

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN
ALCOHÓLICA DE JARABES GLUCOSADOS DERIVADOS DE CÁSCARAS DE
NARANJA (*Citrus sinensis*)**

JORGE ANDRES SEGOVIA ORTEGA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2016**

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN
ALCOHÓLICA DE JARABES GLUCOSADOS DERIVADOS DE CÁSCARAS DE
NARANJA (*Citrus sinensis*)**

JORGE ANDRES SEGOVIA ORTEGA

**Trabajo de grado en modalidad de investigación presentado como requisito
parcial para optar al título de Ingeniero Agroindustrial.**

Asesor:

I.Q., M.Sc. Olga Lucia Benavides Calvache

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2016**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Olga Lucia Benavides Calvache
Firma del Asesor de trabajo de grado

Álvaro Cornejo Pantoja
Firma del jurado

Oscar Arango Bedoya
Firma del jurado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar y cuidar mi camino, a mi familia por el incondicional apoyo, mis padres que han sido un pilar muy importante en mi vida.

Al Grupo de Investigación Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) en cabeza de su directora la MSc. Olga Lucía Benavides Calvache por el apoyo prestado en el desarrollo de esta investigación.

A la profesora Olga Lucía Benavides Calvache por su dirección y asesoría desde la formulación hasta la ejecución de este trabajo.

A la laboratorista Diana María Gómez Narváz por su especial ayuda en este trabajo.

Al personal de Laboratorios Especializados por su colaboración y aporte a este trabajo.

A todas los compañeros y amigos que de forma directa o indirecta colaboraron para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS por ser quien siempre guio, cuido y direcciono mi camino en la vida y todo el proceso de la carrera.

A mis padres Clara Ortega y Jorge Segovia, quienes con su apoyo incondicional han sido un pilar importante para todo este proceso, muchas gracias por su apoyo y por estar para mí siempre.

A mis hermanos Diego y David quienes has sido un ejemplo de responsabilidad y dedicación.

Jorge Andres Segovia Ortega

RESUMEN

El manejo de los residuos sólidos que la gente produce es un problema tanto ambiental como social, saber qué hacer con esos desechos también es parte del conflicto actual. Las nuevas tecnologías y los estudios científicos permiten aprovechar residuos agroindustriales para obtener a partir de estos, productos con valor agregado. Una parte importante a tener en cuenta para el desarrollo del país, es la búsqueda de procesos alternativos de obtención de energía, la optimización de los mismos y así generar un manejo adecuado al consumo de combustibles en todos los sectores que garanticen el uso racional de energía según la ley 697 de 2001 (ley URE), mediante la cual se promueve la utilización de energías alternativas como los biocombustibles a partir de residuos agroindustriales.

Al obtener etanol hidratado a partir de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) se da un uso más rentable a éste, contribuyendo en la reducción del impacto ambiental por causa de acumulación del mismo. La hidrólisis permite romper las moléculas de celulosa y obtener así el azúcar fermentable (glucosa), existen dos alternativas para llevarla a cabo, vía enzimática o vía ácida, en esta investigación se realizó una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico en tres diferentes tratamientos T1 (3%), T2 (5%) y T3 (7%), los porcentajes corresponden a la concentración del ácido. Posterior a esto se realizó una fermentación utilizando levadura de pan comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) debido a su bajo costo y a su fácil disponibilidad, y finalmente se realizaron los cálculos para determinar el rendimiento de etanol hidratado.

Con esta investigación se evaluaron tres diferentes tratamientos de hidrólisis para la cáscara de naranja en la ciudad de Pasto. Se tomaron 30 g de la cáscara previamente seca al 11% de humedad, y deslignificada con hidróxido de sodio 0,1N durante 15 minutos, para después, hidrolizar cada muestra, hidrólisis regulada mediante autoclave a una temperatura de 115°C y 15 psi de presión durante 30 minutos, el tratamiento T3 (7%) presentó mayor absorbancia (0,795) y por ende la mejor concentración de azúcares reductores (5,120 g/l). Los tratamientos T1, T2, y T3 presentaron una diferencia estadística significativa (p -valor > 0,05). En cuanto a la fermentación se obtuvo un valor de 219,28 mg de etanol / g cáscara.

Palabras clave: Hidrólisis, cáscara, fermentación, glucosa, bioetanol, naranja.

ABSTRACT

The management of solid waste that people produce is a problem both environmentally and socially, knowing what to do with these wastes is also part of the current conflict. New technologies and scientific studies can take advantage of agro-industrial waste to obtain from these, value-added products. An important part to consider development of the country, is the search for alternative processes for obtaining energy, optimizing them and generate proper handling fuel consumption in all sectors to ensure the rational use of energy according to the law 697 of 2001 (URE law), whereby the use of alternative energies is promoted as biofuels from agro-industrial waste.

By getting hydrated ethanol from orange peel (*Citrus sinensis*) it a use given it more profitable to this, contributing to reducing the environmental impact caused by accumulation of same. The hydrolysis can break the cellulose molecules and obtain the fermentable sugar (glucose), there are two ways to carry it out, via enzymatic or acid pathway, in this research an acid hydrolysis with sulfuric acid was carried out in three different treatments T1 (3 %), T2 (5%) and T3 (7%), the percentages correspond to the acid concentration. Following this fermentation using commercial bread yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) due to its low cost and easy availability, and finally calculations were performed to determine the performance of hydrous ethanol.

With this research were evaluated three different treatments for hydrolysis of the orange peel in the city of Pasto. 30 g of dried shell to 11% moisture were taken, and delignified with 0.1N sodium hydroxide for 15 minutes, for then, hydrolyze each one sample, hydrolysis regulated by autoclave at a temperature of 115 °C and 15 psi pressure for 30 minutes, the T3 (7%) treatment showed higher absorbance (0.795) and therefore the best concentration of reducing sugars (5,120 g / l). The treatment T1, T2, and T3 showed a statistically significant difference (p-value > 0.05). In relation to the fermentation was obtained 219,28 mg ethanol for g peel.

Keywords: Hydrolysis, shell, fermentation, glucose, bioethanol, orange.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
2.1 ANTECEDENTES DEL TEMA	21
2.1.1 Actualidad en Latinoamérica.	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.2.1 Analizar la hidrólisis química la cáscara de naranja. (<i>Citrus sinensis</i>) para la generación del jarabe glucosado.....	25
3.2.2 Evaluar el contenido de azúcares reductores totales. obtenidos del proceso hidrolítico de la cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>).	25
3.2.3 Desarrollar la fermentación del jarabe y realizar un seguimiento cinético al consumo de azúcares reductores.....	25
3.2.4 Identificar el etanol obtenido durante el proceso de fermentación mediante cromatografía.	25
4. MARCO TEÓRICO	26
4.1 CÁSCARA DE NARANJA	26
4.2 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	27
4.2.1 Composición y estructura.....	27
4.2.2 Celulosa.....	27
4.2.3 Hemicelulosa.	27
4.2.4 Lignina.	28
4.3 GLUCOSA	28

4.3.1	Jarabes de Glucosa.	29
4.4	AZÚCARES REDUCTORES.....	29
4.5	PRE TRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	30
4.6	HIDRÓLISIS.....	31
4.6.1	Hidrólisis Química.	31
4.6.2	Hidrólisis Enzimática.....	32
4.7	ESPECTROFOTOMETRÍA.....	32
4.7.1	Método de ácido 3,5 – dinitrosalicílico.....	32
4.8	FERMENTACIÓN.....	33
4.8.1	Condiciones a controlar en una fermentación discontinua.....	34
4.8.1.1	Temperatura.	35
4.8.1.2	Grados Brix.....	35
4.8.1.3	pH.	35
4.8.1.4	Aireación.....	35
4.8.2	Levaduras.	36
4.8.2.1	Requerimientos nutricionales para las levaduras.	36
4.8.3	Curva de crecimiento de un microorganismo.....	37
4.8.3.1	Fase de latencia (i).....	37
4.8.3.2	Fase logarítmica o exponencial (ii).....	37
4.8.3.3	Fase estacionaria (iii).....	37
4.8.3.4	Fase de muerte (iv).....	38
4.8.4	Cinética química.....	38
4.9	ETANOL.....	39
4.9.1	Aplicación.....	40
4.9.1.1	Alcohol absoluto.....	40
4.9.1.2	Gasolina oxigenada.....	40
4.10	DESTILACIÓN.....	41
4.11	CROMATOGRAFÍA.....	41
5.	METODOLOGÍA.....	43

5.1	ACONDICIONAMIENTO DE LA CÁSCARA DE NARANJA	43
5.2	ELIMINACIÓN DE LIGNINA.....	46
5.3	HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	47
5.4	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	49
5.5	FERMENTACIÓN	52
5.5.1	Determinación de la cinética de consumo de azúcares.....	54
5.6	OBTENCIÓN DE BIOETANOL	55
5.6.1	Cromatografía de gases.....	56
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
7.1	ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SECADO DE LA CASCARA DE NARANJA	58
7.2	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	58
7.2.1	Elaboración de curva de patrón de glucosa	58
7.3	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS HIDROLIZADAS	61
7.4	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN	64
7.4.1	Cinética de la fermentación.....	65
7.4.2	Análisis cromatográfico para el bioetanol obtenido	67
	CONCLUSIONES	71
	RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	73

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la pared vegetal.	28
Figura 2. Representación de estructura química de azúcares reductores.	30
Figura 3. Conversión de diferentes compuestos.	31
Figura 4. Conversión de los azúcares reductores mediante DNS.	33
Figura 5. Esquema de distintas formas de levadura.....	36
Figura 6. Curva de crecimiento de levadura.....	37
Figura 7. Obtención de la cáscara de naranja: Parque Infantil – Ciudad de Pasto.	44
Figura 8. Adecuación de la cáscara y primera reducción de tamaño.	44
Figura 9. Secado y reducción final de tamaño.	45
Figura 10. Mufla Thermolab – Dies.	45
Figura 11. Peso de muestras en balanza analítica SETRA – HL- 410S y Remoción de lignina.	46
Figura 12. Separación de la solución y la cáscara.	46
Figura 13. Hidrólisis ácida regulada mediante autoclave.	47
Figura 14. Autoclave – STERILOF.....	47
Figura 15. Centrifugación de las muestras - Centrifuga UNIVERSAL 320.....	48
Figura 16. Jarabe glucosado.....	48
Figura 17. Preparación de diluciones para curva patrón de glucosa	50
Figura 18. Ecuación 2. $FD = V_f / V_i = 10 \text{ ml} / 0.250 \text{ ml} = 40$	50
Figura 19. Dilución de los jarabes.	51
Figura 20. Baño maría y cambio de color en las diluciones de los jarabes.....	51
Figura 21. Espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300.	51
Figura 22. Ajuste de pH- pH-Metro METTLER TOLEDO – SevenEasy.....	52
Figura 23. Adaptación de erlenmeyers como biofermentadores.	53

Figura 24. Ambiente de fermentación.	53
Figura 25. Toma de muestras para cinética de azúcares.	54
Figura 26. Muestras del biofermento a diferentes tiempos de reacción.....	54
Figura 27. Destilación del bioetanol - rotaevaporador LABOROTA 4000 – Heidolph	55
Figura 28. Equipo de Cromatografía GC-174A CHROMATOGRAPH SHIMADZU.	56
Figura 29. Columna capilar DB – WAX.	56
Figura 30. Soluciones para elaboración de la curva patrón.....	59
Figura 31. Gráfico de barras comparativo para soluciones de glucosa de la curva patrón.	60
Figura 32. Curva patrón de glucosa.	60
Figura 33. Comparación de medias de absorbancia para cada tratamiento.....	62
Figura 34. Comparación de medias de concentración de AR (g/L) para cada tratamiento.....	63
Figura 35. Comparación de la concentración de expresados como glucosa de muestras hidrolizadas en relación a la curva patrón.....	64
Figura 36. Curva de seguimiento a azucares reductores durante la fermentación.	66
Figura 37. Curva de seguimiento a azucares reductores durante la fermentación.	67
Figura 38. Cromatograma del bioetanol obtenido.	68
Figura 39. Cromatograma estándar de etanol.....	69
Figura 40. Cromatograma estándar de metanol.....	70

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.	Clasificación de Países líderes en Capacidad de Producción de Etanol y Biodiesel	22
Tabla 2.	Composición química aproximada de la cáscara de naranja.....	27
Tabla 3.	Diluciones para curva patrón de glucosa.....	49
Tabla 4.	Diseño experimental para la hidrólisis	57
Tabla 5.	Matriz del diseño experimental para la hidrólisis	57
Tabla 6.	Resultados de la Prueba de DNS para glucosa	59
Tabla 7.	Resultado de las muestras hidrolizadas	61
Tabla 8.	Resultados de verificación de varianza - nivel de confianza de 95%....	63
Tabla 9.	Resultados de cinética de azúcares	65
Tabla 10.	Resultados del seguimiento al consumo de azúcares	66
Tabla 11.	Resultados de áreas de bioetanol	68
Tabla 12.	Resultados de áreas de etanol estándar	69
Tabla 13.	Resultados de áreas de metanol estándar	70

INTRODUCCIÓN

El incremento de los precios de los combustibles fósiles, los estrictos controles gubernamentales sobre las emisiones de escape y el ya previsto futuro agotamiento de las reservas de petróleo han impulsado la racionalización del uso de energía así como, de la diversificación de las fuentes y suministros de estas lo cual, ha llevado a una búsqueda incesable de formas de aprovechamiento energético técnicamente factibles y económicamente atractivas, “como sucede con los biocombustibles producidos vía fermentativa”¹. Actualmente, la producción comercial de etanol está basada en la fermentación de la sacarosa de la caña de azúcar y melaza, o la glucosa derivada de los cultivos que poseen como principal componente almidón, tales como maíz, trigo y yuca. Existe una creciente necesidad para la industria en mejorar la tecnología y aumentar la producción Sin embargo, frente al riesgo de generar problemas de seguridad alimentaria debido al uso de cultivos con potencial alimentario como fuentes de biocombustibles, se prevé que los residuos agrícolas (biomasa) sean la mejor fuente para la producción de combustibles alternativos. En el mundo se producen aproximadamente 1600 millones de toneladas por año de residuos sólidos, los cuales generan graves problemas, no sólo por el deterioro del medio ambiente, sino también desde el punto de vista económico puesto que los costos de recolección, transporte y disposición final son cada vez mayores.

En el caso de Colombia, las cifras del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial indican que en un día el país produce 27300 toneladas de basura de las cuales el 65% son residuos orgánicos. En el departamento de Nariño se generan entre 300-1000 toneladas de residuos diarias de las cuales el 73% son residuos orgánicos. Por estas razones, se está impulsando el estudio de la producción de bioetanol de tercera generación, el cual es producido a partir de biomasa lignocelulósica residual, compuesta por dos polímeros de carbohidratos, la celulosa (35-50%) y la hemicelulosa (15-25%), y un polímero fenólico, la lignina (20-25%). Los residuos orgánicos son materias primas con capacidad de conversión de valor agregado, se pueden tratar y ser transformadas en productos de gran interés para la industria como también para el medio ambiente.

¹ Posso, F. (2002). Energía y ambiente: pasado, presente y futuro. Parte dos: sistema Energético basado en energías alternativas. Geoenseñanza, Vol. 7(2). pp. 54-73.

“Se estima que el procesamiento de desechos orgánicos ha sido considerado como un asunto de tratamiento, prevención y minimización debido a los efectos ambientales inducidos por su disposición. Por la gran cantidad de residuos orgánicos que se generan a diario se han visto reflejados problemas no solo en el medio ambiente si no también problemas a nivel social y a nivel económico.”²

La agroindustria es el eslabón de la cadena donde empieza la agregación de valor y la transformación de materias primas agropecuarias en productos industriales; tal es el caso de la agroindustria de la fermentación alcohólica en la cual materias primas lignocelulósicas pueden ser procesadas para la generación de etanol, como producto de mayor valor agregado. Allí surge la necesidad de darle un mayor aprovechamiento a la producción agrícola, para contribuir a la economía del país, disminuyendo las importaciones de materias primas, generando nuevos empleos y mejorando los ingresos y calidad de vida de los agricultores

Los biocombustibles líquidos, denominados también biocarburantes, son productos que se están empleando como sustitutivos de la gasolina y del ACPM en vehículos, los cuales son obtenidos a partir de materias primas de origen agrícola. Actualmente, una gran cantidad de países promueven la idea de generar sus propios combustibles, para no depender de importaciones o de reservas agotables y, colateralmente generar empleos estables y de calidad, teniendo en cuenta que el alcohol se obtiene a partir de los ciclos vegetativos de productos agrícolas tales como remolacha, maíz, cebada, papa, yuca, eucalipto, girasol, entre otros, incluyendo la caña de azúcar, cultivo que está bien difundido y que se convierte en la principal fuente para la producción de alcohol.

