UNIVERSIDAD DE PIURA
REPOSITORIO INSTITUCIONAL PIRHUA

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS DE BANANO ORGÁNICO EN PIURA

Junneyder Escalante Calderón y Hilda Fuentes Aquije

Piura, septiembre de 2013

Universidad de Piura

Área Departamental de Ingeniería Industrial y de Sistemas

Escalante, J. y Fuentes, H. (2013). *Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura*. Tesis de pregrado en Ingeniería Industrial y de Sistemas. Universidad de Piura. Facultad de Ingeniería. Programa Académico de Ingeniería Industrial y de Sistemas. Piura, Perú.

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Perú

Repositorio institucional PIRHUA – Universidad de Piura

U N I V E R S I D A D DE P I U R A

FACULTAD DE INGENIERIA

"Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura"

Tesis para optar el Título de

Ingeniero Industrial y de Sistemas

Junneyder Andree Escalante Calderón

Hilda Rosa Fuentes Aquije

Asesor: Dr. Ing. Gastón Cruz Alcedo

Piura, Septiembre 2013

La presente tesis la dedicamos a nuestros padres y hermanos que con su esfuerzo y palabras de aliento, durante los 5 años de carrera, han hecho posible que nuestras metas se hagan realidad; así como también, a nuestro asesor de tesis, por el gran apoyo brindado.

Prólogo

Los actuales biocombustibles generan cada vez más dudas acerca de su viabilidad e impacto ambiental; es por ello que diversas investigaciones y proyectos tecnológicos en el mundo están buscando nuevas formas y fuentes de materias primas para la producción de combustibles renovables, con el objetivo de satisfacer la demanda energética mundial y disminuir la contaminación ambiental causada por los combustibles fósiles. Es así como se ha llegado al estudio y desarrollo de los biocombustibles de segunda generación, cuyas materias primas son los residuos vegetales.

Entre los diversos residuos vegetales que se pueden encontrar en la región Piura se encuentran los residuos agrícolas de banano orgánico (hojas, pseudotallos y raquis), los cuales son considerados como material lignocelulósico apto para la producción de bioetanol, por presentar en su composición un alto contenido de celulosa y hemicelulosa; además, de ser un recurso abundante en la región, el cual alcanza aproximadamente 560 t/día de desechos. Esto lo convierte en una potencial fuente de materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación, que contribuiría a cubrir la demanda interna insatisfecha de etanol anhidro; además de disminuir emisiones vehiculares de CO_2 de origen fósil.

En el curso de Proyectos, nosotros, los tesistas, junto a otros compañeros, desarrollamos el trabajo semestral titulado: "Diseño de la línea de producción y análisis experimental de la obtención de etanol a partir de residuos agrícolas de plátano; en el distrito de Salitral, Sullana"; trabajo que incluyó un estudio de pre factibilidad, un breve análisis experimental y el análisis financiero del proyecto. Esta investigación nos ha servido de base para profundizar más en la parte experimental de la obtención de etanol a partir de los residuos agrícolas de banano orgánico.

Expresamos nuestro profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado con nosotros para la realización de la presente tesis, como lo son: nuestro asesor de tesis el Dr. Ing. Gastón Cruz, los profesores informantes de la tesis; el Ing. Jorge Yaksetig; las asistentes de los laboratorios de química y mecánica; y al Ing. Silvestre Lizama Ríos, propietario de la empresa Agua Vip S.A.C., de Marcavelica – Sullana.

Resumen

Los materiales lignocelulósicos son considerados aptos para la producción de etanol de segunda generación. En la región Piura se generan 5 400 000 toneladas/año de residuos agrícolas de banano orgánico (hojas, pseudotallos y raquis). En la presente tesis se ha realizado un estudio experimental que ha permitido obtener etanol a partir de dichos residuos.

La secuencia de procesos para la obtención de etanol a nivel de laboratorio, fue la siguiente: pretratamiento, deslignificación, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación.

Los pretratamientos utilizados fueron: *Steam Explosion* (SE) y *Liquid Hot Water* (LHW). La mayor degradación de la hemicelulosa correspondió a una variación de pH de 2,5, en ensayos de LHW con pseudotallo húmedo; mientras que con el pretratamiento SE solo alcanzó una variación de pH de 1,5.

La hidrólisis enzimática se realizó con enzimas celulolíticas Cellic Ctec 2 (Novozymes), alcanzando un rendimiento del 29%. El proceso de fermentación se estabilizó al quinto día, sin haberse podido determinar la cantidad de glucosa presente.

Se consiguió un destilado de 92% de pureza en peso y un rendimiento etílico de 0,078 g de etanol/g de biomasa.

En conclusión, es técnicamente factible la producción de etanol a partir de estos residuos, sin embargo, es necesario abordar con mayor profundidad las condiciones óptimas para cada proceso con el fin de implementar dicha tecnología a nivel industrial.

Índice

Introducción

1 Capítulo I: Biocombustibles de fuentes lignocelulósicas 1

1.1 Estudio del material lignocelulósico 1

1.1.1 Definición 1

1.1.2 Composición 1

1.1.3 Características y propiedades de los residuos lignocelulósicos 5

1.2 Estudio del etanol como biocombustible 6

1.2.1 Descripción general 6

1.2.2 Propiedades y ventajas del bioetanol 6

1.2.3 Aplicaciones actuales 6

1.2.4 Procesos de obtención de bioetanol 7

1.3 Estudio de las enzimas celulolíticas 20

1.3.1 Descripción general 20

1.3.2 Ventajas de la hidrólisis enzimática 20

1.3.3 Actividad enzimática celulolítica 21

1.3.4 Enzimas celulolíticas Cellic CTec 2 21

2 Capítulo II: Bioetanol y residuos de banano: situación y potencial 23

2.1 Situación internacional del etanol 23

2.2 Situación nacional del etanol 25

2.3 Consumidores nacionales de etanol 27
2.4 Proveedores de etanol 28
2.5 Normas técnicas 30
2.5.1 NTP 321.126 de etanol carburante 30
2.5.2 Normas técnicas internacionales del etanol 31
2.6 Tendencias del uso del etanol 32
2.7 Estudio de los residuos agrícolas de banano orgánico 32
2.7.1 Descripción general 32
2.7.2 Composición química 33
2.7.3 Situación del cultivo 34
2.7.4 Importancia 35
2.7.5 Aprovechamiento tradicional 35
3 Capítulo III: Parte experimental 37
3.1 Diagrama del procedimiento experimental 37
3.2 Acondicionamiento de la materia prima 38
3.3 Determinación de la densidad aparente 39
3.4 Pretratamientos 39
3.4.1 *Steam Explosion* (SE) 43
3.4.2 *Liquid Hot Water* (LHW) 45
3.5 Deslignificación por ozonización 55
3.6 Hidrólisis enzimática 57
3.7 Fermentación alcohólica 58
3.7.1 Preparación del inóculo 59
3.7.2 Proceso de fermentación 59
3.8 Destilación 60

3.9 Determinación del grado alcohólico 61
3.9.1 Densidad del destilado 61
3.9.2 Índice de refracción 61
4 Capítulo IV: Resultados y discusión 63
4.1 Secado de la biomasa 63
4.2 Resultados de pretratamientos 64
4.2.1 Ensayos preliminares en biorreactor de ¾ " de diámetro 64
4.2.2 *Steam Explosion* en biorreactor de ¾ " de diámetro 64
4.2.3 *Liquid Hot Water* en biorreactor de ¾ " de diámetro 75
4.2.4 *Liquid Hot Water* en biorreactor de 3´´ 82
4.3 Resultados del proceso de deslignificación 84
4.4 Resultados de los procesos de hidrólisis enzimática 84
4.5 Resultados del proceso de fermentación 87
4.6 Resultados del proceso de destilación 88
5 Capítulo V: Perspectivas para un posible proyecto industrial 91
5.1 Selección de tecnologías 91
5.1.1 Desfibrado 91
5.1.2 Pretratamiento 92
5.1.3 Deslignificación 93
5.1.4 Hidrólisis enzimática 94
5.1.5 Fermentación 95
5.1.6 Destilación 96
5.1.7 Deshidratación 97
5.2 Diagrama de proceso continuo 98
Conclusiones 101

Referencias 105

Anexo A: Brochure de aplicación de las enzimas Cellic CTec 2 ..... A-1

Anexo B: Composición química de biomasa de banano pretratada con LHW en Perú y Colombia B-1

Anexo C: Propiedades del agua saturada (líquido-vapor) C-1

Anexo D: Normas de seguridad D-1

Introducción

El calentamiento global atribuido al excesivo CO_2 emanado de los vehículos que usan combustibles fósiles, el elevado costo de estos combustibles y su pronta escasez, son los principales motivos para que se realicen investigaciones sobre nuevas fuentes de combustibles alternativos, especialmente que puedan producirse a partir de biomasa vegetal la cual no debe competir con los alimentos, como es el caso del etanol a partir de los residuos agrícolas de banano orgánico, que es objeto de estudio en la presente tesis.

El objetivo principal de estudio, es la obtención de etanol a partir de hojas, pseudotallos y raquis de banano orgánico excedentes de las áreas de cultivo en la región Piura; para lo cual se realizó un estudio experimental en el Laboratorio de Química de la Universidad de Piura.

Se analizó el efecto de dos métodos de pretratamiento: *Steam Explosion* (SE) *y Liquid Hot Water* (LHW), seguido del proceso de deslignificación con ozono y posterior hidrólisis enzimática. En esta última se utilizaron enzimas de tercera generación (Cellic CTec 2), las cuales fueron enviadas desde Brasil por cortesía de la empresa Novozymes.

En el primer capítulo se presenta el marco teórico de los biocombustibles a partir de fuentes lignocelulósicas, mostrándose un estudio del bioetanol y sus procesos; así como una descripción general de las enzimas celulíticas. En el segundo capítulo se realiza una recopilación de datos de mercado, que incluye información relevante sobre la situación nacional e internacional del bioetanol y del banano orgánico de la región Piura. En el tercer y cuarto capítulo se desarrolla la parte experimental de la tesis, en los cuales se describe los métodos utilizados para obtener bioetanol en el laboratorio y se muestran los resultados obtenidos. Finalmente, en el quinto capítulo se realiza un aporte para una potencial industria de producción de bioetanol a partir de residuos de banano orgánico en la región Piura, brindando información sobre las tecnologías existentes y el diagrama de proceso continuo propuesto.

Se espera brindar un aporte en base a las investigaciones realizadas por otros autores, en torno a la implementación de nuevas tecnologías que permitan incrementar la producción de bioetanol y reducir el deterioro medioambiental; así como contribuir al desarrollo de la región.

Capítulo 1
Biocombustibles de fuentes lignocelulósicas

En este capítulo se presentan los antecedentes de estudio de material lignocelulósico, presente en diversos residuos agrícolas, como fuente de energía de segunda generación para la obtención de etanol. Luego, un estudio del bioetanol como fuente de energía; y finalmente un estudio sobre las enzimas celulolíticas actualmente utilizadas en el proceso de producción de bioetanol.

1.1 Estudio del material lignocelulósico

1.1.1 Definición

La lignocelulosa es un sustrato complejo, formado por una combinación de polisacáridos de la celulosa y lignina. Es el principal componente de la pared celular de las plantas, cuyas proporciones varían en función del tipo de biomasa **[1]**.

Este tipo de material presenta un elevado potencial para la producción de bioetanol debido a su alto contenido de celulosa, y está presente en residuos agrícolas y forestales, tales como: caña de azúcar, algodón, bambú, cáscara de arroz, maíz, trigo, cebada, plátano, entre otros **[2]**.

1.1.2 Composición

El material lignocelulósico está constituido por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinas), compuestos fenólicos (lignina) y compuestos minoritarios (minerales, lípidos y proteínas).

1.1.2.1 Polisacáridos

Los polisacáridos están compuestos por carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60 y 80% del total del material lignocelulósico **[3].**

- **Celulosa**

Es un homopolímero lineal de elevado peso molecular, constituido por cadenas lineales de celobiosa[1] (D-glucopiranosil-ß-1,4-D-glucopiranosa); presenta entre 200 y 10 000 unidades de glicosídicas en celulosa nativa, aunque este número varía según el tipo de material lignocelulósico.

El enlace glicosídico se forma por la reacción del grupo –OH hemiacetálico del carbono anomérico de la ß-D-glucopiranosa con el grupo –OH del carbono 4 de otra ß-D-glucopiranosa **[4].**

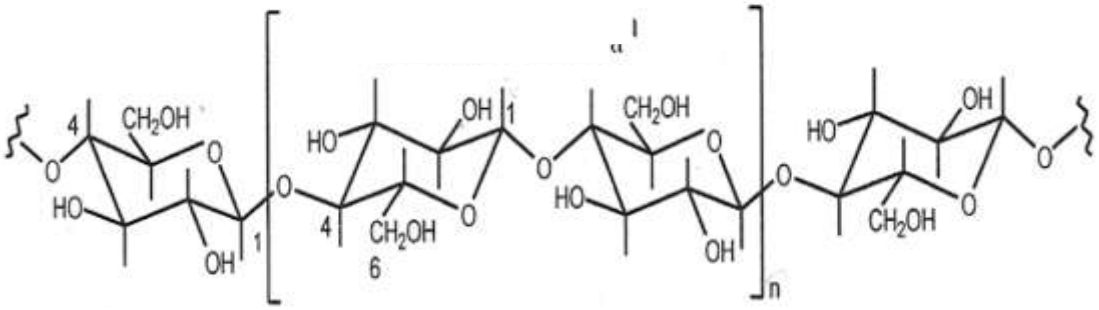

Fig. 1.1 Unidad de celobiosa [4]

Desde un punto de vista macro, cada una de las hebras de celulosa está enlazada a otras, mediante puentes de hidrógeno, formando una estructura supramolecular semi cristalina, dándole características de insolubilidad.

El hecho de que los grupos –OH salgan lateralmente, permitiendo las uniones inter e intramoleculares da lugar a las fibras elementales o misceláneas, las cuales poseen zonas amorfas que le confieren elasticidad y zonas de estructura cristalina que le confieren la resistencia a la celulosa. La presencia de regiones amorfas permite una mejor penetración de reactivos químicos.

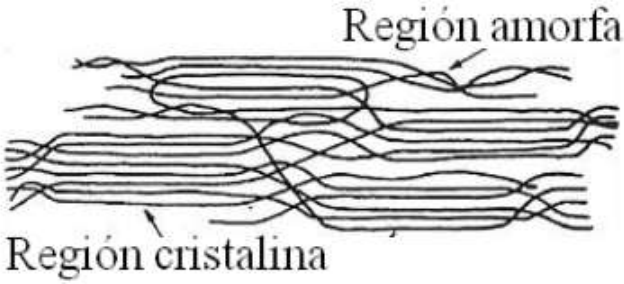

Fig. 1.2 Regiones de las fibras elementales [3]

- **Hemicelulosa**

La hemicelulosa está constituida por polímeros de unidades de anhidro azúcares, unidos por enlaces glucosídicos.

[1] Es un disacárido que se produce por la hidrólisis de la celulosa.

Estos polímeros están constituidos por cinco monosacáridos: glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Además de monómeros, la hemicelulosa presenta derivados de las osas como los ácidos hexurónicos y deoxi-hexosas (ver Figura 1.3).

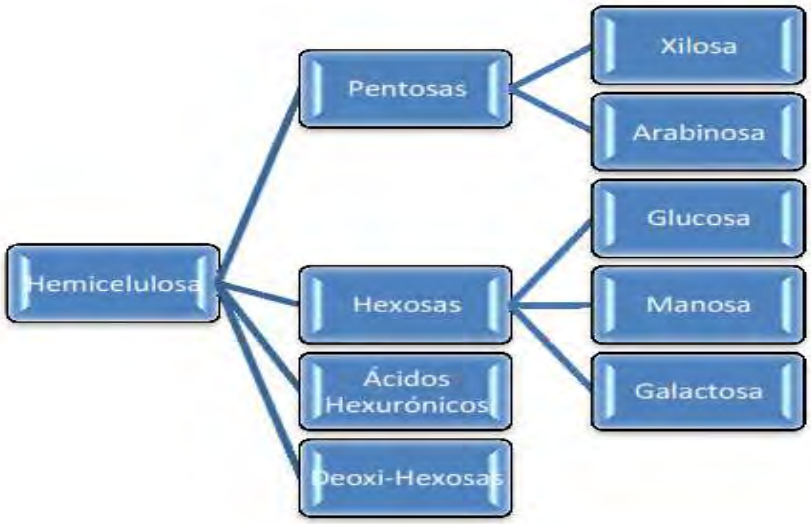

Fig. 1.3 Composición de la hemicelulosa [4]

Las hemicelulosas pueden ser clasificadas de acuerdo a su estructura, en diferentes polisacáridos: xilanos, mananos, ß-glucanos y xiloglucanos.

Los xilanos son el principal componente de la hemicelulosa, y representa alrededor del 20-30% del residuo agrícola. Son heteropolímeros, formados por una cadena de xilosas unidas por medio de un enlace ß-1,4-glucosídico, uniéndose a pequeñas cadenas de carbohidratos.

Los xiloglucanos consisten en una cadena principal de ß– (1,4)-D-glucopiranosa. Hasta un 75% de las unidades de glucopiranosa pueden estar ramificadas con un monosacárido u oligosacárido; este grado de ramificación determina el grado de bioconversión de este tipo de hemicelulosa.

La función principal de la hemicelulosa es mantener una interacción con la celulosa y lignina, para proporcionar rigidez a la pared celular **[5].**

1.1.2.2 Lignina

La lignina es un polímero tridimensional amorfo altamente ramificado, formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada.

Se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas); además es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal. Es importante destacar que es la única fibra no polisacárido que se conoce.

Proporciona rigidez a la pared celular, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular **[6].**

- **Estructura química de la lignina**

La molécula de lignina es una macromolécula, con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). Es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad (ver Figura 1.4). Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan una "aproximación" de dicha estructura.

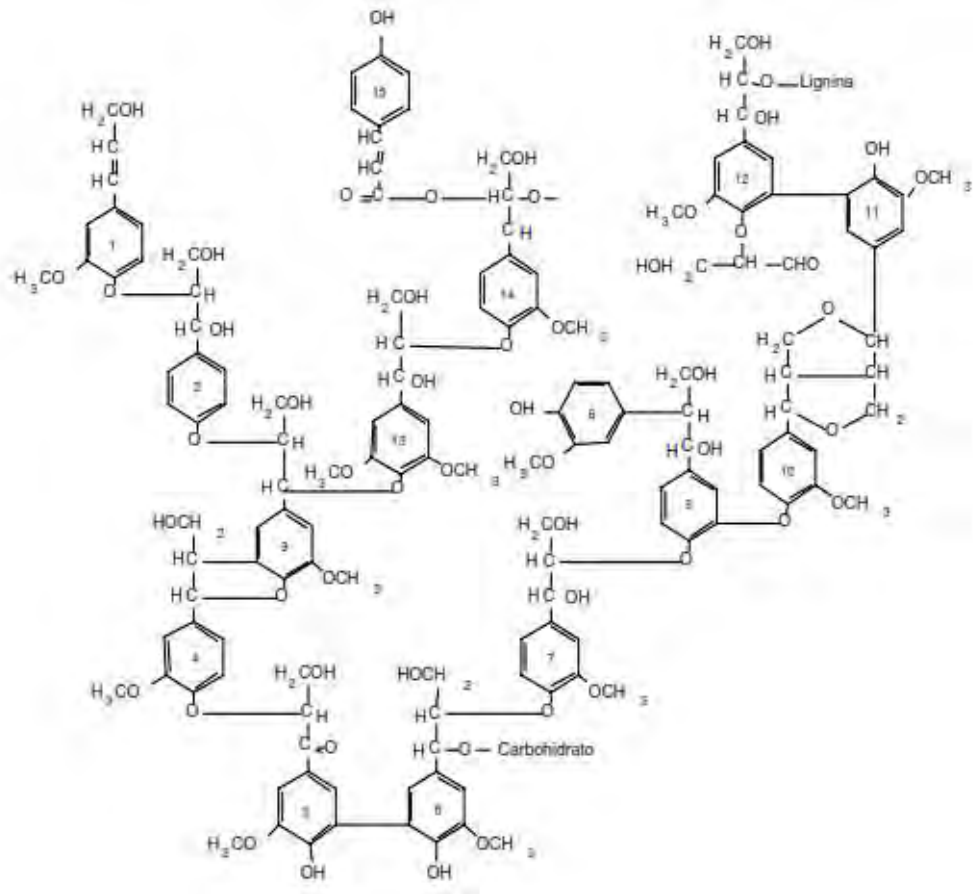

Fig. 1.4 Estructura molecular de la lignina [3]

- **Propiedades físicas de la lignina**

El grado de lignificación afecta notablemente a la digestibilidad de la fibra. La lignina, que aumenta de manera ostensible en la pared celular de la planta con el curso de la maduración, es resistente a la degradación bacteriana, y su contenido en fibra reduce la digestibilidad de los polisacáridos fibrosos.

La biodegradación de la lignina puede ser dividida en dos procesos:

- La separación de las cadenas que están conectadas a las unidades monoméricas, resultando una despolimerización de la lignina.
- La ruptura de los anillos aromáticos del polímero de lignina.

1.1.2.3 Otras sustancias

Entre las diversas sustancias que constituyen los materiales lignocelulósicos se encuentran: compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, entre otros. Estas sustancias desempeñan la función de intermediarios metabólicos, reservan la energía, contribuyen al color, olor y a la resistencia al marchitamiento.

1.1.3 Características y propiedades de los residuos lignocelulósicos

- Los materiales lignocelulósicos poseen una alta cantidad de agua, aproximadamente el 80% del peso en fresco.

Fig. 1.5 Componentes típicos de los desechos agrícolas [4]

- La pared celular de las plantas está constituida por el entramado de microfibras ya mencionadas (celulosa, hemicelulosa y lignina).
- La lignina y hemicelulosa se encuentran entretejidas con la celulosa formando una especie de barrera natural lo que dificulta el acceso de enzimas a las largas cadenas de glucanos.
- El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia[2] de la celulosa.
- La celulosa es el principal componente estructural del material lignocelulósico, con cerca del 50% del material; encargada de dar la alta resistencia a los ataques químicos y a la tracción mecánica, lo que dificulta las operaciones unitarias a las que puede ser sometido el material lignocelulósico.
- Los polisacáridos le confieren al material lignocelulósico un alto contenido energético, por tal motivo en la actualidad se están realizando diversos estudios con el fin de convertir esta biomasa en energía aprovechable para el hombre.

---

[2] Resistencia al fraccionamiento de carbohidratos de la biomasa.

1.2 Estudio del etanol como biocombustible

1.2.1 Descripción general

El etanol es una cadena de dos átomos de carbono unidos por un enlace simple, donde uno de éstos está enlazado a un grupo hidroxilo; producto de una fermentación anaeróbica de azúcares por medio de microorganismos, principalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* **[7].**

El etanol es utilizado en distintas empresas que se encuentran en la rama químico-industrial, médico-farmacéutico y en la producción de biocombustibles a partir de materias primas como: la caña de azúcar y maíz, las cuales compiten con la industria de producción de alimentos **[8]**.

Puede utilizarse como único combustible, realizando modificaciones a los motores; pero en la mayoría de los países se prefiere utilizar mezclas de etanol con gasolina, que van desde un 10% hasta un 85% de etanol en volumen **[3].**

1.2.2 Propiedades y ventajas del bioetanol [9, 10, 11]

- El etanol es un compuesto orgánico de fórmula química C_2H_5OH.
- Se presenta como líquido a condiciones ambientales; es incoloro y límpido.
- Es biodegradable y es más volátil que la gasolina.
- Su temperatura de ebullición normal es 78,65 °C y su calor de vaporización es 38,56 kJ/mol.
- Los procesos de producción de etanol
- El etanol introduce más oxígeno a la mezcla combustible, mejorando la eficiencia de la combustión.
- Produce menos dióxido de carbono que la gasolina; aunque, el impacto total depende de los procesos de destilación y la eficiencia de los cultivos.
- Presenta un elevado número de octano (105).
- Presenta baja toxicidad en comparación con los hidrocarburos.
- No contiene azufre, por tanto no emite SO_x en la combustión.
- La combinación de 90% de gasolina y 10% etanol puede ser usado en los vehículos sin ninguna modificación en el motor.

1.2.3 Aplicaciones actuales

- En Brasil, el etanol producido a partir de caña de azúcar sustituye la mitad de la gasolina.
- En los Estados Unidos, gran productor mundial de etanol a base de maíz, el programa es más reciente y sus justificaciones son la eliminación de aditivos en la gasolina y la reducción de las emisiones de gases que provocan el calentamiento global.
- En los países de Europa Occidental también se usa etanol producido del trigo y de la remolacha. En esos países el costo del etanol es de dos a cuatro veces más elevado que en Brasil y los subsidios internos y barreras aduaneras protegen las industrias locales, impidiendo la importación del etanol **[12]**.
- En los últimos años se han desarrollado una serie de vehículos capaces de funcionar tanto con gasolina como con etanol o una mezcla de ambos. Se denominan *Flexible Fuel Vehicles* (FFV); estos automóviles disponen de un sensor que detecta la relación etanol/gasolina y, en función de ésta, ajustan la carburación del motor (modifica la

mezcla de aire y combustible tratando de mantener la potencia y el consumo del automóvil en un valor óptimo).

- Existen diversas combinaciones de biocombustible, como: E5 que significa una mezcla del 5% de bioetanol y el 95% de gasolina; E10 significa 10% de bioetanol y el 90% de gasolina, esta mezcla es la más utilizada en EEUU ya que hasta esta proporción los motores de los vehículos no requieren ninguna modificación e incluso produce la elevación del número de octano en la gasolina mejorando su resultado y reducción de la emisión de gases contaminantes; E85: mezcla de 85% de bioetanol y 15 % de gasolina, utilizada en vehículos con motores especiales.
- E95 y E100: mezclas hasta el 95% y 100% de bioetanol son utilizados en algunos países como Brasil con motores especiales.
- E-Diesel: el bioetanol permite su mezcla con gasoil utilizando un aditivo solvente, obteniendo este producto de muy buenas características en cuanto a combustión y reducción de contaminación; ofreciendo así, otras alternativas al bioetanol en el campo de los vehículos diesel.
- Etil Terbutil Éter (ETBE): No se comercializa como un biocombustible, sino que se utiliza como un aditivo de la gasolina. Se obtiene por síntesis del bioetanol con el isobutileno, subproducto de la destilación del petróleo. El ETBE posee las ventajas de ser menos volátil y más miscible con la gasolina que el propio etanol y, como el etanol, se adiciona a la gasolina en proporciones del 10 al 15%.

1.2.4 Procesos de obtención de bioetanol

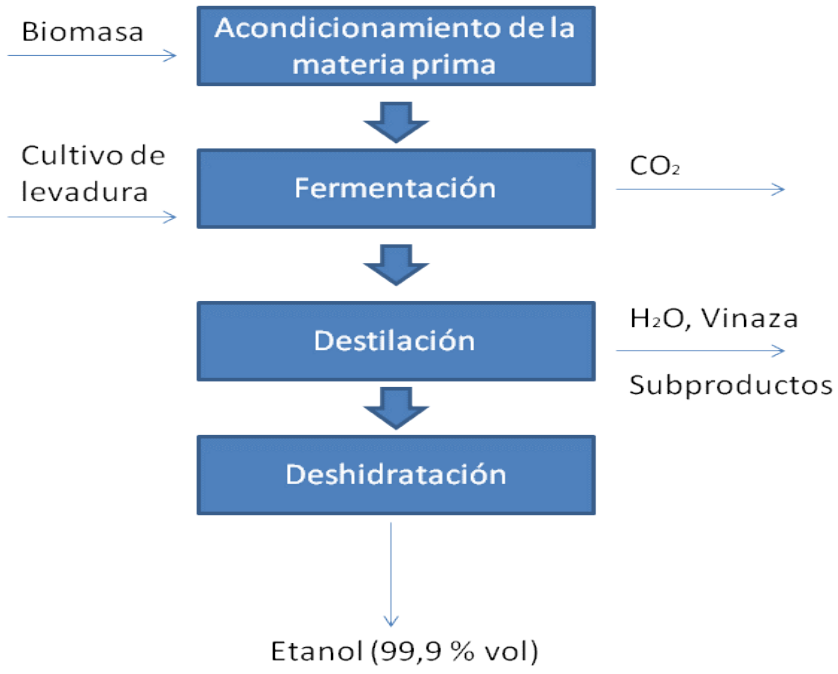

Fig. 1.6 Diagrama de proceso de producción de etanol

El etanol puede ser producido utilizando azúcares, cereales (almidón) o biomasa lignocelulósica, los cuales contienen glucosa como su componente fundamental.

Para la obtención de alcohol a partir de cualquiera de las materias primas, se precisa la obtención de una disolución acuosa de azúcares denominada mosto, que sirva de base para los

procesos de fermentación mediante levaduras que dan como resultado una mezcla de etanol y agua que se somete a destilación **[4].**

1.2.4.1 Producción convencional de etanol

El proceso consta de unas primeras etapas de trituración, extracción, prensado y filtrado que tienen por objeto reducir el tamaño y obtener una solución acuosa de azúcares que pasa a la etapa de fermentación y luego a la destilación, rectificación y deshidratación (ver Figura 1.6).

- **Fermentación**

Es la degradación anaeróbica de los compuestos orgánicos, realizada por las enzimas de ciertos microorganismos, llamados levaduras o fermentos. Se produce la transformación de una molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y en dos de dióxido de carbono.

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

La forma tradicional de fermentación es con un proceso discontinuo, utilizando células libres de levadura **[13]**.

A pesar de parecer una reacción simple, la fermentación es en realidad una reacción compleja ya que las levaduras además de transformar los azúcares en alcoholes utilizan otros nutrientes para reproducirse.

La levadura más utilizada comercialmente es la *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura convierte la glucosa en etanol bajo condiciones anaeróbicas, generando dos moles de adenosín trifosfato (compuesto portador de energía en los seres vivos), por cada mol de glucosa consumida **[14]**, además de 2 moles de etanol. Este microorganismo tiene también la capacidad de convertir las hexosas en CO_2 aeróbicamente, por lo que dependiendo de las concentraciones de O_2 en el medio de cultivo y de la fuente de carbono, se puede favorecer uno de los dos procesos. Las levaduras tienen la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol **[15]**.

Para evaluar la efectividad de la fermentación se utilizan rendimientos biomasa/producto y producto/sustrato **[16].** El rendimiento teórico para la fermentación es de 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO_2 por gramo de glucosa; sin embargo, debido a que la levadura utiliza la glucosa para producir, también, otros productos, es difícil alcanzar este rendimiento teórico. El rendimiento experimental varía entre 90 y 95% del teórico y los rendimientos industriales varían entre 87 y 93% del teórico **[16].**

Los principales productos de la fermentación alcohólica son el etanol y CO_2, sin embargo, durante el proceso muchos productos intermedios quedan sin reaccionar como son el piruvato y el acetaldehído; también, se forman otros alcoholes pesados producto de la fermentación de otros azúcares como las pentosas **[17]**.

- **Destilación**

La destilación es un proceso de separación por diferencia en los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla, que al ser sometidos al calor, los compuestos más volátiles como el alcohol se evaporan y se concentran en fase de vapor.

Algunos tipos de destilación:

a. Destilación simple

En este tipo de destilación se produce la vaporización de un material por la aplicación de calor; el método es empleado en la industria de capacidad moderada y pequeña, para llevar a cabo separaciones parciales de los componentes más volátiles de mezclas de líquidos miscibles.

Normalmente, la mezcla líquida es cargada en lotes a un recipiente y sometida a ebullición. Los vapores que se desprenden continuamente, se condensan y se recolectan sin que tenga lugar ninguna condensación parcial ni retorno al recipiente en donde se lleva a cabo el calentamiento y ebullición de la mezcla.

La primera porción del destilado será la más rica en el componente más volátil y conforme continúa la destilación, el producto evaporado se va empobreciendo. Por lo tanto, el destilado puede recolectarse en varios lotes separados, llamados fracciones, obteniéndose así una serie de productos destilados de diferente grado de pureza **[18].**

b. Destilación fraccionada

Una columna de fraccionamiento consta de un tubo de vidrio de gran superficie interna que facilita el intercambio de calor entre el vapor ascendente (más caliente) y el condensado descendente (más frío). Con ello, aparecen a lo largo de la columna multitud de vaporizaciones y condensaciones (equilibrios líquido-vapor), resultando que, a medida que se asciende en la columna, el vapor es cada vez más rico en uno de los componentes, mientras que el residuo se enriquece en el otro.

Con una columna suficientemente larga, los productos de la destilación fraccionada (destilado y residuo) pueden ser componentes puros o un componente puro y un azeótropo, según que la mezcla sea ideal o no ideal **[18]**.

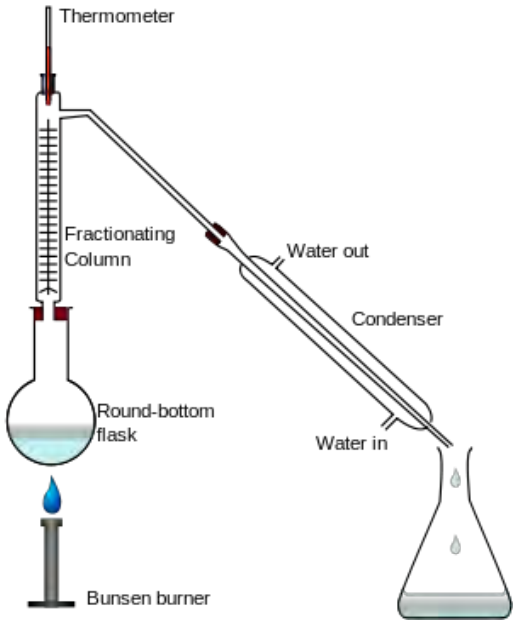

Fig. 1.7 Destilación fraccionada en el laboratorio

c. Rectificación

La destilación por rectificación es una destilación multietapas, donde se vuelve a destilar el condensado obtenido de la destilación anterior, de esta forma se obtiene un nuevo destilado con un mayor contenido de componentes más volátiles, aumentándose en cada etapa la pureza del destilado **[19]**.

La destilación se realiza en una columna de destilación en contracorriente, donde la mezcla líquida a separar se lleva al fondo de la columna y se lleva a ebullición, mientras que el vapor generado sube por la columna, sale de ella por la parte superior y se condensa. Parte del condensado se obtiene como producto (destilado), mientras el resto retorna a la parte superior de la columna, y está se denomina reflujo.

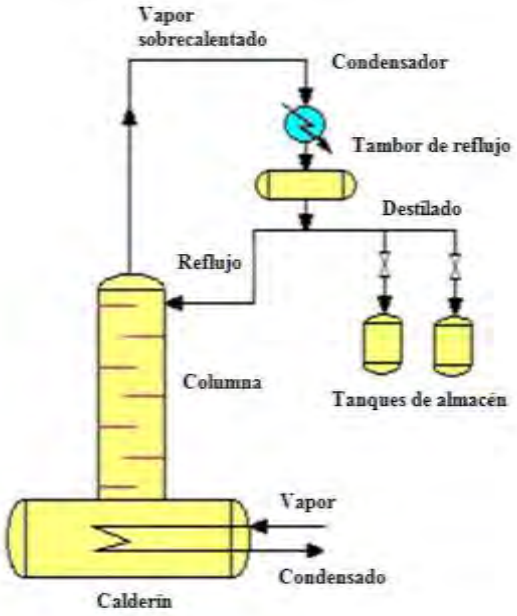

Fig. 1.8 Esquema de una columna de destilación discontinua [20]

- **Deshidratación del etanol**

La deshidratación es un proceso físico que consiste en la separación del agua del destilado, para incrementar la pureza del etanol **[21]**.

La deshidratación produce una mezcla líquida de compuestos químicos que hierven; éstos son llamados azeótropos **[21]**.

Existen diversos procesos de deshidratación del etanol rectificado, tales como: **[22]**

a. Destilación al vacío

El sistema para obtener etanol anhidro consta de dos columnas consecutivas; la primera columna (columna despojadora) lleva la solución diluida hasta una composición cercana a la azeotrópica y luego esta solución se lleva a la segunda columna en la que se aplica el vacío para deshidratar el etanol y obtener una composición por encima del 99% en volumen **[23].**

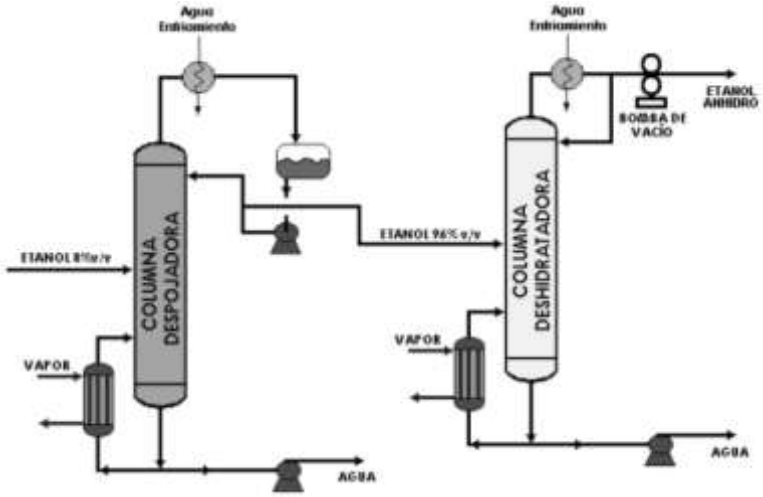

Fig. 1.9 Destilación al vacío [23]

b. Destilación azeotrópica

Este sistema utiliza tres columnas; la primera es la columna despojadora, la cual concentra la solución alcohólica hasta un punto cercano al azeotrópico; en la segunda columna se añade un disolvente que produce un azeótropo heterogéneo que posteriormente pasa a una decantación y la tercera columna retira el disolvente remanente y lo devuelve a la segunda columna **[23].**

El proceso se inicia con la adición de un disolvente o compuesto modificador (benceno o ciclohexano) a la mezcla de alimentación azeotrópica, en la segunda columna de destilación fraccionada, para formar un Azeótropo Ternario Heterogéneo (ATH); luego este ATH se separa como destilado en dicha columna **[21]**.

Por la parte superior de esta segunda columna se obtiene el etanol anhidro. El ATH es condensado como producto de cabeza y se le decanta para obtener dos fases inmiscibles. La fase orgánica, regresa a la columna azeotrópica como reflujo, mientras la fase acuosa es bombeada a una tercera columna de destilación fraccionada, llamada recuperadora, donde se separa el disolvente o compuesto modificador del agua **[21]**.

