



FACULTAD DE INGENIERIA, ARQUITECTURA Y
URBANISMO
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO
EXTERIOR

TESIS

Obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática y
fermentación a partir de almidón de vituca (*Colacasia
esculenta*) Lambayeque, 2015”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR

Autores:

Bach. Montenegro Rojas Elizabeth Caterine

Bach. Pérez Gavidia Yanet del Rocío

Pimentel - 2016

Obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón
de vituca (*Colacasia esculenta*) Lambayeque, 2015

Aprobación de la tesis

Montenegro Rojas Elizabeth
Caterine

Pérez Gavidia Yanet del
Rocío

Ms. Mechato Anastasio Augusto Antonio

Presidente del jurado

Msc. Bustamante Sigueñas Danny Adolfo

Secretario del jurado

Ing. Símpalo López Walter Bernardo

Vocal del jurado

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

A mis padres por estar siempre a mi lado cuando más lo necesito, por mostrarme en cada momento su apoyo incondicional, y el interés para que estudie y me desarrolle completamente en todos los aspectos de mi vida. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi hermano, Wilder, para que veas en mí un ejemplo a seguir.

A todos mis amigos que me apoyaron y me permitieron compartir los malos y buenos momentos.

Elizabeth C. Montenegro Rojas

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a Dios, porque supo guiarme por el buen camino.

A mi familia

A mi madre, que con su apoyo incondicional supo apoyarme y entenderme en las dificultades que se presentaban en el camino.

A mi padre, por sus enseñanzas, principios y valores y su constante ayuda incondicional.

A mis hermanos porque siempre han estado junto a mí brindándome todo su apoyo.

A mi amiga Elizabeth por brindarme su sincera amistad y haber compartido momentos agradables.

Yanet R. Pérez Gavidia

Agradecimiento

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a la largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza.

Al Ing. Walter Símpalo López por su tiempo, paciencia, dedicación y asesoría al orientarnos a lo largo del desarrollo y culminación de nuestra tesis.

A Rocío por haber sido una excelente compañera de tesis y más que una amiga, por ser como una hermana por haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación. Por todo los consejos y el apoyo recibido en los momentos difíciles de la vida.

Finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Elizabeth C. Montenegro Rojas

Agradecimiento

Agradezco a mis padres por su apoyo moral y económico durante toda mi formación universitaria y realización de esta investigación.

A la Ing. Lourdes Jossefine Esquivel Paredes que sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación de este estudio.

A nuestro asesor especialista el Ing. Walter Bernardo Símpalo López por su tiempo, paciencia y dedicación para orientarnos para realizar un buen desarrollo y culminación de nuestra tesis.

A los docentes que con sus enseñanzas y ejemplos contribuyeron con mi formación profesional.

Yanet R. Pérez Gavidia

RESUMEN

El agotamiento continuo de combustibles no renovables ha dado lugar a la investigación de nuevos procesos para la producción de etanol a fin de contrarrestar la demanda mundial, por tanto, el presente estudio se centró en el tema de la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática a partir de almidón de vituca, teniendo como variables independientes: concentración de almidón (80-160 g/L), enzimas α -amilasa (0.1 – 1.0 g/l) T° 80°C-85°C pH 5.5 , pectinasa (0.02 – 0.04 g/L) T° 80°C -85°C, pH 5.5 y glucoamilasa (0.05-0.1g/L) T° 60°C -65°C pH 4.5, para su evaluación se diseñó la metodología de superficie respuesta empleando un modelo lineal para el análisis de la significancia estadística entre las variables de estudio, se planteó como hipótesis: La hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (*Colacasia esculenta*); permite obtener un rendimiento superior al 50 % de bioetanol luego de 72 horas de fermentación anaeróbica, para ello se tuvo como objetivos determinar las concentraciones óptimas de almidón y enzimas α -amilasa, pectinasa y glucoamilasa para un mayor rendimiento de bioetanol por hidrólisis enzimática y fermentación, asimismo evaluar el proceso de fermentación utilizando la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) donde las concentraciones utilizadas por cada muestra fue constante de 2.67 g/L.