De ese cultivo se tienen muchas experiencias, capacidad y manejo en Colombia (en particular en el Valle del Cauca), por su uso y encadenamiento productivo con el etanol. En este escenario, el gobierno nacional ha planteado entre sus intereses estratégicos, el tema de los alcoholes carburantes. “Política también incentivada por el aumento acelerado de los precios de los carburantes, costo que está afectando de manera significativa, a algunos sectores de la producción que demandan como insumo básico combustibles fósiles”³

² Cardona, C. y Sanchez, O. (2006). Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. Energy. pp. 2447-2459. doi: 10.1016/j.energy.2005.10.020.

³ Cortes, M., Gonzales, S. & Alvares, M. (2008). Colombia en la era del alcohol carburante. Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Vol. (3). ISSN 1900-9607/. pp. 13.

El biocombustible más usado a nivel mundial es el etanol con una producción cercana a los 51000 millones de litros. “Los principales productores mundiales son Brasil y EEUU. El 73% de esta cantidad es usado como combustible, el 17% en bebidas y el 10% tiene uso industrial”⁴. “El etanol, al combinarse con la gasolina eleva el contenido de oxígeno por lo que mejora la oxidación de hidrocarburos reduciendo la liberación de contaminantes a la atmósfera”

⁴ Fukuda, H., Kondo, A. y Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 44(1). pp. 2-12. doi:10.1016/j.bej.2008.11.016.

1. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El debate sobre el agotamiento de las reservas mundiales de petróleo se intensificó por la subida de los precios en los EE.UU. durante 2004, aunque las reservas para la producción de combustibles son abundantes, la necesidad de encontrar alternativas a los combustibles fósiles es más que ampliamente justificada.

Las técnicas actuales de producción de etanol a partir de cereales y caña de azúcar representan un problema en la seguridad alimentaria. De igual forma, la producción de etanol carburante por medio de estas materias primas no ha llenado las expectativas con respecto a la disminución de gases de efecto invernadero y de aumento en la producción de energía con respecto a la gastada. El aprovechamiento de los residuos orgánicos generados a nivel industrial, considerados por falta de estudio como basura, puede ser una base fundamental en la producción de nuevos productos como el etanol, que a nivel mundial es un elemento importante en el diario vivir de las personas. La energía renovable es atractiva, puesto que suple las necesidades energéticas que actualmente son provistas por los combustibles fósiles. “Adicionalmente existen ventajas de índole ambiental, como la reducción de los gases de efecto invernadero”⁵

El etanol tiene un gran potencial como sustituto de los derivados del petróleo, su producción en Estados Unidos y Brasil fue de 10,600.00 y 6,577.89 millones de galones respectivamente en 2009. Además, cabe resaltar que el bioetanol y el biodiesel pueden ser utilizados también en generación de electricidad en zonas aisladas (no interconectadas a la red energética nacional). En este sentido, otro aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo del país es el mejoramiento de la eficiencia en los procesos de generación de energía, optimización del consumo de combustibles en el sector del transporte, industrial, rural, residencial y comercial que garanticen el uso racional de energía según la Ley 697 de 2001 (Ley URE), mediante la cual se promueve la utilización de energías alternativas. Según la evaluación del WEC (World Energy Council) se estima que las energías renovables (en primer lugar a partir de biomasa) representarán el 25,4% del consumo mundial en el 2030, el 40% en el 2050 y el 80% en el 2080. Si un litro de gasolina se remplazara por un litro de bioetanol, se evitaría el 75% de emisiones de gas con efecto de invernadero.

⁵ Izmirlioglu, G. & Demirci, A. (2012). Ethanol Production from Waste Potato Mash by Using *Saccharomyces Cerevisiae*. Applied Sciences, Vol. 2(4). pp. 738-753. Available at: <http://www.mdpi.com/2076-3417/2/4/738/> [Accessed February 28, 2013].

Siendo el maíz es el cultivo más utilizados para la producción de etanol, su manejo es restringido debido a que el uso de tierras para su cultivo compite con el de producción de alimentos. También se están realizando investigaciones para reducir el consumo de combustible fósil en todo el proceso de obtención de etanol.

Una fuente de la cual se puede obtener jarabe glucosado es la corteza de las frutas que en su gran mayoría es considerada biomasa desvalorizada. Frutas como la naranja y la piña, poseen gran importancia en el mercado, pero sus cáscaras son desechadas, desaprovechando el valor que éstas tienen y además que el uso de este subproducto agrícola se limita a la alimentación de ganado bovino. El bioetanol obtenido por fermentación de estas materias primas que contienen hidratos de carbono, se adapta particularmente bien para sustituir a la gasolina en los motores de encendido por chispa y se convierte en una alternativa interesante para abrir nuevos mercados para su revalorización. La eficiencia para la producción de etanol es dependiente de la disponibilidad de sustrato adecuado, la cepa de levadura y el método a manejar. Estos son los principales parámetros evaluados en las investigaciones que permiten un modelaje de los procesos y conseguir mejores resultados en la producción de etanol.

Diferentes factores influyen en la generación de residuos, uno de ellos es la sobrepoblación, las diferentes actividades humanas y el consumismo, que han contribuido a acumular grandes cantidades de residuos orgánicos (cientos y miles de toneladas al año), cantidades que van en aumento. Por otro lado, no en todos los países existe la tecnología adecuada para el manejo de estos y, hasta ahora, su manejo no ha resultado eficiente. Las quemas a cielo abierto y la disposición de tiraderos o vertederos, por ejemplo, provocan problemas de contaminación, que acarrear enfermedades y daño al medio ambiente, además de conflictos sociales y políticos. La comercialización del zumo naranja representa el sustento diario de diferentes familias en la localidad conocida como parque infantil, en la ciudad de Pasto, la venta de este jugo es muy popular en ese sector, y se generan cantidades considerables de las cáscaras, que son desechadas a diario como residuos y que ya son una problemática de carácter ambiental y social, el inadecuado manejo de las mismas ha provocado la aparición de diferentes tipos de insectos, también, producen olores y generan lixiviados, problemas que son de incomodidad para la comunidad que reside a los alrededores como también para los transeúntes.

2. JUSTIFICACIÓN

Los recursos no renovables para este caso en específico combustibles fósiles, día a día se están agotando en el país, debido a que existe una demanda que estos generan en todo el mundo por las diferentes aplicaciones y usos que estos tienen en diferentes procesos industriales. El alcohol carburante no paga los impuestos de la gasolina, tal como fue aprobado en la reforma tributaria, las inversiones son rentables tanto para el productor de la caña como para el inversionista en la agroindustria. Las tasas de retorno en dólares están por encima del 20%, lo que hace atractivos los proyectos para atraer inversionistas tanto nacionales como extranjeros. Estas rentabilidades se logran sin incrementar el costo del combustible al consumidor final. Desde hace varias décadas los residuos orgánicos vegetales han sido un foco de atención para investigaciones, debido a que parte de sus componentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de gran interés. Con el tiempo se han venido analizando diferentes estrategias y técnicas de producción tomando como materia prima los residuos orgánicos vegetales de los cuales se han podido transformar grandes y útiles productos y subproductos que intervienen en el crecimiento de la industria y el cuidado del medio ambiente en general. La naranja es destinada como insumo para la agroindustria, es utilizada para la producción de jugos principalmente, cuyo proceso conlleva una generación considerable de desechos como cáscaras, pulpa y semillas. Los residuos generados durante el procesamiento de la naranja son una carga sustancial para el medio ambiente, sin embargo, estos desechos pueden ser empleados para obtener otros productos como aceites esenciales y pectinas, buscando incrementar su valor agregado con el proceso de agroindustrialización y al mismo tiempo de disminuir el impacto ambiental que estos producen. La cáscara se usa como saborizante, también el aceite esencial extraído de la capa externa de la piel, se utiliza comercialmente como saborizante de alimentos, refrescos y para otros fines. “De la capa interna blanca de la cáscara se extrae pectina para el uso en conservas de frutas.”⁶

Las cáscaras de naranja representan aproximadamente del 45 al 60% del peso de la fruta, el bioetanol obtenido por fermentación de materias primas que contienen hidratos de carbono, se adapta particularmente bien para sustituir a la gasolina en los motores de encendido por chispa. La producción de etanol combustible a partir de material lignocelulósico se ha convertido en una alternativa interesante en la utilización de este tipo de residuos, lo que podrían abrir nuevas opciones para su revalorización.

⁶ Cerón Salazar, I., y Cardona Alzate, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. Ingeniería y Ciencia, pp. 65-86.

Las características de la cáscara de naranja, hacen que esta materia prima sea apta para la extracción de celulosa por medio de hidrólisis química y enzimática y de allí obtener azúcares reductores, destacados como jarabes azucarados para ser empleados como edulcorantes, y también para la obtención de etanol.

En el eje cafetero se encuentra localizada la mayor parte de la industria procesadora de cítricos del país, con una capacidad de producción de alrededor de 110000 toneladas por año, distribuidas entre Cicolsa-Quindío con 50.000 t/año, Frutropico-Antioquia con 40.000 t/año, Frutasa-Caldas con 13.000 t/año y Passicol-Caldas con 7.000 t/año. En la localidad del parque infantil en la ciudad de Pasto se generan alrededor de 150 kg/día de cáscara de naranja. Todas estas cantidades pueden ser empleadas para los diferentes estudios y direccionamientos a la formación productos de valor agregado de interés industrial como lo es el bioetanol.

Para Colombia es importante producir bioetanol por las siguientes razones: Disminución de emisiones contaminantes a la atmósfera, con la mezcla de solo 10% de etanol con la gasolina, se disminuyen en 27% las emisiones de monóxido de carbono en carros nuevos, 45% en carros típicos colombianos de 7-8 años de uso y 20% de hidrocarburos a la atmósfera colombiana, con las positivas consecuencias para la salud humana y ambiental. Los cambios atmosféricos son evidentes.

2.1 ANTECEDENTES DEL TEMA

La utilización de los biocombustibles líquidos es tan antigua como la de los mismos combustibles de origen fósil y los motores de combustión interna. Las crisis energéticas que sacudieron el siglo XX, y la preocupación mundial por la conservación del medio ambiente, fueron el motor para incentivar la búsqueda de nuevas fuentes energéticas como el etanol. La historia del uso del etanol como combustible, se remonta al siglo XIX y su línea cronológica desde entonces hasta la actualidad, describe, una serie de acontecimientos importantes en el campo de la ingeniería automotriz, la agroindustria, la ecología y la industria energética.

Como consecuencia de la primera crisis petrolera acontecida en la década de los 70, el mercado de los biocombustibles comenzó a tener vida propia. En 1973 el precio del crudo sufrió un alza extraordinariamente, afectando a todos los países del mundo, en especial a aquellos países cuyo alto consumo no se ve sustentado en reservas propias y lo cual les hace depender de otros estados para satisfacer su demanda. El precio del petróleo ha sido uno de los principales factores que han tenido incidencia sobre la demanda de Biocombustibles. El aumento en los últimos

años de la población mundial, sumado al incremento de la demanda energética de países emergentes como lo son Brasil y China, ha redundado en una variación del precio del crudo, lo que ha llevado a los países importadores a buscar otras fuentes alternativas de energía.

El precio del petróleo, está supeditado al comportamiento de una serie de elementos que lo determinan, tal es el caso de los factores climáticos, los eventos de índole político, la dinámica de los fondos de petróleo y las diversas interacciones entre consumidores, productores y las propias empresas petroleras. De igual forma se encuentra regulado por las leyes de la oferta y la demanda. Es así como el precio del petróleo pone de manifiesto los conflictos entre consumidores y productores y a nivel más macro, entre los países miembros de la OPEP y aquellos que no lo son, convirtiéndose entonces en un precio de origen netamente político en gran porcentaje.

Tabla 1. Clasificación de Países Líderes en Capacidad de Producción de Etanol y Biodiésel

Etanol			Biodiésel		
	País	Millones de litros		País	Millones de litros
1	Estados Unidos	51.415,97	1	Estados Unidos	5.912,17
2	Brasil	26.887,52	2	Alemania	5.047,81
3	China	2.699,48	3	España	5.023,19
4	Francia	1.821,03	4	Indonesia	4.262,31
5	Canadá	1.494,50	5	Brasil	4.160,28
6	India	1.420,92	6	Malasia	4.091,18
7	Polonia	1.079	7	China	3.906,09
8	Alemania	916,97	8	Argentina	3.636,28
9	Tailandia	868,50	9	Francia	2.926,11
10	Jamaica	832,70	10	Tailandia	2.771
11	Trinidad y Tobago	757	11	Italia	2.749,99
12	Indonesia	683,38	12	India	1.715,64
13	España	546	13	Polonia	1.505,05
14	Austria	485	14	Países Bajos	1.124,09
15	Bélgica	485	15	Singapur	988,76
16	Países Bajos	480	16	Austria	982,96
17	Reino Unido	470	17	Reino Unido	970
18	Islas Virgenes	387,50	18	Bélgica	886,37
19	Colombia	352	19	Grecia	850,26
20	Vietnam	318,11	20	Australia	797,81
21	Australia	292,70	21	Corea del Sur	762,91
22	República Checa	280	22	Portugal	590,92
23	El Salvador	247,10	23	Colombia	584,82
24	Paraguay	237,25	24	Filipinas	478,23
25	Argentina	237,20	25	República Checa	459,77
	Total	95.694,83		Total	57.184

Fuente: Torres y Carrera Consultores de Comunicación “Informe biocombustibles” 2010.

De acuerdo a éste ranking, se puede observar que los 5 países que lideran en capacidad de producción de Biodiesel son Estados Unidos, Alemania, España, Indonesia y Brasil mientras que la mayor capacidad de producción de Etanol la ostentan Estados Unidos, Brasil, China, Francia y Canadá. De acuerdo a todo esto, se intensifica la búsqueda de alternativas que sean un suplente al petróleo, como es el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos, otro tipo de biomasa ha sido base de investigación para obtención de bioetanol son los residuos de la papa (*Solanum tuberosum*) según Gerena, (2013) cada unidad de papa se encuentra conformada por tres partes principales: piel, cáscara y zona medular, esta última se forma primordialmente de tejido parenquimatoso, reservorio por excelencia de almidón, y por ende de energía. Luego de su cosecha los tubérculos contienen en promedio 80% para agua y 20% para materia seca (60% de esta corresponde a almidón).

2.1.1 Actualidad en Latinoamérica. El sector de la producción de etanol se encuentra en expansión, un ejemplo de esto está reflejado en su parque automovilístico que suma alrededor de tres millones de vehículos que consumen etanol y cerca de 16 millones que consumen una mezcla de etanol-gasolina. En los últimos años, la industria automovilística brasileña desarrolló vehículos que operan con flexibilidad en el tipo de combustible, que se conocen de manera popular como FLEX, debido a que el motor funciona con cualquier proporción de gasolina (mezcla E20 – E25) y etanol anhidro (E100), disponibles en el mercado a partir de 2003. En agosto de 2008 la flota de carros "Flex" ya había alcanzado 6 millones de vehículos, incluyendo automóviles y vehículos comerciales livianos, representando un 23% de la flota de vehículos livianos de Brasil.

Ante la iniciativa tomada por el Gobierno de Colombia de impulsar una Ley que estimule la producción, comercialización y consumo de alcoholes carburantes y ante la anunciada deficiencia de petróleo en los próximos años, la producción de alcohol aparece como una nueva alternativa para la producción de combustible limpio; lo que dará sostenibilidad al sector azucarero y a su área de influencia que depende en gran parte de éste, además proporcionará, nuevas posibilidades al sector agropecuario en general.

