



**Producción de bioetanol a partir del residuo del
proceso de extracción de aceite de higuera
(*Ricinus communis*) y análisis de sus impactos
ambientales**

**WILLIAM ANDRES AGUDELO LOPEZ
NICHOLAS SERRANO CABEZA**

Universidad Autónoma de Bucaramanga
Facultad de ingenierías fisicomecánicas
Ingeniería en Energía
Bucaramanga, Colombia

2019

Producción de bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuera (*Ricinus communis*) y análisis de sus impactos ambientales

**WILLIAM ANDRES AGUDELO LOPEZ
NICHOLAS SERRANO CABEZA**

Trabajo de grado para optar al título de:
INGENIERO EN ENERGÍA

Director:

M.Sc. Luis Eduardo Jaimes Reatiaga

Codirectora:

PhD Graciela Chalela Alvarez

Asesora:

M. Sc.(c) Yohana Castro Hernández

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de ingenierías fisicomecánicas

Ingeniería en Energía

Bucaramanga, Colombia

2019

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mis padres María Mercedes López y William Agudelo Cadena, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida estudiantil y por el esfuerzo que han hecho. A mis tíos Milton Agudelo Cadena, Didier Agudelo Cadena, Isnel Agudelo Pérez y en especial a Edilson Agudelo Cadena (QEPD) porque en todo el transcurso de mi carrera universitaria estuvieron pendientes de mí, apoyándome y guiándome en todo lo que necesité. A ellos y a mi familia y amigos en general GRACIAS.

WILLIAM ANDRES AGUDELO LOPEZ

Este proyecto de grado va dedicado a mis padres: Luz Marina Cabeza y Néstor Serrano Giraldo, que con sus esfuerzos y apoyo a lo largo de muchos años me permitieron finalizar una etapa más de mi vida. A mis hermanos que siempre han estado a mi lado para guiarme y aconsejarme en los momentos difíciles.

NICHOLAS SERRANO CABEZA

Agradecimientos

Queremos agradecer primeramente a Dios porque sin el nada de esto hubiera sido posible. Agradecer al centro de investigación en biotecnología, bioética y ambiente de la UNAB. A la Dra. Graciela Chalela Álvarez, una persona que admiramos de una forma increíble y de la cual estamos agradecidos por su apoyo y gran conocimiento brindando hacia nosotros. A la ingeniera Yohana Castro Hernández, por su infinita paciencia, tiempo y dedicación a nosotros, y a nuestro trabajo de grado, sin su ayuda no habría sido posible el desarrollo de este trabajo de grado. A la Ing. María Del Pilar Velasco quien siempre estuvo pendiente en el laboratorio. A todo el equipo del CINBBYA de la UNAB mil gracias por su comprensión, paciencia y ayuda cuando la necesitamos.

Queremos agradecer al M.Sc Luis Eduardo Jaimes Reatiaga por su paciencia y orientación en este trabajo de grado, que a pesar que siempre estaba ocupado, buscaba la manera de ayudarnos de la mejor forma posible. Agradecer a Marvin Torres Camacho, auxiliar de planta piloto, quien siempre estuvo dispuesto a ayudar sin importar lo ocupado que estuviese.

También es necesario agradecer a todas las personas que con su ayuda, facilitaron la realización de este proyecto de grado. En cualquier caso, cualquier error que haya en este libro es enteramente nuestra responsabilidad.

Resumen

El proceso de extracción de aceite de higuera genera un residuo conocido como torta de higuera. Esta biomasa contiene aproximadamente 40,2 % de celulosa. Por medio de los microorganismos: *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp., se plantearon algunas rutas para la hidrólisis enzimática de la celulosa que permitiera la producción de glucosa y, posteriormente, bioetanol a través de vía fermentativa por *Saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionó la mejor ruta con dos criterios: el menor periodo de hidrólisis y la mayor concentración de glucosa. Esto para su posterior réplica y simulación del proceso en Aspen plus®. La ruta escogida fue la hidrólisis por medio del microorganismo *Trichoderma* spp., debido a que, la hidrólisis tarda alrededor de 4 a 6 días; mientras que por los otros microorganismos entre 7 y 9 días. Además, su concentración registrada en las pruebas fue la mayor, con 11 % de glucosa. A partir de 1 kg de higuera se puede producir entre 50 y 100 mililitros de solución líquida con bioetanol en concentración de volumen de hasta 0,2437. Adicional, se analizaron los impactos ambientales en cuanto a la producción a nivel de laboratorio. Para obtener 100 mililitros de etanol se generan 2,8 kg de CO₂ equivalente, siendo el uso de energía eléctrica el que más impacta al medio ambiente. De igual forma, se evaluó la producción en Aspen Plus® con una capacidad de 10,11 toneladas diarias, de las cuales se pueden obtener 978,10 litros diarios de bioetanol con pureza del 98,9 %.

Palabras clave: Bioetanol, *Ricinus communis*, Hidrólisis enzimática, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp.

Abstract

The castor bean oil extraction process generates a residue known as castor bean cake. This biomass contains approximately 40.2% cellulose. By means of microorganisms such as *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. and *Rhizopus* spp., some routes for the enzymatic hydrolysis of cellulose were proposed that would allow the production of glucose and, subsequently, bioethanol through fermentation. The best route was chosen with two criteria: the shortest hydrolysis period and the highest glucose concentration. This for a posterior replication and simulation of the process in Aspen plus®. The chosen route was the hydrolysis generated by the microorganism *Trichoderma* spp., because its hydrolysis takes about 4 to 6 days; while by other microorganisms takes between 7 and 9 days. In addition, its concentration recorded in the tests was the highest, with 11% glucose. Between 50 and 100 milliliters of liquid solution containing bioethanol in volume concentration up to 0.2437 can be produced from 1 kg of castor bean cake. In addition, environmental impacts in terms of production were analyzed at the laboratory scale. In order to obtain 100 milliliters of ethanol, 2.8 kg of CO₂ equivalent are generated, being the use of electric energy the input that most impacts the environment. Similarly, the production of Aspen Plus® was evaluated with a capacity of 15 tons per day, from which 1435.14 liters per day of bioethanol with 98.9% purity can be obtained.

Keywords: Bioethanol, *Ricinus communis*, enzymatic hydrolysis, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp.

Contenido

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
1. Marco referencial	3
1.1 Marco teórico	3
1.1.1 Higuera (<i>Ricinus communis</i>).....	3
1.1.2 Aplicaciones de la semilla de higuera (<i>Ricinus communis</i>).....	5
1.1.3 Torta de higuera como biomasa lignocelulósica	6
1.1.4 Composición de la torta de higuera	7
1.1.5 Producción de bioetanol a partir de torta de higuera	9
1.1.6 Producción anual de bioetanol en Colombia	10
1.1.7 Procesos de obtención de bioetanol a partir de torta de higuera	11
1.1.8 Microorganismos usados en la hidrólisis enzimática de la torta de higuera ...	15
2. Metodología de investigación.	18
3. Producción de bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuera.	19
3.1 Cultivo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Rhizopus</i> spp... 19	
3.1.1 Método de adaptación de hongo a medio con torta de <i>Ricinus communis</i>	20
3.2 Proceso de hidrólisis enzimática de la torta de higuera (<i>Ricinus communis</i>).. 22	
3.2.1 Diseño y pretratado de biorreactores y de torta de higuera (<i>Ricinus communis</i>).....	22
3.2.2 Inoculación de hongos filamentosos en los biorreactores de hidrólisis.....	24
3.2.3 Control del proceso de hidrólisis enzimática, mediciones de pH, celulosa y glucosa.....	25
3.2.4 Lavado del biorreactor y obtención de jugo rico en azúcar libre (glucosa)	29
3.3 Proceso de fermentación con levadura del género <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 29	
3.3.1 Activación de la levadura del género <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.3.2 Adición de levadura activada a jugo rico en azúcar libre (glucosa)	30
3.4 Proceso de destilación de solución post- fermentación	30
3.5 Medición de concentración de etanol en producto destilado.....	31
3.6 Réplica del proceso de producción de bioetanol	32
3.6.1 Réplica (I) por hidrólisis enzimática de <i>Trichoderma</i> spp.	33
3.6.2 Réplica (II) por acción enzimática de <i>Trichoderma</i> spp.....	33

XII **Producción de bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuera (*Ricinus communis*) y análisis de sus impactos ambientales**

3.6.3	Réplica (III) por hidrólisis enzimática de <i>Aspergillus niger</i>	34
3.6.4	Réplica de proceso de fermentación	34
3.6.5	Réplica del proceso de destilación	34
3.7	Análisis elemental de residuo sólido post hidrólisis	35
3.7.1	Análisis de carbono orgánico total	35
3.7.2	Análisis de fósforo total	35
3.7.3	Análisis de potasio total.....	36
3.7.4	Análisis de nitrógeno total	36
3.8	Análisis de cromatografía.....	38
4.	Resultados de producción de bioetanol	39
4.1	Resultados del cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Rhizopus</i> spp.	39
4.2	Resultados del proceso de hidrólisis enzimática de la torta de higuera (<i>Ricinus communis</i>).....	42
4.2.1	Resultados de hidrólisis enzimática por acción del <i>Trichoderma</i> spp.	42
4.2.2	Resultados de la hidrólisis enzimática por acción de <i>Rhizopus</i> spp.....	44
4.2.3	Resultados de la hidrólisis enzimática por acción del <i>Aspergillus niger</i>	47
4.2.4	Observaciones generales y lavado de biorreactores de hidrólisis.....	51
4.3	Resultados del proceso de fermentación	51
4.4	Resultados del proceso de destilación	53
4.5	Resultados de cálculo de concentración de etanol por el método de determinación de la densidad de líquidos con el picnómetro de Gay-Lussac	54
4.6	Resultados de proceso de réplica	55
4.6.1	Resultados de Réplica (I) por acción enzimática de <i>Trichoderma</i> spp.	56
4.6.2	Resultados de Réplica (II) por acción enzimática de <i>Trichoderma</i> spp.....	58
4.6.3	Resultados de Réplica (III) por acción enzimática de <i>Aspergillus niger</i>	60
4.6.4	Resultados de la réplica de proceso de fermentación.....	62
4.6.5	Resultados de la réplica del proceso de destilación.	63
4.7	Resultado del análisis elemental de residuo sólido post hidrólisis	65
4.7.1	Resultado del análisis de carbono orgánico total.....	65
4.7.2	Resultado del análisis de fósforo total	65
4.7.3	Resultado del análisis de potasio total.....	65
4.7.4	Resultado del análisis de nitrógeno total	66
4.8	Resultados del análisis de cromatografía.....	66
5.	Simulación de la línea de producción en Aspen plus®.....	68
5.1	Definición de componentes.....	69
5.2	Implementación del diagrama de bloques.....	70
5.2.1	Construcción de la simulación	72
5.3	RESULTADOS DE LA SIMULACION DE LA LINEA DE PRODUCCION EN ASPEN PLUS®	75
5.3.1	Resultados de simulación de hidrólisis enzimática	79
5.3.2	Resultados de simulación de fermentación y captura de carbono	80
5.3.3	Resultados de simulación de destilación	82
6.	Análisis de impactos ambientales	86
6.1	Metodología	86
6.2	Definición del objetivo del ACV	87
6.3	Unidad funcional	87

6.4	Alcance del ACV	87
6.5	Inventario de ciclo de vida	88
6.6	Evaluación de impacto	90
7.	Resultados de la simulación de los impactos ambientales	93
7.1	Categorías de impacto Midpoint	93
7.1.1	Cambio climático	93
7.1.2	Acidificación terrestre.....	95
7.1.3	Eutrofización del agua	97
7.1.4	Formación de ozono	99
7.1.5	Agotamiento de recursos fósiles	101
7.2	Categorías de impacto Endpoint	103
7.2.1	Daño a la salud humana	103
7.2.2	Daño a los ecosistemas.....	105
7.2.3	Agotamiento de recursos	107
8.	Conclusiones y Recomendaciones.....	110
8.1	Conclusiones.....	110
8.2	Recomendaciones.....	111
	Bibliografía	112

Lista de figuras

Figura 1	Arbusto de higuera.....	3
Figura 2	Semilla de higuera.....	3
Figura 3	Estructura de la biomasa lignocelulósica tomando como referencia el arbusto de higuera.....	7
Figura 4	Estructura de la celulosa.....	9
Figura 5	Plantas productoras de bioetanol en Colombia.....	10
Figura 6.	Procesos para la obtención de bioetanol.....	11
Figura 7	Diagrama del proceso de fermentación alcohólica.....	13
Figura 8.	Ciclo de Krebs.....	15
Figura 9	Destilación simple.....	15
Figura 10	Representación macroscópica de <i>Aspergillus niger</i>	16
Figura 11	Representación macroscópica de <i>Rhizopus</i> spp.....	17
Figura 12	Representación macroscópica de <i>Trichoderma</i> spp.....	17
Figura 13	Metodología de la investigación.....	18
Figura 14	Fresa con <i>Rhizopus</i> spp.....	20
Figura 15	Diferencial de volúmenes.....	20
Figura 16	Caja petri con medio malta agar higuera.....	22
Figura 17	Biorreactor para hidrólisis enzimática.....	23
Figura 18	Esterilización de torta.....	23
Figura 19	Montaje de biorreactor para la hidrólisis enzimática.....	24
Figura 20	Montaje para medición de celulosa por el método de Kurschner y Hoffer.....	26
Figura 21	Filtro Gooch de porosidad media.....	26
Figura 22	Filtro Gooch luego de medición de celulosa.....	27
Figura 23	De izquierda a derecha, muestra patrón y muestra blanco.....	28
Figura 24	Montaje de destilación.....	31
Figura 25	De izquierda a derecha: tubo de ensayo con muestra sobrenadante (medición de COT), cubeta de reacción para nitrógeno, cubeta de reacción para fosfatos y cubeta de reacción para potasio.....	37
Figura 26	Imagen microscópica de hongo <i>Trichoderma</i> spp.....	39
Figura 27	Imagen microscópica de hongo <i>Rhizopus</i> spp.....	40
Figura 28	Imagen microscópica de hongo <i>Aspergillus niger</i>	41
Figura 29.	Recipientes fermentadores.....	53
Figura 30	Recipientes fermentadores, De izquierda a derecha replica (I) y replica (III).....	63
Figura 31	Lista de compuestos para la simulación en Aspen®.....	70
Figura 32	Diagrama de bloques a implementar en Aspen plus®.....	71
Figura 33.	Métodos y propiedades para la simulación.....	72

Figura 34 Composición de la corriente “ <i>BIOMASS</i> ”	73
Figura 35. Reacciones de hidrólisis y sus rendimientos	74
Figura 36 Reacción de unidad fermentadora “ <i>FERM-101</i> ”	74
Figura 37 Diagrama de proceso implementado en Aspen ®.....	77
Figura 38 Etapa de hidrólisis enzimática en Aspen plus®.....	79
Figura 39 Etapa de fermentación en Aspen plus ®.....	81
Figura 40 Proceso de destilación y purificación de etanol en Aspen plus®.....	83
Figura 41 Marco de referencia de un análisis de ciclo de vida[68].	86
Figura 42 Proceso bajo estudio en el ACV	88
Figura 43 Distribución de impactos en la categoría de cambio climático.....	93
Figura 44. Diagrama de bloques de los impactos ambientales de la categoría de calentamiento global.....	94
Figura 45 Distribución de impactos en la categoría de acidificación terrestre	95
Figura 46. Diagrama de bloques de los impactos asociados a la categoría de acidificación terrestre.....	96
Figura 47 Distribución de impactos en la categoría de eutrofización del agua	97
Figura 48. Diagrama de barras de los impactos ambientales de la categoría de eutrofización del agua.	98
Figura 49 Distribución de impactos en la categoría de formación de ozono.....	99
Figura 50. Diagrama de barras de los impactos de la categoría de formación de ozono.	100
Figura 51 Distribución de impactos en la categoría de agotamiento de recursos fósiles	101
Figura 52. Diagrama de barras de los impactos asociados a la categoría de escasez de recursos fósiles.	102
Figura 53 Distribución de impactos en la categoría de daño a la salud humana.....	103
Figura 54. Diagrama de barras de los impactos asociados a la categoría de daño a la salud humana.....	104
Figura 55 Distribución de impactos en la categoría de daño a los ecosistemas.....	105
Figura 56. Diagrama de barras de los impactos asociados a la categoría de daño a los ecosistemas.	106
Figura 57 Distribución de impactos en la categoría de agotamiento de recursos.....	107
Figura 58. Diagrama de barras asociado a los impactos de la categoría de escasez de recursos.	108

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 Características principales del arbusto de higuera.....	4
Tabla 2 Clasificación taxonómica del arbusto de higuera	5
Tabla 3 Demanda anual de semillas de higuera.....	5
Tabla 4 Aplicaciones de la torta de higuera	6
Tabla 5 Componentes principales de la biomasa lignocelulósica.....	7
Tabla 6 Composición elemental y de componentes de biomasa de la torta de higuera ..	8
Tabla 7 Propiedades del etanol.....	10
Tabla 8 Capacidad de las plantas productoras de bioetanol en Colombia	11
Tabla 9 Pretratamientos químicos	12
Tabla 10 Métodos para realizar la fermentación	14
Tabla 11 Datos de diferencial de volúmenes	21
Tabla 12 Concentración de hongo en el inóculo de cada biorreactor de hidrólisis	25
Tabla 13 Detalles de adaptación de hongos filamentosos a medio de cultivo con torta de higuera	41
Tabla 14 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por <i>Trichoderma</i> spp.	42
Tabla 15 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por <i>Rhizopus</i> spp.	45
Tabla 16 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por <i>Rhizopus</i> spp.	47
Tabla 17 Datos de activación de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
Tabla 18 Resultados de proceso de destilación.....	53
Tabla 19 Valores para calibración de picnómetro de Gay-Lussac a temperatura cercana de 20°C.....	54
Tabla 20 Valores para calibración de picnómetro de Gay-Lussac a temperatura cercana de 60°C.....	54
Tabla 21 Concentración de etanol y densidad de destilados	55
Tabla 22 Concentración de inóculo de réplica (I)	56
Tabla 23 Resultados de réplica (I) de hidrólisis enzimática por <i>Trichoderma</i> spp.	56
Tabla 24. Conteo del hongo <i>Trichoderma</i>	58
Tabla 25. Datos de las pruebas de celulosa y glucosa de la réplica (II)	58
Tabla 26 Concentración de inóculo de réplica (III)	60
Tabla 27 Resultados de réplica (III) de hidrólisis enzimática por <i>Aspergillus niger</i>	61
Tabla 28 Concentración de inóculo de levadura para replicas (I) y (III).....	63
Tabla 29 Resultados del proceso de destilación producto de réplica (I).....	64

Tabla 30 Valores para medición de concentración de etanol y densidad de solución post destilado.....	64
Tabla 31 Resultados de análisis elemental de residuo orgánico post hidrólisis.....	66
Tabla 32 Resultados de concentración de etanol por análisis de cromatografía	66
Tabla 33 Resultados de concentración de metanol por análisis de cromatografía	66
Tabla 34 Volumen de etanol de los destilados	67
Tabla 35 Propiedades, nomenclatura y tipo de propiedad para definición en Aspen plus®	70
Tabla 36 Condiciones operativas de los equipos de la línea de producción.....	75
Tabla 37 Resultados de etapa de hidrólisis enzimática en Aspen plus®.....	80
Tabla 38 Resultados de proceso de fermentación en Aspen plus®	81
Tabla 39 Resultados de recobro de etanol y absorción de CO ₂ en Aspen plus®	82
Tabla 40 Resultados de proceso de destilación de etanol en Aspen plus®.....	84
Tabla 41 Resultados de proceso de purificación de etanol en Aspen plus®.....	85
Tabla 42 Inventario fase de desactivación de la toxina	89
Tabla 43. Inventario fase de extracción del aceite de higuera.....	89
Tabla 44 Inventario fase de hidrólisis enzimática	89
Tabla 45. Inventario fase de fermentación	90
Tabla 46. Inventario fase de destilación	90
Tabla 47 Categorías de impacto Midpoint	91
Tabla 48 Categorías de impacto Endpoint	91
Tabla 49 Características de los equipos utilizados.....	92

Introducción

Los recursos fósiles han sido la fuente principal de la energía usada en el mundo a través de los años debido a su alto impacto comercial tanto en el ámbito nacional como internacional. El continuo uso de estos recursos ha generado una escasez en la obtención de los mismos, lo cual ha llevado a la humanidad buscar nuevas alternativas para suplir la demanda energética mundial.

Debido a esta crisis energética, la biomasa es una fuente renovable que ha surgido como alternativa a la generación de combustibles fósiles en el mundo dado a la obtención de biodiesel y bioetanol a partir de semillas, plantas y algas[1]. Su facilidad de cultivo y cosecha y su amplia distribución en la tierra han generado un alto interés en la investigación y producción de distintas fuentes energéticas provenientes de la biomasa.

En la actualidad la semilla de *Ricinus communis* (higuerilla) se reconoce como una opción viable en la producción de biodiesel[2], pero debido a su distribución geográfica en el territorio colombiano y a su adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas se han realizado distintas investigaciones para el aprovechamiento máximo de la semilla[3].

El proceso de extracción al que se somete la higuerilla genera residuos, aceite de higuerilla y torta de higuerilla. El aceite de ricino es el componente más conocido y utilizado de la higuerilla, siendo este utilizado en industrias de pinturas, esmaltes y principalmente de producción de biodiesel[4]; pero contrario a éste, la torta de higuerilla ha tenido pocos estudios de sus aplicabilidades, siendo esta una de las razones por la que esta investigación se llevó a cabo, ya que se enfoca en determinar el potencial de la torta de higuerilla como fuente de producción de biocombustibles como lo es el bioetanol, logrando así, el mayor aprovechamiento de esta biomasa.

La semilla de higuerilla no es apta para el consumo, dado a una toxina presente en su composición, la cual se debe retirar previamente para la producción de bioetanol, es por esto que no presenta inconvenientes como la transición de materias primas hacia la producción energética dejando a un lado sus finalidades alimenticias, generando de esta manera, un alza de precios y una posible escasez de estas materias primas para el consumo humano[5]. Este proyecto desarrolla una metodología para la obtención de bioetanol a partir de torta de higuerilla mediante procesos enzimáticos, utilizando microorganismos que serán descritos posteriormente con el fin de incentivar el uso de esta materia prima en Colombia, destacando su gran potencial y bajas emisiones respecto a otras materias primas convencionales ya utilizadas.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Producir bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuera (*Ricinus communis*) y analizar sus impactos ambientales.

Objetivos específicos.

- Emplear una metodología que permita la obtención de los azúcares fermentables mediante la hidrólisis enzimática generada por *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger* y *Rhizopus* spp.
- Producir bioetanol a nivel de laboratorio, analizando sus características fisicoquímicas con el fin de cumplir los índices de calidad establecidos en las normas internacionales ASTM D4814 (pH, %etanol, %metanol, etc.).
- Realizar la simulación de la línea de producción a escala menor de biorrefinería en el software Aspen plus ®.
- Analizar el perfil de impactos ambientales asociados a la cadena productiva del bioetanol, a pequeña escala, por medio del software Sima Pro.

1. Marco referencial

1.1 Marco teórico

1.1.1 Higuerilla (*Ricinus communis*)

La higuerilla es una planta tipo arbusto con una altura de 1 a 5 metros, con los tallos presentando una coloración verde o rojiza. Las hojas tienen de 5 a 8 segmentos, en forma de estrella. Sus frutos son pequeñas capsulas espinosas de forma ovalada que contienen entre 1 a 3 semillas[6].

Figura 1 Arbusto de higuerilla



Fuente: Inforural [7].

“Es originaria de África tropical sin embargo es común desde hace muchos de años en países de América Latina, se cree que llegó a este continente a partir de la conquista, habita en climas calientes, se conoce también como (Higuereta, ricino, palmacristi y castor)”[6]. Su distribución es bastante amplia, encontrándose en las orillas de ríos, quebradas o lagos, inclusive a alturas cercanas a los 3000 msnm [6].

Figura 2 Semilla de higuerilla



Fuente: Campos Seeds [8].

4 Producción de bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuerilla (*Ricinus communis*) y análisis de sus impactos ambientales

Las características principales del arbusto de higuerilla están plasmadas en la Tabla 1.

La producción mundial de higuerilla cada vez va aumentando; en el año 2000 la demanda fue de 1.371.000 toneladas de semilla, 9 años después se incrementó un 8%, siendo India, China y Brasil los principales países que más semilla de higuerilla usaron[6]. Así mismo, el uso de aceite de higuerilla ha incrementado, en 1985 se utilizaba 400.000 toneladas de aceite y 25 años después este número de incremento un 52%[6]. La tabla 3 muestra los principales consumidores de *Ricinus communis* en el mundo.

Tabla 1 Características principales del arbusto de higuerilla

Características <i>Ricinus communis</i>	
Familia	Euphorbiaceae
Nombre científico	<i>Ricinus communis</i>
Etimología	Ricinus, del latín con el que se conocen ciertas garrapatas que se asemejan a sus semillas; communis, prestado del vocablo latín communisque significa evidente o común
Nombre común	Higuerilla
Origen	Introducida
Continente	África
Distribución geográfica	Nativa de África
Hábito de crecimiento	Arbórea
Altura máxima (m)	10
Diámetro (cm)	40
Amplitud de copa	Estrecha (menor que 7 m)
Densidad de follaje	Baja
Modelo arquitectónico	No determinado
Sistema radicular	Profundo
Atributos foliares	Mide 20 cm de diámetro, palmeada, de borde aserrado y lobulado, nectarios en la base foliar y estípulas terminales
Persistencia hoja	Semicaducifolia
Atributos florales	Miden 1 cm de diámetro, con muchos estambres
Estación de floración	Estacional
Sistema de polinización	No determinado
Limitaciones flores	Ninguna
Limitaciones frutos en espacios públicos	Tóxicos
Sistema de dispersión	No determinado
Densidad madera (g/cm ³)	No determinado
Tasa de crecimiento	Rápida
Longevidad	Baja (0 - 35 años)
Zonas de humedad	Seca, Húmeda, Muy húmeda
Rango altitudinal	0 - 1000 msnm, 1001 - 1500 msnm, 1501 - 2000 msnm, 2001 - 3000 msnm
Requerimiento de luminosidad	Alta
Tipo de suelo	Se desarrolla bien en suelos arcillosos, arenosos, profundos, con poca acidez y alto contenido de nitrógeno.
Uso	El aceite que se extrae de sus semillas tiene aplicaciones industriales y medicinales.
Función	Ornamental, Recuperación de suelos y/o áreas degradadas
Usos en espacio público	Cerros, Glorietas, Orejas de puente, Parques
Estado de conservación	No evaluada

Fuente: [9].

Su clasificación taxonómica se resume en la Tabla 2:

Tabla 2 Clasificación taxonómica del arbusto de higuera

Clasificación taxonómica arbusto de higuera	
Reino	Plantae
Subreino	Trachebionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Subfamilia	Acalyphoideae
Tribu	Acalypheae
Subtribu	Ricininae
Genero	Ricinus
Especie	Ricinus communis

Fuente:[10].

Tabla 3 Demanda anual de semillas de higuera

País	Demanda anual de semillas de higuera [Ton]	%
India	1549000	86,30
Mozambique	69000	3,84
China	67000	3,73
Brasil	37000	2,06
Etiopia	12000	0,67
Birmania	10000	0,56
Paraguay	9000	0,50
Vietnam	7000	0,39
Sudáfrica	7000	0,39
Angola	4000	0,22
Colombia	3500	0,19
Otros	20500	1,14
Total	1795000	100,00

Fuente:[11].

1.1.2 Aplicaciones de la semilla de higuera (*Ricinus communis*)

La semilla de higuera es el producto principal que se obtiene del cultivo de la higuera, de la cual se extrae el aceite de ricino el cual tiene varias aplicaciones industriales entre las que destacan la obtención de biodiesel, la producción de lubricantes y fertilizantes. Del proceso de extracción también se obtiene la torta de higuera la cual es un producto que ha sido aprovechado relativamente poco [6].

Las principales aplicaciones de la torta de higuera son presentadas a continuación en la tabla 4:

Tabla 4 Aplicaciones de la torta de higuera

Aplicaciones torta de higuera	
Aplicación	Razón
Fertilizante	Su alto contenido de nitrógeno, fósforo y calcio en comparación con otros fertilizantes orgánicos[12], además de reducir la acidez del suelo[13].
Alimento animal	Debido a su gran cantidad de proteínas, así mismo después de eliminar su toxicidad se utiliza para reemplazar algodón, tartas y soja en el alimento de ganado y pollos[14].
Producción de herbicidas o insecticidas	Su alto contenido de nitrógeno y su toxicidad permiten que tenga propiedades de insecticidas y nematocidas[14].

Fuente: [15].

1.1.3 Torta de higuera como biomasa lignocelulósica

La biomasa es la materia orgánica renovable que proviene de distintas fuentes: vegetal, animal o la obtenida debido a una transformación natural o artificial. Son muchos los recursos que forman la biomasa, estos pueden ser: residuos forestales, agrícolas, biodegradables, subproductos industriales, entre otros. A causa de las variadas aplicaciones energéticas que tiene la biomasa, esta es la energía renovable más usada de todo el mundo[16].

La torta de higuera hace parte de la biomasa residual generada por transformaciones agroindustriales, esta a su vez hace parte de la biomasa lignocelulósica empleada principalmente en la generación de combustibles y alimento animal, además de servir como estructura para algunas construcciones, pero en la actualidad su aprovechamiento es más complejo; varias industrias utilizan este tipo de biomasa para la producción de productos químicos, combustibles líquidos y gaseosos, entre otros[17].

Para un mejor entendimiento de lo que es la biomasa lignocelulosa la tabla 5 muestra sus principales componentes:

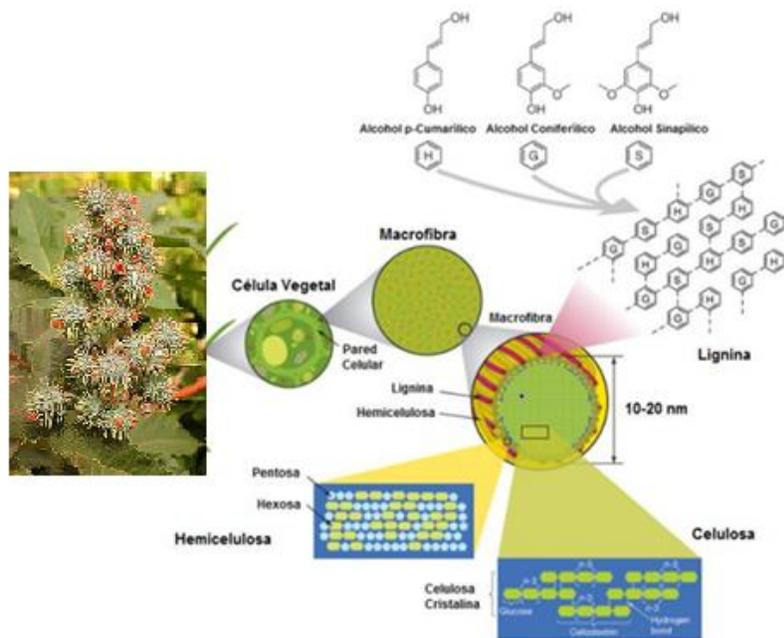
Tabla 5 Componentes principales de la biomasa lignocelulósica

Componentes principales biomasa lignocelulosica	
Componente	Porcentaje
Celulosa	20%-50%
Hemicelulosa	15%-35%
Lignina	10%-30%
Proteínas	3%-10%
Lípidos	1.5%
Azúcares solubles	10.5%

Fuente:[18].

En la siguiente figura se muestra la estructura del arbusto de higuera siendo este clasificado como fuente de obtención de biomasa lignocelulósica. (Figura 3):

Figura 3 Estructura de la biomasa lignocelulósica tomando como referencia el arbusto de higuera



basado en S. Morales De La Rosa:[19].

1.1.4 Composición de la torta de higuera

La celulosa, hemicelulosa y lignina son los tres polímeros estructurales principales de la biomasa lignocelulósica, incluyendo los provenientes de actividades agrícolas. La biomasa lignocelulósica se obtiene de bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas, entre otros lo que la hace la biomasa más abundante de la tierra[19].

Es fundamental identificar los componentes de la torta de higuera, con el fin de establecer el potencial que esta presenta en la producción de bioetanol. La composición elemental y de componentes de biomasa de la torta de higuera se muestra en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6 Composición elemental y de componentes de biomasa de la torta de higuera

Composición torta de higuera	
Composición elemental	
Elemento	%
C	43,2
H	6,1
O	44,7
N	1,6
Cenizas	4,4
Al	0,0112
Ca	0,896
Cu	0,001
Fe	0,006
Na	0,039
Mg	0,131
Mn	0,001
K	0,624
P	0,221
Zn	0,002
Componentes de biomasa	
Componente	%
Extractivos	18,6
Hemicelulosa	13,6
Celulosa	33,4
Lignina acida insoluble	17,6
Lignina acida soluble	2,5
Proteínas	4,9

Fuente:[20].

- **Celulosa**

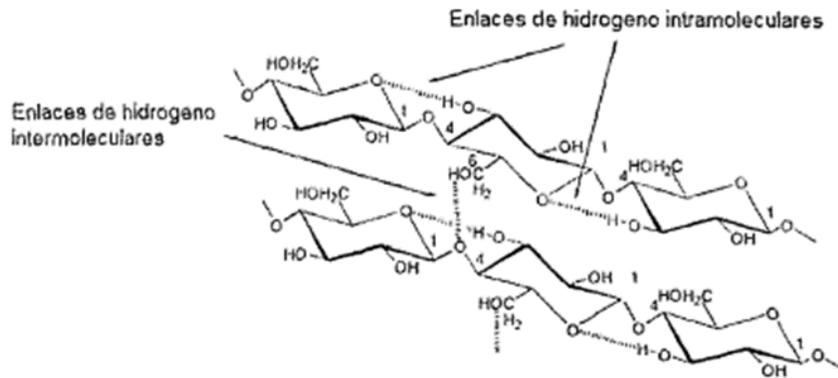
La celulosa está presente en todas las plantas, ya que es la que forma la pared celular de las células vegetales. La celulosa se encuentra en los tejidos de sostén, por lo cual es un polisacárido fundamental en la estructura de las plantas; debido a estas dos cualidades es la molécula biológica más abundante. La celulosa es un polímero formado principalmente por moléculas de glucosa y presenta la siguiente fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ con un valor mínimo de $n = 200$ [21].

La glucosa es un monosacárido, un tipo de azúcar simple, de color blanco, que se halla en las células de muchos frutos, miel, sangre y líquidos tisulares de animales. La glucosa es

el componente principal en la producción de bioetanol mediante un proceso de fermentación alcohólica el cual será descrito posteriormente.

La celulosa está compuesta por una estructura lineal, en la que se crean múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas cercanas de glucosa, formando fibras compactas que no pueden ser penetradas por el agua, y de este modo, insolubles en agua y en alcohol. Su estructura se muestra en la siguiente figura 4 [21]:

Figura 4 Estructura de la celulosa



Fuente: C. Arellano Perales, E. Houbron, and D. Elena Rustrían Portilla [22]

1.1.5 Producción de bioetanol a partir de torta de higuera

El bioetanol se obtiene de biomasa vegetal compuesta de azúcares simples o de algunos compuestos que mediante ciertos procesos puedan ser transformados en azúcares, como el almidón o la celulosa. El maíz, trigo, sorgo, cebada, remolacha azucarera, caña de azúcar y la semilla de higuera son las principales especies vegetales de las que se puede obtener bioetanol. El bioetanol obtenido es de gran utilidad energética ya que se emplea como combustible mezclándolo con distintas naftas en diferentes proporciones dependiendo de la normativa y de sus usos finales[23].

El bioetanol comparte la misma composición química del etanol y características, la única diferencia entre los dos es que el bioetanol se obtiene a través de procesos de transformación de la biomasa, mientras que el etanol se obtiene de otros procesos[24]. La tabla 7 ilustra las propiedades del etanol:

Tabla 7 Propiedades del etanol

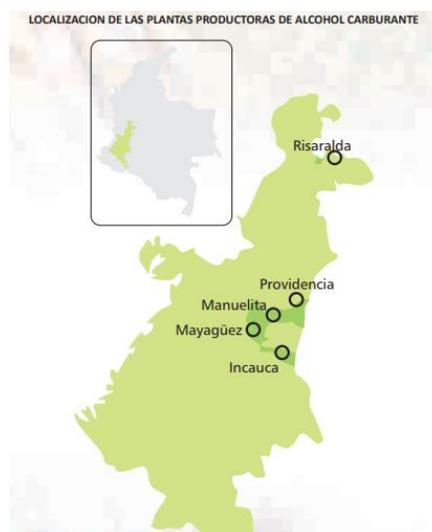
Parámetro	Valor
Estado físico a 15°C y 1 atm	Líquido
Peso molecular	46,07
Punto de ebullición a 1 atm	78,3°C
Punto de congelación	-114°C
Punto de ebullición a 1 atm	243,1°C
Parámetro	Valor
Presión crítica	63 atm
Gravedad específica (Líquido)	0,790 a 20°C
Gravedad específica (Vapor)	1,6
Calor específico (Vapor)	1,128
Calor de solución	-2,3*10 ⁵ [J/kg]
Calor de combustión	-268,8*10 ⁵ [J/kg]
Calor de vaporización latente	8,37*10 ⁵ [J/kg]
Tensión superficial a 20°C	22,8 Dinas/cm
Viscosidad a 20°C	0,0141 poise
Presión de vapor a 20°C	43 mmHg
Calor específico a 23°C	0,618 cal/g
Punto de inflamación	14°C
Peso específico a 15,56°C	0,816
Limites de inflamabilidad	90-400 g/L de aire
Índice de refracción	1,3651

Fuente:[25].