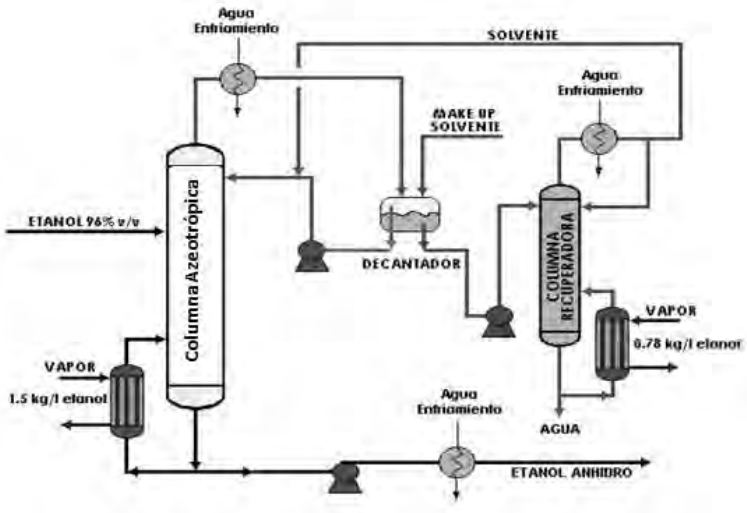

Fig. 1.10 Destilación azeotrópica [23]

c. Destilación extractiva

Consiste en adicionar un solvente no volátil, de alto punto de ebullición y miscible con la mezcla de alimentación azeotrópica, en una columna de destilación fraccionada, para alterar las volatilidades de los componentes claves, sin la formación de un nuevo azeótropo **[21]**.

Consta de tres columnas de destilación fraccionada. La primera columna es la rectificación y es similar a la descrita para la destilación azeotrópica. La segunda columna, llamada extractiva, recibe la solución alcohólica rectificada y al solvente en contracorriente. En el tope de la columna, el etanol anhidro es condensado y obtenido como producto principal. La corriente de fondo de la columna, constituida por agua y solvente, se alimenta a una tercera columna, llamada recuperadora; donde el agua es separada del solvente como producto de cabeza y es enviada como alimentación a otras etapas del proceso **[21]**.

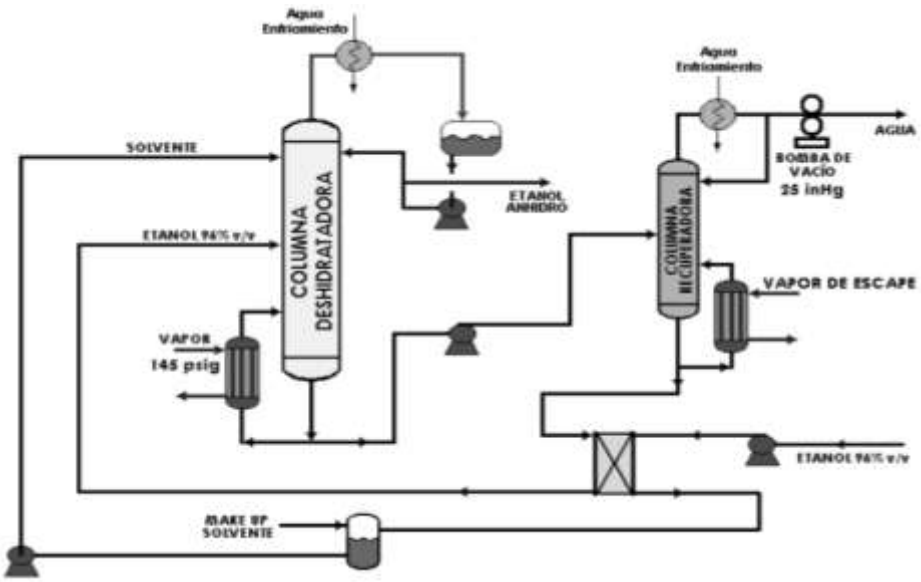

Fig. 1.11 Destilación extractiva [23]

d. Destilación extractiva salina

Es un proceso análogo a la destilación extractiva, con la diferencia de que el agente es una sal iónica, no volátil y soluble en la mezcla de alimentación **[21]**.

Entre las ventajas de la destilación salina se encuentran las siguientes **[24]**:

- Disminución del número de equipos requeridos para la destilación, ya que con una sola columna se puede reconcentrar el alcohol proveniente de la fermentación y obtenerlo muy puro (99,8-99,9% molar).
- La operación requiere de pequeñas cantidades de agente salino.
- El producto obtenido está totalmente libre del electrolito, debido a la baja volatilidad de éste.
- Se requieren bajos costos energéticos y de equipos.

Las sales más comunes utilizadas para este fin son: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), yoduro de potasio (KI), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y acetato de potasio ($C_2H_3O_2K$).

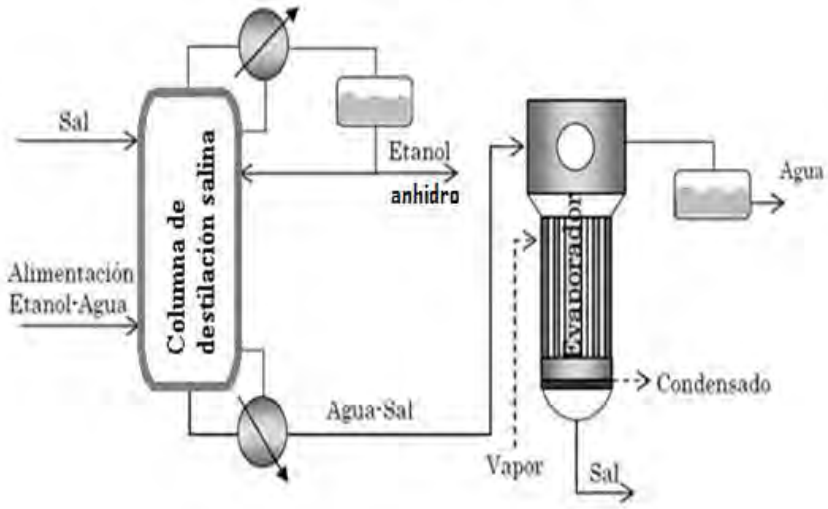

Fig. 1.12 Destilación salina [24]

e. Tamices moleculares

Son sustancias granulares fabricadas a partir de aluminosilicatos de potasio, que están caracterizadas por su capacidad de retener sobre su superficie algunos tipos de especies químicas, que por lo general son disolventes.

La operación de separación por tamices moleculares puede darse en fase líquida o de vapor. En la operación en fase líquida, se utiliza gas caliente para la regeneración del lecho de tamiz molecular; esto conduce a un deterioro acelerado por causa del choque térmico. La regeneración se lleva a cabo haciendo pasar una corriente de gas caliente a través del lecho de tamiz molecular. La operación en fase vapor permite alargar la vida promedio del tamiz hasta por 10 años, ya que la regeneración se hace recirculando parte de los vapores de etanol anhidro sobrecalentado al lecho, con el fin de retirar la humedad acumulada **[23].**

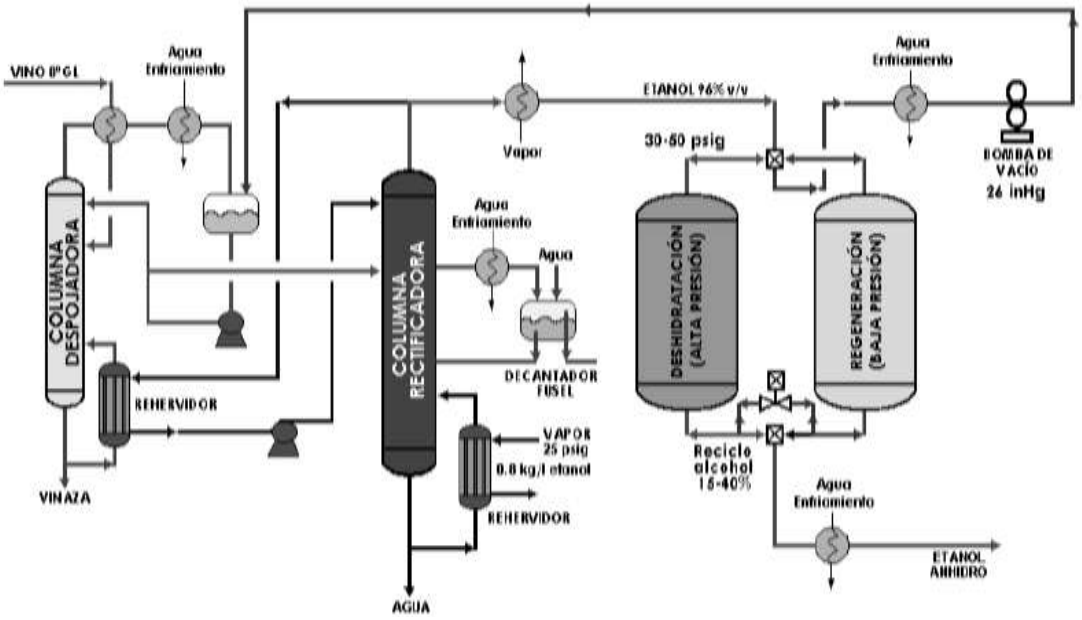

Fig. 1.13 Sistema de tamices moleculares [23]

f. Pervaporación

Es un proceso relativamente nuevo y más complejo, que remueve compuestos orgánicos volátiles de mezclas acuosas y presenta elementos en común con la ósmosis inversa y la separación de gases **[23].**

Una mezcla líquida se pone en contacto con una membrana polimérica permeable microporosa y selectiva. Uno de los componentes de la mezcla es transportado a través de la membrana, en estado vapor, siendo condensado y recuperado.

La permeación es inducida por una disminución de la presión parcial del componente permeable mediante vacío o por una corriente de un gas inerte. La corriente del tope de una columna rectificadora es enviada a una unidad de pervaporación, donde el permeado es obtenido al reducir la presión del otro lado de la membrana hidrofílica. El etanol anhidro es obtenido como producto de la unidad. El permeado es condensado y enviado a un tanque almacenador, de donde es reciclado a la columna rectificadora.

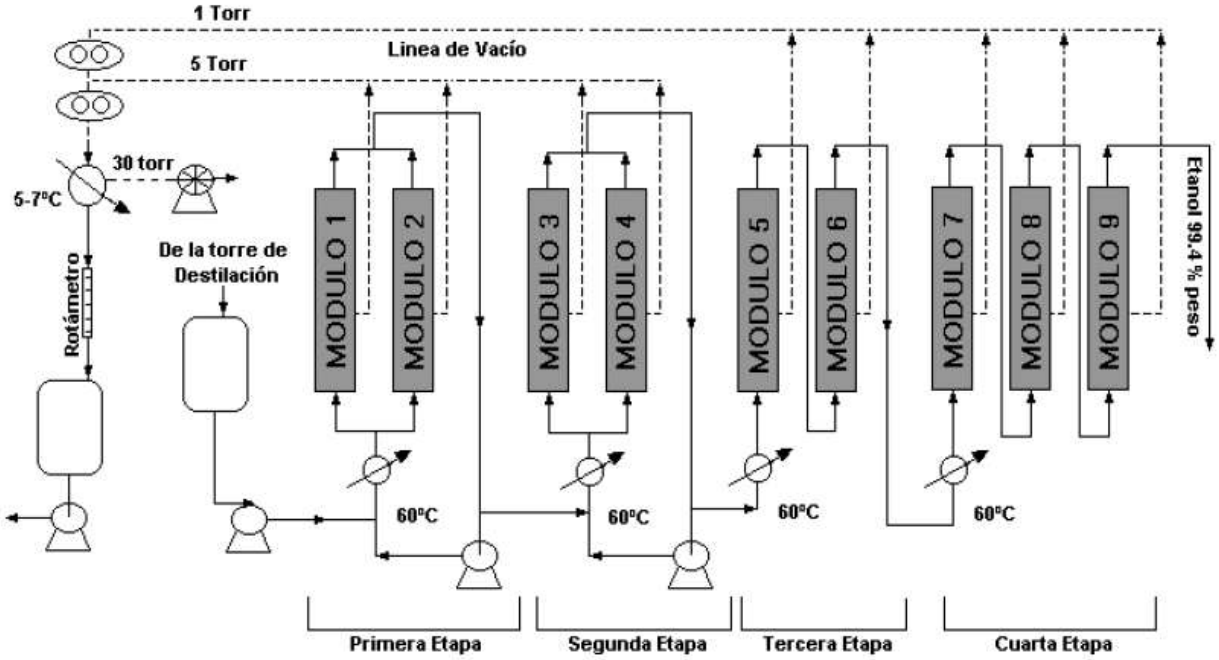

Fig. 1.14 Pervaporación [23]

g. Procesos híbridos [23]

Es la tecnología más prometedora para la deshidratación de etanol, en especial para el sistema de destilación-pervaporación, añadiéndose como beneficio principal la disminución considerable de los costos de inversión y de operación.

La alimentación se envía a la columna de destilación, que opera a presión atmosférica, donde se produce agua casi pura y un destilado rico en etanol. Luego el destilado se envía a una etapa de pervaporación, donde se produce un permeado y un retenido. El vapor permeado se condensa bajo condiciones de vacío y se recircula a la columna de destilación.

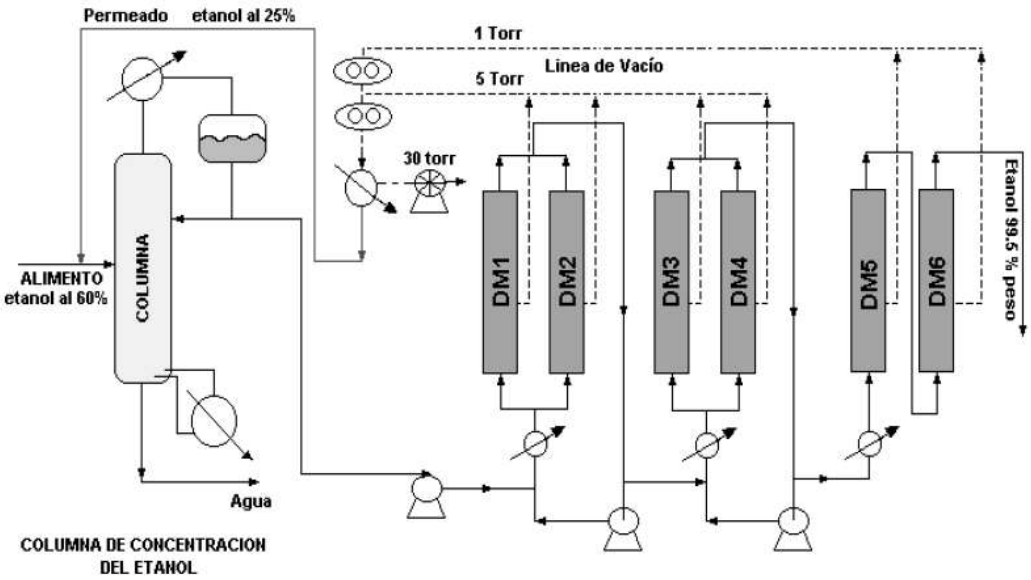

Fig. 1.15 Diagrama de procesos híbridos [23]

1.2.4.2 Producción de etanol a partir de material lignocelulósico

La obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es un proceso complejo debido a la poca accesibilidad a la celulosa, pues forma parte de una matriz entremezclada con lignina y hemicelulosa; es por ello que son necesarios pretratamientos que degradan la hemicelulosa; así como procesos de deslignificación que eliminan la lignina, permitiendo una mayor accesibilidad a la celulosa, y facilitando el proceso de hidrólisis.

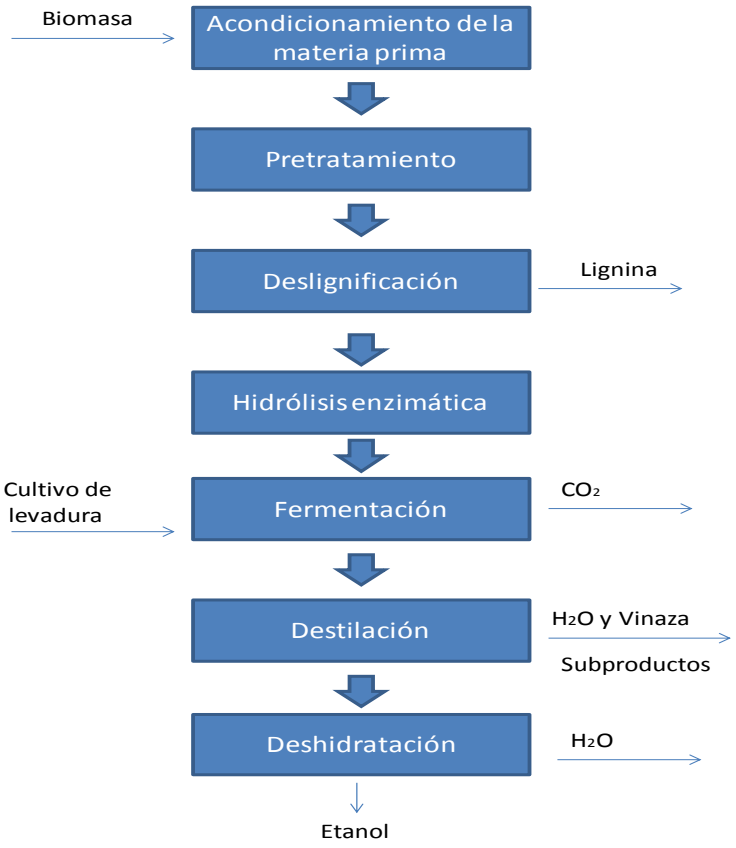

Fig. 1.16 Diagrama de proceso de producción de etanol de material lignocelulósico

- **Pretratamientos**

Existen diversos tipos de pretratamientos (físicos, químicos, térmicos, biológicos) que permiten la degradación de hemicelulosa y lignina de la biomasa **[25]**.

a. Pretratamiento físico [26]

Trituración mecánica

El pretratamiento de trituración mecánica se utiliza para reducir el tamaño de partícula y cristalinidad de la lignocelulosa, de la madera, con el fin de aumentar el área de superficie específica y reducir el grado de polimerización.

Extrusión

La extrusión es un nuevo y prometedor pretratamiento físico para la conversión de biomasa para la producción de etanol.

En la extrusión, los materiales se someten a calentamiento, mezcla y cizallamiento, lo que resulta en modificaciones físicas y químicas durante el paso a través del extrusor. Las ventajas de este pretratamiento son: la capacidad de proporcionar alta cizalla, transferencia de calor rápida y rápida mezcla.

b. Pretratamiento químico

Pretratamiento con ácido [26]

Los pretratamientos ácidos emplean catalizadores para conseguir un efecto más fuerte en la hemicelulosa y en la lignina que en la celulosa cristalina.

Su principal objetivo es solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa, haciendo que la celulosa sea más accesible a las enzimas.

Los procesos catalizados por ácido se pueden clasificar en dos grupos: tratamientos con ácidos concentrados o tratamientos con ácidos diluidos. Sin embargo, la utilización de los ácidos concentrados es menos atractivo para la producción de etanol, debido a la mayor formación de compuestos inhibidores de las levaduras.

Pretratamiento alcalino [25]

Los pretratamientos alcalinos incrementan la digestibilidad de la celulosa y son más eficaces para la solubilización de la lignina, presentando un efecto menor sobre la celulosa y la hemicelulosa que los procesos ácidos o hidrotérmicos **[27]**. Esta tecnología es efectiva en función del contenido de lignina de la biomasa y se puede realizar a temperatura ambiente.

c. Pretratamiento físico-químico

Oxidación húmeda

Es un método de pretratamiento oxidante que emplea oxígeno o aire como catalizador. Cuando no se añade oxígeno, el proceso es similar a un pretratamiento hidrotérmico y comparable al pretratamiento de explosión de vapor. Se realiza durante 5-15 min a temperaturas de 170 a 200 °C y a presiones de 10 a 12 bar.

Expansión de fibra por amoniaco (AFEX)

Durante el pretratamiento AFEX, la biomasa se trata con amoníaco anhidro líquido, con temperaturas entre 60 y 100 °C y presiones elevadas durante un periodo de tiempo variable **[28]**. El amoniaco tiene un marcado efecto sobre la lignocelulosa, causando la descristalización parcial de la celulosa y el desglose de lignina **[29]**.

En condiciones óptimas, AFEX puede alcanzar más del 90% de conversión de la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables. A pesar de la poca eliminación de la lignina, la digestión enzimática con cargas bajas de enzimas es muy alta en comparación con otras alternativas de pretratamientos.

d. Pretratamiento biológico

El pretratamiento de lignocelulosa con hongos se considera un proceso favorable al medio ambiente debido a que no se utilizan productos químicos; además, no es corrosivo, no requiere de mucha energía y produce pocos inhibidores **[30]**.

El cultivo sumergido de los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus* produce enzimas ligninolíticas. Este tipo de hongo degrada la lignina más extensa y rápidamente que cualquier otro microorganismo. Su actividad parece estar relacionada a la producción de enzimas como manganeso peroxidasa y la lacasa, que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas.

e. Pretratamientos hidrotérmicos

Para la presente tesis se ha empleado los siguientes pretratamientos hidrotérmicos: Steam Explosion (SE) *y Liquid Hot Water* (LHW), así como deslignificación por ozonización.

Los pretratamientos hidrotérmicos fueron escogidos debido a su bajo impacto en el medio ambiente, ya que no requieren de la adición de químicos, además de presentar menores cantidades de inhibidores en comparación al resto de experimentos, los cuales podrían afectar la eficacia de los procesos posteriores **[25].**

Steam Explosion

Es uno de los métodos más utilizados para la degradación de la hemicelulosa en la biomasa. Consiste en someter a la biomasa a elevada temperatura y presión de vapor saturado (l40 °C - 240 °C y 0,32 MPa - 3,4 MPa) dentro de un biorreactor, para luego ser despresurizado de manera instantánea y violenta sobre un tanque recolector, ocasionando el rompimiento de la hemicelulosa del material y la formación de ácido acético **[25].**

El rompimiento de la hemicelulosa es producto de la acción degradante de la evaporación instantánea del agua interna de la biomasa, que además ocasiona la formación de ácido acético debido a la reacción del agua con los radicales acetilos desprendidos de la hemicelulosa **[31].**

A este proceso sin la adición de productos químicos o biológicos se le conoce como autohidrólisis; bajo estas condiciones, los grupos acetilos de la hemicelulosa generan ácidos (acético, fórmico, levulínico), los cuales se cree incrementan la eficiencia total del pretratamiento; sin embargo, estos compuestos son inhibidores para los microorganismos usados durante el proceso de fermentación **[26]**.

Liquid Hot Water

Es un pretratamiento hidrotérmico que tampoco requiere de la adición de químicos. Una alta presión y un espacio libre del 25% aproximadamente **[2]** del biorreactor mantienen el agua en estado líquido a elevadas temperaturas (170 °C - 230 °C) **[32].** El pH debe mantenerse dentro de un rango de 4-7 **[2]**.

El vapor saturado o el agua caliente condensan el agua presente en las células de la biomasa, como resultado se liberan ácidos orgánicos (ácido acético y ácido urónico) por saponificación de hemicelulosa urónica y grupos acetilos. Además, las elevadas temperaturas utilizadas en ambos pretratamientos, hacen que el agua presente en la mezcla actúe como ácido acético o fórmico **[17]**, el cuál degrada casi en su totalidad la hemicelulosa y parcialmente la lignina haciendo la celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática **[25]**.

f. Deslignificación por ozonización

Se denomina deslignificación a la eliminación selectiva de la lignina de los materiales lignocelulósicos, esto se consigue fragmentando la lignina y disolviendo los fragmentos **[33].**

El método de deslignificación que se usa en la parte experimental de esta tesis es por ozonización, que consiste en inyectar ozono a una mezcla embebida en una solución de ácido acético, para degradar la hemicelulosa y lignina presentes.

El ozono es un agente oxidante que muestra una eficiencia de deslignificación alta **[34]**. Además, en presencia de ácido acético se solubiliza y presenta una gran selectividad hacia la degradación de la lignina y las materias orgánicas presentes **[35]**.

Se conoce que a mayor contenido de lignina, el ozono ataca más directamente a la lignina y por tanto, el porcentaje de glucanos[3] en términos relativos aumenta **[36]**. La hemicelulosa es ligeramente afectada, mientras que la celulosa no es afectada. Así, la cantidad de compuestos de degradación derivados de la hemicelulosa y de la celulosa es muy baja.

Las ventajas que el proceso ofrece es que no produce compuestos inhibidores y puede realizarse en condiciones ambientales de presión y temperatura. Entre sus desventajas se tiene que debido a la gran cantidad de ozono necesaria, puede hacer al proceso económicamente inviable **[25]**.

---

[3] Los glucanos son polímeros de glucosa, con enlaces glucosídicos entre sus residuos de tipo ß(1-4). Los glucanos (1-4) del tipo del almidón, quedan alineados de forma helicoide.

- **Hidrólisis de la celulosa**

Se entiende por hidrólisis al proceso por el cual se incorpora agua y se descompone la celulosa en glucanos y glucosa.

Existen dos tipos de hidrólisis:

a. Hidrólisis ácida

Constituye una reacción heterogénea, en la que el material celulósico está en fase sólida y el agente hidrolítico en fase acuosa.

Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos, por lo que requieren de reactores que resistan la corrosión.

El pretratamiento con ácido presenta un rendimiento relativamente bajo y, alta formación de subproductos, necesitando un elevado consumo de energía **[37]**, e incrementando los costos en comparación con otros tratamientos.

Después de la hidrólisis ácida se requiere de una neutralización del pH para evitar la inhibición durante la fermentación **[22]**.

b. Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática degrada la celulosa presente en la biomasa, mediante la adición de enzimas celulolíticas.

Este proceso consume menos energía y puede dar un producto puro con mayor rendimiento **[37]**. Una buena medida de la eficacia de una enzima es el porcentaje de conversión de celulosa, que se define como la cantidad de celulosa convertida en glucosa dividida por la cantidad total de celulosa. Se puede lograr una alta conversión de celulosa aumentando la dosis de enzima o el tiempo de hidrólisis **[38].**

La hidrólisis enzimática en un medio heterogéneo, tiene las siguientes etapas (ver Figura 1.17): **[39]**

- Transferencia de las moléculas de enzima (E) de la solución acuosa a la superficie de sustrato de celulosa (S).
- Formación del complejo enzima-sustrato (ES), previa adsorción de las moléculas de enzima sobre la celulosa.
- Transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo ES.
- Reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P), glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hacia el medio dispersante acuoso.
- Descomposición de la celobiosa en glucosa por medio de β-glucosidasas.

$$\text{Adsorción:} \quad (S) + (E) \leftrightarrow [(ES)]$$
$$\text{Reacción:} \quad [(ES)] \rightarrow (E) + (P)$$

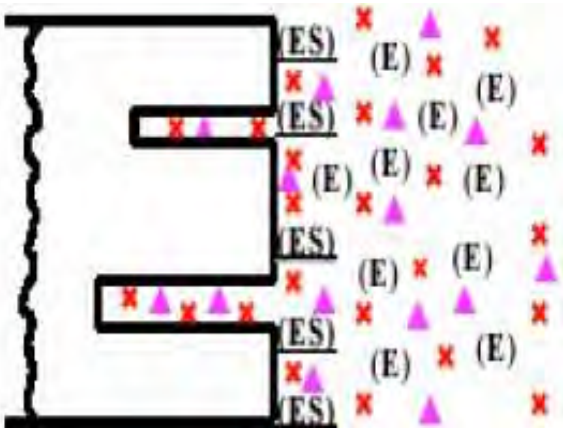

Fig. 1.17 Interacción enzima-sustrato [39].

1.3 Estudio de las enzimas celulolíticas

1.3.1 Descripción general

La mayoría de microorganismos celulolíticos como *Trichoderma sp, Sporotrichum sp, Penicillium sp, y Aspergillus sp,* son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas[4] **[40]**.

La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación que han sido estudiados durante décadas, encontrándose diversas condiciones de elaboración y propiedades finales **[41]**.

Las celulasas son enzimas de acción hidrolítica, derivadas de procesos naturales de fermentación, que presentan un enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos ß-1,4 presentes en la celulosa.

Una enzima celulasa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, que forman lo que se denomina un complejo enzimático, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa **[39]**. Este complejo presenta por lo menos tres actividades diferentes **[42]**, que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa.

1.3.2 Ventajas de la hidrólisis enzimática [39, 43]

- Sustituye el uso de tratamientos ácido.
- No presentan una amenaza para el medio ambiente.
- Son catalizadoras, acelera las reacciones bioquímicas.
- La actividad catalítica de la enzima depende tanto de su capacidad de adsorción sobre el sustrato, como de la formación del complejo activo enzima-sustrato.
- Convierten la celulosa en azúcares fermentables.
- Mejora la conversión de la biomasa lignocelulósica en azúcares.
- Pueden trabajar a baja temperatura y pH moderado.

[4] Enzimas que degradan la hemicelulosa.

1.3.3 Actividad enzimática celulolítica

Se ha demostrado que parámetros como la temperatura, tipo de enzimas, mohos y propiedades fisicoquímicas influyen en el desarrollo del proceso de degradación enzimática.

Para el desarrollo y estudio de la actividad enzimática de sustratos celulósicos se consideran cuatro factores **[39]**:

- Estructura y propiedades fisicoquímicas del sustrato celulósico.
- Las propiedades y modo de acción de la enzima celulasa.
- El modo de interacción entre las moléculas de enzima y celulosa.
- Las condiciones del medio del sistema reaccionante.

Dentro de las tres actividades de las celulasas tenemos a las endo-ß- 1,4-glucanasa o carboximetil celulasa, encargadas de romper al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, de producir un rápido decremento en la longitud de la cadena y de un lento incremento de los grupos reductores libres; las exo-ß-1,4-glucanasa o avicelasa, remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero y, finalmente la ß-glucosidasa hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa **[44]**.

La especificidad de la catálisis hace que para cada celulasa utilizada, las condiciones de pH y temperatura sea diferente, variando en función del tipo de enzima comercialmente utilizado. Por lo tanto, la efectividad y reproductibilidad del tratamiento depende del control de estas dos variables **[39]**.

1.3.4 Enzimas celulolíticas Cellic CTec 2

Novozymes es una empresa de biotecnología con un fuerte enfoque en la producción de enzimas, la cual ofrece más de 700 productos biotecnológicos para diversos sectores como: alimentos y bebidas, biofarma, textil, pulpa y papel y, bioenergía.

Dentro del sector de bioenergía produce enzimas que ayudan a la conversión de la celulosa en azúcares fermentables; estas enzimas se han perfeccionado a lo largo de los años, hasta llegar a las enzimas Cellic CTec 2 y Cellic CTec 3, las cuales logran mejores resultados con menores cantidades de enzimas.

Por contacto con la empresa Novozymes, se consiguió las enzimas de tercera generación: Cellic CTec 2, usadas durante la parte experimental de la presente tesis.

1.3.4.1 Descripción general

Las enzimas Cellic CTec 2 son un tipo de celulasa compleja, que se utiliza para la conversión de celulosa en azúcares fermentables.
La empresa fabricante (Novozymes) la considera como la primera enzima comercialmente viable para la producción de biocombustibles, que permitirán la producción de etanol celulósico a un costo por debajo de 2 dólares por galón **[45]**.

Estas enzimas funcionan en distintos tipos de materias primas, incluyendo mazorcas y tallos de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar y astillas leñosas **[45].**

1.3.4.2 Importancia y usos

Se ha comprobado que estas enzimas incrementan el rendimiento del proceso de obtención de etanol de fuentes celulósicas, que es uno de los principales factores influyentes para alcanzar una rentabilidad apropiada para su comercialización.

Las enzimas pierden gradualmente su actividad con el trascurrir del tiempo; es por ello que el almacenamiento prolongado y/o condiciones adversas, tales como temperaturas altas, puede provocar el incremento de la dosis recomendada. Las condiciones de almacenamiento recomendables son de 0 a 25 °C, en un envase cerrado herméticamente y protegido del sol.

La empresa Novozymes recomienda una dosis basada en el nivel de celulosa contenida en el sustrato obtenido del pretratamiento que se utilice. Se sugiere que la dosificación de enzima, para la investigación inicial de un sustrato, sea de: 1,5%, 3,0%, 6,0%, y 30,0% w/w (g enzima/g de celulosa).

Las condiciones favorables para la hidrólisis enzimática con estas enzimas son: temperatura 45 °C-50 °C y pH 5,0-5,5. Tanto la temperatura como el pH son parámetros que deben mantenerse constantes a lo largo de la hidrólisis, que se estima en aproximadamente 72 horas **[38].**

1.3.4.3 Resultados previos

La empresa Novozymes ha colaborado con diferentes empresas de producción de etanol en el mundo, las cuales han trabajado con la familia de productos Cellic para lograr la optimización del proceso de producción de etanol celulósico.

El producto ha sido aplicado a diferentes materias primas y pretratamientos mecánicos y termoquímicos. Se ha determinado que si la materia prima pretratada contiene una cantidad apreciable de hemicelulosa, es recomendable combinar la celulasa Cellic CTec 2 y HTec 2, para impulsar la hidrólisis de la celulosa.

En el Anexo A se presenta una información técnica de estas enzimas.

Capítulo 2
Bioetanol y residuos de banano: situación y potencial

En este capítulo se presenta la situación actual del mercado peruano del etanol. Además, se hace una pequeña descripción del mercado internacional, dado que una empresa de producción de etanol debe contemplar la exportación de este producto, por la demanda que tiene en distintos países.

Por otra parte, se describen los residuos lignocelulósicos derivados del cultivo de banano orgánico, evaluando su potencial para la producción de etanol.

2.1 Situación internacional del etanol

El etanol es un biocombustible que puede ser mezclado con la gasolina. Asimismo, es usado como insumo en las industrias de cosméticos, farmacéutica, química, elaboración de bebidas, entre otras.

Países como Brasil, EE.UU., India, Colombia, Tailandia, y la mayoría de países industrializados están comprometidos a emplear el etanol como combustible automotor alternativo, motivados por las preocupaciones ambientales y por la búsqueda de otras alternativas al consumo de hidrocarburos. Además, las importaciones de petróleo se acrecientan cada vez más a nivel mundial, producto de la industrialización de estos países, ocasionando grandes desembolsos económicos y pérdida de la calidad ambiental en estas naciones. **[46]**

El continente americano concentra el 88% de la producción mundial de etanol. Estados Unidos y Brasil son los principales productores con 63% y 24% de la producción mundial respectivamente. Aunque en el 2011 la producción mundial de etanol disminuyó respecto al año anterior, Estados Unidos alcanzó la mayor producción de toda su historia, 53 000 millones de litros **[47]**.

En el 2011, Estados Unidos exportó niveles record de etanol, con un total de 1 200 millones de galones, comparados con los casi 400 millones de galones en el 2010, siendo Brasil el principal destino, seguido de Canadá y Europa **[48]**.

China es el principal productor de etanol en Asia y el cuarto a nivel mundial. En el 2012 la producción conjunta de sus cinco plantas (4 instalaciones basadas en cereales y una basada en yuca) alcanzó 2 400 millones de litros de etanol **[49].** Con el fin de seguir aumentando la

producción de etanol, el gobierno de China otorga subvenciones de producción a todas las plantas del país **[50]**.

Tabla 2.1 Producción mundial de etanol del 2007 al 2012, en millones de litros [49]

País	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Argentina	-	-	25	132	210	270
Australia	50	131	208	284	298	450
Brasil	20 196	24 772	22 556	25 326	19 935	20 220
Canadá	640	850	955	1 200	1 350	1 800
China	1 700	2 000	2 050	2 050	2 100	2 400
Colombia	272	256	327	291	337	370
Unión Europea	1 803	2 816	3 702	4 258	4 450	4 985
India	170	263	105	365	430	610
Tailandia	192	336	401	426	510	690
Estados Unidos	24 552	34 968	40 728	50 087	52 805	52 000
Perú	-	-	7	126	180	288
Otros	301	486	652	592	812	1 034

Tabla 2.2 Mezclas de etanol en algunos países [47]

País	Mezcla obligatoria	Comentario
Argentina	E5	
Australia	E6, E5	E6 en New South Wales , E5 en Queensland
Bélgica	E4	
Brasil	E18-25	
Canadá	E5	E7,5 en Alberta
China	E 10	En 9 provincias
Colombia	E8	
Alemania	E10	
Guatemala	E5	
India	E10	
Indonesia	E3	
Jamaica	E10	
Paraguay	E24	
Perú	E7,8	
España	E6,5	
Filipinas	E10	
Estados Unidos	E10, E9, E2	E10 en Missouri, Montana, Florida, Minnesota, Oregon; E9 en Florida; E2 en Luisiana y Washington
Uruguay	E5	
Zambia	E10	

2.2 Situación nacional del etanol

El Decreto Supremo N° 021-2007-EM "Reglamento para la comercialización de biocombustibles", establece que a partir del 1° de enero de 2010, la gasolina comercializable en el mercado peruano tiene 7,8% de etanol carburante.

En la Tabla 2.3 se muestran las fechas de inicio de la aplicación del mencionado reglamento, en las diferentes regiones del país:

Tabla 2.3 Cronograma de aplicación de la comercialización obligatoria de gasohol en las regiones del Perú [51]

Región	Fecha de inicio
Piura y Lambayeque	01 de abril de 2010
Tumbes y Cajamarca	01 de mayo de 2010
La Libertad y Ancash	01 de junio de 2010
Huánuco	01 de julio de 2010
Pasco	01 de agosto de 2010
Junín	01 de septiembre de 2010
Lima y Callao	01 de junio 2011
Ica	
Huancavelica	
Ayacucho	
Apurímac	
Cusco	
Arequipa	
Puno	
Moquegua	
Tacna	

El etanol se requiere en distintos tipos de industrias, para la elaboración de productos como: **[52]**

- **ETBE (Etil Tert-Butilt-Éter):** aditivo para mejorar el octanaje de la gasolina que reemplaza el Metil Tert-Butil-Éter (MTBE) en la gasolina sin plomo.
- **Gasohol:** son mezclas de etanol y gasolina para uso automotor.
- **Alcohol neutro (96 °GL – 97 °GL):** se utiliza en la elaboración de licores, en aplicaciones químicas, biológicas y farmacológicas.
- **Alcohol desnaturalizado (97 °GL):** se utiliza para fines industriales, como disolvente.
- **Alcohol medicinal (70 °GL y 90 °GL):** se utiliza en la preparación de lociones y disolventes suaves.
- **Alcohol anhidro (99,6 °GL - 99,8 °GL):** es el alcohol deshidratado, que se utiliza como carburante en el gasohol.

A partir de 1999 el Perú comenzó a exportar alcohol etílico rectificado[5], como resultado del inicio de operaciones comerciales hacia el exterior por parte del Complejo Agroindustrial Cartavio S.A. y Quimpac S.A.

En el 2009 la empresa Sucroalcolera del Chira S.A dio inicio a sus exportaciones de etanol con 6 500 m^3 valorizadas en US$ 5,4 millones. Los principales destinos fueron Estados Unidos, Holanda y Ecuador **[53]**.

En el 2010 las exportaciones de etanol crecieron un 13% respecto al año anterior. Perú exportó un total de US$ 36,6 millones a un precio promedio de US$ 0,57/L. El principal destino de exportación fue Holanda con US$ 15,9 millones (44% del total), seguido de Colombia que incremento sus compras hasta US$ 10,6 millones. La empresa exportadora líder fue la Corporación Azucarera del Perú SA con US$ 9,1 millones (29% del total) **[54]**.

