

PRODUCCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA MADERA

ANA CRISTINA BARCO JOYA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN ENERGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGIA – BIOÉTICA Y AMBIENTE
BUCARAMANGA
2014

PRODUCCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA MADERA

ANA CRISTINA BARCO JOYA

Proyecto de Grado para optar al título de
Ingeniera en Energía

MSc. DR. rer. nat GRACIELA CHALELA ALVAREZ
Directora del Proyecto

UNAB Ambiental - CINBBYA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN ENERGÍA
BUCARAMANGA
2014

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del jurado

Firma del jurado

Bucaramanga, Junio 27 de 2014

*A Dios, por haberme permitido lograr mis objetivos
A mi familia, a quienes les debo todo lo que soy
A mi padre, mi mayor motivación*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a ti Dios, mi fuente de energía, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque has hecho realidad este sueño y porque cuento con tu compañía para lograr todas mis metas.

A mi familia, mis padres Mario Gabriel y Nidia, y mi hermano Carlos, para ellos mi gratitud eterna por todo lo que soy, por su apoyo, consejos, paciencia y gran motivación.

A mi directora de tesis, Dra. Graciela Chalela por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia ha logrado en mí el poder terminar mi estudio de pregrado con éxito.

A personas que durante toda mi carrera han aportado con un granito de arena a mi formación académica, al señor Decano Germán Oliveros, a María Eugenia Castillo, a Marvin Torres.

A quienes la vida me puso en el camino para lograr la culminación de este proyecto, a María del Pilar Velasco, a Norma Rojas, a Diana Heredia, a Helga Mora. A todos mis profesores, en especial al Dr. Julio Paba, al Ing. Luis Eduardo Jaimes, al Ing. Carlos Rey y al Ing. César Acevedo, porque gracias a sus exigencias me han hecho crecer tanto personal como profesionalmente.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que les agradezco su amistad, apoyo, energía, sonrisas y compañía. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han enseñado.

La dicha de mi vida consiste en tener siempre algo que aprender, alguien a quien amar y alguna alegría por la cual sonreír como lo hacemos los valientes.

TABLA DE CONTENIDO

<u>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	<u>13</u>
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
1.2. ALCANCES	15
1.3. OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	15
<u>2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</u>	<u>16</u>
2.1. ANTECEDENTES	16
2.2. MARCO CONCEPTUAL	18
2.2.1. ASERRÍN COMO CONTAMINANTE	18
2.2.2. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	19
2.2.3. MADERA	22
2.2.4. BIOCOMBUSTIBLES.....	24
2.2.5. TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	32
<u>3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....</u>	<u>43</u>
3.1. SELECCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL HONGO	43
3.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	43
3.1.2. HIDRÓLISIS	46
3.1.3. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.....	47
3.2. PRODUCCIÓN A ESCALA LABORATORIO DE BIOETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN	49
3.2.1. MONTAJE 1.....	49
3.2.2. MONTAJE 2.....	53
3.2.3. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL.....	60
<u>4. RESULTADOS.....</u>	<u>66</u>
4.1. SELECCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL HONGO	66
4.1.1. HIDRÓLISIS	66
4.1.2. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.....	71
4.2. PRODUCCIÓN A ESCALA LABORATORIO DE BIOETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN	73
4.2.1. MONTAJE 1.....	73
4.2.2. MONTAJE 2.....	75
4.2.3. DETERMINACIÓN DE ETANOL.....	76
4.3. IDENTIFICACION DE VARIABLES	83
4.3.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	83

4.3.2. VARIABLES DEPENDIENTES	84
4.4. BALANCE MÁSCO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ASERRÍN	86
4.5. ANALISIS COMPARATIVO	88
<u>5. CONCLUSIONES</u>	<u>90</u>
<u>6. RECOMENDACIONES</u>	<u>91</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>92</u>
<u>ANEXO A. PILARES DE LA POLÍTICA DE BIOCMBUSTIBLES EN COLOMBIA</u>	<u>96</u>
<u>ANEXO B. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA</u>	<u>100</u>

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Componente hemicelulósico principal.....	20
Tabla 2. Composición química típica de la madera	23
Tabla 3. Rendimiento energético (GJ/ha) de los biocombustibles.....	25
Tabla 4. Materias primas para obtención de bioetanol	26
Tabla 5. Comparación entre propiedades físico-químicas del etanol y la gasolina	27
Tabla 6. Principales países productores de etanol y biodiesel 2007 y proyecciones para el 2017.....	29
Tabla 7. Plantas productoras de alcohol carburante en Colombia	31
Tabla 8. Ejemplos de pre-tratamientos de materiales lignocelulósicos.....	34
Tabla 9. Clasificación de la materia prima según su procedencia	45
Tabla 10. Especificaciones técnicas espectrofotómetro Pharo 300.....	48
Tabla 11. Densidad según porcentaje de etanol	61
Tabla 12. Tiempos de retención obtenidos a partir de las inyecciones de los estándares en forma pura así como en el de la mezcla	62
Tabla 13. Peso del tipo de aserrín con volumen equivalente.....	68
Tabla 14. Datos de medición de absorbancia a 540nm para cada tipo de aserrín	71
Tabla 15. Valores de glucosa para cada tipo de aserrín	72
Tabla 16. Valores de absorbancia por duplicado y cálculo de concentración de glucosa ..	73
Tabla 17. Cantidad de fermentado producido en cada proceso	74
Tabla 18. Determinación de glucosa.....	75
Tabla 19. Producción del fermentado antes y después de la destilación – segunda destilación	76
Tabla 20. Resultados cuantitativos obtenidos de la concentración de alcohol en las muestras procesadas: por cromatografía de gases y determinación de la densidad	83
Tabla 21. Datos materia prima – producción de etanol a escala laboratorio y cantidad de microorganismo	85
Tabla 22. Datos de pruebas de producción de bioetanol con diferentes materias primas	89
Tabla 23. Concentraciones tubos de ensayo	100

TABLA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fuentes de producción de Bioetanol	14
Figura 2. Cadena de aprovechamiento de los productos forestales	19
Figura 3. Estructura química de la celulosa.	20
Figura 4. Estructura de la lignina	21
Figura 5. Vista microscópica de maderas blandas y duras	22
Figura 6. Procesos y productos de conversión de la biomasa	24
Figura 7. Mezcla alcohol carburante en Colombia	30
Figura 8. Ubicación de plantas productoras de alcohol carburante en Colombia	31
Figura 9. Esquema imagen para la conversión de biomasa lignocelulósica en Bioetanol ..	33
Figura 10. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa	36
Figura 11. Colonia de hongo Trichoderma	37
Figura 12. Observación microscópica de Saccharomyces cerevisiae cepa utilizada en el proceso de fermentación	39
Figura 13. Equipo para la deshidratación del alcohol asistida por microondas	42
Figura 14. Diagrama de la metodología para el desarrollo del proceso de producción de bioetanol	43
Figura 15. Proceso de obtención de aserrín en la fábrica	44
Figura 16. Representación del tipo de aserrín obtenido de la fábrica	46
Figura 17. Espectrofotómetro Pharo 300 (Merak)	48
Figura 17. Diagrama del bioproceso aplicado a escala laboratorio, montaje 1	50
Figura 18. Hongo Trichoderma en medio acuoso.....	51
Figura 19. Proceso de hidrolisis enzimática.....	51
Figura 20. Lixiviado para cada montaje	52
Figura 21. Proceso fermentativo para cada montaje	52
Figura 22. Destilador por arrastre de vapor	53
Figura 23. Diagrama del bioproceso aplicado a escala de laboratorio, montaje 2	54
Figura 24. Bioreactor adaptado para la hidrólisis.....	55
Figura 25. Medio en frascos de 60 ml con Inoculo pasados 5 días	56
Figura 26. Cultivo selectivo de 30 frascos pasados 10 días	56
Figura 27. Medio de cultivo celulósico con inoculo de Trichoderma viride	57
Figura 28. Hongo Trichoderma viride en medio acuoso con aireación	57
Figura 29. Bioreactor en proceso de hidrólisis enzimática con aireación	58
Figura 30. Proceso de lixiviado	58
Figura 31. Proceso de fermentación.....	59

Figura 32. Equipo para realizar destilación por arrastre de vapor	60
Figura 33. Equipo para deshidratación asistida por microondas	60
Figura 34. Cromatógrafo de gases, Dani, empleado para la detección de bioetanol.	62
Figura 35. Curva de las adiciones estándar	64
Figura 36. Vista del hongo en cada tipo de aserrín con el mismo peso	67
Figura 37. Vista macroscópica frontal e inferior del aglomerado por peso de aserrín	68
Figura 38. Vista macroscópica del hongo en cada tipo de aserrín con el mismo volumen	70
Figura 39. Vista macroscópica frontal e inferior del aglomerado por volumen de aserrín	71
Figura 40. Representación gráfica de los valores de glucosa de cada tipo de madera para el día 0, 3, 7 y 14	73
Figura 41. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la mezcla de los estándares	77
Figura 42. Cromatogramas obtenidos a partir de las inyecciones de las muestras de condensados obtenidos durante la destilación del mosto fermentado (aserrín fermentado)	78
Figura 43. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra destilada (Hidrodestilación asistida por microondas para obtener alcohol anhidro).....	79
Figura 44. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra segunda destilada	80
Figura 45. Cromatogramas obtenidos durante el análisis de adiciones estándar den los sistemas. (a) Muestra segunda destilación (hidrodestilación asistida por microondas), (b) repetición de la muestra (a) y (c) Muestra destilación. Concentración promedio de glucosa 192,157 mg/dL	82
Figura 46. Diagrama de balance másico del bioproceso aplicado a escala laboratorio, montaje 2	87
Figura 47. Descripción grafica de los pilares de la política de Biocombustibles en Colombia	96

RESUMEN

En una época como la actual, ante una eventual crisis energética debido a la acelerada producción y reducción en las reservas probadas del petróleo, y la emisión de gases de efecto invernadero de manera incontrolada a la atmósfera, la constante necesidad de disminuir tanto la dependencia hacia el crudo como las consecuencias del calentamiento global, ha provocado la búsqueda de fuentes de energía alternativa para la generación de combustibles económicamente viables y con un índice de contaminación reducido como lo es el caso del etanol (1).

En Colombia, el desarrollo de los biocombustibles viene enlazado con la política para subsector del downstream de la industria del petróleo y gas, la cual busca diversificar la canasta energética del país a través del uso de biocombustibles con criterios de sostenibilidad ambiental, autosuficiencia energética y desarrollo agroindustrial (2).

Actualmente Brasil y Estados Unidos utilizan etanol como combustible, obteniéndolo de caña de azúcar y almidón de maíz respectivamente. En el caso del maíz, se usa también como alimento y su valor comercial aumenta (3). Otro material que es de interés para la producción de etanol es el material lignocelulósico, ya que está compuesto principalmente de tres polímeros: lignina, hemicelulosa y celulosa, siendo estas dos últimas las aprovechables para la producción de etanol ya que su composición total corresponde a azúcares los cuales en su mayoría pueden ser convertidos a etanol (4).

Este proyecto busca producir etanol a partir de los residuos de la madera, residuo considerado como un obstáculo para la sostenibilidad de los bosques y las industrias forestales debido a su alto grado de producción como desecho tanto en los bosques como en las plantas procesadoras o aserríos. Por tanto, este proyecto basa su contribución a la protección del ambiente en dos aspectos: El primero es la disminución de la contaminación causada por el aserrín como desecho sólido y el segundo el uso de este desecho para la producción de bioetanol de segunda generación, el cual al ser mezclado con gasolina al 10% en Colombia (gasohol), lograría reducir las emisiones de monóxido de carbono (CO) e hidrocarburos totales (THC).

El proyecto se ejecutó en dos fases: la primera fase consiste de la selección de las mejores condiciones para el crecimiento del microorganismo mientras que la segunda fase consiste de la fermentación de la materia prima hidrolizada, mediante *Saccharomyces cerevisiae* para producir alcohol etílico; este alcohol fue destilado mediante hidrodestilación asistida por microondas, para producir alcohol carburante.

El aporte a este proceso investigativo del conocimiento se resume en un aspecto importante. En los procesos de obtención de etanol por fermentación, a diferencia de las materias ricas en azúcares simples (sacarosa y almidón) que requieren por lo general pocos

o ningún tratamiento preliminar, los materiales lignocelulosicos presentan una estructura compleja en la que los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) se encuentran protegidos por un compuesto fenólico muy resistente llamado lignina, por tanto dichos materiales requieren ser sometidos a un proceso de hidrólisis. En este contexto se aplicará hidrólisis enzimática por medio de un microorganismo productor de celulasa (enzima encargada de descomponer la celulosa en sus unidades de azúcares) llamado *Trichoderma viride*, el cual se adaptó al sustrato mediante cultivos sucesivos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

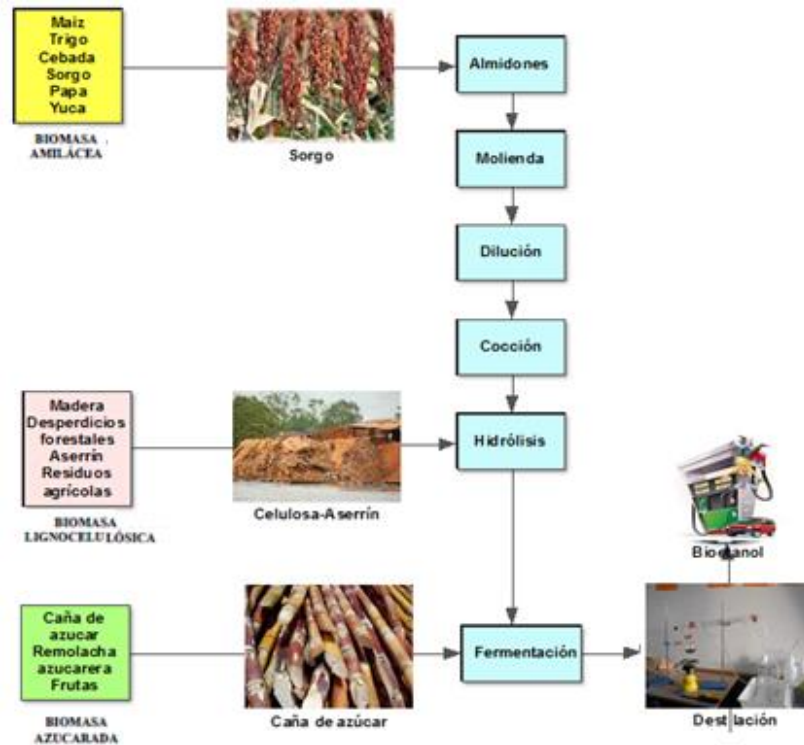
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Nuestro país y el mundo en un futuro cercano, estarán enfrentando el fin de la era del petróleo barato y de fácil acceso. Aunado a lo anterior, la quema indiscriminada de combustibles fósiles son responsables de grandes problemas medioambientales como la acumulación de gases invernadero, acidificación, contaminación del aire, contaminación del agua, daño de las capas superficiales y ozono troposférico. Por lo tanto, es imperioso desarrollar tecnologías para producir energía y productos químicos renovables y amigables con el ambiente. La electricidad puede ser producida con una amplia gama de tecnologías renovables. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser utilizados como biofábricas para producir metabolitos (productos químicos obtenidos por transformación bioquímica de los azúcares) que pueden emplearse como sustitutos de los derivados del petróleo, incluyendo combustibles líquidos y gaseosos; combustibles que crean un ciclo artificial del carbono sin aumento neto de la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera (5).

Estos biocombustibles ya juegan un papel importante en países como Estados Unidos y Brasil, los mayores productores de etanol carburante en el mundo. La producción actual de bioetanol de primera generación varía según la materia prima ya sean almidonadas o azucaradas, sin embargo es más fácil conseguir etanol a partir de materiales azucarados, como la caña de azúcar o la remolacha ya que se fermentan directamente, pero esta producción ha comenzado a cuestionarse en los últimos años ya que se considera una inferencia negativa en la agricultura dedicada a la producción de alimentos. Otra propuesta es producir biocombustible de segunda generación a partir de lignocelulosa, material residual de aserraderos y biomasa forestal (4), puesto que estas materias primas no compiten con los cultivos alimentarios y también son menos costosas que las materias primas agrícolas convencionales. Existen tres tipos de materias primas para producir bioetanol: 1) amiláceas, 2) lignocelulósicas y 3) azucaradas.

Los procesos a partir de los tres tipos de materias primas se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Fuentes de producción de Bioetanol



Fuente: Dra. Graciela Chalela A. (2013)

Adicional a esto, la biomasa lignocelulósica es una fuente de energía primaria renovable que puede proporcionar algunas alternativas de combustibles para el transporte como el bioetanol en el corto plazo. Básicamente se trata de añadir bioetanol, obtenido a partir de materia lignocelulosa a la gasolina para que la combustión de los carburantes emita menos cantidad de compuestos nocivos (6).

La madera se encuentra entre las materias lignocelulósicas con mayor disponibilidad en el mundo y en los últimos años los principales países productores de madera han centrado su interés en la búsqueda de alternativas para la gestión y la utilización de los residuos derivados de las actividades forestales. Las alternativas de aprovechamiento implementadas hasta el momento se han enfocado fundamentalmente hacia su recuperación energética (7).

En los procesos industriales como el aserrado la producción de residuos está entre 50 y 70% de la madera en rollo. El aserrín es un residuo acumulado que contamina el suelo y los cursos de agua, restringe la superficie útil de suelo y genera problemas ambientales por incendios y autocombustión (8). El uso de estos residuos ofrece una alternativa para la disminución de estos problemas.

1.2. ALCANCES

Este proyecto comprende la realización de un estudio preliminar a nivel laboratorio para la producción de bioetanol a partir de residuos de la madera usando como agente biodegradante el hongo *Trichoderma viride*, abriendo la posibilidad de escalamiento y optimización. Bioproceso realizado en el laboratorio de CINBAYA, ubicado en el primer piso del bloque D de la UNAB.

1.3. OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo general

Producir bioetanol carburante a partir de aserrín mediante hidrólisis enzimática con *Trichoderma viride*.

Objetivos específicos

1. Revisar la documentación existente sobre producción de bioetanol.
2. Establecer la metodología para la producción de bioetanol a partir de aserrín.
3. Aislar e identificar la cepa de *Trichoderma viride* como agente degradador de lignocelulosa.
4. Cuantificar la cantidad de bioetanol que se puede producir.
5. Evaluar la factibilidad biológica del uso del aserrín comparado con el uso de otras materias primas.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES

El modelo energético actual, basado en el consumo de combustibles fósiles, genera diversos problemas a causa del carácter no renovable de éstos, incremento de las emisiones contaminantes y la liberación de gases que contribuyen al calentamiento global. Existe una fuerte dependencia del combustible fósil para movilizar las industrias y el mercado mundial. Sin embargo las reservas escasean, las reservas probadas de crudo se calcularon en 1.669 miles de millones de barriles, según el BP Statistical Review June 2013¹, y el hecho de que las dos terceras partes de las reservas petrolíferas están ubicadas en regiones de inestabilidad o conflicto político, como los países del medio oriente y de la antigua Unión Soviética. De acuerdo a lo anterior mencionado podemos decir que la era del combustible fósil como fuente exclusiva de energía “tiene sus días contados” (7).

Actualmente nos encontramos frente a un cambio en el modelo energético mundial, donde el pilar de este nuevo modelo energético lo constituyen los biocombustibles. Los biocombustibles son los combustibles obtenidos a partir de carbohidratos provenientes de material vegetal, particularmente productos ricos en sacarosa, almidón o celulosa para la obtención de bioetanol, y productos ricos en aceites para el caso del biodiesel. Se han implementado diferentes estrategias a nivel mundial para reemplazar o utilizar de manera conjunta los combustibles fósiles y los biocombustibles.

En los últimos años se ha evidenciado un progresivo aumento en los precios de los combustibles fósiles, debido principalmente a los conflictos políticos e inestabilidad de los países en los cuales se concentran las principales reservas de petróleo. El incremento en los precios de los combustibles frenará el desarrollo económico de los países y generará el empobrecimiento de los consumidores (9). Se ha estimado que la industria del bioetanol podría crear miles de empleos y asegurar el crecimiento económico y energético nacional y global (10). En Estados Unidos, por ejemplo, en el año de 2004, la industria del bioetanol permitió la creación de 147 mil empleos en todos los sectores de la economía y produjo más de 2 billones de dólares de impuestos a los gobiernos locales, federales y estatales (11).

La producción mundial de etanol combustible ha presentado un incremento importante en los últimos años. Se estima que durante el período 2000-2005 la producción mundial pasó de $1,7 \times 10^{10}$ litros a cerca de $4,0 \times 10^{10}$ (12), teniendo en cuenta el estimado de que un galón de etanol es equivalente a 0,7 galones de combustible fósil, en estos cinco años se habría reemplazado el consumo de $1,61 \times 10^{10}$ galones de combustible fósil (13).