1.1.6 Producción anual de bioetanol en Colombia

En la figura 5 se muestra las cinco plantas de producción de bioetanol a base de bagazo de caña de azúcar de Colombia:

Figura 5 Plantas productoras de bioetanol en Colombia



Fuente: Biocombustibles Colombia [26].

La producción anual de estas plantas se muestra en la tabla 8:

Tabla 8 Capacidad de las plantas productoras de bioetanol en Colombia

Región	Inversionista	Capacidad [L/día]	Producción de azúcar cruda [Ton/año]	Área plantada [Ha]
Miranda, Cauca	Incauca	350000	97690	11942
Palmira, Valle	Ingenio Providencia	300000	65126	9287
Palmira, Valle	Manuelita	250000	81408	8721
Candelaria, Valle	Mayaguez	250000	48845	6587
La Virginia, Risaralda	Ingenio Risaralda	100000	32563	3004
Total en producción		1250000	325632	39541

Fuente:[26]

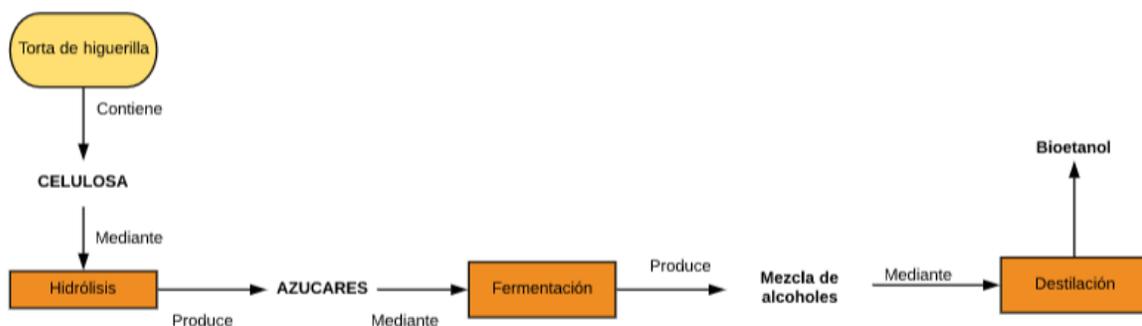
De la tabla 8 se puede inferir que el producto principal para la generación de bioetanol en Colombia es el bagazo de caña de azúcar, por lo que es de suma importancia la utilización de distintas fuentes de biomasa con alto potencial para la producción de bioetanol.

1.1.7 Procesos de obtención de bioetanol a partir de torta de higuierilla

El bioetanol se produce mediante una fermentación alcohólica por medio de levaduras. Las levaduras fermentan los azúcares simples, que proviene de la biomasa, dando como resultado final, etanol y dióxido de carbono.

En el caso de la higuierilla, la glucosa que contiene el grano es el único componente que se transforma en alcohol. Para esto se utilizan enzimas específicas que hidrolizan la celulosa hasta azúcares simples como la glucosa.

El proceso de obtención de bioetanol a partir de torta de higuierilla se presenta en la figura 6:

Figura 6. Procesos para la obtención de bioetanolFuente: *Plantas de biomasa* [27]

- **Pretratamiento de la materia prima**

Es el primer proceso de transformación por el que pasa los componentes fundamentales, es decir, la celulosa, hemicelulosa y lignina. La finalidad de este proceso es reducir la cantidad lignina para que las enzimas puedan lograr la degradación de sustrato y así

umentar el rendimiento de azúcar. Algunos tipos de pretratamientos más usados son los siguientes[28]:

Pretratamientos físicos: “Según R. Abascal Fernández (2017), los principales métodos son la trituración mecánica que se encarga de disminuir el tamaño de la materia y la pirolisis que se basa en definir las características de los procesos secundarios.”[28].

Pretratamientos químicos y biológicos: Modifican la estructura química de la materia prima mediante los siguientes procesos descritos en la tabla 9:

Tabla 9 Pretratamientos químicos

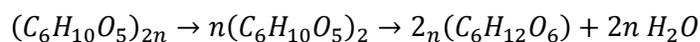
Pretratamientos químicos y biológicos	
Método	Descripción
Explosión a vapor	Los componentes se separan utilizando menor energía que procesos mecánicos mediante altas temperaturas y presiones a la cuales se somete la biomasa.
Explosión con amoníaco	La estructura cristalina de la celulosa se rompe mediante amoníaco líquido en vez de vapor como el método anterior.
Agua líquida a alta temperatura	La hemicelulosa se solubiliza de la celulosa a través del sometimiento de la biomasa a agua con altas temperaturas, logrando que el acceso a la celulosa se simplifique.
Hidrólisis enzimática	“Según R. Abascal Fernández este método es el más efectivo para la producción de etanol a partir de la biomasa. Consiste en la degradación microbiana de los residuos lignocelulósicos mediante enzimas, donde la más empleada es la celulosa.”.
Hidrólisis ácida	Su objetivo es transformar los polisacáridos de la biomasa en sus monómeros elementales mediante catalizadores ácidos.
Tratamientos de ozono	La lignina, la hemicelulosa y parcialmente la celulosa se degradan a condiciones de temperatura y presión estándar

Fuente: [28].

- **Hidrólisis de la torta de higuera**

“Según A. Herrera Escobar (2013), la hidrólisis consiste en la doble descomposición de la molécula de agua (H+ y OH-) con otro compuesto, en la cual sus átomos forman otra especie química. Este proceso también se realiza por la acción de un ácido o enzima.” [29]

Reacción 1. Reacción química hidrólisis



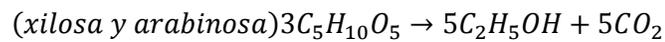
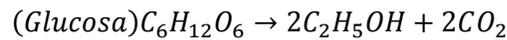
La etapa de hidrólisis es de vital importancia debido a que, si se sobrepasa el tiempo de liberación de la glucosa, ocurrirá el proceso de glucólisis el cual consiste en la degradación de la glucosa para extraer energía para el metabolismo celular.

- **Fermentación alcohólica de la glucosa liberada en el proceso de hidrólisis enzimática**

“Según H. Vázquez (2018), la fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono”[30].

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Zymomonas mobilis* son los dos microorganismos más utilizados en la fermentación de la glucosa para la producción de etanol.[29]. Las reacciones químicas del proceso son:

Reacción 2. Reacción química de la fermentación[31]



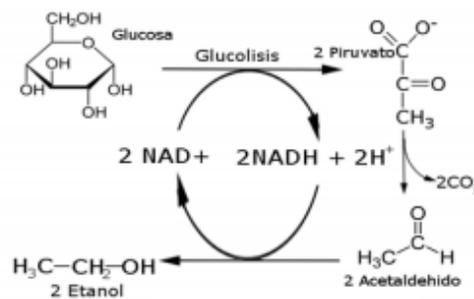
Con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa, los organismos biológicos usados para la producción de bioetanol viven en un ambiente con oxígeno (aerobiosis), ya que, si la población no ha incrementado lo suficiente al estar presente en un ambiente anaerobio, la velocidad de obtención de etanol será drásticamente afectada. Por lo tanto, se pueden definir dos fases [31]:

-“Fase aerobia: es una fase de crecimiento en la cual la glucosa pasa a dióxido de carbono”[31].

-“Fase anaerobia: es la fase de producción de etanol; la glucosa pasa a etanol y dióxido de carbono”[31].

El diagrama de la fermentación alcohólica se presenta en la figura 7:

Figura 7 Diagrama del proceso de fermentación alcohólica



Fuente: J. Suarez [31]

La fermentación se puede llevar a cabo de varias maneras, descritas a continuación:

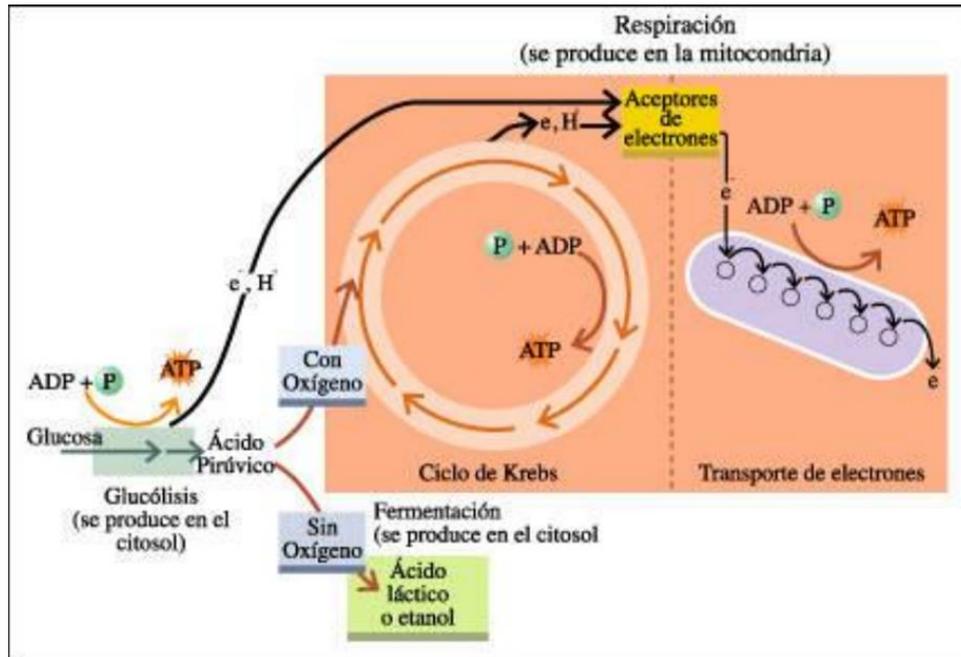
Tabla 10 Métodos para realizar la fermentación

Métodos para realizar la fermentación	
Método	Descripción
Fermentación en co-cultivo	Se emplea mediante la cultivación de dos microorganismos en el mismo recipiente, estos microorganismos son los encargados de llevar a cabo la fermentación de la glucosa y la pentosa.
Fermentación secuencial	La glucosa y la xilosa se someten a varias fermentaciones continuas en el mismo recipiente
Hidrolisis y fermentación separadas	Ambos procesos se efectúan por separados a condiciones de temperatura y pH idóneas. El principal problema se da en el proceso de hidrolisis, ya que la celulosa acumulada inhibe la función de la celulasa
Sacarificación y fermentación simultáneas	Se debe tener un control óptimo de la temperatura y la velocidad del proceso debido a que la fermentación es un proceso lento. En este método se requieren menos reactores y enzimas que en los métodos anteriores
Sacarificación y fermentación separadas	Se emplea una clostridia anaeróbica con el fin de producir enzimas que hidrolizan el sustrato, generando azúcares que posteriormente serán transformados en etanol
Otras opciones	Otra opción de obtener el etanol es mediante la fermentación alcohólica de las hexosas y las pentosas.

Fuente: [28]

Los distintos procesos de obtención de etanol son establecidos mediante algunos criterios de selección; estos dependen del tipo de hidrólisis, tipo de fermentación, y materia prima.

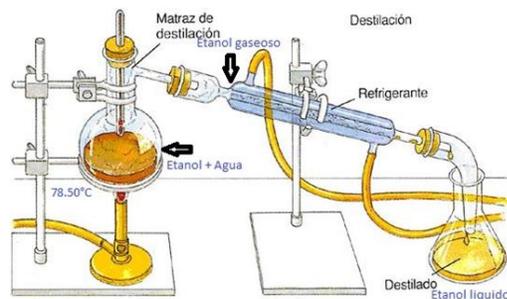
La fermentación alcohólica es realizada por hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Mucor* y *Fusarium* y, hongos unicelulares como levaduras. La fermentación se fundamenta bajo el ciclo de Krebs; “el ácido pirúvico derivado de la glucólisis es decarboxilado por el acetaldehído en una reacción catalizada por la enzima piruvato decarboxilasa y TPP (Tiamina pirofosfato); el acetaldehído es reducido a etanol por un alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD, resultando en la reoxidación del NADH₂ formado durante la glucólisis” [32].

Figura 8. Ciclo de Krebs

Fuente: [33].

- **Destilación**

Teniendo en cuenta que el punto de ebullición del etanol (78.3°C) es menor al del agua (100°C), se somete la biomasa a un calentamiento que genera la separación del etanol del agua debido a que se evapora primero [28]. Si este proceso es realizado varias veces se logra obtener un etanol con mayor grado de pureza.

Figura 9 Destilación simpleFuente: *Química orgánica* [34].

1.1.8 Microorganismos usados en la hidrólisis enzimática de la torta de higuera

- *Aspergillus niger*

“Es un hongo filamentoso haploide que se utiliza para el manejo de desechos y biotransformaciones además de sus usos industriales, como la producción de ácido cítrico y enzimas extracelulares. *Aspergillus niger* no solo es una especie de patógeno vegetal, sino un grupo del género *Aspergillus* que se compone de 15 variedades, todas con conidias negras”[33].

El hongo se localiza principalmente en el suelo en la vegetación y en hojas en descomposición. Tiene una gran variedad de huéspedes como uvas, cebollas, mangos, algunos granos entre otros, y raramente se encuentra en aves, mamíferos y humanos

“Su temperatura de crecimiento óptima es de 20-40 ° C, con un buen crecimiento a 37 ° C. Puede sobrevivir a 60 ° C, pero, por ejemplo, en jugos de frutas, puede eliminarse por exposición a 63 ° C durante 25 minutos. Además, puede crecer en ambientes de 90 a 100% de humedad relativa”[36].

Figura 10 Representación macroscópica de *Aspergillus niger*.



Fuente: Autores.

Rhizopus spp.

“*Rhizopus* es un hongo filamentoso cosmopolita que se encuentra en el suelo, frutas y verduras en descomposición, heces de animales y pan viejo. Mientras que *Rhizopus spp.* son contaminantes comunes, también son causas ocasionales de infecciones graves (y con frecuencia fatales) en los seres humanos”[37].

Los miembros de *Rhizopus* se utilizan para una gran variedad de aplicaciones como pueden ser la producción de ácido láctico y cortisona, la fermentación alcohólica, la adsorción de contaminantes químicos y la fabricación de ciertos ácidos [38].

Figura 11 Representación macroscópica de *Rhizopus* spp.



Fuente: Atlas de identificación micológica. [39].

***Trichoderma* spp.**

Se considera uno de los hongos cultivables más resistentes ya que esta presenta en la mayoría de los suelos y hábitat, además de poder crecer exitosamente en ambientes con contenido de pesticidas y otros químicos. Dada su gran tolerancia a condiciones extremas, su producción masiva ha sido uno de los aspectos en auge en el sector de la agricultura [40].

“Trichoderma tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos”[40].

“Este hongo toma nutrientes de los hongos que degrada y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostaje lo favorecen; requiere de humedad para poder germinar. La velocidad de crecimiento de este organismo es alta, por esto es capaz establecerse en el suelo rápidamente y controlar las enfermedades. Probablemente sea el hongo beneficioso, más versátil y polifacético que abunda en los suelos”[40].

Figura 12 Representación macroscópica de *Trichoderma* spp.

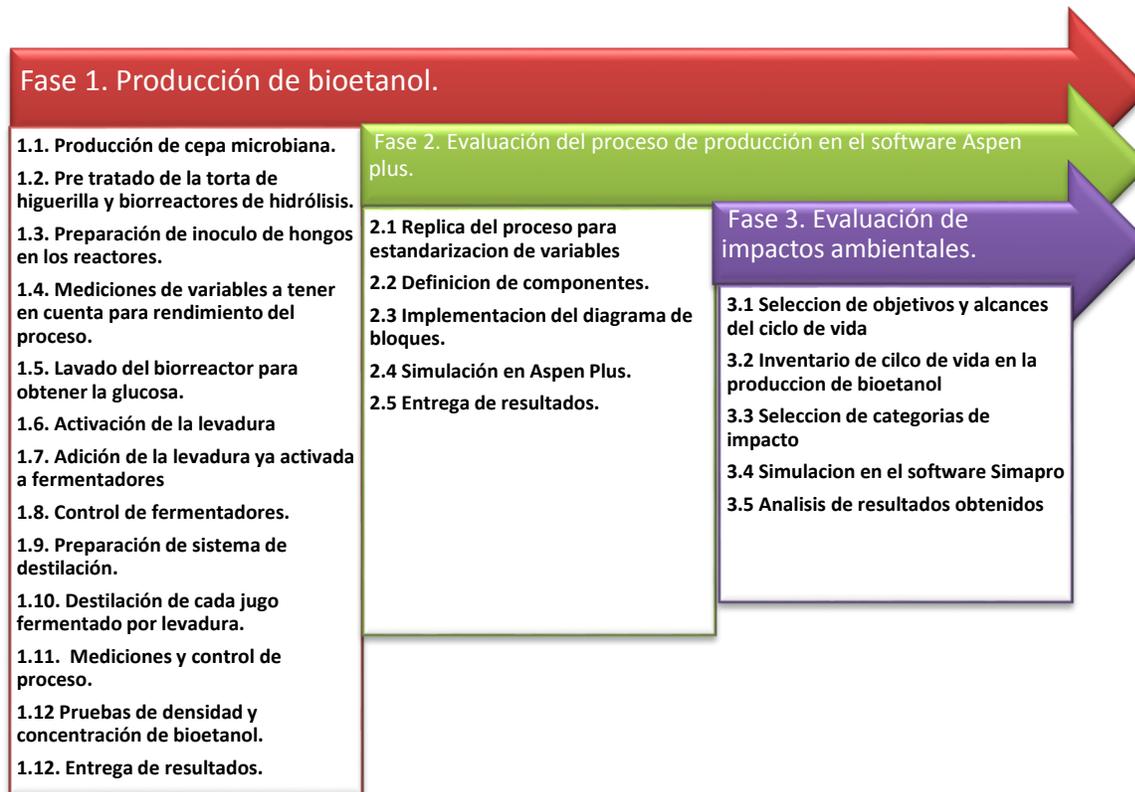


Fuente: Autores.

2. Metodología de investigación.

La metodología utilizada para lograr los objetivos planteados se presenta en la figura 13:

Figura 13 Metodología de la investigación.



Fuente: Autores

La anterior figura hace ilustración a los 3 procesos fundamentales para llevar a cabo la investigación. En la primera fase se llevan a cabo las diferentes acciones que permitirán dar cumplimiento a la producción de bioetanol. Esta fase que se denomina fase I comprende las actividades necesarias para la producción de bioetanol y sus procesos. Posteriormente viene la fase II que está denominada por la segunda actividad mostrada en esta figura. Esta fase consta de 4 actividades, que llevarán a dar cumplimiento al tercer objetivo específico de este proyecto de grado, la simulación del proceso de producción de bioetanol en el software Aspen Plus. La fase III está compuesta por cinco actividades y comprende temas de impacto ambiental. En esta fase se analizará un perfil de impactos ambientales y posteriormente se hará un análisis de los mismos.

3. Producción de bioetanol a partir del residuo del proceso de extracción de aceite de higuera.

La producción de bioetanol a partir de la torta de higuera (residuos) ha sido objeto de estudio por varios autores. Sin embargo, no se ha utilizado ninguno de los hongos a trabajar en este trabajo para hidrolizar la torta. Es decir, no se ha hecho uso de *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp. o *Trichoderma* spp. La torta de higuera requiere de un pretratamiento de hidrólisis, que se puede llevar a cabo de diferentes maneras. El primer objetivo específico se basa en encontrar la manera adecuada para la hidrólisis enzimática de forma en que se pueda obtener el mayor rendimiento. Los criterios serán la cantidad de líquido obtenido luego de la fermentación y su relación en cuanto a su concentración de bioetanol.

Por lo tanto, el primer paso es el aislamiento de la cepa de los tres hongos y posteriormente su réplica. Realizar el procedimiento de hidrolizado con cada uno, luego uno con los tres microorganismos juntos y luego un reactor de control, sin ningún hongo en su interior, para verificar entre otros parámetros, que el proceso de hidrólisis ocurre gracias a la enzima liberada por el hongo, y no por reacciones ajenas a esta.

3.1 Cultivo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp.

Gracias al cepario de hongos del CINBBYA, del cual se obtuvieron las cepas originales del *Aspergillus niger* y de *Trichoderma* spp., no fue necesario recurrir a medidas para encontrar el hongo. Sin embargo, *Rhizopus* spp., no se encontraba en el cepario por lo que fue necesario buscar en ambientes en donde el hongo muestra crecimiento. El hongo *Rhizopus* spp. muestra gran crecimiento en la fresa (*Fragaria* spp.) [37] por lo que se tomó una muestra del microorganismo en una de estas frutas en estado de descomposición.

El cultivo de los hongos se formó con el medio malta agar. Se realizó cultivo de hongos en cajas Petri, cada una con una adición de entre 2,5% a un 3% en relación v/v de la torta de higuera por lo que fue necesario calcular la densidad de la torta. Esta adición se realizó con el fin de facilitar la adaptación del microorganismo a un ambiente con torta de higuera.

Figura 14 Fresa con *Rhizopus* spp.



Fuente: Project Noah

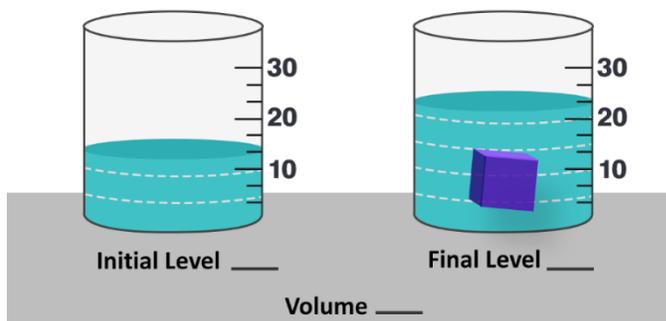
3.1.1 Método de adaptación de hongo a medio con torta de *Ricinus communis*

Para medir la densidad de la torta se utilizó el método para medir densidad de sólidos irregulares por desplazamiento de agua. Es decir, se aplicó la ecuación (Ec. 2) que expresa que la razón entre la masa y el volumen es igual a la densidad. Se utilizó como masa una muestra de 2 gramos de torta de higuera, y el volumen fue calculado por diferencial de volúmenes así:

$$v_{torta} = v_{final} - v_{inicial} \quad Ec. 1$$

Se midieron 5 mL de H₂O destilada ($v_{inicial}$), se le añadieron 2 gramos de torta y por diferencial de volúmenes se midió el volumen de la torta de higuera.

Figura 15 Diferencial de volúmenes.



Fuente: ScienceStruck

La prueba se realizó tres veces obteniendo los siguientes datos:

Tabla 11 Datos de diferencial de volúmenes

PRUEBA	Volumen final [mL]	Volumen de torta [mL]
1	6,7	1,7
2	6,7	1,7
3	6,8	1,8

Con valor de volumen de torta de 1,7333 mL, se calculó la densidad de la semilla por medio de la razón entre la masa y el volumen seleccionado para la prueba:

$$d_{torta} = \frac{m_{muestra}}{v_{torta}} \quad \text{Ec. 2}$$

Así la densidad de la torta dio como resultado 1,1538 gramos por mililitro. Con este valor se calculó cuanto debía ser la cantidad de torta añadida a cada caja Petri, teniendo en cuenta que hay aproximadamente 25 mL de medio por cada caja por lo que la relación de cuanto masa se debe añadir quedo de la siguiente manera:

$$m_{tcp} = v_{cp} * [C_{tcp}] * d_{torta} \quad \text{Ec. 3}$$

Teniendo que v_{cp} es el volumen en mililitro por caja Petri, $[C_{tcp}]$ es la concentración de torta por caja Petri expresada en valor numérico, se tiene que:

$$m_{tcp} = 25 [ml] * 0,025 * 1,1538 \left[\frac{g}{ml} \right] = 0,721125 [g]$$

Con esto y con el fin de mantener valores fijos, se calculó el mismo valor, pero con concentración del 3% y se promedió, para mantener adaptación hacia un buen crecimiento del hongo. Por lo tanto, se añadió a cada caja Petri 0,8 gramos de torta de higuera.

Se prepararon un total de 30 cajas petri, de tal forma que se pudieran obtener 10 cajas por hongo. Para añadir la torta a las cajas petri, esta se pesó en empaques de papel aluminio, y en un recipiente de material similar cubierto con papel aluminio. Se pasó por autoclave para garantizar que la torta añadida a cada caja Petri estuviera desinfectada. Posterior al proceso de autoclave del medio y de la torta, esta se añadió a cada caja Petri y consecutivamente el medio. El resultado de la caja es mostrado en la figura 16.

Luego de seleccionar la cepa original de *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp y *Rhizopus* spp., se procedió al cultivo de estos, empezando por *Trichoderma* spp., pasando por *Rhizopus* spp. y posteriormente *Aspergillus niger*. Se realizó siembra por técnica de incorporación con asa de punta recta de hongos filamentosos. Las cajas se introdujeron en incubadora para garantizar temperatura óptima para su crecimiento que esta alrededor de los 28°C. El periodo de crecimiento y adaptación tardó alrededor de 3 semanas. Cabe resaltar que no todas las cajas crecieron correctamente, pues el tiempo de adaptación fue distinto en todos los hongos.

Figura 16 Caja petri con medio malta agar higuera



Fuente: Autores

Posteriormente se replicó de nuevo la siembra, esta vez con mayores consideraciones en cuanto a la seguridad del cultivo. Se realizaron otras 30 cajas Petri, y se pudo observar que el crecimiento necesitó de menor tiempo. La hipótesis más acertada, es que el hongo que se tomó como original, es el mismo hongo ya adaptado al medio con contenido de torta. Por lo tanto, su entorno de crecimiento, al ser de características similares, facilitó su crecimiento.

3.2 Proceso de hidrólisis enzimática de la torta de higuera (*Ricinus communis*)

Para llegar a un proceso adecuado de hidrólisis enzimática fue necesario realizar varias pruebas preliminares, encontrando en cada una de ellas, nuevos factores a tener en cuenta. Sin embargo, se muestra un proceso que se encontró adecuado, por factores que favorecen el crecimiento del hongo, tales como cantidad de luz, salida de lixiviado, y que se contara con ausencia de bacterias. En las primeras pruebas realizadas, se obtuvieron resultados poco favorables, en donde se presentaba un olor fétido, producto de contaminación de la torta. El tiempo de hidrólisis además tardaba alrededor de 15 días y no con los resultados esperados. Procesos como la inoculación del hongo, o el lavado en la etapa final, afectaban en gran manera estos procedimientos. No obstante, fue gracias a estos resultados que se pudo llegar a un proceso adecuado.

3.2.1 Diseño y pretratado de biorreactores y de torta de higuera (*Ricinus communis*)

El proceso, al hacer uso de hongos filamentosos para el procedimiento de hidrólisis enzimática, debe garantizar un ambiente libre de bacterias. Es por esto que se debe hacer un pretratado de cada biorreactor y de la torta de higuera.

El proceso de hidrólisis es un proceso independiente de reacciones calóricas o que requieran de un diseño riguroso de biorreactores, por lo que en este proyecto solo se

tomaron en cuenta, las necesidades básicas para que el microorganismo pueda crecer. Esto hace referencia a flujo de aire, salida de lixiviados y ausencia de bacterias. El recipiente se muestra en la figura 17. En pruebas realizadas previamente, el tamaño de la torta causaba un taponamiento a la salida dispuesta para los lixiviados por lo que fue necesario realizar unas barreras con una malla fina. Esta permite el paso del líquido, pero no de los sólidos suspendidos en el mismo. El biorreactor se esterilizó con agua destilada a 100°C de tal forma que se pueda eliminar un gran número de bacterias presentes en el biorreactor.

Figura 17 Biorreactor para hidrólisis enzimática.



Fuente: Autores

Figura 18 Esterilización de torta



Fuente: Autores

Cada biorreactor contenía 1000 gramos de torta de higuera, pero esta debió ser pretratada para eliminar sus bacterias. Por lo tanto, se hirvió en baño de maría, de forma tal que se garantizara la mayor esterilización de la torta.

3.2.2 Inoculación de hongos filamentosos en los biorreactores de hidrólisis

El procedimiento se realizó por medio del lavado de las cajas Petri seleccionadas, en total 7 por cada hongo filamentosos. Se prepararon 5 recipientes, cada uno con 1000 mL de cloruro sódico al 85% y se pasaron por autoclave para su esterilización. Con este líquido se realizó el lavado de las respectivas cajas Petri.

Al final se adicionó la torta a cada biorreactor y se le agregó 1000 mL de la solución. Posteriormente, se cubrió con papel aluminio para limitar la cantidad de luz que entraba a los biorreactores, y mejorar su seguridad microbiana. Se le puso la entrada de aire con una bomba de aire, cuyo flujo nominal es de 1.5 L/min. La cantidad de aire se suministró en jornadas de 12 horas para disminuir el consumo de energía. El montaje del biorreactor se puede evidenciar en la figura 19:

Figura 19 Montaje de biorreactor para la hidrólisis enzimática.



Fuente: Autores

Para determinar la concentración del inoculo, se realizó conteo microbiano en cámara de Neubauer tomando una muestra de 1 μL de cada solución obtenida luego del lavado. El método consiste en el conteo de las células de 5 retículos (cuadros de la cámara) indicados por el procedimiento. Luego se debe calcular el promedio del conteo y por último se aplica la fórmula que la técnica de conteo en cámara de Neubauer sugiere.[41]

Los resultados se anexan en la siguiente tabla, junto con la ecuación (Ec.4), por medio de la cual, se calculó la concentración:

$$\#cel/ml = Cc * 25 * 10000 \quad \text{Ec. 4}$$

Siendo Cc el promedio de los 5 cuadros contados.

Tabla 12 Concentración de hongo en el inóculo de cada biorreactor de hidrólisis

HONGO	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración [Cell/ml]
	1	2	3	4	5			
<i>Aspergillus niger</i>	7	7	5	8	11	7,6	1	1,9000E+07
<i>Trichoderma spp</i>	32	29	31	23	27	28,4	0	7,1000E+06
<i>Rhizopus spp</i>	42	59	45	35	43,5	44,9	0	1,1225E+07

Lo que se observa en las casillas de retículo en la tabla 12, es la cantidad de células en cada retículo. Antes de sellar con parafina cada reactor, se tomaron 6 gramos para realizar mediciones de pH, glucosa y celulosa. Estas variables definen el tiempo adecuado para el proceso de hidrólisis.

3.2.3 Control del proceso de hidrólisis enzimática, mediciones de pH, celulosa y glucosa.

Para realizar la toma de datos, fue necesario hacer uso de la cámara de seguridad biológica. Esto para que el ambiente en donde se abre el biorreactor se mantenga con ausencia de bacterias necesarias y no se contamine el biorreactor.

El control del proceso se realizó midiendo la celulosa y la glucosa presente en la torta. En el día 1 (día del inóculo) se realizó la primera medición de control tanto de glucosa como de celulosa. Posteriormente se realizaron medidas cada 3 días, para las 3 variables de cada reactor. Se determinó la celulosa por el método de *Kurschner y Hoffer* [42]. Se tomó un gramo de materia anhidra, se colocó en un matraz, se le añadió 20 mL de etanol y 5 mL de ácido nítrico concentrado. El montaje para medición de la celulosa se sugiere como en la figura 20.

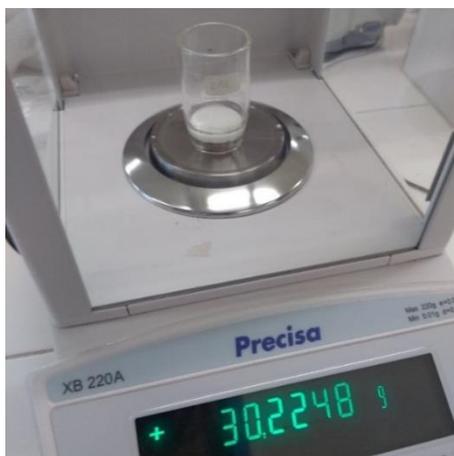
Figura 20 Montaje para medición de celulosa por el método de Kurschner y Hoffer.



Fuente: Autores

Se hirvió en baño María a reflujo durante 30 minutos. La solución se pasó por un filtro Gooch de porosidad media y peso conocido como el que se muestra en la figura 21.

Figura 21 Filtro Gooch de porosidad media.



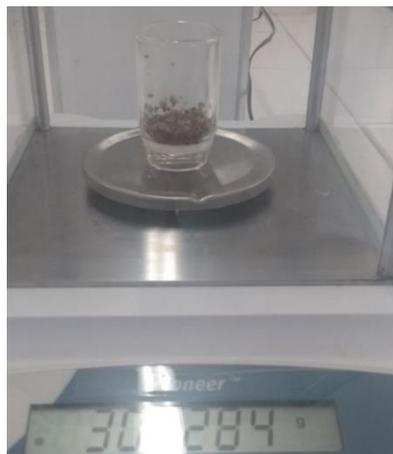
Fuente: Autores

El sólido se sometió a una segunda digestión con 20 mL de etanol y 5 mL de ácido nítrico durante 30 minutos. Luego de esto, se realizó una decantación como en el proceso anterior. El líquido de residuo se desechó, aislándose en recipientes de vidrio y con tapa cerrada, pues no se puede arrojar el material a cañería debido a su alto riesgo de contaminación. Su tratamiento, fue encargado a entidades correspondientes.

Se realizó una tercera digestión con 100 mL de agua destilada por una hora. La muestra se filtró en el Gooch, se lavó con agua destilada caliente y posteriormente con 100 mL de solución saturada de acetato de sodio. Por último, con 250 mL de agua destilada caliente.

El filtro Gooch con el residuo se pasó por horno eléctrico a una temperatura de $105 \pm 3^\circ\text{C}$, para luego enfriar en un desecador de cristal sobre sílica gel y finalmente pesarse [42]. El proceso de digestión y filtrado tarda alrededor de 4 horas. La figura 22 muestra el filtro Gooch luego del proceso, y el peso final del mismo:

Figura 22 Filtro Gooch luego de medición de celulosa.



Fuente: Autores

El porcentaje de celulosa se calcula con la siguiente relación:

$$\text{Celulosa} [\%] = \frac{P_{QR}}{P_Q} * 100 \text{ Ec. 5}$$

Donde P_{QR} es el peso seco del residuo [g] y P_Q es el peso anhidro de la muestra [g]. Como ejemplo de cálculo se realizará el de una muestra de torta, sin ningún tipo de tratamiento de hidrólisis. Esto para demostrar además el contenido celulósico de la torta de forma experimental. El peso inicial del filtro Gooch como se muestra en la figura 21 fue de 30,2248 gramos. El peso final como se muestra en la figura 22 es de 30,8232 gramos Teniendo así que el peso seco del residuo es la diferencia entre estos dos valores[42]. El peso anhidro de la muestra es de 1 gramo, dando un valor de porcentaje de celulosa:

$$\text{Celulosa} [\%] = \frac{(30,8232 - 30,2248) [g]}{1 [g]} * 100 = 59,84\%$$

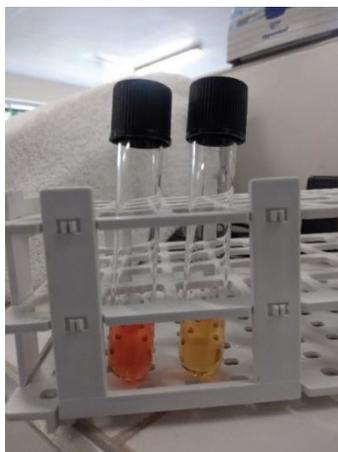
Con este valor no solo se demuestra la cantidad de celulosa que contiene la torta, sino que también concuerda con los datos mostrados en el marco teórico del presente proyecto.

Para medir la glucosa libre se utilizó método de espectrofotometría. Para esto fue necesario hacer uso del paquete de reactivos para medición de glucosa. Se siguieron las instrucciones para uso del reactivo que sugiere el proveedor del paquete de reactivos (BioSystems).[43]

Para calcular la glucosa se necesitó de tubos de ensayo, espectrofotómetro, pipetas automáticas para toma de muestras pequeñas, y pipetas de 5 mL para tomar muestras de reactivo.

Primero es necesario realizar calibración del espectrofotómetro. Se deben tomar 3 mL de reactivo y ponerlos en tubos de ensayo. Se deben tomar 2 tubos de ensayo y agregar 3 mL de reactivo a cada uno. Solo a uno se le agrega 30 μ l del patrón y otro con solo los 3 mL de reactivo que se conocerá como blanco. Posteriormente se pasa la muestra blanco por el espectrofotómetro. Esto para configurar el punto 0 de espectrofotometría, es decir una solución libre de glucosa.[43] El patrón y la muestra blanco se muestran en la figura 23.

Figura 23 De izquierda a derecha, muestra patrón y muestra blanco.