Tabla 2.4 Exportaciones de etanol 2009-2010 [54]

Exportaciones alcohol etílico ≥ 80 °GL						
Mes	**2009**			**2010**		
	FOB ($)	**Miles de litros (L)**	**Precio promedio ($/L)**	**FOB ($)**	**Miles de litros (L)**	**Precio promedio ($/L)**
Enero	2 992 393	6 303,0	0,47	3 506 968	6 354,4	0,55
Febrero	3 327 653	6 388,2	0,52	665 891	1 046,3	0,64
Marzo	426 646	819,3	0,52	4 499 042	8 032,6	0,56
Abril	3 218 905	6 641,4	0,48	2 314 116	4 081,4	0,57
Mayo	432 723	774,9	0,56	5 473 840	10 159,0	0,54
Junio	468 639	793,1	0,59	4 320 261	7 927,9	0,54
Julio	3 453 125	6 475,2	0,54	3 661 188	6 403,0	0,57
Agosto	520 014	924,6	0,56	446 359	681,7	0,65
Septiembre	3 635 818	6 892,0	0,53	3 680 566	6 201,3	0,59
Octubre	3 762 988	7 159,4	0,53	3 237 701	5 932,0	0,54
Noviembre	600 457	1 013,5	0,59	1 153 673	1 871,0	0,62
Diciembre	9 662 837	15 119,0	0,64	3 646 818	6 181,0	0,59
Totales año	**32 502 199**	**59 305,0**	**0,54**	**36 606 424**	**64 872,0**	**0,57**
Promedio mes	**2 708 517**	**4 942,0**		**3 050 535**	**5 406,0**	
Porcentaje de crecimiento promedio	**127%**	**120%**	**3%**	**13%**	**9%**	**6%**

En el 2011 las exportaciones de etanol bajaron un 10% respecto al año anterior. Perú exportó un total de US$ 33,1 millones a un precio promedio de US$ 0,65/L promedio. Los principales destinos de exportación fueron Holanda, Ecuador, Colombia y Chile con US$ 17,8 millones, US$ 6,3 millones, US$ 6,1 millones y US$ 2,9 millones respectivamente **[55]**.

En el 2012 las exportaciones de etanol crecieron drásticamente un 161% respecto al año anterior. Perú logró exportar US$ 86,5 millones a un precio promedio de US$ 0,71/L.

[5] Etanol con grado de pureza es menor al etanol combustible.

Holanda fue el principal destino de exportación con US$ 35,3 millones (41% del total), seguido de Colombia con US$ 25,3 millones y Ecuador con US$ 18,1 millones. La principal empresa exportadora fue Sucroalcolera del Chira S.A con US$ 28,9 millones **[56]**.

Tabla 2.5 Exportaciones de etanol 2011-2012 [55, 56]

Exportaciones alcohol etílico ≥ 80 °GL						
Mes	**2011**			**2012**		
	FOB ($)	**Miles de litros (L)**	**Precio promedio ($)**	**FOB ($)**	**Miles de litros (L)**	**Precio promedio ($)**
Enero	3 729 384	6 026,6	0,59	4 469 781	6 460,6	0,69
Febrero	133 035	266,9	0,50	4 163 377	6 054,3	0,69
Marzo	2 206 374	3 760,7	0,58	5 356 283	7 921,4	0,68
Abril	312 460	474,5	0,65	1 293 751	1 574,3	0,82
Mayo	2 989 382	4 987,9	0,60	5 274 500	7 448,8	0,71
Junio	4 013 789	6 464,7	0,62	4 846 480	6 147,8	0,79
Julio	3 110 246	4 644,0	0,67	6 065 896	8 354,7	0,73
Agosto	1 921 717	2 886,7	0,66	13 310 902	17 529,5	0,76
Septiembre	2 994 334	4 688,4	0,64	7 759 959	10 854	0,72
Octubre	4 440 805	6 507,0	0,68	12 539 449	17 602,9	0,71
Noviembre	3 626 046	5 477,9	0,66	10 697 115	16 468,4	0,65
Diciembre	3 642 284	4 480,0	0,81	10 728 056	15 675,0	0,69
Totales año	**33 119 856**	**50 900,0**	**0,65**	**86 505 550**	**122 092,0**	**0,71**
Promedio mes	**2 759 988**	**4 241,7**		**7 208 796**	**10 174,0**	
Porcentaje de crecimiento promedio	**-10%**	**-22%**	**15%**	**161%**	**140%**	**9%**

En las Tablas 2.4 y 2.5 se muestra la evolución de precios promedio del etanol del año 2009 al 2012. Se aprecia que en el año 2012 los precios del etanol fueron superiores al de los anteriores años, observándose una tendencia creciente del precio.

2.3 Consumidores nacionales de etanol

Los principales consumidores de etanol, las refinerías de petróleo, mezclan la gasolina con el etanol carburante para comercializarlo como gasohol.

En el Perú existen 6 refinerías de las cuales solo 2 producen gasohol:

- **Refinería la Pampilla (Repsol):** principal productora de gasohol del país, sus instalaciones se ubican en la provincia constitucional del Callao.
- **Refinería Talara (Petroperú):** fue la primera refinería en comercializar gasohol, sus instalaciones se ubican en la localidad de Talara, departamento de Piura.

Como se muestra en la Figura 2.1, la cadena de comercialización del gasohol se compone de agricultores, productores, refinerías y distribuidores:

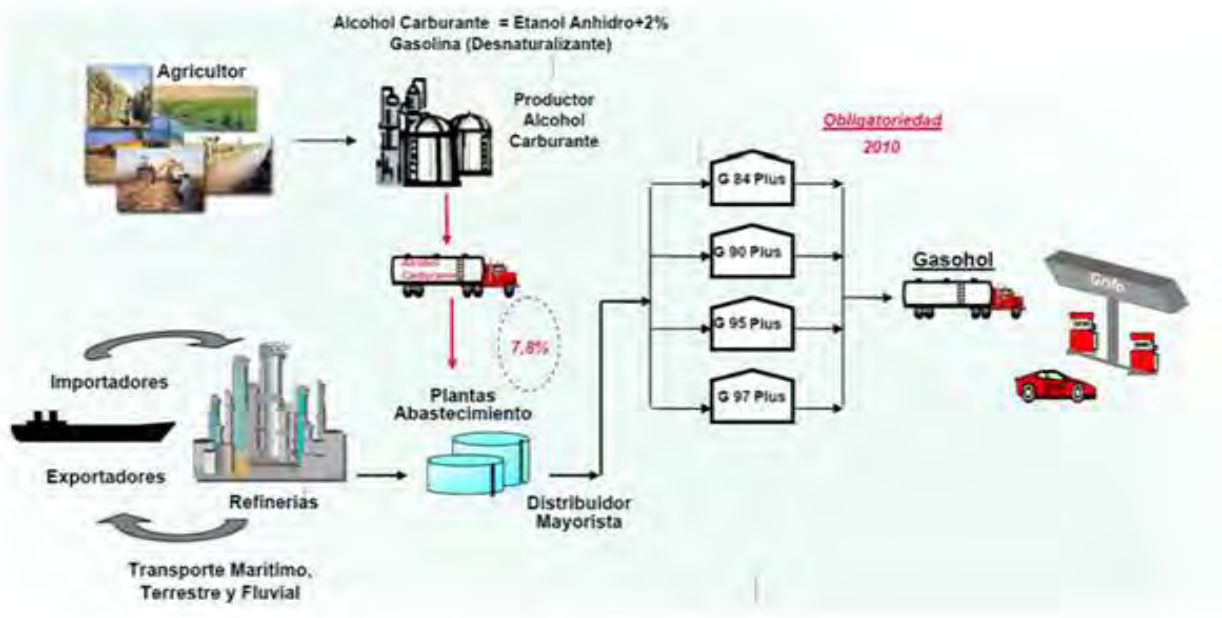

Fig. 2.1 Cadena de comercialización del gasohol [51]

2.4 Proveedores de etanol

Perú es un país que ha invertido más de US$ 200 millones en este rubro, generando 40 000 hectáreas sembradas y más de 15 000 puestos de trabajo en la última década **[57]**.

A continuación se presenta información sobre las principales empresas del sector:

- **Caña Brava**

Caña Brava es el conjunto de 3 empresas del grupo Romero que se dedican exclusivamente a la producción de etanol a partir de la caña de azúcar: Agrícola del Chira S.A., que se encarga de la cosecha y plantación de la caña de azúcar; Sucroalcolera del Chira S.A., encargada de la molienda y la producción industrial de etanol y; Bioenergía del Chira S.A. responsable de la generación de energía eléctrica a partir del bagazo **[58]**.

Su planta está localizada en el departamento de Piura y tiene una capacidad de producción de 350 mil litros de etanol anhidro por día, con una molienda de 4 000 toneladas diarias de caña.

La empresa inició a sus operaciones en el 2009. En diciembre de ese mismo año, la empresa exportó US$ 5,4 millones en etanol a Holanda, convirtiéndose en la primera empresa exportadora de etanol anhidro en el Perú **[53]**.

En el 2010 las exportaciones crecieron un 50% alcanzando los US$ 8,1 millones (21% del total de exportaciones). Los destinos de exportación fueron Holanda, Ecuador y Colombia **[54]**.

En el 2011 las exportaciones de la empresa disminuyeron a casi US$ 4 millones (12% del total), debido al aumento de la demanda interna de gasohol. El principal destino de las exportaciones fue Ecuador, seguido de Holanda y Colombia. Hasta ese año, Caña Brava era la única empresa productora de etanol anhidro en el Perú pero Maple Biocombustibles S.A inició sus operaciones en octubre de ese año **[55]**.

En el 2012 las exportaciones de la empresa aumentaron sustancialmente a US$ 31,7 millones, convirtiéndola en la principal empresa exportadora. En ese mismo año Maple Biocombustibles exportó etanol anhidro por US$ 21,2 millones **[56]**.

- **Maple**

Maple es una empresa integrada de energía independiente, con activos y operaciones en Perú. A través de sus subsidiarias Maple Etanol SRL ("Maple Etanol") y Maple Biocombustibles SRL, la empresa comenzó sus operaciones de cosecha de caña de azúcar y producción de etanol a finales de marzo del 2012 **[59]**.

Maple posee actualmente 13 500 ha de tierras situadas en el margen sur del río Chira en el norte del Perú de las cuales 7 000 ha se emplean para el cultivo de caña de azúcar **[59]**.

Maple utiliza modernas técnicas de cultivo y automatización, incluyendo el amplio uso de riego por goteo, recolección mecánica y la automatización dentro de planta. Por último, la ubicación de Maple cerca de la terminal de exportaciones en la costa del Pacífico le permite bajos costo de transporte para acceder a los mercados internacionales claves **[59]**.

La planta de etanol de Maple está diseñada para procesar hasta 5 000 toneladas de caña de azúcar por día y producir hasta 35 millones de galones de etanol por año. Además, sus instalaciones cuentan con una planta de generación de energía capaz de producir hasta 37 MW de energía **[59]**.

- **Corporación Azucarera del Perú S.A (Coazúcar*)***

Coazúcar es una corporación agroindustrial peruana dedicada a la siembra y procesamiento de la caña de azúcar; así como, a la comercialización de subproductos derivados como: azúcar, alcoholes, melaza y bagazo **[60]**.

Coazúcar es una empresa holding del Grupo Gloria que controla las empresas Casa Grande S.A, Cartavio S.A., San Jacinto S.A, San Juan S.A, Empresa Agrícola Sintuco S.A y Empresa Agraria Chiquitoy S.A. En la actualidad la empresa mantiene operaciones directas de fabricación de etanol en Cartavio, Casa Grande y San Jacinto **[60]**.

Coazúcar dio inicio a la exportación de alcohol etílico rectificado en el año 2009 con US$ 4 millones a Holanda y Ecuador **[54]**.

En el 2010 Coazúcar lideró las exportaciones de etanol de 96 °GL (no anhidro) con US$ 9,1 millones. Los destinos de exportación fueron Holanda, Ecuador, Colombia, Chile y Francia **[54]**.

En el 2011 las exportaciones de la corporación aumentaron a US$9,9 millones (30% del total); siendo el principal destino Holanda. En el 2012 Coazúcar fue la tercera empresa exportadora con US$14,98 millones después de Maple y Caña Brava **[56]**.

En enero del 2013, Coazúcar exportó US$ 6,4 millones a Ecuador y Holanda. **[61]**.

Además de Coazúcar, en Perú existen otras empresas productoras de etanol (no anhidro) a partir de caña de azúcar: Alambique Tumán y Empresa Agroindustrial Laredo. Sólo Maple Biocombustibles S.A y Sucroalcolera del Chira S.A producen y comercializan etanol anhidro.

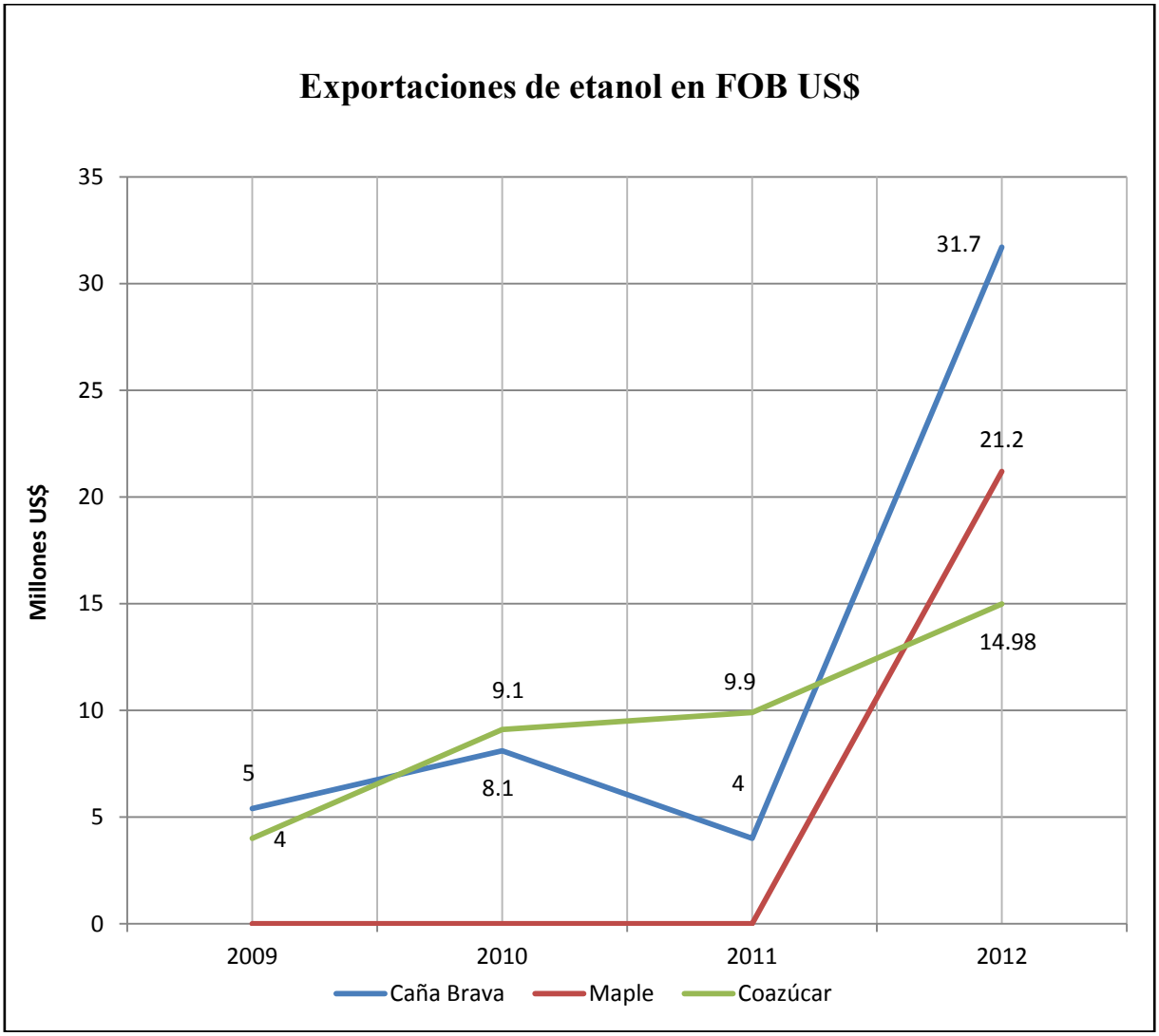

Fig. 2.2 Exportaciones anuales de etanol por empresa desde 2009 al 2012

2.5 Normas técnicas

2.5.1 NTP 321.126 de etanol carburante

La presente norma técnica peruana ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización de petróleo, derivados y combustibles líquidos, y el subcomité de biocombustibles, durante los meses de noviembre del 2008 a diciembre del 2009 **[62].**

Tabla 2.6 Especificaciones técnicas del etanol carburante [51]

Características	Especificaciones	
	Mínimo	Máximo
Etanol anhidro, porcentaje en volumen	95,20	
Metanol, porcentaje en volumen		0,50
Contenido de agua, porcentaje en peso		0,30
Contenido de desnaturalizante, porcentaje en volumen	2,00	3,00
Goma existente, lavada con solvente mg/100 mL		5,00
Contenido de cloruros inorgánicos, ppm (mg/L)		10,00
Apariencia	Claro, brillante, libre de contaminantes suspendidos o precipitados	
Contenido de cobre, mg/kg		0,10
Contenido de fósforo, mg/L		0,50
Acidez (ácido acético) (mg/L)		0,007
pH	6,50	9,00
Azufre, ppm		30,00
Sulfato total, ppm		4,00

2.5.2 Normas técnicas internacionales del etanol

La Tabla 2.7 muestra las especificaciones técnicas del etanol carburante en Estados Unidos y Brasil, normalizadas por la ASTM (*American Society for Testing and Materials*) y ANP (Agencia Nacional de Petróleo, Gas y Biocombustibles) respectivamente. Además se muestran las especificaciones en Europa y Suiza.

Tabla 2.7 Especificaciones técnicas del etanol carburante alrededor del mundo [51, 63]

Característica	Unidad		EEUU	Brasil	Suiza	Europa
Densidad (20 °C)	kg/m^3	máx.		791,5	792,0	
Grado alcohólico a 20 °C	°INPM, %m/m	mín.		99,3		
Grado alcohólico a 20 °C	°GL, %v/v	mín.	92,1	99,6	99,7	98,7
Agua	% v/v	máx.	1,0		0,3	0,3
Acidez total	mg/L (%m/m)	máx.	56,0	30,0	56,0	56,0
Conductividad eléctrica	μS/m	máx.		500,0	500,0	
pH			6,5 - 9,0		6,5 - 9,0	6,5 - 9,0
Contenido de Cobre	mg/kg	máx.	0,1	0,07	0,1	0,1
Ion cloruro	mg/kg (mg/L)	máx.	40,0		10,0	25,0
Goma existente, lavada con solvente	mg/100mL	máx.	5,0		5,0	
Metanol	% v/v	máx.	0,5		0,5	1,0
C3-C5	% v/v	máx.			2,0	2,0
Desnaturalizante	% v/v		1,96 a 4,76			
Contenido de sulfato	mg/kg	máx.			50,0	10,0
Contenido de fosofro	mg/L	máx.				0,5
Materia no volátil	mg/L	máx.				100

°INPM: porcentaje de alcohol en peso

2.6 Tendencias del uso del etanol

Actualmente, Estados Unidos y Brasil lideran la producción de etanol a nivel mundial. En Estados Unidos la Normativa de Combustibles Renovables establece un camino claro para un mayor uso de biocombustibles mientras que en Brasil una flota grande y creciente de vehículos con motor alcoholero garantiza un fuerte consumo de biocombustibles en el futuro **[49]**.

En Europa y Asia se están produciendo cambios significativos en la política de biocombustibles con el fin de impulsar su producción y comercialización. Al mismo tiempo, en los países en vías de desarrollo, sus gobiernos expresan mandatos y objetivos para la inclusión de un mayor porcentaje de etanol en la gasolina **[49]**.
Para la próxima década se prevé un aumento en la producción y consumo de etanol a nivel mundial pero a un ritmo más lento que en de la década del 2000 al 2010; sin embargo, se estima que en el 2020 la producción de etanol sea el doble a la actual **[64]**. Según expertos, podría duplicarse la producción de etanol en el año 2020, con una tasa de crecimiento del 10,1% a partir del 2011 (volumen de producción estimado de 45 291 millones de litros en el 2020) **[65]**.

Se espera que en los países asiáticos y de Oceanía puedan autoabastecerse hacia el 2015; siendo Japón, China, Australia y Nueva Zelanda los grandes importadores de etanol. Es probable que India, Indonesia y Tailandia sean exportadores para el 2015, aunque no con la misma capacidad que Brasil **[66]**.

De acuerdo a los escenarios de la Agencia Internacional de Energía (AIE) en términos del uso de la tierra, se espera que la proporción entre la disponibilidad mundial de tierra dedicada al cultivo de los biocombustibles contemple entre un 2,8% y un 3,8% al 2030, habiendo sido un 1% en el 2004 **[67]**.

2.7 Estudio de los residuos agrícolas de banano orgánico

2.7.1 Descripción general

El banano es una planta perteneciente a la familia de las musáceas y al género musa, de origen vegetal cuyo fruto es consumido por la población en general y por algunas especies animales que viven dentro del mismo ecosistema.

Es una planta que se siembra por única vez y se reproduce periódicamente; es decir, la planta madre[6] es sembrada y, después de un par de meses crecen de ella las plantas hijas, las cuales luego de que la planta madre da frutos éstas hacen lo mismo **[68].**

El peso de los residuos de la planta varía ente 20 a 45 kg. El pseudotallo está formado por el tronco de la planta y las vainas de las hojas, y su altura promedio es de 3,5 m; el número de hojas varia de 15 a 30 por planta y los raquis de 6 a 20, un raquis por cada racimo de bananos **[69].**

[6] Planta de la primera siembra.

Fig. 2.3 Partes y residuo de la planta de banano

La producción mundial promedio de banano es de 29,9 millones de toneladas anuales, generada principalmente en África con un 73,2% de la producción, mientras que en América Central y Sur se produce el 27,8% con un promedio de 7,1 millones de toneladas anuales.

2.7.2 Composición química

En el marco del proyecto: *Characterization and bioconversión of lignocellulosic banana Waste for biofuel production in rural agricultural communities in Perú and Colombia* **[70]**, se determinó la composición química del banano orgánico peruano, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.8:

Tabla 2.8 Composición química del banano de Perú [70]

	Pseudotallo	**Hojas**	**Raquis**
Ceniza	4,85 ± 0,54	11,48 ± 0,68	6,61 ± 1,38
Lignina	12,04 ± 0,03	25,69 ± 4,19	21,37 ± 1,31
Glucanos	60,41 ± 0,23	27,29 ± 0,66	41,96 ± 0,69
Xilanos	5,07 ± 0,24	6,87 ± 0,20	7,99 ± 0,25
	Pseudotallo	**Hojas**	**Raquis**
Galactanos	0,66 ± 32,00	1,22 ± 0,08	1,89 ± 0,08
Arabinanos	1,84 ± 0,07	3,39 ± 0,18	3,59 ± 0,07
Mananos	0,15 ± 0,21	0,00 ± 0,00	1,81 ± 0,04
Total	**85,02**	**75,94**	**85,22**

Los datos de la Tabla 2.8 son porcentajes del total sobre una base de peso en seco, en promedio con una desviación estándar (n = 2).

2.7.3 Situación del cultivo

El Perú cuenta con aproximadamente 300 mil hectáreas sembradas de frutales, de las cuales el plátano y el banano ocupan el 50%. El banano orgánico se cultiva principalmente en la zona costera norte occidental del país (en las regiones de Tumbes, Piura y Lambayeque) **[71]**.

La producción del banano orgánico se debe principalmente al esfuerzo conjunto de miles de pequeños productores que se han organizado en asociaciones de productores, lo que les ha permitido manejar uniformemente tecnologías de cultivo y de comercialización con certificación orgánica **[71]**.

La mayor parte de la producción de banano orgánico es exportada a Europa, Estados Unidos y Japón. El banano que no cumple con los estándares de calidad para exportación es calificado como banano de descarte y pasa a ser comercializado en el mercado nacional.

Las Tablas 2.9 y 2.10 muestran la producción y superficie de cosecha de plátano y banano orgánico en las regiones de Tumbes, Piura y Lambayeque.

Tabla 2.9 Producción de banano orgánico, en toneladas [71]

Región	Año				
	2007	2008	2009	2010	2011
Lambayeque	2 267	2 051	2 135	3 110	5 934
Piura	252 740	233 813	247 240	262 378	274 435
Tumbes	66 838	37 993	61 492	80 020	96 467

Tabla 2.10 Superficies cosechadas de banano orgánico [71]

Región	Superficie cosechada (hectáreas)				
	2007	2008	2009	2010	2011
Lambayeque	231	244	271	388	442
Piura	11 237	10 670	10 246	10 715	9 949
Tumbes	3 338	3 446	3 560	3 664	4 434

El periodo de cosecha de banano se realiza todo el año, pero la mayor producción se concentra entre enero y abril **[72]**.

En la cadena de producción del banano orgánico (ver Figura 2.4) participan cuatro actores: proveedores, productores, distribuidores del mercado nacional y empresas exportadoras. Se organizan en asociaciones que negocian los precios del banano con las empresas exportadoras, que se encargan de la cosecha, empaque del producto y gestión de exportación. También hay asociaciones que tienen sus propias plantas de empaque y exportan directamente a mercados de comercio justo (*fair trade*) **[72].**

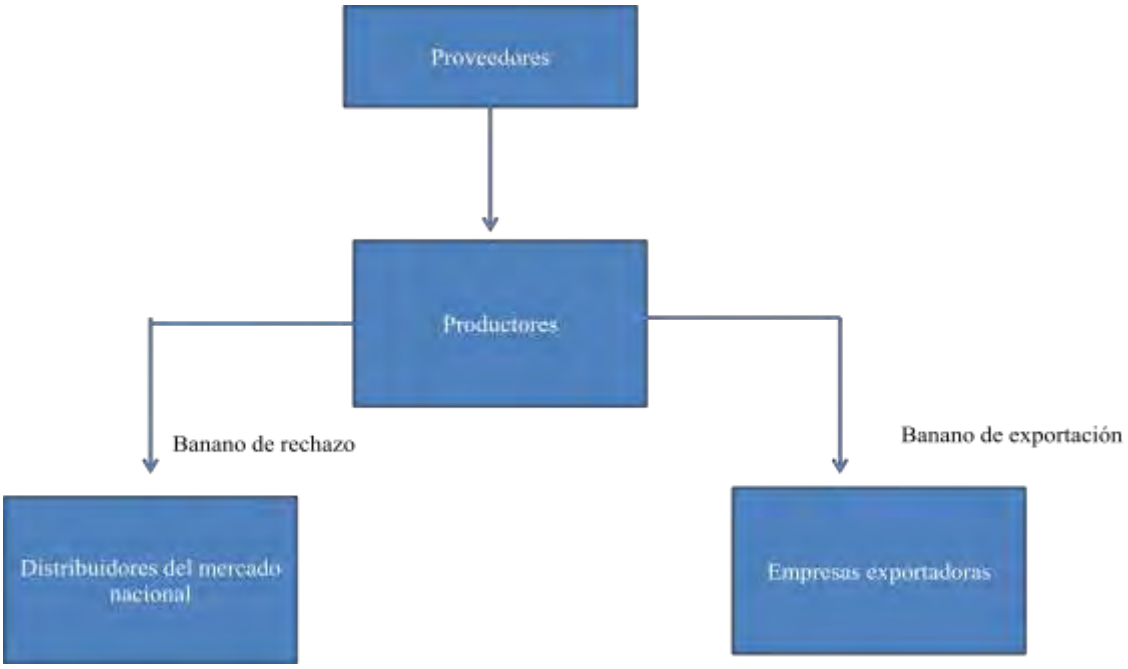

Fig. 2.4 Cadena de producción del banano orgánico en el Perú [72]

En octubre de 2012, las plagas llamadas mancha roja (insecto) y sigatoka negra (hongo) ocasionaron la devolución de toneladas de banano del mercado europeo, poniendo en grave riesgo las exportaciones de banano en las regiones de Tumbes y Piura **[73]**.

2.7.4 Importancia

Actualmente los residuos agrícolas de banano orgánico no tienen una importancia en el mercado del bioetanol, ni algún otro mercado. Pero existen investigaciones que se vienen realizando en distintas partes del mundo como Colombia y Estados Unidos, sobre el beneficio que podrían ofrecer estos residuos como fuente de material lignoceluloso para la producción de bioetanol.

2.7.5 Aprovechamiento tradicional

Tanto las hojas como los pseudotallos de la planta de plátano, son utilizados como abono de los propios suelos en los que son cultivados, ya que aún no existe ningún uso industrial. Es decir, luego de recoger las manos de plátano, se deja que la planta se pudra hasta que pierda fuerza y pueda tumbarse; al estar caída se termina de secar y es así como se incorpora al suelo como abono.

Las hojas también son utilizadas como envoltura de tamales, pero no existe un estudio que determine la cantidad usada para dicho fin. El pago que se realiza por aproximadamente tonelada de hojas es de S/**.** 100 **[69]**.

Capítulo 3
Parte experimental

En este capítulo se describen los equipos y métodos empleados en el estudio experimental de la presente tesis. Todos los ensayos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad de Piura, a excepción de la ozonización que se llevó a cabo en la empresa Agua VIP S.A.C en el distrito de Marcavelica – Sullana.

3.1 Diagrama del procedimiento experimental

La secuencia de etapas del procedimiento experimental aplicado en la presente tesis, se muestra en la Figura 3.1.

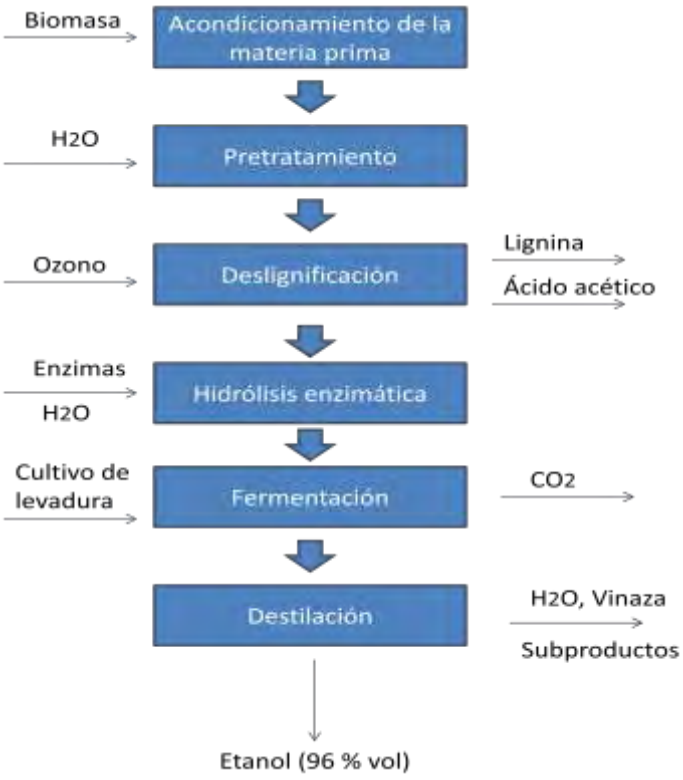

Fig. 3.1 Procedimiento experimental de obtención de bioetanol

3.2 Acondicionamiento de la materia prima

La materia prima utilizada para la parte experimental fueron hojas, pseudotallos y raquis de banano orgánico del valle del Chira. La biomasa fue obtenida de una parcela de banano orgánico de propiedad del Sr. Juan Escalante Abanto, miembro de la Asociación de Productores de Banano Orgánico de Salitral – APBOS; quien maneja riego por goteo de 4 horas diarias. El tiempo de vida de la planta de banano es de 9 a 10 meses, al cabo del cual se cosecha y se corta el pseudotallo. Para la experimentación se trabajó con plantas de 9 meses, recién cortadas.

La biomasa fue lavada con abundante agua, para eliminar la tierra y residuos de pesticidas como el furfural **[74]**; fue secada y posteriormente cortada con un procesador de alimentos y tijeras hasta conseguir trozos de unos 5 mm, con el objetivo de contribuir a una más fácil degradación de la biomasa durante los pretratamientos.

Fig. 3.2 Lavado de hojas de banano orgánico

Fig. 3.3 Hojas picadas de banano orgánico

Fig. 3.4 Tallo picado de banano orgánico

De cada tipo de biomasa cortada, la mitad del material se secó en una estufa de ventilación forzada, el resto se empleó directamente en los pretratamientos.

3.3 Determinación de la densidad aparente

La densidad aparente de un material es la relación entre el peso real seco y el volumen aparente. El volumen aparente, es el volumen que ocupa el material en un recipiente, incluyendo los espacios sin llenar y la porosidad.

Previo a la realización de los pretratamientos con biomasa seca, se halló la densidad aparente de las muestras de biomasa con diferentes niveles de secado, con el objetivo de determinar el nivel de secado que permita emplear la mayor cantidad posible de material en el biorreactor.

3.4 Pretratamientos

Se planificó dos tipos de pretratamientos hidrotérmicos con el objetivo de degradar la hemicelulosa presente en la biomasa, éstos fueron: *Steam Explosion* (SE) y *Liquid Hot Water* (LHW), que fueron descritos en la sección 1.2.4.2. Estos dos pretratamientos fueron seleccionados como los más adecuados debido a que degradan gran parte de la hemicelulosa sin formar compuestos inhibidores. Otros pretratamientos emplean ácidos y bases débiles, las cuales producen compuestos inhibidores (H_2SO_4, NaOH, Na_2SO_4, CaOH) de la acción de las enzimas y el crecimiento de las levaduras **[25].**

En primera instancia, se consideró utilizar un biorreactor del tipo empleado en estudios experimentales previos en la Universidad Nacional de Colombia y Universidad de California - Davis **[70].** Sin embargo para esta tesis no hubo la posibilidad de construir reactores grandes debido al elevado costo de los materiales.

Para el pretratamiento SE, se consideraron las características técnicas de un biorreactor mostrado en un video de una investigación de la Universidad Estatal de Oregon **[75]**.

Para el pretratamiento LHW se analizó la información brindada por el profesor Michael J. Antal del Instituto de Energía Natural de Hawaii **[32]** sobre las condiciones de proceso más adecuada.

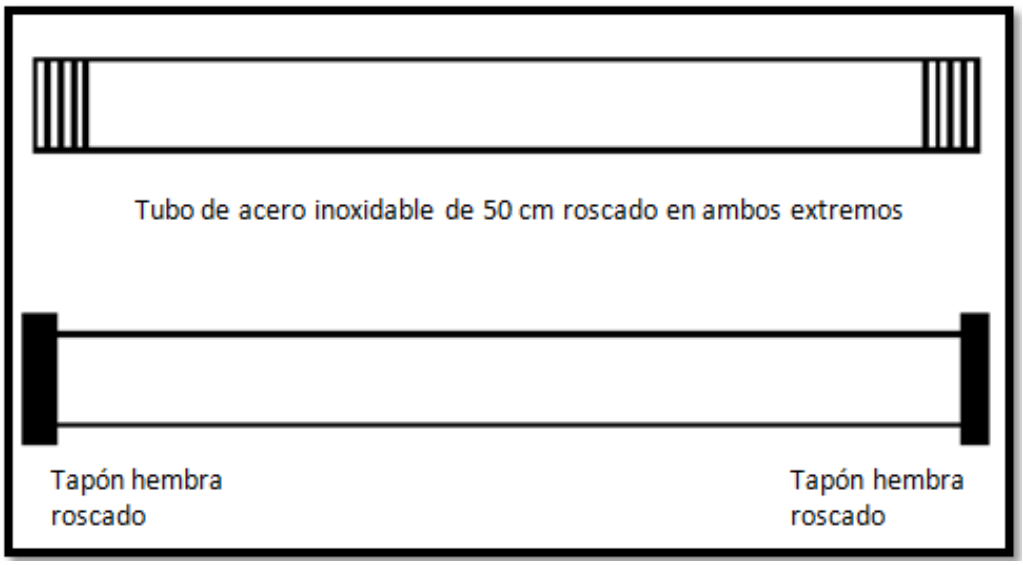

Fig. 3.5 Esquema del biorreactor tubular para LHW

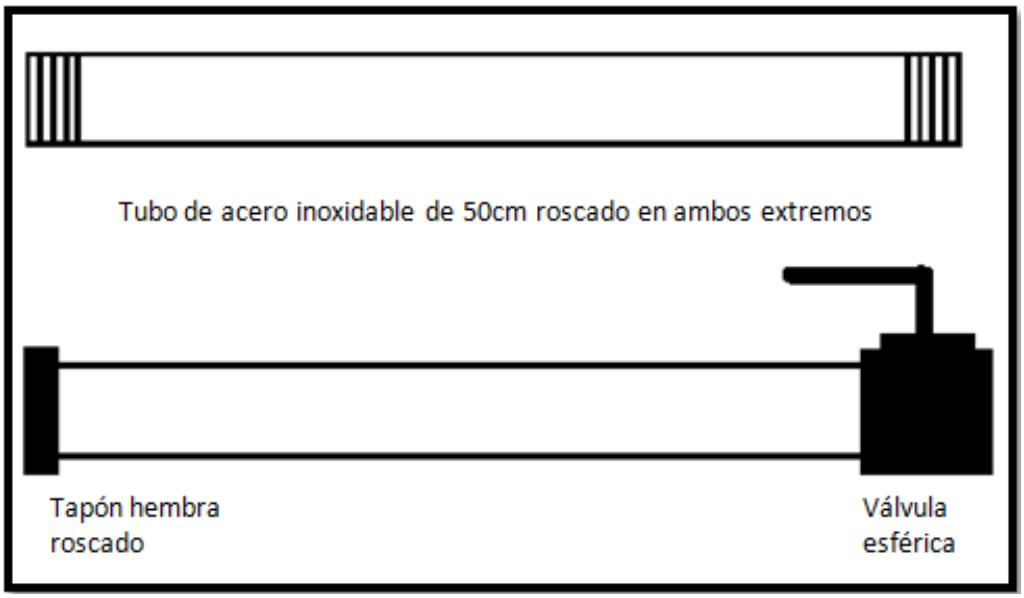

Fig. 3.6 Esquema del biorreactor tubular para SE

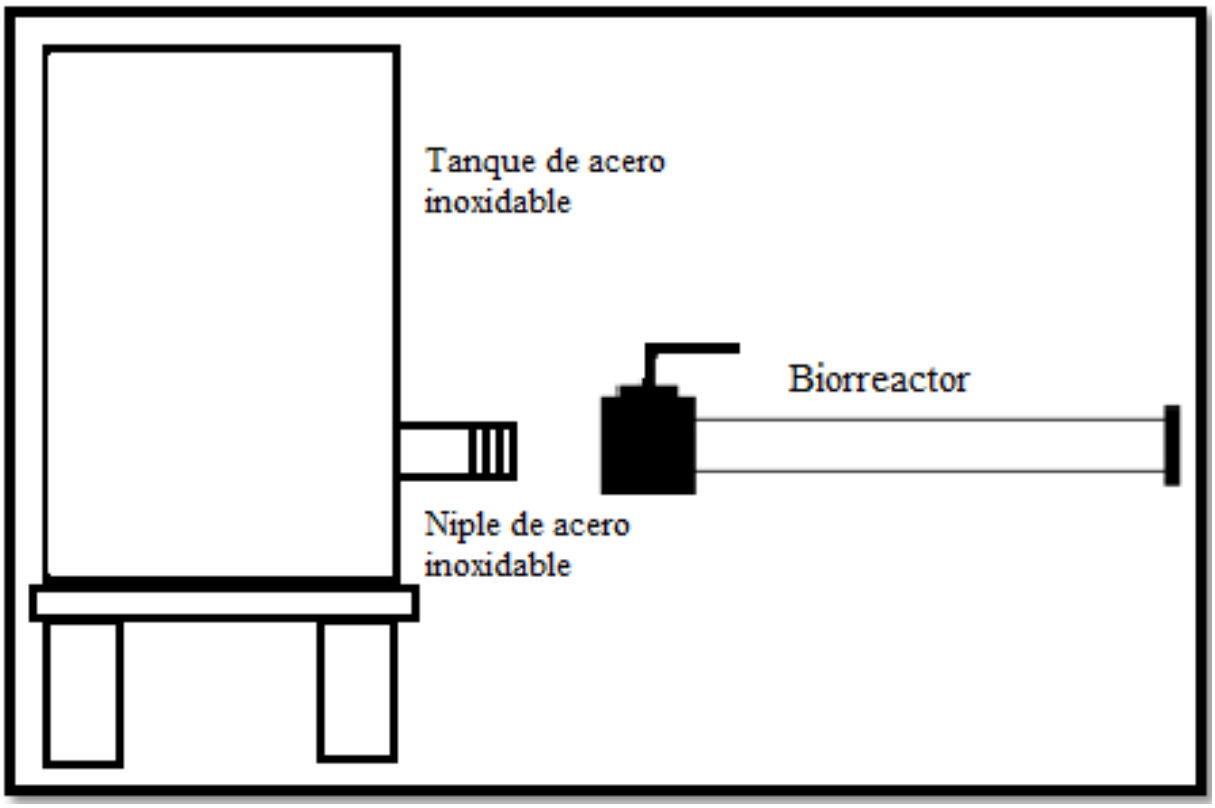

Fig. 3.7 Tanque cilíndrico de despresurización para SE

Previo a la construcción del biorreactor se decidió analizar los parámetros de temperatura y presión a la que se sometería la biomasa, para así verificar que el biorreactor pudiera soportar condiciones de temperatura entre 180 y 200 °C y presiones de hasta 10 atmósferas. Por ello se optó en usar tubos de acero inoxidable, cuyas características se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características del biorreactor

Biorreactor	Espesor del tubo (mm)	Diámetro interno (pulgadas)	Largo (cm)	Capacidad (mL)
W1	0,5	¾	50	155
W2	1,0	3	50	2 300

Se emplearon válvulas esféricas, de acero inoxidable, apropiadas para presiones y temperaturas de vapor de hasta 13 atm y 200 °C respectivamente.