Una vez llevados a cabo los 20 tratamientos establecidos por el modelo lineal se logró establecer que las concentraciones de almidón y enzimas α -amilasa, pectinasa y glucoamilasa óptimas fueron 160 g/L, 1.0 g/l, 0.03g/L y 0.10 g/L respectivamente como parámetros óptimos para lograr un rendimiento de 60 % de bioetanol, aceptándose la hipótesis alternativa.

Palabras clave: hidrólisis enzimática, enzimas, fermentación anaeróbica, levadura.

ABSTRACT

Continued depletion of non-renewable fuels has led to research into new processes for ethanol production to counter global demand, therefore, the present study focused on the issue of obtaining bioethanol by enzymatic hydrolysis from vituca starch, having as independent variables: starch concentration (80- 160 g /L), enzymes α -amylase (0.1 - 1.0 g/L) pH 5.5 T° 80°C-85°C, pectinase (0.02 - 0.04 g / l) pH 5.5 and T° 80°C-85°C glucoamylase (0.05-0.1g / l) pH 4.5 T° 60°C-65°C, for evaluation was designed the response surface methodology using a linear model for the analysis of statistical significance between the study variables, was hypothesized: enzymatic hydrolysis and fermentation from vituca starch (*Colacasia esculenta*); allows to obtain an efficiency greater than 50% bioethanol after 72 hours of anaerobic fermentation, for it was aimed to determine optimal concentrations of starch and enzymes α -amylase, pectinase and glucoamylase for a higher yield of ethanol by enzymatic hydrolysis and fermentation also evaluate the process of fermentation using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) where the concentrations used for each sample was 2.67 g of / L constant.

Once carried out the 20 treatments established by the model was established that the concentrations of starch and α -amylase enzymes, pectinase and glucoamylase were optimal 160 g / L, 1.0 g / l, 0.03g / L and 0.10 g / L respectively as parameters are optimal to Achieve a yield of 60% bioethanol, accepting the alternative hypothesis.

Keywords: enzymatic hydrolysis, enzymes, anaerobic fermentation, yeast.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1. Situación problemática	3
1.2. Formulación del Problema	6
1.3. Delimitación de la investigación	6
1.4. Justificación e importancia de la investigación	6
1.5. Limitaciones de la Investigación	8
1.6. Objetivos:	8
1.6.1. Objetivo general	8
1.6.2. Objetivos específicos	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes de estudio	9
2.2. Estado del Arte	16
2.3. Sistemas teórico conceptuales	18
2.3.1. Definición de Vituca	18
2.3.2. Bioetanol	22
2.3.3. Almidones	24
2.3.4. Microorganismos utilizadas para la fermentación de bioetanol	28
2.3.5. Concentración de bioetanol	29
2.3.6. Concentración de azúcares reductores	29
2.3.7. Grados °Brix	30
2.3.8. Rendimiento de bioetanol	30
2.3.9. Uso de biocombustibles en el Perú	31
2.3.10. Etanol – Producción	32
2.4. Definición de términos básicos	33
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	35
3.1. Tipo y diseño de la investigación	35
3.1.1. Tipo de investigación	35
3.1.2. Diseño de la investigación	35
3.2. Población y muestra	35
3.3. Hipótesis	36
3.4. Variables	36
3.5. Operacionalización	37