Este fue uno de los motivos que tuvo en cuenta el Congreso de la República para expedir la Ley 693 de septiembre 19 de 2001, cuyo objeto es controlar la contaminación del aire mediante el uso de oxigenantes en las gasolinas que reduzcan la contaminación producida por los motores de combustión interna. Igualmente, establece que, a partir del 27 de septiembre del año 2005, las gasolinas que se utilicen en las ciudades con más de 500 mil habitantes como Bogotá, Cali, Medellín y Barranquilla y, posteriormente, para el 2006, Bucaramanga, Cartagena, Cúcuta, Pereira y sus áreas metropolitanas, deberán

contener un 10% de alcohol carburante (Grupo Manuelita, 2007); debido a que la utilización de oxigenantes en la gasolina como el etanol, obedece a dos factores: el primero es la racionalización en el consumo de energía y el segundo es la preservación del medio ambiente, además los oxigenantes hacen más eficiente la conversión de energía térmica en energía mecánica y por lo tanto, reducen el consumo de combustible. La legislación sobre producción y uso de biocombustibles también se está aplicando en países como: Argentina, Bolivia, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Paraguay, Perú.

En Colombia las investigaciones para utilizar el etanol como combustible comenzaron en 2001, año en que el gobierno aprobó la ley 693 que obligaba al enriquecimiento en oxígeno de la gasolina. Esto se hizo inicialmente para reducir las emisiones de monóxido de carbono de los coches. Regulaciones más recientes eximieron al etanol elaborado a partir de biomasa de algunos impuestos que gravan la gasolina, haciendo así más barato el etanol que la gasolina (Ley 788 de 2002). Al principio todo el interés en la producción del etanol vino de la industria de azúcar existente, ya que es relativamente fácil añadir un módulo para desarrollar etanol al final de una fábrica de azúcar, y las necesidades energéticas son similares a las que se necesitan para producir el azúcar. El gobierno alienta a convertir gradualmente las fuentes de combustible de los coches a una mezcla del 10 por ciento de etanol y de 90 por ciento de gasolina. Las plantas del etanol están siendo incentivadas por tratos fiscales. “Ha habido interés en plantas de etanol de yuca (mandioca) y de nuevas plantaciones de la caña de azúcar, pero aún no se ha conseguido producir carbohidratos a bajo precio.”⁷

⁷ Vázquez, H. & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259. pp. 11.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la obtención de alcohol mediante la fermentación alcohólica de jarabes glucosados a partir de la hidrólisis química de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analizar la hidrólisis química la cáscara de naranja. (*Citrus sinensis*) para la generación del jarabe glucosado.

3.2.2 Evaluar el contenido de azúcares reductores totales. Obtenidos del proceso hidrolítico de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*).

3.2.3 Desarrollar la fermentación del jarabe y realizar un seguimiento cinético al consumo de azúcares reductores.

3.2.4 Identificar el etanol obtenido durante el proceso de fermentación mediante cromatografía.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CÁSCARA DE NARANJA

La naranja es una fruta cítrica comestible obtenida del naranjo dulce (*Citrus sinensis*). “Es un hesperidio carnoso de cáscara más o menos gruesa y endurecida, y su pulpa está formada típicamente por once gajos u hollejos llenos de jugo, el cual contiene vitamina C, flavonoides y aceites esenciales”.⁸

En Colombia se conocen y se cultivan dos variedades: naranja común o dulce y valenciana o valenciana late, que se cosechan en mayor proporción en el centro del país (Boyacá, Santander, Cundinamarca y Tolima):

- **Naranja dulce:** es la fruta cítrica que ha alcanzado mayor popularidad, tanto para el consumo fresco como para la industrialización de su jugo. Se conocen cuatro grandes grupos: comunes, sin acidez, de ombligo y pigmentadas.
- **Valencia:** Es la variedad de naranja que tiene mayor demanda a nivel mundial y una de las más cultivadas en el país. Da frutos de tamaño mediano, corteza gruesa, dura y coriácea. Superficie lisa, ligeramente áspera, jugo abundante y menos de seis semillas por fruto.

No es solo aprovechable la cáscara de naranja si no también todos sus llamados “desechos”, los diferentes usos de éstos son:

Pulpa: la pulpa de la naranja dulce equivale a 3/4 del total como subproducto de la extracción de jugo, es altamente valorada como pienso granulado con un contenido de proteínas de 6,58 a 7,03%. Es una fuente de levaduras comestibles, alcoholes no ingeribles, ácido ascórbico, y hesperidina.

Piel: Además de sus usos alimentarios, el aceite de la cáscara de naranja es un aroma muy apreciado en perfumes y jabones. Debido a su alto contenido de limoneno, (90-95%), tiene un efecto letal sobre las moscas, pulgas y hormigas. Su potencial como insecticida está en investigación. Se está utilizando en productos de limpieza para motores y en jabones secos para las manos en los talleres de reparación de maquinaria pesada.

⁸ Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; La Malfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. (2000). «Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers». TAG Theoretical and Applied Genetics 100: pp. 1155.

Semillas: El aceite derivado de la semilla de la naranja y de otros cítricos se emplea como aceite de cocina, en jabones y en plásticos. El residuo de las semillas, de alta proteína es adecuado para la alimentación humana, un ingrediente en la alimentación del ganado, y en las mezclas fertilizantes.

Tabla 2. Composición química aproximada de la cáscara de naranja

Parámetro	Valor
Sólidos Solubles (°Brix)	7,1 ± 1,2
pH	3,93 ± 0,03
Total de acidez (g de ácido cítrico/100mL)	0,29 ± 0,03
Índice de Formol	34 ± 2,4
Humedad %	85,9 ± 1,6
Grasa % (DM)	1,55 ± 0,17
Ceniza % (DM)	3,29 ± 0,19
Proteína % (DM)	6,16 ± 0,23
Carbohidratos % (DM)	89,0 ± 1,1
Azúcares Neutrales %	3,8 ± 0,3
Ácido urónico %	7,1 ± 0,9
Lignina %	3,2 ± 0,4
Pectina % (DM)	17 ± 5

Fuente: Cerón et al., (2011). DM, materia seca.

4.2 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

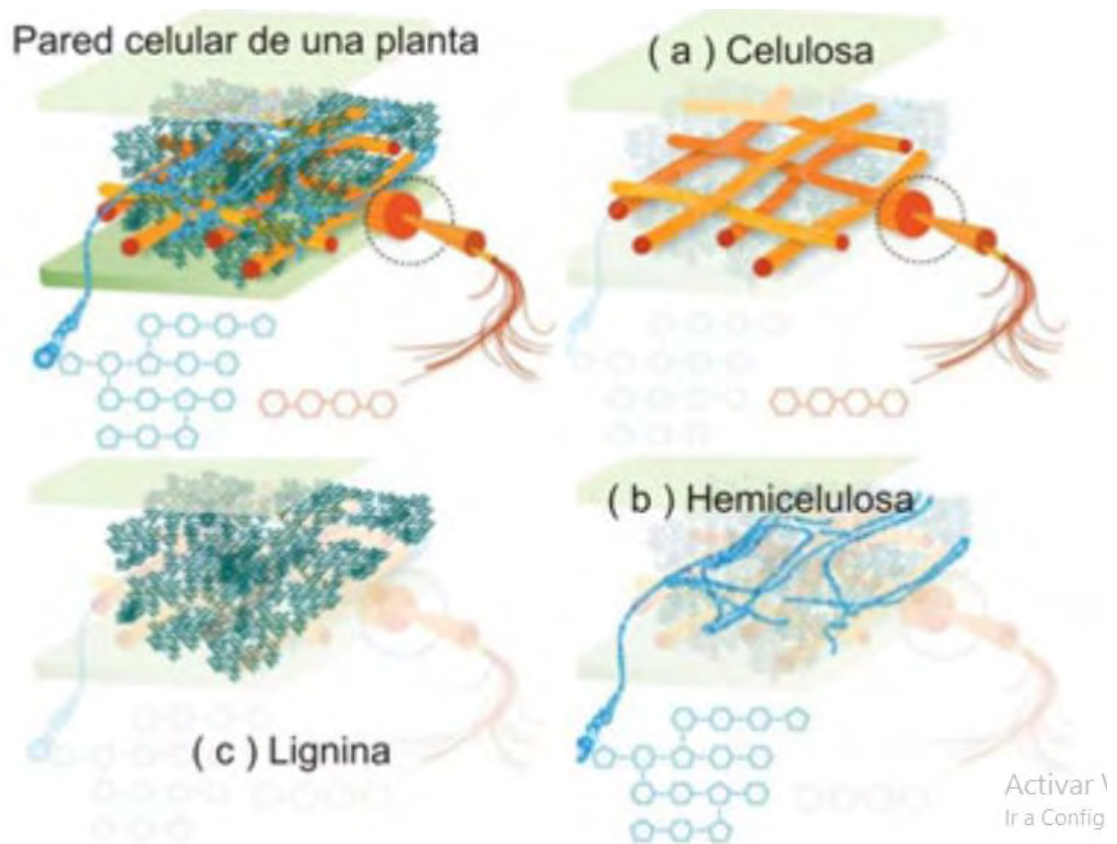
4.2.1 Composición y estructura. Los principales componentes de los residuos lignocelulósicos son la celulosa, hemicelulosa y lignina, además de otros componentes que no hacen parte de la pared celular (Amezquita, 2007). En la cáscara de naranja la celulosa representa entre un 35 - 50% DM, la hemicelulosa entre un 15 - 25% DM y la lignina entre un 20 - 25% DM.

4.2.2 Celulosa. Es el componente mayoritario de las paredes celulares de la generalidad de plantas, es un polímero lineal de β -D-Glucosa, que tiene una parte amorfa y una parte cristalina. El número de azúcares de cadena (grado de polimerización G.P) varía en los diferentes materiales celulósicos.

4.2.3 Hemicelulosa. Está constituida por polímeros de unidades anhidro azúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa.

4.2.4 Lignina. Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alteran de manera desordenada (Amezquita, 2007).

Figura 1. Estructura de la pared vegetal.



Fuente: Castillo, 2013.

4.3 GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos $-OH$ y $O=$. Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula. La glucosa con el 80% del poder edulcorante de la sacarosa es empleada en la elaboración de diversos productos, aunque también es comercializada en forma de jarabes dulces tipo miel.

4.3.1 Jarabes de Glucosa. Son líquidos de consistencia viscosa que por lo general contienen soluciones concentradas de azúcares, como la glucosa, en agua o en otro líquido. Los jarabes se usan desde hace mucho tiempo y antes de descubrirse el azúcar, se preparaban con miel. Los líquidos que habitualmente integran el jarabe son el agua destilada, soluciones extractivas, zumos y otros.

El jarabe de glucosa tiene un contenido equivalente de aproximadamente 20% m/m (expresado como D-glucosa sobre peso seco), y un contenido total de sólidos cercano al 70% m/m (Codex Stan 212-1999). El jarabe de glucosa es uno de los productos más empleados en la industria de la confitería y alimentos procesados. Para el caso de los helados, aporta textura, brillo y disminuye la temperatura de congelación. “En confitería se usa como anticristalizante del azúcar, regulador del dulzor, generador de brillo entre otros”.⁹

El jarabe de glucosa es importante para la industria, ya que tiene aplicaciones en procesos de producción de etanol y elaboración de cerveza, en la industria de alimentos (repostería, confitería, etc.) también impide la cristalización de la sacarosa y otros azúcares, tiene la capacidad de bajar el punto de congelación de algunas soluciones, obtiene buena higroscopicidad, también controla la coloración morena de los azúcares reductores en la superficie durante la cocción. “El jarabe de glucosa se obtiene por hidrólisis química o hidrólisis enzimática según los objetivos a cumplir, estos jarabes se pueden obtener de diferentes materias vegetales que son tratadas y llevadas a análisis químicos para obtener formación de moléculas de maltosa, glucosa, dextrinas y otros azúcares”.¹⁰

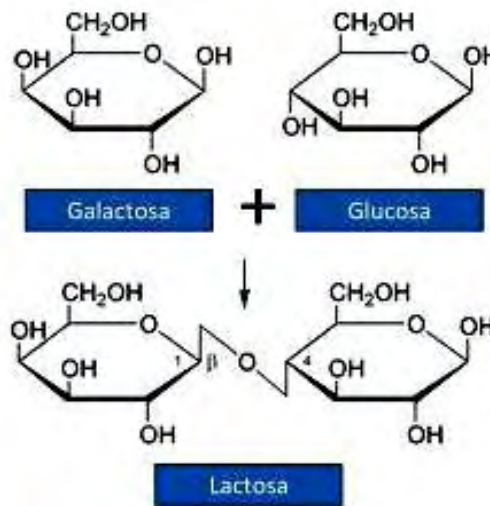
4.4 AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores son azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional), intacto, un grupo hemiacetal (una interacción entre C-2 y C-5,) que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. En solución acuosa, dicho grupo aldehído libre tiene la capacidad de reducción de agentes oxidantes. Las formas cíclicas hemiacetales de los azúcares tiene la potencialidad de generar trazas de la forma abierta (grupos aldehídos libres) (Genera, 2003).

⁹ Rodríguez Reinoso, C. E. (2011). Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (*musa cavendish*) para la obtención de jarabe de glucosa. Proyecto de grado. Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición, pp. 1-39

¹⁰ Armenta, E. I., & Rodríguez, C. (2004). Diseño construcción y montaje de dos bio-reactores para una planta a escala piloto destinada a la producción de jarabes de glucosa. Proyecto de grado, Facultad de Ingeniería Mecánica, Universidad Nacional de Santander, 1- 178.

Figura 2. Representación de estructura química de azúcares reductores.



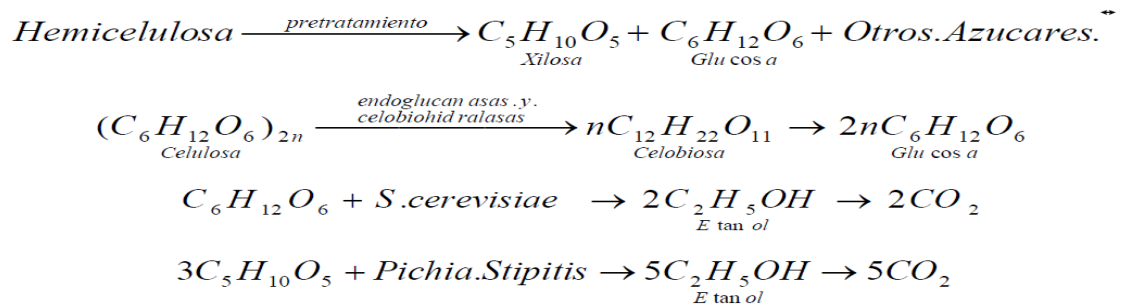
Fuente: Battaner, 2013.

Azúcares reductores son aquellos que como la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa presentan un carbono libre en su estructura y pueden reducir, en determinadas condiciones a las sales cúpricas (Genera, 2003).

4.5 PRE TRATAMIENTOS QUÍMICOS

El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de celulosa y lignina entrelazada por cadenas de hemicelulosa. El pre tratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para posteriores tratamientos. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pre tratamiento y la lignina se libera o incluso puede llegar a descomponer. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a una hidrólisis ácida empleando ácidos fuertes, un ejemplo de estos el ácido sulfúrico, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contienen principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios azúcares presentes en el material lignocelulósico pre tratado e hidrolizado (Amezquita, 2007). Este complejo proceso puede ser representado por las reacciones:

Figura 3. Conversión de diferentes compuestos.



Fuente: Amezquita, 2007.

Los objetivos fundamentales del pre tratamiento van encaminados a reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa – lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrolisis. Por su naturaleza, los pre tratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. Los pre-tratamientos químicos actualmente han recibido mucha atención por ser más simples y limpios que los otros. Por lo tanto en esta investigación se emplean tratamientos químicos, tanto como para la hidrolisis como también para la eliminación de lignina.

4.6 HIDRÓLISIS

Es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, donde la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. Es una reacción de gran importancia debido al gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente. Este término también puede aplicarse a reacciones en donde un ácido se añade al agua, en mayor o menor cantidad para acelerar una reacción; esta hidrólisis puede llevarse a cabo con ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos o por acción enzimática, la cual es la más utilizada industrialmente.