El biorreactor está basado en un tubo de acero, con dos tapones en los extremos para LHW y con una válvula en vez de un tapón para SE, tal como se muestra en la Figura 3.5 y 3.6 respectivamente. Se construyeron dos biorreactores (Figuras 3.8 y 3.9), de las dimensiones y capacidades mostradas en la Tabla 3.1. Para los pretratamientos, el biorreactor se coloca dentro de la estufa de ventilación forzada, y luego se descarga (en el caso de SE) en un tanque de acero inoxidable, como se muestra en la Figura 3.7.

Se realizó ensayos preliminares, tanto SE como LHW, para determinar los parámetros de tiempo y cantidad de agua y biomasa que podrían utilizarse. En las Tablas 3.2 y 3.3 se

muestran las condiciones utilizadas en dichos ensayos preliminares, en que la biomasa fue hojas.

Fig. 3.8 Biorreactor W1 (3/4" de diámetro)

Fig. 3.9 Biorreactor W2 (3" de diámetro)

En los pretratamientos, al tiempo transcurrido desde temperatura ambiente hasta la temperatura de proceso (186 °C para SE y 196 °C para LHW) se le denomina tiempo de calentamiento (t_c). Alcanzada la temperatura de proceso se inicia el tiempo de proceso (t_p), durante el cual la temperatura se mantiene constante, como se muestra en la Figura 3.10.

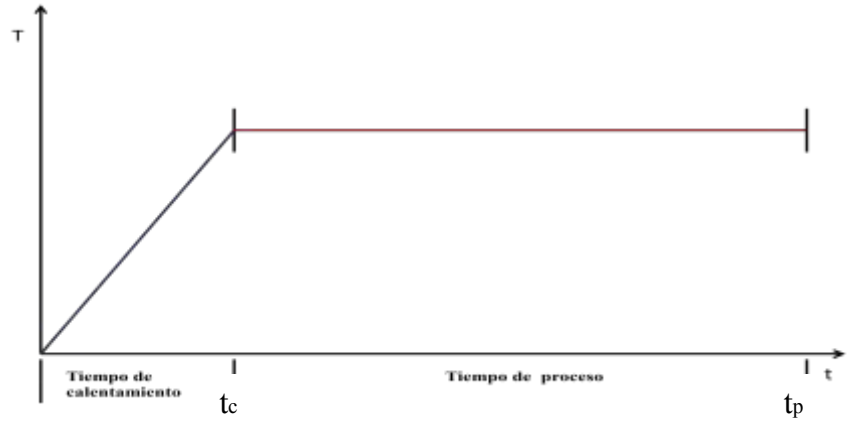

Fig. 3.10 Tiempos de pretratamiento

A continuación se mencionará el procedimiento realizado para cada tipo de pretratamiento:

3.4.1 *Steam Explosion* (SE)

Antes de iniciar el proceso, se determinó el volumen máximo que podría ocupar la mezcla de agua y biomasa dentro del biorreactor, haciendo uso de las densidades aparentes de la biomasa seca y húmeda, como se mencionó en el apartado 3.3.

El espacio mínimo libre que se dejó fue 30% del volumen del biorreactor, ya que en este tipo de pretratamiento se genera vapor, el cual al ser despresurizado junto con la biomasa ocasiona la degradación de la hemicelulosa.

El proceso se inicia con el llenado del biorreactor, a través de la válvula (Figura 3.11). Primero se agrega la biomasa y luego el agua. Se cierra la válvula y se agita el reactor para uniformizar la mezcla; luego se extrae una muestra con ayuda de una pipeta y se realiza la medición del pH inicial.

Una vez llenado y cerrado el biorreactor se lleva a la estufa, iniciándose el tiempo calentamiento (t_c) desde 36 °C hasta 186 °C seguido del tiempo de proceso (t_p). Transcurrido el tiempo de proceso, se apaga la estufa y se retira el biorreactor utilizando guantes de cuero resistentes a elevadas temperaturas; se enrosca inmediatamente en el cilindro de despresurización (Figura 3.12) y se abre la válvula para la descarga instantánea (violenta) de su contenido (Figura 3.13).

Se recolecta la mezcla obtenida; se mide el pH final con el fin de corroborar la formación de ácido acético debido a la degradación de la hemicelulosa, luego se separa la pulpa de biomasa y la parte líquida por medio de una tela filtrante y se pesa **[17]**.

Fig. 3.11 Llenado del biorreactor con biomasa húmeda

Fig. 3.12 Tanque de despresurización

Fig. 3.13 Mezcla de hojas húmedas y agua, después de la despresurización

Las condiciones del pretratamiento SE en el biorreactor W1 fueron: estado de la biomasa (húmeda y seca), cantidad de agua y biomasa, volumen ocupado por la mezcla, tiempo de calentamiento (tiempo transcurrido en calentar desde temperatura ambiente hasta 186 °C), y tiempo de proceso (tiempo en el que la mezcla permanece a temperatura constante 186 °C); todos estos parámetros se detallan en las Tablas 3.4, 3.5 y 3.6. Para la mezcla con biomasa, siempre se usó agua desionizada.

3.4.2 *Liquid Hot Water* (LHW)

Para este pretratamiento se ha considerado un espacio libre máximo del 25% del volumen del biorreactor **[2]**; con el fin de permitir la dilatación del agua sin que se genere vapor **[32]**.

Este proceso se inicia con el remojo de la biomasa en estado seco con agua, durante un periodo de 2 horas (Figura 3.14); para la biomasa húmeda se pasa directamente al biorreactor. A este tiempo de remojo se le denomina tiempo previo.

Una vez llenado el biorreactor se cierra y se agita para uniformizar la mezcla, luego se abre y se extrae una muestra con ayuda de una pipeta, para realizar la medición del pH inicial.

Luego el biorreactor se cierra con el tapón roscado y con cinta de teflón (Figura 3.15), y se lleva a la estufa, iniciándose el calentamiento desde 36 °C hasta 196 °C. El tiempo de proceso (t_p) es de aproximadamente 17 minutos para el biorreactor W1 y 90 minutos para el biorreactor W2.

Al finalizar el calentamiento, se retira el biorreactor de la estufa y se lleva a una bandeja que contiene agua a 15 °C (Figura 3.15). El tiempo de enfriamiento fue de 4 minutos para el reactor W1 y de 8 minutos para el W2.

Para enfriar el biorreactor W1 se emplearon 10 L de agua fría mientras que el biorreactor W2 necesitó de 30 L para poder ser enfriado rápidamente.

La mezcla es extraída del biorreactor, se mide el pH final, luego se separa en pulpa de biomasa y la parte líquida, por medio de una tela filtrante (Figura 3.16).

Fig. 3.14 Biomasa cortada y agua (izquierda), mezcla en el biorreactor (derecha)

Fig. 3.15 Cierre de tapón (izquierda) y enfriamiento (derecha)

Fig. 3.16 Mezcla recuperada del pretratamiento LHW

Las condiciones para este tipo de pretratamiento en el biorreactor W1 fueron: estado de la biomasa (húmeda y seca), cantidad de agua y biomasa, volumen ocupado de la mezcla, tiempo previo (tiempo de remojo de la mezcla), tiempo de calentamiento (tiempo transcurrido en elevar la temperatura desde temperatura ambiente hasta 196 °C), tiempo de proceso (tiempo a temperatura constante 196 °C) y tiempo de enfriamiento (tiempo en el que el biorreactor caliente permanece en una bandeja con agua helada); todos estos parámetros se detallan en las Tablas 3.7, 3.8 y 3.9. Para la mezcla con biomasa, siempre se usó agua desionizada.

Tabla 3.2 Condiciones del pretratamiento SE de hojas. Ensayos preliminares

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)
A1	Húmeda	60	15	4,0	68,4	86,6	75	28:50	19:24	48:14
A2	Húmeda	70	15	4,7	78,4	76,6	85	31:29	16:57	48:27
A3	Húmeda	70	15	4,7	78,4	76,6	85	28:34	17:11	45:45
A4	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	95	26:00	18:00	44:00
A5	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	95	25:25	17:42	43:07
A6	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	95	26:14	17:03	43:17
A7	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	95	26:51	18:00	44:51
A8	Húmeda	60	25	2,4	74,1	80,9	85	28:25	17:12	45:44
A9	Húmeda	70	25	2,8	84,1	70,9	95	29:33	17:47	47:20
A10	Húmeda	70	25	2,8	84,1	70,9	95	30:20	16:46	47:07
A11	Húmeda	75	25	3,0	89,1	65,9	100	30:36	18:28	49:00
A12	Húmeda	120	25	4,8	134,1	20,9	145	30:37	05:32	36:10
A13	Seca	60	25	2,4	74,1	80,9	85	29:41	10:35	40:14
A14	Seca	100	25	4,0	114,1	40,9	125	29:23	04:11	33:34

Tabla 3.3 Condiciones del pretratamiento LHW de hojas. Ensayos preliminares

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Tiempo previo[7] (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)
B1	Seca	110	3	37	112	2:00	27:23	17:33	48:56
B2	Seca	110	3	37	112	2:00	32:31	17:00	53:31
B3	Seca	110	3	37	112	2:00	42:34	17:23	63:58
B4	Húmeda	110	3	37	112	0:00	28:20	17:24	49:44
B5	Húmeda	110	3	37	112	0:00	27:36	17:33	49:09

El tiempo de enfriamiento fue el mismo para todas las pruebas preliminares LHW de hojas, 4 minutos

[7] Tiempo de remojo de la muestra

Tabla 3.4 Condiciones del pretratamiento SE de hojas

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)
C1	Húmeda	80	15	5,3	106,7	48,3	95	26:00	18:00	44:00
C2	Húmeda	70	15	4,7	96,7	58,3	85	31:29	16:57	48:27
C3	Húmeda	70	15	4,7	96,7	58,3	85	28:34	17:11	45:45
C4	Húmeda	60	15	4,0	86,7	68,3	75	28:50	19:24	48:14
C5	Húmeda	70	25	2,8	114,4	40,6	95	30:20	16:46	47:07
C6	Húmeda	60	25	2,4	104,4	50,6	85	28:26	10:15	38:41
C7	Seca	10	5	2,0	29,2	125,8	15	27:41	17:02	44:43
C8	Seca	20	5	4,0	39,2	115,8	25	25:57	17:18	43:16
C9	Seca	60	10	6,0	98,3	56,7	70	26:29	17:01	43:30
C10	Seca	30	15	2,0	87,5	67,5	45	25:16	17:00	42:17
C11	Seca	50	15	3,3	107,5	47,5	65	27:52	17:30	45:22
C12	Seca	30	20	1,5	106,7	48,3	50	26:28	19:00	45:28

Tabla 3.5 Condiciones del pretratamiento SE de pseudotallo

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)
D1	Húmeda	40	30	1,3	72	83	70	31:27	19:23	50:50
D2	Húmeda	60	30	2,0	92	63	90	30:28	16:16	46:44
D3	Húmeda	40	45	0,9	87	68	85	27:04	18:09	45:13
D4	Húmeda	60	45	1,3	107	48	105	27:41	18:53	46:34
D5	Húmeda	60	45	1,3	107	48	105	27:46	30:09	57:55
D6	Húmeda	40	60	0,7	103	52	100	28:55	17:07	46:03
D7	Húmeda	50	60	0,8	113	42	110	30:02	17:00	47:02
D8	Seca	25	5	5,0	38	117	30	27:45	17:04	44:49
D9	Seca	40	10	4,0	66	89	50	26:21	17:54	44:15
D10	Seca	60	10	6,0	86	69	70	29:53	17:25	47:18
D11	Seca	70	10	7,0	96	59	80	26:18	17:02	43:21
D12	Seca	20	15	1,3	60	95	35	26:57	17:03	44:00
D13	Seca	30	15	2,0	70	85	45	27:08	21:44	48:52
D14	Seca	60	15	4,0	100	55	75	25:39	17:17	42:57
D15	Seca	56	20	2,8	109	46	76	29:34	17:01	46:35

Tabla 3.6 Condiciones del pretratamiento SE de raquis

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)
E1	Húmeda	97	10	9,7	109	46	107	29:19	17:20	46:39
E2	Húmeda	97	10	9,7	109	46	107	24:37	34:00	58:37
E3	Húmeda	85	20	4,3	109	46	105	29:11	17:07	46:18
E4	Húmeda	74	30	2,5	109	46	104	28:02	17:41	45:43
E5	Húmeda	38	60	0,6	109	46	98	27:01	17:24	44:25
E6	Seca	90	8	11,2	99	56	98	27:22	17:02	44:24
E7	Seca	85	10	8,5	97	58	95	32:28	16:54	49:22
E8	Seca	61	20	3,0	84	71	81	47:34	17:19	64:54
E9	Seca	51	24	2,1	79	76	75	42:44	17:00	59:44
E10	Seca	41	28	1,5	74	81	69	28:41	17:17	45:59

Tabla 3.7 Condiciones del pretratamiento LHW de hojas

Número experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)
F1	Húmeda	111	3	37,0	116	0:00	30:00	17:00	4:00	51:00
F2	Húmeda	89	15	5,9	116	0:00	48:02	17:00	4:05	69,:08
F3	Húmeda	79	21	3,8	116	0:00	31:18	17:15	4:09	52,:43
F4	Húmeda	68	27	2,5	116	0:00	29:16	17:12	4:39	51:09
F5	Seca	104	3	34,7	116	3:00	29:24	17:02	4:57	51:24
F6	Seca	93	6	15,5	116	2:10	31:35	17:34	4:34	53:43
F7	Seca	81	9	9,0	116	2:20	38:30	17:29	4:22	60:21
F8	Seca	70	12	5,8	116	4:20	31:59	17:02	4:12	53:13
F9	Seca	58	15	3,9	116	6:13	42:54	17:00	4:08	64:02

Tabla 3.8 Condiciones del pretratamiento LHW de pseudotallo

Número experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)
G1	Húmeda	101	15	6,7	115	0:00	28:18	18:18	4:00	50:36
G2	Húmeda	93	23	4,0	115	0:00	27:29	17:16	4:01	48:46
G3	Húmeda	86	30	2,9	114	0:00	26:43	17:03	4:04	47:51
G4	Húmeda	80	36	2,2	114	0:00	26:41	17:02	4:04	47:48
G5	Seca	100	6	16,7	116	2:00	27:00	17:14	4:20	48:34
G6	Seca	92	9	10,2	116	2:00	30:30	17:24	4:10	52:04
G7	Seca	84	12	7,0	116	2:00	23:57	17:01	4:02	45:00
G8	Seca	76	15	5,1	116	2:00	31:00	17:02	4:20	52:22
G9	Seca	70	18	3,9	116	2:00	43:17	19:47	4:18	67:22

Tabla 3.9 Condiciones del pretratamiento LHW de raquis

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)
H1	Húmeda	104	10	10,4	116	0:00	28:15	17:00	4:10	49:25
H2	Húmeda	92	20	4,6	116	0:00	42:28	17:02	4:08	63:38
H3	Húmeda	81	30	2,7	116	0:00	32:16	17:01	4:10	53:27
H4	Seca	104	5	20,8	116	2:00	31:32	18:02	4:00	53:34
H5	Seca	92	10	9,2	116	2:00	41:25	17:10	4:10	62:48
H6	Seca	80	15	5,3	116	2:00	29:23	17:02	4:57	51:00

3.5 Deslignificación por ozonización

Para el proceso de deslignificación se utilizó el proceso de ozonización, por ser uno de los métodos más limpios ya que no requiere de ácidos fuertes, fue propuesto por Roberto Melo y Sonia Acevedo en su estudio "*Efecto de la carga de ozono en la degradación de la lignina residual en pulpa Kraft*" **[36].** Existen otros tipos de método como deslignificación alcalina, con enzimas, deslignificación Kraft, que reportan buenos rendimientos **[25]**. La principal ventaja del proceso de ozonización frente al resto de procesos es que no produce compuestos inhibidores que podrían afectar luego a las enzimas y levaduras, y bajar el rendimiento final del etanol.

En este método el ozono se solubiliza en el ácido acético y degrada selectivamente a la lignina. La degradación de la lignina ocasiona el rompimiento de los compuestos aromáticos (fenoles) produciendo una disminución del pH **[36, 3]**.

En el referido estudio sobre la degradación de la lignina por efecto del ozono **[36]** se añadió una solución de ácido acético con una concentración del 87 % .Para la presente tesis se decidió emplear sólo el ácido acético formado durante los pretratamientos por la degradación de la hemicelulosa.

Los materiales empleados para este proceso, fueron los siguientes:

- 1 bidón de capacidad 20 L
- 1 equipo generador de ozono – 1,5 ppm. Marca Ozotech Inc., Interamericana de Ingeniería S.A.C.
- Papel indicador de pH-Panpeha de 0 a 14 (Merck)

El proceso se realizó en la empresa Agua VIP S.A.C. en Marcavelica – Sullana; que cuenta con el equipo de ozonización.

Fig. 3.17 Equipo de ozonización [76]

Se realizó una prueba preliminar de ozonización en matraces Erlenmeyer con hojas de banano húmedas pretratadas por SE y LHW, en los que se registró una disminución de pH igual a 1, respecto al pH inicial.

Los siguientes ensayos de ozonización (no preliminares) emplearon pseudotallo húmedo pretratado por LHW. El proceso se inició con la medición del pH inicial de la mezcla de 11,19 g de pulpa de biomasa y 200 mL de parte líquida, dicha medición dio como resultado 5,5; luego se inyectó ozono con una carga de 500 mg/hora, durante 25 minutos; se midió la variación de pH cada 3 minutos, sin embargo no mostró un cambio en el pH. Se adicionó 223,8 g de pulpa de biomasa y 4 L de parte líquida de la mezcla pretratada. El proceso se llevó a cabo dentro de un bidón, durante 2 horas. El pH fue medido cada 40 minutos, pero el valor se permaneció invariable.

Tabla 3.10 Información ensayo de ozonización

Ensayo	Pulpa de biomasa (g)	Parte líquida (mL)	pH_0	pH_f	Tiempo de proceso (min)
X1	11,19	200	5,5	5,5	25
X2	223,80	4 000	-	5,5	120

Durante el proceso, se formó una gran cantidad de burbujas, lo cual podría deberse a una interacción entre el ozono con la parte líquida de la mezcla.

Fig. 3.18 Deslignificación por ozonización

3.6 Hidrólisis enzimática

Las condiciones de hidrólisis enzimática para las enzimas Cellic CTec 2 fueron indicadas en un documento suministrado por la empresa Novozymes. La temperatura de proceso debe estar en el rango 45 -50 °C y el pH de la mezcla debe estar entre 5 y 5,5.

Los materiales y equipos empleados para este proceso, fueron los siguientes:

- 185 g de enzimas Cellic CTec 2
- Papel indicador de pH - Panpeha de 0 a 14 (Merck)
- 1 refractómetro de mano - RHBO-80 (0-80 °Brix, precisión ±1 °Brix)
- 1 refractómetro de mesa – Zeiss (0-90 °Brix)
- Estufa de ventilación forzada Memmert, modelo: UFP 500

Se realizaron ensayos preliminares de hidrólisis enzimática con el objetivo de analizar la acción de las enzimas celulolíticas Cellic CTec 2 en diferentes tipos de muestras.

Fueron tres los ensayos preliminares realizados en vasos de precipitado, tapados con papel aluminio para reducir la evaporación de agua durante el calentamiento. El proceso se realizó en una estufa a una temperatura de 50 °C; al cabo del tercer día se pesó y se observó una pérdida de masa, por este motivo y para un correcto análisis del °Brix se agregó agua en cantidad igual a la perdida.

En los tres ensayos preliminares de hidrólisis se utilizó muestras de pseudotallo húmedo pretratado con LHW. En los dos primeros, cada muestra pretratada fue solo líquida y previamente ozonizada (Y2 y Y1 sin ácido acético); cada una de 60 g con 11 g de enzimas. En el tercer ensayo (Y3) se utilizó 181,8 g de muestra pretratada no ozonizada (parte seca y líquida) y 34 g de enzimas (Tabla 3.11).

Para la separación del ácido acético, la muestra Y1 se sometió a una temperatura de 15 °C, punto de congelación del ácido. El hielo formado, en el fondo del recipiente, fue separado y pesado obteniéndose un valor equivalente al 25% respecto al peso inicial de la muestra. También, se midió el pH del ácido acético formado cuyo valor resultante fue 3.

Tabla 3.11 Ensayos de hidrólisis enzimática

Ensayos	Apariencia	Ozonizada	Separación del ácido acético	Muestra (g)	Enzimas (g)
Y1	Líquida	Si	Si	60,0	11
Y2	Líquida	Si	No	60,0	11
Y3	Pastosa	No	No	181,8	34
Y4	Pastosa	Si	No	1000,0	185

Cada 4 horas, durante 5 días, se midió la temperatura de la mezcla, el peso de la mezcla y del agua agregada, y el grado Brix. Al cabo del quinto día el grado Brix se mantuvo constante, con lo cual se dio por terminado el proceso.

Culminados los ensayos preliminares (Y1 y Y2), se procedió a realizar la hidrólisis de una muestra de 1 000 g (Y4) de tallo húmedo pretratado con LHW: 188,8 g de pulpa de biomasa y

811,2 g de parte líquida; a la que se agregaron 185 g de enzimas (Tabla 3.11). La cantidad de enzimas a utilizar se determinó según la dosificación recomendada por la empresa Novozymes, siendo ésta el 35% de la celulosa presente en la mezcla **[38]**.

Durante los 7 días de hidrólisis, tiempo en el cual la mezcla se estabilizó a 15,5 °Brix; se midió periódicamente la temperatura, el peso de la mezcla y del agua agregada, el pH y el grado Brix.

Fig. 3.19 Mezcla pastosa previa a hidrólisis

Fig. 3.20 Mezcla hidrolizada

Fig. 3.21 Enzimas Cellic CTec 2

3.7 Fermentación alcohólica

Los materiales y equipos utilizados para este proceso, fueron los siguientes:

- 30 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, para la producción de vino, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Piura.
- Tanque de fermentación
- 1 refractómetro de mano RHBO-80 (0-80 °Brix, precisión ±1 °Brix)
- 1 refractómetro de mesa - Zeiss (0-90 °Brix)

3.7.1 Preparación del inóculo

Se tomó una muestra de 100 g de mezcla hidrolizada (sólo parte líquida), la cual se sometió a evaporación en la estufa a 100 °C, con el objetivo de elevar la concentración de azúcares hasta 28 °Brix, necesaria para la activación de la levadura para el proceso de fermentación.

Se prepararon dos inóculos en matraces Erlenmeyer. En cada matraz se colocó una mezcla hidrolizada a 28 °Brix y 15 g de levadura. La activación de la levadura tomó 12 horas.

Fig. 3.22 Hidrolizado a 28 °Brix

3.7.2 Proceso de fermentación

El proceso de fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente, bajo condiciones anaeróbicas, en matraz Erlenmeyer de 500 mL para el ensayo preliminar y en tanque de fermentación para la muestra final.

Al cabo del cuarto día, en la primera muestra, el grado Brix se estabilizó, dando por concluido el proceso. Para la segunda muestra, se realizaron mediciones del °Brix diariamente, durante 5 días, tiempo en el que el grado Brix disminuyera hasta alcanzar un valor constante.

Fig. 3.23 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Fig. 3.24 Tanque de fermentación

Fig. 3.25 Mezcla fermentada

3.8 Destilación

Los materiales y equipos empleados para esta etapa, fueron los siguientes:

- Columna de destilación Vigreux
- Baño termorregulador – Techne, modelo: RB-5A
- Matraz redondo de vidrio, de 2 L
- Manta de calefacción

Para este proceso se tomó 500 g de muestra fermentada, de los 1000 g disponibles del proceso anterior, la cual se destiló en una columna Vigreux con reflujo. El condensador del sistema estuvo conectado al baño termorregulador, a 10 °C.

La destilación se realizó en una sola etapa, recogiéndose sucesivamente dos fracciones de destilado: destilado 1 y el destilado 2.

Se midió continuamente la temperatura de destilación, procurando que no sobrepase los 78 °C (punto de ebullición del alcohol etílico); luego de 45 minutos se obtuvo aproximadamente 8 mL del destilado 1 y 12 mL del destilado 2.

Fig. 3.26 Torre de destilación

Fig. 3.27 Muestra durante la destilación

3.9 Determinación del grado alcohólico

La medición del grado alcohólico del destilado obtenido se realizó con dos métodos diferentes:

3.9.1 Densidad del destilado

Para este método, se midió en una probeta de vidrio, el volumen del destilado, y se determinó su densidad.

La densidad hallada se utilizó para determinar el grado alcohólico, según la Tabla *Aqueous Ethyl Alcohol at 15,56 °C* **[77]**.

3.9.2 Índice de refracción

Para este método se midió el índice de refracción del destilado, con un refractómetro de mesa a una temperatura de 20 °C, mantenida constante con un baño termorregulador conectado al refractómetro.

Con el índice de refracción medido se determinó el grado alcohólico según la Tabla D-228 **[77]**.

Fig. 3.28 Equipo de medición del índice de refracción (baño termorregulador y refractómetro)

Capítulo 4
Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados de los experimentos realizados, siguiendo los métodos descritos en el capítulo anterior; así mismo, se realiza un análisis de la influencia de diversos parámetros del proceso en el resultado final.

Es importante recordar que durante los pretratamientos y procesos de deslignificación e hidrólisis enzimática no se emplearon equipos especiales de medición, debido a su elevado costo. Se emplearon características como: pH, índice de refracción y grado Brix, como base para la discusión.

4.1 Secado de la biomasa

En este apartado se presentan los resultados y condiciones de la etapa de secado de la biomasa, previa a los ensayos.

En ensayos preliminares se secaron las hojas a 100 °C a distintos tiempos, con el fin de evaluar la influencia del grado humedad en el pretratamiento SE. Los ensayos mostraron que con biomasa muy seca no se logra un adecuado pretratamiento, por la falta de agua interna a la biomasa que se pueda evaporar de manera instantánea degradando así la hemicelulosa.

Tabla 4.1 Secado de los residuos de banano orgánico en una estufa

Hojas	Temperatura	100 °C
	Tiempo	1 hora
	Densidad muestra seca	0,26 g/mL
	Peso perdido	54%
Pseudotallo	Temperatura	50 °C
	Tiempo	17 horas
	Densidad muestra seca	0,38 g/mL
	Peso perdido	76,1%
Raquis	Temperatura	50 °C
	Tiempo	15 horas
	Densidad muestra seca	0,41 g/mL
	Peso perdido	72,2 %

4.2 Resultados de pretratamientos

4.2.1 Ensayos preliminares en biorreactor de ¾ " de diámetro

En este acápite se presentan los resultados de las ensayos preliminares de *Steam Explosion* (SE) y *Liquid Hot Water* (LHW) aplicados a hojas de banano. Algunos parámetros de proceso de los pretratamientos se tomaron de fuentes secundarias como se mencionó en el punto 3.4.

El principal resultado esperado al realizar estos ensayos es una disminución del pH de la muestra, disminución que correspondería a la presencia de ácido acético producido por la degradación de la hemicelulosa.

En los ensayos preliminares de SE se variaron los tiempos de proceso con el fin de hallar aquel que lograra un aparente rompimiento de la estructura interna del material, según se muestra en el video de la Universidad Estatal de Oregon y la información bibliográfica **[25].**

En la Tabla 4.2 se observa que el rango de tiempo de proceso adecuado para el pretratamiento SE se encuentra entre 16 y 20 minutos; tiempos menores a este rango no producen un adecuado rompimiento de la estructura interna de la biomasa, apreciando que la muestra estudiada presenta la misma apariencia que al inicio del ensayo: materia prima picada.

En la Tabla 4.3 se observa que con en el pretratamiento LHW (que utiliza 17 minutos como tiempo de proceso) se logra degradar la hemicelulosa. Este tiempo fue tomado en base a la información brindada por el profesor Michael J. Antal del Instituto de Energía Natural de Hawaii **[32]**.

4.2.2 *Steam Explosion* en biorreactor de ¾ " de diámetro

En este punto se analizan los resultados de las ensayos del pretratamiento SE, realizado en el biorreactor de ¾ **"** de diámetro. Así mismo, se evalúa la posible influencia de diversos parámetros, como: la relación agua/biomasa, el tiempo de calentamiento y el estado de la biomasa sobre la degradación de la hemicelulosa.

La evaporación instantánea del agua interna de la biomasa produce la degradación de la hemicelulosa y la formación de ácido acético; esta degradación fue evaluada en función de la disminución del pH; a mayor disminución (ΔpH) sería mayor la cantidad de ácido acético formado.

A continuación se presentan las Tablas 4.4, 4.5, y 4.6, en las cuales se describen las condiciones y resultados del pretratamiento SE en hojas, pseudotallos y raquis de banano. También se presentan gráficos, en los cuales se muestran las relaciones entre los parámetros analizados de los resultados experimentales.

Tabla 4.2 Pretratamiento SE de hojas. Ensayos preliminares

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Volumen disponible (mL)	Tiempo de calentamiento[8] (min)	Tiempo de proceso[9] (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH	Apariencia
A1	Húmeda	60	15	4,0	68,4	86,6	28:50	19:24	48:14	7,0	5,5	1,5	Pastosa
A2	Húmeda	70	15	4,7	78,4	76,6	31:29	16:57	48:27	7,0	5,5	1,5	Pastosa
A3	Húmeda	70	15	4,7	78,4	76,6	28:34	17:11	45:45	7,0	5,5	1,5	Pastosa
A4	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	26:00	18:00	44:00	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A5	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	25:25	17:42	43:07	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A6	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	26:14	17:03	43:17	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A7	Húmeda	80	15	5,3	88,4	66,6	26:51	18:00	44:51	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A8	Húmeda	60	25	2,4	74,1	80,9	28:25	17:12	45:44	6,5	5,5	1,0	Pastosa
A9	Húmeda	70	25	2,8	84,1	70,9	29:33	17:47	47:20	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A10	Húmeda	70	25	2,8	84,1	70,9	30:20	16:46	47:07	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A11	Húmeda	75	25	3,0	89,1	65,9	30:36	18:28	49:00	7,0	6,0	1,0	Pastosa
A12	Húmeda	120	25	4,8	134,1	20,9	30:37	05:32	36:10	7,0	6,0	1,0	Sin degradar[10]
A13	Seca	60	25	2,4	74,1	80,9	29:41	10:35	40:14	6,5	5,5	1,0	Sin degradar[10]
A14	Seca	100	25	4,0	114,1	40,9	29:23	04:11	33:34	6,5	5,5	1,0	Sin degradar[10]

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	$pH_o - pH_f$

[8] Tiempo transcurrido hasta alcanzar 186 ºC
[9] Tiempo a temperatura constante (186 ºC)
[10] La muestra tiene el mismo aspecto que al inicio del ensayo.

Tabla 4.3 Pretratamiento LHW de hojas. Ensayos preliminares

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen ocupado (mL)	Tiempo previo[11] (horas)	Tiempo de calentamiento[12] (min)	Tiempo de proceso[13] (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
B1	seca	110	3	37	112	2:00	27:23	17:33	48:56	7,0	5,5	1,5
B2	Seca	110	3	37	112	2:00	32:31	17:00	53:31	7,0	5,5	1,5
B3	seca	110	3	37	112	2:00	42:34	17:23	63:58	7,0	5,5	1,5
B4	Húmeda	110	3	37	112	-	28:20	17:24	49:44	7,0	6,0	1,0
B5	Húmeda	110	3	37	112	-	27:36	17:33	49:09	7,0	6,0	1,0

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	$pH_o - pH_f$

El tiempo de enfriamiento fue el mismo para todos los ensayos preliminares LHW de hojas, 4 minutos.

[11] Tiempo de remojo de la muestra.
[12] Tiempo transcurrido hasta alcanzar 196 °C
[13] Tiempo a temperatura constante (196 °C)

Tabla 4.4 Pretratamiento SE de hojas

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
C1	Húmeda	80	15	5,3	48,3	95	26:00	18:00	44:00	7,0	6,0	1,0
C2	Húmeda	70	15	4,7	58,3	85	31:29	16:57	48:27	7,0	5,5	1,5
C3	Húmeda	70	15	4,7	58,3	85	28:34	17:11	45:45	7,0	5,5	1,5
C4	Húmeda	60	15	4,0	68,3	75	28:50	19:24	48:14	7,0	5,5	1,5
C5	Húmeda	70	25	2,8	40,6	95	30:20	16:46	47:07	7,0	6,0	1,0
C6	Húmeda	60	25	2,4	50,6	85	28:26	10:15	38:41	6,5	5,5	1,0
C7	Seca	20	5	4,0	115,8	25	25:57	17:18	43:16	7,0	5,5	1,5
C8	Seca	10	5	2,0	125,8	15	27:41	17:02	44:43	7,0	5,5	1,5
C9	Seca	60	10	6,0	56,7	70	26:29	17:01	43:30	7,0	6,0	1,0
C10	Seca	50	15	3,3	47,5	65	27:52	17:30	45:22	7,0	6,0	1,0
C11	Seca	30	15	2,0	67,5	45	25:16	17:00	42:17	7,0	6,0	1,0
C12	Seca	30	20	1,5	48,3	50	26:28	19:00	45:28	7,0	5,5	1,5

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_o - pH_f

Tabla 4.5 Pretratamiento SE de pseudotallo

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen disponible (mL)	Masa total (g)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
D1	Húmeda	60	30	2,0	63	90	30:28	16:16	46:44	7,0	5,5	1,5
D2	Húmeda	40	30	1,3	83	70	31:27	19:23	50:50	7,0	5,5	1,5
D3	Húmeda	60	45	1,3	48	105	27:41	18:53	46:34	7,0	6,0	1,0
D4	Húmeda	60	45	1,3	48	105	27:46	30:09	57:55	7,0	6,0	1,0
D5	Húmeda	40	45	0,9	68	85	27:04	18:09	45:13	7,0	5,5	1,5
D6	Húmeda	50	60	0,8	42	110	30:02	17:00	47:02	7,0	6,0	1,0
D7	Húmeda	40	60	0,7	52	100	28:55	17:07	46:03	7,0	5,5	1,5
D8	Seca	25	5	5,0	117	30	27:45	17:04	44:49	6,0	5,5	0,5
D9	Seca	70	10	7,0	59	80	26:18	17:02	43:21	6,0	6,0	0,0
D10	Seca	60	10	6,0	69	70	29:53	17:25	47:18	6,0	5,5	0,5
D11	Seca	40	10	4,0	89	50	26:21	17:54	44:15	6,0	5,5	0,5
D12	Seca	60	15	4,0	55	75	25:39	17:17	42:57	6,0	5,5	0,5
D13	Seca	30	15	2,0	85	45	27:08	21:44	48:52	6,0	5,5	0,5
D14	Seca	20	15	1,3	95	35	26:57	17:03	44:00	6,0	5,5	0,5
D15	Seca	56	20	2,8	46	76	29:34	17:01	46:35	6,0	5,5	0,5

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	$pH_o - pH_f$

Tabla 4.6 Pretratamiento SE de raquis

Número de experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Volumen disponible (mL)	Masa total (mL)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
E1	Húmeda	97	10	9,7	46	107	29:19	17:20	46:39	7,0	7,0	0,0
E2	Húmeda	97	10	9,7	46	107	24:37	34:00	58:37	7,0	7,0	0,0
E3	Húmeda	85	20	4,3	46	105	29:11	17:07	46:18	7,0	7,0	0,0
E4	Húmeda	74	30	2,5	46	104	28:02	17:41	45:43	7,0	7,0	0,0
E5	Húmeda	38	60	0,6	46	98	27:01	17:24	44:25	7,0	7,0	0,0
E6	Seca	90	8	11,2	56	98	27:22	17:02	44:24	7,0	7,0	0,0
E7	Seca	85	10	8,5	58	95	32:28	16:54	49:22	7,0	7,0	0,0
E8	Seca	61	20	3,0	71	81	47:34	17:19	64:54	7,0	5,5	1,5
E9	Seca	51	24	2,1	76	75	42:44	17:00	59:44	7,0	6,0	1,0
E10	Seca	41	28	1,5	81	69	28:41	17:17	45:59	7,0	6,5	0,5

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_o-pH_f

La Tabla 4.4 muestra que en hojas, en promedio, el estado inicial de la biomasa (húmeda o seca) no tiene mayor influencia en la disminución de pH. Sin embargo, se observó que era más fácil trabajar con biomasa húmeda, por lo que se recomienda este estado.