¹ Disponible en línea en bp.com/statisticalreview

En 1975, como consecuencia de la primera crisis petrolera, el Gobierno Federal estableció el programa “Proalcool”, cuyo objetivo fue producir etanol a partir de la caña de azúcar y utilizarlo para la producción de etanol como combustible carburante. Brasil fue uno de los primeros países en implementar la producción de bioetanol, es mundialmente reconocido como el país líder en producción de biocombustibles, particularmente etanol, y se ha consolidado como el país que produce la bioenergía más barata del mundo, a un costo por galón cerca de 0,25 dólares menor al del etanol de maíz producido en Estados Unidos, y cerca de dos dólares más económico que el etanol obtenido a partir de celulosa en Estados Unidos, o de remolacha azucarera en el caso Europeo (14). Toda la gasolina de Brasil está formada por una mezcla de 20-26% de etanol, la cual se conoce como “gasohol”. Actualmente la producción de etanol en Brasil sobrepasa los $1,6 \times 10^{10}$ litros y constituye el 14.8% de los combustibles empleados en el transporte (14). Desde el 2003 Brasil cuenta con vehículos “flex-fuel” los cuales pueden emplear etanol, gasolina, o una mezcla de los dos, ofreciéndole al consumidor la flexibilidad de decidir cuál combustible incorporar en su automóvil. La materia prima principal para la producción de bioetanol en Brasil la constituye la caña de azúcar (10).

Estados Unidos ha sido otro de los países que ha incursionado fuertemente en la producción de biocombustibles en los últimos años, a pesar de que no haya sido uno de los pioneros en este campo. A partir de 1990 la industria del etanol ha sido la de mayor crecimiento en las zonas rurales de Estados Unidos. En el 2004 los biocombustibles en Estados Unidos representaban aproximadamente el 3% del consumo total de combustible para transporte (10). La capacidad de producción de etanol para combustible en el 2004 fue de 15.000 millones de litros y se establecieron 12 nuevas plantas de producción elevando su capacidad de producción a 16.200 millones de litros en el 2005. Sólo en el 2008, la producción de etanol en Estados Unidos ascendió a $3,4 \times 10^{10}$ litros, producidos por 170 plantas (RFA, 2009). Esta cifra es equivalente a $2,38 \times 10^{10}$ litros de combustible fósil. El 90% del etanol de Estados Unidos se obtiene del cultivo de maíz (14). Sin embargo otras alternativas se están considerando como el empleo de sorgo en grano, la remolacha, la celulosa y los desechos sólidos municipales (10).

Colombia tiene características propicias para la producción de biocombustibles: su ubicación tropical, cultura agrícola y disponibilidad de tierras aptas para determinados cultivos hacen que esta práctica sea viable. Sumado a lo anterior, el gobierno ha promovido una serie de estímulos legales que propician el desarrollo de la industria de biocombustibles, tales como exenciones tributarias, creación de zonas francas para su cultivo, y generación de planes de crédito e inversión (7).

La biomasa lignocelulósica es la materia prima renovable más abundante, su producción anual se ha estimado 1×10^{10} millones de toneladas alrededor del mundo (Sánchez & Cardona, 2008). La conversión biológica de las diferentes materias primas lignocelulósicas, como los son los bosques y los residuos agrícolas o los cultivos lignocelulósicos dedicados a

la obtención de etanol ofrece numerosos beneficios, pero su desarrollo se ve obstaculizado por los factores económicos y técnicos (15). En este sentido, uno de los factores más importantes para reducir el costo de la producción de etanol son la utilización eficiente de la materia prima para obtener altos rendimientos de etanol, alta productividad, alta concentración de etanol en la destilación, la valorización de todos los coproductos y la integración de procesos con el fin de reducir la demanda de energía (16).

Por otro lado, la Universidad de Antioquia, desarrolló un trabajo de grado donde se analiza la disponibilidad del recurso madera en Colombia y realiza una evaluación integral del recurso con miras a ser utilizado en la producción de etanol carburante. Además, se analiza la diversidad de especies, las condiciones de plantación, crecimiento de especies arbóreas y la composición química de las maderas.

Dadas las circunstancias actuales de la búsqueda de nuevas alternativas de energía y beneficios ambientales se da inicio al proyecto interno de investigación que tiene por título: MADERA, UN POTENCIAL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES EN COLOMBIA.

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Procesos Físicoquímicos Aplicados PFA, Departamento de Ingeniería Química, ubicado en las instalaciones de la Universidad de Antioquia, Calle 62 # 52-59, Medellín – Colombia.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

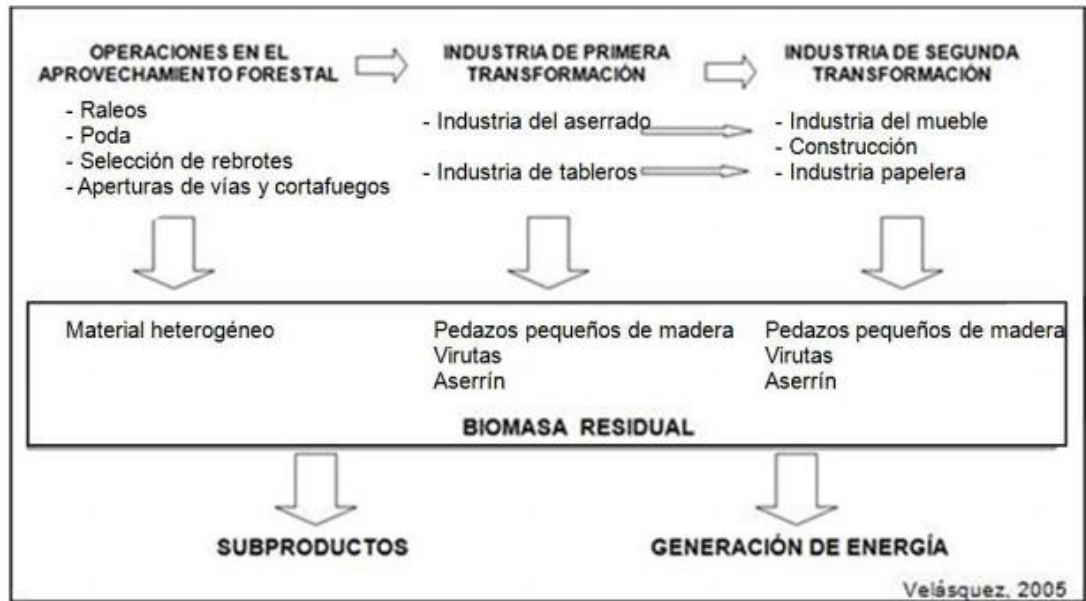
2.2.1. Aserrín como contaminante

Las partículas que se desprenden cuando la madera es sometida a una herramienta o máquina de corte son llamadas aserrín. Este material cuando se acumula a la intemperie contamina el suelo y los recorridos de agua; restringe la superficie útil de suelo y genera problemas ambientales por riesgo de incendios y autocombustión (8) (17).

El aserrín generado por el proceso de aserrío es el más importante en volumen. El tamaño y cantidad de aserrín producido dependerá de las demandas de los productos (vigas, tablas), las características de cada trozo, pues sierras más gruesas generan más aserrín y partículas más grandes y, entre más pasadas haga la sierra, aumentará también su cantidad (8).

La cadena de aprovechamiento de los productos forestales se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Cadena de aprovechamiento de los productos forestales



Fuente: (8)

2.2.2. Materiales lignocelulósicos

El material lignocelulósico presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables (18).

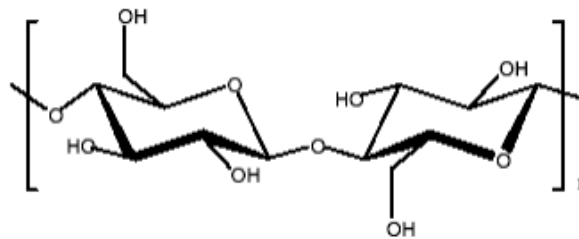
Los componentes principales de naturaleza polisacárida que conforman el material lignocelulósico son de dos tipos, la celulosa y la hemicelulosa, los cuales están asociados unos con otros.

2.2.2.1. Celulosa

En su mayoría, los carbohidratos presentes en la naturaleza se encuentran en forma de polisacáridos, estos no solamente están compuestos por azúcares unidos por enlaces glicosídicos, sino también pueden contener estructuras sacáridas poliméricas unidas por enlaces covalentes a aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos y otras estructuras (19).

La celulosa es el polímero más abundante de la naturaleza, recibe el nombre de biopolímero ya que forma parte de estructuras biológicas vegetales. Su estructura está formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces en el carbono 1 y el carbono 4 por medio de una unión β (4) como se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Estructura química de la celulosa.



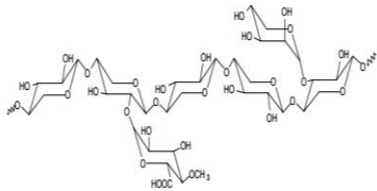
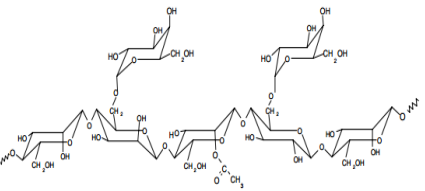
Fuente: (18)

2.2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste de diferentes polímeros, tales como: pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), y ácidos urónicos. El componente hemicelulósico principal de algunos materiales vegetales como maderas duras son los xilanos y en maderas suaves el glucomanano, como se muestra en la Tabla 1. Este polímero es de peso molecular más bajo que la celulosa y contiene ramificaciones con cadenas laterales cortas de azúcares diferentes fácilmente hidrolizables (16, 4).

Tabla 1. Componente hemicelulósico principal

Tipo de madera	Xilanos	Glucomananos
Madera dura	<p>Estructura del O-acetil-4-Ometilglucuroxilano</p>	<p>Estructura del glucomanano</p>

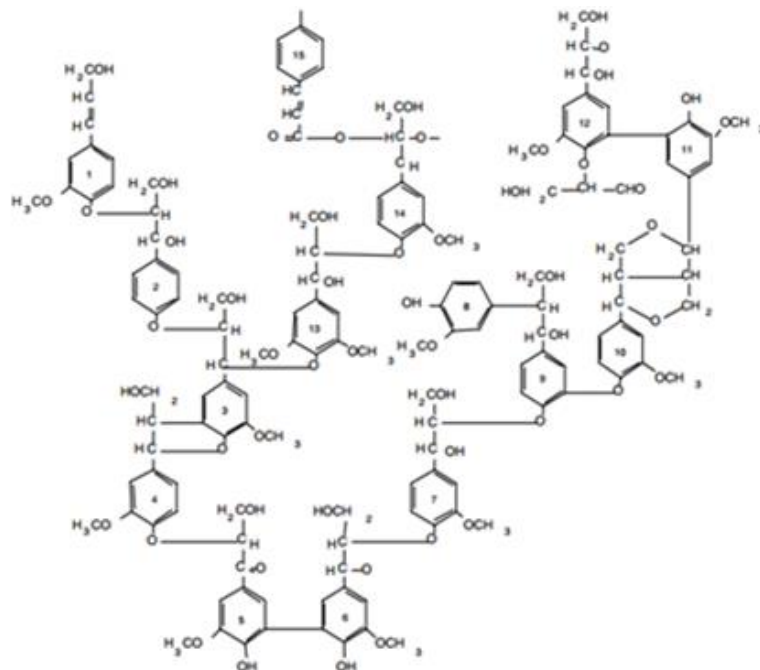
Madera Blanda	<p>Estructura del arabino-4-O-metilglucuroxilano</p> 	<p>Estructura del O-acetilgalactoglucomanano</p> 

Fuente: La tabla fue elaborada a partir de imágenes tomadas de (18) por la autora.

2.2.2.3. Lignina

Después de la celulosa y hemicelulosa, la lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Este es un heteropolímero amorfo que consiste de tres diferentes unidades fenilpropano (p-coumaril, coniferil y alcohol sinapil) unidos por diferentes tipos de enlaces. El principal propósito de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia a ataques microbianos o al estrés oxidativo (18). En la Figura 4 se muestra la estructura de la lignina.

Figura 4. Estructura de la lignina



Fuente: (18)

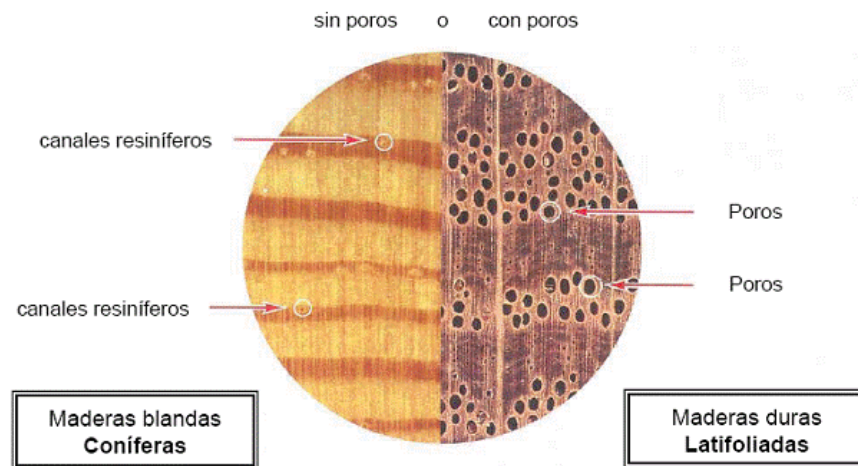
2.2.3. Madera

La madera es un material ortótropo² encontrado como principal contenido del tronco de un árbol. Las maderas se caracterizan por tener troncos que crecen cada año y están compuestos por fibras de celulosa unidas con lignina, se clasifican en duras y blandas, según el árbol del que se obtienen. La madera de los árboles de hoja caduca (caducifolios) es madera dura o también llamada latifoliadas, en tanto la de las coníferas está clasificada como blanda (7).

2.2.3.1. Tipos de maderas

Existen dos grandes grupos botánicos que incluyen la mayor parte de las especies vegetales susceptibles de suministrar maderas comercializables: las gimnospermas y las angiospermas, a las que comúnmente se hace referencia de forma simplificada como conífera y latifoliada respectivamente (20). En la Figura 5 se muestra la diferencia entre maderas blandas y duras.

Figura 5. Vista microscópica de maderas blandas y duras



Fuente: (20)

Maderas coníferas

La estructura de éste tipo de maderas es más sencilla: cabe destacar que faltan esas células que en las maderas frondosas aparecen como poros en los cortes radial y tangencial. Dichas

² Un material ortótropo tiene dos o tres ejes ortogonales entre sí (axial, radial y circunferencial).

maderas son ligeras y blandas, aunque la dureza, pesadez y tenacidad pueden diferir bastante en una misma clase de maderas. El nombre de coníferas alude a la forma cónica de la mayor parte de las especies de este grupo: abetos, pinos, cedros, piceas, etc.

Las maderas de coníferas dadas sus cualidades de blandura y también su sencillez en su constitución son bastante fáciles de trabajar. Como algo anecdótico podríamos decir que conservan su color verde todo el año, porque naturalmente son de hojas perennes (20).

Maderas de latifoliadas

Este tipo de maderas están constituidas por células de paredes gruesas, con pequeños espacios huecos, por lo cual son más pesadas que las maderas de coníferas y tienen un tejido leñoso más compacto. Así entendemos por qué la mayoría de las maderas de ofrecen resistencias superiores a las coníferas. La complejidad de su estructura influye mucho en su aspecto exterior y su valor decorativo, como es su veteado, brillo, reflejos, nudos, etc.

Esta clase de maderas, generalmente duras, son más difíciles de trabajar que las coníferas. Los árboles de frondosas, lo contrario de los de coníferas, son de hoja caduca, y por tanto pierden su verdor en el invierno (20).

En el grupo de las frondosas están las especies de hoja caduca presentes en todos los continentes. Normalmente se distingue entre frondosas de zonas templadas y frondosas tropicales. La mayor parte de las especies utilizadas en pavimentos de madera son frondosas de zonas templadas y de zonas tropicales: haya, roble, arce, fresno, etc.

2.2.3.2. Composición de la madera

La celulosa es la principal componente de las paredes celulares de los árboles y otras plantas. Es una fibra vegetal que al ser observada en el microscopio es similar a un cabello humano, cuya longitud y espesor varía según el tipo de árbol o planta. Las fibras de algodón, por ejemplo, tienen una longitud de 20-25 mm., las de Pino 2-3 mm. Y las de Eucalipto 0,6-0,8 mm. De igual manera, el contenido de celulosa varía según el tipo de árbol o planta que se considere como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química típica de la madera

Tipo de fibra	Celulosa (%)	Lignina (%)	Hemicelulosa (pentosas)(%)	Cenizas (%)	Sílice (%)
Coníferas	46-54	26-34	(16-21)	<1	-
Frondosas	38-49	23-30	(19-26)	<1	-

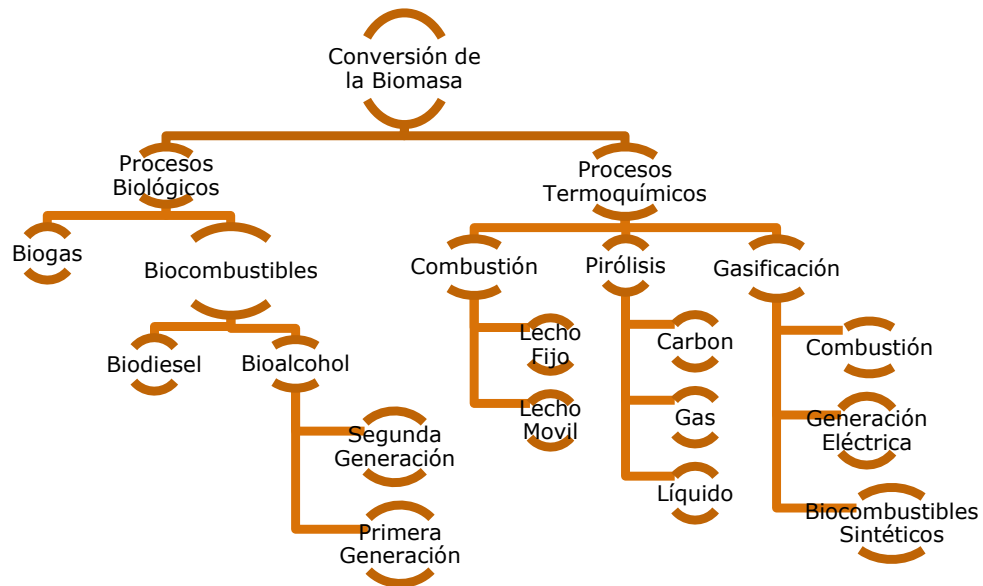
Fuente: (20)

2.2.4. Biocombustibles

La biomasa tiene carácter de energía renovable ya que su contenido energético procede en última instancia de la energía solar fijada por los vegetales en el proceso fotosintético. Esta energía se libera al romper los enlaces de los compuestos orgánicos en el proceso de combustión, dando como productos finales dióxido de carbono y agua (21). Por este motivo, los productos procedentes de la biomasa que se utilizan para fines energéticos se denominan biocombustibles, según su estado físico pueden ser biocombustibles sólidos, en referencia a los que son utilizados básicamente para fines térmicos y eléctricos, y líquidos como sinónimo de los biocarburantes (22).

Existen dos medios para la conversión de biomasa: por medios termoquímicos o por biológicos como se muestra en la Figura 6.

Figura 6. Procesos y productos de conversión de la biomasa



Fuente: Autora

2.2.4.1. Biocombustibles líquidos

Se denominan así a una serie de productos de origen biológico utilizables como combustibles de sustitución de los derivados del petróleo o como aditivos de éstos para su uso en motores (22).

Biocombustibles de primera y segunda generación

- Biocombustibles de primera generación

Son producidos de caña de azúcar o almidón (bioetanol), aceite vegetal o grasas animales (biodiesel), utilizando la tecnología convencional (23). Estas materias primas son de la cadena alimentaria humana o animal. Su uso ha sido criticado por desviar los alimentos fuera de la cadena alimentaria humana, conduciendo a la escasez de alimentos y subidas de los precios (6).

- Biocombustibles de segunda generación

Son basados en cultivos no alimentarios. Entre estos son residuos de biomasa, los tallos de trigo, bagazo de caña, maíz, madera y cultivos especiales energéticos. Para producción de biocombustibles de segunda generación utilizan la tecnología de biomasa a líquido, por ejemplo etanol lignocelulósico.

Muchos de los biocombustibles de segunda generación están en desarrollo: biohidrógeno, biometanol, DMF³, BIO-DME⁴, diésel Fischer-Tropsch, mezclas de alcoholes y diésel de madera (6).

El rendimiento energético de los diferentes biocombustibles mencionados anteriormente se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento energético (GJ/ha) de los biocombustibles

Generación	Biocombustibles	GJ/ha	ha/tep
1°	Biodiesel de girasol	36	1,17
	Biodiesel de soja	18-25	2,35-1,67
	Etanol de trigo	53-84	0,79-0,50
	Etanol de maíz	63-76	0,66-0,55

³ DMF: Dimetilfumarato

⁴ DME: Dimetoxietano

	Etanol de remolacha azúcar	117	0,36
	Etanol caña de azúcar	110-140	0,38-0,30
2°	Etanol de <i>Panicum virgatum</i>	228-407 (futuro)	0,18-0,10
	Plantación de eucalipto-biodiesel FT ⁵	460-620	0,08
	Plantación de eucalipto - metanol	800-1000	0,04
	Plantación de eucalipto – DME	850-1100	0,04

Fuente: (3)

Bioetanol

El bioetanol se produce empleando materia prima de base biológica con cantidades apreciables de azúcares, generalmente obtenido por la fermentación del azúcar utilizando levaduras y otros microorganismos (3). Estas materias primas para la obtención de bioetanol se clasifican como se muestra en la Tabla 4.