4.6.1 Hidrólisis Química. Las moléculas de celulosa, como todos los polisacáridos, se des-polimerizan por acción de los ácidos en caliente. Cuando los gránulos son expuestos a la acción de ácidos minerales muy diluidos y luego calentando esta mezcla se obtiene la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, retomando la moléculas a su forma original, es decir, a sus monómeros principales de D-glucosa. La hidrólisis ácida permite obtener jarabes de D-glucosa con ED (equivalente de dextrosa).

4.6.2 Hidrolisis Enzimática. La hidrólisis enzimática se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir, producen la ruptura de enlaces por agua según: $H-OH + R-R' \rightarrow R-H + R'-OH$. En algunos casos este grupo puede ser transferido por la enzima a otras moléculas y se considera la hidrólisis misma como una transferencia del grupo al agua.

4.7 ESPECTROFOTOMETRÍA

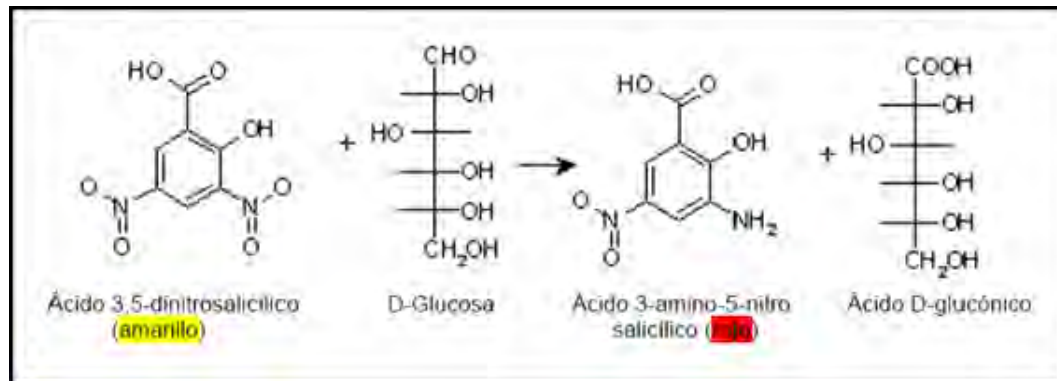
La espectrofotometría es la medición de la cantidad de energía radiante, dentro del espectro UV-visible, que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Dependiendo de la complejidad de una sustancia puede llegar a una infinidad de estados energéticos, las energías de las radiaciones electromagnéticas son cuantificadas. Por lo tanto, cada sustancia puede absorber ciertas radiaciones y otras no. La absorptividad es un factor que indica la capacidad de una sustancia para absorber una radiación determinada y junto con su curva espectral son parámetros utilizados como referencia para la identidad de un compuesto.

Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Díaz, 2009). Los factores fotométricos para la identificación de una sustancia, son: el espectro de absorción y la curva espectral o barrido de exploración de la sustancia.

4.7.1 Método de ácido 3,5 – dinitrosalicílico. Este método utiliza el ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS) para calcular la concentración de azúcares reductores en distintos materiales. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra. Este método ha sufrido varias modificaciones a través de los años para adecuarse al análisis de diferentes materiales y su principal ventaja radica en su alta sensibilidad y productividad debido a que es un método espectrofotométrico. El método del DNS no es recomendable utilizarlo para la determinación de azúcares reductores en muestras intensamente coloreadas como mieles y caldos de fermentación que la contengan.

El método de colorimetría DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico) se basa principalmente en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), (coloración que puede apreciarse en la figura 19). En la Figura 4 se muestra la reacción de óxido-reducción, antes descrita.

Figura 4. Conversión de los azúcares reductores mediante DNS.



Fuente: Miller, 1959.

4.8 FERMENTACIÓN

La fermentación alcohólica es una reacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación 1.



A simple vista puede resultar extraño que los microorganismos elaboren compuestos que no parecen tener ninguna función metabólica y que, en realidad no constituyen productos intermedios del catabolismo, como por ejemplo, el etanol y la acetona. Sin embargo, muchos metabolitos secundarios poseen propiedades anti-microbianas y por lo tanto, en el medio ambiente natural podrían ser implicados en procesos competitivos.

El proceso simplificado de la fermentación es:



Compuestos

Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *S. cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Z. mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínimo. A pesar de parecer, a nivel estequiométrico una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moles de alcohol y dos moles de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g etanol /g glucosa. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico.

Otro parámetro importante es la productividad (g/h/L), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen.

Los parámetros aquí mencionados se definen con relación a la fase y al modo de funcionamiento del bioreactor o fermentador que es el elemento central para la realización de la fermentación alcohólica.

4.8.1 Condiciones a controlar en una fermentación discontinua. Una vez que el sustrato y el organismo se han seleccionado es clave darles las condiciones adecuadas de operación y optimización del sistema. Desde el punto de operación es importante decidir las siguientes variables: temperatura, pH, °Brix, nutrientes estas variables se pueden medir de manera constante mientras que la productividad, o sea, biomasa, producto y consumo de sustrato, son variables que se pueden medir intermitentemente.

4.8.1.1 Temperatura. La temperatura ejerce un marcado efecto sobre la velocidad metabólica del organismo. La temperatura tiene una influencia directa sobre la velocidad de reacción y esta puede cambiar la configuración de los constituyentes celulares, especialmente de las proteínas y de los componentes de la membrana. La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras especialmente de la *S. cerevisiae* oscila entre 30 a 35°C. “La temperatura afecta al micro-organismo de manera notable, ya que si estos son de una especie dada solo pueden crecer en un rango de temperatura”.¹¹

4.8.1.2 Grados Brix. Una concentración de azúcar de 10 a 22% es satisfactoria, aunque a veces se emplean concentraciones demasiado altas que actúan de forma adversa sobre las levaduras pues el alcohol producido puede inhibir su acción (Hernández, 2003). No se puede pensar en fermentar un mosto con una concentración muy elevada de azúcares, en estas condiciones osmófilas las levaduras simplemente estallarían al salir bruscamente el agua de su interior para equilibrar las concentraciones de solutos en el exterior y en el interior de la célula, es decir lo que se conoce como una plasmólisis (Benavides y Pozo, 2008)

4.8.1.3 pH. El pH tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento. El pH óptimo para algunos organismos en especial para las levaduras se encuentra en un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH puede afectar su composición o la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último puede afectar la floculación de la biomasa o la adhesión a las paredes. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio.

4.8.1.4 Aireación. Aunque la producción de alcohol no requiere de oxígeno, en los primeros momentos de la fermentación es necesario una gran cantidad de este gas para la reproducción de las células de levadura en condiciones óptimas. Durante la fermentación pronto se desprende dióxido de carbono y se establecen las condiciones anaerobias.

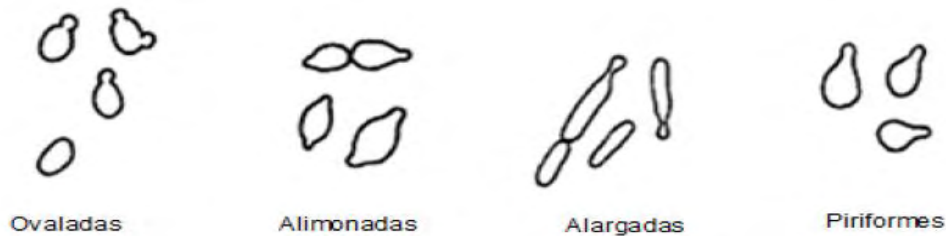
Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2% se asimila como material celular. *S. cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en base aeróbica se caracteriza por la producción de biomasa y en base anaeróbica generalmente por la producción de etanol.

¹¹ Nieto, G. (2009). Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Proyecto de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Pereira. Pp.77-81.

4.8.2 Levaduras. Las levaduras son bastante heterogéneas en su morfología y fisiología; sin embargo, la forma habitual en que se les encuentra es la unicelular. Algunas, además de la forma unicelular o de levadura, pueden presentar micelio. Ambas formas, en estos casos, dan simultáneamente en el medio donde se encuentra el microorganismo. Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizada en el suelo, en la superficie de las frutas, en el néctar de las flores y en ambientes acuáticos. La figura 5 ilustra las distintas formas de levadura que se pueden encontrar. “La *Saccharomyces cerevisiae* es la especie típica de fermentación alta de la industria cervecera, sus colonias son blandas, húmedas y color crema. Fermentan la galactosa, la sacarosa, la maltosa y la rafinosa y no utilizan nitritos”¹²

Saccharomyces cerevisiae es la levadura específica para la fermentación alcohólica, las células son de forma redondas ovales u oviformes, los límites de temperatura para la formación de células se encuentra entre 3 y 40 °C. El óptimo de temperatura para su desarrollo se encuentra alrededor de 30°C.

Figura 5. Esquema de distintas formas de levadura.



Fuente: García, 2004.

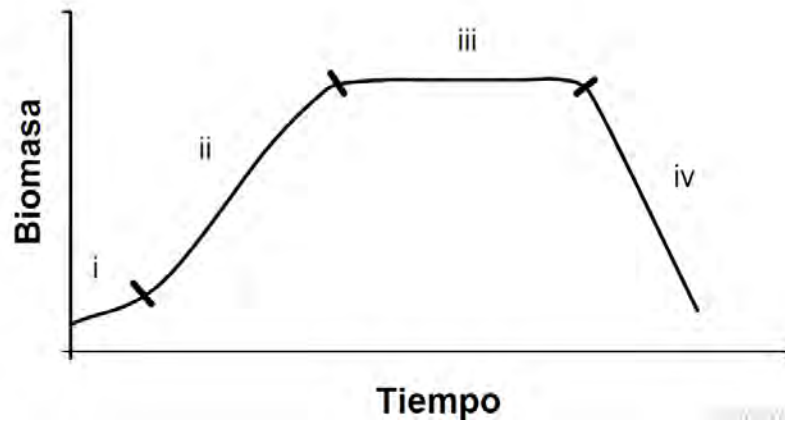
Es importante señalar que las condiciones ambientales influyen para que algunos hongos crezcan como filamentos o como levaduras. Este fenómeno, que se conoce como dimorfismo, se presenta en varios hongos patógenos.

4.8.2.1 Requerimientos nutricionales para las levaduras. Los azúcares constituyen el mejor alimento energético de las levaduras. Muchas pueden catabolizar la glucosa, ya sea en forma aerobia (respiración) o anaeróbica (fermentación). La mayor parte de las levaduras crecen mejor en medios en los que está disponible una buena cantidad de agua. En general requieren para su crecimiento menos humedad que las bacterias.

¹² Gonzales, S. (1978). Microbiología de las bebidas; Pueblos y Educación Ediciones; La Habana Cuba.

4.8.3 Curva de crecimiento de un microorganismo. La curva representa el comportamiento del crecimiento del microorganismo a través del tiempo, con base en ella, se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o metabolitos (primarios o secundarios). La figura 6 ilustra el crecimiento de un microorganismo en el tiempo.

Figura 6. Curva de crecimiento de levadura.



Fuente: Sánchez, 2011.

4.8.3.1 Fase de latencia (i). Representa el periodo de adaptación de la levadura a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. “En esta fase no existe aumento en el número de células debido a que la levadura utiliza la energía disponible para sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo medio”.¹³

4.8.3.2 Fase logarítmica o exponencial (ii). En esta fase las células se multiplican de manera exponencial. La velocidad de crecimiento puede ser cuantificado con base al número de células que se producen por unidad de tiempo. La fase termina cuando los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales se modifican ó cuando la célula produce metabolitos tóxicos que inhiben su reproducción.

4.8.3.3 Fase estacionaria (iii). En esta fase la velocidad de crecimiento de la levadura es igual a la velocidad de muerte. Una vez que se obtiene la máxima concentración de células, la producción de etanol disminuye.

¹³ Sánchez, A.M, Gutiérrez, A.I, Muñoz, J.A, & Barrero, C.A. (2010) “Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos, (Revista Tumbaga),” pp. 61-91.

4.8.3.4 Fase de muerte (iv). Es la fase en la que el número de muertes es mayor al número de nuevas células formadas. Esta fase continúa hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células resistentes o hasta que todas las células mueren.

4.8.4 Cinética química. El objetivo de la cinética química es el estudio de las velocidades de las reacciones químicas y de los factores de los que dependen dichas velocidades. “De estos factores, los más importantes son la concentración y la temperatura. Haciendo un estudio sistemático de los efectos de estos factores sobre las velocidades, se pueden sacar conclusiones sobre el mecanismo por el que se verifican las reacciones químicas”¹⁴.

Existen características que pueden verse directamente relacionadas con la obtención de datos experimentales, dos de los factores que podrían influir son la concentración de las especies químicas y el tipo de reactor, la primera se puede medir empleando diferentes técnicas, que pueden clasificarse en;

Métodos químicos: como volumetría o gravimetría de muestra extraídas del reactor a tiempos conocidos. En general, acostumbran a ser métodos lentos, por lo que no son indicados para estudiar reacciones rápidas. Pero incluso si la reacción es lenta puede ser necesario frenar la reacción en cada una de las muestras recogidas, mediante enfriamiento súbito, o añadiendo inhibidores que luego pueden también interferir en el análisis.

Métodos físicos, basados en la medida de alguna propiedad física directamente relacionada con la concentración de una o varias especies presentes en el medio. Suelen presentar la ventaja de que no es necesario perturbar el sistema reaccionante, como sucede al extraer muestras, sino que las medidas se realizan *in-situ*. Como inconveniente se encuentra la necesidad de realizar calibrados previos para relacionar la propiedad medida con la concentración. Algunos ejemplos de este tipo de métodos son las medidas de presión, espectrofotométricas, de conductividad térmica, del índice de refracción, o la cromatografía.

Los datos cinéticos se obtienen en el laboratorio a partir de experimentos en los que se hace reaccionar una mezcla de reactantes de concentración definida. El recipiente en el que tiene lugar la reacción se denomina reactor químico. En base a la variación de concentraciones que ha tenido lugar en el medio de reacción

¹⁴ Moreno, A. (2001). Cinética química, principios básicos. Instituto de Química. UNAM. pp. 7.

entre la entrada y la salida del reactor, o al transcurrir un determinado periodo de tiempo, se determina la velocidad de reacción experimental. En este caso debe considerarse que tipo de reactor se ha utilizado, puesto que la variación de concentración observada entra la entrada y la salida del reactor depende del reactor usado, mientras que la velocidad de reacción es una característica intrínseca del sistema químico y, por tanto, independiente del reactor. En base a esto, es recomendable utilizar reactores en los que se conozca perfectamente como circulan las moléculas por su interior, es decir, su modelo de flujo. En experimentos cinéticos se suelen emplear básicamente dos tipos de distintos reactores:

Reactores discontinuos: son los más utilizados, están constituidos por un recipiente cerrado en el que la mezcla de reacción se encuentra perfectamente agitada. Suele operar a temperatura y volumen constantes. Inicialmente, el reactor se carga con los reactantes y el sistema evoluciona según avanza la reacción. La velocidad de reacción se determina a partir de la variación de las concentraciones con el tiempo.

Reactores continuos: se alimentan de una corriente de composición constante y conocida de manera que el reactor opera en continuo. Normalmente se analiza la composición de la corriente de salida cuando el sistema ha alcanzado el estado estacionario. Los modelos de flujo más utilizados son los que más se aproximan a la situación de reactores ideales: el reactor continuo de mezcla perfecta y el reactor tubular de flujo de pistón. Los reactores de mezcla perfecta, ya sean en continuo o discontinuo, se suelen emplear para reacciones entre líquidos, reacciones en fase líquida que den lugar a otros sólidos y reacciones de líquidos con gases que borbotan. Los reactores de flujo de pistón son los más indicados para reacciones en fase gas o líquida catalizadas por sólidos por el mayor contacto entre la fase fluida y el sólido.

4.9 ETANOL

El etanol es un derivado de hidrocarburos simples (moléculas formadas por carbono e hidrógeno) y se caracterizan por tener un grupo oxidrilo (OH) unido a uno de los átomos de carbono. Al mezclarse con agua en cualquier proporción, da una mezcla azeotrópica. Su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ y su fórmula molecular es $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Es el más común de los alcoholes y se caracteriza por ser un compuesto líquido, incoloro volátil, inflamable, con un punto de ebullición de 78°C y de menor toxicidad.