En pseudotallo (Tabla 4.5) y en raquis (Tabla 4.6) tampoco se observa una marcada influencia del estado de la biomasa en la disminución del pH.

En la Tabla 4.5, al variar el volumen disponible en el pretratamiento SE (pues en este método se produce un mayor o menor volumen de vapor de agua, lo que podría ocasionar una degradación mayor o menor de la biomasa), se observó que en estado húmedo a mayor volumen disponible se produce una mayor degradación de la hemicelulosa; mientras que en estado seco la variación de volumen disponible no influye en los resultados de la degradación

En el pretratamiento SE de raquis (Tabla 4.6), se consiguieron resultados desfavorables, en comparación con los resultados de las Tablas 4.4 y 4.5. A pesar de haberse ensayado un amplio rango de relaciones agua/biomasa y de tiempo de calentamiento, en la mayoría de ensayos el pH final obtenido es 7; es decir, no hubo disminución de pH, tanto para el estado húmedo como en seco.

En general, no se observa una influencia del tiempo de calentamiento en la disminución del pH y por tanto en la degradación de la hemicelulosa.

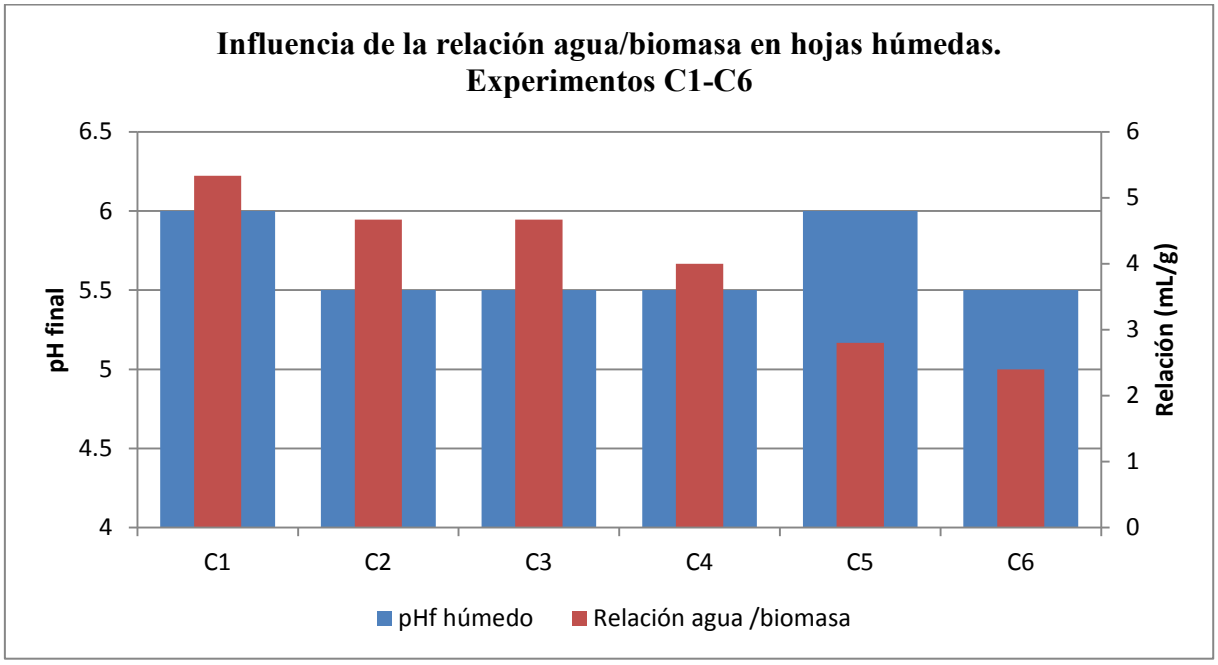

Fig. 4.1 *Steam Explosion* de hojas húmedas – comparación 1

Se podría decir que, en promedio, las mayores diferencias de pH y por tanto la mayor degradación de la hemicelulosa se ha observado en el pseudotallo, seguido de hojas y raquis; este orden coincide con el ordenamiento de los residuos de banano en base a su contenido de hemicelulosa **[70]**.

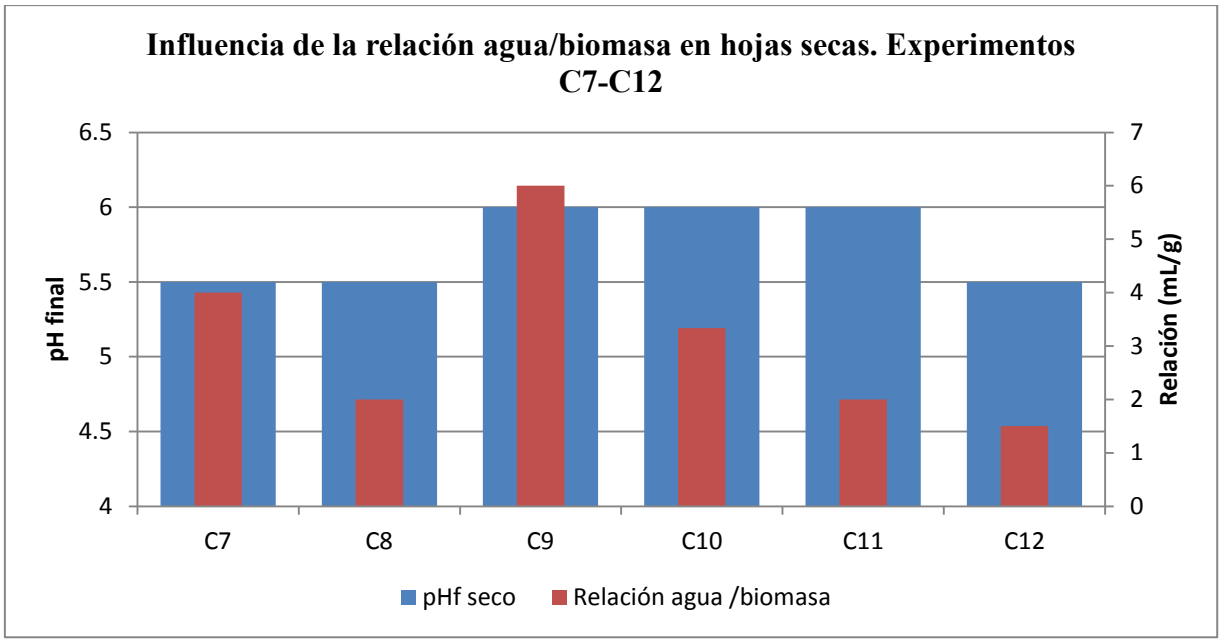

Fig. 4.2 *Steam Explosion* de hojas secas – comparación 1

En las Figuras 4.1 y 4.2, se observa que la relación agua/biomasa no es un factor influyente sobre el pH final, en el pretratamiento SE de hojas.

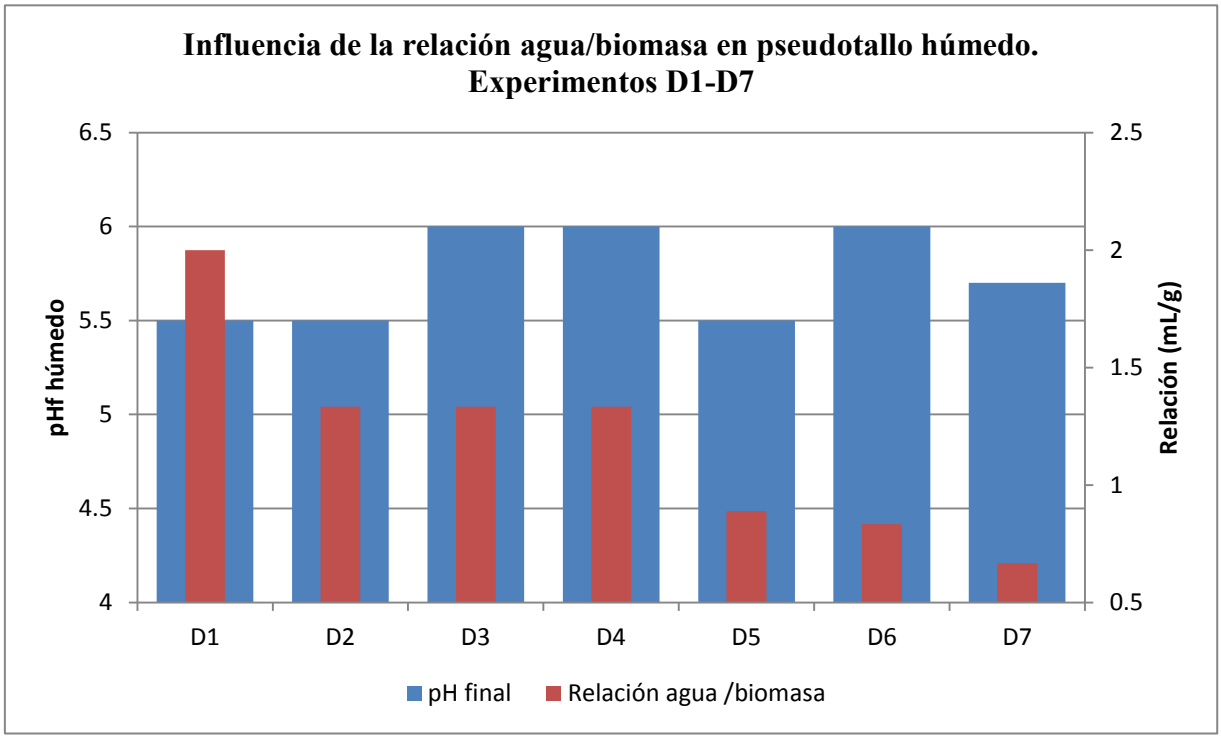

Fig. 4.3 *Steam Explosion* de pseudotallo húmedo – comparación 1

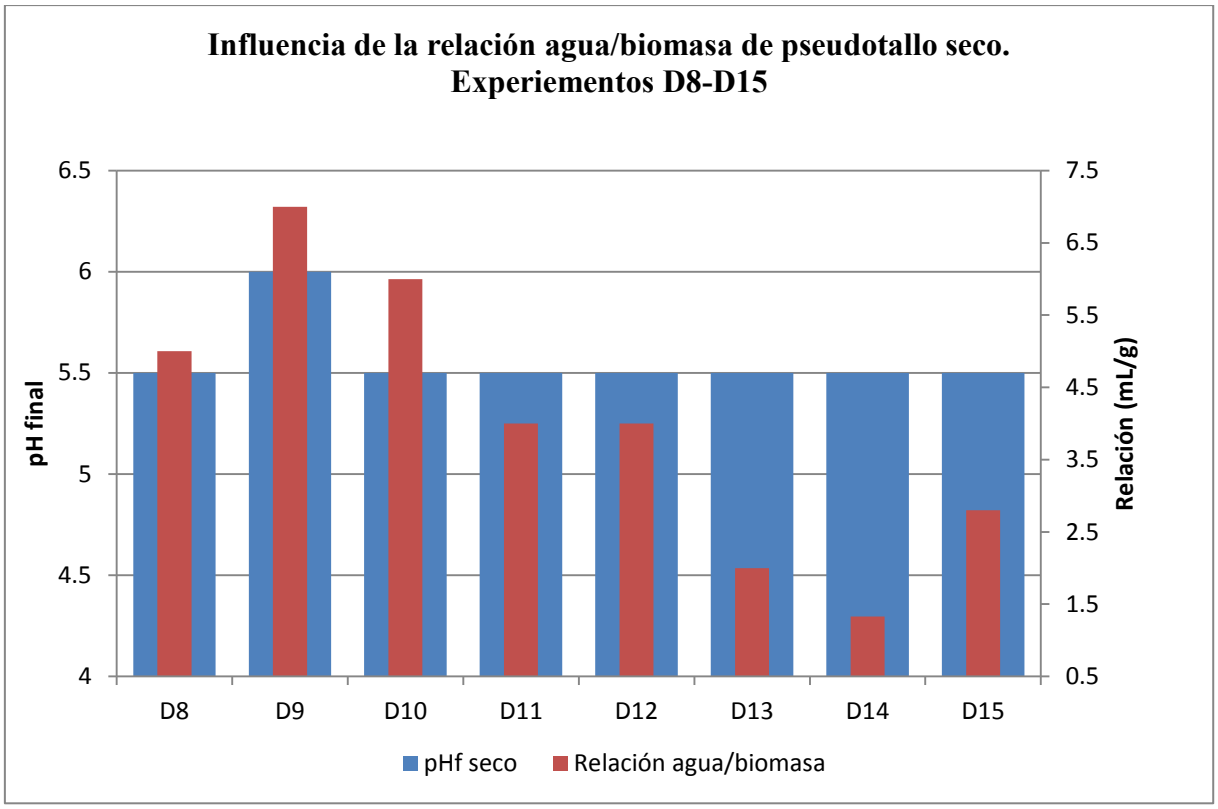

Fig. 4.4 *Steam Explosion* de pseudotallo seco-comparación 1

En las Figuras 4.3 y 4.4 se muestran distintas relaciones de agua/biomasa en pretratamiento SE de pseudotallo húmedo y seco, pero el pH final no presenta un patrón de cambio.

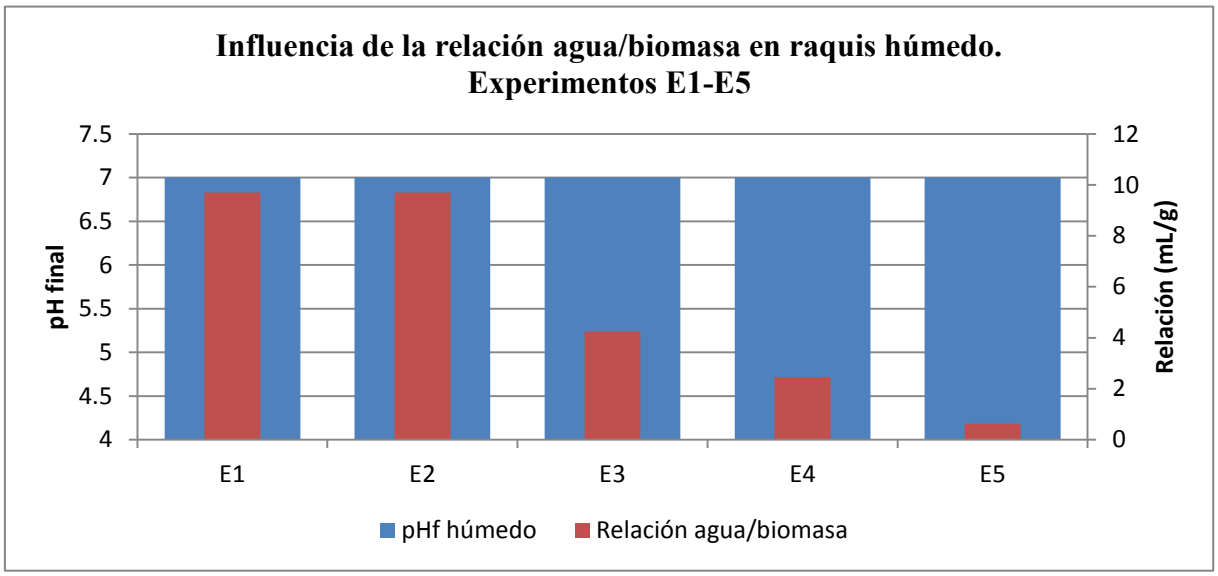

Fig. 4.5 *Steam Explosion* de raquis húmedo – comparación 1

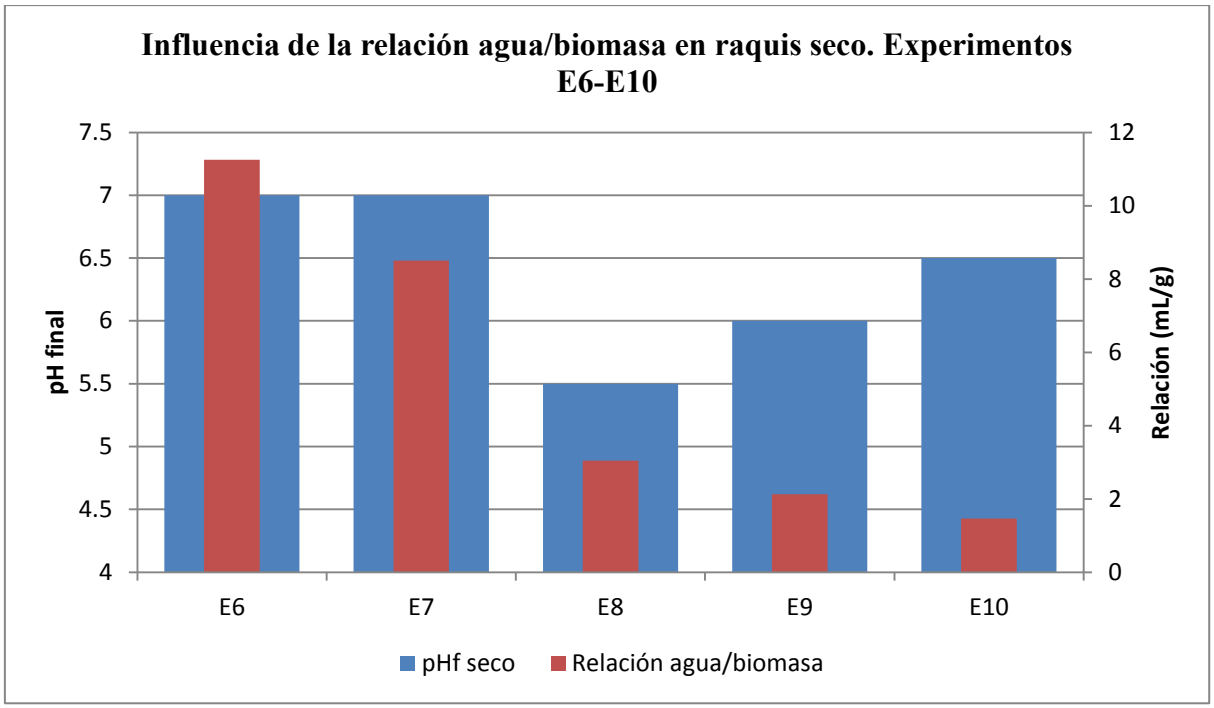

Fig. 4.6 *Steam Explosion* de raquis seco-comparación 1

En las Figuras 4.5 y 4.6 se observa que la relación agua/biomasa o bien no tiene influencia o no muestra una tendencia clara en el pH final en los experimentos de *Steam Explosion* de raquis húmedos o secos.

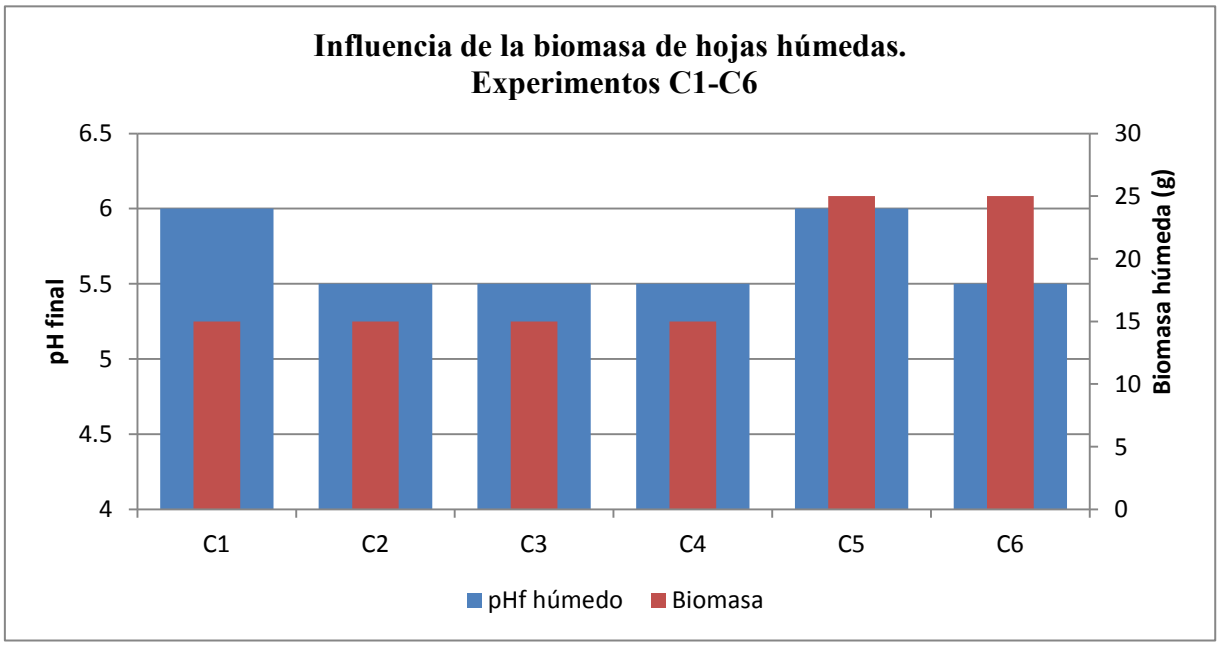

Fig. 4.7 *Steam Explosion* de hojas húmedas – comparación 2

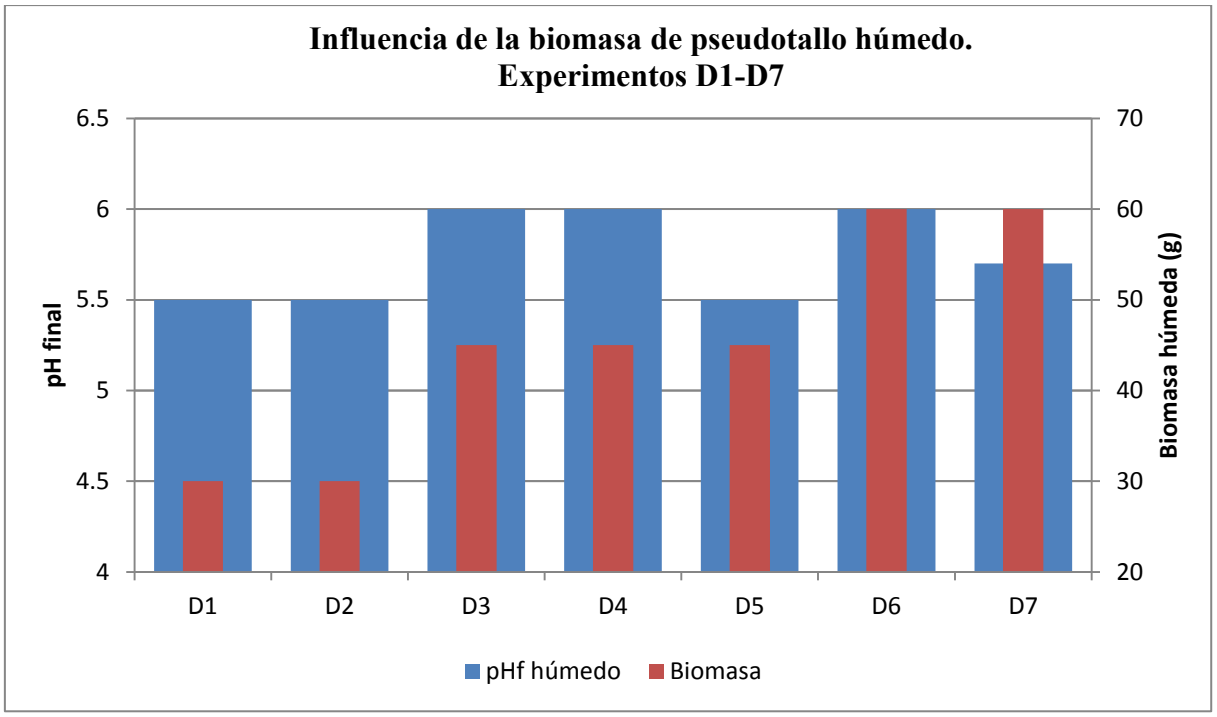

Fig. 4.8 *Steam Explosion* de pseudotallo húmedo – comparación 2

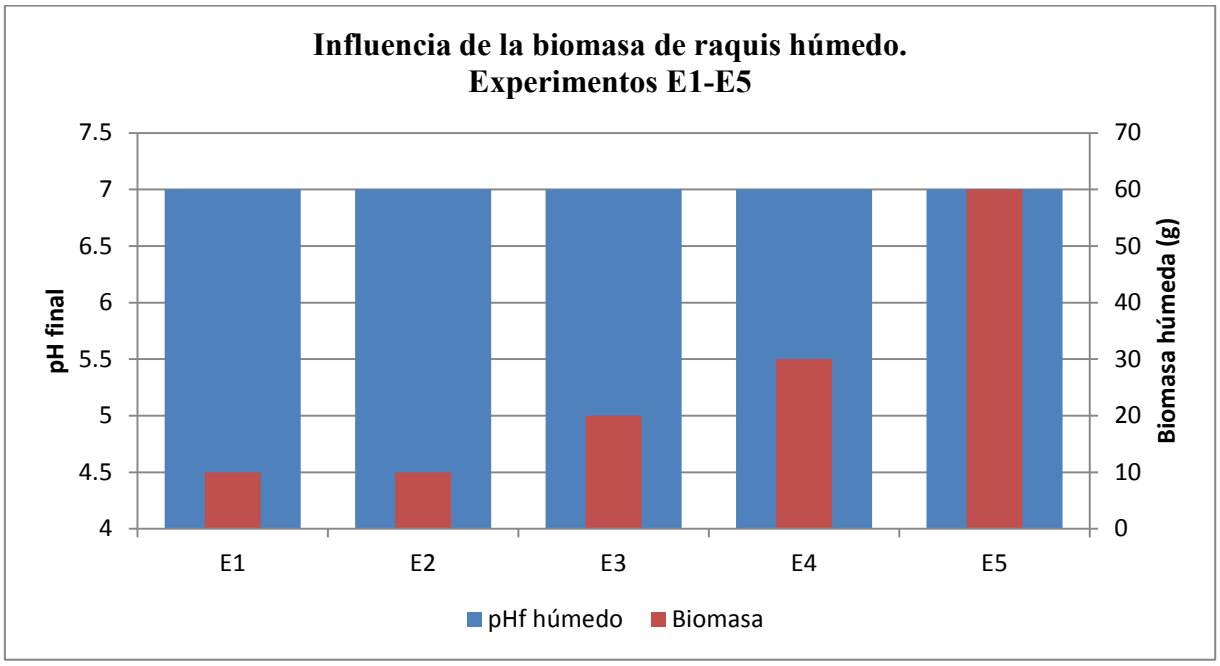

Fig. 4.9 *Steam Explosion* de raquis húmedos – comparación 2

En las Figuras 4.7 a 4.9 se busca ver la posible relación entre la cantidad de biomasa y el pH final alcanzado en el pretratamiento SE, de los tres tipos de residuos de banano orgánico, considerando el mismo tamaño del biorreactor.

Dado que el valor del pH final está en un rango muy estrecho (5,5 - 6,0), tanto en hojas como en pseudotallo, no se podría afirmar que haya una tendencia; sin embargo, en raquis es más claro que no se presenta ningún cambio.

4.2.3 *Liquid Hot Water* en biorreactor de ¾ " de diámetro

En este acápite se presentan los resultados de los ensayos del pretratamiento LHW realizados en el biorreactor de ¾ " de diámetro. Así mismo, se evalúa la posible influencia de diversos parámetros como el estado de la biomasa, tiempo de proceso y relación agua/biomasa, en la degradación de la hemicelulosa.

Pese a las limitaciones instrumentales, se intenta evaluar la mayor o menor degradación de hemicelulosa degradada por la acción ácida del agua a altas temperaturas. La degradación de la hemicelulosa ocasiona el rompimiento de los radicales acetilos y la formación de ácido acético. La formación de este ácido produce una disminución del pH, por lo que se considera que un menor pH final en la mezcla pretratada correspondería a una mayor degradación de la hemicelulosa.

Para cada tipo de residuo de banano orgánico se presenta una tabla con los resultados obtenidos en estado húmedo y seco, la cantidad de agua y biomasa empleada, la relación de agua/biomasa utilizada, los tiempos de cada etapa y las mediciones de pH (Tablas 4.7 a 4.9).

A diferencia del pretratamiento SE, en donde se trabajó con diferentes volúmenes, en LHW todos los ensayos emplearon un volumen total de 116 mL en el biorreactor.

Tabla 4.7 Pretratamiento LHW de hojas

Número Experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)	pHo	pH_f	ΔpH
F1	Húmeda	111	3	37,0	0:00	30:00	17:00	4:00	51:00	7,0	6,0	1,0
F2	Húmeda	89	15	5,9	0:00	48:02	17:00	4:05	69:08	7,0	5,5	1,5
F3	Húmeda	79	21	3,8	0:00	31:18	17:15	4:09	52:43	7,0	5,5	1,5
F4	Húmeda	68	27	2,5	0:00	29:16	17:12	4:39	51:09	7,0	5,5	1,5
F5	Seca	104	3	34,7	3:00	29:24	17:02	4:57	51:24	7,0	5,5	1,5
F6	Seca	93	6	15,5	2:10	31:35	17:34	4:34	53:43	7,0	5,5	1,5
F7	Seca	81	9	9,0	2:20	38:30	17:29	4:22	60:21	7,0	5,5	1,5
F8	Seca	70	12	5,8	4:20	31:59	17:02	4:12	53:13	7,0	5,5	1,5
F9	Seca	58	15	3,9	6:13	42:54	17:00	4:08	64:02	7,0	5,5	1,5

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_0-pH_f

Tabla 4.8 Pretratamiento LHW de pseudotallo

Número experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua /biomasa (mL/g)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
G1	Húmeda	101	15	6,7	0:00	28:18	18:18	4:00	50:36	7,0	5,5	1,5
G2	Húmeda	93	23	4,0	0:00	27:29	17:16	4:01	48:46	7,0	5,5	1,5
G3	Húmeda	86	30	2,9	0:00	26:43	17:03	4:04	47:51	7,0	5,5	1,5
G4	Húmeda	80	36	2,2	0:00	26:41	17:02	4:04	47:48	7,0	4,5	2,5
G5	Seca	100	6	16,7	2:00	27:00	17:14	4:20	48:34	6,0	4,5	1,5
G6	Seca	92	9	10,2	2:00	30:30	17:24	4:10	52:04	6,0	4,5	1,5
G7	Seca	84	12	7,0	2:00	23:57	17:01	4:02	45:00	6,0	4,5	1,5
G8	Seca	76	15	5,1	2:00	31:00	17:02	4:20	52:22	6,0	4,5	1,5
G9	Seca	70	18	3,9	2:00	43:17	19:47	4:18	67:22	6,0	4,3	1,7

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_0-pH_f

Tabla 4.9 Pretratamiento LHW de raquis

Número de Experimento	Estado de biomasa	Agua (mL)	Biomasa (g)	Relación agua/biomasa (mL/g)	Tiempo previo (horas)	Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de proceso (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	Tiempo total (min)	pH_0	pH_f	ΔpH
H1	Húmeda	104	10	10,4	0:00	28:15	17:00	4:10	49:25	7,0	7,0	0,0
H2	Húmeda	92	20	4,6	0:00	42:28	17:02	4:08	63:38	7,0	5,5	1,5
H3	Húmeda	81	30	2,7	0:00	32:16	17:01	4:10	53:27	7,0	4,5	2,5
H4	Seca	104	5	20,8	2:00	31:32	18:02	4:00	53:34	7,0	5,5	1,5
H5	Seca	92	10	9,2	2:00	41:25	17:10	4:10	62:48	7,0	5,5	1,5
H6	Seca	80	15	5,3	2:00	29:23	17:02	4:57	51:00	7,0	5,5	1,5

pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_0-pH_f

En la Tabla 4.7, se observa que el tiempo previo de remojo de la biomasa seca no influye en la eficiencia del pretratamiento. Tampoco el estado de la biomasa influye en una mayor o menor degradación de la hemicelulosa, ya que en la mayoría de los ensayos LHW se alcanza un pH final de 5,5.

En la Tabla 4.8, se observa que los ensayos LHW con pseudotallo registraron en promedio menores pH finales que las hojas y raquis. Esto puede deberse al menor contenido de hemicelulosa que presenta, por lo que se requeriría de menor esfuerzo para degradar toda la hemicelulosa presente en este tipo de residuo.

Se debe aclarar que las relaciones agua/biomasa en las hojas fueron mayores que en pseudotallo y raquis; esto se debió a la baja densidad de las hojas, lo que restringía las cantidades de masa en el biorreactor. Lo contrario ocurrió con el pseudotallo, cuya densidad permitió utilizar mayores cantidades de biomasa.

Se observa que los mejores resultados se han obtenido en el pseudotallo, seguido de las hojas y finalmente de los raquis; este orden coincide con el ordenamiento de los residuos en base al contenido de hemicelulosa **[70]**. El menor pH final fue de 4,5; independiente del tipo de residuo y estado de biomasa.

La etapa de enfriamiento del LHW no tiene un efecto aparente en la degradación de la hemicelulosa. Esta etapa se realiza con el objetivo de enfriar el biorreactor y poder acceder rápidamente a su contenido.

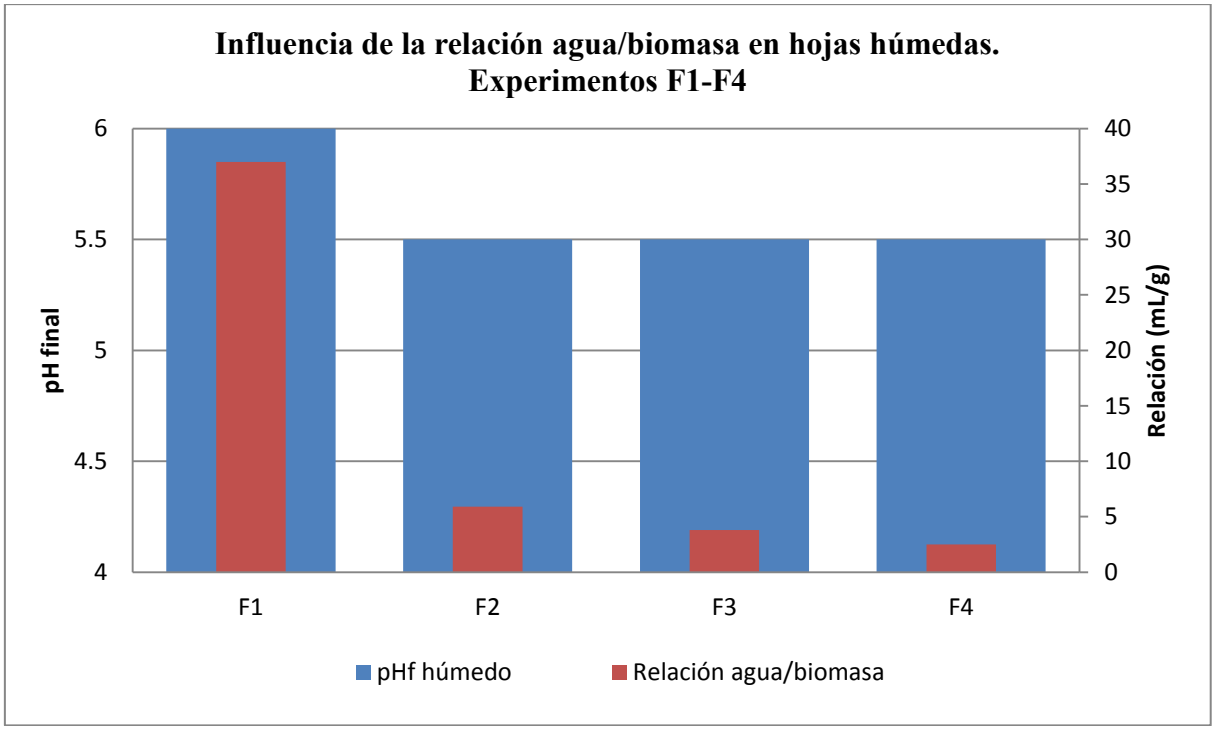

Fig. 4.10 *Liquid Hot Water* de hojas húmedas – comparación 1

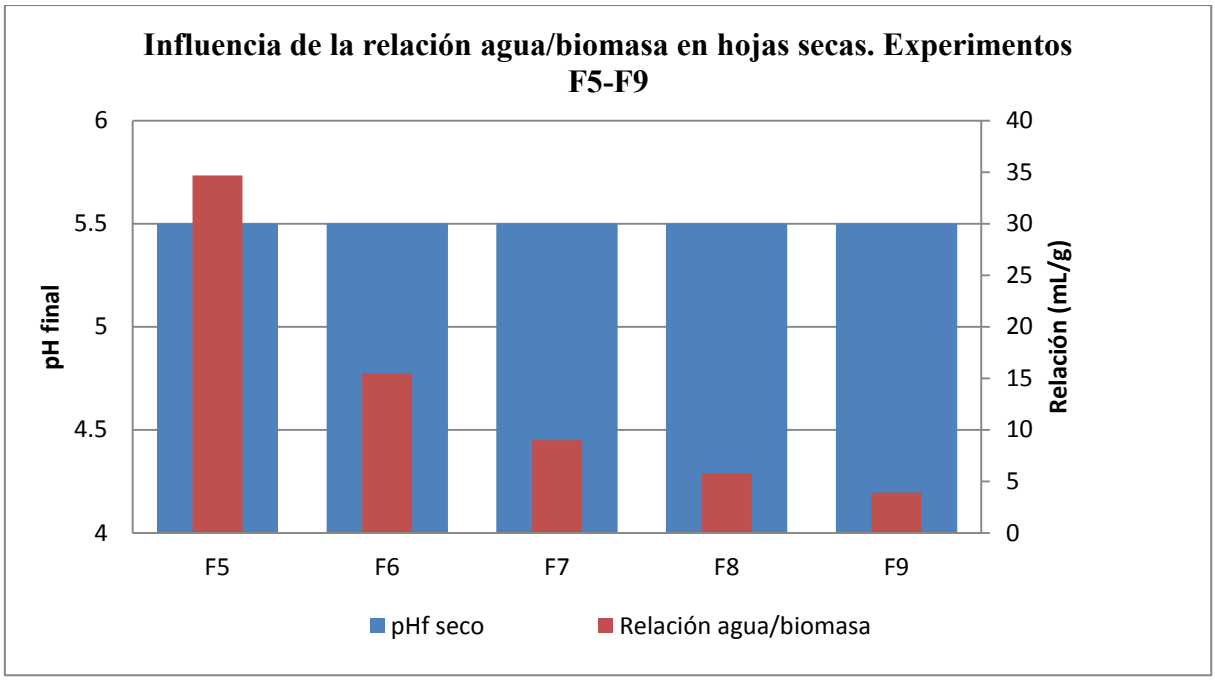

Fig. 4.11 *Liquid Hot Water* de hojas secas – comparación 1

En las Figuras 4.10 y 4.11 se observa que en estado húmedo o seco, las distintas relaciones de agua/biomasa no se correlacionan con una mayor o menor degradación de la hemicelulosa. El pH final alcanzado es 5,5 en la mayoría de los ensayos.

Se aprecia que a diferencia del pseudotallo y raquis, las hojas no lograron alcanzar 4,5 de pH final, sino que bajó sólo a 5,5.