Inicialmente las materias primas son sometidas a un proceso de remoción de azúcar contenido en las mismas (trituración, impregnación y tratamiento químico). Una destilación y deshidratación son empleadas como último paso en la fabricación de etanol para obtener la concentración deseada (3).

Tabla 4. Materias primas para obtención de bioetanol

Azucaradas	Mostos y jugos de diferentes frutas	
	De remolacha y de caña de azúcar	
	El sorgo dulce	
	Mandioca	
	Cereales	Maíz
		Cebada
		Malte
		Trigo
Avena		
	Centeno	

⁵ Biodiesel FT: Biodiesel Fischer-Tropsch

	Tubérculos	Arroz
		Papa
		Camote
		Raíz de girasol
Celulósicas	Madera	
	Bagazo de caña de azúcar	
	Residuos de palma o de trigo	
	Residuos de maíz	
	Pulpa de remolacha	

Fuente: (3)

2.2.4.2. Propiedades del bioetanol

Para analizar las propiedades del bioetanol como sustitutivo total o parcial de la gasolina en su uso como combustible es necesario conocer las propiedades de cada uno de estos productos y sus posibles interrelaciones en caso de mezcla.

Las propiedades físico-químicas de interés para el estudio del comportamiento del etanol como combustible en motores de automóvil aparecen comparadas con las de la gasolina en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación entre propiedades físico-químicas del etanol y la gasolina

Propiedad	Unidad	Gasolina	Etanol
Formula		C ₅ -C ₁₂	C ₂ H ₅ O
Densidad	kg/L	0,72 - 0,78	0,792
Poder calorífico inferior	kJ/kg	43.500	28.225
	kJ/L	32.180	22.350
Solubilidad en agua	% en volumen	~0	100
Punto de ebullición	°C	88	78,37
Relación estequiométrica aire/combustible		14,5	9
Índice de octano		95	106
Presión de vapor	kPa	40-65	15-17
Calor latente de vaporización	kJ/kg	348,8	920,9

Fuente: (21)

2.2.4.3. Ventajas y desventajas del etanol combustible

Ventajas:

- Se puede producir a partir de fuentes renovables.
- Genera menos monóxidos de carbono al utilizarse como aditivo en la gasolina en comparación a si se usa únicamente gasolina.
- Presenta un elevado índice de octanaje, favoreciendo la combustión y evitando el golpeteo.
- Es menos inflamable que la gasolina y el diesel.
- La combinación de 90% de gasolina y 10% etanol puede ser usado en los vehículos sin ninguna modificación.

Desventajas:

- Presenta menor poder calorífico que la gasolina, por lo que requiere un mayor consumo.
- Contiene 2/3 de la energía contenida en el mismo volumen.
- La elaboración de etanol a partir de granos es más caro que la gasolina. Aproximadamente 1.5 veces.
- Presenta problemas de corrosión en partes mecánicas y sellos.
- En climas muy fríos presenta dificultades para el encendido.
- Genera emisiones de óxidos de nitrógeno y aldehídos (contaminantes menores).
- Para el uso de una mezcla de 85% etanol y 15% gasolina (E85) se requiere de modificación en los motores.

2.2.4.4. Contexto mundial

Según datos de la IEA⁶ (2007) se espera que la participación de los combustibles en el sector de transporte se incremente entre un 1% hasta valores próximos de 7% en 2030. Esto representa un aumento de un valor equivalente a 15,5 Mtep (millones de toneladas equivalentes de petróleo) en 2004 y hasta 146,7 Mtep en 2030 (23).

En la Tabla 6. Se puede apreciar los principales países productores de etanol y biodiesel.

⁶ IEA: Agencia Internacional de Energía.

Tabla 6. Principales países productores de etanol y biodiesel 2007 y proyecciones para el 2017

Bioetanol (Millones de litros)			Biodiesel (Millones de litros)		
País	2007	2017	País	2005-7 (Media)	2017
Brasil	22.551	40.511	UE	4.095	13.217
U.S.A	25.864	52.444	U.S.A	1.429	1.731
China	4.150	10.210	India	277	385
UE	3.599	11.883	Indonesia	241	2.984
India	2.075	3.574	Austria	199	994

Fuente: (3)

El mayor incremento en el consumo de biocombustibles se presenta en Estados Unidos, Europa, Asia y Brasil.

2.2.4.5. Situación en Colombia

El programa para etanol como combustible en Colombia comenzó con la expedición de la ley 693 del año 2001 que obligaba al enriquecimiento en oxígeno de la gasolina por motivos ambientales. Esto se hizo inicialmente para reducir las emisiones de monóxido de carbono de los coches. Regulaciones posteriores eximieron al etanol elaborado a partir de biomasa de algunos impuestos que gravan la gasolina, haciendo así más barato el etanol que la gasolina. Esta tendencia se vio reforzada cuando los precios del petróleo subieron, y con él el interés en combustibles renovables (24).

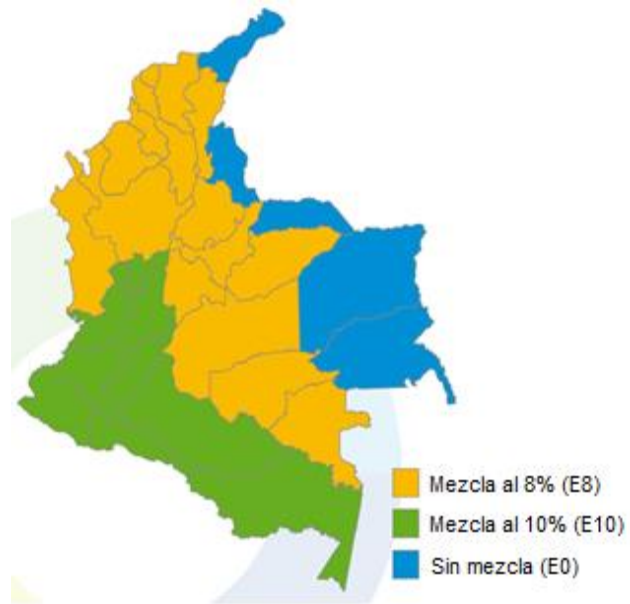
Actualmente en Colombia el requisito de incorporar un 10% de etanol en la gasolina sólo está vigente en Bogotá, el Valle del Cauca y el Eje Cafetero como se muestra en la Figura 7. Para cumplir con este requerimiento, se estima que se necesitan 675.000 litros de etanol diarios para suplir las necesidades de las siete principales ciudades de Colombia y 1,5 millones de litros diarios a nivel nacional (24).

Actualmente existen cinco plantas principales en Colombia para la producción de etanol ubicadas en el Valle del Río Cauca (Incauca, Providencia, Manuelita, Mayagüez y Risaralda), las cuales producen cerca de un millón de litros diarios de alcohol carburante, lo que puede equivaler a haber descubierto un campo petrolero con producción diaria de 16.500 barriles (2).

Las plantas productoras y su capacidad se pueden observar en la Figura 8 y la Tabla 7 respectivamente.

El objetivo en el mediano plazo es alcanzar a nivel nacional una mezcla obligatoria E10 (ver ANEXO A.). Para incrementar mezclas, el Gobierno Nacional está diseñando un programa para comercializar mezclas que puedan ser utilizadas en vehículos FFV⁷ (E25-E85) a partir del 2015 (2).

Figura 7. Mezcla alcohol carburante en Colombia



Fuente: (2)

⁷ FFV: Flexible Fuel Vehicle

Figura 8. Ubicación de plantas productoras de alcohol carburante en Colombia



Fuente: (2)

Tabla 7. Plantas productoras de alcohol carburante en Colombia

Ubicación	Inversionista	Capacidad (L/Día)	Área Sembrada (ha)	Empleos Directos	Empleos Indirectos
Miranda, Cauca	Incauca	350.000	11.942	2.171	4.342
Palmira, Valle	Ingenio Providencia	300.000	9.287	1.688	3.376
Palmira, Valle	Manuelita	250.000	8.721	1.586	3.172
Candelaria, Valle	Mayagüez	250.000	6.587	1.198	2.396
La Virginia, Risaralda	Ingenio Risaralda	100.000	3.004	546	1.092
TOTAL en producción		1.250.000	40.741	7.429	14.858

Fuente: (2)

2.2.5. Tecnologías para la producción de bioetanol

Las diferentes tecnologías asociadas a la conversión de biomasa en bioetanol vienen dadas por los siguientes pasos básicos (18 y 19):

1. Pre-tratamientos sean mecánicos, químicos o térmicos con el fin de facilitar la hidrólisis.
2. Hidrólisis, es la conversión de la biomasa en una materia prima adecuada para la fermentación (azúcares fermentables). Este paso constituye la mayor diferencia entre los procesos disponibles para la producción de bioetanol, ya que varía de acuerdo a la naturaleza del material usado. Las materias con alto contenido de azúcares requieren por lo general poco o ningún tratamiento preliminar; mientras las materias amiláceas y celulósicas deben ser hidrolizadas antes de que actúen sobre ellas las levaduras.
3. Fermentación, consiste en una secuencia de reacciones donde se libera energía y se obtiene etanol y dióxido de carbono a partir de azúcares por medio de la acción de un biocatalizador (microorganismos como levaduras y bacterias).
4. Destilación, es un proceso de separación que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y posteriormente enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. Gestión recursos producción de energía fermentación evaporación destilación

En la Figura 9 se puede apreciar los pasos del proceso para la obtención de bioetanol.

2.2.5.1. Pre-tratamientos

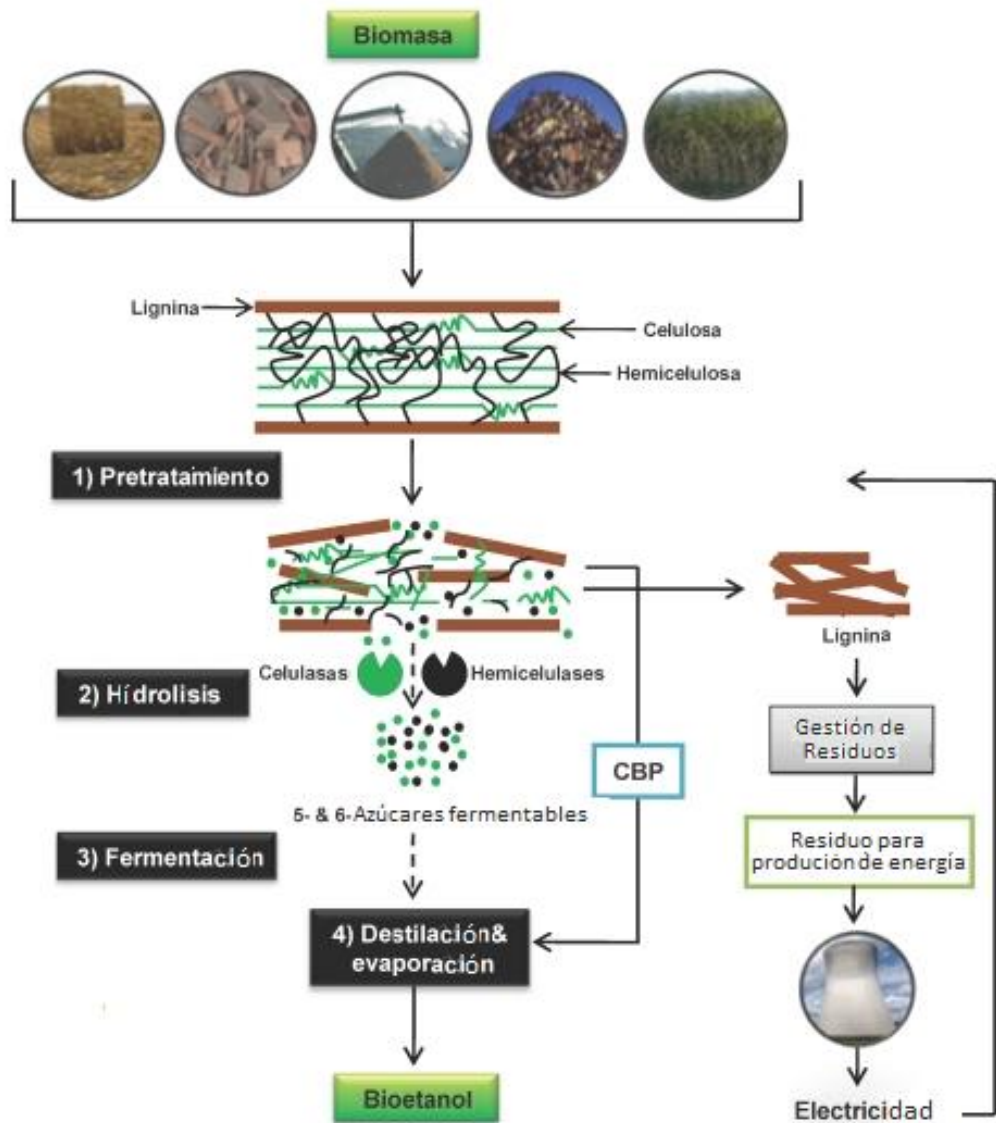
Para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos es necesario someterlos a pre-tratamientos para facilitar la hidrólisis de la celulosa generar azúcares fermentables mediante el uso de celulasas. La lignocelulosa es altamente resistente a la hidrólisis, ya que el conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos entre sí por enlaces covalentes, diversos puentes intermoleculares y fuerzas de Van der Waals.

Los pre-tratamientos promueven la generación de regiones amorfas en la celulosa las cuales son más susceptibles a la hidrólisis (25).

Existen diversos procesos que van desde un tratamiento mecánico, como la reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis y disminuir el grado

de polimerización de los compuestos, hasta un tratamiento térmico donde el efecto es que a altas temperaturas (150 – 180 °C) la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta para ser hidrolizada (19) como se muestra en la Tabla 8.

Figura 9. Esquema imagen para la conversión de biomasa lignocelulósica en Bioetanol



Fuente: (26)⁸

⁸ CBP: Consolidated Bioprocessing

Se han usado tratamientos ácidos y alcalinos, los cuales promueven de igual manera la solubilización de la lignina y principalmente la hemicelulosa teniendo el mismo propósito que el tratamiento térmico (27).

Tabla 8. Ejemplos de pre-tratamientos de materiales lignocelulósicos

Métodos	Procedimiento	Referencia
Pulverizado mecánico	Molienda	(28)
Pirólisis	Temp. >300 C	(29)
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260 °C 0,69-4,85 MPa por unos segundos o minutos y liberación de presión hasta presión atmosférica	(30)
Agua líquida caliente	Agua caliente a presión 170-230 °C 1-46 min	(31)
Explosión de fibra con amoníaco	1-2 kg de amoníaco/kg de material seco 90°C/30min	(32)
Explosión con CO ₂	4 kg de CO ₂ /kg de material 5,62 Mpa	(28)

Fuente: (19)

2.2.5.2. Hidrólisis

La generación de azúcares monoméricos derivados ya sea de la celulosa o hemicelulosa puede ser llevada a cabo por vía química (ácidos o álcalis) o por vía enzimática.

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales (4) (18).

Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (33). Sin embargo, sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial (18).

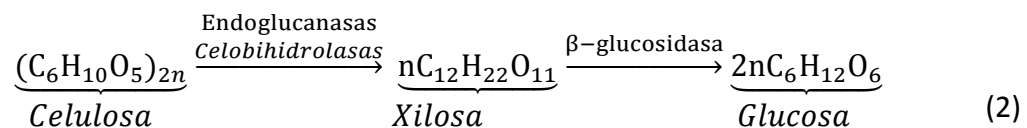
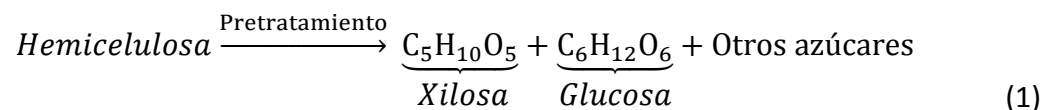
Los procesos industriales de hidrólisis ácida pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos.

- Ácidos concentrados

Los procesos que implican ácidos concentrados operan a baja temperatura obteniendo altos rendimientos en el proceso de hidrólisis (rendimiento superior al 90% de la glucosa potencial). A pesar de esto, la gran cantidad de ácido empleado en la impregnación del material a tratar y el alto costo de su recuperación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que obliga a altas inversiones en los equipamientos, hacen que el proceso no sea rentable (34).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, cuya mezcla produce la degradación de la celulosa (9, 16). Esta transformación se produce a través de una compleja secuencia de reacciones que puede expresarse, desde el punto de vista tecnológico, por la siguiente ecuación:



El único requerimiento para la hidrólisis enzimática es ajustar las condiciones, como el pH y la temperatura para que el proceso enzimático se lleve a cabo adecuadamente.

Un aspecto muy importante es que se les considera a estas reacciones como amigables al medio ambiente (35).

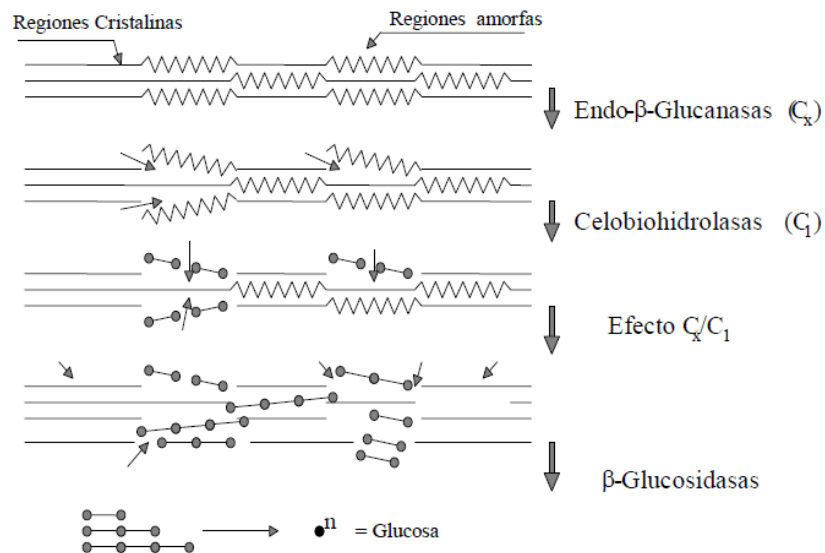
La celulosa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (26) como se muestra en la Figura 10.

Este complejo enzimático está formado por tres tipos de enzimas (36) (26):

- Endoglucanasas (EGs) o endocelulasas (β -1,4-D-glucan 4-glucanohidrolasa): produce escisión al azar de la cadena de celulosa dando glucosa, celobiosa y celotriosa. Peso molecular de 18.000 a 60.000.
- Celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasa (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa): ataca por el extremo no reductor de la cadena celulosa dando celobiosa como producto primario. Peso molecular de 50.000 a 71.000.

- β -glucosidasa (BGs) o celobiasa (β -D-glucosido glucohidrolasa): Hidroliza la celobiasa a glucosa con una elevada actividad con respecto a celodextrinas. Su peso molecular es de 76.000.

Figura 10. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa



Fuente: (18)

La acción hidrolítica de las celulasas puede describirse, de forma esquemática, como un proceso en dos etapas (37):

- Primera etapa, es la conversión de celulosa a celobiosa, por la acción sinérgica de endo y exocelulasas, que son fuertemente adsorbidas en la superficie de la celulosa sólida.
- Segunda etapa, es la conversión de celobiosa a glucosa por acción de la β -glucosidasa, en fase acuosa.

Trichoderma

El consorcio por enzimático se puede obtener a partir de seres vivos y principalmente microorganismos (hongos y bacterias). Las celulasas de origen fúngico se obtienen principalmente de los géneros *Trichoderma spp*, *Phanerochaete spp* y *Fusarium*, son los que han sido las más estudiadas por la capacidad de producir enzimas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo (26).

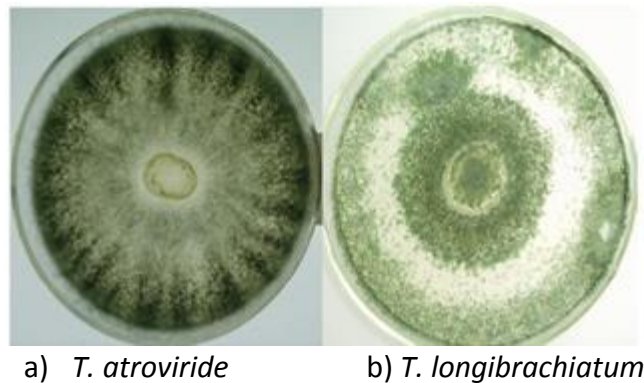
Los microorganismos producen una amplia gama de enzimas útiles a nivel industrial, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo (36).

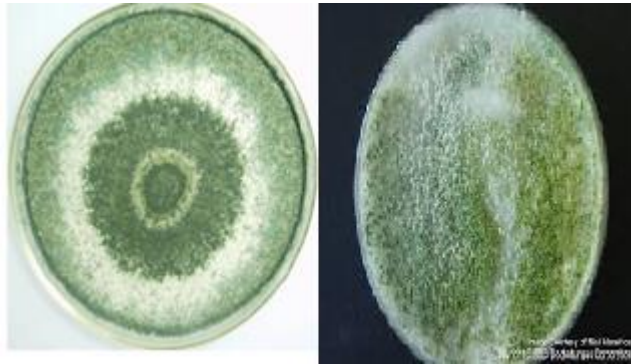
La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del ciclo de crecimiento. Algunos hongos de importancia industrial empleados para la obtención de metabolitos son correspondientes al género Deuteromicetos (Deuteromicotina), entre los cuales están *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum-chrysogenum* y *Trichoderma*. Debido a estas características, se pretende aprovechar su metabolismo para degradar la celulosa presente en la fibra residual de la madera.