El etanol está presente en diversas bebidas fermentadas tales como cervezas, vinos, licores. Desde la antigüedad se obtenía el etanol por fermentación anaeróbica de una disolución con contenido en azúcares con levadura y posterior destilación. Dependiendo del género de bebida alcohólica que lo contenga, el alcohol aparece acompañado de distintos elementos químicos que lo dotan de color, sabor, olor, entre otras características (Jiménez et al., 2008). A pesar de que el etanol se ha utilizado mayoritariamente como base en la producción de bebidas alcohólicas tiene además una serie de aplicaciones en la industria química, farmacéutica y automotriz (Cortes et al., 2008). El uso de alcoholes, tanto puros como sus mezclas para combustible, no es una idea reciente. En 1906 Henry Ford produjo un automóvil que podía trabajar con alcohol o con gasolina. En el Brasil se conocen estudios desde 1920 y en 1985 ese país producía cerca de 4,8 millones de t/año de alcohol, la mayoría dedicada a mezclas carburantes.

El etanol puede ser producido a partir de cualquier material biológico que contenga apreciables cantidades de azúcar o materiales que pueden ser convertidos a azúcar tal como son los almidones y la celulosa.

4.9.1 Aplicación. Además de usarse como bebida alcohólica, el etanol se utiliza ampliamente en muchos sectores industriales y en el sector farmacéutico, como principio activo de algunos medicamentos y cosméticos. Según su pureza el etanol recibe distintas denominaciones: Alcohol Industrial: Es alcohol etílico, normalmente de alta graduación, producido y vendido para cualquier uso, excepto bebidas. Se distribuye generalmente en forma de alcohol puro (96% en volumen), alcohol naturalizado (mezclado con sustancias amargas o tóxicas que lo convierten en no apto para consumo en licores) y mezclas de solventes de marca registrada. Muchas medicinas, productos alimenticios, condimentos y cosméticos no se podrían producir sin él. Se utilizan para producir vacunas, tónicos compuestos, jarabes, tintes, antisépticos, cloroformo, barbitúricos, pegamentos, cosméticos, detergentes, explosivos, tintas, cremas, plásticos y textiles.

4.9.1.1 Alcohol absoluto. Se usa como reactivo en laboratorio o en biomedicina, como combustible en motores de explosión y también en múltiples procesos industriales. Se produce deshidratando alcohol puro de 96%, por medio de ácido sulfúrico concentrado, cloruro de calcio anhidro o alúmina.

4.9.1.2 Gasolina oxigenada. Es una mezcla de gasolina con un compuesto que contiene oxígeno en su molécula, que mejora la combustión en los motores. A nivel mundial se han venido utilizando compuestos tipo éter (MTBE, ETBE, DIPE) y alcoholes (metanol, etanol). Los cual ayudan a que se produzca una mejor y limpia combustión.

4.9.1.3 Gasohol. Es un sustituto de la gasolina, hecho de una mezcla de gasolina y de 10% a 20% de etanol. El gasohol posee un octanaje más alto que la gasolina normal y quema a menor temperatura, por lo cual produce menores emisiones contaminantes.

4.10 DESTILACIÓN

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

Un líquido entra en ebullición cuando al calentarlo su presión de vapor se iguala a la presión atmosférica. En una destilación a vacío la presión en el interior del equipo se hace menor a la atmosférica con el objeto de que los componentes de la mezcla a separar destilen a una temperatura inferior a su punto de ebullición normal. Una destilación a vacío se puede realizar tanto con un equipo de destilación sencilla como con un equipo de destilación fraccionada. Para ello, cualquiera de los dos equipos herméticamente cerrado se conecta a un sistema de vacío-trompa de agua o bomba de vacío de membrana o aceite a través de la salida lateral del tubo colector acodado.

Un tipo de destilación a vacío muy utilizado en un laboratorio químico es la evaporación rotatoria. Este tipo de destilación se realiza en equipos denominados genéricamente rotavapores y se usa para eliminar con rapidez el disolvente de una disolución en la que se encuentra presente un soluto poco volátil habitualmente a temperaturas próximas a la temperatura ambiente, con lo que se minimiza el riesgo de descomposición del producto de interés que queda en el matraz de destilación.

4.11 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía de gases es una técnica muy utilizada para separar los diferentes compuestos volátiles de una muestra. La fase móvil es un gas inerte, (nitrógeno o helio) que transporta la muestra volatilizada en el inyector a través de la columna cromatográfica. La fase estacionaria generalmente está constituida por una columna de metil polisiloxano, o derivados de éste. Los diferentes compuestos se separan en función de su grado de volatilidad (punto de ebullición, peso molecular) y su afinidad por la fase estacionaria. Entre los detectores más

utilizados cabe mencionar el detector FID (ionización de llama) que por su alta versatilidad, hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos.

Para realizar una separación por cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura, esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas - líquido). Los componentes separados emergen de la columna a intervalos discretos y pasan a un sistema de detección adecuado, o bien se dirigen hacia un dispositivo de recogida de muestras.

5. METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló a nivel experimental en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial y en el laboratorio de bioquímica de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño ubicados en el municipio Pasto (Nariño) a una altura de 2527 m.s.n.m.

5.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA CÁSCARA DE NARANJA

Se obtuvo la cáscara de naranja en el sector conocido como parque infantil, en la ciudad de Pasto, (ver figura 7) se seleccionó la variedad valencia, la cual es la que usa los comercializadores del sector.

Luego de esto se hizo un primer lavado a la cáscara para retirar impurezas, seguido se retiró la pulpa y semillas contenidas dentro de la cáscara que queda después de la extracción del jugo, ya terminado esto, se hizo una reducción de tamaño para facilitar el secado (ver figura 8) que se realizó en una mufla THERMOLAB - DIES de la planta piloto de la Universidad de Nariño (ver figura 10), durante 3 horas aproximadamente a una temperatura de 110 °C, y finalmente se realizó la reducción de tamaño final en cortes triangulares usando un cuchillo común (ver figura 9).



Fuente: Esta Investigación

Figura 7. Obtención de la cáscara de naranja: Parque Infantil – Ciudad de Pasto.



Fuente: Este estudio.

Figura 8. Adecuación de la cáscara y primera reducción de tamaño.



Fuente: Este estudio

Figura 9. Secado y reducción final de tamaño.



Fuente: Este estudio

Figura 10. Mufla Thermolab – Dies.



Fuente: Este estudio

5.2 ELIMINACIÓN DE LIGNINA

La remoción de lignina se realizó empleando una solución de NaOH a una concentración de 0.1 N, se pesaron 30 g de cáscara seca, para esto se empleó una balanza analítica SETRA – HL- 410S (ver figura 11) y se adicionaron 100 ml de NaOH, se dejó reposar durante 15 minutos y luego de esto se agregó 0.816 gramos de sulfato de calcio, el cual evita la degradación de la celulosa causada por el hidróxido de sodio, y se dejó en reposo durante 3 horas (Hoyos y Pérez, 2005). Se separó la cáscara de la solución empleando un lienzo y se extrajo toda la solución (ver figura 12).

Figura 11. Peso de muestras en balanza analítica SETRA – HL- 410S y Remoción de lignina.



Fuente: Este estudio

Figura 12. Separación de la solución y la cáscara.

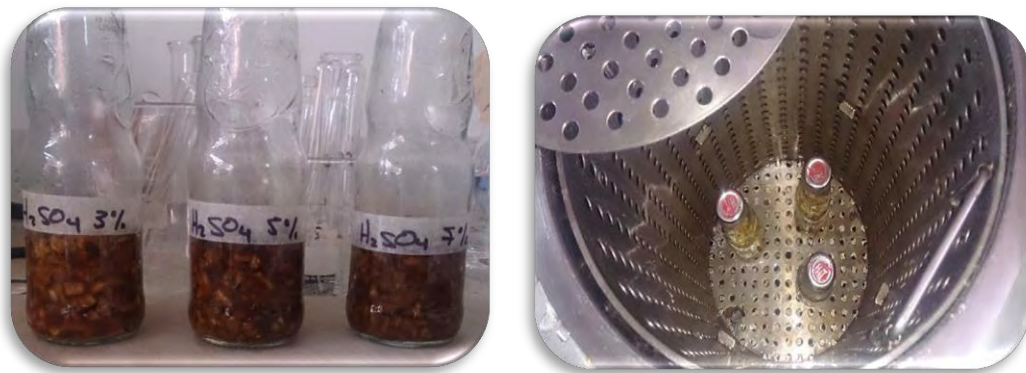


Fuente: Este estudio

5.3 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se usaron 3 concentraciones de ácido sulfúrico, 3%, 5% y 7%. A 30 g de cáscara se le agregó 50 ml de cada solución hasta cubrirla por completo y se reguló el proceso hidrolítico mediante una autoclave STERILOF (ver figura 14) en un rango de temperatura de entre 115 y 120 °C a 15 psi durante un tiempo de 30 minutos (ver figura 13). El hidrolizado se centrifugó a 7000 rpm durante 7 minutos en una centrifuga UNIVERSAL 320 (ver figura 15) para la obtención del jarabe glucosado (ver figura 16).

Figura 13. Hidrólisis ácida regulada mediante autoclave.



Fuente: Este estudio

Figura 14. Autoclave – STERILOF.



Fuente: Este estudio

Figura 15. Centrifugación de las muestras - Centrifuga UNIVERSAL 320.



Fuente: Este estudio

Figura 16. Jarabe glucosado.



Fuente: Este estudio

5.4 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

De acuerdo a Sánchez et al., 2010. Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el método de colorimetría DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico) y en primer lugar se realizó una curva de calibración de glucosa, empleando un patrón de glucosa anhidra (Sigma Aldrich), con una concentración de 4 g/L, luego de esto se realizaron diluciones en 8 tubos de ensayo (0-7) como lo muestra la siguiente tabla:

Tabla 3. Diluciones para curva patrón de glucosa

Tubo	Glucosa	Agua
0 (blanco)	0	1000 μ L
1	100 μ L	900 μ L
2	150 μ L	850 μ L
3	200 μ L	800 μ L
4	250 μ L	750 μ L
5	300 μ L	700 μ L
6	350 μ L	650 μ L
7	400 μ L	600 μ L

Fuente: Este estudio

A cada tubo se le agregó 1 ml de DNS, este se preparó utilizando 0,8 g de NaOH (Merck) + 15 g de tartrato de sodio y potasio (Panreac) + 0,5 g DNS (Panreac) hasta 50 mL con agua destilada, para luego ya listo el DNS agregarle a cada tubo y llevar a baño maría durante 5 minutos (ver figura 19), se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 10 ml de agua, el agua empleada fue de tipo II obtenida en el laboratorio de calidad de aguas de la universidad de Nariño, enseguida se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 (ver figura 20), de las respectivas diluciones en una longitud de onda de 540 nm. Se realizaron pruebas de absorción por triplicado tanto para la curva patrón como para los hidrolizados.

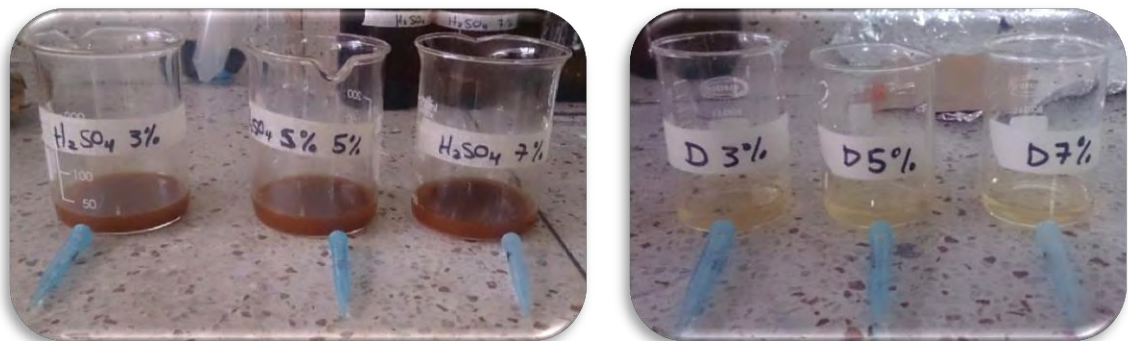
Figura 17. Preparación de diluciones para curva patrón de glucosa



Fuente: Este estudio

Para poder realizar la medición en el espectrofotómetro fue necesario realizar una dilución a cada jarabe, el factor de dilución empleado corresponde a 40 (ver ecuación 2), este factor se calculó tomando 250 μL de cada jarabe y agregando agua hasta un volumen de 10 ml, y cada muestra fue identificada de acuerdo al porcentaje de ácido sulfúrico empleado en la hidrolisis, como también la identificación de la diluciones (ver figura 18).

Figura 18. Ecuación 2. $FD = V_f / V_i = 10 \text{ ml} / 0.250 \text{ ml} = 40$



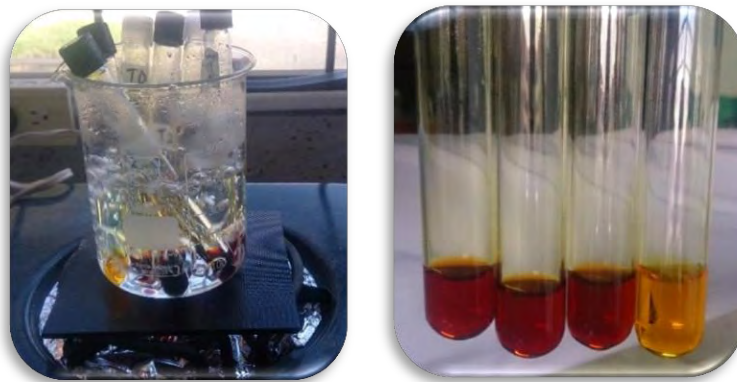
Fuente: Este estudio

Figura 19. Dilución de los jarabes.



Fuente: Este estudio

Figura 20. Baño maría y cambio de color en las diluciones de los jarabes.



Fuente: Este estudio

Figura 21. Espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300.



Fuente: Este estudio

De este modo se escogió la muestra con mayor concentración de azúcares reductores, ya que se espera que esta concentración presente un mayor rendimiento de etanol, y se continuó la etapa de fermentación.

5.5 FERMENTACIÓN

Para la fermentación se ajustó el pH del jarabe glucosado con mayor concentración de azúcares reductores, a un valor de 6 mediante la adición de NaOH al 30% y determinando la variable con un pH-Metro METTLER TOLEDO - SevenEasy (ver figura 21). *Saccharomyces cerevisiae* levadura comercial (levapan), fue la empleada en la fermentación en una proporción de 10% P/V y se activó utilizando agua a 35°C disolviendo por completo, se cubrió y se esperó 10 minutos hasta la aparición de burbujas y/o espuma, momento que indica que esta lista. También se agregaron nutrientes, 1,3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ según la metodología de Lareo et al., 2013.

Figura 22. Ajuste de pH- pH-Metro METTLER TOLEDO – SevenEasy.



Fuente: Este estudio

Tres erlenmeyers de 250 ml de capacidad fueron adaptados como biofermentadores, y se empleó en cada uno el volumen de trabajo de 100 ml (jarabe, sales y levadura) (Tasic et al., 2009; Hashem y Darwish, 2010; Khan et al., 2012), los erlenmeyers previamente esterilizados en una autoclave, a una temperatura aproximada de 115 – 120 °C durante 40 minutos, se taparon con corchos los cuales tenían dos agujeros para poder instalar dos mangueras de aproximadamente 5 mm de diámetro, una manguera era para el escape de CO_2 y la otra para la toma de muestras para obtener la cinética de los azúcares (ver figura 24). La temperatura de fermentación se reguló mediante un bombillo de 100 voltios, con un tipo de luz amarilla, el cual aportaba aproximadamente 34°C, valor

óptimo para el crecimiento de la levadura, el fermento se dejó por 88 horas a agitación constante. A cada erlenmeyer se lo recubrió con papel aluminio para evitar la alteración de la levadura debido al efecto de la luz, la cual provoca un estrés en la levadura incitando una inhibición en el proceso de conversión glucosa-etanol (ver figura22).

Figura 23. Adaptación de erlenmeyers como biofermentadores.



Fuente: Este estudio

Figura 24. Ambiente de fermentación.



Fuente: Este estudio

5.5.1 Determinación de la cinética de consumo de azúcares. Para determinar la cinética se realizaron 7 extracciones del fermento (ver figura24) en los siguientes órdenes de tiempo: 16, 23, 39, 46, 64, 70, 88 horas. Las muestras fueron diluidas empleando el factor 40, previamente determinado para los jarabes glucosados.