Fuente: Autores

Luego de configurado el punto 0, se pasa la muestra del patrón y su valor hará referencia a una solución con un contenido de 100 mg/dL glucosa. El valor de espectrometría dio de 0.500 nm. Para medir la glucosa libre hay en la torta se debe tomar una muestra de 5 gramos, se le añaden 25 mL de agua destilada y se agita mecánicamente durante 30 minutos. La muestra se pasa por papel filtro. [44] Se toma 30 μ L de la muestra filtrada y se agrega al tubo de ensayo con 3 mL de reactivo de glucosa. Se agita el tubo de ensayo y se deja actuar durante 10 minutos. Posteriormente se pasa la muestra por el espectrofotómetro. Al igual que con la celulosa, se realizó este procedimiento con la torta sin ningún procedimiento de hidrólisis para determinar la concentración inicial de glucosa libre.

Para calcular el porcentaje de celulosa se utiliza la siguiente ecuación:

$$C_{muestra} = C_{patron} * \frac{A_{muestra} [nm]}{A_{patron} [nm]} \text{ Ec. 6 [43]}$$

Entiéndase como $C_{muestra}$ como la concentración de glucosa de la muestra, C_{patron} como la concentración del patrón siendo de 100%; $A_{muestra}$ como la absorbancia de la muestra y A_{patron} como la absorbancia del patrón siendo esta última de 500 nm. Así, y tomando como ejemplo la absorbancia de una muestra sin ningún tratamiento, la concentración se calcula de la siguiente manera:

$$C_{muestra} = 100\% * \frac{0,005[nm]}{500 [nm]}$$

0,005 nm equivale a la absorbancia de la muestra sin tratamiento alguno.

El pH se midió por medio del kit de tiras de pH. Esta medida va de la mano con la toma de datos de glucosa, pues se mide pH con la solución que se forma luego de los 30 minutos de agitación. Para realizar la medición simplemente se introduce una tira medidora de pH, y se deja actuar por 10 segundos. Posteriormente se analiza el color y se compara con la escala que tiene el empaque del kit para determinar el grado de acidez de la muestra. [43]

3.2.4 Lavado del biorreactor y obtención de jugo rico en azúcar libre (glucosa)

Después de obtener la glucosa libre, se procedió a realizar el lavado de la torta de cada biorreactor. Se prepararon 5 litros de solución salina que fueron pasados por autoclave. Seguidamente el biorreactor de hidrólisis se abrió en un área estéril por mecheros de laboratorio, y se le administró 1 litro de solución salina a cada biorreactor.

El lavado se realizó de forma manual, es decir, agitando de forma suave la torta contenida en el biorreactor para que se pudiera obtener el mayor jugo de la torta ya hidrolizada. Cabe resaltar que todos los instrumentos utilizados para este procedimiento estaban debidamente estériles. El jugo procedente de cada reactor se introdujo en otros recipientes, que, junto con la adición de levadura ya activada, funcionaron como recipiente fermentador.

3.3 Proceso de fermentación con levadura del género *Saccharomyces cerevisiae*

El primer paso fue activar la levadura. Esta activación se realizó por medio de agitación mecánica con un flujo de aire de 1.5 L/min. Se utilizó levadura seca instantánea dulce comercial marca *Fleischman*. Se sugiere que, para preparar 1000 ml de solución con levadura, se deben utilizar 17 gramos de levadura, sin embargo, se prepararon 800 ml de agua destilada estéril y se le añadieron 13,6 gramos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se adicionó a un recipiente que se esterilizó previamente con agua a temperatura ambiente y se le puso el flujo de aire para iniciar la activación. La fermentación, debe ser una fermentación de tipo anaerobia, esto para que las reacciones sean de una fermentación alcohólica.

3.3.1 Activación de la levadura del género *Saccharomyces cerevisiae*.

La activación de la levadura se determinó por la concentración de células presentes en una muestra aleatoria. Es por esto que se aplicó contenido microbiano en cámara de Neubauer todos los días en un periodo de 24 horas para determinar el tiempo de activación de la levadura y la forma en que esta ocurría. Se tomó una muestra de 10 µl y se pusieron en la cámara de Neubauer para su posterior conteo. Sin embargo, se observó que había una gran cantidad de células presentes por lo que fue necesario realizar diluciones con 90 µl de agua destilada.

3.3.2 Adición de levadura activada a jugo rico en azúcar libre (glucosa)

Luego de obtener el jugo rico en glucosa y ponerlo en recipientes estériles, se les adicionó 250 ml de solución con levadura activada. Y posteriormente se selló y se dejó reaccionar durante 4 días.

Para determinar el tiempo de reacción se tomó una muestra de la solución en cada fermentador y se pasó por papel filtro. A esta muestra se le aplicó la técnica de medición de glucosa y cuando la cantidad de glucosa hubiera disminuido lo suficiente, se pasó al proceso de destilación.

3.4 Proceso de destilación de solución post- fermentación

Para el proceso de destilación se realizó un montaje en el laboratorio como el que se muestra en la figura 24, en donde se tiene un matraz que lleva en su interior bolas de gel sílica para disminuir la formación de espuma, una trampa de vapor que conecta el condensador y el matraz, un termómetro que permita verificar la temperatura de los vapores en la trampa. La temperatura manejada de los vapores debía rondar los 80°C esto debido a que esta es la temperatura de evaporación del etanol, y teniendo en cuenta que el objetivo era obtener bioetanol y no agua u otros productos que se obtienen a temperaturas mayores.

Figura 24 Montaje de destilación



Fuente: Autores.

Para determinar por cuánto tiempo se iba a destilar, se realizó un conteo de la frecuencia a la que salía líquido destilado. Cuando esta frecuencia estuviera muy alejada de la inicial, es decir, que salga menos líquido destilado, se detendrá el proceso de destilación. Esto porque si la frecuencia de goteo del destilador en gotas por minuto es muy baja con respecto a la inicial, da a entender que la concentración de bioetanol en el líquido post-fermentador es baja. Por lo tanto, no tiene sentido continuar con el proceso de destilación.

3.5 Medición de concentración de etanol en producto destilado

La concentración de destilado se midió bajo lineamientos de la norma NTC 336 grasas y aceites animales y vegetales. Método de la determinación de la densidad (masa por volumen convencional). Esta norma es equivalente a la ISO 6883:2000[45].

El primer paso fue la calibración del picnómetro. Como no se conoce el coeficiente medio de expansión cúbica, es necesario realizar calibración a temperaturas cercanas a los 20 y a los 60°C. Primero se debe pesar el picnómetro con su tapón esmerilado, limpio y seco. Se toma la medida y posteriormente se llena con agua destilada a 20°C. Se lleva a baño de agua durante 60 minutos. Posteriormente se registra la temperatura del picnómetro y se pesa el picnómetro lleno con el tapón esmerilado. Como el valor del coeficiente medio de expansión cúbica γ es desconocido, se repite el mismo procedimiento, esta vez con una temperatura cercana a los 60°C.[45]

Se utiliza la ecuación para calcular el volumen del picnómetro a la temperatura de calibración θ_c que sugiere la NTC 336. [45]

$$v_c = \frac{m_1 - m_0}{\rho_w} \text{ Ec. 7}$$

Donde v_c es el volumen del picnómetro a la temperatura de calibración θ_c ; m_1 es la masa del picnómetro lleno con agua en gramos; m_0 es la masa del picnómetro vacío en gramos y ρ_w es la densidad del agua en gramos por mililitros, a la temperatura θ_c de calibración (se tomó de la tabla 1 de la norma NTC 336). El coeficiente medio de expansión cubica del picnómetro se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{V_{c_2} - V_{c_1}}{V_{c_1}(\theta_2 - \theta_1)} \text{ Ec. 8}$$

Donde γ es el coeficiente medio de expansión cubica del picnómetro de vidrio, en grado Celsius a la potencia menos uno; V_{c_2} es el volumen en mililitros del picnómetro a la temperatura de calibración θ_2 ; V_{c_1} es el volumen en mililitros del picnómetro a la temperatura de calibración θ_1 ; θ_1 es la temperatura cercana a 20°C a la cual el picnómetro fue calibrado, en grados Celsius; θ_2 es la temperatura cercana a 60°C a la cual el picnómetro fue calibrado, en grados Celsius.[45]

Este valor sirve para determinar el volumen del picnómetro a temperaturas desconocidas. La ecuación para determinar ese volumen es la siguiente:

$$v_d = v_c[1 + \gamma(\theta_d - \theta_c)] \text{ Ec. 9}$$

Donde v_d es el volumen en mililitros del picnómetro a la temperatura θ_d que es la temperatura a la cual se desea conocer el volumen del picnómetro, en grado Celsius. La densidad de la muestra, en este caso la de destilado se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\rho_\theta = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta) \text{ Ec. 10}$$

Donde ρ_θ es el valor de la densidad en gramos por mililitro; m_3 es la masa en gramos del picnómetro lleno con la muestra de ensayo a temperatura θ . Como se desconoce el valor de k que es el cambio medio de densidad del etanol, la temperatura θ de la muestra y la temperatura θ_d de determinación de volumen del picnómetro, deben ser iguales.

Posteriormente el valor de densidad es comparado con la tabla del anexo 1 en donde se muestra la concentración de etanol en una muestra, en función de la densidad. Esta tabla fue tomada de LD Didactic GmbH.[46]

3.6 Réplica del proceso de producción de bioetanol

Para simular el proceso es necesario realizar réplicas de la producción de bioetanol. Sin embargo, hay que resaltar que se contaron con inconvenientes para el proceso de réplica, pues el crecimiento de los microorganismos se vio lleno de inconvenientes debido a problemas en la incubadora del laboratorio. Como resultado, la contaminación de los medios de cultivo. Sin embargo, se lograron obtener las cajas petri necesarias para replicar el proceso de producción.

Se replicó el proceso de producción por la vía de hidrólisis enzimática por medio de *Aspergillus niger* 1 vez y 2 veces por medio de hidrólisis vía *Trichoderma* spp. Esto debido a que *Trichoderma* spp. Mostró la mayor concentración de glucosa registrada en todas las mediciones realizadas, y en el menor tiempo, por lo que la eficiencia es mayor (Véase Gráfica 10). La metodología para su proceso de producción fue buscando la mayor similitud en cuanto al proceso de inoculación y de producción vía fermentativa, esta vez, teniendo en cuenta los detalles de tiempo de hidrólisis y de fermentación.

3.6.1 Réplica (I) por hidrólisis enzimática de *Trichoderma* spp.

Para el proceso de hidrólisis se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.2. Se diferenció la medición de la concentración de glucosa cada 24 horas y, de celulosa al inicio y al final del proceso de hidrólisis. Al tratarse de microorganismos es complicado manejar la misma concentración de inóculo que se aprecia en la tabla 12, pues la concentración así se realice con la misma cantidad de líquido de lavado o de cajas petri, no depende de estas variables, sino de otros factores, ya que se trata de microorganismos con vida propia que tienen crecimiento impredecible. Es por esto, que teniendo en cuenta la concentración de inóculo de *Trichoderma* spp. de $7.10E+6$ células por mililitro, se tuvo un margen de $\pm 1E+6$ [Cell/mL], partiendo de la misma cantidad de cajas petri.

Los métodos para la medición de las variables fueron las mismas descritas en el apartado 3.2, tanto para glucosa como para celulosa. El periodo de hidrólisis fue realizado teniendo en cuenta que para la prueba anterior después de pasados 4 días, la concentración de glucosa había llegado a su punto pico. Es decir, el periodo de hidrólisis debía ser de máximo 6 días.

En búsqueda de la uniformidad del proceso, el lavado se realizó según el apartado 3.2.4 usando 1 litro de solución salina con concentración del 85%, y bajo la misma metodología.

3.6.2 Réplica (II) por acción enzimática de *Trichoderma* spp.

Al igual que en la réplica (I) de *Trichoderma* spp., los métodos de medición de celulosa y glucosa son los mismos descritos en el apartado 3.2.

El día de inoculación (día 0) y el día 1 se tomaron mediciones de celulosa y glucosa; debido a que el día 1 fue viernes y por limitantes en la disponibilidad del laboratorio los días sábado y domingo no se realizaron mediciones esos días. El día 4 se realizó solo medición de glucosa. El día 5 se realizaron las últimas mediciones de celulosa y glucosa debido a que el reactor se contaminó; el día 6, el cual debió ser el día de lavado, si se toma en cuenta el comportamiento de *Trichoderma* spp. en la réplica (I), no se aplicó ya que el reactor presentaba altos signos de putrefacción y por ende se descartó.

Esta réplica se realizó con la misma cantidad de cajas Petri (7) para tratar de mantener condiciones similares a las de la inoculación descrita en el apartado 3.2.2.

3.6.3 Réplica (III) por hidrólisis enzimática de *Aspergillus niger*

La hidrólisis enzimática producto de *Aspergillus niger* es más lenta, según se comprobó en los resultados del proceso por este microorganismo. Por lo tanto, se realizó medición de glucosa en el día 2 que fue un viernes y el lunes por efectos de disponibilidad de laboratorio. Conociendo que se llegó a un punto alto de concentración de glucosa pasados 7 días en la primera prueba realizada, se realizaron mediciones con un periodo de 48 horas. Esto, buscando obtener el punto óptimo para el lavado del biorreactor. De igual manera para la concentración se realizó el lavado con 7 cajas Petri de hongo ya maduro, es decir, buscando una concentración similar. En cuanto a la celulosa, se midió su concentración en el día 0 (día de inóculo) y día 7(día de lavado).

Los métodos para medición de celulosa y glucosa son las mismas descritas en el apartado 3.2. El lavado se realizó de la manera descrita en el apartado 3.6.1.

3.6.4 Réplica de proceso de fermentación

Como en el apartado 3.3 para llevar a cabo el proceso de fermentación, es necesario realizar la activación de la levadura, y adicionar a los fermentadores. El proceso se llevó a cabo con las mismas características, a diferencia que la levadura se activó hasta que se obtuvo una concentración en un punto óptimo. Es decir, en la activación pasada de la levadura se observó el comportamiento de la concentración en su periodo de activación, dando como resultado un pico pasadas las 72 horas de la preparación del jugo fermentativo(ver grafica 11). Tomando este periodo de activación como referencia, se dejó activar por este mismo tiempo, y se detuvo la activación, llevándose a temperaturas por debajo de 10°C para mantener esos niveles de concentración. La cantidad de levadura agregada fue de 200 mL a cada jugo post hidrólisis, para así iniciar el proceso de fermentación.

En estas replicas se mejoró el proceso de fermentación llevándose a un punto de temperatura óptimo de 37°C [47]. El tiempo de residencia del fermentador en la incubadora fue de 4 días.

3.6.5 Réplica del proceso de destilación

Como resultados del proceso de destilación se obtuvo un periodo de destilación de 4 horas, hasta donde su frecuencia de destilado disminuía notablemente, por lo que este periodo es el que se tuvo en cuenta para la destilación del líquido post-fermentación.

Las mediciones de densidad y de la concentración de etanol fueron realizadas de la misma manera que se plantea en el apartado 3.5.

3.7 Análisis elemental de residuo sólido post hidrólisis

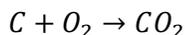
Este análisis se desarrolló con el fin de buscar que el residuo pueda funcionar como posible abono luego de un tratamiento. Es por esto que se realizó el análisis elemental, siguiendo los requerimientos para que un compuesto sólido orgánico sea considerado como abono orgánico según la norma NTC 5167 [48]. Entre los criterios que la norma exige, está el contenido de carbono orgánico total (mínimo 15%), N, P₂O₅ y K₂O totales (declararlos si cada uno es mayor de 1%). [48]

3.7.1 Análisis de carbono orgánico total

Para este análisis se siguieron los pasos descritos por medio de la NTC 5403 para determinar la cantidad de carbono orgánico. El método utilizado fue el método de oxidación húmeda que allí se describe.[49] La muestra es digerida por dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) para oxidar el carbono orgánico presente:



El dicromato de potasio se oxida en medio ácido, en este caso el ácido sulfúrico (H₂SO₄), la cantidad gastada en la oxidación de la materia orgánica formada en el proceso Cr₂(SO₄)₃ y oxígeno que reacciona, oxidando el carbono de la materia orgánica



Los reactivos utilizados para realizar esta medición son los siguientes:

- Solución estándar de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)
- 250 mL de agua destilada
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado
- 0.25 gramos de la muestra

Primero se tomaron 0.25 gramos de muestra (residuo sólido post hidrólisis) previamente secada en un horno durante una hora a temperatura de ±40°C y se trituraron en un mortero de laboratorio. Posteriormente se agregaron 250 mL de agua destilada a un recipiente con tapa, y se le adicionó 5 mL de solución estándar de dicromato de potasio. Se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se le agregó los 0.25 gramos de muestra. Se agitó débilmente y se le adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico. Se agitó suavemente durante 30 segundos y se dejó reposar por 16 horas. Posteriormente se tomó una muestra de la solución sobrenadante, y se pasó por las celdas foto-colorimétricas para posteriormente medir su concentración en el espectrofotómetro con longitud de onda de 585 nm.[49]

3.7.2 Análisis de fósforo total

El fundamento del método según el fabricante del kit es el siguiente:

“Este método se basa en que, dentro de una solución sulfúrica, los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato para formar ácido molibdofosfórico. El ácido ascórbico reduce esto a fosfomolibdeno Azul (PMB) que se determina fotométricamente. El método es análogo a EPA 365.2 + 3, APHA 4500-P E y DIN EN ISO 6878” [50].

Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes:

- Reactivo del kit P-1K
- Reactivo del kit P-2K
- Reactivo del kit P-3K

Adicionalmente se necesita un casquillo verde medidor de dosis para el reactivo P-1K y un casquillo azul medidor de dosis para el reactivo P-3K.

Inicialmente se toma una muestra de 1ml y se le adiciona 1 dosis del reactivo P-1K y se calienta a 120 °C por 30 minutos. Posteriormente se toma la muestra y se le agrega 5 gotas del reactivo P-2K y una dosis del reactivo P-3K, se agita y se deja reaccionar por 5 minutos. Se debe tener en cuenta que si la medición supera los 25.0 mg/l de $PO_4 - P$ se necesita realizar una dilución agua destilada, además el pH debe estar entre 0,8 y 0,95.

3.7.3 Análisis de potasio total

El fundamento del método según el fabricante del kit es el siguiente:

“El método utilizado es el turbidimétrico el cual se basa en que, en una solución alcalina, los iones de potasio reaccionan con Kalignost® (tetrafenilborato de sodio) para formar un precipitado ligeramente soluble. La turbidez resultante se mide en el fotómetro” [51].

Los reactivos que se usan son:

- Reactivo del kit K-1K
- Reactivo del kit K-2K

El procedimiento cambia según el catálogo utilizado. Según el catálogo 114562, inicialmente se toma una muestra de 2 ml a la cual se le adiciona 6 gotas de reactivo K-1K y una micro cucharada de reactivo K-2K, posteriormente se agita la mezcla y se deja reaccionar por 5 minutos. El procedimiento según el catálogo 100615 es prácticamente el mismo, solo varía en que la muestra debe ser de 0,5 ml. Si la medición pasa del rango de medición de cualquier catálogo, se requiere realizar una dilución con agua destilada, además el pH de la muestra debe estar entre 10 y 11,5.

3.7.4 Análisis de nitrógeno total

El fundamento del método según el fabricante del kit es el siguiente:

“Los compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno se transforman en nitratos. Por el método de Koroleff por tratamiento de un oxidante como termorreductor. Estos nitratos en

solución sulfúrica concentrada forman con un derivado de ácido benzoico un nitrocompuesto rojo que se determina en fotómetro.” [52]

La disgregación es análoga en DIN EN ISO 11905-1. Los reactivos utilizados para realizar esta medición son los siguientes:

- Reactivo del kit N-1K
- Reactivo del kit N-2K
- Reactivo del kit N-3K
- Cubeta de reacción del kit
- 1 mL de muestra preparada
- 9 mL de agua destilada

Para la disgregación se prepararon muestras líquidas del residuo post hidrólisis. Se tomó 1 mL de esta, y junto con 9 mL de agua destilada, se pipeteó en una cubeta vacía y se agitó. Luego se le añadió una microcucharada del reactivo N-1K y se mezcló. Posteriormente se le agregaron 6 mL del reactivo N-2K y se mezcló. Luego se calentó la cubeta durante 1 hora a 120°C en un termostato precalentado. Se dejó enfriar a temperatura ambiente en un soporte de tubos de ensayo, se dejó reposar para luego tomar una muestra. [52]

Para la muestra de medición se tomó una cubeta de reacción del kit y se le agregó 1 microcucharada del reactivo N-3K. Se le agregó 1 mL de la muestra disgregada y enfriada. Se dejó en reposo por 10 minutos y se mide en el fotómetro. La imagen de las cubetas de reacción (medición para N, K y P) y el tubo de ensayo con la muestra sobrenadante de la medición del COT está en la siguiente imagen:

Figura 25 De izquierda a derecha: tubo de ensayo con muestra sobrenadante (medición de COT), cubeta de reacción para nitrógeno, cubeta de reacción para fosfatos y cubeta de reacción para potasio.



Fuente: Autores.

3.8 Análisis de cromatografía

Este análisis fue patrocinado por el CINBBYA y se realizó en el centro integrado de laboratorios de ingeniería química de la UIS (CILIQ). La muestra se sometió a centrifugación durante 15 minutos a 5500 rpm en una centrifuga marca Thermo, modelo Heraus Megafuge 16, luego se pasó a través de filtros jeringa de 0.45 μm hasta tener 0.9mL; al sobrenadante filtrado. Esta se sometió a centrifugación nuevamente bajo las mismas condiciones y el sobrenadante resultante se llevó para análisis GC/FID.

Para observar las condiciones cromatográficas, patrones, el reporte de resultados y cromatogramas entregados por el laboratorio, ver anexo 5.

4. Resultados de producción de bioetanol

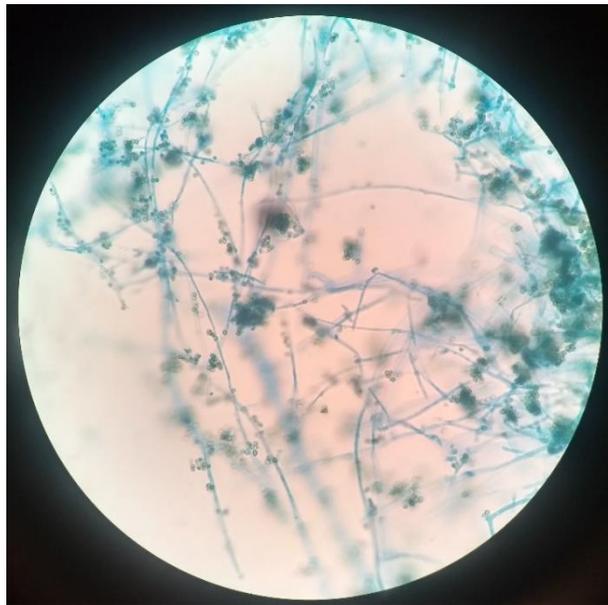
Los resultados se presentan en el orden en el que la metodología fue planteada.

4.1 Resultados del cultivo de *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp.

Luego de que se realizara el aislamiento de la cepa y el proceso de siembra en cajas con contenido de torta, todos los hongos crecieron de forma satisfactoria.

Trichoderma spp. tiene características muy similares a las normales en un medio malta agar. Luego de 11 días se observaron características macroscópicas satisfactorias, buscando como resultado una correcta adaptación del hongo. Además, se observa un micelio blanco en las cajas que puede deberse a la digestión del hongo y a su adaptabilidad. En cuanto a su forma microscópica, las imágenes dan peso para afirmar que es una cepa de *Trichoderma* spp.

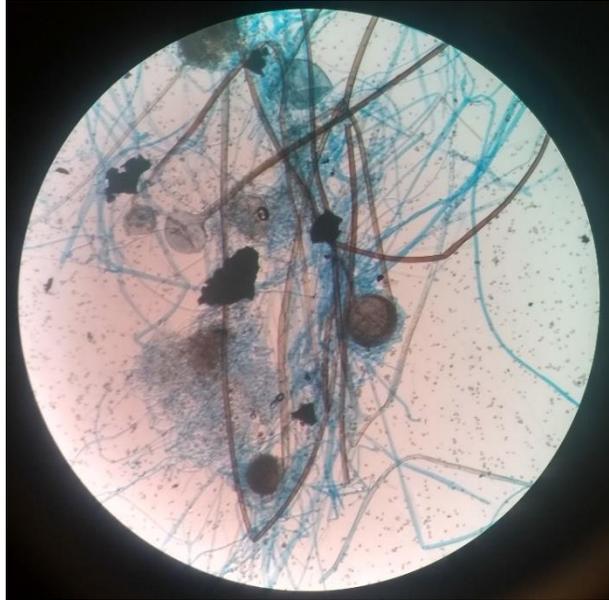
Figura 26 Imagen microscópica de hongo *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

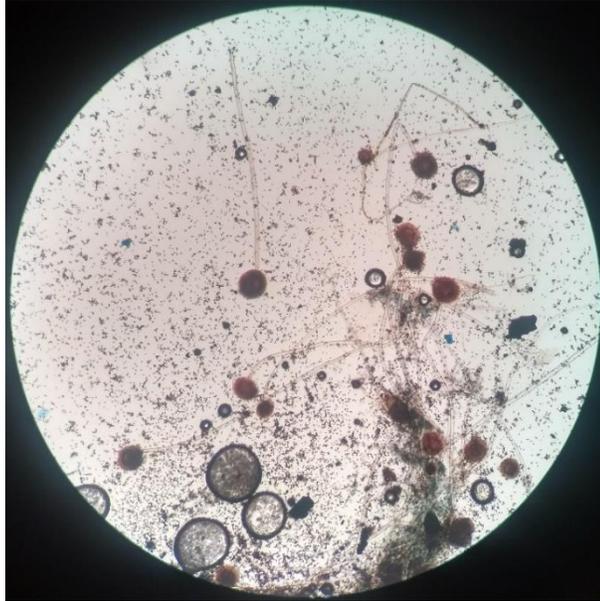
Rhizopus spp. muestra buen crecimiento pasados 10 días de la siembra, sus características macroscópicas revelan a un hongo adaptado. Se logra ver las fibras del hongo, y en sus puntas unos cabezales negros similares a los del *Rhizopus* spp. original, del cual se realizó la siembra. La exploración a nivel micro muestra la forma del *Rhizopus* según fuentes bibliográficas. [37]–[39]

Figura 27 Imagen microscópica de hongo *Rhizopus* spp.



Fuente: Autores

Aspergillus niger no daba muestras de adaptación sino hasta los 15 días pasados después de la siembra. En sus primeros días mostraba una capa blanca en toda la caja Petri, y no el crecimiento natural de color negro que tiene este hongo por sus características. Sin embargo, el hongo se logró adaptar, ya que mostró características macroscópicas similares a la cepa original.

Figura 28 Imagen microscópica de hongo *Aspergillus niger*.

Fuente: Autores

Color de micelio negro y reverso de la colonia en forma de tela gamuzada de color gris-amarillento. A nivel microscópico, los conidios son semejantes a los de la cepa original. Con esto, se puede concluir la adaptación de los tres hongos. El resumen del crecimiento en el periodo de adaptación de muestra en la tabla 13:

Tabla 13 Detalles de adaptación de hongos filamentosos a medio de cultivo con torta de higuera

HONGO	TIEMPO DE ADAPTACIÓN [DÍAS]	PROCESO DE ADAPTACIÓN Y CARACTERÍSTICAS
<i>Trichoderma</i> spp.	11	Micelio blanco en sus primeros días: color verde, original de su especie. A nivel microscópico se pueden observar sus fibras.
<i>Rhizopus</i> spp.	10	Cepa similar a la cepa original. Mostró gran adaptabilidad, siendo el hongo con menor tiempo requerido para su maduro crecimiento. A nivel microscópico se observan las esporas y la forma característica de este hongo.
<i>Aspergillus niger</i>	15	Fue el hongo que mayor tiempo tomó en crecer. En sus primeros días, mostró una capa blanca particulares de su periodo de crecimiento. Posteriormente, adquirió su color negro y su reverso en forma de color gris amarillento. A nivel microscópico se observan esporas de <i>Aspergillus niger</i> .

Cuando se realizó la siembra del hongo ya adaptado, se pudo observar que el crecimiento necesitó de menor tiempo. La hipótesis propuesta se basa en que el hongo que se tomó como original es el mismo hongo ya adaptado al medio con contenido de torta. Luego de pasados ocho días todos los hongos habían crecido bien, mostrando características similares a su cepa original.

4.2 Resultados del proceso de hidrólisis enzimática de la torta de higuera (*Ricinus communis*)

Los resultados de este proceso se muestran según la variación de la glucosa y de la celulosa como parámetros que definen la evolución del proceso.

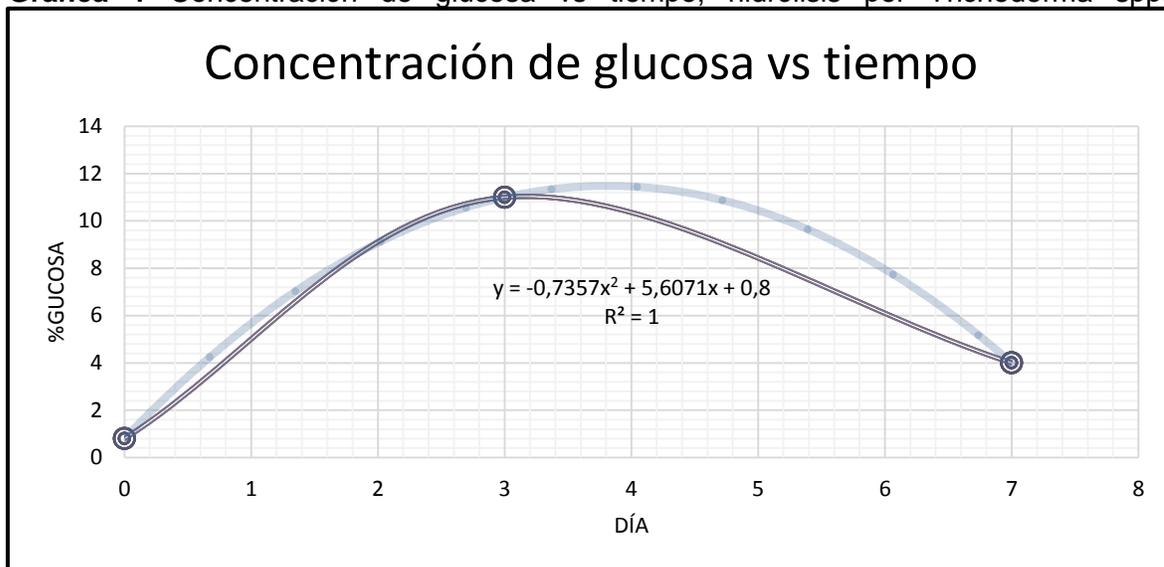
4.2.1 Resultados de hidrólisis enzimática por acción del *Trichoderma* spp.

Los resultados correspondientes a la hidrólisis por la acción del *Trichoderma* spp., arrojó los siguientes resultados:

Tabla 14 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por *Trichoderma* spp.

Día	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch [g] inicial	Peso filtro Gooch [g] final	% de Celulosa
0	7	0,004	0,8	30,1444	30,6152	47,08
3	6	0,055	11	30,2822	30,4156	13,34
7	6,5	0,02	4	30,1486	30,2807	13,21

En la tabla 14 se puede observar como el pH se mantuvo por debajo de 7. Esto ocurre porque *Trichoderma* spp. crece en ambientes ácidos, demostrando así que, desde el punto de vista del pH, el microorganismo creció correctamente. Para analizar el comportamiento de la glucosa se tiene la gráfica 1 en donde se muestra el comportamiento de esta variable con respecto al tiempo:

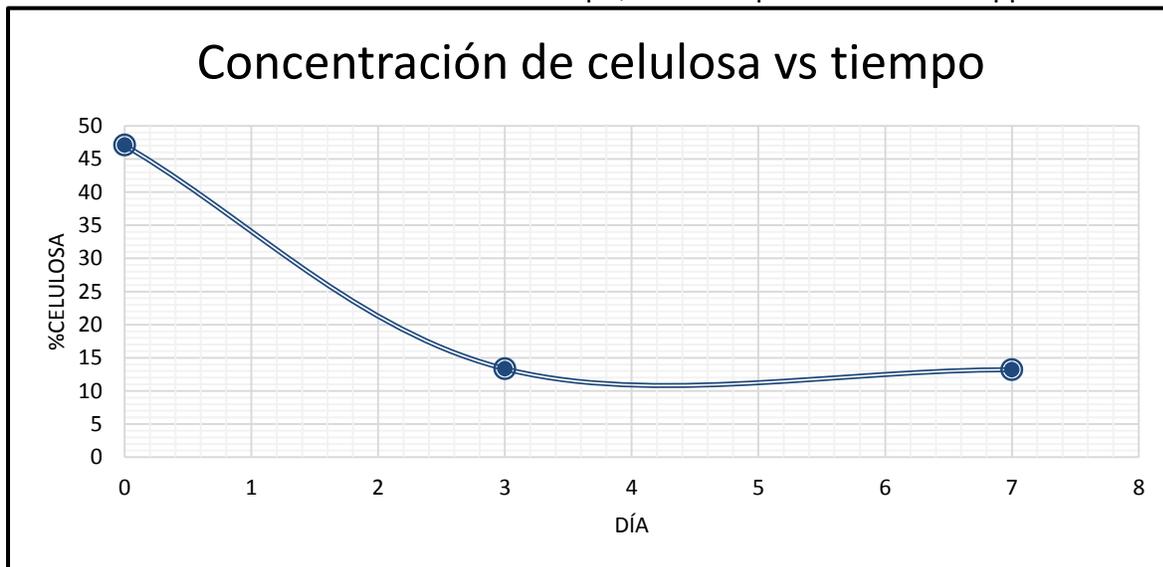
Gráfica 1 Concentración de glucosa vs tiempo, hidrólisis por *Trichoderma* spp.

Fuente: Autores

En la gráfica se observa como en el día 3 llega a su pico de concentración. Teóricamente se conoce que, el proceso de hidrólisis ocurre hasta un punto pico, en donde seguidamente su cantidad de este azúcar simple comienza a disminuir por efectos de glucolisis. Es probable que entre los días 3 y 7, la glucosa haya aumentado. Sin embargo, por efectos de medida y tiempo, no es posible asegurar que la celulosa pudo aumentar o disminuir en este periodo. No obstante, se agregó como línea de tendencia una gráfica polinómica de orden 2, una ecuación que permita obtener el comportamiento a una parábola similar. Cabe resaltar que, el comportamiento no es descrito por una ecuación de segundo orden sino hasta el periodo en que esta logra una estabilización. Es decir, por bibliografía se conoce que luego del proceso de glucolisis, esta comienza a adoptar un comportamiento constante cuando llega a un mínimo de concentración de glucosa. [53] Para complementar este comportamiento es necesario revisar la gráfica 2 en donde se muestra el comportamiento de la celulosa en función del tiempo.

La concentración de celulosa disminuyó drásticamente a la que había en el día 0 (día de inoculación). Esto señala que efectivamente la enzima liberada por el hongo *Trichoderma* spp., reaccionó con las cadenas complejas de celulosa, produciendo a su paso glucosa libre. En la gráfica 3 se observa el comportamiento de la concentración de glucosa con respecto a la concentración de celulosa.

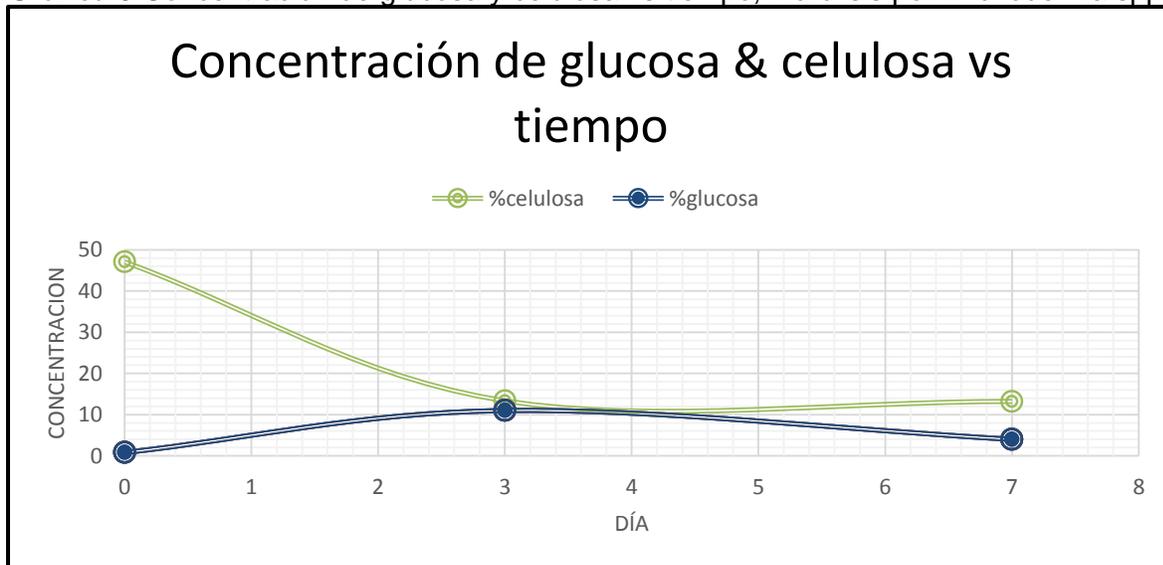
Gráfica 2 Concentración de celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

En la gráfica 3, comparando la celulosa con la glucosa, es posible observar cómo mientras una aumenta su concentración (glucosa), la celulosa disminuye su valor, lo que da a entender la reacción que está ocurriendo dentro del biorreactor de hidrólisis.