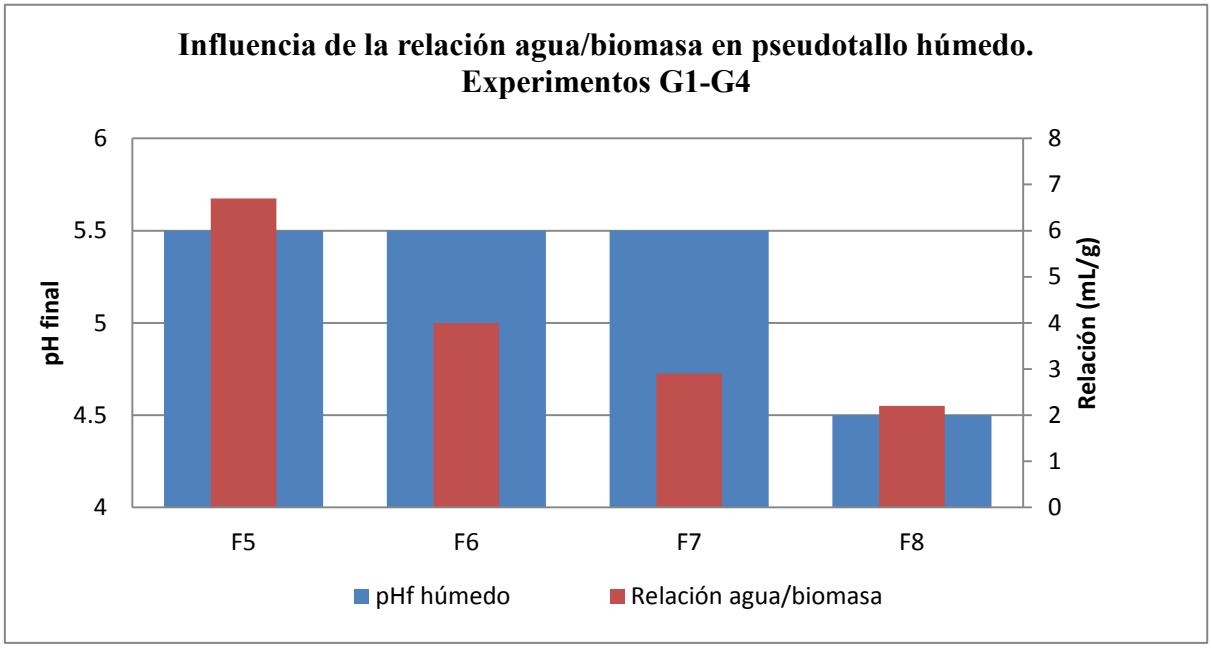

Fig. 4.12 *Liquid Hot Water* de pseudotallo húmedo – comparación 1

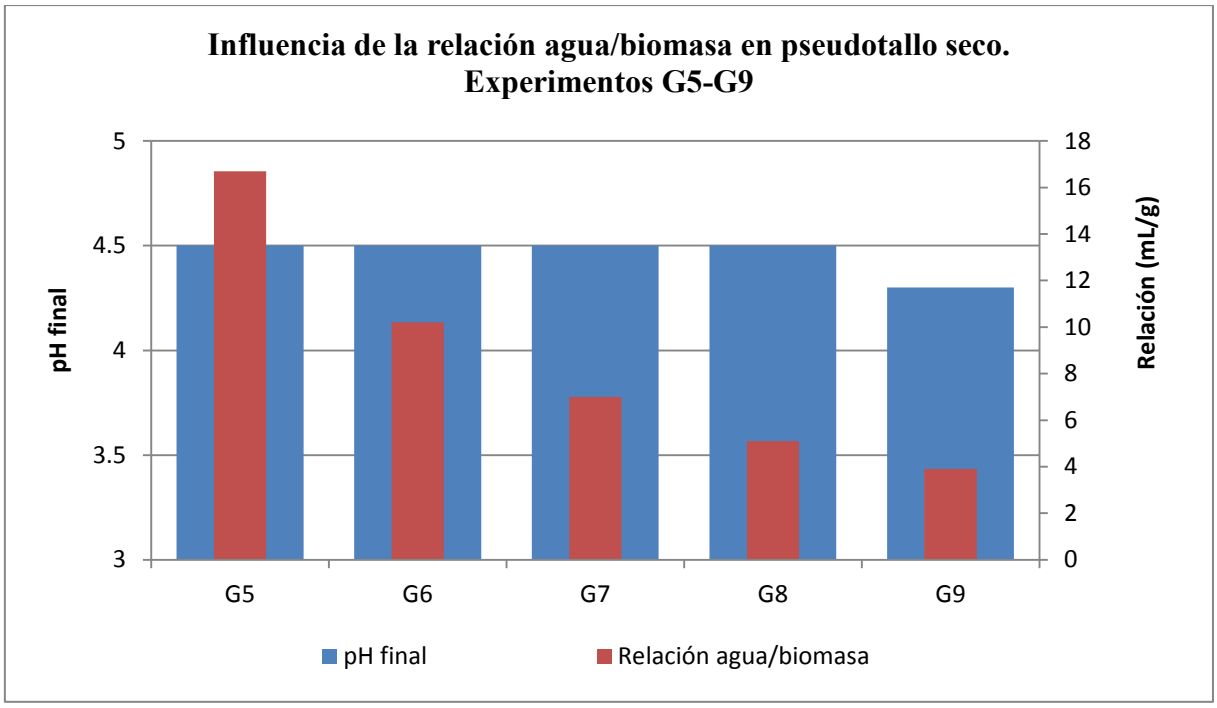

Fig. 4.13 *Liquid Hot Water* de pseudotallo seco – comparación 1

En las Figuras 4.12 y 4.13 se observa que la relación agua/biomasa no influye en una mayor degradación de la hemicelulosa, en pseudotallos húmedos o secos. En estado húmedo la mayoría de los ensayos registraron un pH final de 5,5; mientras que, en seco todos los ensayos alcanzaron un pH entorno a 4,5.

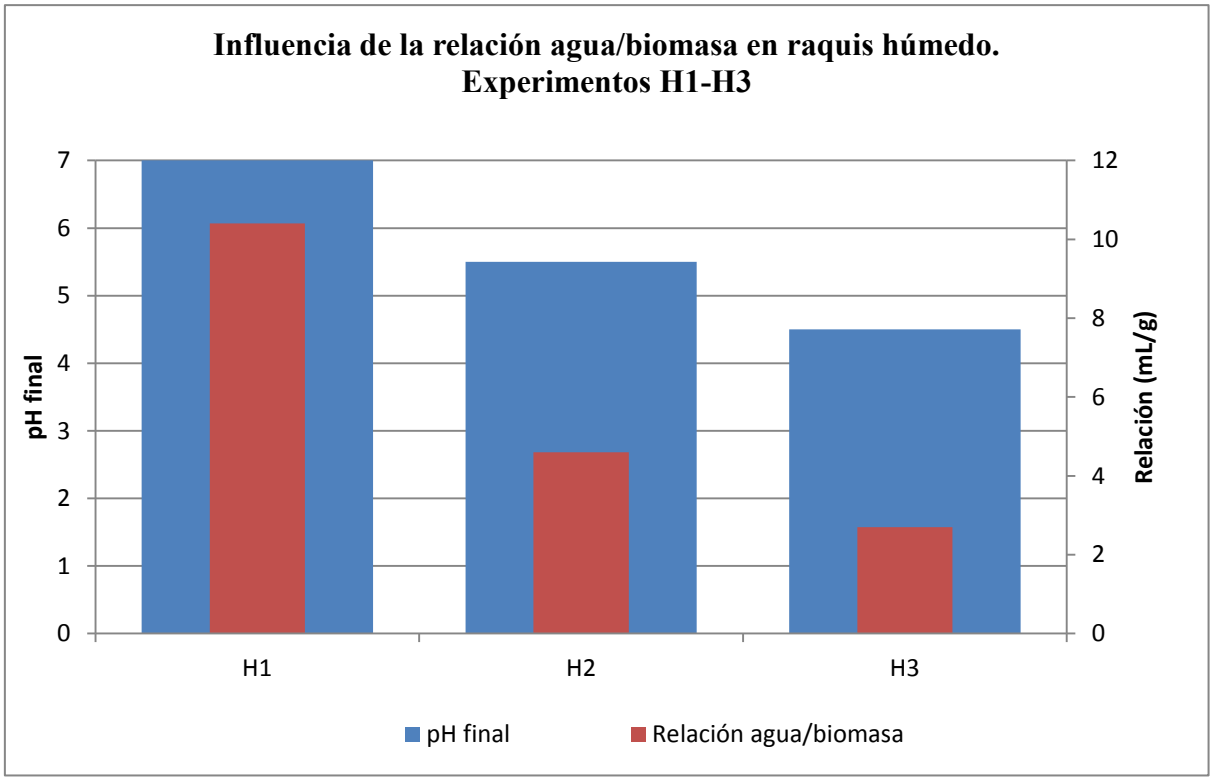

Fig. 4.14 *Liquid Hot Water* de raquis húmedos – comparación 1

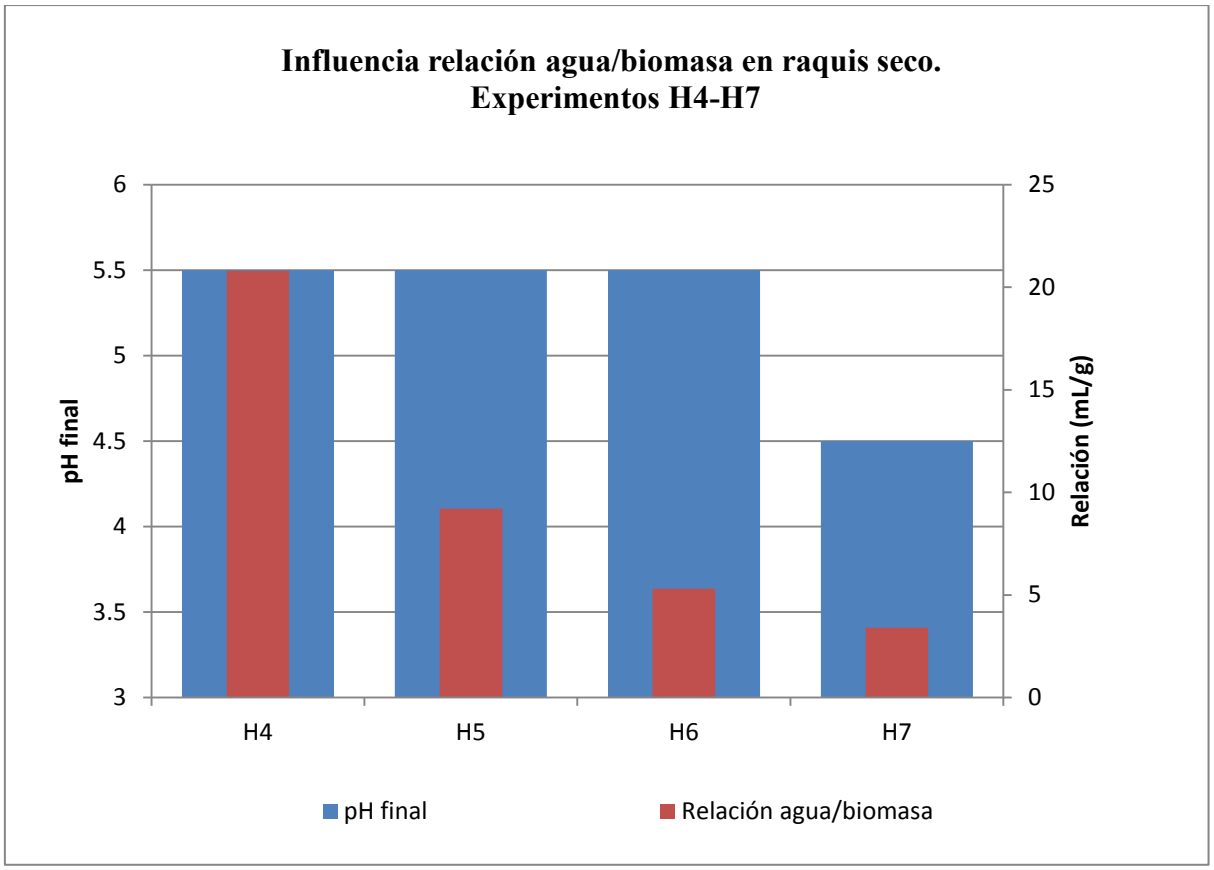

Fig. 4.15 *Liquid Hot Water* de raquis seco – comparación 1

En la Figura 4.14 se observa una aparente influencia de la relación agua/biomasa sobre la degradación de la hemicelulosa en raquis húmedos; sin embargo, en raquis secos (Figura 4.15) se observa lo mismo que en el resto de pruebas; es decir, que la relación agua/biomasa no influye en la degradación de la hemicelulosa.

4.2.4 *Liquid Hot Water* en biorreactor de 3´´

En la Tabla 4.10, se muestran los resultados obtenidos del pretratamiento LHW de pseudotallos, con mayores cantidades de biomasa, en el biorreactor W2 (de 3" de diámetro).

El objetivo de estos ensayos fue, principalmente, contar con la adecuada cantidad de biomasa pretratada, para las siguientes etapas del proceso.

Tabla 4.10 Pretratamiento LHW de pseudotallo- biorreactor de 3''

	Datos iniciales				t_c (min)	t_p (min)	t_e (min)	Biomasa obtenida		Resultados						
Ex	**Biomasa (g)**	**Agua (mL)**	**Relación (mL/ g)**	**Estado de la biomasa**				**Pulpa (g)**	**Líquido (g)**	**Masa inicial (g)**	**Masa final (g)**	**Recuperación (%)**	**pH_0**	**pH_f**	**ΔpH**	**Apariencia**
K1	453,25	1 295	2,85	Húmeda	52:35	90:00	8:41	70,00	1 525,1	1 748,25	1 595,0	91%	7	5,5	1,5	Líquida
K2	453,25	1 295	2,85	Húmeda	49:26	86:00	8:13	101.30	1 439,0	1 748,25	1 540,3	88%	7	5,5	1,5	Líquida
K3	453,25	1 295	2,85	Húmeda	45:09	83:00	9:55	75,00	1 528,0	1 748,25	1 603,0	92%	7	5,5	1,5	Líquida

Ex	Número de ensayo
t_c	Tiempo de calentamiento
t_p	Tiempo de proceso
t_e	Tiempo de enfriamiento
pH_0	pH inicial
pH_f	pH final
ΔpH	pH_o-pH_f

4.3 Resultados del proceso de deslignificación

En este acápite se presentan los resultados del proceso de deslignificación con ozono. La materia prima utilizada fue pseudotallo pretratado mediante LHW, por ser esta combinación de residuo - pretratamiento la que mostró mejores resultados de degradación de la hemicelulosa. El material utilizado fue la combinación de las muestras pretratadas K1, K2, K3, que se muestran en la Tabla 4.10.

En el proceso de deslignificación por ozonización, la degradación de la lignina produce la formación de ácidos como resultado de la descomposición de compuestos fenólicos **[36, 3]**. Para la evaluación de esta degradación se empleó nuevamente la disminución de pH. Sin embargo, los valores de pH no mostraron reducción alguna; cabe la posibilidad de que la cantidad de ozono aplicada haya sido menor a la necesaria o que la concentración de ácido acético haya sido insuficiente.

Durante el proceso de ozonización se produjo abundantes burbujas, sin embargo, cuantitativamente no se registró ninguna disminución en el pH, con lo cual se podría concluir que no se produjo la degradación de la lignina. Se considera que la carga de ozono suministrada no fue la suficiente, y que el tiempo de proceso fue muy corto. Se recomienda realizar el proceso con cargas y tiempos mayores hasta disminuir el pH y así demostrar que la lignina se ha degradado.

4.4 Resultados de los procesos de hidrólisis enzimática

En este acápite se presentan los resultados del proceso de hidrólisis enzimática con las enzimas Cellic CTec 2. La materia prima utilizada fue pseudotallo pretratado sin ozonizar (Y3) y parte del material resultante del proceso de deslignificación (Y1, Y2, Y4).

En la hidrólisis enzimática, las enzimas convierten la celulosa en glucosa al romper las cadenas de glucanos en glucosa. Para la evaluación de dicha conversión se empleó el grado Brix como unidad de medida.

En la Tabla 4.11 se presenta una comparación del proceso de hidrólisis enzimática a distintas muestras: muestras ozonizadas (Y2 y Y1=sin ácido acético, ver 3.10.6), y muestra no ozonizada. En la Tabla 4.12 se presentan los resultados para una muestra más grande (Y4), la cual tampoco fue ozonizada.

Las muestras sometidas a hidrólisis enzimática, inicialmente, presentaron una apariencia pastosa, pero al cabo del primer día de hidrólisis su consistencia fue más líquida.

Tabla 4.11 Hidrólisis enzimática preliminar con muestra ozonizada

Muestra	Hora	Peso (g)	°Brix	T (°C)
Y1	0	60,00	2,00	40
	17	60,00	12,25	-
	50	60,00	10,00	49
	65	60,00	10,00	50
	73	60,00	10,00	-
Y2	0	60,00	2,00	40
	17	60,00	11,75	-
	50	60,00	10,00	49
	65	60,00	10,00	50
	73	60,00	11,00	55

El resultado de la hidrólisis preliminar fue positivo en las muestras ozonizadas sin ácido acético (Y1) y con ácido acético (Y2), dado que el grado Brix incrementó de 2 a 10 y 11 °Brix, respectivamente.

Tabla 4.12 Hidrólisis enzimática preliminar de la muestra no ozonizada

	Hora	Peso (g)	°Brix	T (°C)	pH
Y3	0	181,80	8,50	45,00	5,5
	3	181,80	10,50	47,00	5,5
	15	181,80	11,50	-	5,5
	18	181,80	11,50	-	5,5
	23	181,80	11,50	-	5,0

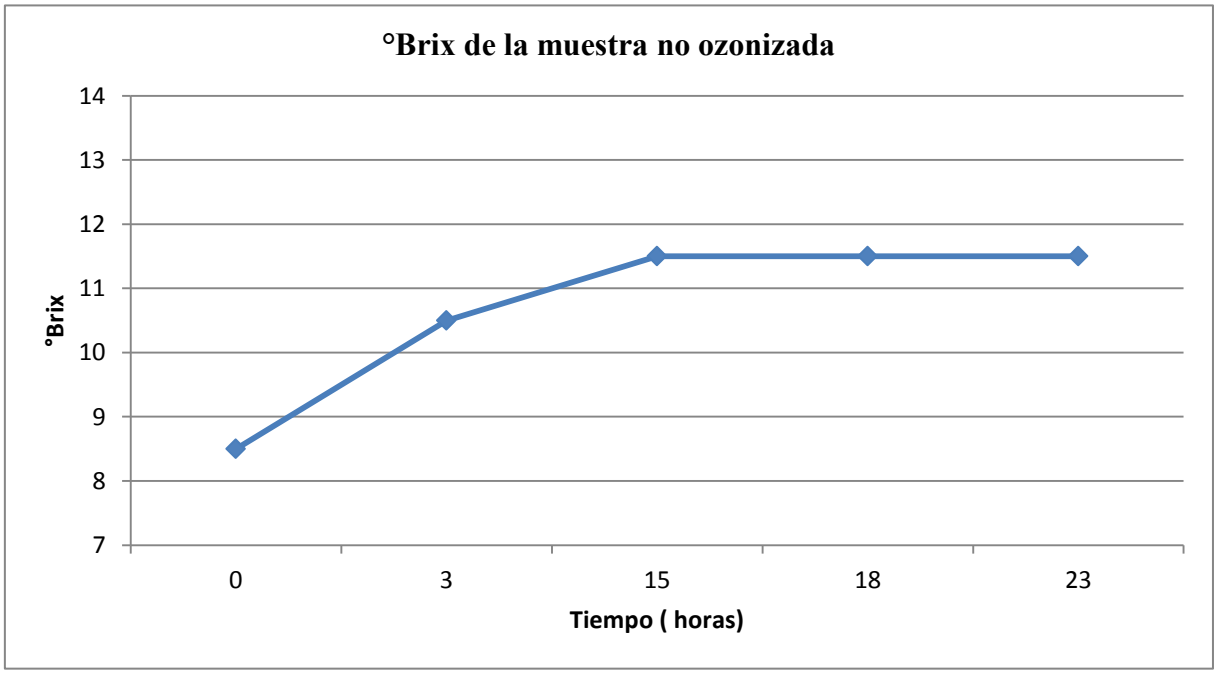

Fig. 4.16 Evolución del grado Brix durante la hidrólisis enzimática de la muestra no ozonizada

Tabla 4.13 Resultado hidrólisis enzimática de muestra más grande, no ozonizada

	Hora	Peso (g)	°Brix	T (°C)	pH
Y4	0	1 000,00	2,00	40	5,5
	24	1 000,00	12,50	49	-
	39	1 000,00	12,50	50	-
	48	1 000,00	13,00	50	5,0
	96	1 000,00	15,50	50	5,0
	111	1 000,00	15,50	14	5,0

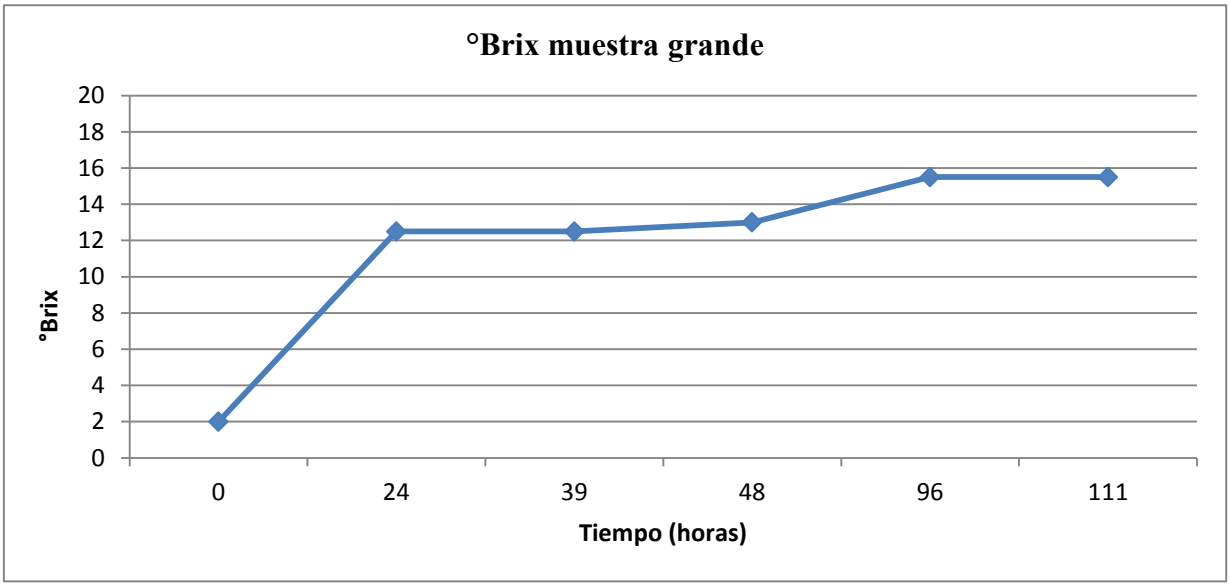

Fig. 4.17 Evolución del grado Brix, durante hidrólisis enzimática de una muestra grande (Y4)

Al comparar los dos ensayos preliminares (Y1, Y2 y Y3) de hidrólisis enzimática, se encuentra una tendencia similar, a pesar de que en la primera muestra (Y1) se eliminó el ácido acético presente y en las otras muestras (Y2 y Y3) se mantuvo el ácido acético; por lo cual se concluyó que durante la hidrólisis enzimática este componente no tiene ninguna influencia.

Todas las muestras presentan un aumento del grado Brix al trascurrir el tiempo.

- **Rendimiento de hidrólisis**

Para el cálculo del rendimiento de la hidrólisis enzimática, en el ensayo Y4 se determinó la cantidad de glucosa producida (en base a la variación del grado Brix) y la cantidad teórica de celulosa presente en la mezcla:

°Brix de la muestra final hidrolizada = 15,5
Porcentaje de celulosa de la muestra (pseudotallo) = 52,81 % **[70]**
Peso muestra final = 1 000 g

$$\frac{0{,}155 \times 1000}{1\,000 \times 0{,}5281} \times 100 = 29{,}35\%$$

4.5 Resultados del proceso de fermentación

En la Figura 4.18 se muestran los resultados de las fermentaciones realizadas.

Previo a la fermentación, las muestras se dejaron evaporar en una estufa con el objetivo de concentrarlas hasta alcanzar el grado Brix requerido para el correcto crecimiento de la levadura, llegando a 28 °Brix en la muestra previa y 15,5 °Brix en la muestra final.

- **Medida con refractómetro:**

Tabla 4.14 Medida del grado Brix durante la fermentación

Muestra	Peso (g)	°Brix					
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Previa	78	28,00	19,00	16,75	16,00	15,50	15,50
Final	1 000	15,50	11,00	10,75	10,50	8,00	8,00

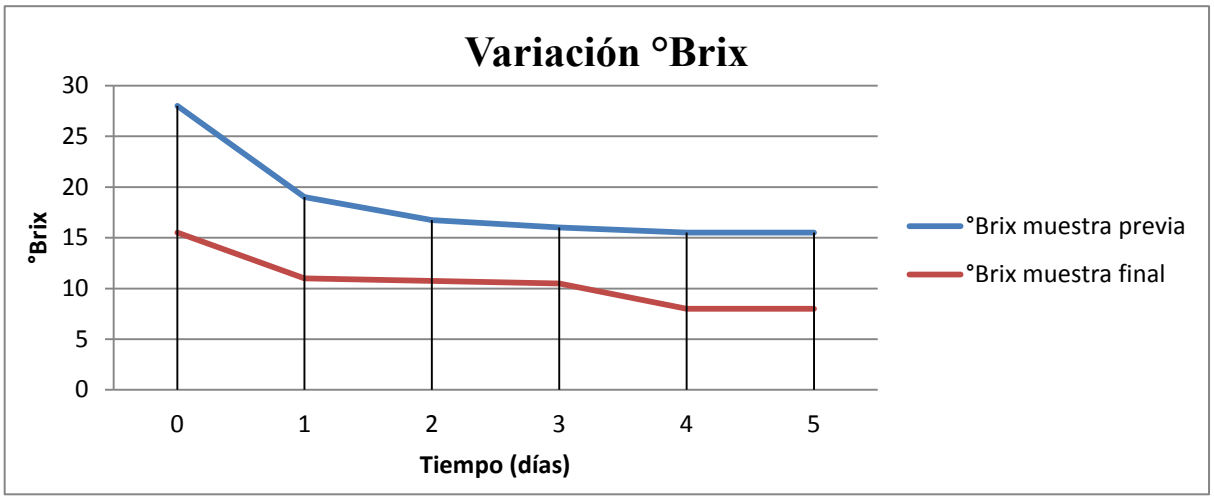

Fig. 4.18 Fermentación de muestras previa y final

En ambas muestras, el grado Brix disminuyó con el transcurrir de los días, hasta estabilizarse en 15,50 °Brix en la muestra previa y 8 °Brix en la muestra final.

- **Rendimiento de la fermentación**

Se determina mediante el cálculo de la masa de etanol que se obtendría teóricamente, a partir de la cantidad de glucosa determinada experimentalmente por la variación del grado Brix.

Etanol teórico:

$$\underset{\substack{1\ \text{mol}\\ 180\ \text{g}}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\substack{2\ \text{moles}\\ 92\ \text{g}}}{2C_2H_5OH} + \underset{\substack{2\ \text{moles}\\ 88\ \text{g}}}{2CO_2}$$

El rendimiento estequiométrico para la fermentación es de 0,511 g de etanol/g de glucosa.

Cálculo:

°Brix al inicio de la fermentación = 15,5
Variación del °Brix durante la fermentación = 7,5

500 mL de mezcla = 0,155 × 500 = 77,5 g de azúcares totales[14]

Azúcares convertidos a etanol = 0,075 × 500 = 37,5 g

(37,5/180) = 0,21 moles de glucosa

0,21 × 2 = 0,42 moles de etanol

m_e = 0,42 × 46 = **19,17 g de etanol teórico producido**

Rendimiento de la fermentación:

(19,17/77,5) = 0,247 g de etanol⁄g de glucosa

El rendimiento experimental de la fermentación varía entre 90% y 95% y su rendimiento industrial varía entre 87% y 93% **[16].**

El bajo rendimiento de la fermentación registrado en la presente tesis pueden deberse a las siguientes causas:

- Empleo de levadura liofilizada comercial. Por lo general, en este tipo de experimentos, se utiliza levadura aislada y adaptada previamente en laboratorio.
- Entrada de aire a la mezcla durante las tomas de muestra para la medición del °Brix.
- Excesiva variación del pH durante el proceso, ya que no se empleó soluciones reguladoras de pH.
- Presencia de sólidos insolubles (biomasa residual).

4.6 Resultados del proceso de destilación

A continuación se presenta el cálculo de la masa de etanol obtenida; así como los resultados experimentales y los rendimientos considerados:

- **Medida de grado alcohólico**

Debido al poco volumen del destilado obtenido, las mediciones del grado alcohólico que se obtuvieron empleando los diferentes métodos presuponen alto grado de error.

[14] Los azúcares totales presentes en la mezcla han sido considerados como glucosa.

a. Método de densidad

Tabla 4.15 Grado alcohólico-método de densidad

# destilado	Masa (g)	Volumen (mL)	Densidad (g/mL)	% alcohol en volumen	% alcohol en peso
1	10,53	13,0	0,8100	96,5	91,75
2	6,33	7,0	0,9242	55,1	47,32

Nota: el % alcohol en volumen se obtiene a partir de la densidad, mediante la Tabla *Aqueous Ethyl Alcohol at 15,56 °C* **[77]**.

10,53 × 0,9175 + 6,33 × 0,4732 = **12,657 g etanol experimental**

Rendimiento de la destilación

(12,657/19,17) × 100 ≅ **66%**

b. Método de refractómetro

Tabla 4.16 Grado alcohólico - método de índice de refracción

# destilado	°Brix	Índice de refracción	% alcohol peso
1	20,5	1,3646	92
2	18,4	1,3610	48

Nota: el % alcohol en peso se obtiene a partir del índice de refracción, mediante la Tabla *Aqueous Ethyl Alcohol at 15,56 °C* **[77]**.

10,53 × 0,92 + 6,33 × 0,48 = **12,728 g etanol experimental**

Rendimiento de la destilación

(12,728/19,17) × 100 ≅ **66,4%**

Se aprecia que los rendimientos de la destilación empleando los diferentes métodos coinciden.

- **Biomasa utilizada para conseguir 12,657 g de etanol**

La biomasa empleada fue pseudotallo húmedo, el cual tiene una humedad del 76 % según las pruebas realizadas de secado.

Biomasa fresca inicial: 1 359,75 g
Materia seca en la biomasa: 326,34 g
Agua añadida para LHW: 3 885,00 g
Biomasa inicial + agua: 5 244,75 g
Pulpa de biomasa recuperada: 188,88 g
Biomasa utilizada para la destilación: 326,34/2 = 163,17 g (materia seca).

- **Rendimiento etílico**

(12,657 g etanol/163,17 g biomasa) = 0,078 g etanol/g biomasa

Teniendo en cuenta que en una hectárea de cultivo de banano orgánico se generan 2 925 kg de residuos vegetales, este rendimiento etílico equivale a 2 340 L/ha.

En un estudio de posibles cultivos alternativos para la producción de etanol de biomasa vegetal en Uruguay, los rendimientos etílicos de las especies lignocelulósicas *Switchgrass* (*Panicum virtagum*) y *Miscantus* (*Miscanthus giganteus*) fueron de 1 600 litros de etanol/ha y 4 500 litros de etanol/ha respectivamente **[78].**

En un artículo sobre la producción de etanol a partir de pasto *Switchgrass*, se menciona que el rendimiento etílico alcanzado fue de 300 galones de etanol/ha **[79].**

En otro estudio sobre *Cultivos alternativos para la producción de bioetanol,* donde se empleó el tallo de pataca como biomasa de estudio, el rendimiento etílico alcanzado fue de 66,7 litros de etanol/t de tallo **[80].**

El rendimiento etílico alcanzado en la parte experimental de la presente tesis es mayor al de los estudios anteriormente mencionados, esto puede atribuirse a:

- Empleo de enzimas celulolíticas de tercera generación
- Aplicación de pretratamientos hidrotérmicos
- Ensayos realizados en una escala de laboratorio, debiendo ser verificados en escala piloto.

Capítulo 5
Perspectivas para un posible proyecto industrial

El objetivo de este capítulo es brindar una descripción sobre las tecnologías disponibles para obtener etanol anhidro industrializado, utilizando como materia prima: pseudotallo húmedo de banano orgánico. Como se detalló en los capítulos 3 y 4, este tipo de biomasa presenta el mayor contenido de celulosa y registró los mejores resultados en las pruebas experimentales realizadas.

A partir de la información obtenida de la parte experimental de la presente tesis, se propone un diagrama de flujo del proceso industrial y se proponen equipos para cada etapa según la tecnología seleccionada.

Las capacidades de cada equipo se han seleccionado para una capacidad de producción de 30 toneladas métricas de etanol por día (t/día), esta capacidad se explicará más adelante en el punto 5.2.

Es importante destacar que sólo las fases de pretratamiento, deslignificación e hidrólisis enzimática utilizan nuevas tecnologías; mientras que en las fases de desfibrado, filtración, destilación y deshidratación se emplea tecnología ya conocida y utilizada en la mayoría de las plantas productoras de etanol.

5.1 Selección de tecnologías

5.1.1 Desfibrado

El proceso de desfibrado es una operación mecánica que se realiza con el fin de reducir el tamaño del material lignocelulósico, para facilitar los procesos posteriores.

Luego de evaluar varias alternativas de equipos cortadores, desfibradores y moledores, se ha seleccionado una desfibradora vertical de *Fives Fletcher* **[81]**, cuyo diseño del rotor da una cobertura completa en toda la anchura de la máquina. Los martillos oscilantes, que reducen la materia prima en trozos más pequeños, se solapan entre sí ligeramente para asegurar que exista una cobertura total de área de barrido.

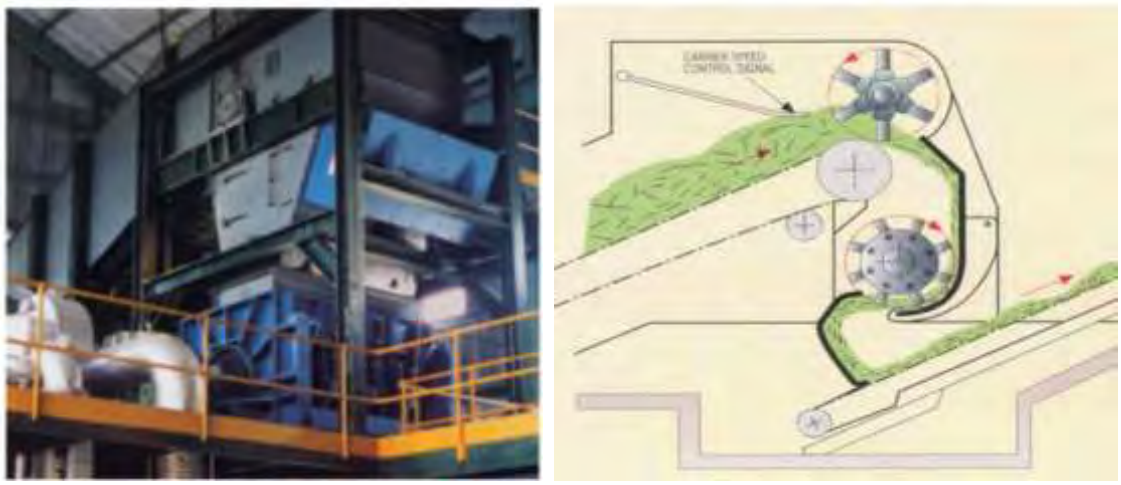

Fig. 5.1 Máquina desfibradora [81]

La desfibradora vertical (ver Figura 5.1) está compuesta por dos rotores de seis y ocho barras respectivamente, y dos fajas transportadoras por donde pasa la materia prima de forma continua; la capacidad que se recomienda es de 400 t/día **[81]**.

5.1.2 Pretratamiento

El pretratamiento *Liquid Hot Water* ha sido seleccionado como el más adecuado para un posible proyecto industrial, debido principalmente a la simplicidad de la tecnología requerida, sin embargo, este proceso requiere de mayor energía que el pretratamiento *Steam Explosion*.

El equipo propuesto para el pretratamiento LHW consiste en un reactor hidrotérmico químico de acero inoxidable S316 de alta aleación[15]. La temperatura y presión de trabajo máxima del reactor es de 350 °C y 20 MPa respectivamente **[82]**.

El material seleccionado para todos los equipos del proceso de pretratamiento es acero inoxidable, con el fin de evitar la corrosión y facilitar la limpieza **[83]**.

El reactor debe contar con un sistema de enfriamiento, que consiste en camisas intercambiadoras de calor situadas en todo su ancho y base. Además, la alimentación de la biomasa y agua será impulsada por dos bombas de tornillo, al igual que la salida de la mezcla pretratada.

El reactor tendrá 15 mm de espesor **[82]** y una capacidad de 50 m^3, con un procesamiento diario de 1 000 t/día, el proceso dura 3 horas por lo que se requerirá de 3 reactores.

[15] Una alta aleación es una aleación que exhibe una excelente resistencia mecánica, resistencia a altas temperaturas, estabilidad y una gran resistencia a la corrosión y la oxidación.

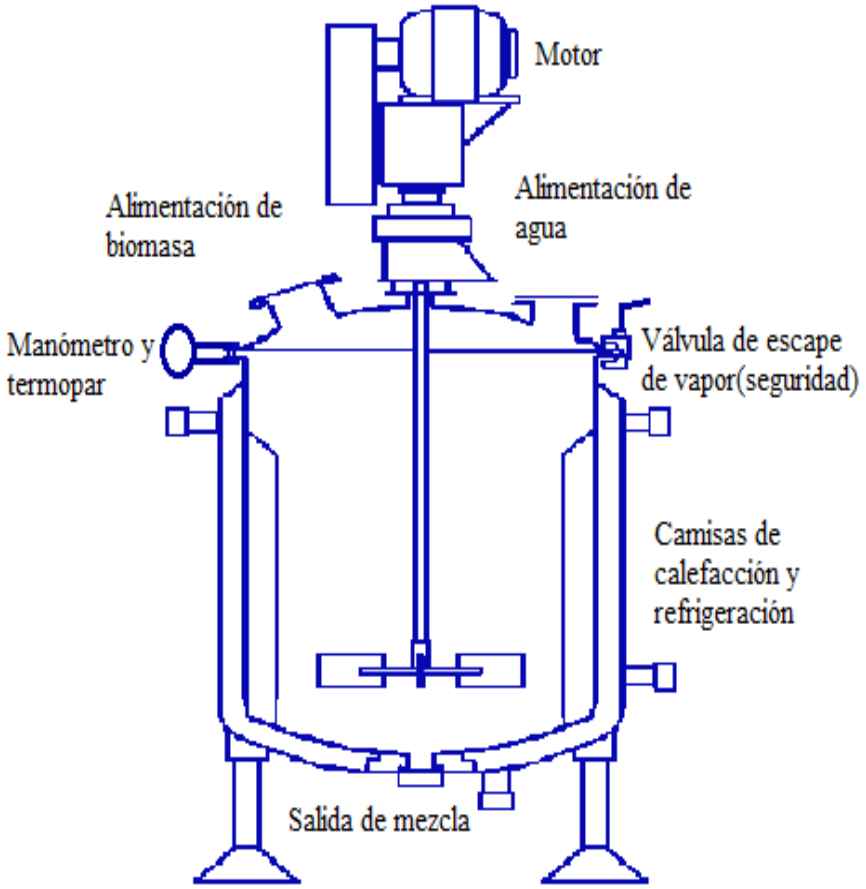

Fig. 5.2 Tanque de cocción de acero inoxidable [82]

5.1.3 Deslignificación

Los procesos comerciales de deslignificación se basan en la solubilización de la lignina en medios acuosos **[2]**. En esta tesis se propone el método de ozonización.