Figura 25. Toma de muestras para cinética de azúcares.



Fuente: Este estudio

16h 23h 39h 46h 64h 70h 88h

Figura 26. Muestras del biofermento a diferentes tiempos de reacción.



Fuente: Este estudio

La figura 25 indica la reacción de la glucosa con el DNS en el transcurso del tiempo de la fermentación, en el tiempo 16h se muestra al lado derecho la coloración naranja que corresponde a la muestra de fermentación, y al lado izquierdo la muestra referente (blanco).

5.6 OBTENCIÓN DE BIOETANOL

La solución acuosa del bioetanol producido durante la fermentación del jarabe glucosado se concentró por destilación a vacío. Para lo cual, se empleó un rotaevaporador LABOROTA 4000 - Heidolph (ver figura 26), que consta de una llave de conexión con la atmósfera, un refrigerante, un motor de giro, un matraz de destilación, un baño termostático y un matraz colector. Se trabajó el refrigerante a 4°C, el baño termostático a una temperatura de 78°C según la tabla 3-6: Lista de disolventes registrada en el manual del rotaevaporador (2012), y se usó una bomba con presión de 1000Pa, El procedimiento se hizo hasta la reducción del 10% en volumen de la mezcla de fermento inicial.

Figura 27. Destilación del bioetanol - rotaevaporador LABOROTA 4000 – Heidolph



Fuente: Este estudio

5.6.1 Cromatografía de gases

Figura 28. Equipo de Cromatografía GC-174A CHROMATOGRAPH SHIMADZU.



Fuente: Este estudio

Figura 29. Columna capilar DB – WAX.



Fuente: Este estudio

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de esta investigación y con el fin de dar respuesta a los objetivos planteados se desarrolló un diseño experimental completamente al azar. Se manejaron relaciones cáscara / ácido de 30g / 3%, 30g/5% y 30g / 7% según la metodología de Alvear *et al.*, (2009). Se manejaron replicas por triplicado para cada tratamiento.

Tabla 4. Diseño experimental para la hidrólisis

FACTOR	NIVEL
Cascara / Ácido Sulfúrico (Concentración del ácido)	30 - 3% 30 - 5% 30 - 7%

Fuente: Este estudio

Tabla 5. Matriz del diseño experimental para la hidrólisis

Relación cáscara (g) /ácido (%)	Símbolo	Número de Repeticiones
T1: 30 / 3	T1R _{1,2,3}	3
T2: 30 / 5	T2R _{1,2,3}	3
T3: 30 / 7	T3R _{1,2,3}	3

Fuente: Este estudio

T: tratamiento; R: repetición.

Las variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores en el jarabe obtenido, para ello se utilizó el método de colorimetría DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para los análisis estadísticos se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión 16.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos tanto para la hidrólisis ácida como para la obtención de bioetanol hidratado a partir de fermentación.

7.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SECADO DE LA CASCARA DE NARANJA

$$\text{Ecuación 3. \% Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100\%$$

Humedad inicial = 73.32 %

% humedad final = 11 %

El % de humedad inicial resulta semejante al obtenido por Gerena, (2013), en donde obtuvo un valor de humedad de 74, 28%, otros autores como Cerón y Cardona, (2011), reportan un 85,8% y Tejada et al., (2010), reporta 69,36% la variación entre resultados puede ser atribuido a factores como la especie de naranja y forma de secado.

7.2 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

7.2.1 Elaboración de curva de patrón de glucosa. La intensidad de la coloración rojo ladrillo presente en cada patrón es función de la cantidad de azúcares reductores (glucosa) en las muestras (Ver Figura 29) debido a que el ácido 3,5 dinitrosalicílico de color amarillo se une a la glucosa produciendo ácido 3-amino-5-nitro salicílico que posee color rojo. En base a Fajardo y Sarmiento, (2007). se empleó una longitud de onda de 540 nm debido a que en este valor según los autores evita una posible interferencia de luz externa que pueda influir en las absorbancias de las soluciones, tanto para las soluciones de la curva patrón como para las muestras de hidrolizado.

Figura 30. Soluciones para elaboración de la curva patrón.



Fuente: Este estudio

Tabla 6. Resultados de la Prueba de DNS para glucosa

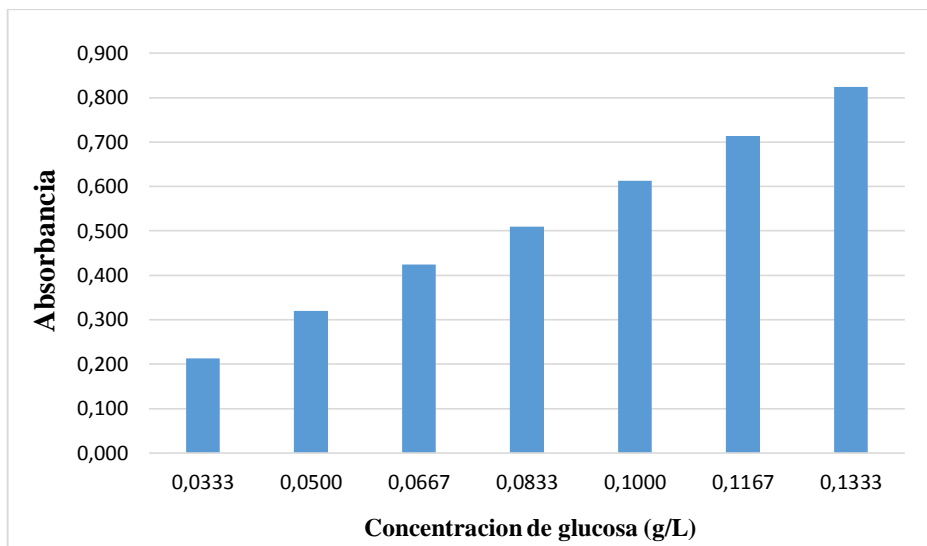
Tubo	AR g/l teórico	AR g/l practico	Abs ^a 1	Abs ^a 2	Abs ^a 3	Abs ^a Promedio	DE ^b	CV ^c
(blanco)	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,033	0,034	0,220	0,211	0,209	0,213	0,0059	2,746%
2	0,050	0,051	0,336	0,301	0,322	0,320	0,0176	5,510%
3	0,068	0,068	0,434	0,416	0,422	0,424	0,0092	2,161%
4	0,083	0,082	0,495	0,517	0,516	0,509	0,0124	2,439%
5	0,100	0,099	0,595	0,617	0,626	0,613	0,0159	2,603%
6	0,117	0,116	0,728	0,712	0,698	0,714	0,0176	2,466%
7	0,133	0,134	0,811	0,818	0,823	0,824	0,0168	2,041%

Fuente: Este estudio

a: Absorbancia; b: Desviación Estándar; c: Coeficiente de Variación; AR: azúcares reductores.

La tabla 6 muestra los resultados por triplicado de la prueba de DNS para 7 soluciones de concentración variable de glucosa, con las que se realizó una curva patrón con el promedio de los datos. En base al cálculo de la desviación estándar que son valores cercanos a 0 y el coeficiente de variación que son valores cercanos a 1, indica que la variabilidad o dispersión entre los datos no es significativamente grande.

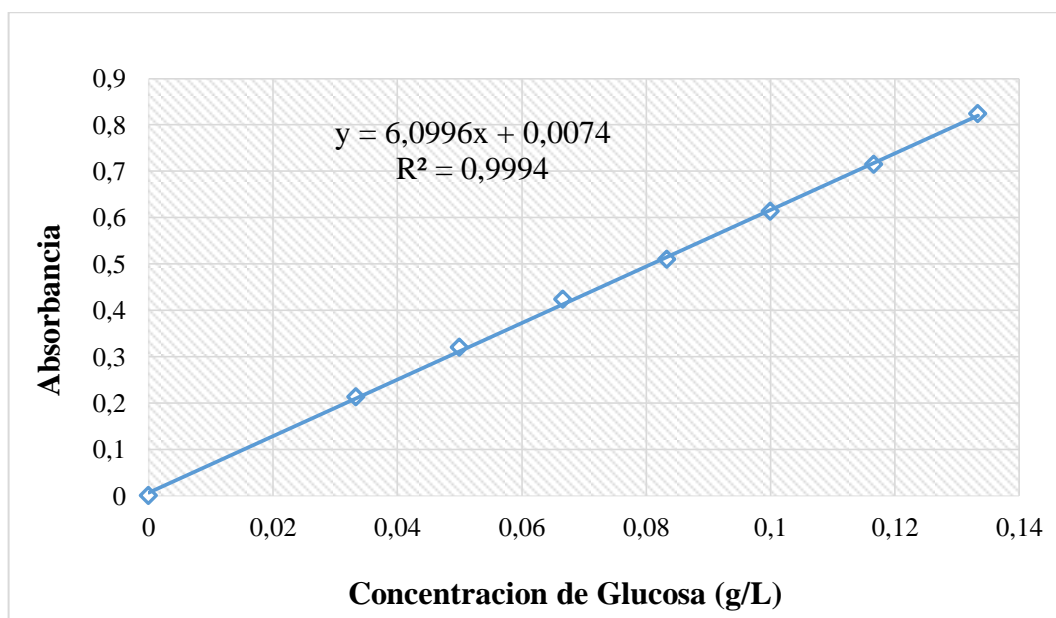
Figura 31. Gráfico de barras comparativo para soluciones de glucosa de la curva patrón.



Fuente: Este estudio

La figura 30 indica que existe una diferencia proporcional entre todas las concentraciones y la absorbancias de la curva patrón de glucosa.

Figura 32. Curva patrón de glucosa.



Fuente: Este estudio

De la figura 31 se obtuvo la ecuación: $Y = 6,0996X + 0,0074$, donde Y es la **absorbancia** y X es la concentración de **glucosa**. Se obtuvo un $R^2 = 0,9994$, lo cual evidencia relación entre variables ya que el coeficiente de determinación es muy cercano a 1. Esta ecuación de la recta permite realizar la cuantificación del analito, que para este caso son los azúcares reductores de las muestras hidrolizadas.

La medida de la concentración mediante un método instrumental se basa en la existencia de una relación proporcional entre dicha concentración y la señal analítica o respuesta que genera un instrumento. Generalmente esta relación es lineal de modo que puede expresarse como $y = a + b \cdot C_A$ donde C_A es la concentración del analito, y es la señal medida, a la ordenada en el origen y b la pendiente en la recta. La ecuación de la recta se obtiene mediante calibración con diluciones de concentración perfectamente conocidas (diluciones patrón) a partir de la medida de la señal analítica proporcionada por éstas. Los pares de valores **concentración –señal** se ajustan a una recta, a partir de la cual pueden obtener la concentración del analito en muestras conocidas o desconocidas, es por esto que la curva patrón es pieza clave en la cuantificación de los azúcares reductores a cuantificar en este estudio.

7.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS HIDROLIZADAS

Tabla 7. Resultado de las muestras hidrolizadas

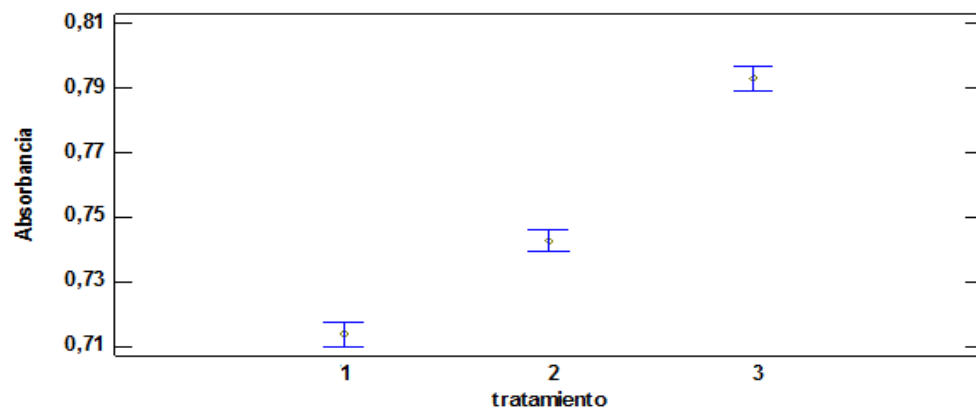
T	R1	R2	R3	Prom Abs	Concentración AR (g/l) * FD	DE*	CV*
1 (3%)	0,70 9	0,718	0,714	0,714	4,592	0,0045092 5	0,632%
2 (5%)	0,74 7	0,742	0,739	0,743	4,768	0,0040414 5	0,544%
3 (7%)	0,79 2	0,797	0,795	0,795	5,120	0,0025166 1	0,317%

Fuente: Este estudio

AR: Azúcares reductores; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; PromAbs: promedio de absorbancia.

En la tabla 7 se puede ver que el menor valor de Desviación Estándar (0,00251661) corresponde al T3 (7%), esto da a entender que los valores obtenidos para ese tratamiento no poseen una diferencia estadística significativa entre la media de los mismos, también muestra un resultado menor para el Coeficiente de variación (0,316688%) indicando un homogeneidad entre los resultados.

Figura 33. Comparación de medias de absorbancia para cada tratamiento.



Fuente: Este estudio

La figura 32 indica la diferencia entre las medias para cada tratamiento y la diferencia estadísticamente significativa para el T3 (7%) en comparación a los T1 (3%) y T2 (5%), esta diferencia también se ve reflejada en los resultados de azúcares reductores obtenidos para el T3 (7%), que por esta razón fue el tratamiento escogido para la fase siguiente de fermentación.

Figura 34. Comparación de medias de concentración de AR (g/L) para cada tratamiento.



Fuente: Este estudio

La figura 33 indica las concentraciones de azúcares reductores para cada tratamiento, se observó que a medida que se aumenta la concentración de ácido sulfúrico aumenta la concentración de azúcares reductores, el valor más alto de las tres concentraciones fue el del T3 (7%) con un resultado de 5,120 g/L de azúcares, esto se debe al incremento de la actividad de los iones hidrógeno que participan en la reacción como catalizadores al tener una mayor cantidad de ácido en este tratamiento (Tasic et al., 2009). La sinergia que existe entre el ácido como agente catalizador y la temperatura a favor de la hidrólisis da como resultado mayor concentraciones de azúcares reductores, tal como la glucosa, aun así se hace necesario el control de estos parámetros para evitar una posible degradación de los productos de hidrólisis deseados a carbón (C), dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O).

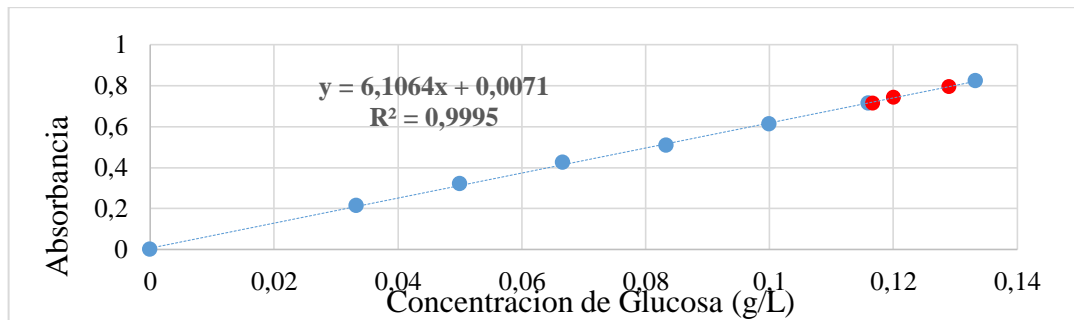
Tabla 8. Resultados de verificación de varianza - nivel de confianza de 95%

<i>Comparación tratamiento</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
1 / 2	0,00430921	0,00304342	1,0244	0,0489
1 / 3	0,00430921	0,00103208	4,37777	0,0257
2 / 3	0,00402135	0,00123102	3,24444	0,0310

Fuente: Este estudio

La tabla 8 indica los resultados del análisis de varianza para los tratamientos, se observó que los P-valor para cada uno de los tratamientos es menor a la referencia de 0,05, esto da a entender que existe una diferencia estadística significativa entre cada tratamiento. Es decir que estadísticamente el T3 (7%) es el de mayor significancia entre los demás tratamientos.