Gráfica 3 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

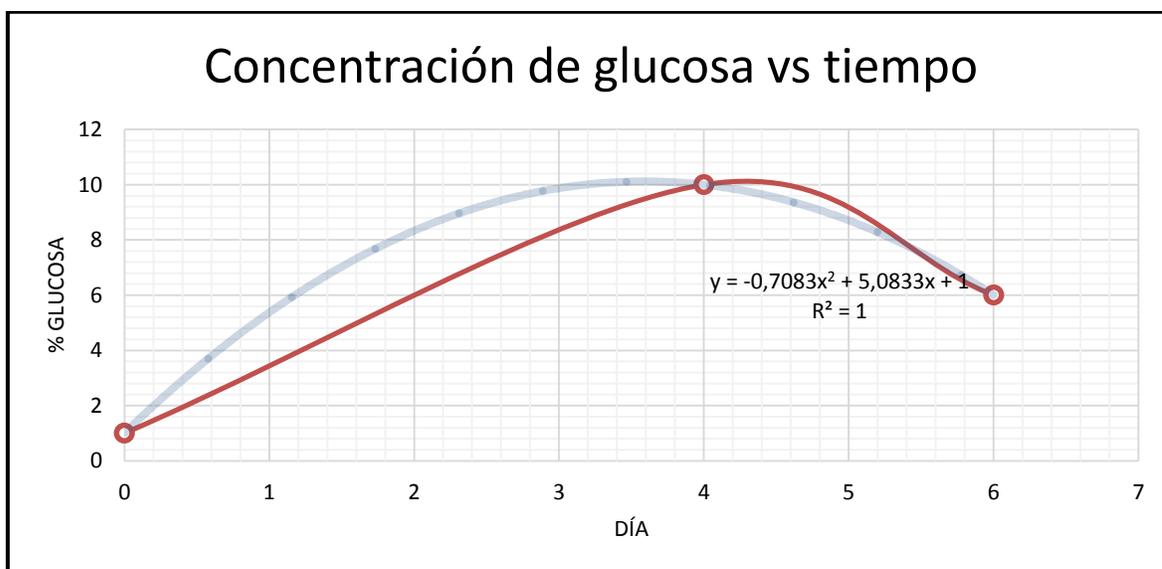
4.2.2 Resultados de la hidrólisis enzimática por acción de *Rhizopus* spp.

Los resultados correspondientes a la hidrólisis por la acción del *Rhizopus* spp., proporcionó los siguientes resultados:

Tabla 15 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por *Rhizopus* spp.

Día	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch inicial [g]	Peso filtro Gooch final [g]	% de celulosa
0	7	0,005	1	29,9305	30,4888	55,83
4	6	0,05	10	30,9872	31,1345	14,73
6	6	0,03	6	29,9305	30,0479	11,74

En los resultados se observa como en las mediciones de pH, este mostró un medio ácido, sin embargo, no muy alejado de lo normal. La acidez para que este hongo crezca de forma correcta ronda los 5,5 a los 6,5 en grado de acidez, por lo que da a entender que tiene un pH que favorece su crecimiento. En la gráfica 4 se puede observar el comportamiento del % de glucosa en función del tiempo:

Gráfica 4 Concentración de glucosa vs tiempo, hidrólisis por *Rhizopus* spp.

Fuente: Autores

En la gráfica es posible observar como la glucosa eleva su concentración hasta llegar a un pico cercano al 10 %, el cual fue medido al cuarto día luego de haber puesto en marcha la hidrólisis enzimática. Luego es posible observar una caída que en el día 6 arrojó datos menores de concentración.

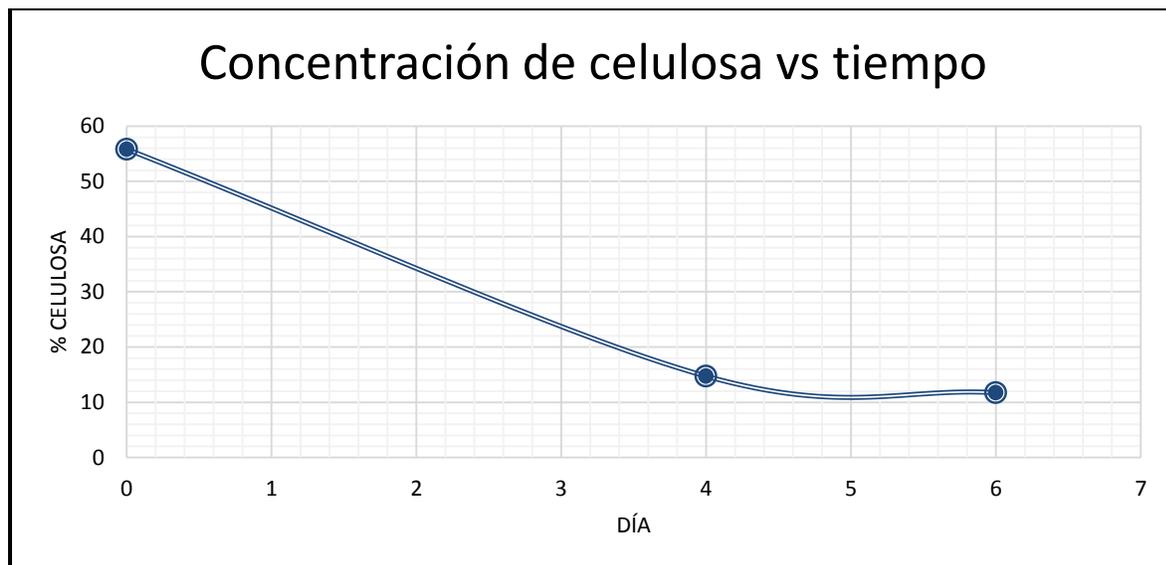
Esta prueba tiene mayor periodo en la segunda medición que las otras dos y, menos tiempo en la medición número 3, es decir, en el día 6. Esto por efecto del tiempo que requiere cada medición y la distribución que debía hacerse con los demás biorreactores. No se puede afirmar si la glucosa alcanzó valores más altos de concentración durante tiempo mayor o menor, pues a pesar de que se graficó una parábola de orden 2, el comportamiento es impredecible. Esto, debido a que depende netamente del crecimiento

del microorganismo. Para complementar este comportamiento se añade la gráfica 5 en donde se muestra el comportamiento de la celulosa en función del tiempo.

La concentración de celulosa pasó de ser en el día 0 (día de inoculación) de 55,83 a disminuir a 14,73 % en el día 4 y a 11,74% en el día 6. Es decir, confirma que la hidrólisis ocurrió, y esto se verifica según el comportamiento de la celulosa. El periodo de adaptación fue, además, exitoso. Pues en pruebas hechas anteriormente, el proceso de hidrólisis tardaba alrededor de 15 días.

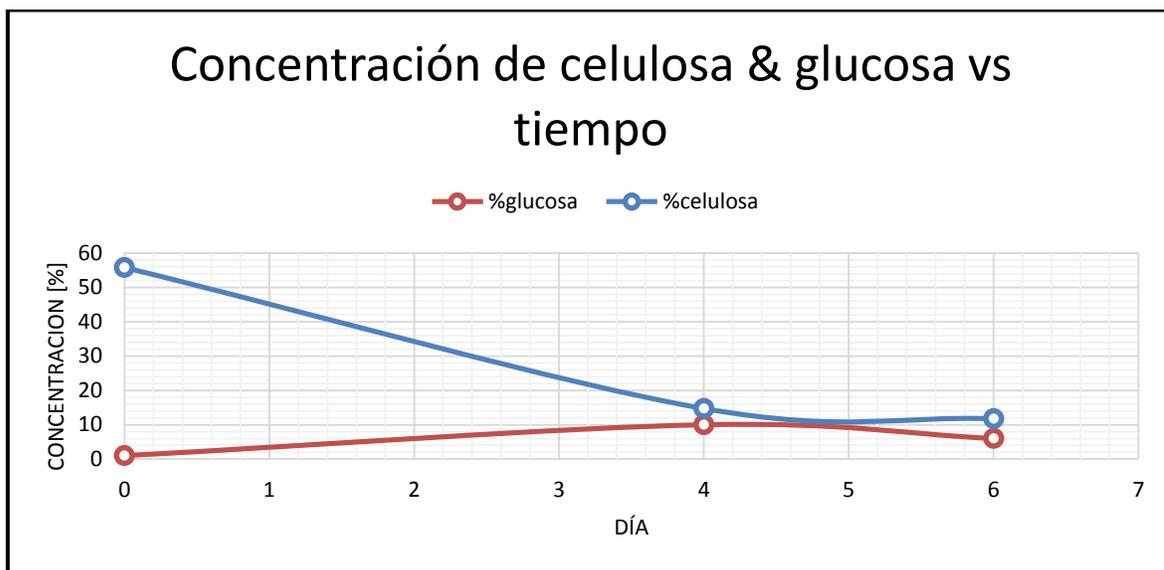
Luego de que el hongo inoculado, creciera en un ambiente con torta de higuera, aceleró su crecimiento y, a su vez, la hidrólisis. Lo que se supone que ocurre con la celulosa después del día 6 es una estabilización, pues la enzima se inhibe y deja de hidrolizar la celulosa.

Gráfica 5 Concentración de celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Rhizopus* spp.



Fuente: Autores

En la gráfica 6 se observa el comportamiento de la celulosa y de la glucosa, y esto permite una idea general de como funcionaron las dos variables. Allí se observa, el comportamiento fue el adecuado, pues mientras una disminuye drásticamente (celulosa), la glucosa pasa de no tener valor en su concentración a aumentar su valor hasta un 10%.

Gráfica 6 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Rhizopus* spp.

Fuente: Autores

4.2.3 Resultados de la hidrólisis enzimática por acción del *Aspergillus niger*.

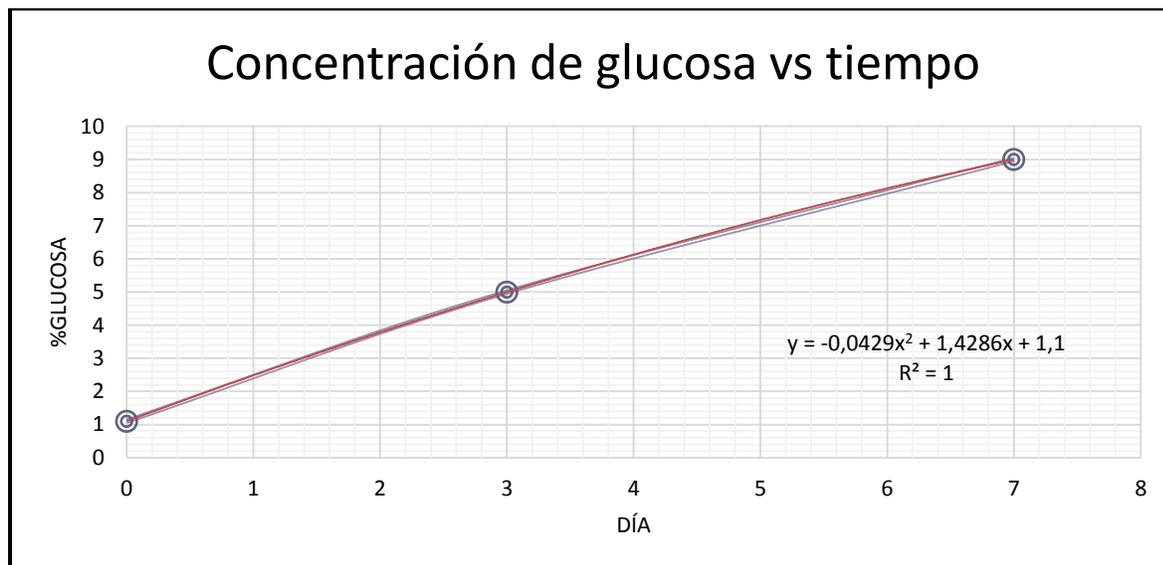
Los resultados correspondientes a la hidrólisis por la acción del *Aspergillus niger* dio los siguientes resultados:

Tabla 16 Resultados de prueba 1 de hidrólisis enzimática por *Rhizopus* spp.

Día	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch inicial [g]	Peso filtro Gooch final [g]	% de Celulosa
0	7	0,0055	1,1	30,3598	30,9139	55,41
3	5	0,025	5	30,9872	31,3063	31,91
7	5	0,045	9	30,9872	31,2568	26,96

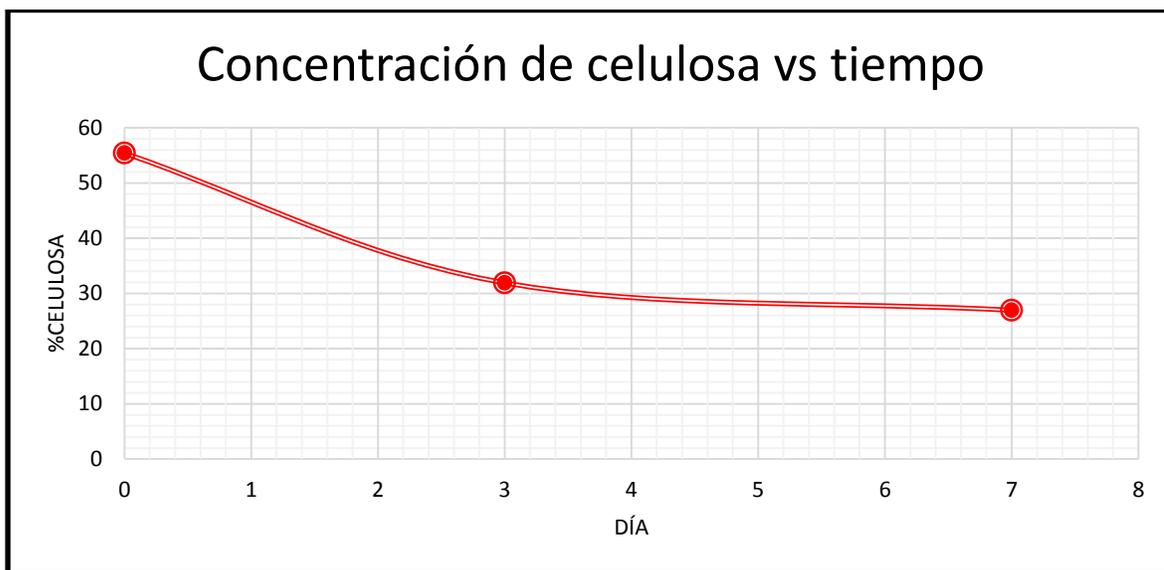
Como se observa en la medición del pH, *Aspergillus niger* también creció en un ambiente ácido. Su pH se mantuvo en 5 en las dos últimas mediciones. Esto ocurrió debido a la correcta adaptación del hongo y al correcto funcionamiento del mismo, puesto que, es en un ambiente ácido donde mejora su crecimiento y rendimiento. En la gráfica 7 se puede observar el comportamiento del % de celulosa en función del tiempo:

Gráfica 7 Concentración de glucosa vs tiempo, hidrólisis por *Aspergillus niger*.



Fuente: Autores

Como se puede observar, la hidrólisis enzimática fue la más lenta para el biorreactor con *Aspergillus niger* en comparación con los anteriores. Se evidencia que, alcanzó su valor pico en las tres mediciones en la última medición con una concentración del 9%. Es decir, la cantidad de glucosa tuvo un valor similar en su etapa final, al valor pico de glucosa en los otros biorreactores. Sin embargo, en cuanto al tiempo, fue el menos eficaz porque su proceso de hidrólisis fue más tardío. Para su comparación se agregó la línea de tendencia, con una ecuación polinómica de orden 2, ya que el proceso de hidrólisis tiene un comportamiento que puede ser similar a este tipo de gráfica. A pesar de que el comportamiento de crecimiento de la concentración de glucosa no tiene forma parabólica, se conoce que el porcentaje de glucosa después de llegar a su valor pico disminuirá portándose esta variable como una parábola negativa. Cabe resaltar que, la parábola no describe completamente el comportamiento del crecimiento de la glucosa, pues una parábola tiende al infinito o al menos infinito; y la glucosa después de mucho tiempo tiende a tomar valores mínimos por efecto de glucólisis, pero estables. En otras palabras, después de pasado el tiempo la glucosa se comportará de manera lineal, sin aumentar o disminuir su concentración. Para complementar este comportamiento, se añade la gráfica 8 en donde se muestra el comportamiento de la celulosa en función del tiempo:

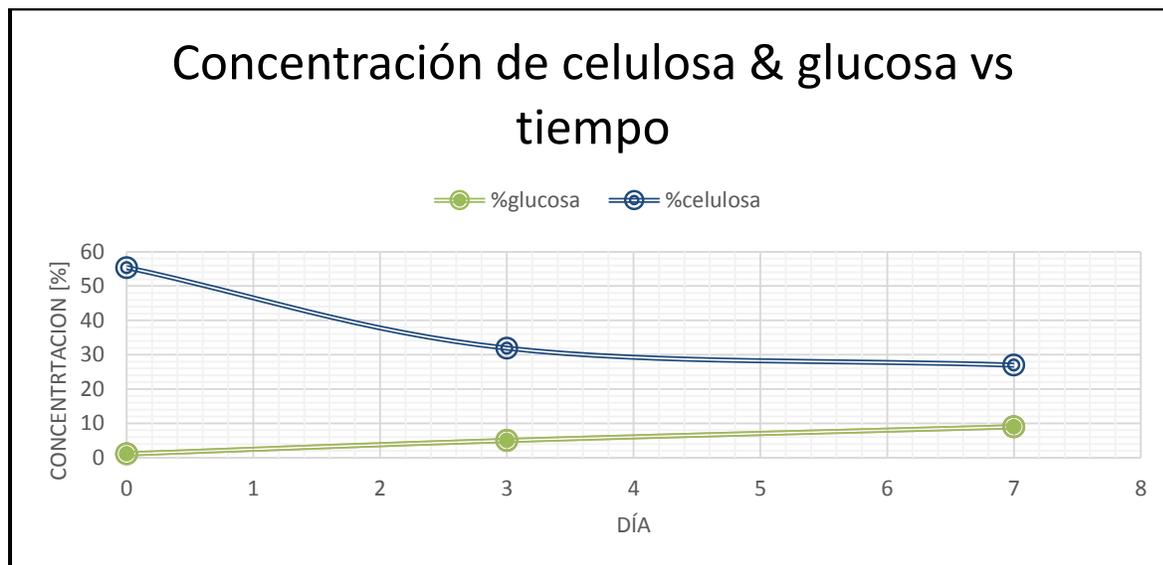
Gráfica 8 Concentración de celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Aspergillus niger*.

Fuente: Autores

En la gráfica 8 se observa un comportamiento descendente, pero menos pronunciado si lo comparamos con la disminución de la celulosa en los biorreactores anteriormente analizados. Esta concentración disminuye desde un 55,41 % en el día del inóculo (día 0) hasta un 26,29 % en el día 7. Se logró observar como en los primeros días este valor tenía una pendiente más pronunciada, comparándose con la pendiente que hay entre el dato tomado el día 3 y el día 7. En los primeros tres días se logró una disminución en porcentaje de la concentración de celulosa del 23,5, mientras que, entre el día 3 y el día 7 solo un 5,62 %. En la gráfica 9 se observa el comportamiento de la celulosa y de la glucosa, esto brinda una idea general de como funcionaron las dos variables.

Se observa un proceso de hidrólisis menos efectivo y más lento. Se argumenta que su efectividad es más baja debido a la poca diferencia de porcentaje que hay entre el valor inicial y el valor mínimo de celulosa alcanzado en las mediciones realizadas. Así, se compara con los valores de mediciones hechos en biorreactores de *Trichoderma* spp., y *Rhizopus* spp.

Gráfica 9 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, hidrólisis por *Aspergillus niger*.



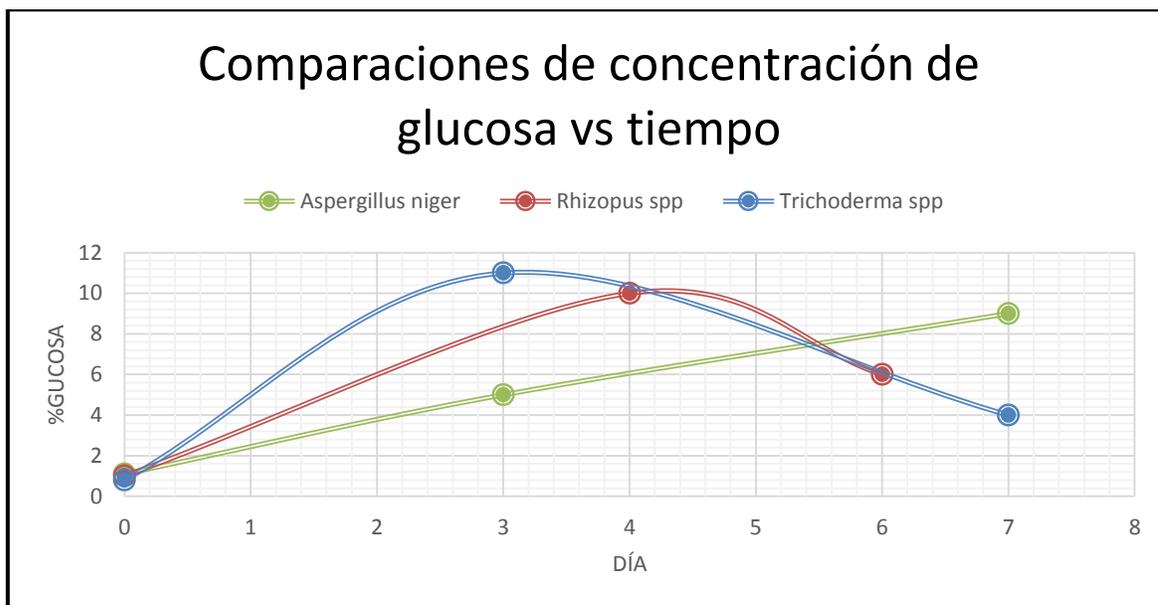
Fuente: Autores

Finalmente, para comparar la eficiencia de hidrólisis se tuvieron en cuenta dos criterios. La concentración de glucosa y el tiempo. Es decir, el reactor que tenga mayor concentración de glucosa medida y en el menor tiempo será el método escogido para la réplica. En la gráfica 10 se muestra la concentración de glucosa producto de los tres reactores.

Como se observa en la gráfica 10, el punto más alto de concentración de glucosa se presenta por hidrólisis producto de *Trichoderma spp.* Además, el que menor tiempo requiere es este microorganismo, pues no solo alcanza el punto más alto, sino también el punto más bajo de concentración, mostrando que su hidrólisis es más rápida, en comparación con la de los otros microorganismos. *Aspergillus niger* mostró una hidrólisis más lenta, sin embargo, es posible que entre el día 3 y el día 7 su concentración haya aumentado y para el día 7, día de última medición registrada, su concentración sea descendente producto de glucolisis.

Rhizopus spp tiene una menor cantidad de concentración, sin embargo, este no se tuvo en cuenta para la réplica, pues se buscó repetir el proceso con mayor eficiencia. La razón de porque se decidió replicar la hidrólisis con *Aspergillus niger* fue debido al volumen del líquido post destilado, pues fue la que presento mayor cantidad (Ver tabla 18).

Gráfica 10 Concentración de glucosa vs tiempo, comparación de hidrólisis entre los tres microorganismos



Fuente: Autores

4.2.4 Observaciones generales y lavado de biorreactores de hidrólisis

Se implementó un reactor neutral, el cual no contenía ningún microorganismo, con el fin de comprobar que la hidrólisis enzimática ocurro por acción de los mismos y no por reacciones ajenas. Las gráficas del desempeño reactor neutral están presentes en el anexo 2.

En el día 7 de la prueba realizada al reactor de *Rhizopus spp.*, se realizó el lavado de los biorreactores. En el anexo 3 se observan las imágenes de los biorreactores antes de realizar el lavado. Los biorreactores con micelio blanco en la parte superior, e incluso, el biorreactor de *Aspergillus niger* mostraba cepa microbiana en gran parte del área superior de la torta.

4.3 Resultados del proceso de fermentación

El primer paso fue activar la levadura, luego se añadió a los recipientes destilados en donde estaba la solución post lavado y se dejó durante 4 días.

Los datos del conteo microbiano de la levadura se muestran en la tabla 17:

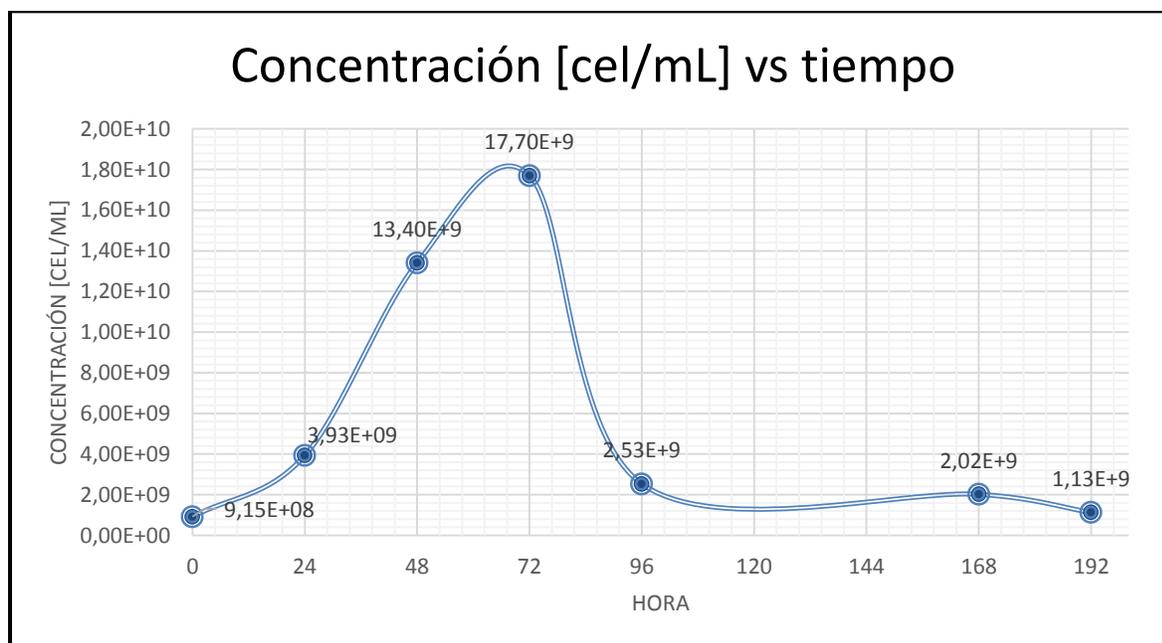
Tabla 17 Datos de activación de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Horas	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración [Cell/mL]
	1	2	3	4	5			
0	58	18	51	38	18	36,6	2	9,15E+08

24	153	205	137	141	150	157,20	2	3,93E+09
48	57	49	39	53	70	53,6	3	13,40E+9
72	66	62	75	83	68	70,8	3	17,70E+9
96	110	97	93	58	148	101,2	2	2,53E+9
168	52	101	105	94	52	80,8	2	2,02E+9
192	43	42	25	42	73	45	2	1,13E+9

Se puede observar que la concentración de células por mililitro aumentó considerablemente las primeras 72 horas, siendo cerca de este periodo cuando alcanzó la mayor cantidad de células por mililitro. Es posible ver que la toma de pruebas se estaba realizando cada 24 horas hasta cuando se completaron 96 horas y luego pasaron 72 horas para la próxima medición; pues por causas mayores pasaron dos días en los cuales no se pudo realizar el conteo microbiano. La gráfica 11 se muestra a continuación y allí se ilustra como fue el proceso de activación de la levadura:

Gráfica 11 Concentración de levadura vs tiempo.



Fuente: Autores

En el gráfico de dispersión que muestra la concentración en células por mililitro, se puede observar como alcanza sus valores pico entre las 48 y las 72 horas.

Luego de activada la levadura se añadieron 250 mL a cada recipiente fermentador, se selló con parafina y se dejó accionar durante 3 días. La figura 29 muestra los tres recipientes en donde ya actuaban como fermentadores. Luego de destapar los fermentadores, pasados los 3 días se comprobó que habían ocurrido procesos de fermentación, ya que una

sustancia gaseosa salió al instante que se abrió el fermentador; la sustancia CO₂. La temperatura del proceso se mantuvo a temperatura ambiente.

Figura 29. Recipientes fermentadores



Fuente: Autores.

4.4 Resultados del proceso de destilación

El proceso ocurrió hasta cuando el tiempo entre gota y gota de destilado superó los dos minutos. Las cantidades de producto destilado junto con el tiempo de destilación se muestran en la tabla 18:

Tabla 18 Resultados de proceso de destilación

Hidrólisis enzimática causada por:	Cantidad de destilado [mL]	Tiempo de destilación [minutos]
Trichoderma spp.	4,8	330
Rhizopus spp.	22,3	300
<i>Aspergillus niger</i>	96,9	240

Como se puede observar, la hidrólisis causada por *Aspergillus niger* fue la que mayor cantidad de destilado produjo. Esto se debe a que, para el momento en que se realizó el lavado, la concentración de glucosa era mayor para este hongo, pues fue una hidrólisis más lenta que la de los otros microorganismos. A diferencia del destilado por *Trichoderma* spp., y *Rhizopus* spp., su cantidad de destilado es mucho menor. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la mejor ruta sea producir el bioetanol por la *Trichoderma* spp., o por el *Rhizopus* spp., ya que alcanzaron valores de concentración de glucosa más altos en menos tiempo; efecto que, para la fase de lavado y fermentación tuvo resultados poco favorables con respecto a la hidrólisis lenta ocurrida por el *Aspergillus niger*.

Se midió la densidad del destilado producto de *Rhizopus* spp., y de *Aspergillus niger*. Por otra parte, la cantidad de destilado producto de la hidrólisis por *Trichoderma* spp., fue tan mínimo que no alcanzó para cubrir el picnómetro, por lo tanto, no se pudo determinar la concentración.

4.5 Resultados de cálculo de concentración de etanol por el método de determinación de la densidad de líquidos con el picnómetro de Gay-Lussac

El primer paso es la calibración del picnómetro para calcular el coeficiente medio de expansión. El peso del picnómetro vacío fue de 10.053 gramos. Los valores para la calibración del picnómetro con agua destilada a temperatura cercana a 20°C se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 19 Valores para calibración de picnómetro de Gay-Lussac a temperatura cercana de 20°C

MEDIDA	VALOR	NOMENCLATURA
Temperatura	25°C	θ_1
Masa picnómetro lleno	15.1154 [g]	m_1
Densidad del agua a temperatura de calibración	0.99599 [g/mL]	ρ_w

El valor de densidad se tomó según los valores expresados en la tabla 1 de la norma NTC 336 [43]. Utilizando la ecuación ($v_c = \frac{m_1 - m_0}{\rho_w}$ Ec. 7) se tiene que:

$$v_{c_1} = \frac{15.1154[g] - 10.0853 [g]}{0.99599 [\frac{g}{mL}]} = 5,0504 \text{ mL}$$

Los valores medidos para la calibración del picnómetro a temperatura cercana a 60°C están plasmados en la siguiente tabla:

Tabla 20 Valores para calibración de picnómetro de Gay-Lussac a temperatura cercana de 60°C

MEDIDA	VALOR	NOMENCLATURA
Temperatura	53°C	θ_2
Masa picnómetro lleno	14.9994 [g]	m_2
Densidad del agua a temperatura de calibración	0.98217 [g/mL]	ρ_{w_2}

Utilizando la ecuación $v_c = \frac{m_1 - m_0}{\rho_w}$ Ec. 7) se tiene que:

$$v_{c_2} = \frac{14,9994[g] - 10,0853 [g]}{0,98561 \left[\frac{g}{mL}\right]} = 4,9858 \text{ mL}$$

Así y aplicando la ecuación para calcular el coeficiente medio de expansión cubica del picnómetro, se tiene que:

$$\gamma = \frac{4,9858 - 5,0504 [mL]}{5,0504 (53 - 25)[mL * ^\circ C]} = -0,00046 [^\circ C^{-1}]$$

Así, el volumen del picnómetro a la temperatura de medición de la muestra es de:

$$v_d = 5,0504[1 - 0,00046(25 - 25)] = 5,0504 [mL]$$

Entonces tomando como m_3 el picnómetro con la muestra de *Aspergillus niger* el valor de la densidad de la muestra se calculó por medio de la ecuación $\rho_\theta = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta)$ Ec. 10 de la siguiente manera:

$$\rho_\theta = \frac{15,0003 - 10,0853 [g]}{5,0504 [mL]} = 0,9732 \left[\frac{g}{mL}\right]$$

Entonces interpolando este valor con los datos de la tabla 1 del anexo 1 se tiene que la concentración en volumen de etanol es de aproximadamente 0,1792. Los valores de densidad y concentración de etanol de los destilados se muestran en la siguiente tabla, teniendo en cuenta que el destilado de hidrólisis por *Trichoderma* spp, no permitió su medición debido a la poca cantidad de volumen, pues el volumen debe ser de 5,0505 mililitros.

Tabla 21 Concentración de etanol y densidad de destilados

Hidrólisis enzimática causada por:	Masa del picnómetro lleno [g]	Densidad [g/mL]	Concentración de etanol en volumen.
Rhizopus spp.	14,9733	0,9678	0,2204
<i>Aspergillus niger</i>	15,0003	0,9732	0,1792

4.6 Resultados de proceso de replica

A continuación, se muestran los resultados relacionados con la réplica de cada proceso de hidrólisis según la línea de metodología mostrada en el apartado 3.6.

4.6.1 Resultados de Replica (I) por acción enzimática de *Trichoderma* spp.

El primer paso fue la inoculación del hongo, el cual tuvo una concentración de 7.90E+6 células por mililitro, tal como se observa en la tabla 22.

Tabla 22 Concentración de inóculo de réplica (I)

HONGO	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración [Cell/ml]
	1	2	3	4	5			
Trichoderma spp., replica 1	34	36	30	25	33	31,6	0	7,90 E+06

Como se menciona en el apartado 3.6.1 la medición tanto de glucosa como de pH se realizó en periodos de 24 horas y la medición de la concentración de celulosa en el día 0 (día del inóculo) y en el día final en el cual se realizó el lavado. Los resultados de las mediciones están en la siguiente tabla 23:

Tabla 23 Resultados de réplica (I) de hidrólisis enzimática por *Trichoderma* spp.

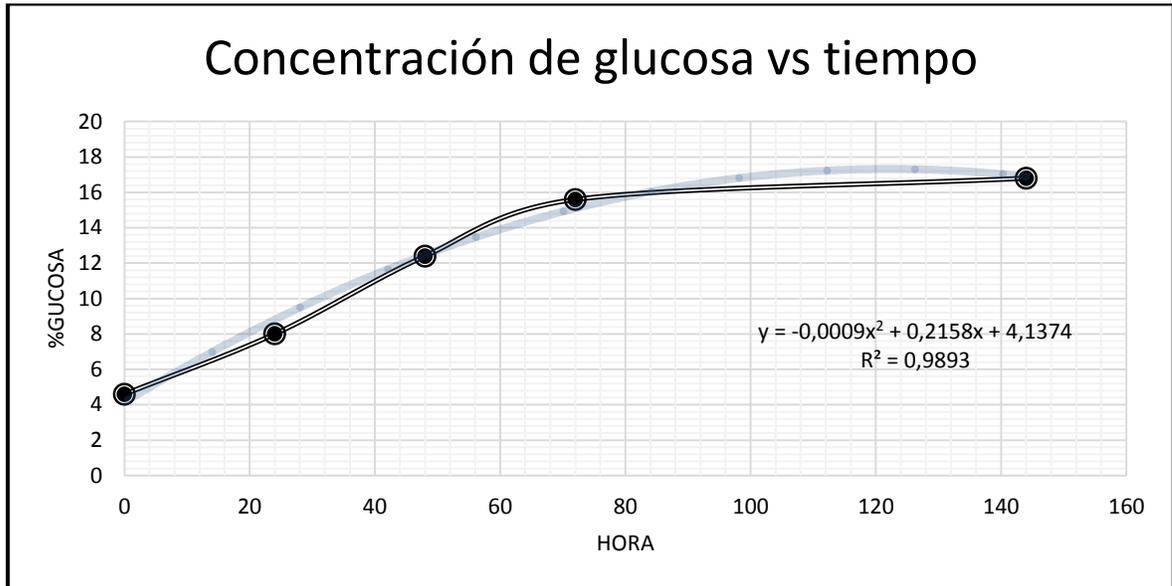
Horas	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch [g] inicial	Peso filtro Gooch [g] final	% de celulosa
0	7	0,023	4,6	30,174	30,5966	42,26
24	6,5	0,04	8	-	-	-
48	6	0,062	12,4	-	-	-
72	6	0,078	15,6	-	-	-
144	6,5	0,084	16,8	29,8933	30,0627	16,94

En la tabla 23 se puede observar como el comportamiento de la concentración de glucosa aumenta diariamente. El pH disminuye y se mantiene alrededor de 6 lo que indica que, el microorganismo creció correctamente. El comportamiento de la concentración de glucosa se analiza por medio de la gráfica 12.