Las especies de *Trichoderma* son hongos ubicuos y aparecen en cualquier tipo de suelo, produciendo colonias blancas, amarillas o más típicamente verdes cuando se cultivan. Las especies de *Trichoderma* se utilizan para producir celulasas. Además, son particularmente efectivas como antagonistas del crecimiento de otros hongos, muchos de ellos patógenos de plantas, con el resultado de que las especies de *Trichoderma* son importantes agentes en biocontrol.

En la Figura 11 se puede apreciar las diferentes colonias de hongo *Trichoderma*.

Figura 11. Colonia de hongo *Trichoderma*





d) *T. virens*

e) *T. viride*

Fuente: (38)

2.2.5.3. Fermentación

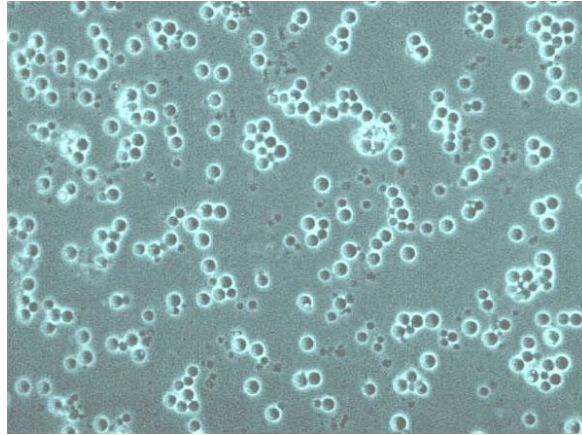
Los azúcares monoméricos y fermentables generados por la hidrólisis enzimática pasan a ser metabolizados por microorganismos que produzcan etanol. La glucosa liberada de la celulosa es convertida a etanol por bacterias o levaduras, teniendo como ejemplos *Zymomonas mobilis* o *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente mediante la glucólisis (39).

En la fermentación alcohólica, además de los microorganismos (levaduras), las enzimas juegan un papel importante ya que sin estas no sería posible tan compleja operación. Además de los microorganismos y enzimas se requiere que el medio sobre el cual actúan tenga unas condiciones especiales como pH, temperatura, concentración de nutrientes en el sustrato.

Levadura es el nombre genérico dado a un grupo de hongos *Ascomycetes* pertenecientes al orden *Endomycetales*. Las levaduras son micro hongos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se reproducen mediante gemación.

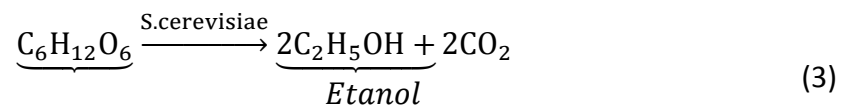
La membrana celular consta de polisacáridos y muy poca quitina. Tienen glucógeno como sustancia de reserva y contienen también numerosas vitaminas. Provocan la fermentación alcohólica de las masas de harina y de los líquidos azucarados, y muchas de ellas se utilizan para obtener bebidas y elaborar pan y otros productos. Se puede apreciar de forma microscópica en la Figura 12 la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 12. Observación microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* cepa utilizada en el proceso de fermentación



Fuente: CINBBYA-UNAB

La levadura es un anaerobio facultativo: transformando azúcar a la misma velocidad, la levadura aeróbica produce dióxido de carbono, agua y una producción relativamente alta de nueva levadura, mientras que la levadura crecida anaeróbicamente tiene una velocidad relativamente lenta de crecimiento, que ahora se acopla a una alta conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono (34). Esta transformación se produce a través de una reacción que puede expresarse, desde el punto de vista tecnológico, por la siguiente ecuación:



Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias. Estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono. La fermentación alcohólica, comienza después de que la glucosa entra en la célula de levadura.

La glucosa se degrada a ácido pirúvico, proceso llamado glucólisis, este ácido formado luego es transformado a etanol y dióxido de carbono. Los seres humanos han aprovechado este proceso para hacer pan, cerveza, y vino.

Condiciones de la fermentación alcohólica

La actividad de las levaduras y de las enzimas se ve influenciada por agentes externos y que se reflejan en el rendimiento de la operación, entre estos factores tenemos el pH, temperatura, presión, azúcares presentes, ácidos.

- pH: La fermentación se realiza entre un rango de pH entre 3.0 a 4.0., con este rango no permite que en él se desarrollen agentes patógenos.
- Temperatura: La actividad de las levaduras es intensa entre 20°C y 25°C, máxima a 30°C y por encima de los 40°C disminuye. Nunca se debe permitir que un mosto fermente por encima de los 40°C.
- Presión: En la actividad fermentativa se forma etanol y se desprende gas carbónico, en la medida que su concentración aumenta en el recipiente de fermentación, la presión aumenta y trae como consecuencia una disminución de la actividad celular
- Azúcares: Es la materia prima para las levaduras, la concentración del mosto debe estar entre 14 a 20 grados Brix.

2.2.5.4. Destilación

Proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación (4).

El objetivo principal de la destilación es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles.

Si la diferencia en volatilidad (y por tanto en punto de ebullición) entre los dos componentes es grande, puede realizarse fácilmente la separación completa en una destilación individual. Mientras que si los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla sólo difieren ligeramente, no se puede conseguir la separación total en una destilación individual. Un ejemplo importante es la separación de agua, que hierve a 100 °C, y alcohol, que hierve a 78,5 °C. Si se hierve una mezcla de estos dos líquidos, el vapor que sale es más rico en alcohol y más pobre en agua que el líquido del que procede, pero no es alcohol puro. Con el fin de concentrar una disolución que contenga un 10% de alcohol (como la que puede obtenerse por fermentación) para obtener una disolución que contenga un 50% de alcohol (frecuente en el whisky), el destilado ha de destilarse una o dos veces más, y si se desea alcohol industrial (95%) son necesarias varias destilaciones (21).

Tipos de destilación

Existen varios tipos de destilación, sin embargo, el punto en común de todos estos y al que se le debe dar la mayor importancia para asegurar la eficacia de la separación de los componentes de interés, es el área de contacto líquido - vapor, ya que este es el único punto (ya sean platos, el bulbo del termómetro, etc.) en el que se produce la condensación de los componentes separados y por tanto, a mayor área de contacto más rápida y eficiente será la separación (21).

Destilación simple

Es el método que se usa para la separación de líquidos con punto de ebullición inferior a 150°C a presión atmosférica de impurezas no volátiles o de otros líquidos miscibles que presenten un punto de ebullición al menos 25°C superior al primero de ellos (21).

Destilación Fraccionada

Este proceso, conocido como rectificación o destilación fraccionada, se utiliza mucho en la industria, no sólo para mezclas simples de dos componentes (como alcohol y agua en los productos de fermentación, u oxígeno y nitrógeno en el aire líquido), sino también para mezclas más complejas como las que se encuentran en el alquitrán de hulla y en el petróleo (21).

Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros no volátiles que se mezclados con ellos. El arrastre en corriente de vapor hace posible la purificación de muchas sustancias de puntos de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura (14).

Destilación al vacío

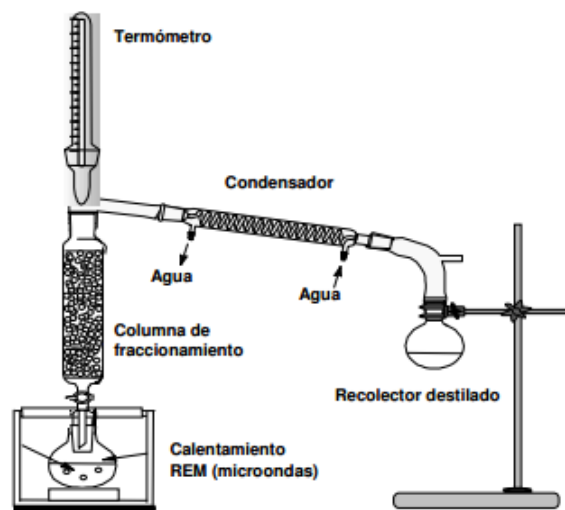
Muchas sustancias no pueden purificarse por destilación a la presión ordinaria, porque se descomponen a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal, en otros casos la finalmente poseen problemas de equilibrio líquido-vapor, en consecuencia se emplea el método de destilación al vacío o a presión reducida.

Deshidratación asistida por microondas

En procesos industriales es bien conocido el uso de las microondas (MO) como fuente de energía para reacciones bioquímicas y químicas de sistemas de reología complicada como polímeros y asfaltos entre otros (40).

En el proceso de destilación se han usado las microondas para seleccionar específicamente un isómero de valor comercial de algunos hidrocarburos, solo se reportan algunos pocos datos en la literatura acerca de la destilación-concentración de etanol-agua con este tipo de calentamiento (41). Dichos conocimientos de procesos que utilizaron energía de microondas dejan ver variables influyentes en el proceso de deshidratación de alcohol como las siguientes: temperatura, volumen de mezcla cargada, concentración de etanol de la disolución, potencia de salida de la radiación electromagnética, tiempo de exposición a la energía, ángulo de penetración de las ondas electromagnéticas, frecuencia de oscilación de las ondas, altura de la columna de fraccionamiento (42).

Figura 13. Equipo para la deshidratación del alcohol asistida por microondas



Fuente: Diagrama del equipo CINBBYA⁹

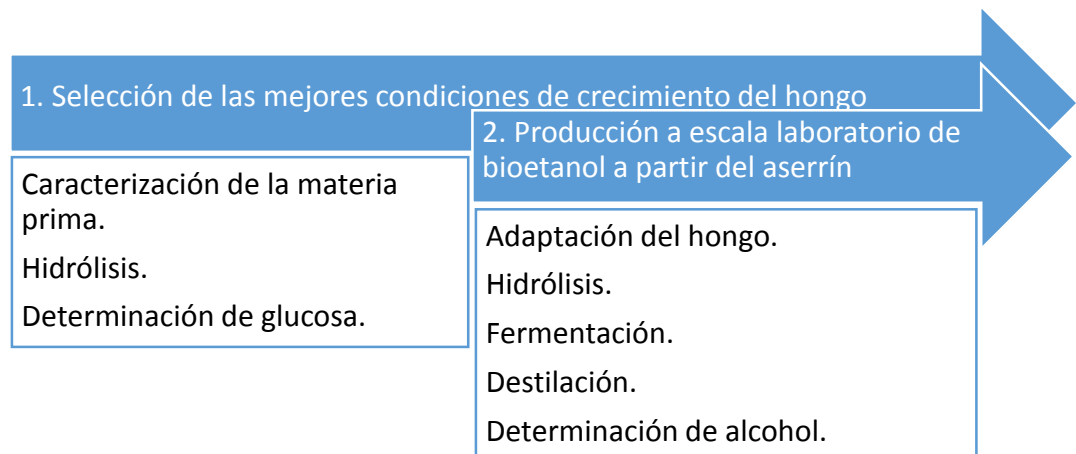
⁹ CINBBYA: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente ubicado en la Universidad Autónoma de Bucaramanga.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El presente proyecto se realizó en dos fases: la primera fase consiste en la selección de las mejores condiciones de crecimiento del microorganismo, la cual implica caracterización, hidrólisis y su correspondiente medición de glucosa, mientras que la segunda fase consiste en la producción a escala laboratorio a partir de aserrín, la cual implica cuatro pasos adicionales, hidrólisis, fermentación, destilación y su correspondiente determinación de alcohol.

En la Figura 14 se representa gráficamente la metodología del proceso general para la obtención de etanol.

Figura 14. Diagrama de la metodología para el desarrollo del proceso de producción de bioetanol



Fuente: Autora

3.1. SELECCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL HONGO

3.1.1. Caracterización de la materia prima

3.1.1.1. Obtención de la materia prima

La materia prima se obtuvo de la empresa, Muebles Estupiñan, dedicada a la fabricación de muebles de alta calidad y diseño, consolidada como uno de los proveedores más

importantes para el sector de la construcción. Punto de fábrica ubicado en la calle 50 # 15-88 barrió San Miguel, Bucaramanga – Santander, Colombia.

3.1.1.2. Proceso de la madera en la fábrica

El proceso básico que se lleva a cabo en la fábrica para la elaboración de diferentes productos es el siguiente: Se puede observar en la Figura 15.

1. La madera llega por bloques a la fábrica.
2. Se aplanea el bloque por 2 caras a un ángulo de 90°.
3. Se seca de 15-20 días (Hornos agua-calor).
4. Se aplanea por las otras 2 caras (churrasco).
5. Se inmuniza con TRIFOSBAN 48CE de 3-4 horas (6 L veneno cada 50 gal agua).
6. Se lija (Polvillo) y se procede a la elaboración (muebles, camas, puertas, etc.).

Figura 15. Proceso de obtención de aserrín en la fábrica



Fuente: Autora

3.1.1.3. Clasificación de la materia prima

La fábrica trabaja con madera específica para la fabricación de muebles en general, puesto que la clasificación depende del tipo de madera usada para la elaboración de determinado mueble y la contextura del aserrín depende de la maquina a la cual es sometida la madera.

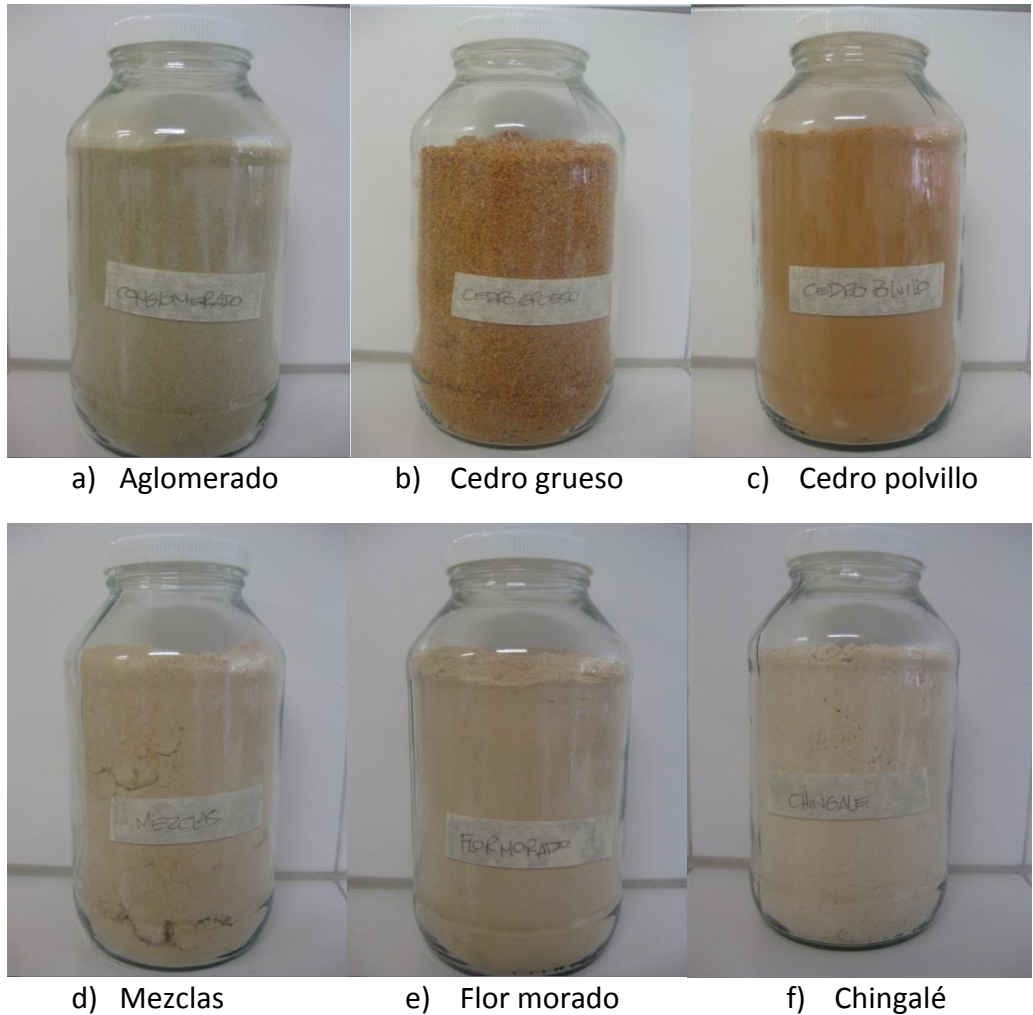
Debido a esto se obtuvieron y utilizaron 6 clases de aserrín, los cuales se clasificaron como se muestra Tabla 9, y se almacenaron como se muestra en la Figura 16.

Tabla 9. Clasificación de la materia prima según su procedencia

Clase de madera	Tipo de madera	Procedencia	Descripción
Flor morado	Dura	Departamento Cesar – Colombia	Es una clase de roble también llamado guayacán rosado. Es un árbol nativo de la América tropical. Su nombre científico es <i>Tabebuia rosea</i> .
Chingalé	Blanda	Departamento Antioquia – Colombia	Se encuentra principalmente en las subregiones del Nordeste Antioqueño, Bajo Cauca y Oriente Antioqueño-Colombia. Su nombre científico es <i>Jacaranca copaia</i> .
Cedro grueso	Blanda	Ciudad de Barranca – Colombia	Los cedros constituyen un género de coníferas pináceas. Son árboles de gran tamaño, de madera olorosa y copa cónica o vertical, su nombre científico es <i>Cedrela montana</i> .
Cedro polvillo	Blanda		
Mezclas	Blanda – Dura	-	Es una mezcla de toda la clase de madera usada en la fábrica.
Aglomerado	Blanda	-	Es obtenido a partir de pequeñas virutas, o serrín, encoladas a presión. Por lo general se emplean maderas blandas por facilidad de trabajar con ellas, ya que es más fácil prensar blando que duro.

Fuente: Autora

Figura 16. Representación del tipo de aserrín obtenido de la fábrica



Fuente: Autora

3.1.2. Hidrólisis

Para la selección del tipo de aserrín más adecuado como materia prima se realizaron dos montajes con una particularidad diferente, el primer montaje con una constante de peso del aserrín y el segundo con una constante de volumen del aserrín.

3.1.2.1. Montaje 1, inoculación del hongo por peso de aserrín

Este ensayo se realizó para hacer un análisis comparativo de la adaptación del microorganismo bajo las mismas condiciones en cada una de las clases de aserrín tomando como constante el peso.

El procedimiento que se llevó a cabo en este montaje está determinado por dos pasos principales, preparación del medio de aserrín con el mismo peso para todas las muestras e inoculación del hongo.

Se pesaron 40 gramos de cada tipo de aserrín, se le agregaron 60ml de agua destilada y 10ml de agua peptonada, se esterilizo a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos, se dejó atemperar a temperatura ambiente y se inoculo el hongo Trichoderma, finalmente se realizó un análisis comparativo visual entre todas las muestras pasados 8, 15 y 30 días.

3.1.2.2. Montaje 2, inoculación del hongo por volumen de aserrín

Este ensayo se realizó para hacer un análisis comparativo de la adaptación del microorganismo bajo las mismas condiciones en cada una de las clases de aserrín tomando como constante el volumen.

El procedimiento que se llevó a cabo en este montaje está determinado por dos pasos principales, preparación del medio de aserrín con el mismo peso para todas las muestras e inoculación del hongo.

Se tomó el mismo volumen aparente para cada tipo de aserrín, se le agregaron 60ml de agua destilada y 10ml de agua peptonada, se esterilizo a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos, se dejó atemperar a temperatura ambiente y se inoculo el hongo Trichoderma, finalmente se realizó un análisis comparativo visual entre todas las muestras pasados 8, 15 y 30 días.

3.1.3. Determinación de glucosa

Este ensayo se realizó con el fin de elegir la clase de aserrín con más contenido de glucosa usando para su determinación la técnica de colorimetría midiendo absorbancia en un espectrofotómetro marca Spectroquant® Pharo 300 (Figura 17), con las especificaciones mencionadas en la Tabla 10.

Figura 17. Espectrofotómetro Pharo 300 (Merak)



Fuente: Autora

Tabla 10. Especificaciones técnicas espectrofotómetro Pharo 300

Modelo	Pharo 300
Fuente de luz	Xenón
Sistema óptico	Haz único
Rango de longitud de onda (nm)	190-1100 0,69-4,85 MPa por unos segundos o minutos y liberación de presión hasta presión atmosférica
Ancho de banda espectral (nm)	+1
Rango fotométrico	+3,3 A
Precisión fotométrica	0,003 A a $\leq 0,600$ A; 0,5% de lectura para $0,6 < A < 2$
Barrido	Incrementos de 1 nm con rango seleccionable de longitud de onda
Modos de medición	Concentración, absorbancia, transmisión, longitudes de ondas múltiples, exploraciones
Almacenamiento de resultados	1000 valores individuales medidos: 4 MB para barridos y cinética
Interfaz	RS232, USB-A, USB-B
Idiomas	Inglés, alemán, francés, español e italiano
Cubetas	16 mm redondo, 10/20/50 nm rectangular con reconocimiento automático
Clase de protección	IP 31
Requisitos de potencia	100-240 V/50-60 Hz con cable de alimentación de 2,5 m específico de cada país
Ancho x Fondo x Alto (mm)	404x314x197

Peso sin fuente de alimentación (kg)	3,7
--------------------------------------	-----

Fuente: BioSystems S.A.