Figura 35. Comparación de la concentración de expresados como glucosa de muestras hidrolizadas en relación a la curva patrón.



Fuente: Este estudio

La figura 34 indica la concentraciones de azúcares reductores de las muestras de cascara de naranja hidrolizadas, los resultados obtenidos se encuentran dentro de la curva patrón de glucosa en un rango de 0 – 0,134 g/L.

Los puntos rojos en la gráfica corresponden a las muestras hidrolizadas y los puntos azules a las diluciones de la curva patrón. De acuerdo al resultado para azúcares reductores con cáscara de naranja con un valor que fue de 5,120 g AR / 30 g de residuo seco, es decir: 17,06 g AR/ 100 g de residuo seco.

La diferencia entre el resultado de este estudio y el de Genera, (2013) que es de 19, 27 g AR / 100 g de residuo seco, puede deberse a la no eliminación total de lignina, como también, al tiempo de hidrolisis de la celulosa, ya que por la misma naturaleza química y ubicación en la pared celular se requiere separarla de la lignina para exponer los enlaces glucosídicos a la acción química, argumentos que concuerdan con Zhou et al., 2011.

7.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN

Volumen de inyección en cromatógrafo: 1 μ L

% de etanol obtenido: 83,38%, asumiendo que este % es un volumen y teniendo que cuenta que el destilado está altamente concentrado de alcoholes. Entonces el destilado tendrá 83,38 °GL.

De acuerdo a los datos obtenidos de destilado de 10 ml y los volúmenes manejados de fermento de 100 ml, entonces 90 ml serian de agua separada. Para encontrar el valor de la concentración de etanol en el fermento, se puede aplicar:

$$83,38 \text{ }^\circ\text{GL} \times 10 \text{ ml} = C_2 \times 100 \text{ ml}$$

$$C_2 = 8,338 \text{ }^\circ\text{GL} \quad \longrightarrow \quad 8,338 \text{ }^\circ\text{GL} / 100 \text{ ml de fermento}$$

100 ml se prepararon a partir de 30 g cáscara entonces:

$$C_2 = \frac{8,338 \text{ ml etanol}}{30 \text{ g cáscara}} \times \frac{0,789 \text{ g}}{1 \text{ ml}} = 0,219 \frac{\text{g etanol}}{\text{g cáscara}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 219,28 \frac{\text{mg etanol}}{\text{g cáscara}}$$

Estos valores obtenidos son similares a los reportados por Tejada et al., (2010) quienes obtuvieron 84,6 mg de etanol / g de cáscara, la variación entre datos puede deberse a la variedad de la naranja, al proceso de hidrolisis, al proceso de eliminación de lignina y a los diferentes factores de fermentación empleados.

7.4.1 Cinética de la fermentación

Tabla 9. Resultados de cinética de azúcares

Tiempo (horas)	Recuento	Abs Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
T0	3	0,795	0,002517	0,316688%
T16	3	0,772	0,002082	0,288453%
T23	3	0,743	0,002	0,306279%
T39	3	0,644	0,003056	0,593983%
T46	3	0,524	0,003	0,707547%
T64	3	0,277	0,004510	1,42098%
T70	3	0,214	0,002517	1,12182%
T88	3	0,155	0,004041	3,50415%

Fuente: Este estudio

Abs: Absorbancia.

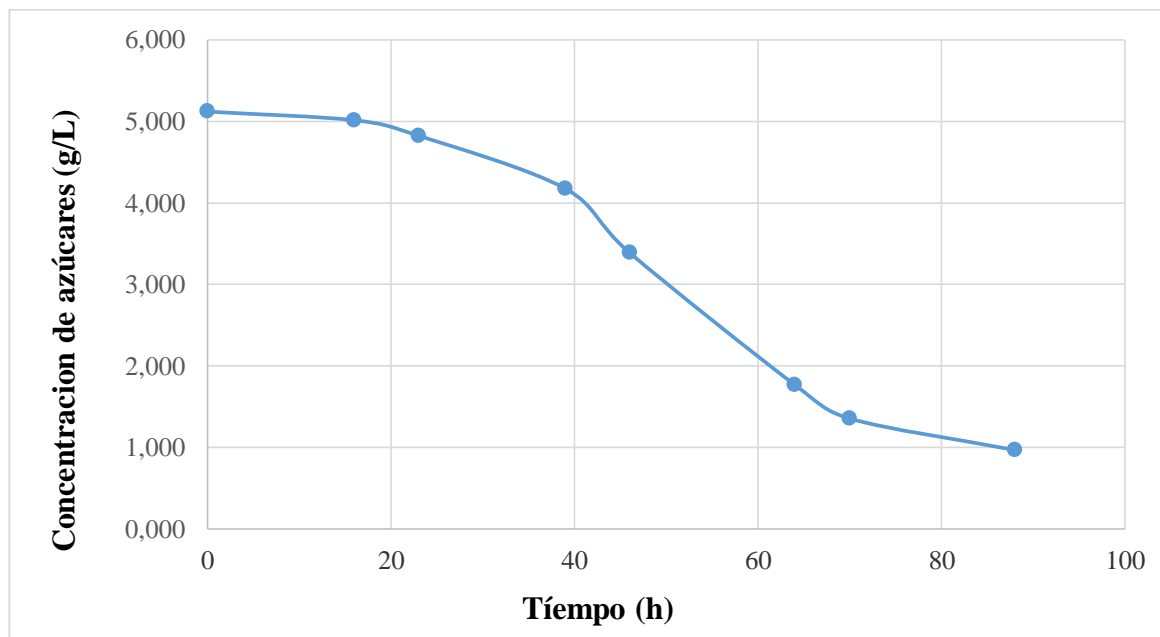
La tabla 9 muestra los resultado obtenidos de la cinética realizada a los azúcares de la fermentación, observando que la desviación estándar para cada resultado es baja, esto indica que no existe una diferencia estadística significativa entre los datos de las réplicas y la media de los mismos, pasa de igual forma para los resultados de coeficiente de variación, los valores obtenidos demuestran homogeneidad entre los mismos.

Tabla 10. Resultados del seguimiento al consumo de azúcares

Tiempo (horas)	Absorbancia promedio	Azúcares (g/L)	Factor de dilución (40)(g/L)
t0	0,795	0,129	5,120
t16	0,772	0,125	5,014
t23	0,743	0,121	4,824
t39	0,644	0,104	4,175
t46	0,524	0,085	3,388
t64	0,277	0,044	1,768
t70	0,214	0,034	1,355
t88	0,155	0,024	0,968

Fuente: Este estudio

Figura 36. Curva de seguimiento a azúcares reductores durante la fermentación.

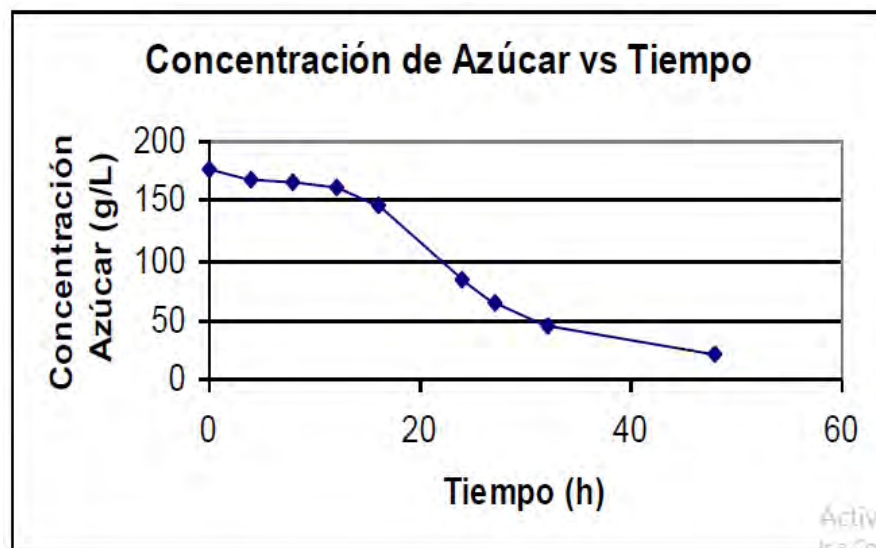


Fuente: Este estudio

La tabla 10 y figura 35 indican los resultados obtenidos en la cinética de azúcares para la fermentación, en la curva se puede observar que hasta el tiempo 23 h no existe una disminución de azúcares notoria, esto debido a que en ese rango de tiempo la levadura empleada se encuentra en el fase de latencia, debido a que el inóculo fue transferido a un medio fresco, este periodo es corto, debido a que el

inoculo tuvo un periodo de acondicionamiento (activación) previo en 30 ml del fermento. Después de este periodo se da la fase exponencial, en donde las células en crecimiento están en el estado fisiológico más sano y la fermentación es notoria ya que se generan cantidades observables de gas y espuma, además presenta disminución en forma lineal de la concentración de azúcares hasta las 64 horas. A medida que transcurre el tiempo y la cantidad de microorganismo aumenta debido a las condiciones favorables del medio, la caída de azúcares es mayor, se genera así un limitante para el proceso fermentativo, considerando que el sistema usado para este proceso fue discontinuo, por ello entre las 64 h y 88 h del ensayo se observa como la tendencia de la curva es a mantenerse constante, indicando que la población de levadura está entrando en fase estacionaria, por lo que se detiene el proceso de fermentación.

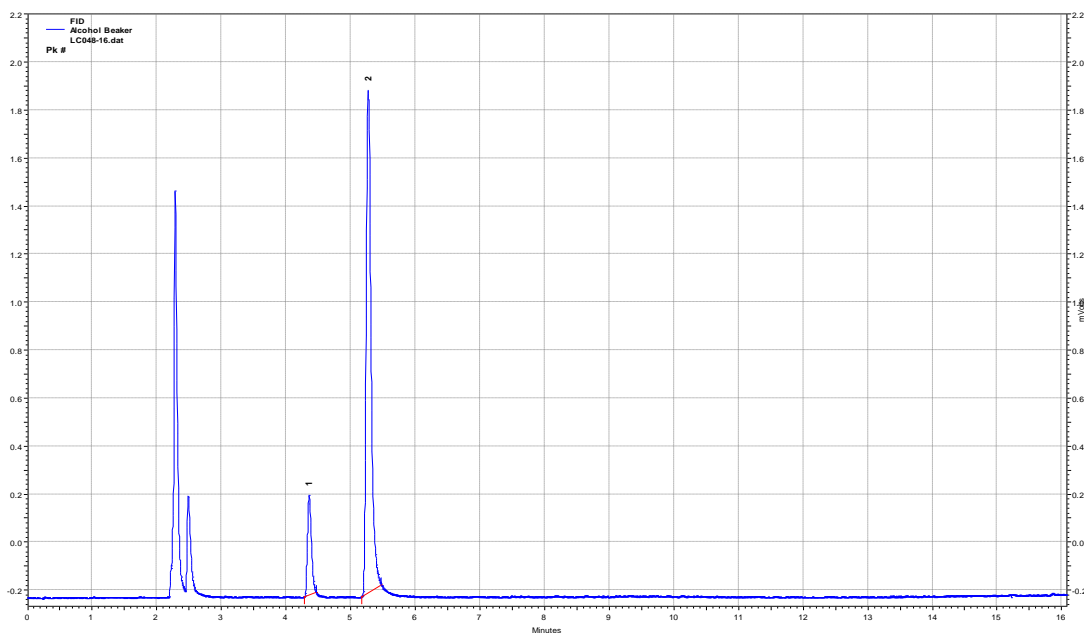
Figura 37. Curva de seguimiento a azúcares reductores durante la fermentación.



Fuente: Garzón y Hernández, (2009).

7.4.2 Análisis cromatográfico para el bioetanol obtenido

Figura 38. Cromatograma del bioetanol obtenido.



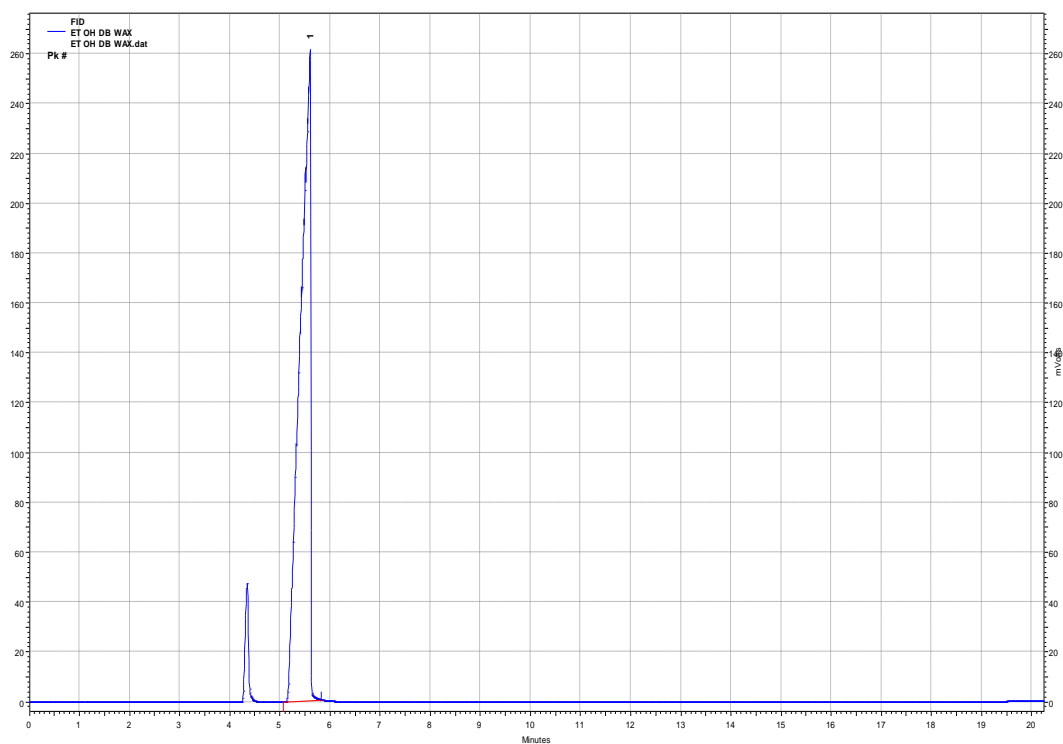
Fuente: Este estudio

Tabla 11. Resultados de áreas de bioetanol

FID Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
4.356	1741	13.79	417	16.62
5.268	10885	86.21	2092	83.38
Totals	12626	100.00	2509	100.00

Fuente: Este estudio

Figura 39. Cromatograma estándar de etanol.



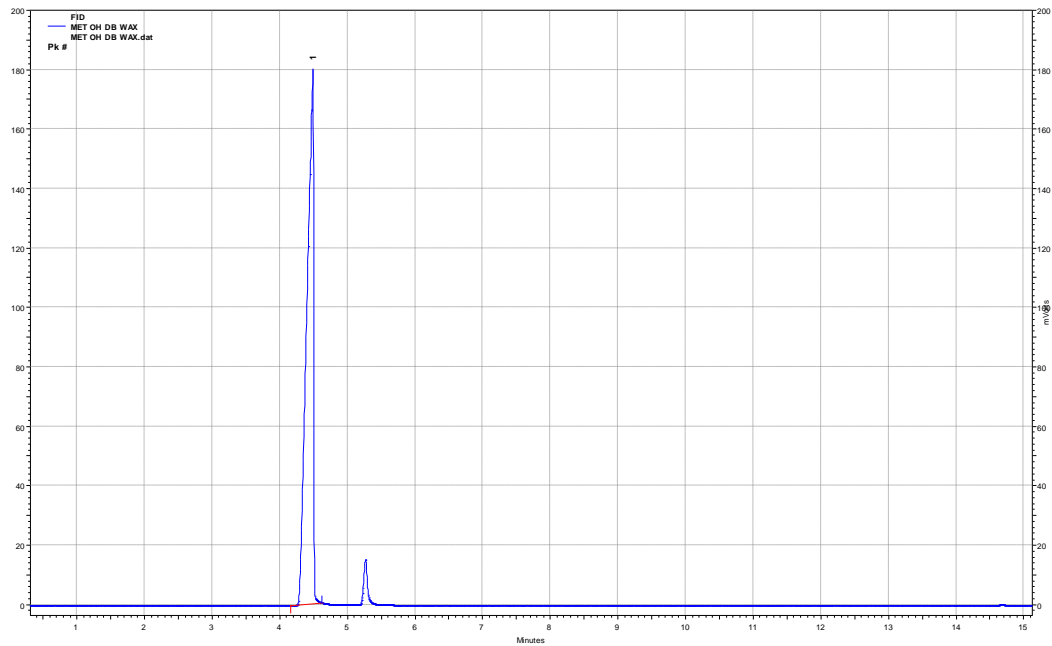
Fuente: Este estudio

Tabla 12. Resultados de áreas de etanol estándar

FID Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.601	3746013	100.00	261504	100.00
Totals				
	3746013	100.00	261504	100.00

Fuente: Este estudio

Figura 40. Cromatograma estándar de metanol.