En la gráfica 12 es posible observar como las concentraciones de glucosa aumentan hasta llegar a un punto casi estable, pues la diferencia de concentración entre pasadas las 72 y las 144 horas, es de 1,2%, mientras que entre las dos últimas mediciones (48 y 72 horas) la diferencia es de 3.2%. Es por esto, que el proceso terminó en el día 6, día de cumplidas las 144 horas y en donde se obtuvo la mayor concentración de glucosa registrada de aproximadamente 17%.

En la tabla 23 se observa que la concentración de celulosa disminuye hasta llegar a concentraciones de 16.94 %. Para relacionar las concentraciones, se graficó el comportamiento de la glucosa vs la línea entre los puntos de concentración de celulosa en el día 0 y en el día del lavado (144 horas).

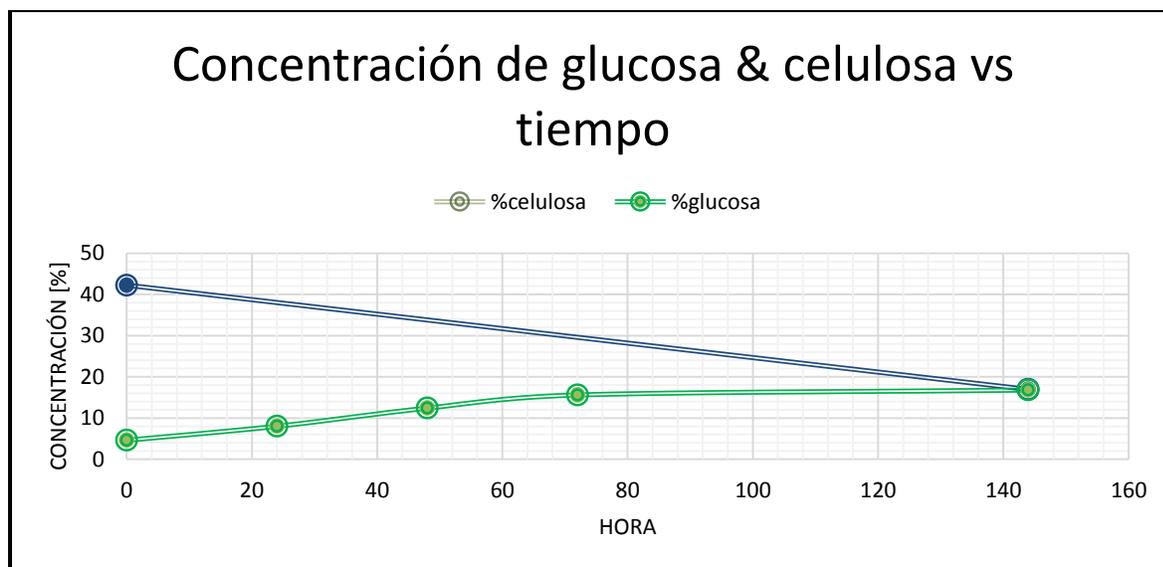
Gráfica 12 Concentración de glucosa vs tiempo, replica (I) hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

El comportamiento de la celulosa es el esperado, teniendo en cuenta que para la hidrólisis con *Trichoderma* spp. la concentración final fue de 13.21%, es decir menor a la obtenida en este proceso. La explicación de porqué se obtuvo mayor concentración de glucosa puede deberse a la concentración inicial de inóculo que para la réplica 1 fue de $7.9E+6$ mientras que la de la prueba fue de $7.1E+6$, es decir una diferencia de 800'000 células por mililitro. Después de pasadas las 144 horas se realizó el lavado del biorreactor de hidrólisis, obteniéndose mayor cantidad de lixiviados con 867 mL de solución post hidrólisis rica en glucosa.

Gráfica 13 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, replica (I) hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

4.6.2 Resultados de Replica (II) por acción enzimática de *Trichoderma* spp.

El primer paso fue la inoculación del hongo, el cual tuvo una concentración de $7,55E+6$ células por mililitro, tal como se observa en la tabla 24.

Tabla 24. Conteo del hongo *Trichoderma*

HONGO	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración [Cell/ml]
	1	2	3	4	5			
Trichoderma spp	35	27	36	23	30	30,2	0	7,5500E+06

Como se menciona en el apartado 3.6.3 la medición tanto de glucosa como de pH se realizó en periodos de 24 horas excepto el día 3 y 4, ya que estos eran fin de semana, y en estos días no es posible realizar mediciones en el laboratorio. La medición de celulosa se realizó el día 0 y el día 5, debido a que el biorreactor se contaminó y posteriormente se descartó. Los resultados de las mediciones son los siguientes (Tabla 25):

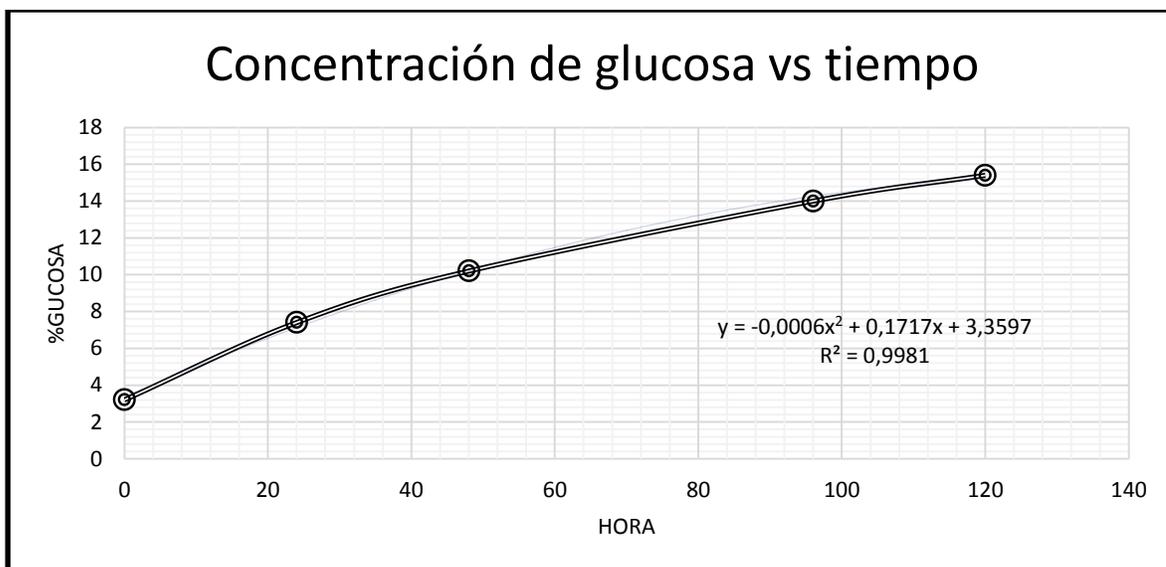
Tabla 25. Datos de las pruebas de celulosa y glucosa de la réplica (II)

Horas	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch [g] inicial	Peso filtro Gooch [g] final	% de celulosa
0	7	0,016	3,2	29,8986	30,3527	45,41

24	7	0,037	7,4	-	-	-
48	6,5	0,051	10,2	-	-	-
96	6	0,07	14	-	-	-
120	6,5	0,077	15,4	30,2871	30,5443	25,72

En la tabla 25 se observa que la glucosa aumentaba diariamente, además el pH se mantuvo en valores entre 6 y 6,5 lo cual indica que el hongo creció correctamente hasta el día 5 que se paró de analizar el biorreactor ya que la contaminación que este adquirió afectaría las mediciones y el microorganismo. El comportamiento de la glucosa se analiza por medio de la gráfica 14:

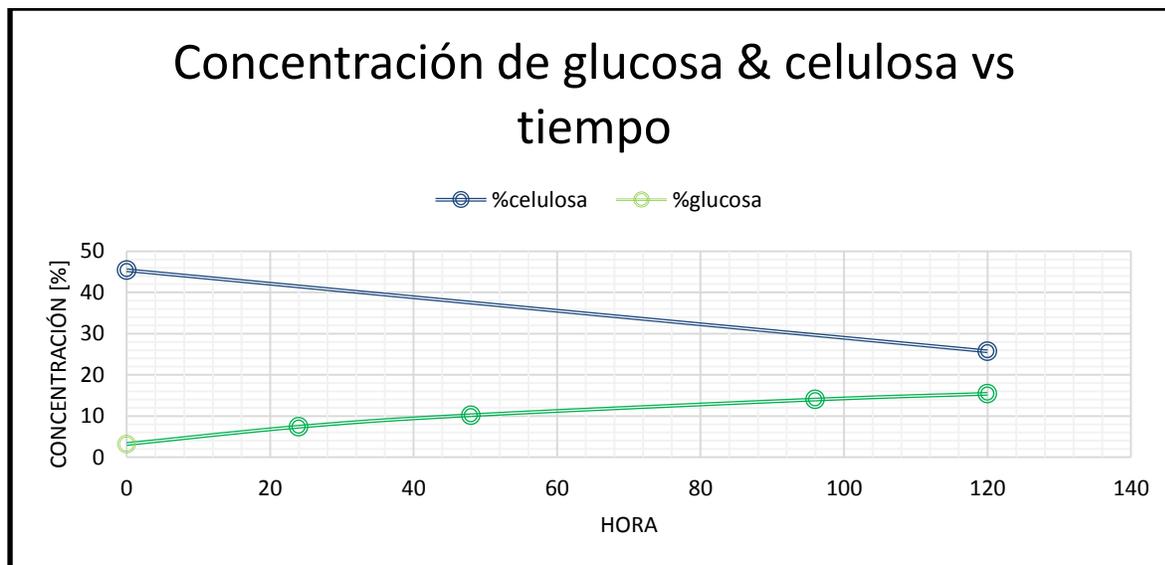
Gráfica 14 Concentración de glucosa vs tiempo, replica (II) hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

En la gráfica 14 es posible observar como las concentraciones de glucosa comienzan aumentando abruptamente ya que entre pasadas las 24 horas y 48 horas, la diferencia de concentración es de 4,2 %, pero esta tiende a disminuir levemente, como se puede evidenciar pasadas las 96 y 120 horas donde la diferencia de concentración es de 1,4%. Es por esto, que el proceso debió terminar en el día 6, día de cumplidas las 144 horas donde se tendría la mayor concentración como sucedió con la réplica (I) de *Trichoderma* spp, pero debido a la contaminación este valor no se pudo obtener. Para efectos de análisis y comparación con la cantidad de celulosa se muestra la siguiente gráfica:

Gráfica 15 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, replica (II) hidrólisis por *Trichoderma* spp.



Fuente: Autores

Previamente a la contaminación, el comportamiento de la celulosa era el esperado ya que en el día 5 (día donde se paró el análisis) la concentración era de 25,72%, teniendo una tendencia a disminuir a un ritmo relativamente rápido. La glucosa también estaba aumentando, por lo que se esperaba que en el día 6 el lavado se realizara como sucedió con la réplica (I) de *Trichoderma* spp. El comportamiento de la gráfica no se pudo ilustrar en su totalidad debido a problemas previamente explicados.

4.6.3 Resultados de Replica (III) por acción enzimática de *Aspergillus niger*.

El primer paso fue la inoculación del hongo, el cual tuvo una concentración de 1,750E+7 células por mililitro, tal como se observa en la tabla 26.

Tabla 26 Concentración de inóculo de réplica (III)

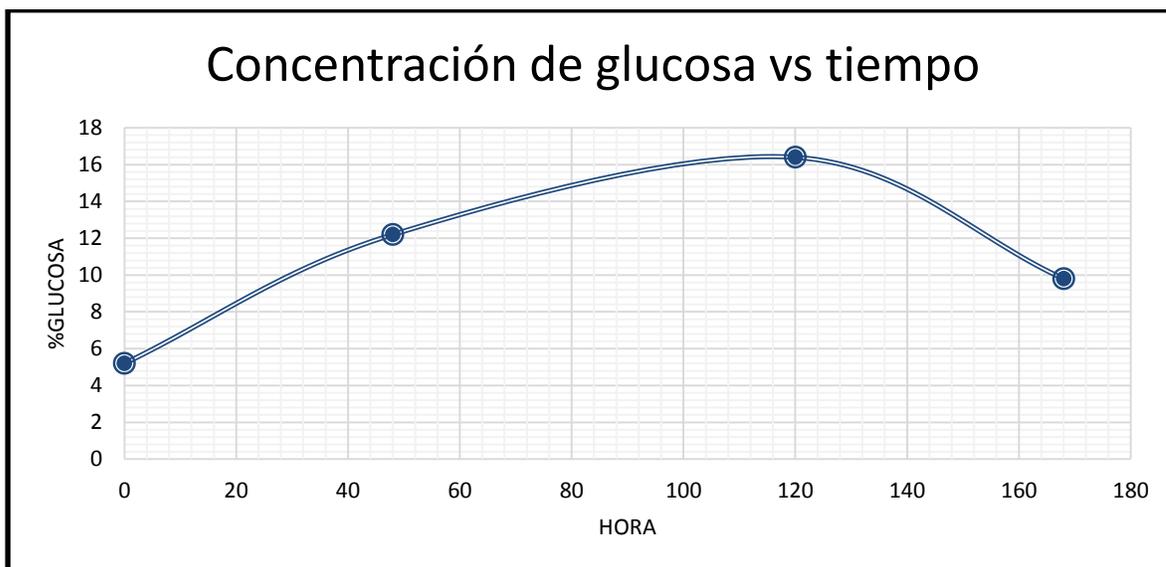
HONGO	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración [Cell/ml]
	1	2	3	4	5			
<i>Aspergillus niger</i>	8	7	8	6	6	7	1	1,7500E+07

Como se menciona en el apartado 3.6.3 la medición tanto de glucosa como de pH se realizó en periodos de 24 horas y la medición de la concentración de celulosa en el día 0 (día del inóculo) y en el día final en el cual se realizó el lavado. Los resultados de las mediciones están en la siguiente tabla 27:

Tabla 27 Resultados de réplica (III) de hidrólisis enzimática por *Aspergillus niger*.

Horas	pH	Absorbancia	% de Glucosa	Peso filtro Gooch inicial [g]	Peso filtro Gooch final [g]	% de celulosa
0	7	0,026	5,2	29,8991	30,3205	42,14
48	4,5	0,061	12,2	-	-	-
120	5,5	0,082	16,4	-	-	-
168	7	0,049	9,8	30,0627	30,3527	29

Como se puede observar, el pH desciende hasta un nivel de 4,5. Esto muestra como el microorganismo disminuye el grado de acidez del ambiente, aumentando su crecimiento. Sin embargo, en el día 7, el grado de acidez se balancea, lo que da a entender que, si las condiciones están normales dentro del biorreactor, el microorganismo pudo haber detenido su crecimiento. Esto se puede evidenciar en el % de glucosa, pues si concentración disminuye en gran manera, pues se pasa de una concentración pasadas 120 horas del inoculo (5 días) de 16,4% a una concentración de 9,8% pasadas las 168 horas (7 días). La diferencia de concentraciones fue de 6,6%. Esto se debe a efectos de glucolisis, sin embargo, esta medición fue tomada en el momento del lavado, por lo que la concentración final de glucosa fue de aproximadamente el 10%. En la gráfica 16 se observa el comportamiento de la concentración de glucosa:

Gráfica 16 Concentración de glucosa vs tiempo, replica (III) hidrólisis por *Aspergillus niger*

Fuente: Autores

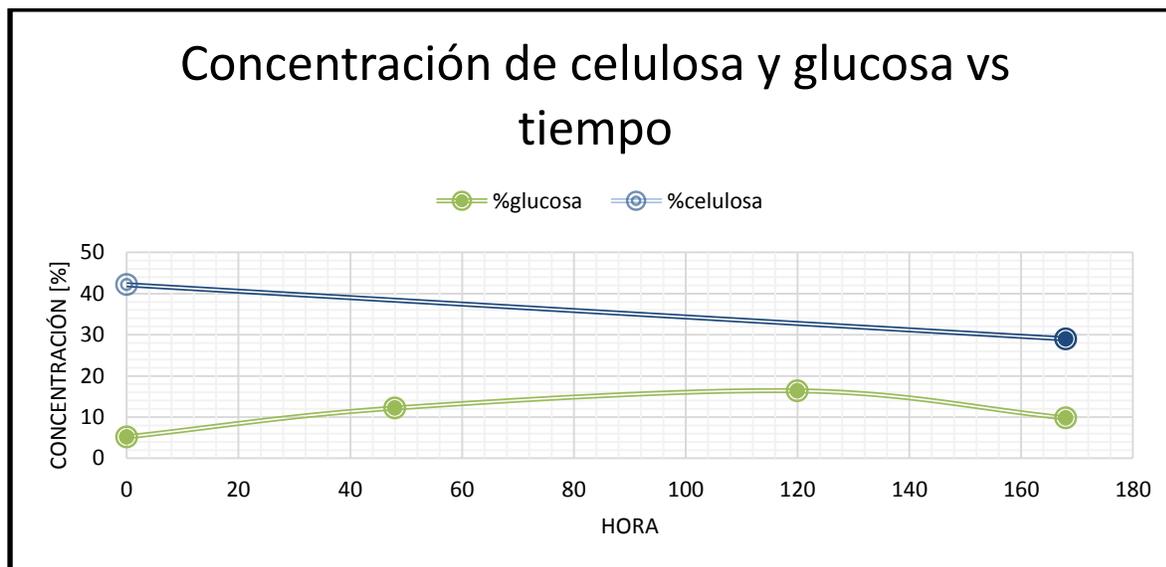
Es posible observar como el comportamiento de la concentración de la glucosa aumenta considerablemente hasta pasadas 120 horas. La concentración es totalmente ascendente

por efectos de las enzimas hidrolasas liberadas por *Aspergillus niger*, dando como resultado esta liberación de glucosa a partir de la celulosa. Además, se observa como la velocidad de reacción entre las primeras 48 horas (2 días), su concentración aumenta casi al doble. Para efectos de análisis y comparación con la cantidad de celulosa se muestra la gráfica 17.

Como la celulosa no se midió sino en el inicio y en el fin del proceso solo se tienen dos datos de esta variable. Sin embargo, es posible observar como la disminución de esta variable, que llega al 29%. Es decir, a pesar de que el microorganismo creció de manera correcta, si se compara con los resultados de la tabla 15, (concentración final de celulosa de 26,96%), se tiene una diferencia de 2,04%. La razón puede deberse a la diferencia de concentración en el inóculo que fue de 1'500'000 células por mililitro menos en comparación con la concentración de inóculo de *Aspergillus niger* que se muestra en la tabla 11.

Después de pasadas las 168 horas se realizó el lavado del biorreactor de hidrólisis, obteniéndose 680 mL de solución post hidrólisis rica en glucosa.

Gráfica 17 Concentración de glucosa y celulosa vs tiempo, replica (III) hidrólisis por *Aspergillus niger*



Fuente: Autores

4.6.4 Resultados de la réplica de proceso de fermentación

Las réplicas (I) y (III) pasaron por el proceso de fermentación. La réplica (II) no fue posible debido a la contaminación. La activación de la levadura se llevó a cabo con un tiempo de reacción de 72 horas. Esto porque transcurrido este periodo, la concentración medida en la activación realizada en las pruebas anteriores, alcanzó valores pico. La determinación de concentración de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en el instante en que

se agregó a la solución post hidrólisis. La concentración de la levadura se muestra en la siguiente tabla 28:

Tabla 28 Concentración de inóculo de levadura para réplicas (I) y (III).

HONGO	Retículo					Promedio	Diluciones	Concentración de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [Cell/ml]
	1	2	3	4	5			
<i>Aspergillus niger</i>	35	29	28	28	31	30,2	4	7,5500E+10
<i>Trichoderma spp.</i>	58	65	70	75	59	65,4	4	16,3500E+10

Como la concentración de inóculo fue mayor, se agregaron 200 mL a cada recipiente fermentador, se sellaron con parafina y se introdujeron en el baño de maría a temperatura a temperatura de 37°C y se dejó reaccionar durante 4 días. La cantidad de líquido total fue de 1067 mililitros para la fermentación de la réplica (I) y 880 mililitros para la fermentación (III) que se dividieron en dos recipientes, con un contenido de 440 mililitros cada uno. La imagen del fermentador de la réplica (I) y un recipiente de la réplica (III) se muestra en la siguiente figura 30:

Figura 30 Recipientes fermentadores, De izquierda a derecha réplica (I) y réplica (III).



Fuente: Autores

4.6.5 Resultados de la réplica del proceso de destilación.

El proceso de destilación se llevó a cabo durante 4 horas, pues fue el tiempo establecido para dar estandarización al proceso de réplica. Estas 4 horas iniciaban a partir de que la temperatura registrada estuviera en rangos de 79°C y 84°C, ajustándose a la temperatura

de destilación del etanol. Sin embargo, pasadas las 4 horas, era posible seguir obteniendo producto destilado, aunque con menor frecuencia. Cabe resaltar que se realizaron dos destilaciones. Una con 3 días de periodo para la fermentación y la otra con los 4 días cumplidos. Esto sacando muestras de 500 mL para cada destilación. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 29:

Tabla 29 Resultados del proceso de destilación producto de réplica (I).

Hidrólisis enzimática causada por:	Cantidad de destilado [mL]	Tiempo de destilación [minutos]
Trichoderma spp.	32.1	240
Trichoderma spp. ¹	8	240

¹Este resultado es de la destilación que se realizó con 3 días de fermentación.

En cuanto al jugo destilado del *Aspergillus niger* no fue posible realizar la destilación, esto debido a que la cantidad de gas en el líquido no lo permitió. Al finalizar los 4 días se obtuvo un líquido con alto contenido de compuesto gaseoso, que teóricamente es CO₂[47]. Para cuando se realizó el montaje de destilación y este alcanzaba temperaturas superiores a los 45°C, el proceso se comportaba de manera inestable, pues el cambio de fase de líquida a gaseosa, generaba reacciones químicas violentas.

Posteriormente, se midió la densidad del destilado, y sus resultados se muestran en la siguiente tabla 30:

Tabla 30 Valores para medición de concentración de etanol y densidad de solución post destilado.

MEDIDA	VALOR	NOMENCLATURA
Temperatura	25°C	θ_1
Masa picnómetro lleno con muestra	14.9571 [g]	m_3
Densidad del agua a temperatura θ_1	0.99599 [g/mL]	ρ_w

Entonces tomando los valores de la tabla 19 y m_3 de la tabla anterior, el valor de la densidad de la muestra se calculó por medio de la ecuación $\rho_\theta = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta)$ Ec. 10 de la siguiente manera:

$$\rho_\theta = \frac{14,9571 - 10,0853 [g]}{5,0504 [mL]} = 0,9646 \left[\frac{g}{mL} \right]$$

Entonces interpolando este valor con los datos de la tabla 1 del anexo 1 se tiene que la concentración en volumen del etanol es de aproximadamente 0.2437.

4.7 Resultado del análisis elemental de residuo sólido post hidrólisis

4.7.1 Resultado del análisis de carbono orgánico total

Para calcular la concentración y la cantidad es necesario utilizar la ecuación de curva de calibración que ya tiene el laboratorio y cuyo muestreo es de:

$$f(x) = 5127.8194(x) - 5.0568 \quad \rho_{\theta} = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta) \quad \text{Ec. 10}$$

El espectrofotómetro arroja una absorbancia de 0.472. Reemplazando este valor en la ecuación $\rho_{\theta} = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta)$ Ec. 10, la concentración es de:

$$f(0.472) = 5127.8194(0.472) - 5.0568 = 2415.2740 \left[\frac{mg}{L} \right] \text{COT}$$

Así, el porcentaje se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$CO \left(\frac{mg}{mg} \right) = ppm \text{ en } CC * D_m * D_v \quad \rho_{\theta} = \frac{m_3 - m_1}{v_d} + k(\theta_d - \theta) \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

$ppm \text{ } CC$ = partes por millón en la curva de calibración

D_m = Dilución de masa (mililitros de extractante/gramos de muestra)

D_v = Dilución de volumen (aforo/alícuota), entiéndase por aforo a la dilución de agua destilada agregada al final del proceso y alícuota los mililitros de extractante

$$CO \left(\frac{mg}{mg} \right) = 2415.2740 \left[\frac{mg}{L} \right] * \frac{15 [mL]}{0.25 [g]} * \frac{50 [mL]}{15 [mL]} * \frac{1 [L]}{1000 [mL]} * \frac{1 [g]}{1000 [mg]} = 0.4830$$

Entonces la concentración de carbono orgánico total es de 48.30%, cumpliendo así con el estándar que pide la norma, pues debe ser mayor a 15%. [48]

4.7.2 Resultado del análisis de fósforo total

Después de realizar el método explicado en el apartado 3.7.2, se comprobó que la muestra se encontró en el rango de pH encontrado en [50], dando como resultado 0,8 ,luego se pasó la muestra por el espectrofotómetro, obteniendo un resultado de 5,4 mg/l y una absorbancia de 0,690.

4.7.3 Resultado del análisis de potasio total

Después de realizar el método turbidimétrico explicado en el apartado 3.7.3, se comprobó que la muestra se encontró en el rango de pH encontrado en [51], dando como resultado 10. Se realizó la prueba primero por el catálogo 114562, pero se obtuvo un resultado de

300 mg/l excediendo el rango establecido de 50 mg/l, por lo que se debió tomar el catálogo 100615; aplicando el procedimiento descrito por dicho catálogo se obtuvo 300 mg/l de potasio, además de una absorbancia de 2,917.

4.7.4 Resultado del análisis de nitrógeno total

Después de realizado el proceso y pasada la cubeta en el fotómetro se obtuvo una concentración de 94 mg/L de nitrógeno, registrando una absorbancia de 0.659.

Los resultados de todos los parámetros requeridos por la norma se muestran a continuación (Tabla 31):

Tabla 31 Resultados de análisis elemental de residuo orgánico post hidrólisis

Parámetro	Concentración [mg/L]	Absorbancia	% [mg/mg]
Carbono orgánico total	2415.2740	0.472	48.30
Fosforo total	5.4	0.690	-
Potasio total	300	2.971	-
Nitrógeno total	94	0.659	-

Analizando la tabla 31, es posible ver que de acuerdo con los parámetros exigidos por la NTC 5167, el residuo sólido producto de la hidrólisis enzimática puede ser utilizado como abono orgánico. Hay que resaltar que para esto, es necesario hacerle un tratamiento al producto, para que su uso final sea este.

4.8 Resultados del análisis de cromatografía

Los resultados de concentración de etanol y metanol arrojados por la cromatografía se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 32 Resultados de concentración de etanol por análisis de cromatografía

Destilado producto de la hidrólisis enzimática por:	Prom. Concentración etanol (%V/V)	RSD
<i>Trichoderma</i> spp.	3.1	0.3
<i>Rhizopus</i> spp.	10.5	0.4
<i>Aspergillus niger</i>	1.8	0.2

Tabla 33 Resultados de concentración de metanol por análisis de cromatografía

Destilado producto de la hidrólisis enzimática por:	Prom. Concentración metanol (%V/V)	RSD
<i>Trichoderma</i> spp.	0.2	0.01
<i>Rhizopus</i> spp.	0.08	0.03
<i>Aspergillus niger</i>	0.1	0.02

En las figuras 1, 2 y 3 del anexo 5 se muestra los cromatogramas arrojados por el resultado del CG. Allí se observa como los picos de etanol del destilado producto de la hidrólisis enzimática por *Aspergillus niger* muestra la menor concentración al ser superpuesto con los cromatogramas de 1 y 5% de etanol. También es posible observar como el pico de etanol del destilado producto de la hidrólisis por *Rhizopus spp.*, está sobre la superposición del cromatograma de 10% de patrón de etanol. A partir de los valores de la tabla 18 y los de la tabla 32 se muestran las cantidades de volumen de etanol producido:

Tabla 34 Volumen de etanol de los destilados

Destilado producto de la hidrólisis enzimática por:	Volumen de destilado [mL]	Prom. Concentración etanol (%V/V)	Volumen de etanol [mL]
<i>Trichoderma spp.</i> (1)*	40.1	3.1	1.2431
<i>Rhizopus spp.</i>	22.3	10.5	2.3415
<i>Aspergillus niger</i>	96.9	1.8	1.7442

* La muestra hace referencia al producto de destilado de la réplica 1, hidrólisis enzimática causada por *Trichoderma spp.*

Rhizopus spp. se muestra según la tabla 34 como el mejor hongo para la hidrólisis enzimática, pues produjo 2.34 mililitros de etanol.

5. Simulación de la línea de producción en Aspen plus®

Esta fase consiste en la evaluación a mayor escala de la línea de producción de bioetanol a partir de la torta de higuera. Para ello se ha usado el software de simulación comercial ASPEN PLUS®.

Cabe resaltar que no se realizó un escalado del proceso, sino simplemente se evaluó la producción con mayor cantidad de materia prima, manteniendo parámetros de producción a nivel de laboratorio, es decir, parámetros como coeficiente de reacciones, y temperaturas, fueron utilizadas según datos a producción piloto en laboratorio. Esto porque el fin de un escalado es lograr la exitosa puesta en marcha y la operación económica de una unidad a escala comercial. Esta definición fue tomada de Gonzales. R. en su libro Principios básicos de escalado[54]. Allí también define que:

“El escalado de los biorreactores discontinuos en la mayoría de los casos se lleva a cabo multiplicando el volumen de reacción por el factor de escala y no requiere de plantas piloto ni mockups, aunque la transferencia de calor puede ser importante en ocasiones”. Roberto Gonzales Castellanos. Principios básicos de escalado.[54]

Teniendo en cuenta que el proceso se realizó con temperatura y presión ambiente, las condiciones para realizarlo a escala mayor solo serían por medio de un escalado con simetría geométrica. Es por esto que se tomaron los mismos coeficientes de reacción en la hidrólisis, que es la etapa clave del proceso, y no se realizó escalado de la unidad. Después de este proceso, la simulación se llevó a cabo tomando data de referencia para su ejecución.

La implementación del proceso en el software consta de varias etapas, cuyo orden es exigido por el ASPEN PLUS®. Las etapas seguidas fueron:

- Definición de componentes
- Implementación de diagrama de bloques
- Definición de corrientes y condiciones de operación
- Análisis de resultados

Antes de realizar estos pasos es necesario definir la escala del proyecto. Cabe resaltar que en Colombia es necesario importar la semilla de higuera, pues no es del interés su cultivo para el agricultor del país[55]. 1 hectárea tiene la capacidad de producir entre 3 y 4 toneladas por año[56]. Con el objetivo de que se pueda implementar, se evaluó la producción que tendrían dos mil hectáreas de cultivo de higuera. Esta cifra fácilmente se puede alcanzar teniendo en cuenta su rentabilidad [57] y que para el 2007 se cultivó cerca de mil hectáreas de higuera [58]. Por lo tanto, anualmente se tendría una producción de 7000 toneladas anuales de semilla, lo que equivale aproximadamente a 3640 toneladas de torta de higuera por año, es decir 10,11 toneladas diarias.

5.1 Definición de componentes

El software de simulación contiene una gran cantidad de bases de datos con las propiedades de los compuestos químicos que se necesitan para llevar a cabo esta simulación. Sin embargo, no es posible simular el proceso de hidrólisis con microorganismos vivos, por lo que fue necesario utilizar la enzima celulasa comercial, de *Trichoderma spp.* Para la obtención de las propiedades de este compuesto se ha recurrido a las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information*, más específicamente a PubChem.

Los componentes que no se encontraban en la bases de datos de aspen como la lignina, las proteínas, entre otras; se definieron como compuestos sólidos, y se le añadieron las propiedades que exige el software. Se definieron como compuestos sólidos la celulosa y el xilano, pues están hacen parte de la torta de higuera. La composición de la torta de higuera que se tuvo en cuenta para realizar la simulación, es la mostrada en la tabla 6, tomando como cantidad de celulosa, la medida en laboratorio. De estos compuestos lo que necesitaron ser definidos fueron los siguientes:

- Lignina
- Extractivos
- Proteína
- Enzima celulasa

La lista de componentes se muestra en la figura 31. Para los compuestos no definidos fue necesario definir propiedades de tipo “SCALAR” que se proporciona directamente su valor, y “T-DEPENDENT” que utiliza correlaciones que dependen de la temperatura. En la tabla 35, se observa que tipo de propiedades son de tipo “SCALAR” o “T-DEPENDENT”, con su nomenclatura. Los datos recopilados para estas propiedades y su respectiva referencia se recogen en el Anexo 4.

Figura 31 Lista de compuestos para la simulación en Aspen ®

Component ID	Type	Component name	Alias
CELLULOS	Solid	CELLULOSE-R	C6H1005-R-1
GLUCOSE	Conventional	DEXTROSE	C6H1206
XYLOSE	Conventional	XYLOSE	C5H1005-D2
XYLAN	Solid	GLUTARIC-ACID	C5H804
GLUCOLIG	Conventional	DEXTROSE	C6H1206
CELLOB	Conventional	DEXTROSE	C6H1206
ETHANOL	Conventional	ETHANOL	C2H6O-2
H2O	Conventional	WATER	H2O
NAACL	Conventional	SODIUM-CHLORIDE	NAACL
CO2	Conventional	CARBON-DIOXIDE	CO2
CELLULAS	Solid		
LIGNIN	Solid		
PROTEIN	Solid		
EXTRACTI	Solid		

Fuente: Autores.

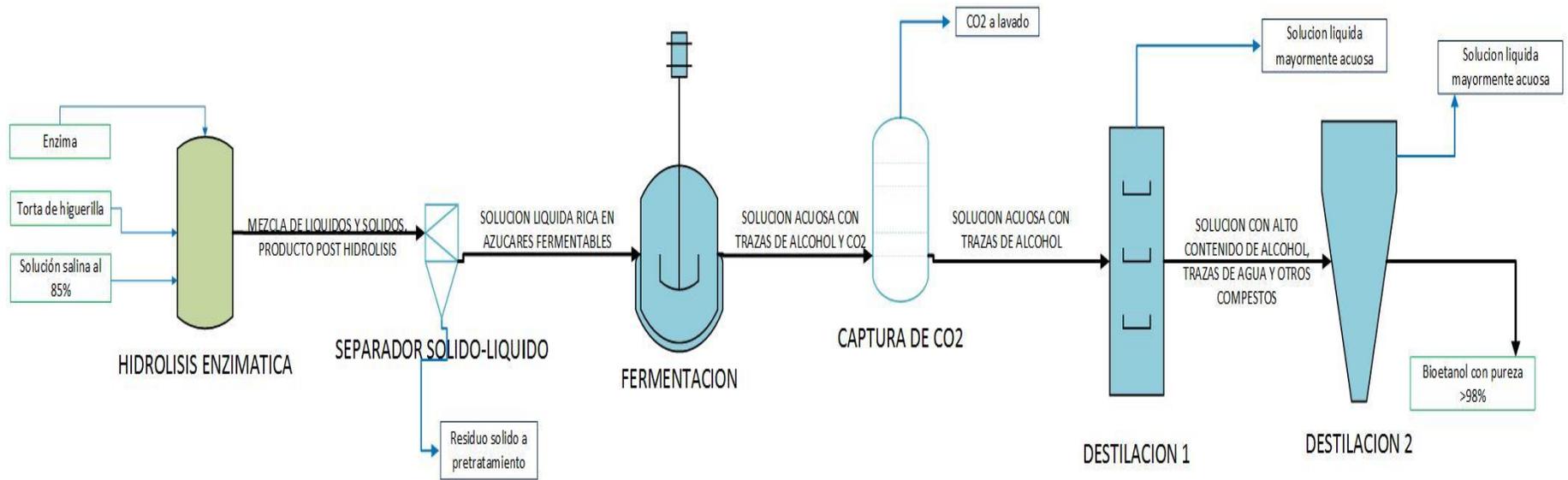
Tabla 35 Propiedades, nomenclatura y tipo de propiedad para definición en Aspen plus ®

PROPIEDAD	NOMENCLATURA	TIPO
Peso molecular	MW	SCALAR
Volumen molar de sólido	VSPOLY	T-DEPENDENT
Capacidad calorífica	CPSP01	T-DEPENDENT
Calor de formación	DHSFRM	SCALAR

5.2 Implementación del diagrama de bloques

El diagrama de bloques a implementar en el software ASPEN PLUS® es el que se muestra en la figura 32. Allí se muestra la línea de producción, teniendo como entradas la torta de higuera, la enzima y la solución salina con la cual se realiza el lavado del biorreactor. Luego pasa a un separador solido-liquido del que se obtienen dos corrientes, una liquida con los azucres fermentables, y otra en donde con el residuo sólido, que iría a otra línea de tratamiento para posible uso como abono orgánico. La solución post-hidrólisis pasa por los fermentadores y posteriormente, este jugo pasa a un proceso de separación de CO₂ y de la solución acuosa con trazas de etanol. Sigue el proceso de destilación del cual se obtiene una corriente con el bioetanol, y otra corriente de agua y otros compuestos. Así entonces se inició la construcción de la simulación.