La ozonización se realizará en el mismo reactor descrito en el punto 5.1.2.

Existen múltiples tipos de máquinas ozonizadoras, de las cuales se recomienda el generador de ozono modelo TG-450, debido a que produce una gran cantidad de ozono a partir de una baja demanda de oxígeno.

El generador de ozono TG-450 produce ozono a partir de una alimentación de oxígeno a través de descarga de corona[16]. Con una alimentación de oxígeno de 120 L/min el generador es capaz de producir 515 g de ozono/hora **[84]**.

Descripción general:

- Peso: 90 kg

[16] Campo eléctrico muy intenso capaz de causar la ruptura dieléctrica del aire **[85]**

- Dimensiones: 76,2 cm x 50,8 cm x 91,4 cm
- Material: aluminio

Especificaciones:

- Concentración de ozono: 4,20 - 8,20% peso
- Salida de ozono: 210 g/h – 515 g/h
- Presión de operación: 5,62 bar
- Alimentación de oxígeno: 90 – 120 L/min
- Alimentación eléctrica: 220 VAC y 60 Hz

Producción de ozono:

- 515 g/h de ozono al 5% y 120 LPM de oxígeno
- 450 g/h de ozono al 5,8% y 90 LPM de oxígeno
- 355 g/h de ozono al 6,9% y 60 LPM de oxígeno
- 210 g/h de ozono al 8,5% y 30 LPM de oxígeno

Equipo ozonizador:

Leyenda	
1	Lengüetas de fijación para montaje en la pared
2	Botón de encendido/apagado
3	Indicador de presión
4	Botón de ozono
5	Control de salida de ozono
6	Medidor de flujo de oxígeno
7	Control de flujo de oxígeno
8	Pestillos de cierre
9	Cable de alimentación
10	Desconexión principal
11	Salida de ozono
12	Entrada de oxígeno
13	Entrada de agua de refrigeración
14	Salida del agua de refrigeración
15	Medidor del flujo de refrigeración
16	Control de refrigeración

Fig. 5.3 Máquina de ozonización [84]

5.1.4 Hidrólisis enzimática

En el caso de la hidrólisis enzimática, se opta por un tanque químico empleado comúnmente en los procesos de hidrólisis, neutralización, reacción, etc. de diferentes campos tales como la farmacia, química, e industria alimentaria **[86]**.

El tanque propuesto es SUS316L, de acero inoxidable de baja aleación. La temperatura y presión máxima de trabajo del tanque es de 170 °C y 0,17 MPa respectivamente **[87]**.

El tanque debe estar equipado con tubos de calefacción por vapor, sensor de temperatura y manómetro. Además, debe contar con un sistema de agitación tipo turbina de 1 725 rpm **[88]** y un sistema de alimentación y salida de la mezcla hidrolizada impulsada por bombas.

El tanque debe ser de forma cilíndrica con fondo cónico, con el fin de facilitar el bombeo de la mezcla hidrolizada. La capacidad del tanque estimado es de 200 m^3 **[89]**, con un tiempo de proceso de 3 días, por lo que se requerirá de 18 tanques.

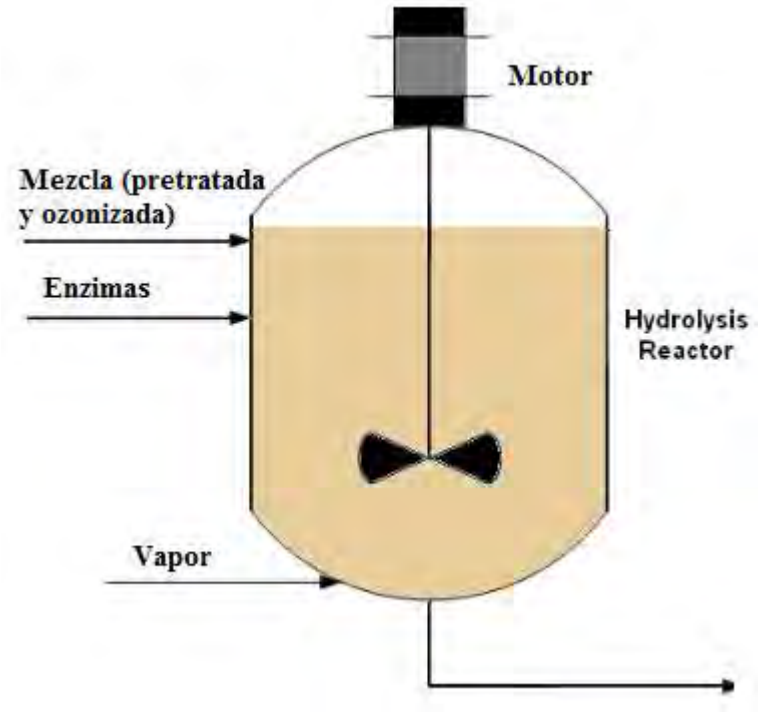

Fig. 5.4 Biorreactor de hidrólisis enzimática [113]

5.1.5 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso que permite convertir azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Este proceso se lleva a cabo en un medio anaeróbico y se representa con la siguiente la ecuación **[16]**:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5\,OH + 2CO_2$$

Los microorganismos responsables de la fermentación son las levaduras, siendo la *Saccharomyces cerevisiae* la levadura más utilizada a nivel industrial **[16]**.

El proceso de fermentación inicia con el cultivo del inóculo el cual se añadirá a la mezcla hidrolizada. La preparación del inóculo debe llevarse a cabo en un laboratorio acondicionado dentro de la planta industrial.

La fermentación puede llevarse a cabo mediante dos tipos de procesos: continuo o discontinuo. La fermentación continua se establece con un sistema abierto, donde el inóculo se añade continuamente al tanque fermentador y una cantidad equivalente de mezcla se extrae simultáneamente del sistema **[90]**. Para el posible proyecto industrial se recomienda la

fermentación discontinua, por ser más eficiente en términos de productividad del fermentador **[91]**.

El diseño del tanque de fermentación debe cumplir las siguientes especificaciones **[90]**:

- Diseñado para que funcione asépticamente, por lo que se recomienda que sea de acero inoxidable.
- Sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- Sistema para el control de la temperatura y pH
- Sistema de control de la espuma.
- Camisa de refrigeración.
- Dispositivo para la toma de muestras.
- El diseño debe facilitar las operaciones de limpieza y mantenimiento.
- Las superficies internas del tanque deben ser lisas.

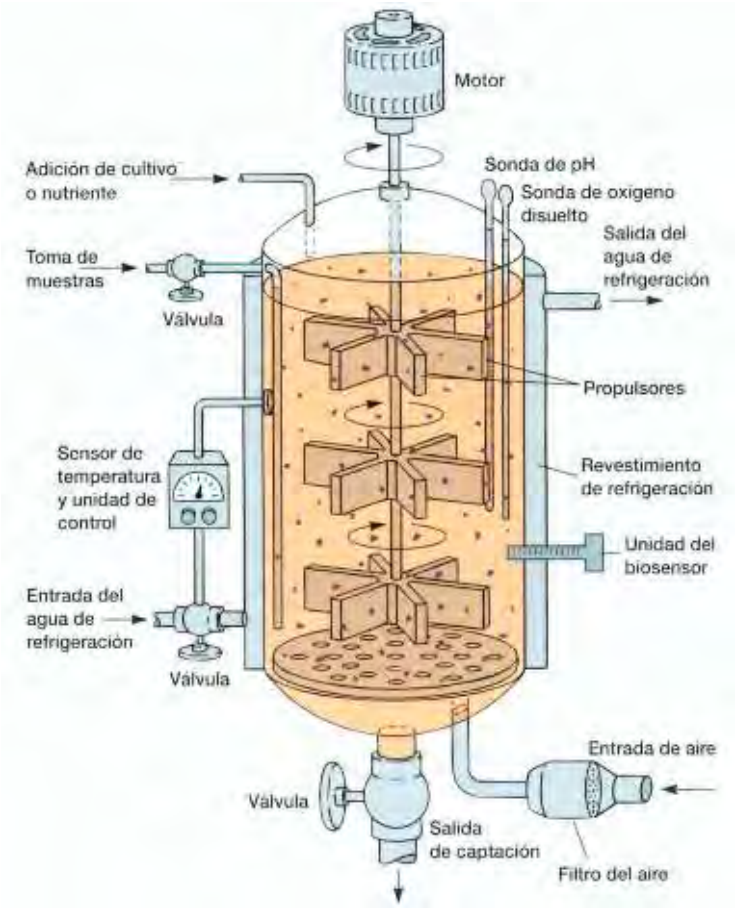

Fig. 5.5 Tanque de fermentación alcohólica [90]

5.1.6 Destilación

La columna de destilación alcohólica consta de una torre cilíndrica vertical metálica compuesta de varios platos colocados uno encima de otro, en los cuales se da el contacto entre la fase líquida y vapor, lo que es una destilación fraccionada.

Para este proceso se recomienda usar dos columnas: de destilación y de rectificación; además, de un condensador vertical y bombas que se utilizan para la alimentación del destilador, la recirculación del destilado y del etanol rectificado y la salida de la vinaza. Todo lo destilado pasa a un tanque de alcohol hidratado.

El líquido fluye en forma descendente por acción de la gravedad. El vapor generado por medio del calentamiento del líquido de fondo, se eleva a través de los orificios de los platos y burbujea en el líquido para formar vapor que pasa al plato superior. Con esto se produce un contacto múltiple entre el vapor y el líquido.

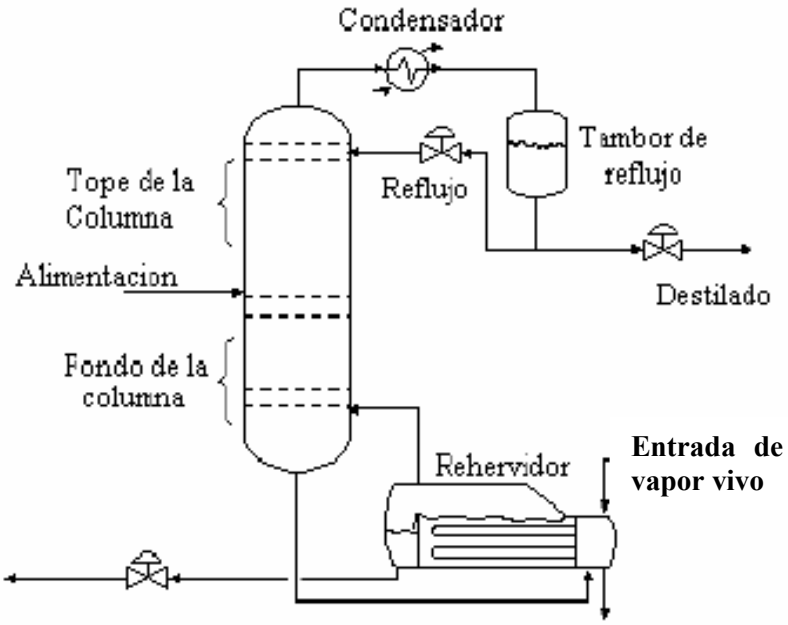

Fig. 5.6 Sistema de destilación [92]

5.1.7 Deshidratación

Para el proceso de deshidratación se recomienda el método de destilación extractiva salina, debido a su bajo costo operativo, bajo impacto medioambiental, no necesita de la importación de materiales patentados y produce la mayor eficiencia energética comparada con las otras operaciones consideradas **[11]**.

Las sales más comunes utilizadas para este fin son: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), yoduro de potasio (KI), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y acetato de potasio ($C_2H_3O_2K$) **[24]**.

El equipo de deshidratación consistirá en una torre de destilación extractiva, una torre de recuperación del solvente, condensadores y decantadores.

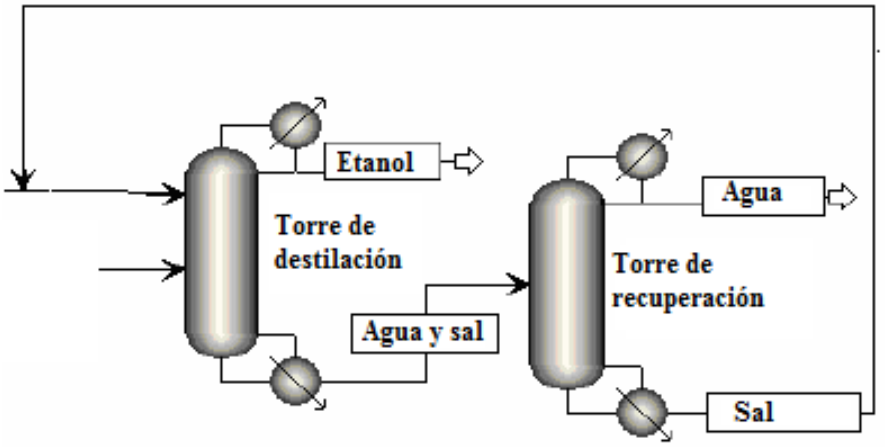

Fig. 5.7 Proceso de destilación extractiva [93]

La torre de destilación extractiva es una torre de acero de 35 bandejas, con una capacidad de hasta 25 t/h y con una temperatura y presión máxima de operación de 320 °C y 0,3 MPa respectivamente **[94]**.

La torre de recuperación es de acero inoxidable AS516 grado 70, capaz de soportar hasta 400 °C y 0,3 MPa de presión **[95]**. En su interior cuenta con un evaporador para la separación del agua y sal.

5.2 Diagrama de proceso continuo

- **Cosecha diaria de banano en Piura - Tumbes**

Actualmente las regiones de Piura y Tumbes emplean 5 229 hectáreas **[96]** y 5 100 hectáreas **[97]** para el cultivo de banano orgánico respectivamente. Según los datos del Ministerio de Agricultura, Perú cuenta con 152 275 hectáreas aptas para este cultivo, de los cuales 33 500 hectáreas pertenecen a estas regiones **[98].**

Por cada hectárea se cultivan 1 200 plantas de banano, de las cuales se cosechan diariamente el 6%, pudiéndose obtener un aproximado de 15 000 t/día de pseudotallo, cantidad máxima que podría utilizarse para la producción de bioetanol en la región **[99]**.

- **Capacidad del proceso**

Los cálculos de la planta industrial se basan en una alimentación diaria de 400 t de pseudotallo húmedo. El diagrama de flujo del proceso se puede ver en la Figura 5.8.

a) Pretratamiento

Para el pretratamiento LHW se utiliza una proporción del 40% de biomasa y 60% de agua, con lo cual se requiere de aproximadamente 600 m^3 de agua diaria, para las 400 t de materia prima.

Según los rendimientos calculados en la parte experimental de la presente tesis, del pretratamiento se obtiene aproximadamente 1 000 t de mezcla.

La capacidad del proceso, considerando un 25% de espacio libre para mantener el agua en estado líquido a elevadas temperaturas, debe ser cubierta por 3 tanques de 50 m^3 cada uno.

b) Deslignificación

Para el proceso de deslignificación por ozonización se requiere de aproximadamente 48 kg/día de ozono, y considerando que el equipo ozonizador escogido suministra 515 g de ozono por hora, se requerirán de 4 equipos.

c) Hidrólisis enzimática

Considerando que el porcentaje de celulosa de la mezcla es del 52,81% y la carga enzimática es del 30% de la celulosa presente, se requiere de 158 t/día de enzimas Cellic CTec 2 para el proceso.

El proceso se llevará a cabo en 18 tanques de 200 m^3 de capacidad cada uno.

d) Fermentación

El porcentaje de levadura debe ser del orden del 1,5% de la mezcla, con lo cual se requerirán 15,9 t/día de *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante la reacción de fermentación se generan aproximadamente 39,4 t/día de CO_2, adicionalmente. Se requiere de 25 tanques de fermentación de 200 m^3 cada uno.

e) Destilación

El porcentaje de vinaza y subproductos es del orden del 83%, y el vapor producido es del orden del 13%, con lo cual queda un 4% de etanol, que asciende a aproximadamente 34 t/día de etanol.

El proceso deberá llevarse a cabo en dos torres destiladoras, de 25 t/h de capacidad cada uno.

f) Deshidratación

Teniendo en cuenta que el etanol rectificado tiene 5% de agua, luego de la deshidratación se obtiene aproximadamente 32 t/día de etanol.

El proceso deberá llevarse a cabo en una columna de destilación extractiva, de 25 t/h de capacidad.

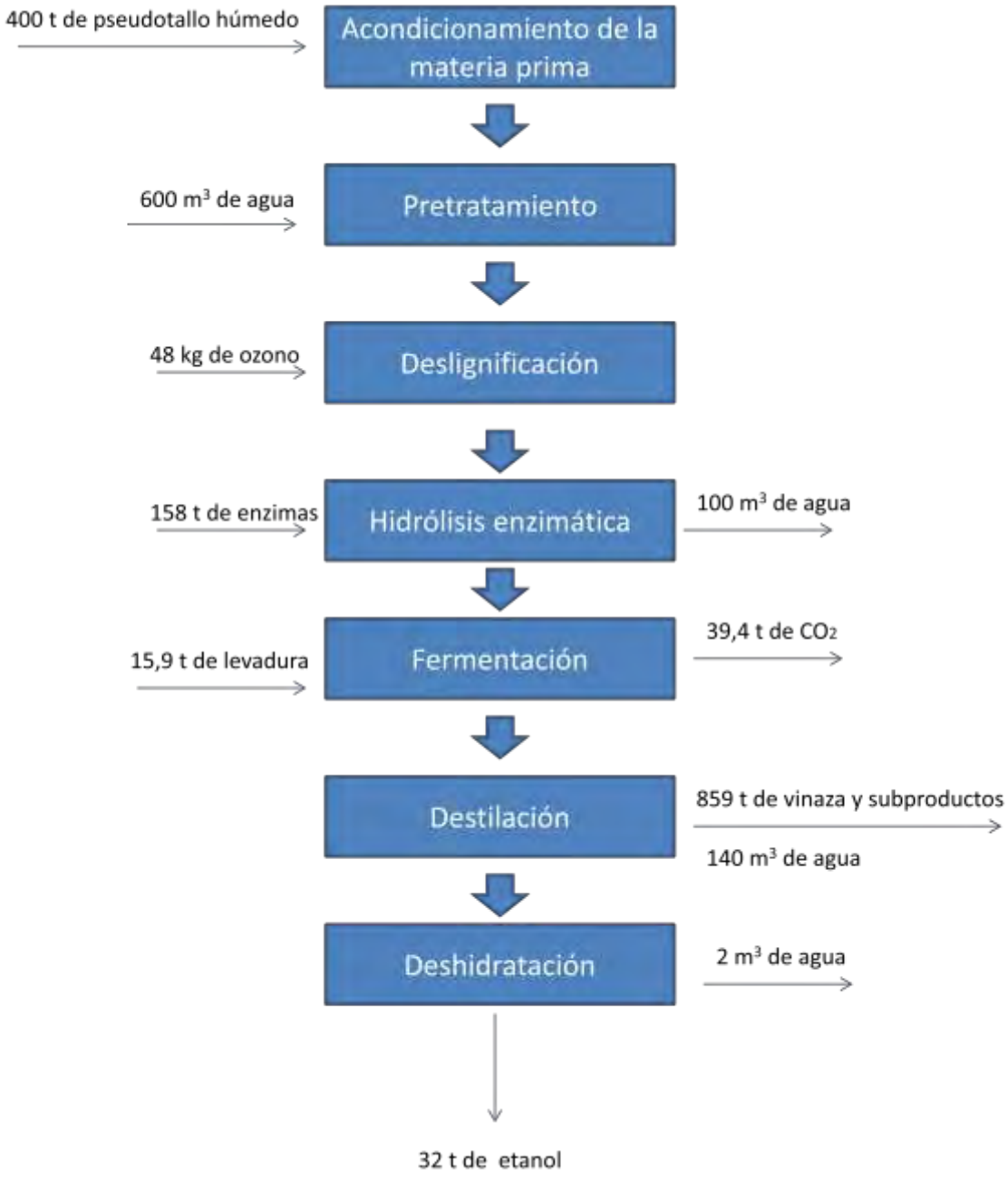

Fig. 5.8 Diagrama de proceso continuo de producción

Conclusiones

El principal objetivo de la tesis (obtención de etanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico) se cumplió; sin embargo, dadas las limitaciones de equipos e instrumentos de análisis, no se pudo realizar más experimentos que corroboren la pureza del destilado obtenido (92% en peso), ni la composición de los productos intermedios del proceso.

Se logró realizar una comparación entre los pretratamientos *Liquid Hot Water* (LHW) y *Steam Explosion* (SE). Ambos lograron una parcial degradación de la hemicelulosa presente en los tres tipos de residuos ensayados (hojas, pseudotallos y raquis), pero en distinto grado; esta degradación fue evaluada en función de la disminución del pH de la muestra, que sería un indicador del ácido acético formado.

En promedio, para los pretratamientos SE y LHW, la mayor degradación de la hemicelulosa se ha observado en el pseudotallo; esto podría deberse a que, según la bibliografía, tiene un menor contenido de hemicelulosa que los otros tipos de residuos evaluados.

En la mitad de los experimentos de SE de hojas, se produjo una baja de pH de 1,5 para ambos estados (húmedo y seco). En el caso del pseudotallo, el 57 % de experimentos en estado húmedo alcanzaron una variación de pH de 1,5 y el 43% restante alcanzó una disminución de 1; mientras que en estado seco la mayor parte de los experimentos alcanzó una reducción de pH de 1. Para los raquis, ninguno de los experimentos presentó una variación apreciable de pH en ninguno de sus estados.

La mayoría de experimentos de LHW de hojas, presentó una reducción de pH de 1,5 y solo uno de ellos presentó una variación de 1. En el caso del pseudotallo, la mayor parte de los experimentos alcanzaron una variación de 1,5, y un 12% presentó una disminución de 2,5. Finalmente, en raquis, la tercera parte de los experimentos presentó una variación de 2,5; otro tercio presentó una variación de 1,5 y el resto no presentó variación alguna.

De lo cual se concluye que el pretratamiento LHW es el más adecuado pues produjo, en la mayoría de los experimentos, una mayor variación de pH que el pretratamiento SE. Se recomienda el uso del pseudotallo, pues es el tipo de biomasa que presentó menor pH final en la mayoría de los experimentos (4,5).

Los resultados obtenidos en la presente tesis coinciden con los resultados de investigaciones realizadas por la Universidad de California-Davis, en el marco de un proyecto en el que

participa también la Universidad de Piura, donde se concluyó que el mejor tipo de biomasa era el pseudotallo. Además, los resultados de la presente tesis son acordes con otras fuentes de información que mencionan que el pretratamiento LHW es más eficiente que SE.

El proceso ensayado comprendió las siguientes etapas: pretratamientos hidrotérmicos, deslignificación por ozonización, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación. No se realizó el proceso de deshidratación del destilado.

El rendimiento etílico (2 340 L/ha) es relativamente alto en comparación con el de otros estudios de etanol de segunda generación; sin embargo, aún se deben realizar más experimentos y a mayor escala con el proceso propuesto en esta tesis, con el fin de confirmar el resultado obtenido.

El proceso de deslignificación mediante el método de ozonización no causó una disminución del pH como se esperaba, por lo que se concluye que no se produjo la degradación de la lignina presente en la muestra. En cambio, el proceso de hidrólisis enzimática sí tuvo un efecto favorable, con las condiciones de tiempo y temperatura establecidas, alcanzándose un rendimiento del 29% respecto al contenido de celulosa teórica inicial, obteniéndose 15,5 g/L de glucosa (estimada mediante la medición del grado Brix). El proceso produjo una mayor cantidad de glucosa respecto a otros materiales lignocelulósicos citados en la bibliografía, como la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar (10,53 g/L). Estos buenos resultados se atribuyen a la eficiencia de las enzimas utilizadas (Cellic CTec 2), de tercera generación.

En el proceso de fermentación se obtuvo 0,247 g de etanol/g de glucosa; este bajo rendimiento podría deberse al empleo de levadura liofilizada comercial, debiendo utilizarse levadura aislada y adaptada al sustrato; otra causa podría haber sido la variación de pH durante la fermentación. El poco volumen del destilado obtenido ocasiona un mayor grado de error en la medida de su grado alcohólico; sin embargo, el rendimiento obtenido para el proceso de destilación fue de aproximadamente el 66% respecto al teórico.

A continuación se enumeran unas conclusiones específicas de cada etapa del proceso.

Liquid Hot Water

Los mejores resultados del pretratamiento LHW se obtuvieron cuando el volumen de agua agregada fue ligeramente mayor al volumen de la biomasa. El uso de cantidades mayores de agua no produce una mayor degradación.

Se corroboró que el LHW es un proceso extensivo; es decir, a mayor cantidad de hemicelulosa presente en la biomasa mayor es el tiempo de proceso requerido para degradar la mayor cantidad de hemicelulosa posible.

Para este tipo de pretratamiento, el tiempo previo de remojo de la biomasa seca no influye en un incremento de eficacia, por lo que se concluye que podría obviarse. Además, este pretratamiento requiere de mayores cantidades de agua y energía que el pretratamiento SE.

Steam Explosion

De los tres tipos de biomasa evaluados con este método, los raquis no mostraron una escasa degradación de la hemicelulosa con este pretratamiento, a pesar de haber variado los tiempos, cantidades de biomasa y agua.

El pretratamiento SE no es un tratamiento extensivo, es decir, un mayor contenido de hemicelulosa no implica un mayor tiempo de proceso. Este pretratamiento es difícil de controlar y es preferible que los residuos a tratar presenten un alto contenido de agua interna, por lo cual se recomienda biomasa húmeda, para que la despresurización tenga los resultados esperados.

Deslignificación por ozonización
En caso de no haberse producido la deslignificación, la causa puede ser la siguiente:

- No se suministró la cantidad necesaria de ozono a la muestra.

Hidrólisis enzimática
Con temperaturas entre 45 °C y 50 °C y con valores de pH entre 5,0 y 5,5, se consiguieron resultados positivos para la hidrólisis enzimática; alcanzándose la estabilización del grado Brix de la muestra, luego de 73 horas de iniciado el proceso.

Para una mejor acción de las enzimas Cellic CTec 2 se recomienda emplear solución tampón con el fin de mantener el pH dentro del rango 5,0 - 5,5 y un agitador para homogeneizar la mezcla durante todo el tiempo que dure la hidrólisis.

Finalmente, diremos que debería continuarse con el estudio, realizando experimentos repetitivos de todo el proceso, para validar el resultado obtenido y dar mayor sustento a la idea de implementar un proyecto a nivel industrial. Además, se sugiere determinar cuantitativamente los compuestos intermedios producidos en cada etapa, así como también, estudiar con mayor detalle las condiciones para realizar la hidrólisis enzimática (temperatura, pH y cantidad de enzimas) y el pretratamiento LHW (tiempo total).

Referencias

[1] Tomás Pejo, E. (2010). Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas de proceso. Recuperado el 12 de Enero de 2012, de Universidad Complutense de Madrid: http://eprints.ucm.es/10802/1/T31774.pdf.

[2] Barba Pacheco, C. Síntesis de carboximetilcelulosa a partir de pastas de plantas anuales. Proyecto de titulación. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona.

[3] Oliva Domínguez, J. (2003). Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de Chopo sobre Kluyverocymes marxianus. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

[4] Barroso Casillas, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Proyecto de titulación. Universidad de Madrid. Madrid.

[5] Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Tesis magistral. Universidad de Sevilla. Sevilla.

[6] Digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos en monogástricos y rumiantes. (n.d). Recuperado el 22 de Enero de 2013, de Universidad de Córdoba: http://www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=153

[7] Pezoa Conte, R. (2010). Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Santiago de Chile. Tesis magistral. Universidad de Chile. Santiago de Chile.

[8] Montoya, M., Quintero, J., Sánchez, O., & Cardona, C. (2005). Producción de etanol carburante: material lignocelulósico una nueva alternativa. Ingeniería de los recursos naturales y del ambiente. 2(1), 47-55.

[9] Perfil del mercado y competitividad exportadora del etanol. (02 de Junio de 2005). Consultado el 11 de Noviembre de 2012, del Ministerio de Comercio Exterior y Turismo: http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Etanol.pdf

[10] Melo Espinoza, EA., Sánchez Borroto, Y., Ferrer Frontela, N., & Ferrer Frontela, N. (Abril de 2012). Evaluación de un motor de encendido por chispa trabajando con mezclas etanol-gasolina. Ingeniería Energética. 33(2), 94-102.

[11] Cerpa, M. (2005). Producción de etanol anhidro como aditivo para la gasolina a partir de la caña de azúcar de la región del Río Huallaga. Trabajo de investigación. Universidad de Valladolid. Valladolid.

[12] Ruiz Canseco, J. (nd). Contaminación ambiental por el Bioetanol-Impacto ambiental del bioetanol a partir de la caña de azúcar. Recuperado el 08 de Marzo 2012, de Scribd: http://es.scribd.com/doc/49827868/trabajo-fundamentos

[13] Chamy, R. (1995). Determination of inhibitory effects in fermentation processes by microcalorimetric techniques. Biotechnology Techniques. 9(4), 231-236.

[14] Classen, PA., López Contreras, AM., Sijtsma, L., & Weusthuis, RA (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology Biotechnology. 52, 741-755.

[15] Sánchez, OJ., & Ariel Cardona, C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. Caracas: INCI. 30(11), 671-678

[16] Vázquez, HJ., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, Investigación y Tecnología. 8(4), 249-259.

[17] Ewanick, S., & Bura, R. (2010). Hidrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass. Woodhead Publications Ltd, Cambridge, UK.

[18] Guerra Millán, FJ., Mallén Wiechers, C., Struck Garza, A., Varela Vega, T., & Zitlalpopoca Soriano, Á. (2008). Destilación simple. Universidad Iberoamericana, México D.F.

[19] Figueroa Rodríguez, JL (21 de Mayo de 2008). Método de diseño de columnas complejas térmicamente acopladas (Sistemas Petlyuk). (Tesis de grado, Universidad de las Américas Puebla). Recuperado el 06 de Abril de 2013, de: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/figueroa_r_jl/capitulo4.pdf

[20] Rectificación discontinua. (2006). Recuperado el 08 de Abril de 2013, de la Universidad Autónoma de Madrid, Área de Ingeniería Química: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mgilarra/experimentacionIQII/Rectificacion discontinua2006.pdf

[21] Perry, RH., Green, DW., & Maloney, JO (1997). Perry´s Chemical Engineers Handbook. 7. Oklahoma: McGraw-Hill Professional Publishing. ISBN: 0070498415

[22] Salado, M., Romero, E. (2007). Diseño de una planta piloto para la obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de girasol. Proyecto de titulación. Universidad de Cádiz. Puerto Real.

[23] Uyazán, AM., Gil, ID., Aguilar, JL., Rodríguez, G., & Caicedo, LA (2004, diciembre). Deshidratación de etanol. Ingeniería e Investigación. 24 (3), 49-59.

[24] López Jiménez, J. & Lozada Salgado, H. (2 de Marzo de 2005). Obtención de etanol anhidro a partir de un proceso de destilación con adición de electrolitos. Proyecto de titulación: Universidad Nacional de Colombia. Caldas.

[25] Toma Pejo, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. (2011). Pretreatment technologies for lignocellulose to bioethanol. En British Library (Eds), Biocombustibles: materias primas alternativas y proceso de conversión. (pp 149-170). San Diego: Elsevier.

[26] Takara, D., Shrestha, P., and Khanal, S. (2010). Lignocellulosic Biomass Pretreatment. Bioenergy and Biofuel from Biowastes and Biomass: pp. 172-200.

[27] Carvalheiro, F., Duarte, LC, Grio, FM (2008). Biorefinerías hemicelulosa: una revisión sobre pretratamientos de biomasa. J. Sci. Ind. Res. 67, 849-864.

[28] Laureano Pérez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, BE (2005). Comprender los factores que limitan la hidrólisis enzimática de la biomasa. Applied Biochemistry Biotechnology. 121, 1081-1099.

[29] Chundawat, SPS, Venkatesh, B., Dale, BE (2007). Efecto de la separación de partículas de tamaño, basado en el rastrojo de maíz molido en pretratamiento AFEX y la digestibilidad enzimática. Biotechnology Bioengineering. 96, 219-231.

[30] Keller, FA., Hamilton, J., Nguyen, QA (2003). Pretratamiento de la biomasa microbiana. Applied Biotechnology Bioengineering. 105, 27-41.

[31] Tucker, M., Kim, K., Newman, M., & Nguyen, Q. (2003). Effects of temperature and moisture on dilute-acid Steam Explosion pretreatment of corn stover and cellulose enzyme digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology. pp. 105-108, 165-177.

[32] Cara, C., Romero, I., Oliva, J., Sáez, F., & Castro, E. (2007). Liquid Hot Water pretreatment of olive tree pruning residues. Applied Biochemistry and Biotechnology. 136-140 (1-12), 379-394. doi: 10.1007/s12010-007-9066-y.

[33] Núñez, C. (01 de Abril de 2008). Transformación de la madera durante el pulpado químico. Recuperado el 24 de Octubre de 2012: http://www.cenunez.com.ar/archivos/65TransformacionesdelamaderaduranteelP.Q.pdf

[34] Shatalov, A., Pereira, H., Arundo, L. (2008). New perspectives for pulping and bleaching ozone based TCF bleaching of organosolv pulps. Bioresource Technology. 99(3), 472-478.

[35] Zambrano, D., Pereira, M., Kurt, A. (2009). Oxidación selectiva de lignina con ozono en medio acético. Proyecto de investigación. Universidad de Concepción. Concepción.

[36] Melo, R., & Acevedo, S. (2011). Efecto de la carga de ozono en la degradación de la lignina residual en pulpas Kraft. Laboratorio de productos forestales de la Universidad de Concepción. Concepción.

[37] Lázaro Belanche, L., & Arauzo Peréz, J. (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales-hidrólisis enzimática. Zubía. 12, 227-240.

[38] Cellic CTec 2 and HTec 2, Enzymes for hidrolysis of lignocellulosic materials. (11 de Agosto de 2010). Recuperado el 10 de Diciembre de 2012, de Novozymes, Biotechnology Company: http://www.scienceplease.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf

[39] Bohorquéz Gutiérrez, LM, & Losada Rivera, LL (2004). Estudio de la actividad enzimática celulolítica en la etapa termófila de una fermentación en estado sólido, realizada a partir de residuos generados en el procesamiento industrial de papa R-12. Universidad de la Sabana.

[40] Lima Aguiar, C., & Menezez, T. (2000). Producao de celulases e xilanase por Aspergillus niger IZ-9 usando fermentacao submersa sobre bagaco de cana-de-acucar. Boletín del Centro de Pesquisa e Procesamiento de Alimentos. 18(1), 57-70.

[41] Da Silva, R., Silva Lago, E., Merheb, CW., Macchione, MM., Park, YK, & Gómes, E. (2005). Producción de xilanasa y CMCasa en fermentación en estado sólido en diferentes residuos de Thermoascus aurantiacus Miehe. Brazilian Journal of Microbiology. 36 (3), 235-241. Consultado el 12 de Febrero de 2013, de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000300006&lng=en&tlng=en. 10.1590/S1517-83822005000300006

[42] Virendra, B., & Tarun, G. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology. 3(2), 90-104.

[43] ¿Qué son las enzimas?. (2010). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Novozymes Biotechnolgy Company: http://www.novozymes.com/en/about-us/our-business/what-are-enzymes/Pages/default.aspx

[44] Ponce Noyola, T., & Pérez Ávalos, O. (2002). Celulosas y xilanasas en la industria. Avance y perspectiva. 21, 273-277.

[45] Novozymes lanzó las primeras enzimas para la producción de etanol celulósico. (12 de Noviembre de 2010). Consultado el 12 de Febrero de 2012, de Fiagro: http://www.fiagro.org/index.php?option=com_content&view=article&Itemid=1&id=1826&Itemid=1&PaginaActual=17

[46] Proyecto Caña Brava. (28 de Octubre de 2011). Consultado el 25 de Agosto de 2012, del Ministerio de Energía y Minas: http://intranet2.minem.gob.pe/web/archivos/ogp/GVEP/cober/6.pdf

[47] Al Jaber, A., Z. Amin, A., Clini, C., Dixon, R., Eckhart, M., El. Ashry, M., y otros. (2012). Renewable 2012 Global Status Report. Paris: REN21.