Fuente: Este estudio

Tabla 13. Resultados de áreas de metanol estándar

FID Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
4.490	1207240	100.00	180119	100.00
Totals				
	1207240	100.00	180119	100.00

Fuente: Este estudio

Como se observa en el cromatograma del bioetanol obtenido (ver figura 33) el tiempo de retención es de 5.268 minutos, este resultado es similar al cromatograma estándar de etanol el cual tiene un tiempo de retención de 5.601 minutos, esto demuestra que lo obtenido si es etanol. Para el segundo compuesto con tiempo de retención de 4.356 minutos, este resultado es comparable para el estándar de metanol, el cual tiene un tiempo de retención de 4.490 minutos, valores que se asemejan entre si e indican la presencia de metanol en la muestra obtenida de la fermentación, estos resultados concuerdan también con lo reportado por Benavidez y Sosa, 2014 y por Garzón y Hernández, (2009).

CONCLUSIONES

La eliminación de lignina es una parte importante del proceso de obtención de etanol, ya que influye en los rendimientos de azúcares reductores, debido a que el NaOH puede arrastrar glucosa cuando se realiza el proceso.

El tratamiento con la mayor obtención de azúcares fermentables fue el T3 (7%) que obtuvo 17,06 g AR/ 100 g de residuo seco, valor similar al reportado por Genera, (2013) que es de 19, 27 g AR / 100 g de residuo seco.

Se obtuvo un valor de 219,28 mg de etanol / g cáscara en la fermentación, dato que demuestra que la obtención de bioetanol a partir de residuos como la cáscara de naranja son altamente atractivos para la industria.

El montaje utilizado para los biofermentadores permitió el seguimiento y control de las variables que se deben tener en cuenta en un proceso de fermentación (agitación, pH, temperatura y consumo de azúcares) generando las condiciones óptimas para llevar a cabo la fermentación y permitiendo así el seguimiento a la cinética de los azúcares.

La cáscara de naranja es un residuo desvalorizado que puede llegar a ser una biomasa residual de gran interés, debido a alto contenido de azúcares y sus rendimientos en cuanto a bioetanol.

RECOMENDACIONES

Realizar el mismo estudio investigativo a escala piloto para determinar las condiciones óptimas en obtención de etanol y así posteriormente una posible viabilidad a escala industrial.

Realizar una investigación aplicando hidrólisis enzimática con posterior fermentación y comparar los rendimientos de etanol con los de este estudio realizando optimización de los mismos para seleccionar la mejor metodología de hidrólisis en la producción de etanol a partir de cascara de naranja.

Realizar estudios de investigación con sacarificación y fermentación simultáneas con el empleo de enzimas para llevar a cabo la hidrólisis con el fin de evaluar los dos tipos de hidrólisis y su efecto en la producción de etanol.

Realizar estudio de fermentación empleando otro tipo de microorganismos como *Zymomonas mobilis* y cepas de levaduras modificadas para la determinación del método más eficiente, comparando el método realizado en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo Berger, V., & Ramirez Diaz, D. M. (2001). Análisis técnico y económico de la pectina, a partir de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*). Proyecto de grado, Universidad de san Buenaventura Cali, 12-75.

Alvear, M. R., C. R. Castillo, D. L. Henao, W. Marimón, C. N. Tejada, L. P. Tejada, A.

Villabona., (2009). Estudio de la hidrólisis ácida de cáscaras de naranja *citrus sinensis* para la obtención de etanol. Proyecto de grado, Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Sede Piedra de Bolívar, Colombia. p. 6.

Armenta, E. I., & Rodriguez, C. (2004). Diseño construcción y montaje de dos bio-reactores para una planta a escala piloto destinada a la producción de jarabes de glucosa. Proyecto de grado, Facultad de Ingeniería Mecánica, Universidad Nacional de Santander, 1- 178.

Aya, A., Pineda, C., Sánchez, J., & Cardona, A. (2005). Análisis comparativo de diferentes materias primas amiláceas para la obtención de alcohol carburante. En XXIII Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Centro de Estudios de Ingeniería Química, Manizales.

Amezquita, N., (2007). Obtención de etanol por la fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático del bagazo de caña de azúcar. Proyecto de grado, Universidad del cauca. pp. 22-24.

Benavidez, D., Sosa, W. (2014). Evaluación de biomasa residual de la papa (*solanum tuberosum*) como sustrato para la producción de etanol hidratado en el departamento de Nariño. Proyecto de grado. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. pp. 87-88.

Betancur, M. & Gomez, C. (2011). Un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. pp. 158-166.

Benítez, T., Tovar, T., Ortiz, V., Dunoyer, A., Alvear, M., Castillo, C. & Madariaga, N. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*. pp. 120-125.

Battaner Arias, E. (2013). *Biomoléculas: Una introducción estructural a la Bioquímica: [EPUB] (1ª ed.)*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca.

Cerón Salazar, I., y Cardona Alzate, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. *Ingeniería y Ciencia*, pp. 65-86.

Chandel, K., Chan, S., Rudravaram, R., Narasu, M., Rao, L. & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol. 2(1). pp. 14-32.

Castro, E. (2003). *Análisis instrumental I*. Segunda edición. Bogotá D.C. Universidad tecnológica de Pereira. pp.111y 121.

Cardona, C. A. (2004). Biodegradación de residuos orgánicos en plazas de mercado. *Revista colombiana de biotecnología*, Vol. VI. No 2. , pp.78-89.

Ceron, V., Velasco, L., y Pardo, F. (2011). Evaluación ambiental de la producción de etanol a partir de yuca (*Manihot esculenta, Crantz*), variedad M-THAI 8. *El Hombre y la Máquina*. pp. 84-94

Cortes, M., Gonzales, S. & Alvares, M. (2008). Colombia en la era del alcohol carburante. *Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Vol. (3). ISSN 1900-9607/. pp. 13.

Cardona, C. y Sanchez, O. (2006). Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy*. pp. 2447-2459. doi: 10.1016/j.energy.2005.10.020.

Castillo, K. (2013). Determinación de parámetros de co-cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol. Proyecto de grado. Universidad Iberoamericana. Ciudad de México. pp. 9.

Catálogo Restek de cromatografía. GC Applications Alcohols. Alcohols Stabilwax. pág. 752.

Corporación Universitaria Lasallista. (2012). Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. (Serie Lasallista Investigación y Ciencia).pp.11-12.

Díaz, N. (2009). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Campus Universitario de Rabanales. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Montería, Colombia..pp. 71.

Eia, R., (2004). Alcohol carburante: actualidad tecnológica. pp.39-46.

Fermentación. Springer Plus. Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. pp. 11. Montevideo, Uruguay.

Fukuda, H., Kondo, A. y Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. Biochemical Engineering Journal. Vol. 44(1). pp. 2-12. doi:10.1016/j.bej.2008.11.016.

Fennema, O. (2000). Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España. P. 228-240.

Fajardo, E. y Sarmiento, S. (2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Proyecto de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias basicas. Bogota. Pp. 33-36.

Garzón, S. y Hernández, C., (2009). Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 Y *Candida utilis* ATCC 9950. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. pp. 75.

Guala, M., Elder, H., Perez, G. & Chiesa, A. (2009). Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L.

obtenidas por Destilación al Vacío. Información Tecnológica-Vol. 20 N°2-2009, pp. 83-88

Gomis V. (2008). Tema 3. Cromatografía de gases. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial.

Galanakis, C. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Food Science y Technology*. pp. 68-87.

Gonzales, S. (1978). Microbiología de las bebidas; Pueblos y Educación Ediciones; La Habana Cuba.

García, C. (2004). Introducción a la microbiología. Editorial EUNED. Edición 2. pp. 109.

Gerena, Flor. (2013). Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*citrus sinensis l var valencia*) y papa (*solanum tuberosum*) variedad diacol capiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Proyecto de grado. Universidad Nacional abierta y a distancia "UNAD" escuela de Ciencias Básicas tecnología e Ingeniería Duitama. pp. 35-36.

Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 40(2), 45-50.

Hoyos, L. & Pérez, Y. (2005). Pretratamiento del Material Lignocelulósico de la planta de banano y su fruto para la producción de jarabe. Proyecto de grado. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. pp. 42-44.

Hashem, M. & Darwish, I. (2010). Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass and Bioenergy, Vol. 34(7). pp. 953-959.

Heredia, E., Trigubó, A., Gilabert, U., Cánepa, H., D'Elía, R. & Marrero, J. (2000). Purificación del Cd por destilación en vacío dinámico. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. pp. 28 - 31.

Hernández, A. (2003). Microbiología industrial. Editorial EUNED. Edición 1. pp. 39.

Izmirlioglu, G. & Demirci, A. (2012). Ethanol Production from Waste Potato Mash by Using *Saccharomyces Cerevisiae*. Applied Sciences, Vol. 2(4). pp. 738-753. Available at: <http://www.mdpi.com/2076-3417/2/4/738/> [Accessed February 28, 2013].

Izquierdo, J., Cunill, F., Tejero, J., Iborra, M., Fite, C. (2004). Cinética de las reacciones químicas. Departamento de ingeniería química. Facultad de química. Ediciones universidad de Barcelona. pp. 44.

Jimenez, S., Linda, L. & Acevedo, E. (2008). Evaluación comparativa de la actividad fermentativa de Células libres e inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre cáscaras de naranja y gluten. Proyecto de grado. Cartagena, Colombia. pp 35.

Kafarov, V., Ojeda, K. & Sánchez, E. (2006). Situación y perspectiva de biocombustibles en Colombia. Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural.

Khan, R., Nawaz, A., Ahmed, M., Khan, M., Azam, F., Ullah, S. & Khan, N. (2012). Production of bioethanol through enzymatic hydrolysis of potato. African Journal of Biotechnology, Vol. 11(25). pp. 6739-6743.

Lal, R., (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel. Environment international, Vol. 31(4). pp. 575-84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788197> [Accessed March 1, 2013].

León, J. (2009). Los Biocombustibles. Conferencia ARPEL. Punta del Este. pp. 6. Montevideo, Uruguay.

Lachman L., Lieberman H (1986). The theory and practice of industrial pharmaceutical. 3 ed., Ed Lea & febiger E.U.A. pp 502-532.

Lareo, C., Ferrari, M., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie,V., Ramírez, M. & Martínez, J. (2013). Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. Springer Plus. Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. pp. 11. Montevideo, Uruguay.

Monsalve, J., Medina de Perez, V. & Ruiz C, A. (2006). Ethanol Produccion of Banana Shell and Cassava Starch. DYNA, Vol. 73(150). pp. 21-27.

Miller, G. (1959). Use of DNS acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. Vol. 31 (3). pp. 426-428.

Marleix M. (2004). Sur Les Biocarburants. Règlement Commis sion des Finances, de L'Économie Générale. Article 146. Asamblea Nacional. Rapport 1622 d'information, Asamblea Nacional de Francia.

Murgas, T. y Vásquez, M. (2012). Evaluación de la obtención de bioetanol a partir del almidón de ñame (*dioscorea rotundata*, *dioscorea alata* y *dioscorea trifida*) mediante la hidrólisis enzimática y posterior fermentación. Universidad de san buenaventura. Facultad de ingenierías, arquitectura, arte y diseños programa de ingeniería química. pp. 138. Cartagena, Colombia.

Moreno, A. (2001). Cinética química, principios básicos. Instituto de Química. UNAM. pp. 7.

Manual de Instrucciones Rotaevaporador R-210/215. (2012). Capítulo 3 Características Técnicas.

Nieto, G. (2009). Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Proyecto de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Pereira. Pp.77-81.

Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; La Malfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. (2000). «Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers». TAG Theoretical and Applied Genetics 100: pp. 1155.

Ocampo, A. (2004). Alcohol carburante: actualidad tecnológica. Revista EIA, Vol. 1. pp. 39-46. Escuela de Ingeniería de Antioquia. Medellín, Colombia.

Olsson, L. & Hahn-Hiigerdl, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology. 18, pp.312-331.

Ospina, M. (2008). Montaje de curvas de calibración para análisis de gomas, fosfatos, sílice, azúcar, y sulfitos por espectrofotometría UV - visible en el laboratorio de aseguramiento de calidad del Ingenio Pichichi S. A. Proyecto de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. pp. 144. Pereira, Colombia.

Posso, F. (2002). Energía y ambiente: pasado, presente y futuro. Parte dos: sistema Energético basado en energías alternativas. Geoenseñanza, Vol. 7(2). pp. 54-73.

Pecsok, R. L., Donal, L. 1983. Métodos modernos de análisis químicos. Editorial limusa.

Quintana, J. & Ruiz, A. (2011). Efecto del pretratamiento térmico sobre la hidrólisis ácida del fruto de banano. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Mina. V Simposio Internacional de Fábricas y I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Medellín, Colombia.

Rani, P., Sharma, S., Garg, F., Raj, K., & Wati, L. (2010). Ethanol production from potato flour by *Saccharomyces cerevisiae*. Indian Journal of Science and Technology, Vol. 3(7). pp. 733-736.

Rodríguez Reinoso, C. E. (2011). Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (*musa cavendish*) para la obtención de jarabe de glucosa. Proyecto de grado. Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición, pp. 1-39

Rincón, A., Vásquez, M. & Padilla, F. (2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. Proyecto de grado. Unidad de Análisis de alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Smith, A., (2008). Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, Vol. 54(4). pp. 546-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476862> [Accessed March 3, 2013].

Srichuwong, S., Orikasa, T., Matsuki, J., Shiina, T., Kobayashi, T., & Tokuyasu, K. (2012). Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 39. pp. 120-127.

Sánchez, A.M, Gutiérrez, A.I, Muñoz, J.A, & Barrero, C.A. (2010) "Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos, (Revista Tumbaga)," pp. 61-91.

Skoog, D. A., Holler, F.J. y T. A. Nieman (2001) *Principios de Análisis Instrumental*. 5ta Edición, Editorial McGraw - Hill.

Sun, Y., & Cheng, J., (2001). Fermentación de hidrolizado "III Workshop tecnológico sobre hidrolizado para la producción de etanol", sesión 3. pp. 24.

Teubner, C., Gysin, H., Levin, H., Hansen, H., Schönfeldt, S., Ehlert, W. & Lechtaler, W. (1999). *El gran libro de los frutos exóticos*. Grupo Ángel Rey (Import, Export & Marketing). Editorial Everest, pp. 21-27.

Torres, A., (2012). Incidencias del uso de etanol como biocombustible en Colombia sobre el mercado de los derivados de la caña de azúcar: una aproximación con dinámica de sistemas. pp 17.

Torres y Carrera. "Informe biocombustibles", Consultores de Comunicación. 2010. Documento electrónico: <http://torresycarrera.com/files/Informes/Informe-Biocombustibles-2010.pdf>

Tejada, L., Tejada, C., Villabona, A., Alvear, M., Castillo, C., Henado, D., Marimón, W., Madariaga, N., Tarón, A. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cascara de naranja y piña. (Revista Tumbaga), pp. 2.

Tasic, M., Konstantinovic, B., Lazic, M. & Veljkovic, V. (2009). The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. Biochemical engineering journal, Vol. 43(2). pp. 208-211.

Uyazán, A. & Gil, I. (2003). Simulación de la Deshidratación de Etanol Azeotrópico por Destilación Extractiva. Proyecto de grado. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogota. Pp. 7-8.

Vazirzadeh, M. & Robati, R. (2013). Investigation of bio-ethanol Production from Waste Potatoes, Vol. 4(1). pp.104-106.

Vázquez, H. & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259. pp. 11.