El procedimiento que se llevó a cabo en este montaje según el protocolo descrito en el ANEXO B está determinado por los siguientes pasos: 1) se tomó 1g de cada una de los tipos de madera y se diluyó en 20ml de agua destilada, 2) se realizó una extracción en medio acuoso sin calentamiento y se tomaron valores de absorbancia a 540nm el día 0, 3, 7 y 14, 3) finalmente se realizaron los cálculos respectivos.

3.2. PRODUCCIÓN A ESCALA LABORATORIO DE BIOETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN

Este ensayo se realizó con el fin de obtener variables en la producción de bioetanol y analizar condiciones adecuadas para el proceso que garanticen su producción abriendo la posibilidad de escalamiento.

3.2.1. Montaje 1

El procedimiento que se llevó a cabo en este montaje está determinado por 8 pasos principales:

1. Preparación del medio de aserrín para 10 frascos de 1000 ml con las mismas condiciones de trabajo.
2. Preparación del microorganismo en medio acuoso
3. Proceso de hidrólisis enzimática
4. Proceso de lixiviación y filtrado
5. Proceso de pasteurización
6. Proceso de fermentación
7. Proceso de destilación
8. Un segundo proceso de destilación.

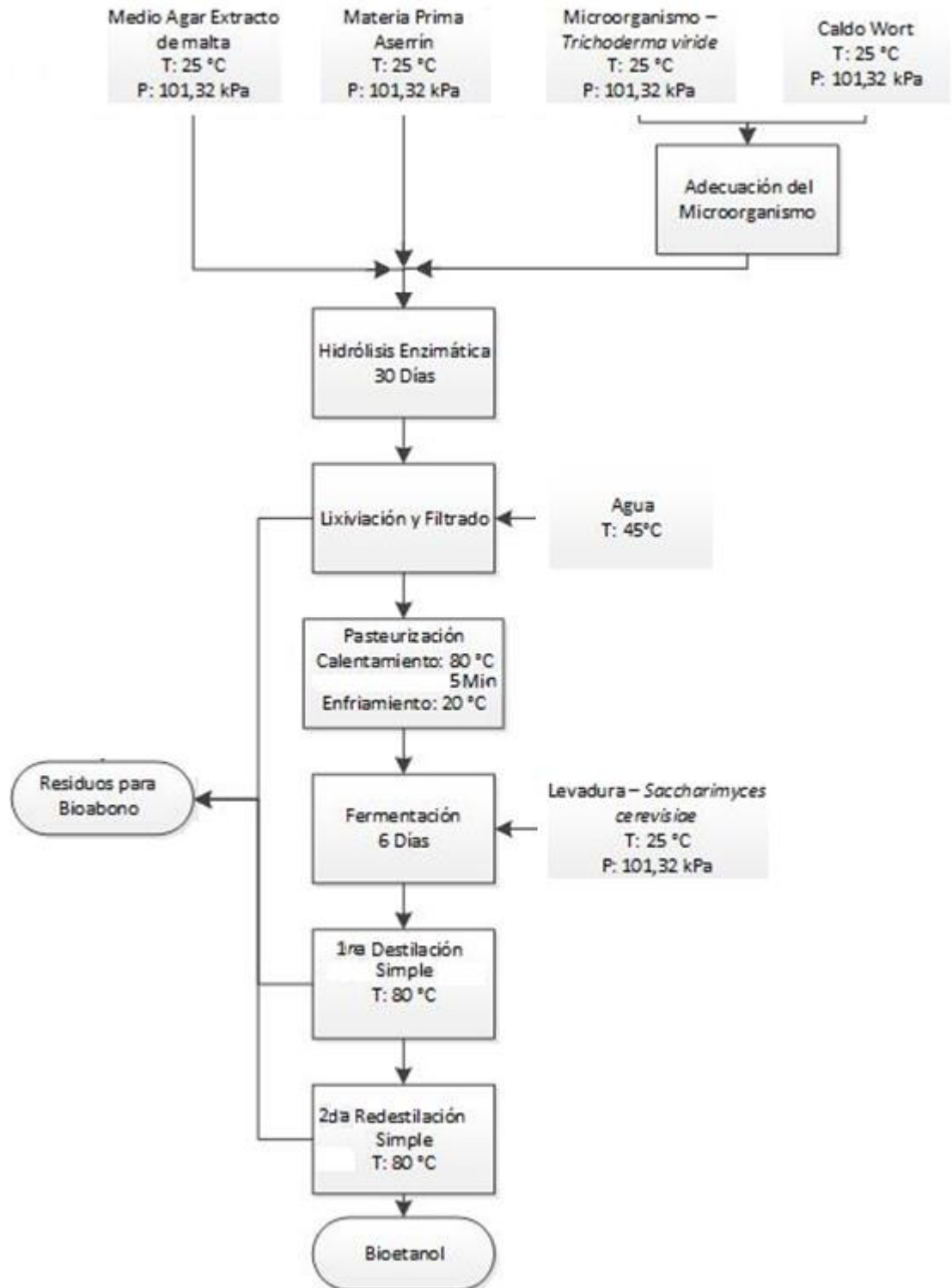
Se prepararon 120 ml de medio agar extracto de malata para cada uno de los 10 frascos (48 g/L de agua destilada) y se mezcló con 80 g de aserrín, se esterilizó a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos. El procedimiento se realizó por duplicado.

En la Figura 17 se describe las características del bioproceso aplicado de transformación.

3.2.1.1. Adaptación del hongo

El hongo fue preparado en medio acuoso, 3,3 g de caldo Wort por 100 ml de agua destilada, como se muestra en la Figura 18.

Figura 18. Diagrama del bioproceso aplicado a escala laboratorio, montaje 1



Fuente: Autora

Figura 19. Hongo *Trichoderma* en medio acuoso



Fuente: Autora

3.2.1.2. Hidrólisis

Cada muestra se sometió a un proceso de hidrólisis enzimática, el cual consistió en inocular 10 ml de hongo *Trichoderma* previamente preparado en medio acuoso (caldo Wort 33 g/L de agua destilada) y finalmente se dejó en reposo durante 30 días.

En la Figura 19 se realiza una foto de los dos montajes reales del proceso de hidrólisis enzimática, medio de aserrín inoculado por *Trichoderma viride*.

Figura 20. Proceso de hidrólisis enzimática



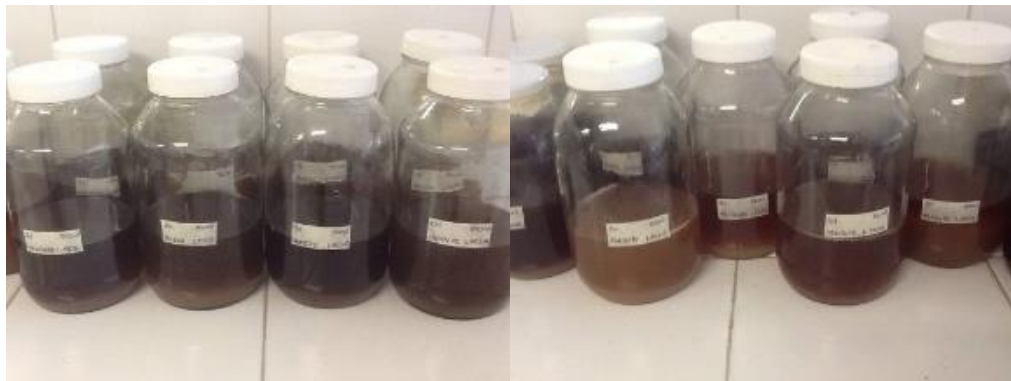
a) Primer montaje

b) Segundo montaje

Fuente: Autora

Pasados 30 días se llevó a cabo una lixiviación, un proceso de arrastre por el agua de materiales solubles, el cual consistió en agregar agua a 45°C 3 veces la cantidad del material en masa a cada uno de los frascos, se mezcló homogéneamente y se filtró manualmente. En la Figura 20 se muestra el lixiviado para cada montaje.

Figura 21. Lixiviado para cada montaje



a) Primer montaje b) Segundo montaje

Fuente: Autora

Se pasteurizó el producto lixiviado a 80°C durante 5 minutos a baño maría, se dejó atemperar a temperatura ambiente.

3.2.1.3. Fermentación

El proceso de fermentación anaerobia consistió en preparar levadura *Saccharomyces cerevisiae* al 2% con solución salina estéril y posteriormente inocular 5 ml de la misma al lixiviado y se dejó en reposo durante 6 días.

En la Figura 21 se realiza una foto de los montajes reales del proceso de fermentación.

Figura 22. Proceso fermentativo para cada montaje



a) Primer montaje

b) Segundo montaje

Fuente: Autora

3.2.1.4. Destilación

Pasados 6 días se llevó a cabo un proceso de destilación simple manteniendo la temperatura a 80°C, y finalmente se realizó una segunda destilación bajo las mismas condiciones.

La Figura 22 representa el equipo usado para realizar el proceso de destilación y segunda destilación simple.

Figura 23. Destilador por arrastre de vapor



Fuente: Autora

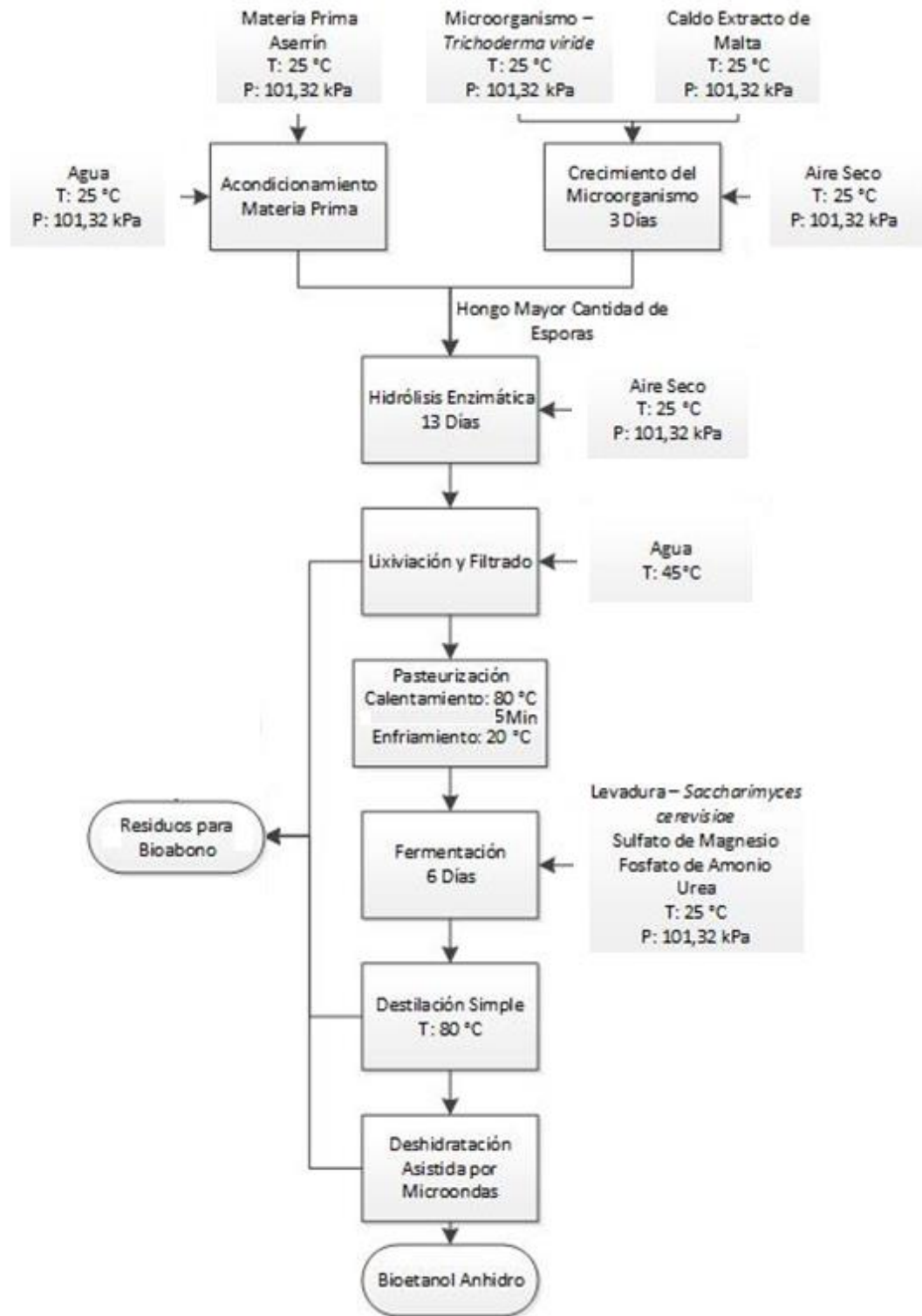
3.2.2. Montaje 2

El procedimiento que se llevó a cabo en este montaje está determinado por 8 pasos principales:

1. Adecuación del medio de aserrín para un bioreactor de 100L
2. Preparación del hongo *Trichoderma* para su crecimiento mediante aireación
3. Proceso de hidrólisis enzimática
4. Proceso de lixiviación y filtrado
5. Proceso de pasteurización
6. Proceso de fermentación
7. Proceso de destilación
8. Proceso de deshidratación

En la Figura 23 se describe las características del bioproceso aplicado de transformación.

Figura 24. Diagrama del bioproceso aplicado a escala de laboratorio, montaje 2



Fuente: Autora

Se pesaron 12 Kg de aserrín aglomerado y se le agregaron 12 L de agua, se mezclaron en un bioreactor previamente adecuado con una llave de agua a 10 cm respecto la parte inferior y en la parte superior unas varas de vidrio de diferentes longitudes garantizando la aireación de todo el contenido.

La Figura 24 representa la adecuación del bioreactor de 100 L donde se llevara a cabo el proceso de hidrólisis, llave, varillas de diferentes longitudes y un juego de mangueras conectadas para el flujo de aire.

Figura 25. Bioreactor adaptado para la hidrólisis



a) Vista superior

b) Vista interna

Fuente: Autora

3.2.2.1. Adaptación del hongo

Para la adaptación del hongo se preparó medio para 60 frascos de 60 ml y se inoculo por triplicado muestra de cada uno de los 20 frascos de los dos montajes.

Se realiza una foto del montaje real de los frascos de 60ml inoculados pasados 5 días y 10 días como se muestra en la Figura 25 y 26 respectivamente.

Figura 26. Medio en frascos de 60 ml con Inoculo pasados 5 días



Fuente: Autora

Figura 27. Cultivo selectivo de 30 frascos pasados 10 días



Fuente: Autora

Se preparó medio celulósico usando papel de filtro picado en 60 cajas Petri y donde finalmente se realizó repique por duplicado de un cultivo selectivo de 30 frascos de vainilla de 60.

Se realizó una foto del montaje real de la adaptación del hongo *Trichoderma viride* en medio celulósico pasados 10 días como se muestra en la Figura 27.

Figura 28. Medio de cultivo celulósico con inoculo de *Trichoderma viride*



Fuente: Autora

La Figura 28 muestra la etapa de crecimiento del hongo mediante aireación durante 3 días.

Figura 29. Hongo *Trichoderma viride* en medio acuoso con aireación



a) Vista superior

b) Vista frontal

Fuente: Autora

3.2.2.2. Hidrólisis

Para llevarse a cabo el proceso de hidrólisis enzimática se vertió el hongo previamente preparado en el inciso anterior con el medio de aserrín húmedo y se dejó en reposo con aireación.

La Figura 29 muestra el bioreactor en el proceso de hidrólisis enzimática con aireación.

Figura 30. Bioreactor en proceso de hidrólisis enzimática con aireación



a) Vista Frontal

b) Vista interna

Fuente: Autora

Pasados 13 días se procedió a realizar un lixiviado, el cual consistió en agregar 1100 ml de agua a 45°C por Kg de contenido en el bioreactor, se macero de manera que quedara una mezcla homogénea y se filtró manualmente.

La Figura 30 muestra cómo se realizó el proceso de lixiviado, dilución de materiales solubles en agua, se agregó 31,9 L de agua a 45°C para 29 kg de contenido del bioreactor. De este proceso se obtuvieron 21.210 ml de lixiviado.

Figura 31. Proceso de lixiviado



Se pasteurizó el lixiviado a 80°C y 15 lb de presión durante 5 minutos a baño maría, se dejó atemperar a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la respectiva determinación de glucosa.

3.2.2.3. Fermentación

Para llevarse a cabo el proceso de fermentación anaerobia se le inoculo al lixiviado 0,25 g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y adicionalmente se agregó 0,25 g/L de sulfato de magnesio, 1 g/L de fosfato de amonio y 0,5 g/L de urea y se dejó en reposo durante 6 días.

Se realizó una foto del montaje real del proceso de fermentación como se muestra en la Figura 31.

Figura 32. Proceso de fermentación



Fuente: Autora

3.2.2.4. Destilación

Pasados 6 días se realizó destilación simple manteniendo una temperatura constante de 80°C. Y finalmente se propuso un método alternativo para deshidratar bioetanol, usando radiación electromagnética como fuente de energía, el cual consistió en someter el lixiviado a deshidratación asistida por microondas.

La Figura 32 muestra el equipo usado para el proceso de destilación simple.

Figura 33. Equipo para realizar destilación por arrastre de vapor



Fuente: Autora

En la Figura 33 se representa el equipo para la deshidratación, la obtención de bioetanol carburante asistida por microondas.

Figura 34. Equipo para deshidratación asistida por microondas



Fuente: Autora

3.2.3. Determinación de alcohol

3.2.3.1. Índice de refracción y densidad por picnómetro

Para lograr establecer si el producto resultante de la destilación fue alcohol etílico, se procedió a compararlos. El método escogido fue a través del índice de refracción, el cual es una característica típica de cada compuesto.

Para determinar el porcentaje de alcohol se calculó la densidad del producto obtenido por la deshidratación utilizando un picnómetro aplicando la siguiente ecuación.

$$D = \frac{m}{V} \quad (4)$$

Donde,

D: Densidad de la muestra, g/ml.

m: Masa de la muestra, g.

V: Volumen, ml.

Después de calcular la densidad de la muestra producida se procede a ubicar el resultado en la Tabla 11, identificando así el porcentaje de etanol.

Tabla 11. Densidad según porcentaje de etanol

% Etanol	% Agua	Densidad g/ml
0	100	1.00
10	90	0.9836
20	80	0.9704
30	70	0.9555
40	60	0.9368
50	50	0.9155
60	40	0.8927
70	30	0.8692
80	20	0.8449
95	15	0.8056
100	0	0.7907

Fuente: (43)

3.2.3.2. Cromatografía

Para la determinación de alcohol se utilizó un cromatógrafo de gases marca Dani como se muestra en la Figura 33, con un detector de ionización de flama (FID), inyector capilar y una columna PE-WAX de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0.53 mm y un espesor de película de 1 mm.

- Columna NN5

- Fase Móvil: nitrógeno
- Flow Rate: 1.0 ml/min
- Detección: 250°C
- Temperatura inyector: 150°C
- Temperatura del Horno: 150°C
- Jeringa Hamilton de 1.0 µL
- El volumen de inyección fue de 0.2 µL

Figura 35. Cromatógrafo de gases, Dani, empleado para la detección de bioetanol.



Fuente: Equipo de propiedad del CINBBYA-UNAB.

Para la identificación del o de los componentes, registrados como un pico en cada uno de los cromatogramas de las muestras, previamente se realizaron inyecciones por duplicado de cada uno de los siguientes estándares puros (metanol, etanol, 2-propanol, acetato de etilo y butanol), así como de la mezcla equimolar de los mismos. Estas inyecciones se realizaron a las mismas condiciones que las de las muestras. Finalmente se compararon los tiempos de retención (que es único para cada compuesto a las mismas condiciones) de los estándares con los picos presentes en las muestras.

Tabla 12. Tiempos de retención obtenidos a partir de las inyecciones de los estándares en forma pura así como en el de la mezcla

Compuesto	Puro/ tr (minutos)	Mezcla tr (minutos)
Metanol	2,224	2,282
Etanol	2,372	2,436
2-Propanol	2,540	2,604
Acetato de etilo	3,389	3,445
Butanol	4,221	4,354

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

Análisis cuantitativo de las muestras

En la cromatografía, la mayor parte de los análisis se realizan con el fin de determinar la concentración o el peso absoluto, o los componentes presentes en la muestra. Debido a que el cromatógrafo no presenta los resultados en forma numérica, sino como variaciones del voltaje de salida en función del tiempo, es necesario transformar dichas variaciones en un número y convertirlo luego a la información deseada. Por lo que la concentración del etanol en las muestras se determinó, empleando el método de las adiciones estándar el cual consiste en añadir sobre una serie de alícuotas, cantidades conocidas del componente a determinar, y medir la magnitud de la propiedad analítica de interés tras las diferentes adiciones. Se utilizó butanol como estándar interno, esto para obtener las relaciones de áreas, entre el analito y el estándar interno en cada adición.

Las condiciones de operación con las cuales se trabajó durante el análisis de las muestras de condensado fueron: flujo de nitrógeno (gas acarreador), 3.0 mL/min; temperatura del inyector y del detector, fue de 220°C; la temperatura de la columna fue de acuerdo al siguiente programa: Temperatura inicial, 40°C durante 3 min, posteriormente, la temperatura se incrementa a una velocidad de 25°C/min hasta llegar a la temperatura final de 215°C. El volumen de inyección de la muestra a analizar fue de 1.0 µL.