[48] Newell, R. (23 de Octubre de 2012). Biofuels Issues and Trends. Consultado el 02 de Abril de 2013, de U.S. Energy Information Administration: http://www.eia.gov/biofuels/issuestrends/pdf/bit.pdf

[49] International Sugar Organization. (19 de Octubre de 2012). World fuel ethanol outlook to 2020. Recuperado el 02 de Abril de 2013, de: http://ebookbrowse.com/mecas-12-19-world-fuel-ethanol-outlook-to-2020-english-pdf-d427032280

[50] Ryan, S., & Junyang, J. (2011). Biofuels Annual Report-2011. Recuperado de China: USDA foreign agricultural service: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_7-9-2012.pdf

[51] Organismo supervisor de la inversión en energía y minería. (06 de Octubre de 2011). Regulación de biocombustibles. Consultado el 03 de Abril de 2013 de:_http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.osinerg.gob.pe%2Fnewweb%2Fuploads%2FPublico%2FSeminario%2520ARIAE%2FSesion%2520VI%2520-%2520Regulacion%2520de%2520Biocombustibles%2FPresentacion%2520ARIAE%2520USO%2520DE%2520BIOCOMB%252006OCT2011.ppt&ei=LXzfUZPSF7Kp4APQrYGgBg&usg=AFQjCNEjzT56jAesLZcNX8vw7P1Zcd7Dyw&sig2=_0pk1iEBVlBveMpoALDgQQ

[52] Quevedo, RA (13 de Mayo de 2010). Consultado el 11 de Noviembre de 2012, del Ministerio de Agricultura: http://www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/especiales/bioenergia/otros/technoserve-oportunidades-etanol-en-peru.pdf

[53] Zurita, M. (2010). Exportaciones de etanol crecen más del 50%. Recuperado el 02 de Abril del 2013, de Agraria Noticias: http://www.agraria.pe/noticias/las-exportaciones-de-etanol-crecen-mas-del-50#gsc.tab=0

[54] Exportación de alcohol etílico. (18 de Enero de 2011). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Agrodataperu: http://www.agrodataperu.com/2011/01/exportacion-alcohol-etilico-dic2010.html

[55] Exportaciones alcohol etílico - etanol Perú Diciembre 2011. (31 de Diciembre 2011). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Agrodataperu: http://www.agrodataperu.com/2011/12/exportacion-alcohol-etilico-etanol-peru-diciembre-2011.html

[56] Alcohol etílico-Etanol Perú Exportación de Diciembre. (22 de Enero de 2013). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Agrodataperu: http://www.agrodataperu.com/2013/01/alcohol-etilico-etanol-peru-exportacion-diciembre-2012.html

[57] Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería. (31 de Enero de 2012). Uso del Gasohol en el Perú, Comercialización y Beneficios en el Medio Ambiente. Consultado el 31 de Diciembre de 2012, de: http://es.scribd.com/doc/91639514/Uso-Del-Gasohol-en-El-Peru

[58] Quiénes somos (2010). Recuperado el 02 de Enero de 2013, de Caña Brava: http://www.canabrava.com.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=44&Itemid=59

[59] Proyecto de etanol (07 de Mayo de 2012). Recuperado el 26 de Junio de 2013, de Maple Energy: http://www.maple-energy.com/etanol.htm

[60] Nosotros. (23 de Febrero 2013). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Coazúcar: http://www.coazucar.com/esp/coazucar_nosotros.html

[61] Alcohol etílico-Etanol Perú exportación de Febrero. (16 de Marzo de 2013). Recuperado el 02 de Abril de 2013, de Agrodataperu: http://www.agrodataperu.com/2013/03/alcohol-etilico-etanol-peru-exportacion-febrero-2013.html

[62] Norma Técnica Peruana NTP 321.126. (14 de Abril de 2011). Consultado el 18 de Febrero de 2013, de Institución Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual: http://bvirtual.indecopi.gob.pe/normas/321.126.pdf

[63] European fuel alcohol specificatios. (19 de febrero de 2013). Recuperado el 11 de Abril de 2013, de ITEC Refining and Marketing Company Ltd.: http://www.itecreft.com/pdf/EN_15376_EUROPEAN_FUEL_ALCOHOL_SPECIFICATIONS_%28ITEC%29.pdf

[64] OECD-FAO, Agricultural Outlook 2012. (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations. doi: 10.1787/agr_outlook-2012-en

[65] Informe Sectorial 2010. (2010). Recuperado 15 de Marzo de 2013, de Infinita Renovables: http://www.infinitarenovables.es/noticia.php?id=67

[66] CEPAL, FAO. (2008). Perspectivas para un mercado mundial de biocombustibles. Bioetanol de Caña de Azúcar. Energía para el desarrollo sostenible. Capítulo 8. BNDES y CGEE (coordinadores). 1ª edición. Rio de Janeiro.

[67] Duffey, A. Estudio regional sobre economía de los biocombustibles 2010: temas clave para los países de América Latina y el Caribe. En: Seminario Latinoamericano y del Caribe de biocombustibles (5°, 2010). Santiago, CEPAL.

[68] Estudio Técnico y de Mercado del Plátano en El Salvador. (2002). Recuperado de Comité de Innovación Tecnológica del Departamento de San Vicente: http://www.sanvicenteproductivo.org/est/Estudio%20Platano.pdf

[69] Garrido, SA (Setiembre de 2012). Visita a plantaciones de banano orgánico de Querecotillo, Sullana, Piura. (R. Lizama, Entrevistador).

[70] Santa María, M., Ruíz, A., Cruz, A., Jeoh, T. (2013). Assessing the feasibility of biofuel production from lignocellulosic banana waste in rural agricultural communities in Peru and Colombia. Bioenergy Research. doi: 10.1007/s12155-013-9333-4

[71] Perú añade en la última década al banano orgánico a su agricultura de exportación, situación actual del Perú en banano orgánico y su aporte en los agroexportadores. (27 de Abril de 2011). Consultado el 04 de Abril de 2013, de Instituto Nacional de Innovación Agraria: http://www.inia.gob.pe/congresomusalac/pdf/articulomusalac.pdf

[72] Banano orgánico. (22 de Marzo de 2005). Consultado el 04 de Abril de 2013, del Ministerio de Comercio Exterior y Turismo: http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Banano_Organico.pdf

[73] Mancha roja amenaza el banano orgánico. (17 de Octubre de 2012). Diario El Tiempo.

[74] McMillan, J., & Dowe, N. (2001). SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hidrolysis and Fermentation. National Renewable Energy Laboratory, Colorado, USA.

[75] Universidad Estatal de Oregon. (02 de Febrero de 2010). Steam Explosion pretreatment for cellulosic etanol at Oregon State University [Archivo de video]. Video publicado en: http://www.youtube.com/watch?v=jpMAiyWoEFo

[76] Características de Poseidon Series. (2012). Recuperado el 8 de Abril de 2013, de Ozotech Inc.: http://www.ozotech.com/index.php/residential/poseidon

[77] Lide, DR (1986). Handbook of Chemistry and Physics. 67. CRC PRESS.

[78] Siri Prieto, G. (2009). Cultivos alternativos para la producción de alcohol etanol a partir de biomasa vegetal. Trabajo de investigación: Universidad de la República Uruguay. Montevideo.

[79] Schmer, MR., Vogel, KP., Mitchell, RB., Perrin, RK. (2008). Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. PNAS. 105(2), 464-469. doi: 10.1073/pnas.07047 67105

[80] Fernández, J. (2008). Cultivos alternativos para la producción de bioetanol. Recuperado el 27 de Enero de 2013, de Universidad Politécnica de Madrid: http://www.foroagrario.com/GEN/20080205/CuAlProBi.pdf

[81] Fives fletcher–vertical shredder. (2009). Recuperado el 01 de Mayo de 2013, de Fives Group: http://www.fivesgroup.com/Fivescail/en/Expertise/Equipment/CanePreparation/Pages/FivesFletcherVerticalShredder.aspx

[82] Hydrothermal chemical reactor. (30 de Abril de 2012). Recuperado el 22 de Abril de 2013, de Col-Int Tech: http://www.col-int.com/hydrothermal-reactor-cithtc350v200a-p-1024.html

[83] Egusquiza, D. (05 de Julio de 2012). Capítulo II: Fermentaciones microbianas. Recuperado el 06 de Abril de 2013, de Universidad Nacional del Callao: http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2002.pdf

[84] TG-450 High output ozone generator. (Diciembre de 2012). Recuperado el 02 de Mayo de 2013 de: http://www.ozonesolutions.com/files/old-manuals/TG_450_Manual.pdf

[85] Herreros, J. (29 de Mayo de 2009). Apuntes del curso Fundamentos físicos de ingeniería: Efecto corona. Recuperado el 02 de Junio de 2013, del Departamento de física de la Universidad Carlos III: http://bacterio.uc3m.es/docencia/profesores/herreros/itts/ficheros/Corona.pdf

[86] Jiangsu Shajiabang Chemical Equipment Co. (08 de Marzo de 2012). Chemical Reactor. Recuperado el 23 de Abril de 2013 de: http://sell.lulusoso.com/selling-leads/534958/Chemical-Reactor.html

[87] Industrial Tank. (2010). Chemical reactor. Recuperado el 12 de Junio de 2013, de Special Project International Inc: http://www.specialprojects.com/equipment/4491/

[88] Taherzadeh J, KK. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. Recuperado el 13 de Enero de 2013, de Universidad Estatal de Carolina del Norte: http://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_02/BioRes_02_4_707_738_Taherzadeh_K_EnzymeBased_Ethanol_Review.pdf.

[89] Zibo Pioneer Import & Export. (08 de Marzo de 2012). Chemical Reactor. Recuperado el 23 de Abril de 2013 de: http://sell.lulusoso.com/selling-leads/534954/50L-50000L-chemical-reactor.html

[90] González, DP (06 de Febrero de 2008). Tipos de fermentación. Recuperado el 02 de Mayo de 2013, de Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca: http://darwin.usal.es/profesores/pfmg/sefin/MI/tema12MI.html

[91] Etapas y equipos del proceso de obtención de alcohol (22 de Junio de 2007). Recuperado el 02 de Mayo de 2013, de Red Interinstitucional de Tecnologías Limpias RITL: http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/313101/313101_ee.htm

[92] Linchtschein, F. (17 de Noviembre de 2011). Equipos básicos y operación. Recuperado de: http://lichtschein.com.ar/destilsp/distileqp.htm

[93] Gómez P, GI (2009). Simulation of the tetrahydrofuran dehydration process by extractive distillation. Latin American Applied Research. 39, 275-284.

[94] Distillation Columns. (13 de Diciembre de 2012). Recuperado el 23 de Abril de 2013 de: http://www.odfjell.com/TollDistillation/Pages/OurDistillationColumns.aspx

[95] Regeneration tower. (n.d.). Recuperado el 25 de Abril de 2013, de Guning Invesment Recovery Services Inc: http://www.gunningservices.com/data-sheet/stripper-regeneration-tower

[96] A nivel nacional, Piura lidera las plantaciones de banano orgánico. (18 de Marzo de 2013). Recuperado el 03 de Junio de 2013, de: http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=71317

[97] Banco Central de Reserva del Perú. (14 de Noviembre de 2012). Caracterización del departamento de Tumbes. Consultado el 03 de Junio de 2013, de: http://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Piura/Tumbes-Caracterizacion.pdf

[98] Resumen ejecutivo. (11 de Mayo de 2006). Consultado el 25 de Agosto de 2012, del Instituto Nacional de Innovación Agraria: http://www.inia.gob.pe/platano/resumen.htm

[99] APOQ. (Setiembre de 2012). Visita a la Asociación de Pequeños Agricultores de Banano orgánico de Querecotillo. (R. Lizama, Entrevistador)

[100] Carlos J. Renedo. (n.d.). Propiedades del agua saturada. Recuperado el 22 de Enero de 2013 de: http://personales.unican.es/renedoc/Transparencias%20WEV/Tranp%20Termo%20y%20MF//02%20Termo/Tablas%20Termo.pdf

Anexo A

Brochure de aplicación de las enzimas Cellic CTec 2 [38]

Conversion of lignocellulosic biomass to ethanol involves the liberation of sugars from biomass feedstocks. These materials are composed of three major fractions: cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose and hemicellulose contain sugars in polymeric form that can be converted by enzymes to fermentable monomers for subsequent fermentation.

The lignin component, however, protects the cellulose and hemicellulose against microbial and enzymatic attack. Hence, the use of lignocellulose as a raw material requires a physical or chemical pretreatment in order to render the cellulose and hemicellulose fractions accessible for enzymatic hydrolysis. This pretreatment step is a fine balancing act aimed at opening the fibers to increase water access and enzymes accessibility while minimizing sugar loss and inhibitor generation to ensure high yields and substrate suitable for enzymatic hydrolysis and fermentation.

Cellic CTec 2 and HTec 2 are state of the art enzymes the have proven effective on a wide variety of pretreated lignocellulosic materials for the conversion of the carbohydrates in these materials to simple sugars prior to fermentation.

Products

In general, Cellic CTec 2 and HTec 2 can be described in the following way:

Table A-1-Decsription of Cellic CTec 2 and HTec 2 and their features

Product	**Cellic® CTec 2**	**Cellic HTec 2**
Tech specifications/description	Cellulase complex for degradation of cellulose to fermentable sugars. A blend of: -Aggressive cellulases. -High level of β-glucosidases. -Hemicellulase	-Endoxylanase with specificity toward soluble hemicellulose -Cellulase background

Features	-High conversion yield -Effective at high solids concentrations -Inhibitor tolerant -Compatible with multiple feedstocks and pretreatments -High concentration and stability	-Can improve cellulose hydrolysis when combined with CTec 2 -Helps in case of mild acid or alkaline pretreatment -Converts hemicellulose to fermentable sugars
Benefits	-Up to 50% lower enzyme dosage -Lower operating and capital costs from optimization of process, e.g., higher total solids loading and higher ethanol titer -Enabling low ethanol cost -Increase process flexibility	-20% lower enzyme usage cost -Enables higher ethanol yields -Provides increased flexibility for pretreatment technology

Application

CTec 2 and Htec 2 in application

Novozymes has partnered broadly with different cellulosic ethanol production companies that have worked with the cellulose product family to optimize the cellulosic ethanol production process. We have gathered application information using CTec 2 and HTec 2 in various process setups using different feedstocks and pretreatments. It is recommended to close Cellic CTec 2 based on the level of cellulose contained in the substrate to allow direct comparisons of enzymes effectiveness on various biomass materials, including those from different feedstocks and pretreatment combinations.

Dosing guidelines

The suggested enzymes trial dosage levels for initial investigation of a substrate are 1,5%, 3,0%, 6,0%, and 30,0% w/w (g enzymes/g cellulose). These data points should be used to generate dose response curve (enzymes dosage vs. percentage cellulosic conversion). The low dosage provides a target for commercially feasible cellulose hydrolysis, while the high dosage provides an indication of maximum enzymatically accessible cellulose content. Additional testing is recommended to refine the dose response curve and determine the effect of time, solids loading, cellulose conversion, and enzymes dosage.

If the pretreated feedstock of interest contains an appreciable amount of hemicellulose, it is advised to combine Cellic CTec 2 and HTec 2 to boost the celluloses; it is advised to combine

Cellic CTec 2 and HTec 2 to boost the cellulose hydrolysis. In some cases, other Novozymes hemicellulases may also be relevant. The enzyme dosage recommendation for Cellic CTec 2 is 0,05-0,50% w/w (g enzymes/g cellulose), but the dosage required is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly. HTec 2 is dosed based upon the amount of cellulose-boosting enzymes; additionally, dosing in this way simplifies the experimental plan.

Using CTec 2 and HTec 2 in combination

When pretreatment result in feedstocks that would benefit from additional hemicellulose degradation, one should test whether there is synergy between CTec 2 and HTec 2. It is recommended to perform a dose response test and dose response-replacement test where the total dosage of the CTec 2 and HTec 2 equals then dosage in the CTec 2-only dose response test. An example of an initial study design is shown in table 2.

Table A-2-Example of an experimental design to test for synergy between Cellic CTec 2 and HTec 2 with 10% HTec2 replacement

Treatment	Enzyme dosage % w/w (g enzyme/g cellulose)	
	CTec 2	HTec 2
Cellulase-low	1,50%	0,00%
Cellulase-mid	3,00%	0,00%
Cellulase-high	6,00%	0,00%
Replacement-low	1,35%	0,15%
Replacement-mid	2,70%	0,30%
Replacement-high	5,40%	0,60%

The optimal temperature and pH

The optimal temperature and pH for Cellic CTec 2 are 45 – 50 °C and pH 5,5, as shown in Figures 1 and 2 respectively. The activity profiles were produced using a dilute acid-pretreated corn Stover at 5% total solids loading. The temperature was kept constant at 50 °C for the pH profile, and the pH was kept at 5,0 for the temperature profile throughout the 72-hour hydrolysis.

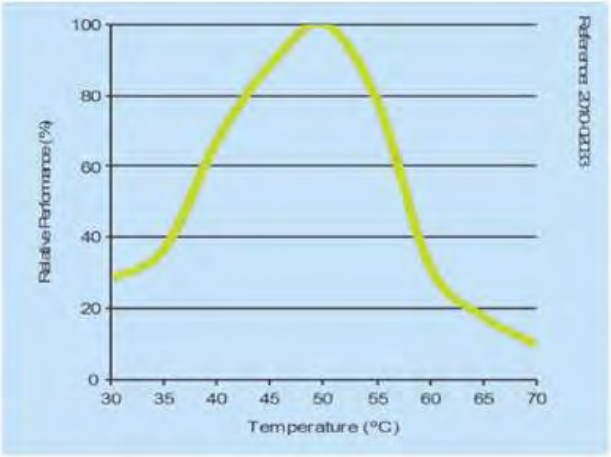

Figure A-1 Temperature curve

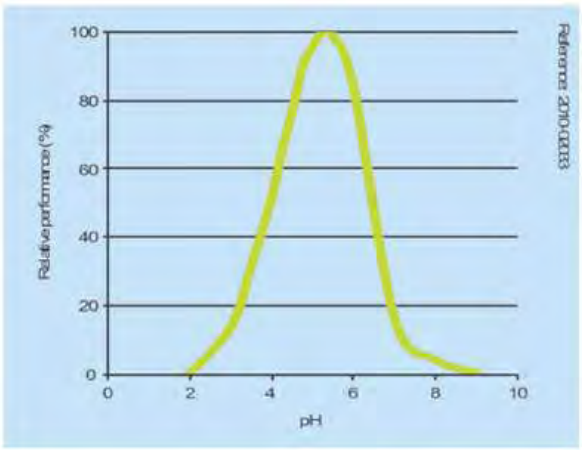

Figure A-2 pH curve

The optimal temperature and pH for Cellic HTec 2 are 45-50 °C and pH5,0.

Figures 3 and 4 illustrate the activity of Cellic HTec 2 at different temperatures and pH values using azo-wheat arbinoxylan as substrate.

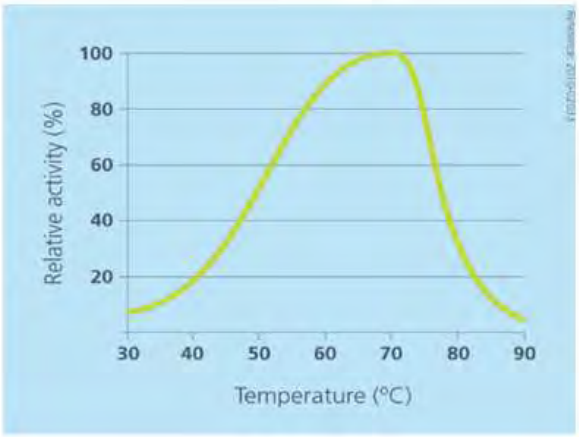

Figure A-3 Effect of the temperature on the activity of Cellic HTec 2

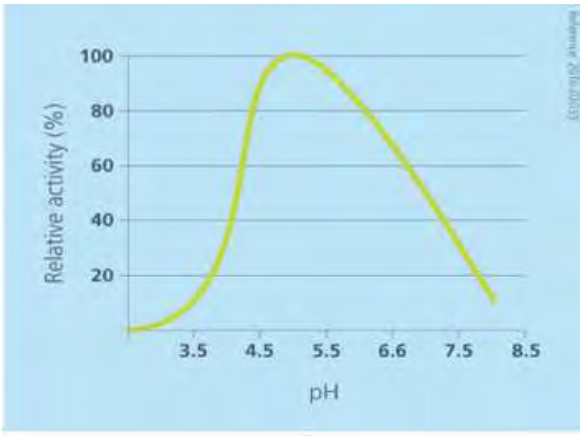

Figure A-4 Effect of pH on the activity of Cellic CTec 2

Figure 5 shows the enzymes dose response of Cellic CTec 2 at 50 °C and pH 5,0 for an unwashed sample of dilute acid-pretreated corn Stover at 15% total solids loading.

The enzymes are also effective on other feedstocks such as sugarcane bagasse, corn cob, corn fiber, and wood pulp. The dose response will depend on feedstocks, pretreatment, and process conditions.

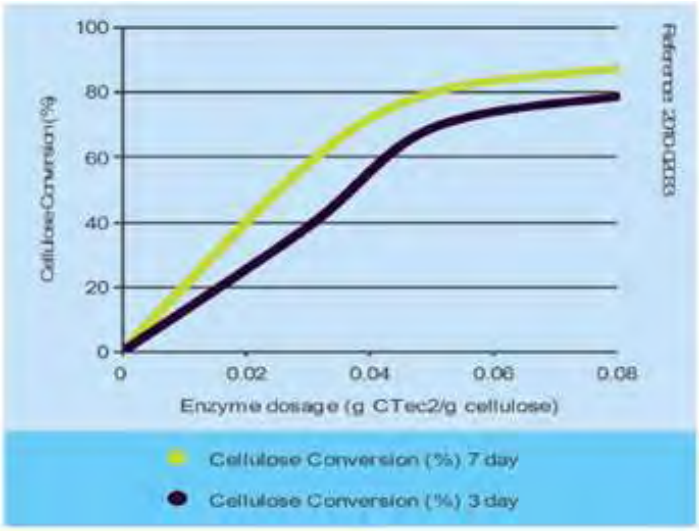

Figure A-5 Enzyme dosage

Storage in application

The recommended storage conditions are 0-25 °C (32-77 °F) in sealed packaging, well-protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. However, enzymes gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions such as higher temperature may lead to a higher dosage requirement.

Safety, handling, and storage

Safety, handling, and storage guidelines are provided with all products.

Cellulosic ethanol primer

Biofuels are a key to reducing global CO2 emissions, and cellulosic bioethanol offers the opportunity to reduce CO_2 emissions by up to 90% compared to conventional gasoline. The cellulosic ethanol industry holds a lot of promise for meeting the demand for an alternative global liquid transportation fuel, and at Novozymes we recognize this potential as a worthwhile focus for our company. That is why we started working on developing cellulosic ethanol solutions in 2000 and have continued to grow our research efforts in this area every year since then. Our cellulosic ethanol work has become the largest endeavor in our company s history, with more than 150 people dedicated to this effort. We have learned a lot through our internal research and through our partnerships with leading companies across the globe.

The information in this section has been collected through our effort over the years and is offered to help you progress in your cellulosic ethanol work.

Cellulosic ethanol production process

The production processes for lignocellulosic ethanol are continuously being optimized al pilot and demonstration-scale plants around the world. Simplified, the process has five steps (figure 6):

Feedstock: feedstock collection and transport to the cellulosic ethanol plant.

1- Pretreatment: A mechanical or thermochemical pretreatment step to break up the lignocellulosic structure so that the enzymes can access cellulose and hemicellulose.
2- Hydrolysis: An enzymatic hydrolysis step to convert the cellulose and hemicellulose to monomeric sugars.
3- Fermentation: A fermentation step to convert the sugars to ethanol.
4- Recovery: A recovery step to separate the ethanol from the remaining fractions so the product can be sold.

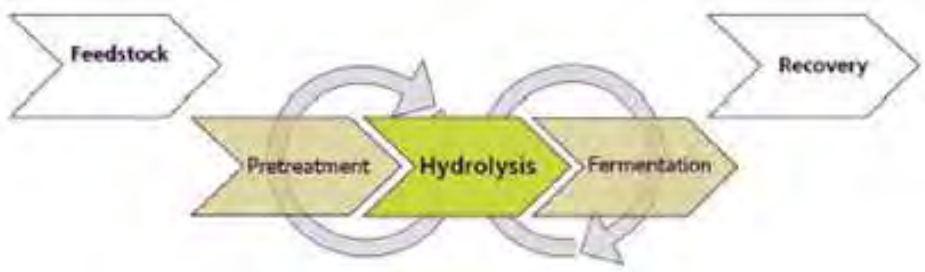

Figure A-6 Cellulosic ethanol production process

It is widely believed that pretreatment, hydrolysis and fermentation would be carried out in an integrated fashion since the three steps are highly interconnected. For example, degradation products generated during pretreatment can adversely affect hydrolysis and fermentation. Additionally, determining the optimal time to proceed from hydrolysis to fermentation can potentially increase the ethanol yield or decrease the overall process cost. Thus, it is important to determine how changes to one process step affect the performance and cost of the subsequent steps.

Hydrolysis

The primary goal of hydrolysis is to convert as much cellulose as possible into monomeric sugars as quickly as possible, which is achieved by adding cellulases. A good measure if the effectiveness of an enzyme is percentage cellulose conversion which is defined as the amount of cellulose converted to glucose divided by the total amount of cellulose. A high cellulose conversion can be achieved by increasing either the enzymes dosage or the hydrolysis time. However, a small fraction of the cellulose in a feedstock is herder to convert than the majority; hence, there can be a diminishing return where it takes a large amount of enzymes to convert a relatively minor fraction of cellulose.

Given this diminishing return, it is not recommended to attempt to reach a predetermined a target percentage cellulose conversion without developing a process model, as this could result in a higher process cost. Finding the optimal enzyme loading requires balancing of capital expenses and operational expenses. Modeling these relationships is critical for finding the optimal process setup for a cellulosic ethanol plant.

Table 3 shows a few basic relationships between several hydrolysis factors and CAPEX/OPEX. It is important to note that the benefits and downsides shown below do not necessarily offset one another. For example, if you increase solids, the saving on acid/base and tank costs may not offset the reduction in maximum attainable conversion at higher enzyme cost. Additionally, it should be noted that not all changes will be realized at the same time as there are multiple ways to approach these complex relationships.

Table A-3 Some basic relationship between CAPEX and OPEX

Hydrolysis factor	CAPEX	OPEX
Higher enzyme dosage	-Quicker reaction results in less installed tank capacity -Lower agitation cost	-More spent on enzyme -Lower agitation cost -Lower residence time -Higher cellulose conversion
Longer hydrolysis time	-Lowe enzyme dosage -More installed-tank capacity	-Higher heating/agitation cost -Less spent on enzyme
Higher total solids	-More expensive (initial) mixing system -Less installed-tank capacity -More expensive solids transport -Potentially cheaper pretreatment -Smaller distillation unit	-Lower water throughput -More spent on enzyme -Higher agitation power -Lower heating cost -Lower acid/base cost -Lower distillation cost
Higher percentage cellulose conversion	-Lower CHP size/cost	-Less material for boiler means less income from electricity -More ethanol generated results in lower distillation costs -More spent on enzyme

A brief note on fermentation and SSF

It is strongly recommended to identify the optimal time to switch form hydrolysis to fermentation for the specific feedstock. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), a process design where yeast and enzyme are added together and run at 32-37 °C, is commonly cited as a way of decreasing process costs because it can remove the end-products inhibition on enzymes by fermenting glucose to ethanol.

However, for cellulosic ethanol, suboptimal conditions during SSF necessitate longer processing time for the enzymes and C5 sugar conversion to reach a specific glucose conversion level. The temperature is not favorable for optimal enzyme performance, and higher inhibitors, due to high solids in hydrolysis, cause the normal yeast dosage to not perform effectively. For cellulases, CTec 2 and HTec 2 have significantly more activity at hydrolysis temperatures than at fermentation temperatures (figures 1 and 3), and CTec 2 also has and improved β-glucosides enzyme that has less glucose inhibition.

Anexo B

Composición química de biomasa de banano pretratada con LHW en Perú y Colombia – Tabla reproducida de estudios de la Universidad Nacional de Colombia y Universidad de California - Davis [70] con autorización de los autores.

	Pseudostems		Leaves		Rachis	
	Peru	Colombia	Peru	Colombia	Peru	Colombia
Ash	10.53 ± 1.69	4.94 ± 1.83	7.78 ± 3.14	13.82 ± 1.64	19.16 ± 2.20	11.01 ± 5.68
Lignin	14.54 ± 2.02	24.12 ± 0.05	34.39 ± 3.55	28.28 ± 3.51	21.30 ± 4.17	14.40 ± 4.81
Glucan	52.81 ± 0.48	58.37 ± 1.69	31.29 ± 0.54	31.17 ± 1.74	39.20 ± 0.62	45.26 ± 2.12
Xylan	5.56 ± 0.17	8.22 ± 0.26	7.33 ± 0.06	8.55 ± 0.47	7.11 ± 0.24	8.00 ± 0.32
Galactan	0.00	0.00	0.55 ± 0.78	1.36 ± 0.17	0.44 ± 0.63	0.00
Arabinan	0.77 ± 0.00	1.09 ± 0.02	2.20 ± 0.02	3.31 ± 0.01	1.79 ± 0.01	2.09 ± 0.11
Mannan	1.10 ± 0.02	0.91 ± 0.01	1.22 ± 0.01	1.20 ± 0.02	1.71 ± 0.01	1.34 ± 0.08
Total	85.32	97.65	84.77	87.69	90.72	82.09
pH in liquid [b]	4.17	5.8	4.67	5.4	5.05	5.1

[a] Chemical composition of the untreated material is presented in Table 1 for comparison. [b] Filtrate from pretreated slurry.

Datos están en % del total en base pulpa de biomasa, promedio ± desviación estándar (n = 2).

Anexo C

Propiedades del agua saturada (líquido – vapor) [100]

Temperatura (°C)	Presión (Pa)
60	19 940
65	25 030
70	31 190
75	38 580
80	47 390
85	57 830
90	70 140
95	84 550
100	101 400
110	143 300
120	198 500
130	270 100
140	361 300
150	475 800
160	617 800
170	791 700
180	1 002 000
190	1 254 000
200	1 554 000

Anexo D

Normas de seguridad

- **Pretratamientos *Steam Explosión* y *Liquid Hot Water***

Generalidades

Para los pretratamientos hidrotérmicos *Steam Explosión* y *Liquid Hot Water* se emplearon diversos equipos de protección como batas, guantes y lentes, con el fin de evitar posibles quemaduras causadas por el escape del vapor saturado o agua caliente del biorreactor.

Los implementos de seguridad (batas, guantes y lentes) fueron suministrados por el Laboratorio de Química y Laboratorio de Mecánica de la Universidad de Piura; así mismo, durante las pruebas se estuvo bajo la supervisión del personal de laboratorio para el manejo de equipos como: estufa, balanza, e incubadora.

Normas generales

- Lavar y secar las manos antes y después de cada prueba.
- Usar equipos de protección (batas, lentes, guantes).
- Mantener el área de trabajo limpia y ordenada.
- Ubicar los equipos de seguridad, como: extintores y botiquín de primeros auxilios.
- Seguir el protocolo de trabajo marcado por los responsables del laboratorio.
- Limpiar inmediatamente los derrames de los productos utilizados.

Normas para la manipulación de equipos e instrumentos

- Verificar el buen estado y funcionamiento de los equipos e instrumentos.
- No utilizar ninguna herramienta o máquina sin conocer su uso, funcionamiento y normas de seguridad específicas.
- Manejar con especial cuidado el material frágil, como el vidrio.

- **Hidrólisis enzimática**

Generalidades

En las pruebas de hidrólisis enzimática se emplearon guantes de látex de laboratorio y mascarillas con el fin de evitar el contacto directo con las enzimas Cellic CTec 2. Para las pruebas de hidrólisis se siguieron las mismas normas de seguridad e higiene que en los

pretratamientos *Steam Explosión* y *Liquid Hot Water*. Además se siguieron las normas referentes a los productos químicos.

Normas referentes a los productos químicos

- Leer detenidamente la información de los productos químicas y sus medidas de seguridad respectivas.
- No dejar ningún producto químico destapado.
- No tocar con las manos los productos químicos.

Etanol

FÓRMULA: C_2H_6O, CH_3CH_2OH.
PESO MOLECULAR: 46,07 g/mol.
COMPOSICIÓN: C: 52,24%; H: 13,13% y O: 34,73%.

Generalidades:

El etanol se utiliza industrialmente para la obtención de acetaldehído, vinagre, butadieno, cloruro de etilo y nitrocelulosa, entre otros. Es muy utilizado como disolvente en síntesis de fármacos, plásticos, lacas, perfumes, cosméticos, etc. También se utiliza en mezclas anticongelantes, como combustible, como antiséptico en cirugía, como materia prima en síntesis y en la preservación de especímenes fisiológicos y patológicos. El llamado alcohol desnaturalizado consiste en etanol al que se le agregan sustancias como metanol, isopropanol o, incluso, piridinas y benceno. Estos compuestos desnaturalizantes son altamente tóxicos por lo que, este tipo de etanol, no debe de ingerirse.

Propiedades físicas y termodinámicas:

Punto de ebullición:	78,3 °C.
Punto de fusión:	-130 °C.
Índice de refracción (a 20 °C):	1,361
Densidad:	0,7893 a 20 °C.
Presión de vapor:	59 mm de Hg a 20 °C.
Densidad de vapor:	1,59 g/mL
Temperatura de ignición:	363 °C
Punto de inflamación (Flash Point):	12 °C (al 100%), 17 °C (al 96%),
Límites de explosividad:	3,3 - 19%
Temperatura de autoignición:	793 °C.
Punto de congelación:	-114,1 °C
Calor específico:(J/g °C):	2,42 (a 20 °C).
Conductividad térmica (W/m K):	0,17 (a 20 °C).
Momento dipolar:	1,699 debyes.
Constante dielétrica:	25,7 (a 20 °C).
Solubilidad:	Miscible con agua en todas proporciones, éter, metanol, cloroformo y acetona.
Temperatura crítica:	243,1 °C.
Presión crítica:	63,116 atm.

Volumen crítico:	0,167 L/mol.
Tensión superficial (din/cm):	231 (a 25 °C).
Viscosidad (cP):	1,17 (a 20oC).
Calor de vaporización (J/g):	839,31.
Calor de combustión (J/g):	29677,69 (a 25 °C)
Calor de fusión (J/g):	104,6

El etanol es un líquido inflamable cuyos vapores pueden generar mezclas explosivas e inflamables con el aire a temperatura ambiente.

Propiedades químicas:

Se ha informado de reacciones vigorosas de este producto con una gran variedad de reactivos como: difluoruro de disulfurilo, nitrato de plata, pentafluoruro de bromo, perclorato de potasio, perclorato de nitrosilo, cloruro de cromilo, percloruro de clorilo, perclorato de uranilo, trióxido de cromo, nitrato de fluor, difluoruro de dioxígeno, hexafluoruro de uranio, heptafluoruro de yodo, tetraclorosilano, ácido permangánico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, ácido peroxodisulfúrico, dióxido de potasio, peróxido de sodio, permanganato de potasio, óxido de rutenio (VIII), platino, potasio, t-butóxido de potasio, óxido de plata y sodio.

En general, es incompatible con ácidos, cloruros de ácido, agentes oxidantes y reductores y metales alcalinos.

Niveles de toxicidad:

México:
CPT: 1900 mg/m^3 (1000 ppm)

Estados Unidos:
TLV (TWA): 1900 mg/m^3 (1000 ppm)

Reino Unido:
VLE: 9500 mg/m^3 (5000 ppm)

Francia:
VME: 1900 mg/m^3 (1000 ppm)

Alemania:
MAK: 1900 mg/m^3 (1000 ppm)
Periodos largos: 1900 mg/m3 (1000 ppm)

Suecia:
Periodos largos: 1900 mg/m^3 (1000 ppm)
Alcohol desnaturalizado:
LDLo (oral en humanos): 1400 mg/kg.

Manejo:

Equipo de protección personal (EPPs):

Para manejar este producto es necesario utilizar bata y lentes de seguridad, en un área bien ventilada. Cuando el uso es constante, es conveniente utilizar guantes. No utilizar lentes de contacto al trabajar con este producto.

Al trasvasar pequeñas cantidades con pipeta, utilizar propipetas, nunca aspirar con la boca.

Riesgos:

Riesgos de fuego y explosión:

Por ser un producto inflamable, los vapores pueden llegar a un punto de ignición, prenderse y transportar el fuego hacia el material que los originó. Los vapores pueden explotar si se prenden en un área cerrada y pueden generar mezclas explosivas e inflamables con el aire a temperatura ambiente.
Los productos de descomposición son monóxido y dióxido de carbono.

Riesgos a la salud:

El etanol es oxidado rápidamente en el cuerpo a acetaldehído, después a acetato y finalmente a dióxido de carbono y agua, el que no se oxida se excreta por la orina y sudor.

Inhalación: Los efectos no son serios siempre que se use de manera razonable. Una inhalación prolongada de concentraciones altas (mayores de 5000 ppm) produce irritación de ojos y tracto respiratorio superior, náuseas, vómito, dolor de cabeza, excitación o depresión, adormecimiento y otros efectos narcóticos, coma o incluso, la muerte.

Contacto con ojos: Se presenta irritación solo en concentraciones mayores a 5 000 a 10 000 ppm.

Contacto con la piel: El líquido puede afectar la piel, produciendo dermatitis caracterizada por resequedad y agrietamiento.

Ingestión: Dosis grandes provocan envenenamiento alcohólico, mientras que su ingestión constante, alcoholismo. También se sospecha que la ingestión de etanol aumenta la toxicidad de otros productos químicos presentes en las industrias y laboratorios, por inhibición de su excreción o de su metabolismo, por ejemplo: 1,1,1-tricloroetano, xileno, tricloroetileno, dimetilformamida, benceno y plomo. La ingestión constante de grandes cantidades de etanol provoca daños en el cerebro, hígado y riñones, que conducen a la muerte. La ingestión de alcohol desnaturalizado aumenta los efectos tóxicos, debido a la presencia de metanol, piridinas y benceno, utilizados como agentes desnaturalizantes, produciendo ceguera o, incluso, la muerte a corto plazo.

Carcinogenicidad: No hay evidencia de que el etanol tenga este efecto por el mismo, sin embargo, algunos estudios han mostrado una gran incidencia de cáncer en laringe después de exposiciones a alcohol sintético, con sulfato de dietilo como agente responsable.

Mutagenicidad: No se ha encontrado este efecto en estudios con Salmonella, pero se han encontrado algunos cambios mutagénicos transitorios en ratas macho tratados con grandes dosis de este producto.

Riesgos reproductivos: Existen evidencias de toxicidad al feto y teratogenicidad en experimentos con animales de laboratorio tratados con dosis grandes durante la gestación. El etanol induce el aborto.

Acciones de emergencia:

Primeros auxilios:

Inhalación: Traslade a la víctima a un lugar ventilado. Aplicar respiración artificial si ésta es dificultosa, irregular o no hay. Proporcionar oxígeno.

Ojos: Lavar inmediatamente con agua o disolución salina de manera abundante.

Piel: Eliminar la ropa contaminada y lavar la piel con agua y jabón.

Ingestión: No inducir el vómito.

En todos los casos de exposición, el paciente debe recibir ayuda médica tan pronto como sea posible.

Control de fuego:
Utilizar el equipo de seguridad necesario, dependiendo de la magnitud del incendio.
Usar agua en forma de neblina lo más lejos posible del incendio, los chorros pueden resultar inefectivos. Enfriar los contenedores que se vean afectados con agua. En el caso de fuegos pequeños, pueden utilizarse extinguidores de espuma, polvo químico seco o dióxido de carbono.

Fugas y derrames:
Evitar respirar los vapores y permanecer en contra del viento. Usar guantes, bata, lentes de seguridad, botas y cualquier otro equipo de seguridad necesario, dependiendo de la magnitud del siniestro. Mantener alejadas del área, flamas o cualquier otra fuente de ignición. Evitar que el derrame llegue a fuentes de agua o drenajes. Para lo cual, deben construirse diques para contenerlo, si es necesario. Absorber el líquido con arena o vermiculita y trasladar a una zona segura para su incineración posterior. Usar rocío de agua para dispersar el vapor y almacenar esta agua contaminada en recipientes adecuados, para ser tratada de manera adecuada, posteriormente. En el caso de derrames pequeños, el etanol puede absorberse con papel, trasladarlo a un lugar seguro y dejarlo evaporar o quemarlo. Lavar el área contaminada con agua.

Desechos:
La mejor manera de desecharlo es por incineración, aunque para pequeñas cantidades puede recurrirse a la evaporación en un lugar seguro.

Almacenamiento:
Cantidades grandes de este producto deben ser almacenadas en tanques metálicos especiales para líquidos inflamables y conectados a tierra. En pequeñas cantidades pueden ser almacenados en recipientes de vidrio. En el lugar de almacenamiento debe haber buena ventilación para evitar la acumulación de concentraciones tóxicas de vapores de este producto y los recipientes deben estar protegidos de la luz directa del sol y alejados de fuentes de ignición.