Figura 32 Diagrama de bloques a implementar en Aspen plus ®

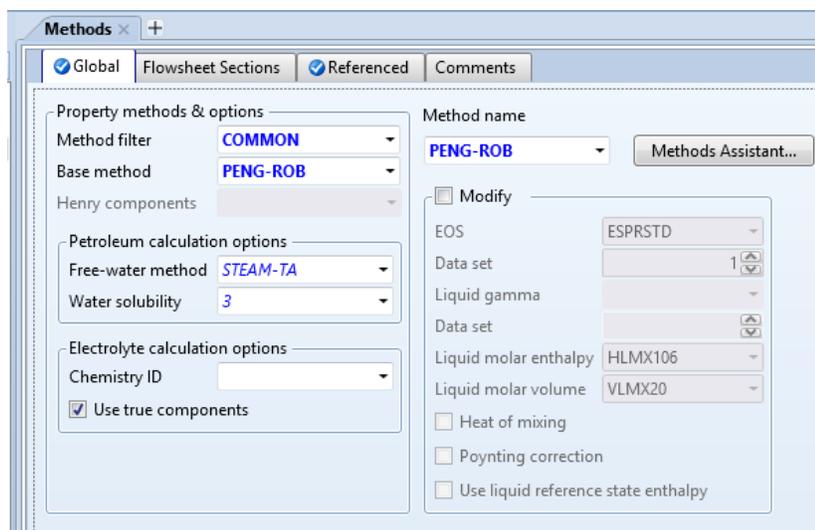


Fuentes: Autores

5.2.1 Construcción de la simulación

En la figura 33 se puede observar el método a utilizar para esta simulación que fue “PENG-ROB”, que utiliza la ecuación de estado Peng-Robinson, pues es una de las más utilizadas para este tipo de procesos.[59]

Figura 33. Métodos y propiedades para la simulación.

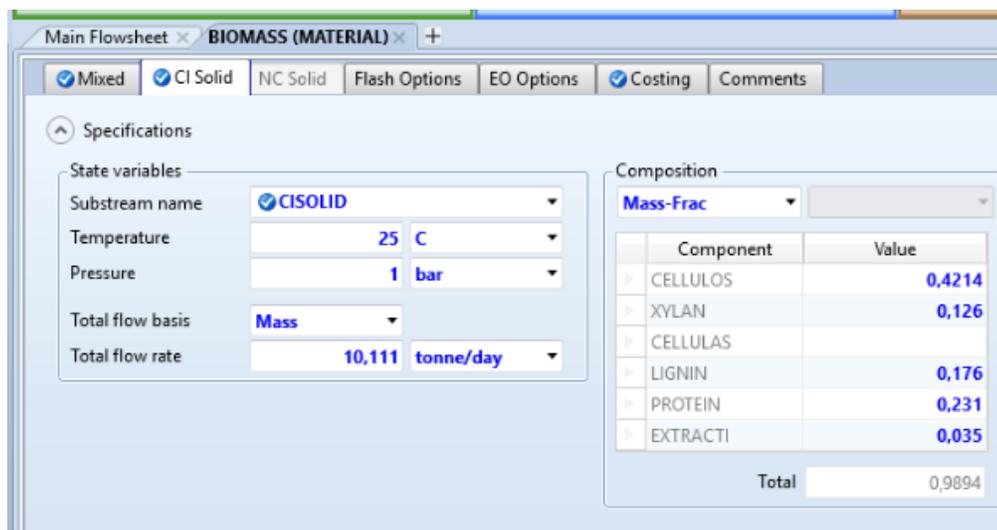


Fuente: Autores

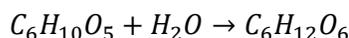
Posteriormente se procedió a implementar el diagrama de bloques en el flowsheet. El primer equipo fue el biorreactor de hidrólisis (*HE-101*), que se diseñó como estequiométrico, en donde a partir de celulosa y agua por medio de la enzima celulasa ocurre un rompimiento de los enlaces y la posterior formación de glucosa.

El biorreactor cuenta con tres corrientes de entrada. La corriente “*BIOMASS*” se define según la composición que se evidencia en la figura 34 en donde se muestra la definición de la corriente.

La corriente “*SALINSOL*” contiene agua con solución salina al 85% por lo que se le agregó agua y cloruro de sodio en relación 1000:8,5, es decir, por 1000 gramos de agua destilada, es necesario agregar 8,5 gramos de NaCl.

Figura 34 Composición de la corriente “BIOMASS”

La corriente “ENZYME” contiene agua con solución salina por medio de la cual se prepara la celulasa comercial producto de *Trichoderma* spp. Como el software no permite simular el crecimiento del microorganismo, se relacionó la cantidad enzima con el rendimiento del agua en la reacción de hidrólisis. El rendimiento de la reacción se tomó a partir de los datos experimentales de la réplica (I) por hidrólisis enzimática de *Trichoderma* spp. Teniendo en cuenta que se tienen concentraciones (% by mass) de glucosa final y celulosa inicial de aproximadamente 17% y 42,3% respectivamente, estableciendo 1000 gramos de torta de higuera, se tendrían 170 gramos de glucosa y 423 gramos de celulosa. El rendimiento fue calculado por medio de estequiometría de reacciones químicas[60]:



El rendimiento del agua se calculó de la siguiente manera:

$$170[g]C_6H_{12}O_6 * \frac{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6}{180,156[g]C_6H_{12}O_6} * \frac{1 \text{ mol } H_2O}{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6} * \frac{18[g]C_6H_{10}O_5}{1 \text{ mol } H_2O} \cong 17[g]C_6H_{10}O_5$$

Por lo tanto la cantidad de enzima celulasa que se agrega para un kilogramo, habrá de ser de 17 gramos. Entonces, para 10,11 toneladas/día es necesario 172 kg/día. Este valor varía de manera lineal según la cantidad de torta a simular, pues los valores de rendimiento se mantendrán constantes en el proceso de simulación.

En cuanto a las reacciones requeridas en el biorreactor, se introdujeron las reacciones 1 y 2 [61] de celulosa a glucosa y de xilosa a xilano respectivamente. Los rendimientos de reacción fueron calculados con datos experimentales por medio de estequiometría de reacciones químicas para la celulosa y tomados de data teórica para la xilosa. Es necesario calcular la cantidad de celulosa que realmente reaccionó y se realiza así:

$$170[g]C_6H_{12}O_6 * \frac{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6}{180,156[g]C_6H_{12}O_6} * \frac{1 \text{ mol } C_6H_{10}O_5}{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6} * \frac{162,14[g]C_6H_{10}O_5}{1 \text{ mol } C_6H_{10}O_5} = 153[g]C_6H_{10}O_5$$

$$\text{rendimiento \%} = \frac{\text{Rendimiento de la reacción}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100 = \frac{153[g]C_6H_{10}O_5}{423[g]C_6H_{10}O_5} * 100 = 36,17\%$$

De esta manera las reacciones de hidrólisis y sus rendimientos se plasman en la siguiente figura 35:

Figura 35. Reacciones de hidrólisis y sus rendimientos

Rxn No.	Specification type	Molar extent	Units	Fractional conversion	Fractional Conversion of Component	Stoichiometry
3	Frac. conversion		kmol/hr	0.36	CELLULOS	CELLULOS(CISOLID) + H2O --> GLUCOSE(MIXED)
7	Frac. conversion		kmol/hr	0	XYLAN	XYLAN(MIXED) + H2O --> XYLOSE(MIXED)

Fuente: Autores

El separador (*SEP-101*) se diseña como un separador de sólido se diseña con temperatura y presión atmosférica. El reactor de fermentación (*FERM-101*) se diseña como estequiométrico operado en condiciones isotérmicas a 37°C [62], en donde ocurren las reacciones de producción de etanol, a partir de glucosa y cuyas conversiones son del 95% [62], [63][61]. Estas reacciones y sus coeficientes se muestran en la figura 36.

Figura 36 Reacción de unidad fermentadora "*FERM-101*"

Rxn No.	Specification type	Molar extent	Units	Fractional conversion	Fractional Conversion of Component	Stoichiometry
1	Frac. conversion		kmol/hr	0.95	GLUCOSE	GLUCOSE --> 2 ETHANOL(MIXED) + 2 CO2(MIXED)

Los productos obtenidos son sometidos a diferentes etapas de purificación. El primer paso es separar el dióxido de carbono (CO₂) de la solución líquida con trazas de etanol, adaptando los diseños de la simulación desarrollada por Aspen Plus [61]. La separación consta de un separador flash (*FLH-101*) operado a 30°C y 1 bar. Esta corriente gaseosa pasa por una torre de absorción para separar el agua y etanol del CO₂, por lo que se emplea una torre de absorción (*TA-101*) de 10 platos para recuperar el etanol de la corriente gaseosa.

La corriente líquida "*TO-DESTI*" está compuesta de una solución líquida con trazas de agua y etanol, por lo que ingresa a una torre de destilación (*TD-101*) de 9 platos con el fin de purificar el bioetanol.

En la tabla 36 se muestran las condiciones operativas y de diseño de todos los equipos que hacen parte de la línea de producción:

Tabla 36 Condiciones operativas de los equipos de la línea de producción.

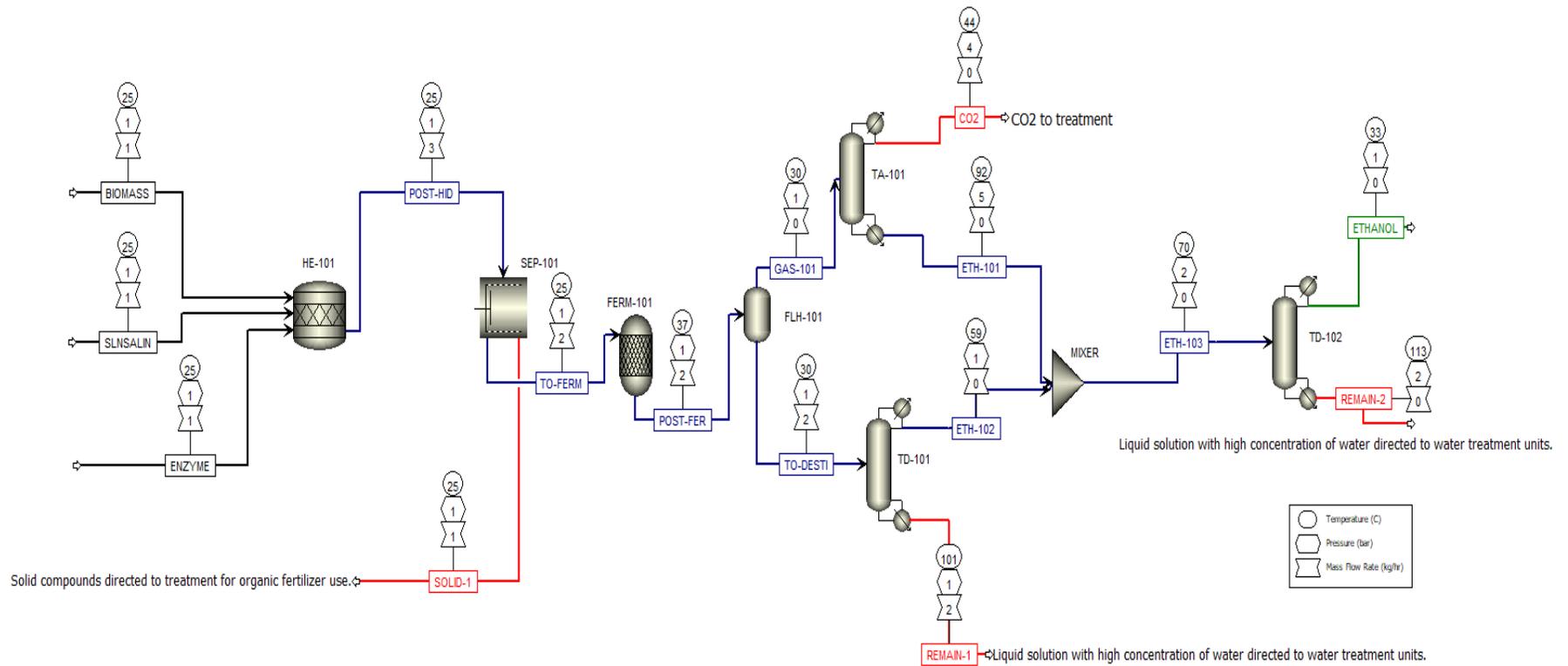
Unidad	T [°C]	P [bar]	P condenser [bar]	P reboiler [bar]	Numero de platos
<i>HE-101</i>	25	1	-	-	-
<i>SEP-101</i>	25	1	-	-	-
<i>FERM-101</i>	37	1	-	-	-
<i>FLH-101</i>	30	1	-	-	-
<i>TA-101</i>	-	-	4	4.5	10
<i>TD-101</i>	-	-	0.9	1	9
<i>TD_102</i>	-	-	1	1.5	10
<i>Mixer</i>	-	1	-	-	-

5.3 RESULTADOS DE LA SIMULACION DE LA LINEA DE PRODUCCION EN ASPEN PLUS®

El montaje del flowsheet se muestra en la figura 37. Para evaluar los resultados, se dividirá la producción en las etapas principales con las que consta el proceso de simulación que son:

- Hidrólisis enzimática
- Fermentación y captura de carbono
- Destilación

Figura 37 Diagrama de proceso implementado en Aspen ®

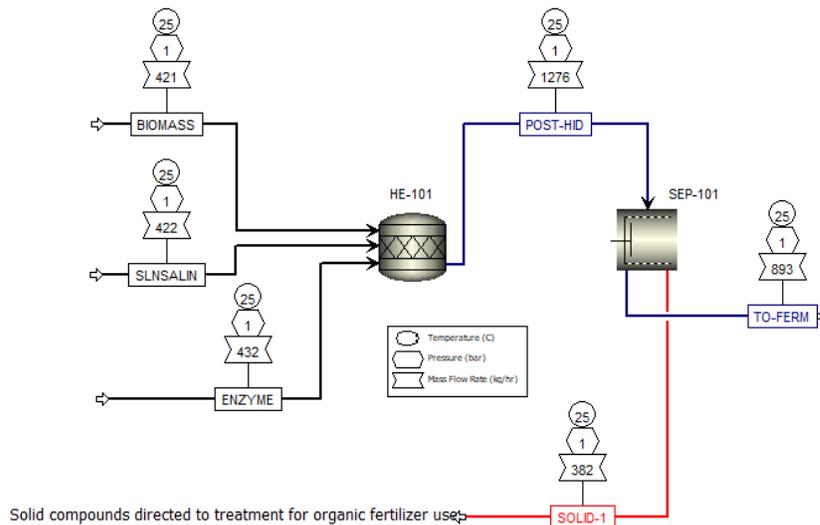


Fuente: Autores.

5.3.1 Resultados de simulación de hidrólisis enzimática

La etapa de hidrólisis enzimática comprende desde la entrada de las materias primas, hasta el separador (*SEP-101*) como se puede observar en la figura 38.

Figura 38 Etapa de hidrólisis enzimática en Aspen plus®



Fuente: Autores.

Teniendo en cuenta las corrientes post hidrólisis y las corrientes que salen del separador, sus resultados se muestran en la tabla 37. En los resultados es posible observar como el biorreactor lleva a cabo el proceso de hidrólisis, dando como resultado un producto con 0.714 de fracción masa líquida y 0.2852 de masa sólida. Evaluando la ruta *SOLID-1* en la cual se tiene la torta post hidrólisis, se ve una materia orgánica rica en ligninas (MF: 0.1961) y en proteínas (MF: 0.2575). El líquido que sale a la fermentación contiene concentraciones másicas de glucosa, cercanas al 0.07. Esto muestra que a partir de los 10.111 kg de torta por día, 1722,5 kg diarios de glucosa se están formando en el biorreactor de hidrólisis.

Tabla 37 Resultados de etapa de hidrólisis enzimática en Aspen plus®

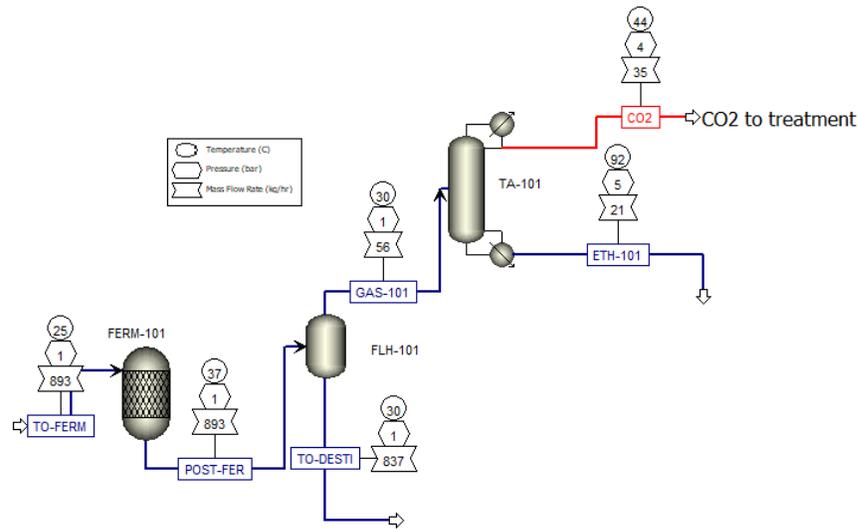
Stream Name	Units	POST-HID		SOLID-1		TO-FERM	
From		HE-101		SEP-101		SEP-101	
To		SEP-101				FERM-101	
Stream Class		MIXCISLD		MIXCISLD		MIXCISLD	
Temperature	C	25		25		25	
Pressure	bar	1		1		1	
		Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions
CELLULOS	kg/hr	114,838	0,0900333	114,838	0,300583	0	0
GLUCOSE	kg/hr	71,7735	0,0562706	1,43231	0,00374902	70,3412	0,0787294
XYLOSE	kg/hr	0	0	0	0	0	0
XYLAN	kg/hr	53,6515	0,0420629	53,6515	0,14043	0	0
ETHANOL	kg/hr	0	0	0	0	0	0
H2O	kg/hr	832,736	0,652867	16,6181	0,0434971	816,118	0,913439
NACL	kg/hr	7,13926	0,0055972	0,142471	0,000372912	6,99679	0,00783115
CO2	kg/hr	0	0	0	0	0	0
CELLULAS	kg/hr	7,16196	0,00561499	7,16196	0,0187461	0	0
LIGNIN	kg/hr	74,9717	0,0587545	74,8717	0,196157	0	0
PROTEIN	kg/hr	98,361	0,0771153	98,361	0,257456	0	0
EXTRACTI	kg/hr	14,9032	0,0116841	14,9032	0,0390084	0	0
Molar Vapor Fraction		0		0		0	
Molar Liquid Fraction		0,886069		0,134351		1	
Molar Solid Fraction		0,113931		0,865649		0	
Mass Liquid Fraction		0,714735		0,047619		1	
Mass Vapor Fraction		0		0		0	
Mass Solid Fraction		0,285265		0,952381		0	
Mass Flows	kg/hr	1275,51		382,05		893,456	
Volume Flow	l/min	18,9492		4,52834		14,4208	

5.3.2 Resultados de simulación de fermentación y captura de carbono

La etapa de fermentación comprende desde la entrada de la corriente "TO-FERM" hasta las corrientes "TO-DESTI y GAS-101". Este último producto sale a la torre de absorción como se puede observar en la figura 39.

La fermentación se lleva a cabo en la unidad (FERM-101) cuyos resultados se plasman en la tabla 38 junto con los resultados de la corriente "POST-FER" y "GAS-101" que detallan la composición de la línea de salida del fermentador.

Figura 39 Etapa de fermentación en Aspen plus ®



Fuente: Autores

Tabla 38 Resultados de proceso de fermentación en Aspen plus ®

Stream Name	Units	POST-FERM		GAS-101		TO-DESTI	
From		FERM-101		FLH-101		FLH-101	
To		FLH-101		TA-101		TA-101	
Stream Class		MIXCISLD		MIXCISLD		MIXCISLD	
Temperature	C	37		30		30	
Pressure	bar	1		1		1	
		Mass Flows	Mass Fractio	Mass Flows	Mass Fractio	Mass Flows	Mass Fractions
CELLULOS	kg/hr	0	0	0	0	0	0
GLUCOSE	kg/hr	3,51706	0,00393647	5,56850E-11	9,94178E-13	3,51706	0,00419975
XYLOSE	kg/hr	0	0	0	0	0	0
XYLAN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
ETHANOL	kg/hr	34,1756	0,0382513	22,5679	0,402917	11,608	0,0138613
H2O	kg/hr	816,118	0,913439	0,812154	0,0144999	815,306	0,973564
NACL	kg/hr	6,99679	0,00783115	4,07147E-30	7,26903E-32	6,99679	0,00835493
CO2	kg/hr	32,6483	0,0365415	32,6311	0,582583	0,0171113	2,04E+00
CELLULAS	kg/hr	0	0	0	0	0	0
LIGNIN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
PROTEIN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
EXTRACTI	kg/hr	0	0	0	0	0	0
Molar Vapor Fraction		0,0286216		1		0	
Molar Liquid Fraction		0,971378		0		1	
Molar Solid Fraction		0		0		0	
Mass Liquid Fraction		0,934697		0		1	
Mass Vapor Fraction		0,0653033		1		0	
Mass Solid Fraction		0		0		0	
Mass Flows	kg/hr	893,456		56,0111		837,445	
Volume Flow	l/min	583,644		528,862		14,0159	

La solución post fermentador contiene una solución con mayor concentración de agua, y una concentración del 3.9% para el etanol y del 3.6% de CO₂. Esta corriente contiene vapor y líquido, predominando este último con una concentración másica de 0.934 respecto a 0.66 del vapor. En la línea GAS-101 se observa un contenido netamente gaseoso, con concentraciones mayoritarias de dióxido de carbono y de etanol. Mientras que en la

corriente “TO-DESTI” se observa una solución netamente líquida con el agua como predominante principal, estando en concentraciones de 0.97.

Es posible observar como el flujo másico del etanol es mayor que en la corriente que sale a destilación. Por lo tanto, se realizó un recobro del etanol en la torre de absorción “TA-101” con el fin de separar el dióxido de carbono y el etanol. Los resultados de las corrientes de salida se plasman en la tabla 39.

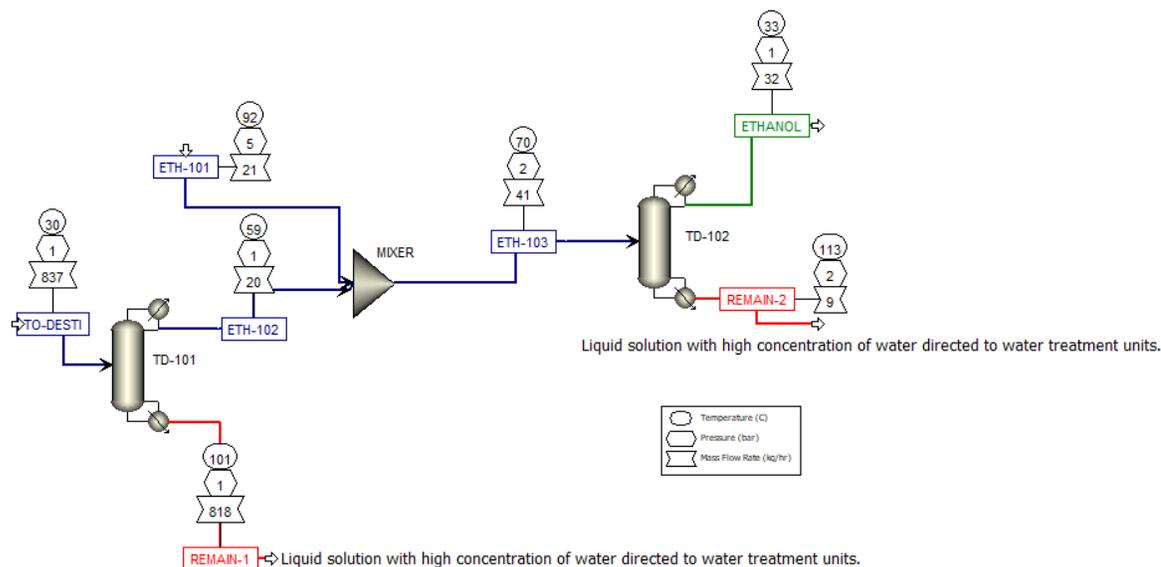
Tabla 39 Resultados de recobro de etanol y absorción de CO₂ en Aspen plus®

Stream Name	Units	ETH-101		CO2	
From		TA-101		TA-101	
To		MIXER			
Stream Class		MIXCISLD		MIXCISLD	
Temperature	C	91,6855		44,4895	
Pressure	bar	4,5		4	
		Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions
CELLULOS	kg/hr	0	0	0	0
GLUCOSE	kg/hr	0	0	0	0
XYLOSE	kg/hr	0	0	0	0
XYLAN	kg/hr	0	0	0	0
ETHANOL	kg/hr	20,3111	0,949624	2,25679	0,0652974
H2O	kg/hr	0,812154	0,0378635	0	0
NaCl	kg/hr	0	0	0	0
CO2	kg/hr	0,326311	0,015213	32,3048	0,934703
CELLULAS	kg/hr	0	0	0	0
LIGNIN	kg/hr	0	0	0	0
PROTEIN	kg/hr	0	0	0	0
EXTRACTI	kg/hr	0	0	0	0
Molar Vapor Fraction		0		1	
Molar Liquid Fraction		1		0	
Molar Solid Fraction		0		0	
Mass Liquid Fraction		1		0	
Mass Vapor Fraction		0		1	
Mass Solid Fraction		0		0	
Mass Flows	kg/hr	21,4495		34,5616	
Volume Flow	l/min	0,493897		84,274	

Como se puede observar en la corriente ETH-101 la fracción másica de etanol es de 0.94, y de CO₂ de 0.015, por lo que esta línea va a un mezclador con el producto de destilación de la unidad “TD-101” para su deshidratación y mayor purificación de bioetanol. La línea “CO2” muestra una concentración de 0.93, y un flujo másico de 32,31 kg/hora de dióxido de carbono. En comparación con el CO₂ que se produce en la fermentación que es de 32,65 kg/hora, la cantidad que se pudo extraer fue el 98.9% del total del producido.

5.3.3 Resultados de simulación de destilación

Se llevaron a cabo dos etapas de destilación tal como se observa en la figura 40, pues el contenido final debe contener un bioetanol con una pureza mayor del 98%.

Figura 40 Proceso de destilación y purificación de etanol en Aspen plus®

Fuente: Autores.

La primera unidad de destilación (*TD-101*) comprende desde la corriente “*TO-DESTI*” hasta las corrientes “*ETH-102*” y “*REMAIN-1*”. Los resultados de este proceso, tanto de las corrientes involucradas como la línea “*ETH-103*” resultante del mezclador (*Mixer*), se muestran en la tabla 40. Como resultado es posible observar cómo se pasa a tener un producto con menor concentración de agua y mayor de etanol. La línea “*ETH-102*” muestra una fracción másica de 0.58 para el etanol y de 0.41 para el agua siendo estos dos compuestos los predominantes para esta corriente. Es por esto que este producto se dirige a un proceso de mezclado en la unidad (*Mixer*) con la solución de la línea “*ETH-101*”. El remanente de la torre de destilación, contiene un flujo másico de 807,153 kg/hr de agua, que comparándolo con el agua que entra a la destilación que es de 815,306 kg/hr, se obtuvo una retención de agua de 99%. Después del mezclado se puede observar que se obtiene una solución con una fracción másica de 0.77 de etanol, en donde se comprueba la importancia del recobro de etanol en el proceso de separación de CO₂.

Tabla 40 Resultados de proceso de destilación de etanol en Aspen plus®

Stream Name	Units	ETH-102		REMAIN-1		ETH-103	
From		TD-101		TD-101		MIXER	
To		MIXER				TD-102	
Stream Class		MIXCISLD		MIXCISLD		MIXCISLD	
Temperature	C	58,8638		101,172		69,561	
Pressure	bar	0,9		1		2	
		Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions
CELLULOS	kg/hr	0	0	0	0	0	0
GLUCOSE	kg/hr	2,25608E-6	1,14705E-7	3,51706	0,00430073	2,25608E-6	5,48594E-8
XYLOSE	kg/hr	0	0	0	0	0	0
XYLAN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
ETHANOL	kg/hr	11,492	0,584461	0,11608	0,000141945	31,803	0,77357
H2O	kg/hr	8,15306	0,41465	807,153	0,987002	8,96521	0,218068
NACL	kg/hr	0,00036846	1,87395E-5	6,99642	0,00855536	0,00036846	8,96245E-6
CO2	kg/hr	0,017113	0,000870252	7,0035E-9	8,56017E-12	0,343423	0,00835334
CELLULAS	kg/hr	0	0	0	0	0	0
LIGNIN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
PROTEIN	kg/hr	0	0	0	0	0	0
EXTRACTI	kg/hr	0	0	0	0	0	0
Molar Vapor Fraction		0,0001		0		0,0042997	
Molar Liquid Fraction		0,9999		1		0,9957	
Molar Solid Fraction		0		0		0	
Mass Liquid Fraction		0,999863		1		0,995029	
Mass Vapor Fraction		0,000136946		0		0,00497079	
Mass Solid Fraction		0		0		0	
Mass Flows	kg/hr	19,6625		817,182		41,112	
Volume Flow	l/min	0,42857		14,6628		2,0691	

La cantidad de etanol que entra en la línea “ETH-101” y “ETH-102” es de 20,3111 kg/hr y 11,492 kg/hr respectivamente. Esto muestra que se obtiene el 63,9% del total del etanol, producto del recobro en el CO₂ y un 36,1% de la primera torre de destilación.

La segunda unidad de destilación comprende desde la corriente “ETH-103” hasta “EHTANOL” y “REMAIN-2”. Los resultados de estas dos últimas corrientes se muestran en la tabla 41. Allí es posible observar como a partir de esta destilación ha sido posible obtener el etanol en una fracción másica de 0,989. El flujo másico de etanol es de 31,8027 kg/hora, y en comparación con el etanol producido en la fermentación que es de 34,1756 kg/hora, se obtiene el 93% de la producción en la línea “POST-FERM”. La línea “REMAIN-2” contiene una fracción másica de 0,999 H₂O, es por esto que junto con la corriente “REMAIN-1”, se planea que pasen a un proceso de tratamiento de agua para su reutilización en el proceso.

Tabla 41 Resultados de proceso de purificación de etanol en Aspen plus®

Stream Name	Units	ETHANOL		REMAIN-2	
From		TD-102		TD-102	
To					
Stream Class		MIXCISLD		MIXCISLD	
Temperature	C	32,8419		112,98	
Pressure	bar	1		1,5	
		Mass Flows	Mass Fractions	Mass Flows	Mass Fractions
CELLULOS	kg/hr	0	0	0	0
GLUCOSE	kg/hr	5,22902E-12	1,62569E-13	2,25607E-6	2,51802E-7
XYLOSE	kg/hr	0	0	0	0
XYLAN	kg/hr	0	0	0	0
ETHANOL	kg/hr	31,8027	0,989041	0,00031803	3,55066E-5
H2O	kg/hr	0,00896521	0,000278812	8,95625	0,999923
NACL	kg/hr	8,54008E-10	2,6559E-11	0,000368463	4,11372E-5
CO2	kg/hr	0,343423	0,0106802	2,44387E-11	2,72847E-12
CELLULAS	kg/hr	0	0	0	0
LIGNIN	kg/hr	0	0	0	0
PROTEIN	kg/hr	0	0	0	0
EXTRACTI	kg/hr	0	0	0	0
Molar Vapor Fraction		0		0	
Molar Liquid Fraction		1		1	
Molar Solid Fraction		0		0	
Mass Liquid Fraction		1		1	
Mass Vapor Fraction		0		0	
Mass Solid Fraction		0		0	
Mass Flows	kg/hr	32,1551		8,95693	
Volume Flow	l/min	0,677668		0,165052	

A partir de 10 toneladas diarias de torta de ricino, es posible obtener 0,771 toneladas diarias de etanol, lo que traduce a 978,10 litros por día de etanol. Para obtener un contexto de la cantidad producida, en Colombia se producen 1'200.000 litros de etanol diarios [64], entonces a partir del aprovechamiento de este residuo, es posible generar el 0,085% de la producción nacional. El impacto podría ser positivo, pues se trata del uso de un residuo sólido producto de un proceso industrial, que en ningún momento compromete la seguridad alimentaria. Según la simulación, se obtuvo un rendimiento del proceso de 0,0771 toneladas de etanol por tonelada de torta de higuera, que en comparación con otras tecnologías como la obtención de etanol a partir de cascara de arroz en donde utilizan un retratamiento con ácido sulfúrico, obtienen un rendimiento de 0,2930 toneladas de etanol por toneladas de biomasa.[62] En otro estudio realizado en donde evalúan la producción de etanol por medio de bagazo de caña de azúcar, con un pretratamiento por medio de ácidos, obtienen un rendimiento de 0,1342 toneladas de etanol por tonelada de biomasa. Entonces en comparación, a pesar de tener un rendimiento en la reacción de hidrólisis tan bajo, es posible obtener una mejoría del proceso y aumentar el rendimiento de la producción de bioetanol.[65]

6. Análisis de impactos ambientales

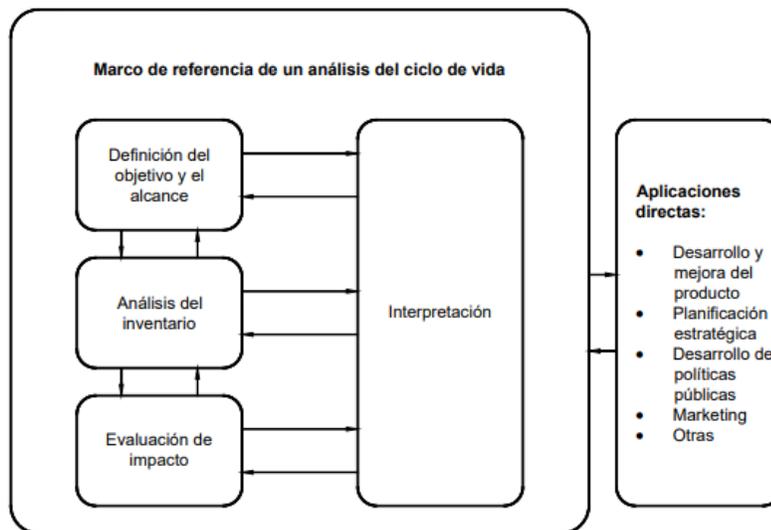
“El Análisis de Ciclo de Vida (ACV) es una herramienta de gestión medioambiental cuya finalidad es analizar de forma objetiva, metódica, sistemática y científica, el impacto ambiental originado por un proceso/producto durante su ciclo de vida completo”[66].

El consumo de materias primas, la energía requerida en procesos de manufactura, las emisiones y residuos obtenidos en cadenas de producción y los efectos ambientales generados en el fin de vida de un producto cuando este sea consumido o no se pueda utilizar más, son las consideraciones que se deben contemplar en un análisis de ciclo de vida (ACV) completo[67].

6.1 Metodología

Según la norma NTC-ISO 14040, la cual explica detalladamente las especificaciones para realizar un ACV; las cuatro fases esenciales de un proyecto asociado a este estudio son: objetivos y alcance del estudio, análisis de inventario, análisis del impacto e interpretación.

Figura 41 Marco de referencia de un análisis de ciclo de vida[68].



●**Definición del objetivo y alcance:** En esta fase se indican los objetivos que promueven el estudio, así como los límites del sistema a estudiar y la identificación de los componentes del ciclo de vida los cuales pueden ser: extracción, transporte, almacenamiento, producción, consumo, reciclaje y disposición final de los desechos[69].

●**Inventario de ciclo de vida:** “Esta fase consiste en la cuantificación de las entradas y salidas del sistema en estudio, en la que se incluye el uso de recursos (materias primas y energía), las emisiones a la atmósfera, suelo y aguas y la generación de residuos. Los datos obtenidos en esta fase son el punto de partida para la Evaluación de Impacto de Ciclo de Vida” [70].

●**Evaluación de impacto:** En esta etapa se evalúa la significancia de los potenciales impactos ambientales generados por la entradas y salidas del sistema del producto a analizar, teniendo respaldo de los resultados obtenidos del análisis del inventario[66].

La Evaluación de Impacto de Ciclo de Vida consta de tres etapas:

-Clasificación: En esta fase los datos obtenidos del inventario se ordenan en una categoría de impacto dependiendo del efecto ambiental esperado.

En esta fase asignan los datos procedentes del inventario a cada categoría de impacto según el tipo de efecto ambiental esperado. “Una categoría de impacto es una clase que representa las consecuencias ambientales generadas por los procesos o sistemas de productos”[71].

-Caracterización y análisis técnico de significancia (o normalización): “La caracterización es el cálculo de la contribución potencial de cada compuesto detectado en el análisis de inventario a un efecto ambiental”[70].

-Valoración: La finalidad de esta etapa es determinar las consecuencias ambientales que causan el menor impacto dentro del análisis de ciclo de vida completo mediante la comparación de los perfiles normalizados de cada efecto ambiental obtenidos en la etapa anterior a esta[70].

●**Interpretación:** En esta fase se tiene en cuenta los resultados del análisis de inventario y los de la evaluación de impacto, con el objetivo de definir en qué fase del ciclo de vida del producto se obtienen las mayores cargas ambientales y por tanto que etapas del sistema deben ser mejoradas. Los resultados de la interpretación generalmente son dados en forma de conclusiones o recomendaciones.

6.2 Definición del objetivo del ACV

El enfoque de este proyecto es el de realizar un análisis y perfil de impactos ambientales de la cadena de producción de bioetanol a partir de *Ricinus communis* (semilla de higuera) a escala de laboratorio desde el proceso de extracción de torta de higuera hasta la obtención del producto final, comparando la significancia de cada etapa de producción respecto a la generación de emisiones.

6.3 Unidad funcional

La unidad funcional escogida es la producción de 100 ml de bioetanol obtenidos de la torta de higuera.