Preparación de la muestra

Se midió con una pipeta volumétrica, 2.0 mL de muestra de destilado y se colocó en un matraz aforado de 10 mL, en donde se le agregó con una micropipeta 25 µL de butanol (estándar interno), posteriormente se llevó al aforo con agua destilada. Después de agitar la disolución, se tomó con una Jeringa Hamilton, 1.0 µL y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Luego se llevó a cabo las adiciones del estándar etanol puro. Se realizaron 5 adiciones, el volumen agregado en cada adición fue de 25 µL. Al término de cada adición, se fueron inyectando 1.0 µL de la disolución. Este mismo procedimiento se repitió para las otras muestras.

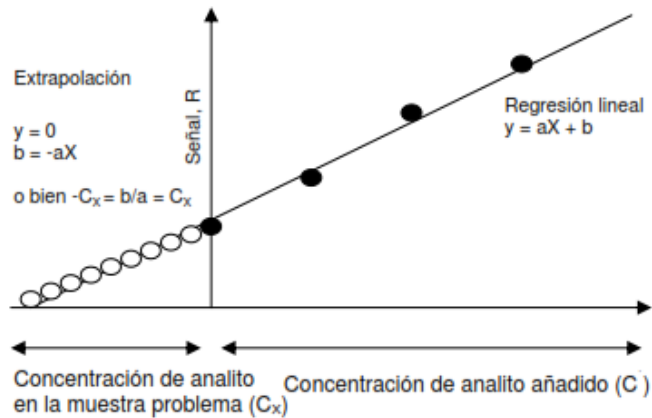
Análisis por cromatografía de gases

El análisis por cromatografía de gases se realizó a las muestras de condensados obtenidos durante la destilación del mosto fermentado.

Los resultados de las señales instrumentales del análisis se representan en la Figura 35. La señal medida como R, representa el cociente de áreas (A_{est}/A_{ei}), donde A_{est} es el área del

estándar etanol puro en cada adición y A_{ei} es el área del estándar interno (butanol) utilizado, se representa en el eje y , mientras que en el eje x , la escala se expresa en términos de las cantidades de analito añadidas, ya sea como masa o como concentración. Por consiguiente, la concentración desconocida está dada en el punto en el cual la línea extrapolada corta al eje de concentración. La recta de regresión se establece mediante mínimos cuadrados.

Figura 36. Curva de las adiciones estándar



Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

La concentración del analito añadido en el volumen de la muestra original (V_x) en cada adición se calcula utilizando la siguiente ecuación:

Concentración del analito añadido

$$C = \frac{V_{est} * C_{est}}{V_x} \quad (5)$$

Donde,

C : Incremento en la concentración del analito en el volumen de muestra original en g/mL

C_{est} : Concentración del estándar añadido

V_{est} : Volumen del estándar acumulado en cada sistema, mL

V_x : Volumen total de la muestra

Una vez construida la curva de adición estándar, se procede a determinar la concentración del analito en la muestra original mediante la extrapolación de la ecuación de regresión lineal del tipo $y = aX + b$. Con intercepto en $y = 0$, la concentración se determina mediante la siguiente ecuación:

Concentración del analito mediante extrapolación

$$C_x = \frac{b}{a} \quad (6)$$

Donde,

C_x : Concentración del analito determinado experimentalmente, g/mL

b : Ordenada de la ecuación de regresión lineal

a : Pendiente de la ecuación de regresión lineal

Por otro lado, se requiere estimar la precisión de C_x , para ello es necesario construir el intervalo de confianza, utilizando la siguiente ecuación:

Intervalo de confianza

$$(C_x \pm tS_c) \text{ g/mL} \quad (7)$$

Donde,

S_c : es la estimación del error estándar

t : distribución t de Student.

4. RESULTADOS

4.1. SELECCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL HONGO

4.1.1. Hidrólisis

4.1.1.1. Montaje 1, inoculación del hongo por peso de aserrín

Para determinar el tipo de aserrín en el que el hongo se adapta mejor se realizó análisis comparativo de las muestras pasados 8, 15 y 30 días:

- Pasados 8 días se puede apreciar un leve crecimiento del hongo en cada una de las muestras, sin embargo es más notable a la vista en el cedro polvillo como se observa en la Figura 36.
- Pasados 15 días se puede apreciar gran cantidad de hongo visible en el aglomerado, mientras que en las otras se percibe pero en bajas cantidades.
- El aglomerado es la clase de madera que pasados 30 días tiene gran cantidad de hongo visible y en las otras muestras es nulo como se observa en la Figura 37.

Figura 37. Vista del hongo en cada tipo de aserrín con el mismo peso



a) Aglomerado

b) Cedro polvillo

c) Cedro grueso



d) Flor morado

e) Chingalé
Fuente: Autora

f) Mezclas

Figura 38. Vista macroscópica frontal e inferior del aglomerado por peso de aserrín



Fuente: Autora

4.1.1.2. Montaje 2, inoculación del hongo por volumen de aserrín

En la Tabla 13 se muestra el peso de cada tipo de aserrín con un mismo volumen.

Tabla 13. Peso del tipo de aserrín con volumen equivalente

Clase de aserrín	Peso (g)
Aglomerado	45,11
Mezcla	18,33
Cedro polvillo	25,14
Chingalé	17,77
Cedro grueso	24,51
Flor morado	30,75

Fuente: Autora

Para determinar el tipo de aserrín en el que el hongo se adapta mejor se realizó análisis comparativo de las muestras pasados 8, 15 y 30 días:

- Pasados 8 días se puede observar un alto crecimiento en las dos muestras de cedro (polvillo y grueso), leve en chingalé y mezclas, nulo en aglomerado y flor morado como se observa en la Figura 38.
- Pasados 15 días se puede observar que la cantidad de hongo visible disminuye en todas las muestras en general pero sin embargo en el aglomerado aun es visible.
- Al igual que en el montaje anterior, pasados 30 días en la muestra del aglomerado hay mayor cantidad de hongo visible respecto de las demás muestras como se observa en la Figura 39.

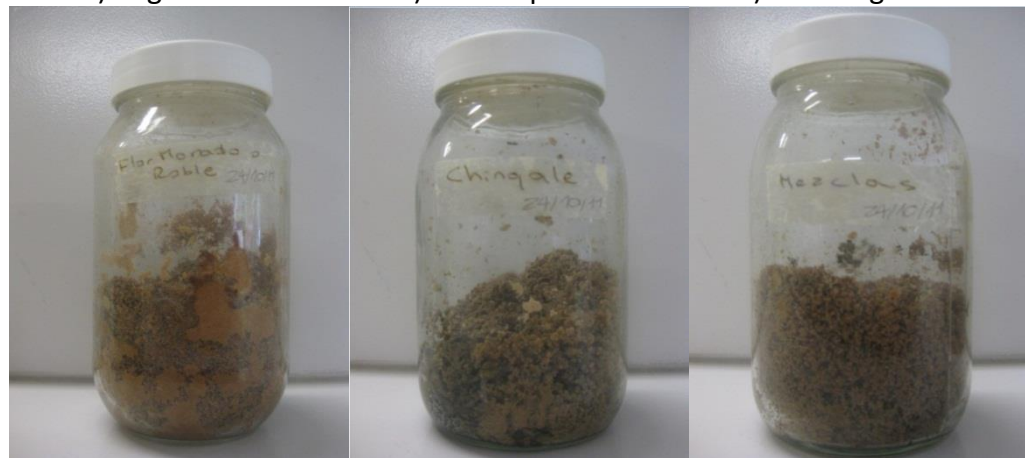
Figura 39. Vista macroscópica del hongo en cada tipo de aserrín con el mismo volumen



b) Aglomerado

b) Cedro polvillo

c) Cedro grueso



e) Flor morado

e) Chingale

f) Mezclas

Fuente: Autora

Figura 40. Vista macroscópica frontal e inferior del aglomerado por volumen de aserrín



Fuente: Autora

4.1.2. Determinación de glucosa

Para la determinación de glucosa se tomaron medidas de absorbancia para cada una de las muestras y el patrón, se prepararon las muestras 1g aserrín/20 ml agua destilada.

En la siguiente tabla se muestran los valores medidos de absorbancia a 540nm tomados el día 0, 3, 7 y 14 como se observa en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos de medición de absorbancia a 540nm para cada tipo de aserrín

Muestra	Absorbancia (A)			
	1	3	7	14
Chingalé	0,195	0,201	0,241	0,246
Cedro polvillo	0,213	0,229	0,235	0,242

Cedro grueso	0,151	0,155	0,156	0,161
Aglomerado	0,238	0,242	0,243	0,266
Flor morado	0,098	0,102	0,153	0,176
Mezcla	0,215	0,22	0,235	0,253
Blanco	0			
Patrón	0,348			

Fuente: Autora

En la Tabla 15 se muestra los valores calculados de glucosa en mg/dL para cada una de las muestras.

Tabla 15. Valores de glucosa para cada tipo de aserrín

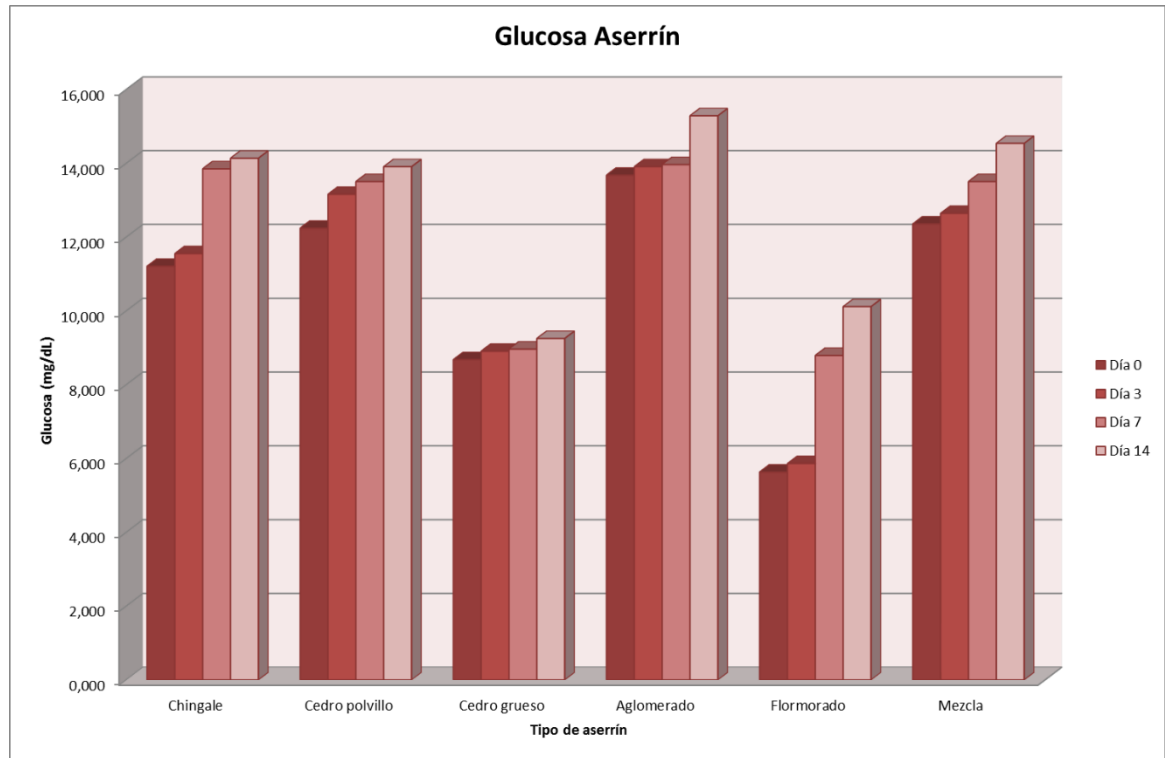
Muestra	Glucosa Aserrín (mg/dL)			
	1	3	7	14
Chingalé	11,20	11,55	13,85	14,13
Cedro polvillo	12,24	13,16	13,50	13,90
Cedro grueso	8,67	8,90	8,96	9,25
Aglomerado	13,67	13,90	13,96	15,28
Flor morado	5,63	5,86	8,79	10,11
Mezcla	12,35	12,64	13,50	14,54

Fuente: Autora

Con los datos presentados en la Tabla 15 se diseñó una representación gráfica, donde se observa claramente los resultados de la determinación de glucosa como se muestra en la Figura 40.

De la Figura 40 se puede concluir que hay presencia de glucosa en todas las muestras, 4 de ellas tienen un valor similar, sin embargo en la muestra donde más se obtuvo glucosa fue en la del tipo de aserrín aglomerado. El mejor resultado para todas las muestras se ve reflejado en el día 14 puesto que al transcurrir tiempo hay mayor extracción de glucosa en el medio acuoso.

Figura 41. Representación gráfica de los valores de glucosa de cada tipo de madera para el día 0, 3, 7 y 14



Fuente: Autora

4.2. PRODUCCIÓN A ESCALA LABORATORIO DE BIOETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN

4.2.1. Montaje 1

Se realizó medición de absorbancia del lixiviado para determinación de glucosa. En la Tabla 16 se muestran los valores de absorbancia de cada una de las muestras por duplicado y el respectivo cálculo de glucosa en mg/dL.

Tabla 16. Valores de absorbancia por duplicado y cálculo de concentración de glucosa

Montaje	Prueba	Medición Absorbancia (A)		Concentración de Glucosa (mg/dL)	
	Muestra	1	2	1	2
Primero	1	0,081	0,062	23,754	18,035
	2	0,005	0,015	1,320	4,252

	3	0,019	0,010	5,572	2,786	
	4	0,131	0,159	38,416	46,481	
	5	0,007	0,012	2,053	3,519	
	6	1,271	1,281	372,581	375,660	
	7	0,004	0,007	1,026	1,906	
	8	0,063	0,039	18,475	11,437	
	9	0,003	0,001	0,733	0,293	
	10	0,395	0,457	115,689	134,018	
	Segundo	1	0,052	0,021	15,103	6,012
		2	0,006	0,005	1,613	1,466
3		0,042	0,011	12,317	3,079	
4		0,321	0,362	94,135	106,158	
5		0,028	0,033	8,211	9,677	
6		Descartado				
7		0,075	0,060	21,848	17,449	
8		0,009	0,002	2,493	0,440	
9		0,005	0,001	1,466	0,293	
10		0,003	0,001	0,733	0,293	
Blanco	0,000					
Patrón	0,341					

Fuente: Autora

Debido a que no se observó crecimiento alguno de ningún hongo en el segundo montaje la muestra 6 fue descartada.

Debido a que la cantidad de destilado estaba en un rango de 3–16 ml para el segundo destilado se mezclaron con agua hasta llegar a una cantidad de 50ml del primer montaje las muestras 3, 5, 7 y 9, y del segundo montaje las muestras 1 a 9. Se descartaron del primer montaje las muestras 1, 2 y 8, y del segundo montaje la muestra 10.

Por lo tanto las muestras que se destilaron por segunda vez puras del primer montaje fueron las muestras 4, 6 y 10, y del segundo montaje la muestra 7.

La Tabla 17 resume la cantidad de líquido producido en unidades de ml en cada el proceso de lixiviado, destilación y segunda destilación para los dos montajes.

Tabla 17. Cantidad de fermentado producido en cada proceso

Montaje	Proceso	Destilación	2da destilación	
	Muestra	Cantidad (ml)	Cantidad Agua (ml)	Cantidad destilado (ml)

Primer	1	2,0	Descartado	
	2	1,0	Descartado	
	3	7,0	43,0	5,0
	4	25,0	-	14,0
	5	14,0	36,0	7,0
	6	18,0	-	11,0
	7	5,4	44,6	3,0
	8	1,0	Descartado	
	9	3,4	46,6	2,0
	10	48,0	-	24,0
Segundo	1	3,7	46,3	0,0
	2	4,7	45,3	2,0
	3	7,4	42,6	3,0
	4	6,6	43,4	3,0
	5	15,0	35,0	8,0
	6	Descartado		
	7	19,0	-	8,5
	8	3,5	46,5	2,0
	9	4,3	45,7	2,0
	10	2,3	Descartado	

Fuente: Autora

4.2.2. Montaje 2

En la Tabla 18 se muestran los valores de absorbancia del lixiviado por duplicado y el respectivo cálculo de glucosa en mg/dL.

Tabla 18. Determinación de glucosa

Muestra	Absorbancia (A)		Glucosa Solución (mg/dL)	
	1	2	1	2
	0,522	0,654	170,588	213,725
Patrón	0,306			
Blanco	0,000			

Fuente: Autora

La Tabla 19 resume en términos de cantidad de líquido producido en unidades de ml en cada el proceso de destilación y segunda destilación.

Tabla 19. Producción del fermentado antes y después de la destilación – segunda destilación

Destilación (ml)	Segunda destilación (ml)
1050	260

Fuente: Autora

4.2.3. Determinación de etanol

4.2.3.1. Índice por refractómetro y densidad por picnómetro

Mediante un refractómetro se midieron los índices de alcohol etílico y el producto obtenido por la deshidratación. Se obtuvieron entonces los siguientes datos a una temperatura de 25°C:

- Alcohol etílico puro: 17 °Brix
- Muestra destilación: 14 °Brix

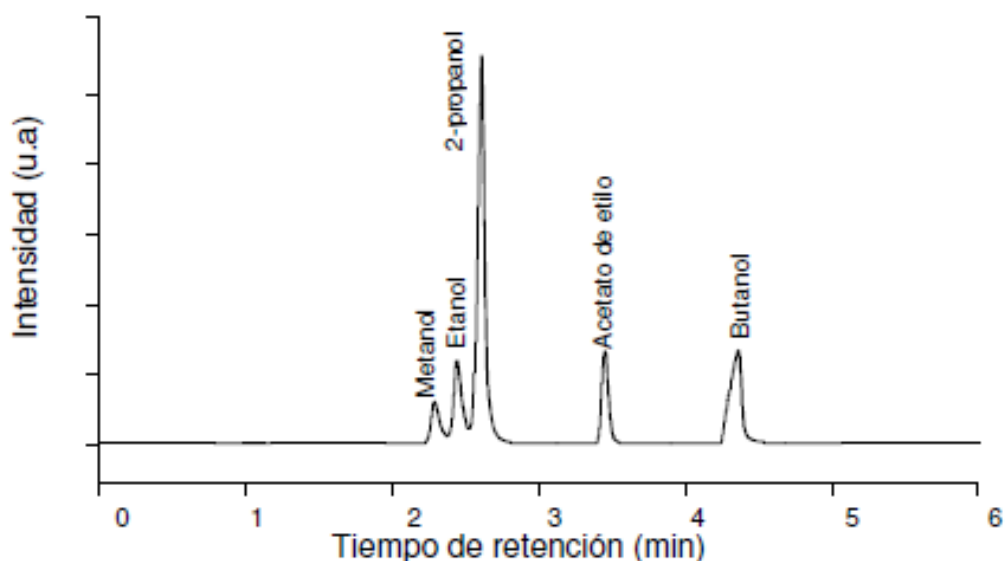
Después de calcular la densidad de la muestra producida determinándola en 0,8108 g/ml donde a partir de la Tabla 11, el rango está entre el 80% y el 95 % de volumen de alcohol.

Aplicando interpolación el porcentaje de etanol según la densidad es de 93,01%.

4.2.3.1. Cromatografía

En la Figura 41 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la inyección de la mezcla de los estándares mencionados anteriormente. Se puede observar una muy buena separación de los picos correspondientes a cada uno de los estándares.

