje de azúcares totales y al aumentar el pH disminuye la concentración de azúcares totales y lo mismo sucede con su interacciones pues posee un coeficiente negativo.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES.

- El porcentaje de almidón seco que se encuentra en 250g de papa cardenal se cuantifico mediante el secado de 5 muestras de almidón previamente lavada a 55 °C de temperatura y un tiempo determinado de 24 horas, obteniendo una masa promedio de 31.014 gr de almidón seco. Al obtener la masa se cuantifica el volumen de agua destilada para el proceso de hidrolisis a partir de la relación 1:10 solido-liquido.
- La presente investigación determino que por cada 1000 gr de papa cardenal es posible obtener 124.059 gr de almidón. Obteniendo un rendimiento del 12,959 %.
- Como resultado de los ensayos programados por el diseño factorial del proceso de hidrolisis la combinación óptima para el proceso es: masa de enzima  $\alpha$ -amilasa de 2,8 gr (+), pH de solución 5,2 (-) y temperatura 80 °C (+) siendo esta la mejor combinación del proceso. Al obtener mayor concentración de azúcares totales expresados en porcentaje de 11,06% en un tiempo de 2 horas
- Para maximizar la producción de azúcares del proceso de hidrólisis se procedió a la optimización del tiempo de reacción: alcanzando una producción de azúcares totales de 14,0% en un tiempo de reacción de 2 horas y 30 minutos. Pasado este tiempo no se justifica seguir la reacción porque la producción no aumenta considerablemente.
- Mediante el análisis estadístico con el programa SPSS 17.0 la variable temperatura se descarta al no influir en gran manera en el proceso; se puede explicar debido a que se trabajó con intervalos de temperatura cercanos entre (70 y 80 ) °C.
- Teóricamente es posible obtener de un gramo de almidón 1.11gr de glucosa por relación estequiometrica. La presente investigación determinó que por cada gramo

de almidón es posible obtener 1.489 gramos de glucosa. El incremento se justifica por el ingreso de una masa mayor de almidón al proceso de hidrólisis debido a que no se cuantificó la masa de cada muestra, solo se procedió a obtener una masa promedio de almidón que ingresa al proceso de hidrólisis. La concentración de almidón en la papa cardenal depende de variables factores como ser: temperatura de la región, la humedad de la región y tipo de fertilizantes utilizados en el terreno.

## **5.2 RECOMENDACIONES.**

- Extender el estudio concerniente a hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulosico del proceso tales como pulpa de papa cardenal y cascara de papa para aumentar el rendimiento en los proceso de hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica.
- Llevar a cabo un análisis de hidrólisis enzimática del almidón de papa cardenal con una variable de concentración de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en la solución.
- Desarrollar un estudio concerniente a la hidrólisis enzimática con otros compuestos. Fuentes ricas en almidón, como cereales (maíz, trigo, cebada, etc.) y de tubérculos (yuca, biomato, etc.); materiales ricos en celulosa, madera y los residuos agrícolas, previa eliminación del lignito.
- Complementar el presente estudio con un diseño factorial en el proceso de fermentación alcohólica, con el propósito de mejorar el rendimiento obtenido de alcohol que por motivos económicos no se pudo realizar.
- Realizar un análisis cuantitativo y cualitativo del sedimento para conocer los compuestos que pueden estar inmersos en dicho residuos con el propósito de elevar si es viable su aprovechamiento para investigaciones posteriores.