6.4 Alcance del ACV

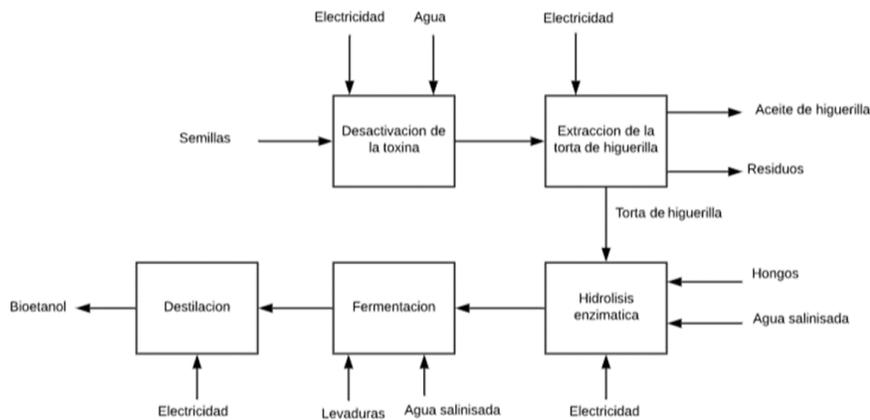
Es necesario definir los diferentes límites del ACV tanto geográficos y temporales, además, del sistema bajo estudio, contemplando los distintos procesos involucrados.

● **Límite geográfico:** Se estableció en la producción de bioetanol a escala del laboratorio del centro de investigación de biotecnología, bioética y ambiente (CINBBYA) de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB) localizada en la ciudad de Bucaramanga, Colombia.

● **Límite temporal:** Tiempo de la cadena productiva de bioetanol a partir de torta de higuera, desde la fase de extracción hasta la obtención del producto final, despreciando la fase agrícola, la fase de transporte, los procesos de medición de variables y la disposición final de los residuos.

● **Sistema bajo estudio:** En la figura 42 se muestra el diagrama de los procesos para la obtención de bioetanol; en un marco rojo se presentan los procesos que se tendrán en cuenta para el análisis de ciclo de vida con sus respectivas entradas y salidas requeridas para la etapa de inventario.

Figura 42 Proceso bajo estudio en el ACV



Fuente: Autores

● **Etapas excluidas de la cadena de producción:** La metodología de siembra de los hongos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp. y *Trichoderma* en los medios de cultivo, además, de su posterior inoculación para la realización de la hidrólisis enzimática no están contempladas en el ACV debido a la alta variabilidad de los procesos.

6.5 Inventario de ciclo de vida

En el inventario de ciclo de vida se recopilieron los datos de entrada y salida de cada proceso principal en la producción de bioetanol. Los flujos de los procesos se midieron con el fin de obtener un resultado más preciso de las cargas ambientales obtenidas en cada

etapa. Los distintos procesos analizados con sus respectivas entradas y salidas son los siguientes:

● **Desactivación de la toxina:**

Tabla 42 Inventario fase de desactivación de la toxina

Etapa de desactivación de la toxina			
Entradas	Materia	Valor	Unidad
	Semilla de higuera	1	kg
	Agua	2	L
	Energía		
	Horno	0,8	kWh
	Estufa eléctrica	0,275	kWh
Salida	Materia		
	Semilla sin toxina	1	kg

● **Extracción del aceite de higuera:**

Tabla 43. Inventario fase de extracción del aceite de higuera

Extracción del aceite de higuera			
Entradas	Materia	Valor	Unidad
	Semilla sin toxina	1	kg
	Energía		
Prensa	0,166	kWh	
Salida	Materia		
	Aceite de higuera	0,3434	kg
	Torta de higuera	0,52	kg
	Residuo	0,338	kg

● **Hidrólisis enzimática:**

Tabla 44 Inventario fase de hidrólisis enzimática

Hidrólisis enzimática			
Entradas	Materia	Valor	Unidad
	Cloruro sódico	8,5	g
	Agua destilada	1	L
	Enzimas	0,168	kg
	Torta de higuera	1	kg
	Energía		
Bomba	0,42	kWh	
Salidas	Materia		
	Solución post hidrólisis	0,7	L
	Residuo torta	0,6	kg

● **Fermentación:**

Tabla 45. Inventario fase de fermentación

Fermentación			
Entradas	Materia	Valor	Unidad
	Levadura	0,0034	kg
	Agua destilada	1	L
	Solución post hidrolisis	1	kg
	Energía		
	Bomba	0,252	kWh
Salidas	Materia		
	Solución post fermentación	0,25	L
	Gases		
CO2	3,6	g	

● **Destilación:**

Tabla 46. Inventario fase de destilación

Destilación			
Entradas	Materia	Valor	Unidad
	Solución post fermentación	0,25	L
	Energía		
Agitadora de platos calientes	1,32	kWh	
Salidas	Materia		
	Bioetanol	0,001	L

6.6 Evaluación de impacto

El software Sima pro tiene muchos métodos para evaluar los impactos ambientales pero el más utilizado y el cual se desarrollará en este proyecto es el método Recipe. El objetivo principal de este método es transformar la lista de resultados del inventario de ciclo de vida en un número limitado de indicadores por puntuación. Estos indicadores por puntuación expresan la severidad relativa en una categoría de impacto ambiental. En este método se determinan los indicadores en dos niveles:

- 18 indicadores Midpoint
- 3 indicadores Endpoint

Una diferencia importante entre los métodos de evaluación de impactos reside en la opción de analizar el efecto último del impacto ambiental, “Endpoint”, o bien, considerar los efectos intermedios, “Midpoint”. Las categorías de impacto ambiental intermedias se hallan más cercanas a la intervención ambiental, permitiendo, en general, modelos de cálculo que se ajustan mejor a dicha intervención. Las categorías de impacto finales son variables que afectan directamente a la sociedad, por tanto, su elección resultaría más relevante y comprensible a escala global. Las categorías Midpoint y Endpoint que se analizarán serán las siguientes (Tabla 47 y Tabla 48):

Tabla 47 Categorías de impacto Midpoint

Recipe Midpoint		
Categoría	Descripción	Unidad
Cambio climático	Se define como los impactos relacionados a la absorción de la radiación por la atmosfera, generando un aumento de la temperatura de la superficie del planeta [69].	kg CO2 eq
Acidificación terrestre	Se relaciona con los impactos ambientales generados por óxidos de azufre y nitrógeno presentes en la atmosfera que retornan a la superficie en forma de ácidos, resultando en la perdida de la neutralidad del agua y el suelo [69].	kg SO2 eq
Eutrofización del agua	Se basa en los impactos relacionados a la acumulación de los minerales y materia orgánica en ecosistemas acuáticos, generando un crecimiento de plantas y escasez de niveles de oxígeno [69].	kg P eq
Formación de ozono	Se basa en los impactos ambientales asociados a los compuestos orgánicos volátiles distribuidos en los NOx y la luz ultravioleta, que generan problemas para la formación de ozono [70].	kg NOX eq
Agotamiento de recursos fósiles	Este indicador de categoría de impacto está relacionado con el uso de combustibles fósiles. Dado a la continua demanda y a la limitada cantidad de alternativas para reemplazarlos, es de vital importancia controlar y cuantificar la utilización de los mismos [70].	kg oil eq

Fuente: [72][73]

Tabla 48 Categorías de impacto Endpoint

Recipe Endpoint		
Categoría	Descripción	Unidad
Daño a la salud humana	“En términos generales, se refiere al impacto en los seres humanos, como resultado de las emisiones de sustancias tóxicas al aire, al agua y al suelo”[74].	Daly
Daño a los ecosistemas	“Se refiere al impacto que propicia la pérdida de uno o varios elementos ambientales o procesos	Species-yr

	el ecosistema que desencadenan un desequilibrio ecológico”[75].	
Agotamiento de recursos	Esta categoría de impacto está relacionada con la salud humana y la estabilidad de los ecosistemas que se ven afectados por la extracción de diferentes minerales y recursos fósiles[76].	USD

Fuente:[74][75][76].

Las referencias y las potencias de los equipos usados en los procesos de obtención de bioetanol son mostradas en la tabla 49:

Tabla 49 Características de los equipos utilizados

Características equipos				
Equipo	Referencia	Potencia [kW]	Tiempo de uso [min]	Energía [kWh]
Estufa eléctrica	2P HACEB	1,1	15	0,275
Horno	Binder serie FD 23	0,8	60	0,8
Prensa de aceite	DL-ZYJ10	2	5	0,166
Bomba hidrolisis	ELITE 802	0,0035	7200	0,42
Bomba fermentación	ELITE 803	0,0035	4320	0,252
Agitadora de platos calientes	SP131010-33	0,44	180	1,32

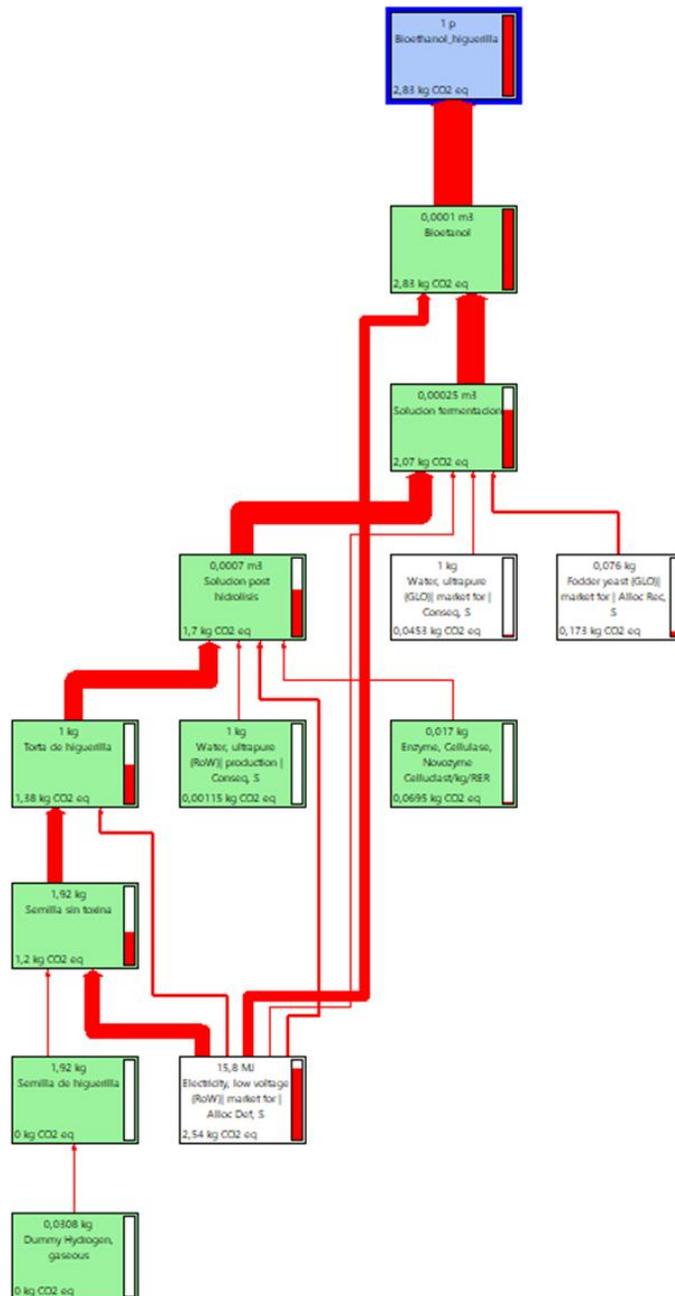
Fuente: Autores

7. Resultados de la simulación de los impactos ambientales

7.1 Categorías de impacto Midpoint

7.1.1 Cambio climático

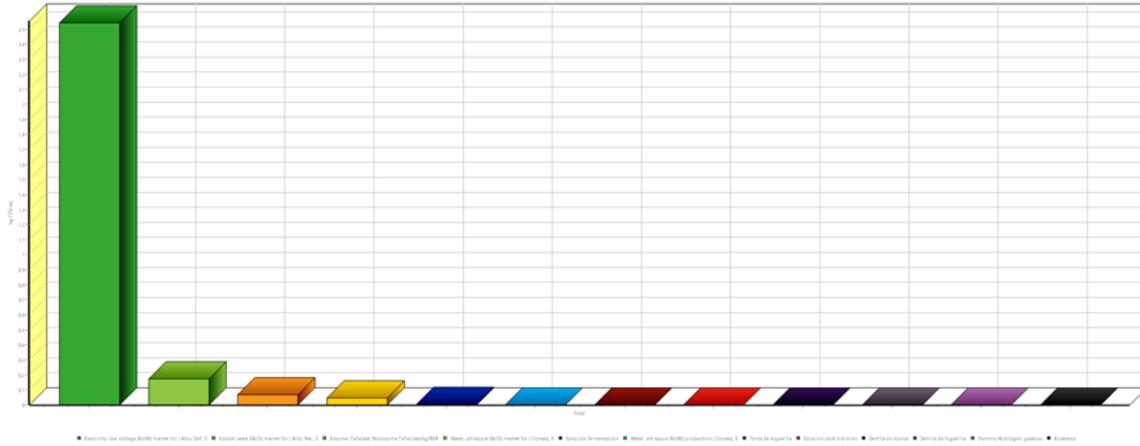
Figura 43 Distribución de impactos en la categoría de cambio climático



Fuente: Autores.

El diagrama de barras asociado a la categoría de cambio climático se muestra en la figura 44:

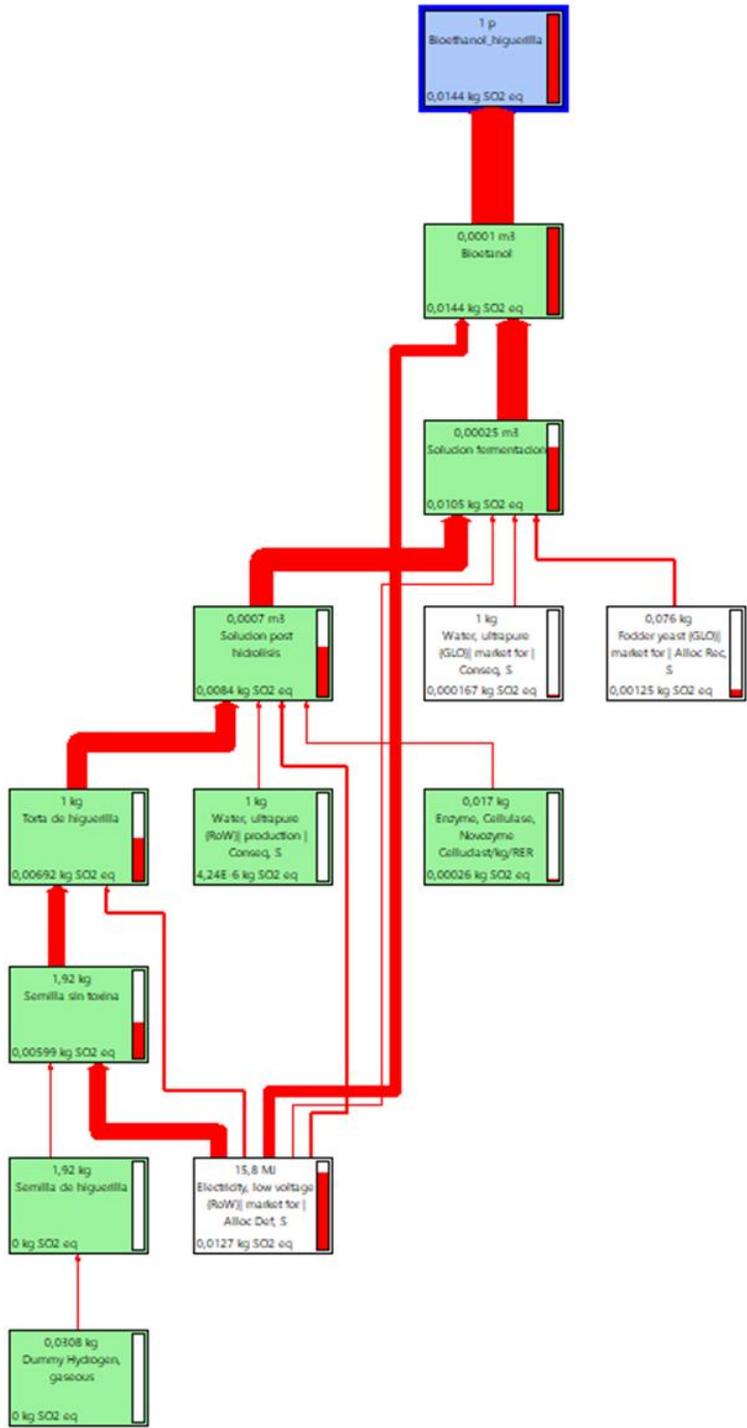
Figura 44. Diagrama de bloques de los impactos ambientales de la categoría de calentamiento global.



Fuente: Autores.

7.1.2 Acidificación terrestre

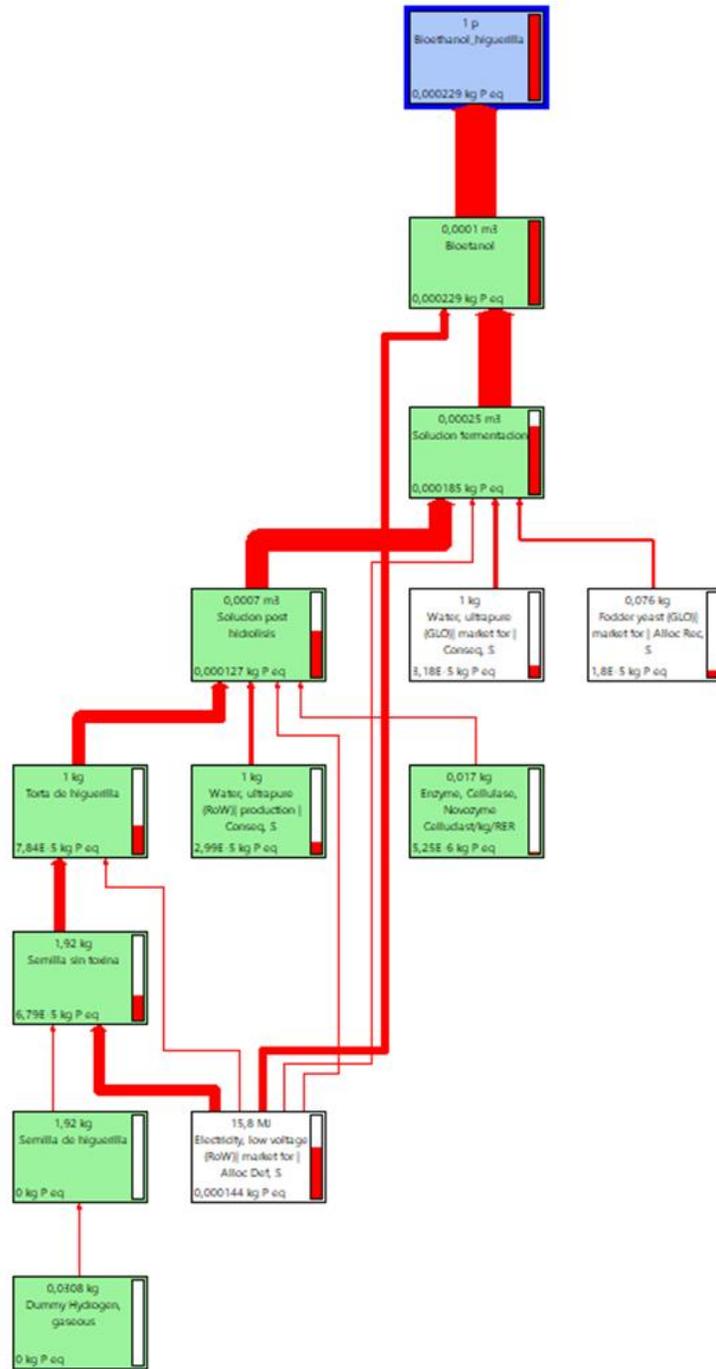
Figura 45 Distribución de impactos en la categoría de acidificación terrestre



Fuente: Autores.

7.1.3 Eutrofización del agua

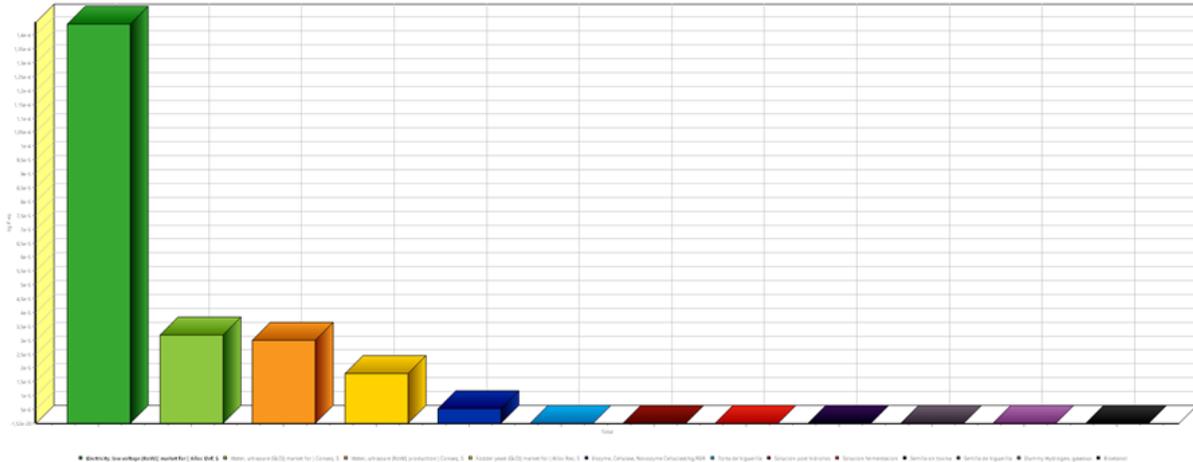
Figura 47 Distribución de impactos en la categoría de eutrofización del agua



Fuente: Autores.

El diagrama de barras de los procesos de la categoría eutrofización del agua se muestran a continuación (figura 48):

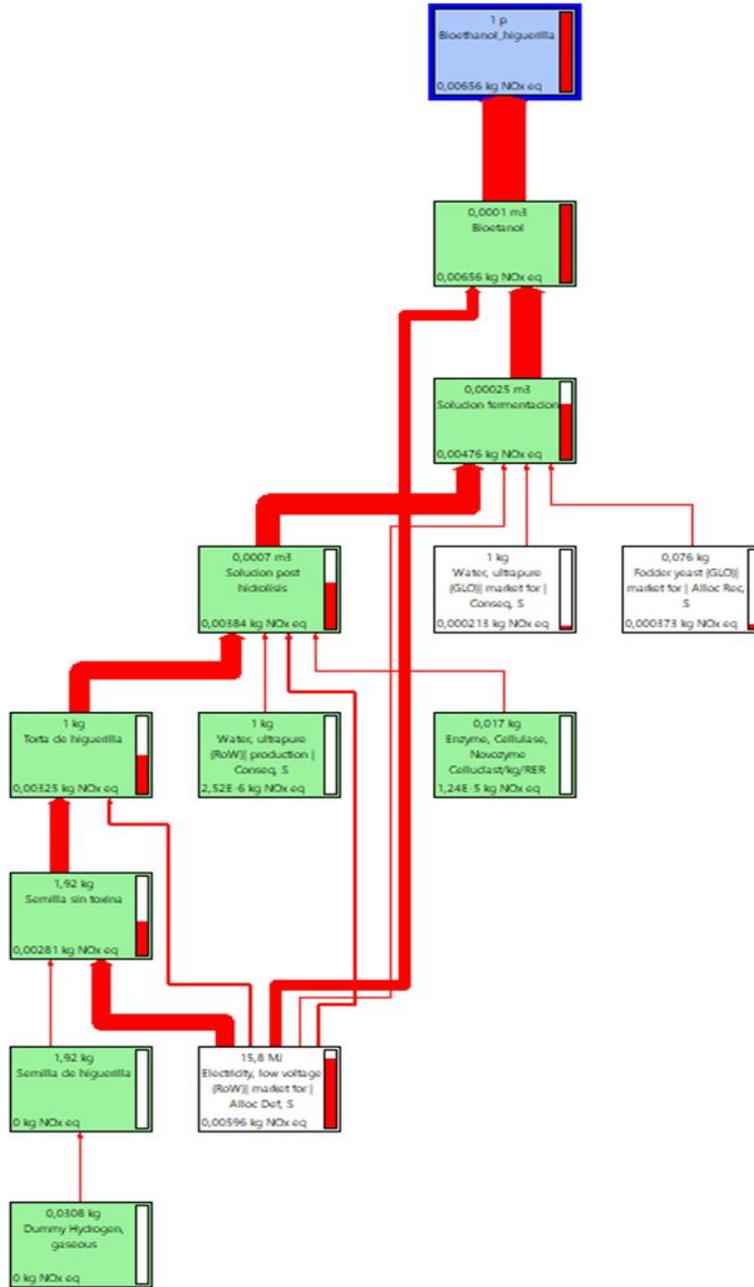
Figura 48. Diagrama de barras de los impactos ambientales de la categoría de eutrofización del agua.



Fuente: Autores

7.1.4 Formación de ozono

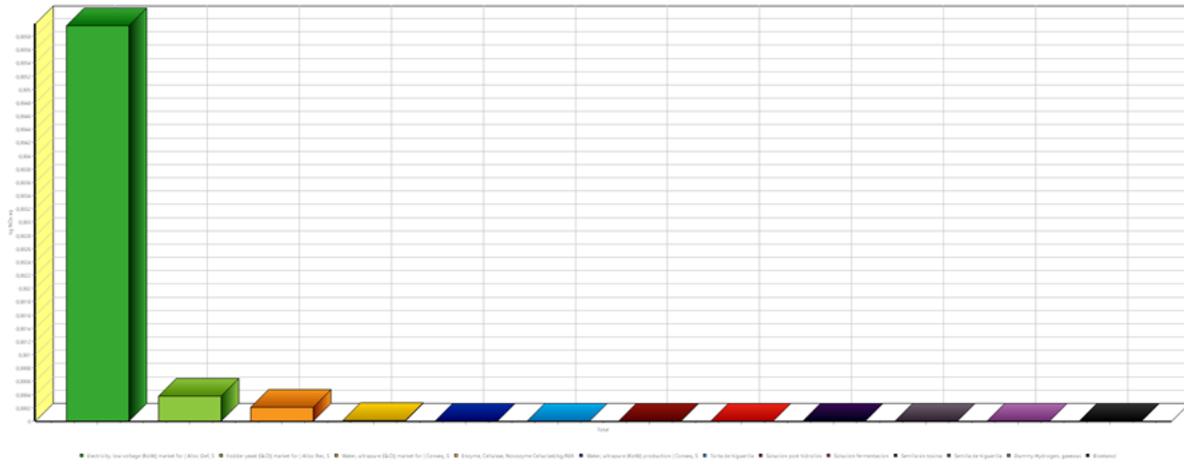
Figura 49 Distribución de impactos en la categoría de formación de ozono



Fuente: Autores.

El diagrama de barras asociado a la categoría formación de ozono se muestra en la figura 50:

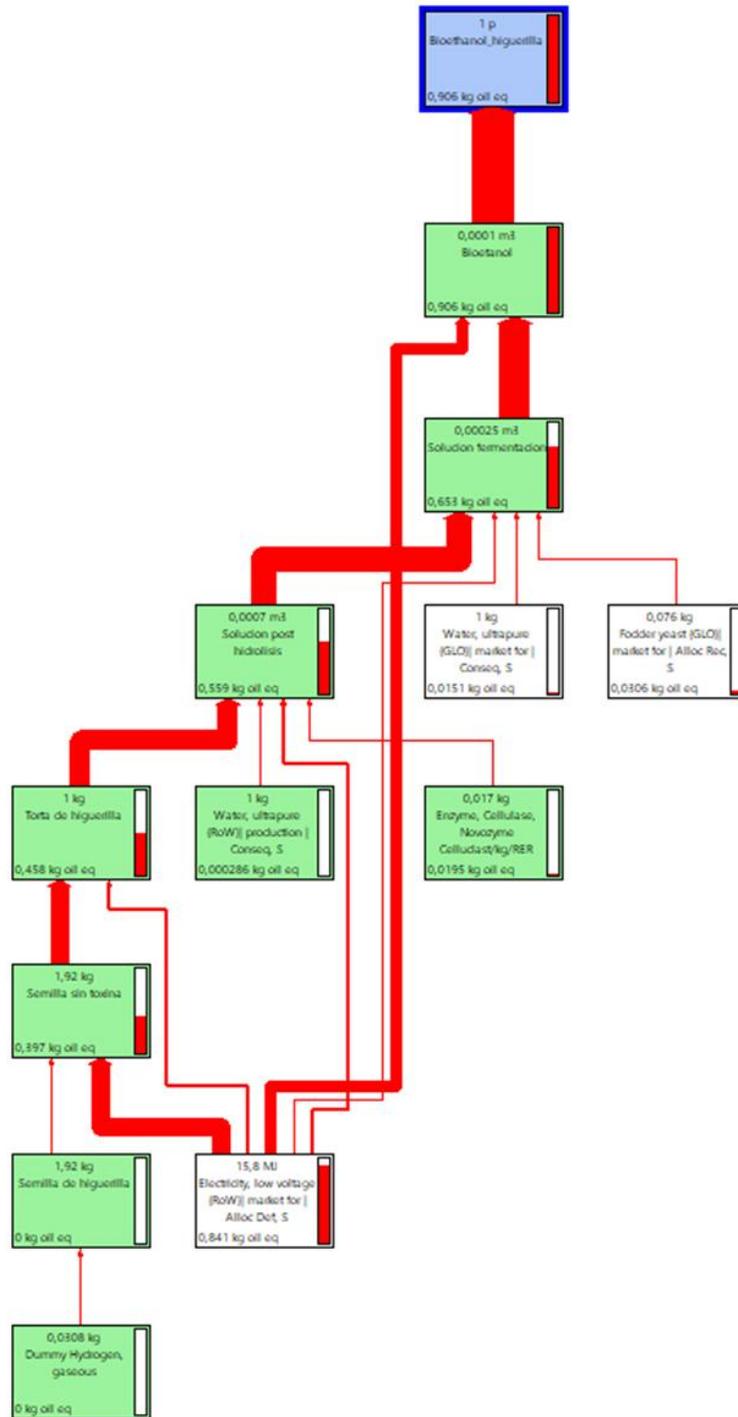
Figura 50. Diagrama de barras de los impactos de la categoría de formación de ozono.



Fuente: Autores

7.1.5 Agotamiento de recursos fósiles

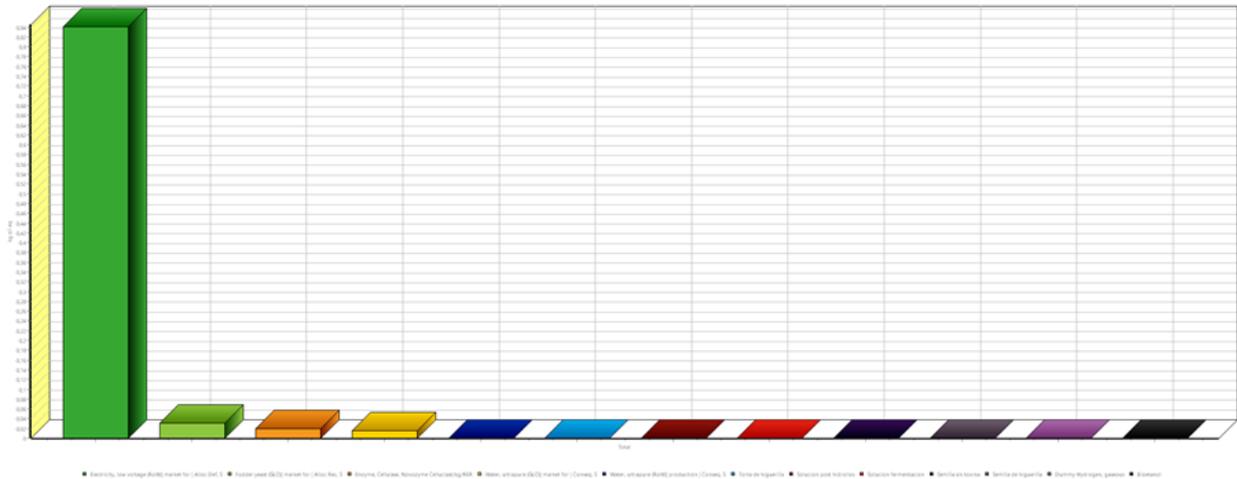
Figura 51 Distribución de impactos en la categoría de agotamiento de recursos fósiles



Fuente: Autores.

El diagrama de barras asociado a la categoría de escasez de recursos fósiles se muestra en la figura 52:

Figura 52. Diagrama de barras de los impactos asociados a la categoría de escasez de recursos fósiles.

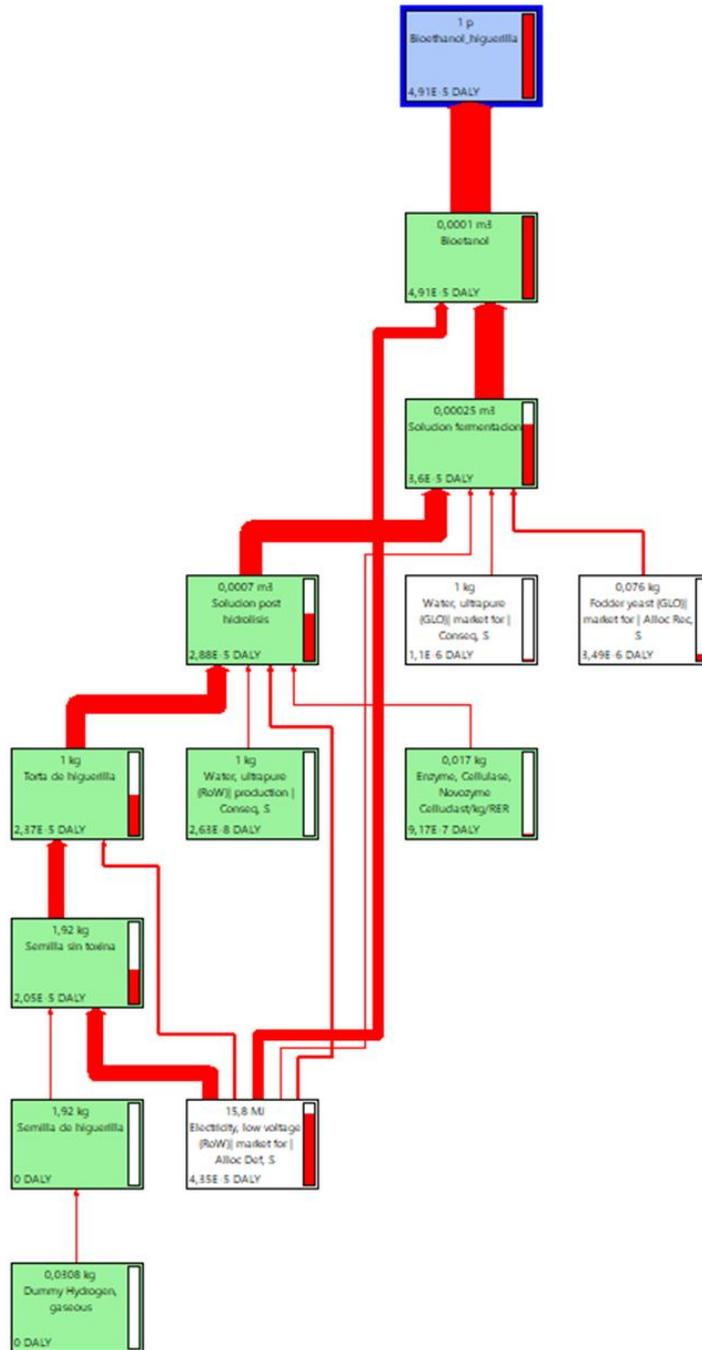


Fuente: Autores

7.2 Categorías de impacto Endpoint

7.2.1 Daño a la salud humana

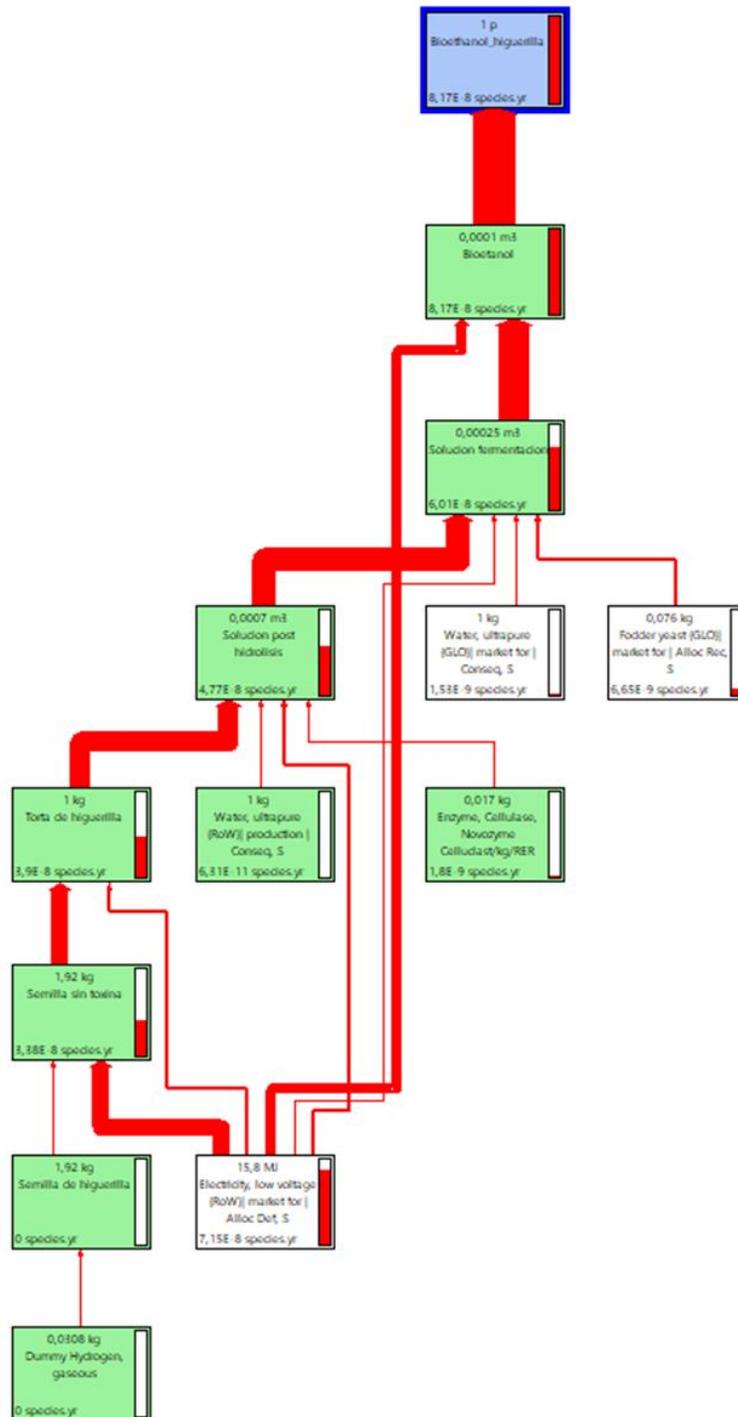
Figura 53 Distribución de impactos en la categoría de daño a la salud humana



Fuente: Autores.