Figura 42. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la mezcla de los estándares



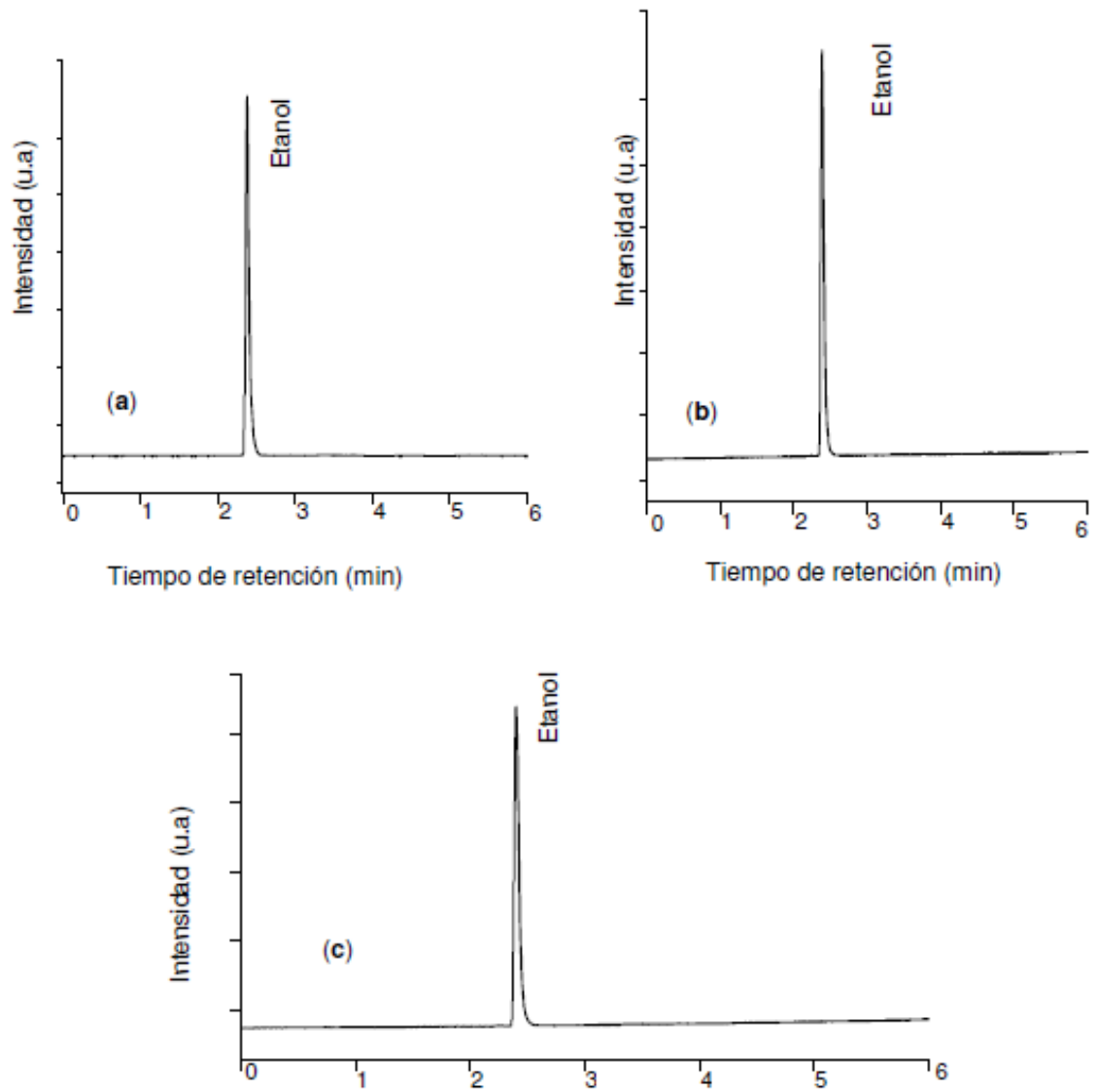
Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

De la Figura 41 se puede observar que en cada uno de los cromatogramas presentados, aparece un solo pico, cuyo tiempo de retención fueron: 2,368 minutos, 2,380 minutos y 2,398 minutos, respectivamente. Al comparar estos tiempos con los tiempos de retención de los estándares presentados en la Tabla 12. Se pudo observar que dichos tiempos corresponde al tiempo de retención del etanol, por lo tanto se puede decir que en el mosto fermentado en los sistemas, analizados contiene únicamente etanol.

En la Figura 42 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra de condensado obtenido durante la destilación del mosto a partir de frascos individuales. Para este caso: (a) corresponde a la muestra 6 del primer montaje con 375,660 mg/dL de glucosa; (b) para la muestra 10 del primer montaje con 134,018 mg/dL de glucosa y la (c) corresponde a la muestra 4 del primer montaje con 106,158 mg/dL de glucosa. En estos cromatogramas, se puede observar un solo pico, cuyo tiempo de retención fue, 2,376 minutos, que al compararlos con los tiempos de retención de los estándares presentados en la Tabla 12, se puede observar que dicho tiempo corresponde al tiempo de retención del etanol, por lo tanto se puede decir que en el mosto fermentado a las condiciones dadas, se tiene únicamente etanol.

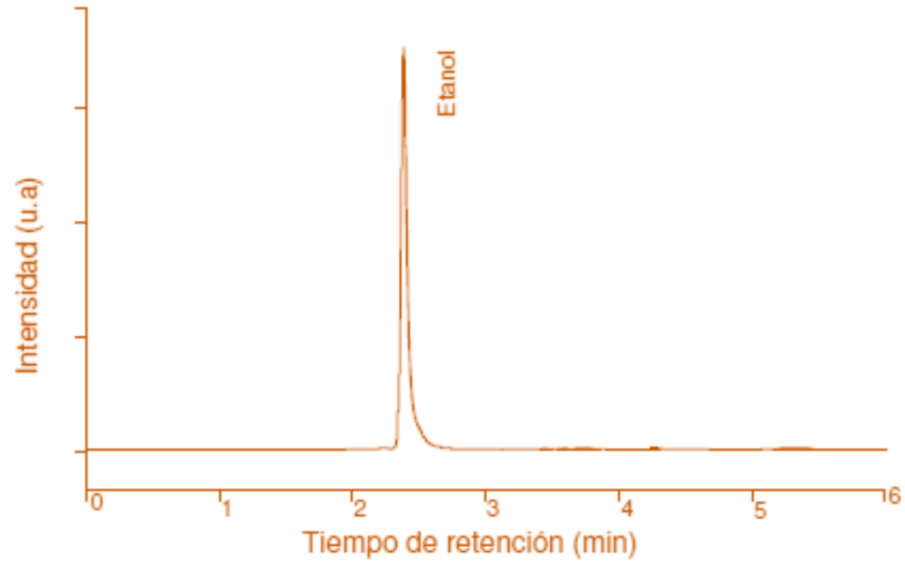
En la Figura 43 se aprecia el cromatograma resultante a partir de la muestra destilada, montaje 2, en el cual se observa un tiempo de retención correspondiente al del etanol de referencia.

Figura 43. Cromatogramas obtenidos a partir de las inyecciones de las muestras de condensados obtenidos durante la destilación del mosto fermentado (aserrín fermentado)



Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

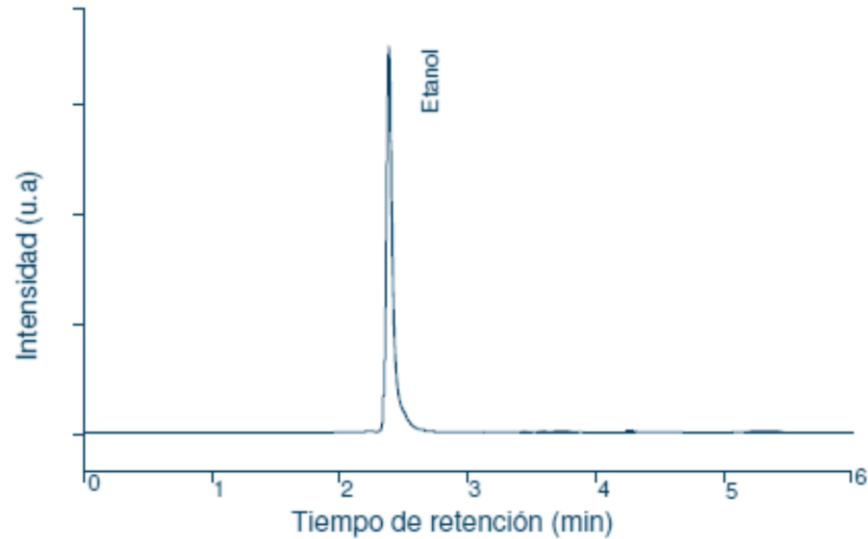
Figura 44. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra destilada (Hidrodestilación asistida por microondas para obtener alcohol anhidro)



Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

En la Figura 44 se aprecia el cromatograma resultante a partir de la muestra segunda destilada (Hidrodestilación asistida por microondas), montaje 2, en el cual se observa un tiempo de retención correspondiente al del etanol de referencia.

Figura 45. Cromatograma obtenido a partir de la inyección de la muestra segunda destilada



Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

En cuanto a la concentración de etanol presente en cada una de las muestras de condensados obtenidos durante la destilación del mosto, se determinó mediante el método de las adiciones estándar, utilizándose como estándar interno a butanol. El método de las adiciones estándar, consiste en añadir sobre una serie de alícuotas, cantidades conocidas del componente a determinar (en este caso etanol), y medir la magnitud de la propiedad analítica de interés tras las diferentes adiciones.

De las tres figuras mostradas en la Figura 45 se puede observar en cada caso que la intensidad del pico del etanol va aumentando conforme se realizan adiciones del estándar (etanol puro).

Para el análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos a partir de las adiciones estándar realizadas a las muestras de condensados, se determinó el intervalo de confianza con un 95 % de nivel de significancia, considerando la *t* de Student = 2,015, los resultados son los siguientes:

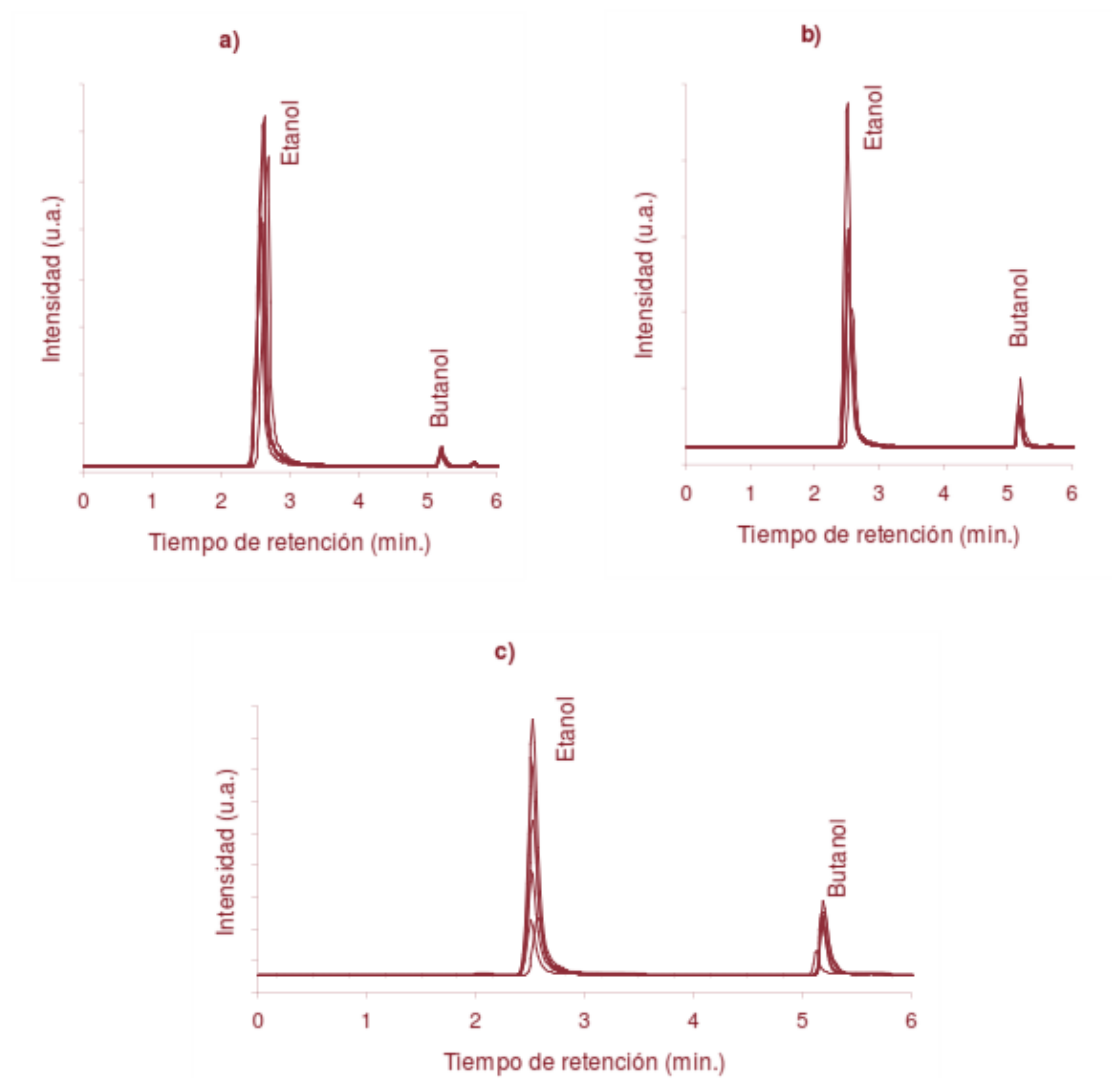
La desviación estándar *S_c* obtenido para la muestra de condensado del mosto fermentado en el sistema D fue de 0.002, por lo tanto el intervalo de confianza es, $C_x = (0.047 \pm 0.004)$ g/mL; la desviación estándar *S_c* para la del sistema a fue de 0,051, por lo tanto el intervalo de confianza es, $C_x = (0.593 \pm 0.102)$ g/mL y finalmente la desviación estándar *S_c* para la

del sistema F fue de 0,003, por lo tanto el intervalo de confianza es, $C_x = (0.466 \pm 0.006)$ g/mL.

De acuerdo a estos resultados, se puede decir que la concentración de etanol en la muestra de condensado del sistema a, muestra segunda destilación (hidrodestilación asistida por microondas), es mayor que a la del sistema c, muestra destilación.

Como se desprende de los análisis realizados y descritos en la Tabla 20 se produjo etanol en todos los ensayos. Puede decirse que existe una relación con la concentración de glucosa y además que se obtuvo un mejor resultado de las muestras del ensayo a nivel de laboratorio cuando se realizó el proceso de segunda destilación, hidrodestilación asistida por microondas. Sin embargo la baja producción de etanol se debe a que los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación son procesos biológicos los cuales requieren de mayor cantidad de parámetros para obtener un resultado más óptimo.

Figura 46. Cromatogramas obtenidos durante el análisis de adiciones estándar den los sistemas. (a) Muestra segunda destilación (hidrodestilación asistida por microondas), (b) repetición de la muestra (a) y (c) Muestra destilación. Concentración promedio de glucosa 192,157 mg/dL



Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

Tabla 20. Resultados cuantitativos obtenidos de la concentración de alcohol en las muestras procesadas: por cromatografía de gases y determinación de la densidad

Muestra	Porcentaje de alcohol obtenido (p/p)	Densidad (g/ml)
6, montaje 1	45	0,9227
10, montaje 1	31	0,9539
4, montaje 1	28	0,9602
Destilada, montaje 2	46	0,9227
Segunda destilación (alcohol concentrado), montaje 2	78	0,8436

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Bucaramanga-CINBBYA (2013)

4.3. IDENTIFICACION DE VARIABLES

Para el desarrollo del trabajo es indispensable realizar un análisis de resultados obtenidos en el experimento “bioproceso escala laboratorio”, donde se identifiquen las variables influyentes en todo el proceso, con el fin de recopilar datos que puedan ser base de cálculo para el desarrollo de posteriores experimentos y optimización del mismo.

Según el experimento en estudio, las variables que se tienen en cuenta para el análisis son de dos tipos, dependientes e independientes.

4.3.1. Variables independientes

4.3.1.1. Caracterización materia prima

- Tipo de aserrín: Esta variable es de gran relevancia ya que de ella depende la cantidad de celulosa presente en el material lignocelulosico, puesto que esta varía con el tipo de madera. Según experimento realizado “Caracterización de la materia prima” se seleccionó el aglomerado como el tipo de aserrín a utilizar.
- Condiciones del aserrín: Es importante tener en cuenta bajo qué condiciones se encuentra la materia prima, ya que dependiendo del estado de degradación permite un mejor acondicionamiento del microorganismo y un aumento en el rendimiento de la hidrolisis enzimática.

4.3.1.2. Variables independientes comprendidas

Según el experimento se analizan tres variables independientes.

- Tiempo de reacción: El tiempo de reacción se estableció según la información consultada en experimentos llevados a cabo con otras materias primas, puesto que el comportamiento del microorganismo tiene un tiempo aproximado donde logra un pico de rendimiento y posteriormente el proceso comienza una etapa de inhibición. El valor medido para esta variable es de 13 días para la hidrólisis y de 6 días para la fermentación.
- Relación Agua-Aserrín: La relación es 1:1.
- Cantidad de microorganismo: Para el experimento se agregó una cierta cantidad de microorganismo (aprox. 0,005 Kg) y posteriormente se inoculó en un bioreactor para su reproducción durante 3 días, esta fase del proceso fue llamada “crecimiento del microorganismo”.

4.3.1.3. Variables fijas

En la producción de bioetanol a partir de aserrín intervienen otras variables que afectan el proceso, tales como la temperatura y el tipo de microorganismo, las cuales son establecidas previamente a partir de la literatura e información consultada.

- Temperatura: Para el experimento en estudio, todos los procedimientos fueron realizados en condiciones ambientales (25°C y 101,32 kPa), exceptuando los procesos que requirieron elevar la temperatura para su ejecución como la pasteurización, destilación y deshidratación.
- Tipo de microorganismo: Los microorganismos que se escogieron para realizar los procesos biológicos de hidrólisis enzimática y fermentación fueron, *Trichoderma viride* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente.

4.3.2. Variables dependientes

Son muchas las variables dependientes, tanto de las reacciones de hidrólisis enzimática y fermentación como del producto, que se podrían utilizar para evaluar el experimento, dependiendo del propósito del mismo.

En la Tabla 23 se presenta un resumen de las variables de entrada y salida del proceso de producción de etanol, cantidad de hongo usado en el proceso y tiempo de duración del proceso.

Tabla 21. Datos materia prima – producción de etanol a escala laboratorio y cantidad de microorganismo

Materia Prima – Aserrín (Kg)	Microorganismo - Hongo <i>Trichoderma viride</i> (Kg)	Tiempo de Producción (días)	Etanol Producido (L)	% Etanol
12	0,005	20	0,26	78

Fuente: Autora

- Rendimiento:

Entendido como la cantidad de bioetanol producido con base en la cantidad de materia prima utilizada la ecuación sería así:

$$Rendimiento = \frac{Peso\ Bioetanol}{Peso\ Aserrin} * 100 \quad (9)$$

Aplicando,

$$Rendimiento = \frac{260\text{mL} * 0,8436\text{g/mL}}{12000\text{g}} * 100 = 1,83\%$$

De esta manera el rendimiento experimental del proceso es de 1,83% teniendo en cuenta que este rendimiento está basado en un porcentaje de etanol del 78%.

- Índice de producción por cada litro de fermento

Los datos se obtuvieron de un volumen de 21,21 litros de fermento, con el objetivo de obtener un índice de producción de etanol por cada litro del mismo.

$$IP = \frac{P}{\#Pruebas} * \frac{1}{Volumen\ de\ fermento} \quad (10)$$

Aplicando,

$$IP = 260 * \frac{1}{21,21} = 12,26\text{ mL por litro de fermento}$$

- Relación bioetanol - materia prima:

$$\text{Bioetanol/Aserrín} = \frac{\text{Volumen Bioetanol}}{\text{Peso Aserrín}} \quad (11)$$

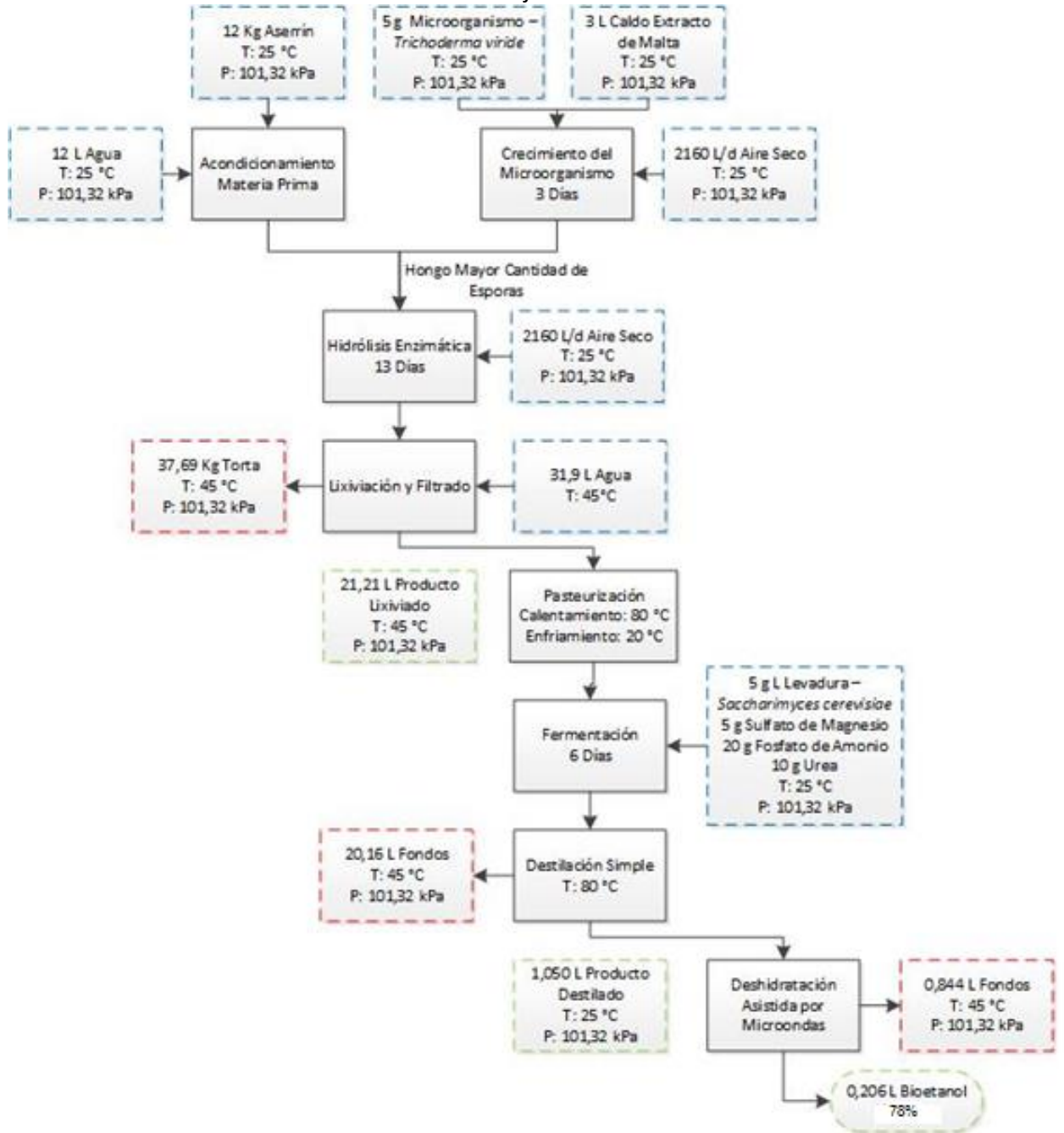
Aplicando,

$$\frac{\text{Bioetanol}}{\text{Aserrín}} = \frac{0,202L}{12kg} = 0,0168 \text{ L por cada } 12Kg \text{ de Aserrín}$$

4.4. BALANCE MÁSSICO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ASERRÍN

En la Figura 46 se presenta un balance de masa aplicado a las principales etapas del proceso de producción de bioetanol.