7.2.2 Daño a los ecosistemas

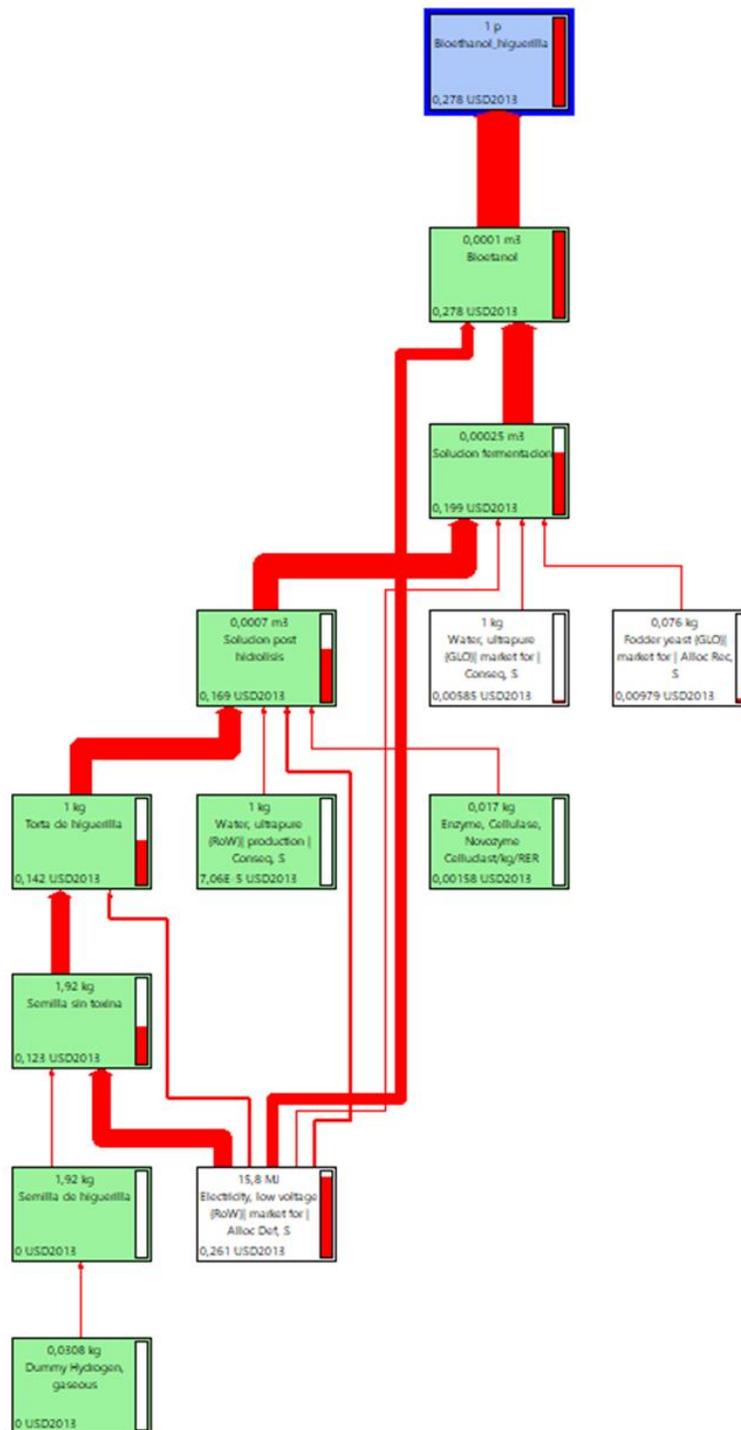
Figura 55 Distribución de impactos en la categoría de daño a los ecosistemas



Fuente: Autores.

7.2.3 Agotamiento de recursos

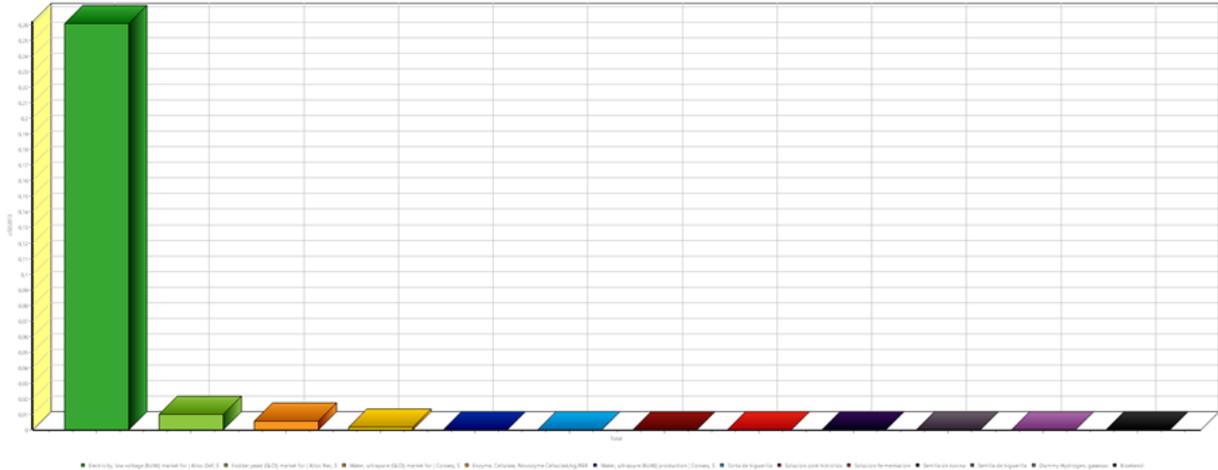
Figura 57 Distribución de impactos en la categoría de agotamiento de recursos



Fuente: Autores.

El diagrama de barras asociado a la categoría de escasez de recursos se muestra en la figura 58:

Figura 58. Diagrama de barras asociado a los impactos de la categoría de escasez de recursos.



Fuente: Autores.

De los resultados obtenidos para cada categoría, la energía eléctrica es el aspecto más crítico en el ámbito ambiental, superando por mucho los valores obtenidos en los demás procesos. Así mismo se puede detallar que el calentamiento global es la categoría que tiene más impacto en la producción de bioetanol a partir de torta de higuierilla (escala de laboratorio), dado que el proceso de fermentación libera dióxido de carbono al ambiente por las reacciones químicas que ocurren, mientras que los otros procesos no se rigen bajo reacciones que emitan gases como el CO_2 .

La eutrofización del agua es la categoría en la que más procesos aportan impactos ambientales, dado a que la mayoría de los procesos requieren de agua para realizarse, afectando al final la reutilización de la misma.

De las figuras anteriormente mostradas se puede determinar que las categorías de impactos asociados a la metodología de evaluación Recipe Endpoint no tienen una gran significancia dado a que el perfil de impactos ambientales se desarrolló a una escala de laboratorio, obteniendo así valores muy mínimos.

La fase de cultivación no fue tomada en cuenta en esta investigación, pero los impactos ambientales asociados a esta fase fueron determinados en el proyecto "Síntesis de biodiesel a partir de higuierilla (*Ricinus communis*) y análisis de su ciclo de vida" del autor Santander Julián [77]. En este proyecto la unidad funcional seleccionada fue un litro de biodiesel; para obtener un litro de biodiesel se produjo 1,51 kg de torta de higuierilla del proceso de extracción de aceite de ricino, generando al final 4,5 kg de CO_2 equivalentes en la fase de cultivo.

En la producción de bioetanol se requirió de 1 kg de torta de higuera, por lo tanto, se asumió que la fase de cultivo genera 3 kg CO₂ equivalentes teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación de Santander Julián [77].

El aceite de palma es la materia prima más usada actualmente en Colombia para la producción de biocombustibles; el cultivo de la palma genera altos impactos ambientales, además de producir daños al suelo. Se realizó una comparación de los impactos ambientales del cultivo de *Ricinus communis* respecto a la palma con el fin de verificar la viabilidad ambiental de esta biomasa.

La producción de bioetanol a partir de *Ricinus communis* genera menos impactos ambientales respecto a la generación de biodiesel a partir de aceite de palma, como se demuestra en trabajo realizado por Ashani Mohammadi [78], esto es debido a que el cultivo de aceite de palma genera graves daños al suelo mientras que la sirve como fertilizante reduciendo la acidez de los suelos.

8. Conclusiones y Recomendaciones

8.1 Conclusiones

Se aislaron los microorganismos *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp. en medio de cultivo Malta agar con torta de higuera, teniendo un periodo de adaptación de 15, 11 y 10 días respectivamente.

En el proceso de la hidrólisis enzimática las concentraciones medidas de celulosa variaron según el microorganismo, de la siguiente manera: *Aspergillus niger* de 55,41% [m/m] a 26,96% [m/m], *Trichoderma* spp. de 47,8% [m/m] a 13,21% [m/m] y *Rhizopus* spp. de 55,83% [m/m] a 11,74% [m/m].

En cuanto a la glucosa se registraron concentraciones de 11% [m/m] para *Trichoderma* spp., 10% [m/m] para *Rhizopus* spp. Y 9% [m/m] para *Aspergillus niger*, mediante el método colorimétrico de glucosa oxidasa/peroxidasa.

Se replicó el proceso de hidrólisis enzimática por *Trichoderma* spp. y *Aspergillus niger*. Para *Trichoderma* spp se obtuvieron concentraciones de glucosa de 16.8% [m/m] y 15.4% [m/m] y, para *Aspergillus niger* 16.4% [m/m].

El pH registrado en los biorreactores disminuyó ligeramente con el tiempo, iniciando con un pH de 7 y finalizando con un pH promedio de 5.5.

Se realizó la activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante 8 días en medio de cultivo líquido Malta con un flujo de aire de 1.5 L/min. Entre el segundo y tercer día, se registraron las mayores concentraciones, siendo estas de 13.4×10^9 [Cell/ml] y 17.7×10^9 [Cell/ml] respectivamente.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo durante 4 días, después de la extracción de la glucosa en medio acuoso, en donde se adicionaron 250 ml de solución con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 2.2×10^9 [Cell/ml].

De 1 kg de torta de higuera se obtuvieron 96,9 [mL], 22,3 [mL] y 4,8 [mL] de solución de destilado producto de la acción enzimática por *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp., respectivamente, registrando densidades entre 0,96 y 0,97 [g/mL], no encontrándose diferencia significativa.

El destilado por la ruta de *Rhizopus* spp. presentó la mayor concentración de etanol con 10,1% [v/v], mientras por *Trichoderma* spp. y *Aspergillus niger*, presentaron concentraciones de 3,1% y 1,9% [v/v] respectivamente.

Se reporta en esta investigación un nuevo hallazgo de la capacidad de hidrólisis enzimática con las cepas de *Rhizopus* spp. aislado a partir del proceso de descomposición de fresas realizadas en el CINBBYA.

Se evaluó la producción en el software Aspen plus® teniendo como capacidad 10 toneladas diarias generando aproximadamente 978,2 litros diarios de bioetanol con una pureza del 98,9%. Se obtuvo un rendimiento de 0,0771 toneladas de etanol por tonelada de biomasa, y comparándolo con el rendimiento a partir del uso de biomasa como cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar, dan rendimientos de 0,2930 y 0,1342 toneladas de etanol por tonelada de biomasa respectivamente. Es decir, en este estudio se presenta menor rendimiento en comparación con otras tecnologías.

El uso de energía eléctrica es la entrada que más impacta el medio ambiente en todas las categorías analizadas. Esta entrada representa 2,54 kg de CO₂ equivalente de los 2,83 kg de CO₂ equivalente totales de la producción de bioetanol, correspondiendo a un 89,7% del impacto ambiental.

8.2 Recomendaciones

Realizar más réplicas del proceso evaluando la cantidad de enzima liberada por los hongos, con el fin de establecer un rendimiento del proceso de hidrólisis.

Realizar la simulación de la cadena completa de producción de bioetanol, teniendo en cuenta los procesos de purificación de agua y de tratamiento del residuo post hidrólisis.

Realizar un análisis económico y energético usando el software Aspen Plus, teniendo en cuenta las entradas y salidas de los procesos descritos previamente.

Realizar un tratamiento al residuo post hidrólisis para su implementación como abono orgánico, dado a que presenta una concentración de 48,30% de carbono orgánico, mayor al exigido por la norma NTC 5167 (15%)

Incluir las fases de transporte y cultivo en el perfil de impactos ambientales.

Bibliografía

- [1] L. C. Fernández-Linares, J. Montiel-Montoya, A. Millán-Oropeza, and J. A. Badillo-Corona, "Production of Biofuels Obtained From Microalgae," *Ra Ximhai*, septiembre - diciembre, ., vol. año/Vol. 8, no. Número 3 Sinaloa., p. 101, 2012.
- [2] R. Isaías *et al.*, "ECOINGENIO," 2012.
- [3] H. Rico *et al.*, *Guía para cultivar higuera (Ricinus communis L.) en Michoacán.*, no. November. 2004.
- [4] "Higuera, planta convertida en aceite | Fideicomiso de Riesgo Compartido | Gobierno | gob.mx." . [Online]. Available: <https://www.gob.mx/firco/articulos/higuera-planta-convertida-en-aceite>. [Accessed: 28-May-2019].
- [5] E. Explained, "Dr . Faebian Bastiman Epitaxy Explained Category Archives : MBE Operator : A case study A week in the life of an MBE operator : A case study : Analysis," pp. 1–12, 2013.
- [6] R. A. Cabrales, J. L. Marrugo N., and J. L. Abril Castro, "Rendimientos en Semilla y Calidad de los Aceites del Cultivo de Higuera (*Ricinus communis* L.) en el Valle del Sinú, Departamento de Córdoba," p. 109, 2014.
- [7] "Semillas de higuera, oportunidad para expandir el mercado agrícola – Info Rural." [Online]. Available: <http://www.inforural.com.mx/semillas-de-higuera-oportunidad-para-expandir-el-mercado-agricola/>. [Accessed: 31-May-2019].
- [8] "Higuera | Semillas CampoSeeds - Venta de semillas en Colombia." [Online]. Available: <http://www.semillascamposeeds.com/productos/higuera/>. [Accessed: 28-May-2019].
- [9] R. Nativos, *Arboles Nativos y Ciudad - Libro.* .
- [10] "Castor Bean (*Ricinus communis*)." [Online]. Available: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/beaudrie_nich/classification.htm. [Accessed: 31-May-2019].
- [11] "Prime Global Capital Group Inc. - PGCG." [Online]. Available: http://www.pgcg.cc/castor_market.php. [Accessed: 29-May-2019].
- [12] B. Lear, *Application of castor pomace and cropping of castor beans to soil to reduce nematode populations*, vol. 43. 1959.
- [13] L. E. M. Pastejo and D. D. D. E. Souza, "Farelo de mamona em dietas de vacas leiteiras em pastejo," 2015.
- [14] L. G. Pivetta, C. de A. Tomaz, S. L. Fioreze, A. C. da C. Lara-Fioreze, L. A. Pivetta, and M. D. Zanotto, "Growth performance of castor bean hybrids under different plant densities," *Rev. Ceres*, vol. 64, no. 4, pp. 399–412, 2017.
- [15] M. M. M. Vieira *et al.*, "Comportamento ingestivo de ovinos alimentados com

- rações contendo quatro níveis de inclusão do farelo de mamona,” *Rev. Ceres*, vol. 58, no. 4, pp. 444–451, 2011.
- [16] “¿Qué es la biomasa? – Aprobi-CV.” [Online]. Available: <http://aprobicv.com/wp/que-es-la-biomasa/>. [Accessed: 28-May-2019].
- [17] O. Ho, O. Ho, O. Ho, O. Ho, and O. Ho, “Etanol a partir de Biomasa Lignocelulósica,” pp. 1–101, 2010.
- [18] C. E. Wyman, “BIOMASS ETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges,” *Annu. Rev. Energy Environ.*, vol. 24, no. 1, pp. 189–226, Nov. 1999.
- [19] S. Morales De La Rosa, “Hidrólisis acida de celulosa y biomasa lignocelolosa asistida con liquidos ionicos,” 2015.
- [20] K. G. Kalogiannis, S. D. Stefanidis, C. M. Michailof, and A. A. Lappas, “Castor bean cake residues upgrading towards high added value products via fast catalytic pyrolysis,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 95, pp. 405–415, 2016.
- [21] M. Gmelina and D. E. U. N. A. Plantación, “MADERA OBTENIDA DEL PRIMER CLAREO EN ÁRBOLES DE Francisco José Paz Fong,” 2008.
- [22] C. Arellano Perales, E. Houbron, and D. Elena Rustrían Portilla ORIZABA, “T E S I S Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática " PRESENTA: CO-DIRECTOR,” 2015.
- [23] “Bioetanol - Bio4.” [Online]. Available: <http://www.bio4.com.ar/productos/bioetanol/>. [Accessed: 29-May-2019].
- [24] “Definición de bioetanol - Qué es, Significado y Concepto.” [Online]. Available: <https://definicion.de/bioetanol/>. [Accessed: 29-May-2019].
- [25] G. Weiss, *Hazardous chemicals data book. Second edition*. 1986.
- [26] B. H. Jaime, “Biocombustibles_Colombia.”
- [27] “Bioetanol - Plantas de Biomasa.” [Online]. Available: <http://www.plantasdebiomasa.net/bioetan.html>. [Accessed: 21-May-2019].
- [28] R. Abascal Fernández and A. Garea Vázquez, “Estudio de la obtención de bioetanol a partir de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica. Matriz de reacciones y optimización,” p. 74, 2017.
- [29] A. de J. Herrera Escobar and C. R. Meers Días, “Diseño De Las Etapas De Hidrólisis De Almidón Y Fermentación Para Producir Bioetanol Basado En La Respuesta Dinámica Del Sistema,” pp. 1–119, 2013.
- [30] H. Javier Vázquez and O. Dacosta, “Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas,” *Ing. Investig. y Tecnol.*, vol. 8, no. 4, pp. 249–259, 2018.
- [31] J. Suarez, “Fermentacion Alcoholic.,” *No J. or J. Lost*, p. 5, 1994.

- [32] A. Oviedo, "Biología celular," 2016. [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/arianny2016biologia/unidad-2-metabolismo/fermentacion-alcoholica-y-lactica-y-ciclo-de-krebs>.
- [33] C. De Krebs, "Ciclo de Krebs."
- [34] "Química Orgánica Yessi: PRÁCTICA 2 DESTILACIÓN SIMPLE Y DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE EBULLICIÓN." .
- [35] I. N. D. S. E. Higiene, "Fichas de agentes biológicos: *Aspergillus* spp," *Databio*, p. 5, 2012.
- [36] A. K. Gautam, S. Sharma, S. Avasthi, and R. Bhaduria, "Diversity, Pathogenicity and Toxicology of *A. niger*: An Important Spoilage Fungi," *Res. J. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 270–280, Mar. 2011.
- [37] "Rhizopus." Available: <https://es.scribd.com/document/299484744/Rhizopus>. [Accessed: 22-May-2019].
- [38] "Rhizopus | fungus genus | Britannica.com." [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/Rhizopus>. [Accessed: 29-May-2019].
- [39] "Rhizopus spp. | Atlas de Identificación micológica." [Online]. Available: <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/18/rhizopus-spp/>. [Accessed: 22-May-2019].
- [40] "Trichoderma spp - EcuRed." [Online]. Available: https://www.ecured.cu/Trichoderma_spp. [Accessed: 22-May-2019].
- [41] O. Bastidas, "Neubauer Chamber Cell Counting," *celeromics*, pp. 1–6, 2016.
- [42] V. Cárdenas, M. Gómez, and L. Padilla, "DEGRADACIÓN DE CELULOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN DE GUADUA UTILIZANDO EL SISTEMA BIOLÓGICO (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces cerevisiae*) Degradación," *Siquia*, pp. 1–9, 2009.
- [43] Byosystems S.A, "Instructivo para medición de glucosa por kit Byosystems," p. 13485, 2018.
- [44] J. P. i Casanellas, *Técnicas y experimentos en edafología*. Col·legi oficial d'enginyers agrònoms de catalunya, 1986.
- [45] Icontec, "NTC 336 grasas y aceites animales y vegetales. método de la determinación de la densidad (masa por volumen convencional)," 2002.
- [46] LD Didactic GmbH, "Determinación de la densidad de líquidos con el picnómetro de Gay-Lussac," pp. 2–4.
- [47] V. QUINTERO DALLOS, "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE ETANOL COMBUSTIBLE A PARTIR DE BIOMASA SECUNDARIA DISPONIBLE EN LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA COLOMBIANA," UINVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, 2009.

- [48] ICONTEC, "NTC-5167 PRODUCTOS PARA LA INDUSTRIA AGRÍCOLA. PRODUCTOS ORGÁNICOS USADOS COMO ABONOS O FERTILIZANTES Y ENMIENDAS DE SUELO," *Icontec*, p. 5, 2004.
- [49] Icontec, "NTC-5403 CALIDAD DE SUELO. DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO," *ICONTEC*, 2006.
- [50] M. Chemicals, "Phosphate Cell Test," vol. 49, no. October, p. 64271, 2011.
- [51] "Potassium Cell Test 1.14562.0001 7.," *Notes*, vol. 49, no. April, p. 64271, 2019.
- [52] Spectroquant, "Test en cubetas Nitrógeno total," *EMD Milipore Corp.*, vol. 49, 2018.
- [53] S. Jáuregui, C. Esteban, ; Rosales Medina, M. Fernanda, ; Bustamante Gavilánez, and A. Cristina, "Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica," *Rev. Tecnológica ESPOL-RTE*, vol. 28, no. 3, pp. 53–68, 2015.
- [54] R. González C, *Principios básicos de escalado*. Editorial Universal, 2007.
- [55] Contexto Ganadero, "Higuerilla, alternativa de rentabilidad para los productores del país," 2016. [Online]. Available: <https://www.contextoganadero.com/regiones/higuerilla-alternativa-de-rentabilidad-para-los-productores-del-pais>. [Accessed: 05-Feb-2019].
- [56] Fedebiocombustibles, "CORPOICA lanza primera variedad colombiana de higuerilla para clima frío moderado," 2011. [Online]. Available: <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-679.htm>. [Accessed: 05-Feb-2019].
- [57] La republica, "SACHA INCHI E HIGUERILLA SEDUCEN COMO NUEVA ALTERNATIVA DE CULTIVOS," 2015. [Online]. Available: <https://www.agronegocios.co/agricultura/sacha-inchi-e-higuerilla-seducen-como-nueva-alternativa-de-cultivos-2620646>. [Accessed: 05-Feb-2019].
- [58] El Tiempo, "Ahora los campesinos de Boyacá le apuntarían a la Higuerilla," 2007. [Online]. Available: <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-3804035>. [Accessed: 05-Feb-2019].
- [59] Universidad de Valladolid, "Ecuaciones de estado," in *Termodinámica aplicada*, Valladolid: Universidad de Valladolid, 2006, pp. 1–20.
- [60] C. Raymond, *Química*, 10th ed. México D.F: Mc Graw Hill, 2010.
- [61] A. Technology, "Aspen Plus Aspen Plus Bioethanol from Corn Stover Model," p. 30, 2008.
- [62] V. Capdevila, V. Kafarov, C. Gely, and A. Pagano, "A PARTIR DE RESIDUOS DE ARROZ SIMULATION OF THE FERMENTATION PROCESS TO OBTAIN BIOETHANOL FROM," vol. 6, no. 2, pp. 11–21, 2015.
- [63] M. Ruhul Amin, M., Saquib Hossain, M. & Sarker, "Simulation of ethanol production by fermentation of molasses," *J. Eng.*, vol. 1, no. 4, pp. 69–73, 2013.

- [64] Fedebiocombustibles, "Preguntas Frecuentes de los Biocombustibles," 2013. [Online]. Available: <https://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-923.htm>.
- [65] S. Rondon, "Diseño conceptual de dos esquemas de producción de etanol combustible de segunda generación a partir de bagazo de caña de azúcar," *UIS*, 2009.
- [66] E. Haya, "Análisis de Ciclo de Vida Master en Ingeniería y Gestión Medioambiental," p. 43, 2016.
- [67] L. C. Castañeda M, "SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA DE BIODIESEL PRODUCIDO A PARTIR DE MICROALGAS," Universidad autónoma de Bucaramanga, 2017.
- [68] The International Standards Organisation, "Iso 14044:2006," *Int. J. Life Cycle Assess.*, vol. 2006, no. 7, pp. 652–668, 2006.
- [69] N. Rieznik and A. Hernández, "Análisis del ciclo de vida," *Capítulo 3. Metodol. Del Análisis Del Ciclo Vida*, p. 37, 2005.
- [70] M. T. Romero Díaz de ávila, "Análisis de ciclo de vida (ACV) Herramienta de Gestión ambiental," *eoi Esc. negocios*, vol. 3, p. 16, 1998.
- [71] J. Hans, "Análisis del ciclo de vida," *Metodol. Del Análisis Del Ciclo Vida*, p. 37, 2015.
- [72] D. G. Dg-, "Daniel Garraín Cordero," vol. 2009, 2009.
- [73] J. S. García, I. Herrera, and A. Rodríguez, "Análisis de Ciclo de Vida de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales. Caso: PTARM de Yautepec (Morales, México)," p. 40, 2011.
- [74] "Impact Category Definitions - eTool." [Online]. Available: <https://etoolglobal.com/eblog/software/impact-category-definitions/>. [Accessed: 30-May-2019].
- [75] "Appendix A: Impact Category Descriptions | Ministry for the Environment." [Online]. Available: <https://www.mfe.govt.nz/publications/waste/life-cycle-assessment-product-stewardship-options-mercury-containing-lamps-new-1>. [Accessed: 30-May-2019].
- [76] "Secretaría de Medio Ambiente." [Online]. Available: <https://www.sema.gob.mx/SGA-IMPACTO-CONCEPTOS.htm>. [Accessed: 30-May-2019].
- [77] Santander Julian "SÍNTESIS DE BIODIESEL A PARTIR DE HIGUERILLA (*RICINUS COMMUNIS*) Y ANÁLISIS DE SU CICLO DE VIDA" *Director*, vol. 15, no. 2, pp. 2017–2019, 2018.
- [78] M. H. Mohammadi Ashnani, A. Johari, H. Hashim, and E. Hasani, "Life Cycle Assessment of Palm Oil Biodiesel Production in Malaysia," *Appl. Mech. Mater.*, vol.

465–466, no. January, pp. 1080–1086, 2013.

ANEXOS

Anexo 1: Tabla para la determinación de la densidad de soluciones de etanol y agua.

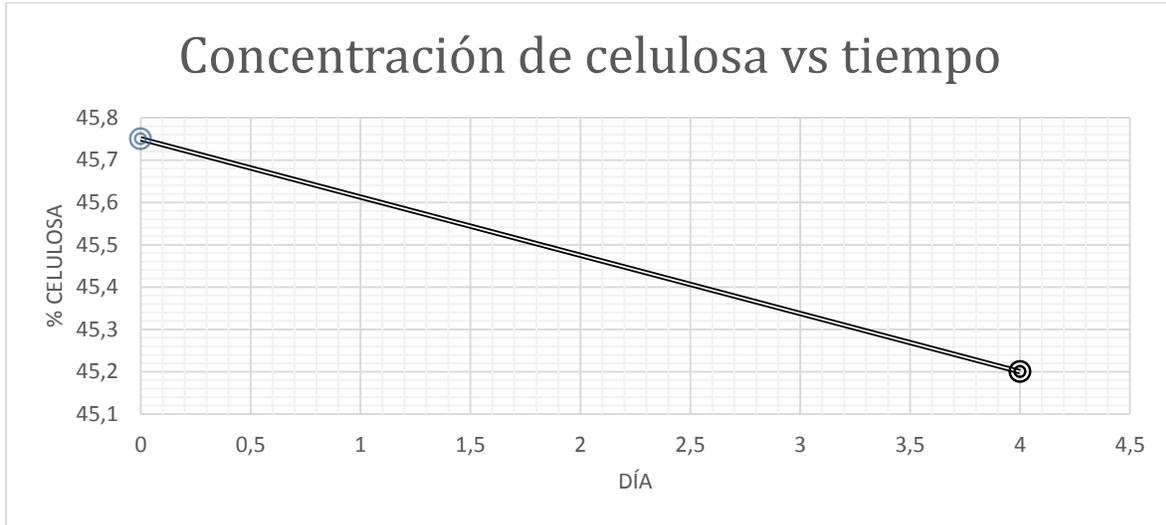
A continuación se muestra la tabla 1 de este anexo. Esta tabla está en este apartado porque sus valores son los que permiten calcular la concentración de etanol en función de la densidad de la muestra [44]:

Tabla 1 anexo 1 Determinación de la concentración en volumen c del etanol, en función de la determinación de la densidad.

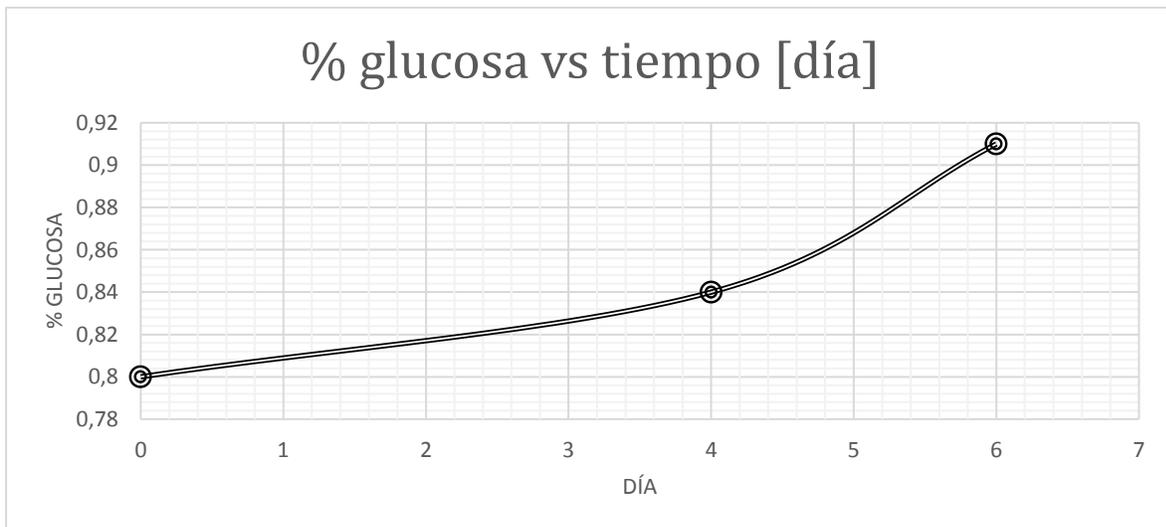
c	$\frac{m_2}{g}$	$\frac{m_2 - m_0}{g}$	$\frac{\rho}{g \cdot cm^{-3}}$
1,0	71,48	39,67	0,7876
0,9	73,26	41,45	0,8229
0,8	74,65	42,84	0,8505
0,7	76,01	44,20	0,8775
0,6	77,14	45,33	0,8999
0,5	78,24	46,43	0,9218
0,4	79,20	47,39	0,9408
0,3	80,01	48,20	0,9569
0,2	80,70	48,89	0,9706
0,1	81,33	49,52	0,9831
0	82,07	50,26	0,9978

Anexo 2. Datos de hidrólisis enzimática, biorreactor de control.

A continuación se muestran las gráficas de concentración de celulosa y glucosa correspondiente y análisis correspondientes a los datos de la tabla 1 del presente anexo.



Grafica 1 anexo 2. Concentración de celulosa vs tiempo, Hidrólisis enzimática sin microorganismos.



Grafica 2 anexo 1. Concentración de glucosa vs tiempo, Hidrólisis enzimática sin microorganismo

Tabla 1 anexo 2. Datos de hidrólisis enzimática, Control

día	pH	Absorbancia				

			% de glucosa	Peso filtro gooch [g] inicial	Peso filtro gooch [g] final	% de celulosa
0	7	0,004	0,8	30,2822	30,7397	45,75
4	7	0,004	0,84	30,4174	30,8792	-
6	6	0,03	0,91	29,9943	30,4463	45,2

Las gráficas anteriormente mostradas describen el proceso esperado de la hidrólisis enzimática del reactor de control, el cual es que los valores de glucosa y celulosa se mantuvieran similares con el paso de los días, demostrando que la hidrólisis ocurre por la acción de los microorganismos.

Anexo 3. Imágenes de biorreactores de hidrólisis enzimática.

- Biorreactor de hidrólisis enzimática con *Trichoderma* spp:

Figura 1 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Trichoderma* spp.



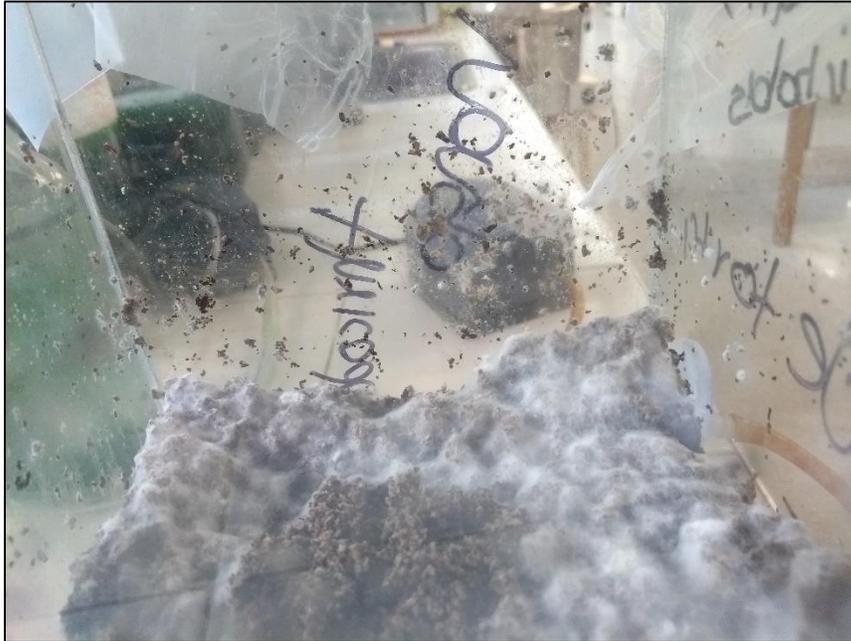
Figura 2 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Trichoderma* spp.**Figura 3 anexo 3.** Hidrólisis enzimática con *Rhizopus* spp

Figura 4 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Rhizopus* spp.



Figura 5 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Rhizopus* spp



- Biorreactor de hidrólisis enzimática con *Aspergillus niger*

Figura 5 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Aspergillus niger*.



Figura 6 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Aspergillus niger*.



Figura 7 anexo 3. Hidrólisis enzimática con *Aspergillus niger*.



ANEXO 4: DATOS DE PROPIEDADES PARA SIMULACION EN ASPEN PLUS® DE COMPUESTOS NO DEFINIDOS

A continuación se muestran los datos para las propiedades de los compuestos no definidos en Aspen plus y que fueron tomados del ejemplo que muestra aspen [59] y de la base de datos de PubliChem.

Tabla 1 anexo 4. Datos de hidrólisis enzimática, Control

Compuesto	Propiedad	Unidades	Valor
PROTEIN	MW		22,8396
	DHSRM	J/kmol	-73763042,4
	VSPOLY	cum/kmol	0,0152
			0

ANEXO 5: Informe del análisis de cromatografía