Figura 47. Diagrama de balance másico del bioproceso aplicado a escala laboratorio, montaje 2



Fuente: Autora

4.5. ANALISIS COMPARATIVO

Por no encontrarse referencia o precedentes sobre este tipo de trabajo, se establecen primeros parámetros para la producción de etanol a partir de aserrín y se compara con otras materias primas, obteniendo datos de pruebas de la literatura, sin embargo es un proceso completamente diferente al que en este proyecto se realiza.

Los datos descritos en la Tabla 22 son un resumen de datos calculados teniendo en cuenta las ecuaciones anteriormente mencionadas y experimentales obtenidas de la literatura para diferentes materias primas, se parte de un volumen de 10 litros de zumo de, papa, zanahoria y remolacha. Cabe mencionar que estos datos fueron el resultado básicamente de tres procesos: 1) proceso de hidrólisis usando como agente biodegradante el hongo *Aspergillus niger* (no se reportan datos de duración en este proceso), 2) proceso de fermentación sin presencia de luz usando *Saccharomyces cerevisiae* durante 8 días y 3) destilación. En cuanto al lacto suero son los desechos de las fabricas lácteas, este zumo es sometido a el proceso de fermentación y destilación posteriormente (44).

Con el objetivo de obtener un índice de producción de etanol por cada litro del mismo, se aplica la Ecuación 10, mientras que para obtener una relación bioetanol/materia prima se aplica la Ecuación 11, donde se compara con los datos obtenidos experimentalmente del aserrín con un volumen de 21,21 L de fermento.

Analizando los indicadores de producción de etanol a partir de diferentes fuentes, donde se discuten para la papa, zanahoria, remolacha, lacto suero y aserrín, el resultando en términos de rendimiento en litros de bioetanol/kg de materia prima, la remolacha y la zanahoria superan al resto de los productos, alcanzando 0,0819L/kg y 0,0866L/kg respectivamente. El lacto suero alcanza un lugar intermedio, seguido de la papa de 0,0437 y 0,033L/kg respectivamente. En cuanto al aserrín es la peor elección puesto que en relación con la producción más alta de bioetanol, remolacha, es de aproximadamente 5,12 veces menos.

Todos los ensayos en el proceso de destilación están aproximadamente bajo los mismos estándares de producción, sin embargo la cantidad de fermento de aserrín es más del doble en comparación a las demás materias primas, aun así el índice de producción es 10,87 veces más bajo respecto al de mayor producción, la remolacha.

Tabla 22. Datos de pruebas de producción de bioetanol con diferentes materias primas

Materia Prima	Cantidad fermento (L)	Temperatura Inicio de condensación (°C)	Tiempo Producción Destilación (min)	Tiempo inicio condensación (min)	%Etanol	Etanol Producido (mL)	Índice de producción (mL/L fermento)	Relación bioetanol materia prima (L/kg)
Papa	10	64,4	83	28	60	330	55	0,033
Zanahoria	10	58,33	65	23	63	819	130	0,0819
Remolacha	10	65,55	67	22	65	866,64	133,3	0,0866
Lacto Suero	10	68,33	62	27	61	437,13	71,6	0,0437
Aserrín	21,21	50	30	20	78	202,8	12,26	0,0169

Fuente: Tabla elaborada por la autora basada en datos experimentales tomados de (44)

5. CONCLUSIONES

- Se determinó que el uso de cualquier tipo de aserrín es apto para la adaptación del hongo *Trichoderma viride* y producción de glucosa, sin embargo se presenta mejor rendimiento en el aserrín aglomerado debido a que tiene una concentración de glucosa superior respecto a las demás muestras (15,28 mg/dL).
- Se determinó mediante el análisis cromatográfico que se produjo etanol en todos los ensayos, se obtuvieron excelentes resultados partiendo de una destilación simple realizada en el laboratorio mejorando del 46 al 78% EtOH (p/p) en un lote de etanol destilado con microondas; tan sólo se consiguió 46% con calentamiento convencional con una concentración de glucosa de 192,157mg/dL.
- Se estableció que bajo las condiciones dadas en este proyecto, el rendimiento de la producción de etanol es de 1,83% con un porcentaje de etanol de 78%.
- Se determinó haciendo un análisis comparativo entre el aserrín y otras materias primas usadas aproximadamente con la misma escala de producción, papa, zanahoria, remolacha y lacto suero, en términos de rendimiento en litros de bioetanol, es significativamente bajo puesto que se produjo 0,203L de bioetanol a diferencia con la materia prima de mayor producción, remolacha, es 5,12 veces menor.
- En cuanto a el índice de producción de etanol por cada litro de fermento se determinó que es de 12,26, es 10,87 veces menor respecto a la remolacha, la más alta producción, teniendo como base de cálculo más del doble de fermento de aserrín, 21,21L.

6. RECOMENDACIONES

- Para futuros estudios de la producción de alcohol con cualquier materia prima para la recuperación y concentración de etanol con el objeto de romper el azeótropo utilizar sales como el acetato de sodio y potasio para el incremento de la solubilidad H₂O-sal (mayor valor de las fuerzas intermoleculares del agua con la sal) y por consiguiente separar con mayor facilidad el alcohol.
- Debido a que la materia prima obtenida es inmunizada, ya que es un factor importante para la finalidad de la fábrica de muebles, por ende es un gran impedimento para el proceso de hidrólisis enzimática realizado por el hongo *Trichoderma viride*, es recomendable obtener como materia prima aserrín de otra procedencia.
- El desarrollo y final ejecución de un proyecto como el presentado en este estudio podría ser impulso para otros proyectos donde puedan desarrollarse investigaciones de este tipo para analizar con mayor profundidad el impacto del uso del alcohol como combustible en los diferentes sectores.
- Se recomienda realizar un modelado conceptual del proceso con ayuda de un software de modelamiento de procesos en estado dinámico, e implementar evaluaciones ambientales y económicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Ballesteros, M.** *Biocombustibles para el transporte: Tecnologías Energeticas e Impacto Ambiental*. McGraw-Hill, 2001. págs. 3175-369.
2. **Rivera, R R.** *Política colombiana de biocombustibles*. Bucaramanga, 2012. IV Jornada de Ingenieria en Energia: Tendencias Tecnologicas en Combustibles.
3. **Castillo, E F.** *Un panorama general sobre los Biocombustibles de Primera Generación en Colombia*. Bucaramanga, 2012. IV Jornada de Ingenieria en Energia: Tendencias Tecnologicas en Combustibles.
4. **Abril, A J.** *Etanol a partir de Biomasa Lignocelulósica*. La Habana, 2008. 1er Taller Nacional de Etanol Celulosico.
5. **Fernando, A y Sanchez, A.** *Biocombustibles Densificados: Análisis de su Posible Producción*. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, 2004.
6. **Kafarov, V.** *Desarrollo de Biocombustibles de 3ra Generacion*. Bucaramanga, 2012. IV Jornada de Ingenieria en Energia: Tendencias Tecnologicas en Combustibles.
7. **Gomez, E, Rios, L y Peña.** *Madera, un Potencial Material Lignocelulósico para la Producción de Biocombustibles en Colombia*. Medellin, Junio de 2012.
8. **Corporación Nacional Forestal.** *Ficha 13 Aserrín*. Santiago de Chile, 2010.
9. *The Impact of Higher Oil Prices on Low Income Countries and on the Poor*. The World Bank, 2005.
10. **Seixas, M.** *Estrategias para construir una plataforma de cooperación horizontal sobre agroenergía y biocombustibles*. IICA, 2006.
11. **RFA.** *Homegrown for the Homeland: Ethanol Industry Outlook 2005*. Renewable Fuels Association, 2005.
12. **DOE.** *Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda*. DOE/SC-0095, 2006.
13. **Somerville, C.** *The billion-ton biofuels vision*. 312: 1277, s.l. : Science, 2006.
14. **Goldemberg, J.** *Ethanol for a sustainable energy future*. 315, Science, 2007, págs. 808-810.

15. **Sánchez, Ó, Cardona, C.** *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.* 99, *Bioresour*, 2008, págs. 5270–5295.
16. **Galbe, M y Zacchi, G.** *Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production* *Adv.* 108, *Eng./Biotechnol*, 2007, págs. 41-65.
17. **Lesme, R y Oliva, L.** *Factibilidad del empleo de los residuos de la industria de la madera para la obtencion de energia electrica.* Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.
18. **Oliva, J M.** *Efecto de los productos de degradacion originados en la explosion por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus.* 2003. Tesis Doctoral Universidad de Alcalá de Henares.
19. **Medina, M, Lara, L y Aguilar, C.** *Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante.* Universidad Autonoma de Coahuila. Coahuila. 2011.
20. **Fonseca, M R.** *Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (Pinus maximinoi H.E. Moore) Procedente de la finca río frío, TACTIC, alta Verapaz.* Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Trabajo de graduacion.
21. **Celi, S F y Macias, E M.** *Obtencion, preparacion y aplicacion del alcohol como combustible alternativo en un motor de combustion interna.* Escuela Politecnica del Ejercito Sede Latacunga. Latacunga. 2006. Tesis de grado.
22. **Portal de Energias renovable.** *Centro de Investigaciones Energeticas Medioambientales y Tecnologicas (CIEMAT).* [En línea] Octubre de 2008. [Citado el: 28 de Febrero de 2013.] http://www.energiasrenovables.ciemat.es/suplementos/sit_actual_renovables/biomasa.htm.
23. **Sarmiento, C A.** *Recursos y Geopolitica: Biocombustibles.* Universidad Autonoma de Bucaramanga. Bucaramanga. 2010.
24. **Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura.** *Atlas de la Agroenergia y los Biocombustibles en las Americas.* San José. 2007. 978-92-9039-807-3.
25. **Dekker, R F.** *Pretreatment options for the enzymatic saccharification of lignocellulose.* New Zealand. 1985. Symposium on the pretreatment of lignocellulosics materials.
26. **Dashtban, M, Schraft, H y Qin, W.** *Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives.* Septiembre de 2009, *International Journal of Biological Sciences*.
27. **Negro, M J, y otros.** *Changes in various physical parameters of Pinus radiata wood after steam explosion pretreatment.* *Bioenergy*. 2003.

28. **Sun, Y y Cheng, J.** *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production a review.* Bioresource technology, 2002. págs. 1-11. 83.
29. **Yu, Z y Zhang, H.** *Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae, Pichia sp. YZ-1 and Zymomonas mobilis.* Biomass and bioenergy, 2003. págs. 257-262. Vol. 24.
30. **Soderstrom, J, y otros.** *Two-step pretreatment of softwood by dilute: H₂SO₄ impregnation for ethanol production.* Biomass and bioenergy. págs. 475-486. 24.
31. **Lynd, L y Pretorius, I.** *Microbial cellulase utilization: Fundamentals and biotechnology.* Microbiol. mol. biol. . 2002. págs. 506–577. 66.
32. **Chundawat, S y Venkatesh, B.** *Effect of particle sized based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility.* Biotechnology and bioengineering, 2006. págs. 219–231. 96.
33. **Galbe, M y Zacchi, G.** *A review of the production of ethanol from softwood.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002. págs. 618-628. 59.
34. **Montoya, M I y Quintero, J A.** *Esquema Tecnológico Integral de la Producción de Bioetanol Carburante.* Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Manizales. 2005. Trabajo de grado.
35. **Lee, R L, Weimer, P J y Pretorius, I S.** *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.* Microbiology and molecular Biology Reviews, 2002. págs. 506-507. Vol. 66.
36. **Zandona, A, Siika-Aho, M y Ramos, L.** *Method for characterization of the enzyme profile and the determination of CBHI core protein in Trichoderma reesei cellulase preparations.* 22, s.l. : World Journ Microbiol and Biotechnol, 2000. 821-825.
37. **Pala, H, Mota, M y Gama, F.** *Enzymatic depolymerisation of cellulose.* 2007. págs. 101-108.
38. **Faria, L, Kolling, D y Camassola, M.** *Comparison of Penicillium echinulatum and Trichoderma reesei cellulase in relation to their activity against various cellulosic substrates.* Technol, 2008. 99 1417-1424.
39. **Ostergaard, S, Ostergaard, I y Olsson, L.** *Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000. págs. 34-50. Vol. 64.
40. **Haswell, S J y Cresswell, S L.** *Microwave Ovens-Out of the Kitchen.* 7, 2011, Journal of Chemical Education, Vol. 78. 900-904.

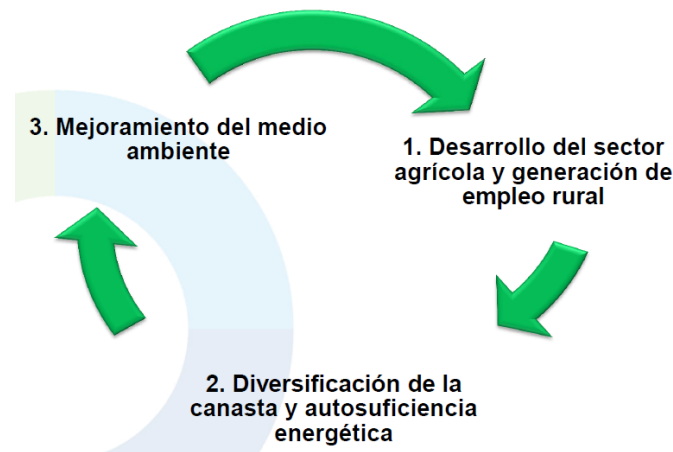
41. **Giese, J.** *Advances in Microwaves food Processing*. 9, 1992, Food technology, Vol. 46. 118-123.
42. **Alarcon, J C, Correa, C R y Molina, D R.** *Deshidratacion de alcohol asistida por microondas*. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2003.
43. **Serra, A, Poch, M y Solá , C.** Recuperacion de Etanol Producido po Fermentacion a pastirs de Biomasa. *Sistemas convencionales y Sistemas no convencionales*. Agroquím, 1987.
44. **Cholota, L y Mora, O.** *Diseño, construcción y prueba de un sistema prototipo para la producción de etanol a partir papa, zanahoria, remolacha y lactosa*. Riobamba. Tesis de grado, 2010.
45. **Consortio Energetico Corpoema.** *Formulacion de un plan de desarrollo para las fuentes no convencionales de energia en Colombia (PDFNCE)*. Bogota. 2010. Vol. 2.
46. **Cabezas, R I.** *Diseño de un sistema de compactacion de biomasa de cascarilla de arroz y serrin, en la produccion de bloques solidos combustibles (BSC)*. Escuela Superior Politecnica de Chimbonazo. Riobamba. 2009. Tesis de grado.
47. **Hernandez, X I y Albarracin, J D.** *Evaluacion del proceso de produccion de bioetanol de segunda generacion apartir de residuos lignocelulosicos utilizando metodologias de analisis exergetico e integracion de procesos*. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 2010. Trabajo de grado.
48. **Martin, C.** *Investigaciones sobre Bioconversion de Biomasa Lignocelulosica en la Universidad de Matanzas*. Santiago de Cuba. 2008. 1er Taller Nacional de Etanol Celulosico.

ANEXO A. PILARES DE LA POLÍTICA DE BIOCOMBUSTIBLES EN COLOMBIA

La producción y masificación del uso de los biocombustibles en Colombia tiene varios objetivos y se fundamenta (2):

- En la necesidad de garantizar el abastecimiento energético del país y disminuir su dependencia de los combustibles fósiles.
- En los beneficios sociales, ambientales y económicos que se pueden obtener con la generación de empleos permanentes con el fortalecimiento del sector agrícola y de las economías regionales.
- El desarrollo agroindustrial.
- El mejoramiento de la calidad del aire que respiramos
- La sustitución de cultivos ilícitos.
- Finalmente, la meta será la generación de una verdadera revolución social en materia de empleo y calidad de vida.

Figura 48. Descripción grafica de los pilares de la política de Biocombustibles en Colombia



Fuente: (2)

1. Consolidación programa de mezclas de biocombustibles

Ley 693 de 2001, Ley 939 de 2004, Ley 1450 de 2011, Decreto 4892 del 27 de Diciembre de 2011 (24) (45).

LEY 693 DE 2001 (Uso de alcoholes carburantes en Colombia)

- Las gasolinas que se utilicen en el país, tendrán que contener compuestos oxigenados tales como alcoholes carburantes.
- Se decretó que el uso del alcohol carburante recibirá un tratamiento especial en las políticas sectoriales de autosuficiencia energética, de producción agropecuaria y de generación de empleo.

LEY 939 DE 2004 (Se estimula la producción y comercialización de biocombustibles para uso en Motores diésel)

- El combustible diésel que se utilice en el país podrá contener biocombustibles de origen vegetal o animal para uso en motores diésel en las calidades que establezcan el Ministerio de Minas y Energía y el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

LEY 1450 DE 2011 (se expidió el Plan Nacional de Desarrollo 2010-2014, “Prosperidad para Todos”)

Se ratifica en las directrices del Documento CONPES 3510:

“El Gobierno Nacional ha construido un marco de política y regulación con el fin de generar incentivos económicos que aseguren la participación del sector privado a lo largo de la cadena de producción de los biocombustibles” (2).

DECRETO 4892 DE 2011 (se dictan disposiciones aplicables al o de alcoholes carburantes y biocombustibles en vehículos automotores)

- A partir del 1 de enero del año 2013, los ministerios de Minas y Energía y de Ambiente y Desarrollo Sostenible, o quien haga sus veces y mediante acto administrativo, previa consulta con la Comisión Intersectorial de Biocombustibles, podrán fijar porcentajes obligatorios de alcohol carburante superiores al 10% de mezcla obligatoria para el alcohol carburante (2).
- Se utilizara Gasolina motor con porcentajes de mezcla obligatoria que variarán entre el 8% y el 10% de mezcla de alcohol carburante en base volumétrica (E-8 -E-10 corriente y extra) (3).

2. Propuesta de armonización marco regulatorio CLDP¹⁰ - biocombustibles

2.1. Reglamentación técnica

RESOLUCIÓN 18 0687 DE 2003, MODIFICADA A TRAVÉS DE LA RESOLUCIÓN 18 1069 DE 2005 (Ministerio de Minas y Energía)

- Se definió la regulación técnica en relación con la producción, acopio, distribución y puntos de mezcla de los alcoholes carburantes y su uso en los combustibles nacionales e importados
- Se señalaron las fechas de entrada del programa de oxigenación de las gasolinas en Colombia

2.2. Reglamentación de calidad

RESOLUCIÓN 447 DE 2003, MODIFICADA POR LA RESOLUCIÓN 1565 DE 2004 (Ministerios del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y Minas y Energía)

- Se establecen los requisitos técnicos y ambientales de los alcoholes carburantes y los combustibles oxigenados que se vienen distribuyendo en el país desde el año 2005

RESOLUCIÓN 1289 DE 2005, MODIFICADA POR LA RESOLUCIÓN 18 0782 DE 2007 (Ministerios del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y Minas y Energía)

- Se establecen los requisitos técnicos y ambientales del biodiesel y sus mezclas con el diesel de origen fósil a distribuir en el país a partir del tercero o cuarto trimestre del año 2007.

2.3. Regulación económica

RESOLUCIÓN 18 0222 DE 2008 (Ministerio de Minas y Energía)

- El máximo entre:
 - Precio fijo

¹⁰ CLDP: Combustibles Líquidos Derivados del Petróleo

-Costo de oportunidad de las materias primas

-Combustible fósil ajustado por calidades energéticas y ambientales.

**RESOLUCIÓN 18 1780 DE 2005, MODIFICADA POR LA RESOLUCIÓN 18 0212 DE 2007
(Ministerio de Minas y Energía)**

- Se definió una banda de precios que toma el mayor valor entre los costos de oportunidad de las materias a utilizar en la producción del Biodiesel y el costo de oportunidad del ACPM de origen fósil, además de la garantía en la recuperación de las inversiones en ambos casos (Factor de producción eficiente).

ANEXO B. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Para la determinación de la glucosa se llevó a cabo la siguiente técnica:

1. Composición

- Reactivo (A): Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 µ/ml, peroxidasa > 1 µ/ml, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, Ph 7,5.
- Patrón (S): glucosa 100 mg/dL (5,55 mmol/L).

2. Procedimiento

- b) Atemperar el reactivo a temperatura ambiente
- c) Pipetear en tubos de ensayo las concentraciones mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 23. Concentraciones tubos de ensayo

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón(S)		10 µl	
Muestra			10 µl
Reactivo(A)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Fuente: BioSystems S.A.

- d) Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
- e) Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 540nm frente al blanco.

3. Cálculos

Concentración de glucosa de la muestra

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} * C \text{ patrón} = C \text{ muestra} \quad (4)$$

Donde,

A muestra: Absorbancia de la muestra

A patron: Absorbancia del patrón

C patron: Concentración del patrón

C muestra: Concentración de la muestra