3.6. Abordaje Metodológico, técnicas e instrumentos de recolección de datos	38
3.6.1. Técnicas de recolección de datos	38
3.6.2. Instrumentos de recolección de datos	41
3.7. Procedimiento para recolección de datos	43
3.8. Plan de análisis estadístico de datos	49
3.9. Criterios éticos	50
3.10. Criterio de rigor científico	51
CAPITULO IV: ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	54
4.1. Resultados en tablas y gráficos	54
4.1.1. Concentración de Azúcares reductores Totales	54
4.1.2. Concentración de bioetanol	66
4.1.3. Concentración de °Brix	75
4.1.4. Rendimiento de bioetanol	76
4.2. Discusiones de resultados	78
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
5.1. Conclusiones	80
5.2. Recomendaciones	80
Referencias Bibliográficas	81
I.ANEXOS	87
II.ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	19
<i>Nombres de la Vituca</i>	19
Tabla 2	19
<i>Clasificación taxonómica</i>	19
Tabla 3	21
<i>Contenido de Carbohidratos en la vituca (base seca)</i>	21
Tabla 4	22
<i>Composición química de los tubérculos de vituca (base fresca)</i>	22
Tabla 5	26
<i>Características de algunos almidones comunes</i>	26
Tabla 6	37
<i>Operacionalización de las variables</i>	37
Tabla 7	50
<i>Elaboración de variables según paquete estadístico Desing-expert, software de la versión 7 (DX7)</i>	50
Tabla 8	55
<i>Porcentaje de azúcares reductores obtenidos al durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)</i>	55
Tabla 9	56
<i>Porcentaje de azúcares reductores obtenidos a las 8 horas de la hidrólisis enzimática (sacarificación) y después de 72 horas de fermentación</i>	56
Tabla 10	57
<i>Resultados de ART (azúcares reductores totales) en el proceso de hidrólisis enzimática</i>	57
Tabla 11	58
<i>Modelo Secuencial de suma de cuadrados (Tipo I)</i>	58
Tabla 12	59
<i>Análisis de varianza para la respuesta ART hidrólisis enzimática (%)</i>	59
Tabla 13	60
<i>Tabla de comportamiento de variables estadísticas</i>	60
Tabla 14	66
<i>Concentración de bioetanol, después de la destilación</i>	66
Tabla 15	67
<i>Resultados de la concentración de bioetanol después de la destilación de las muestras</i>	67
Tabla 16	68
<i>Modelo Secuencial de suma de cuadrados (Tipo I)</i>	68

Tabla 17	68
<i>Análisis de varianza para la respuesta concentración de bioetanol</i>	68
Tabla 18	69
<i>Cuadro de comportamiento de variables estadísticas</i>	69
Tabla 19	75
<i>Brix obtenidos durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)</i>	75
Tabla 20	76
<i>Brix obtenidos durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)</i>	76
Tabla 21	77
<i>Rendimiento de bioetanol obtenido mediante la relación etanol-ART</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Frutos de Vituca (<i>Colacasia esculenta</i>).....	19
Figura 2: Planta de Vituca (<i>Colacasia esculenta</i>).....	19
Figura 3: Reacción del almidón por hidrólisis enzimática para la obtención de bioetanol.....	30
Figura 4: Curva patrón para determinar la ecuación del % de azúcares reductores	40
Figura 5: Proceso de licuefacción de enzimas α -amilasa y pectinasa, para la ruptura de enlaces glucosídicos α 1 \rightarrow 4.	46
Figura 6: Procesos de sacarificación en la hidrólisis enzimática.....	47
Figura 7: Proceso de fermentación.....	48
Figura 8: Curva patrón para determinar la ecuación del % de azúcares reductores	54
Figura 9: Gráfica de probabilidad normal de los residuos estudentizados de la concentración de ART (azúcares reductores totales)	61
Figura 10: Gráfica de residuos estudentizados contra los valores predichos.....	61
Figura 11: Gráfica de los valores residuales contra los valores obtenidos por cada tratamiento.....	62
Figura 12: Gráfica de los valores predichos contra los valores actuales.....	62
Figura 13: Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variables almidón-pectinasa	61
Figura 14: Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables almidón-pectinasa	62
Figura 15: Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variable α -amilasa – glucoamilasa.....	64
Figura 16: Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa	65
Figura 17: Gráfica de probabilidad normal de los residuos estudentizados de la concentración de bioetanol	70
Figura 18: Gráfica de residuos estudentizados contra los valores predichos	70
Figura 19: Gráfica de los valores residuales contra los valores obtenidos por cada tratamiento.....	71
Figura 20: Gráfica de los valores predichos contra los valores actuales	71
Figura 21: Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-pectinasa.....	72
Figura 22: Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-pectinasa.....	72
Figura 23: Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa.....	73

Figura 24: Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa.....	73
Figura 25: Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa.....	74
Figura 26: Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa.....	74

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el agotamiento de combustibles no renovables ha causado un alza de precios en todo el mundo, debido a ello ha llevado a investigar nuevas técnicas de proceso como biomasa distinguida por su menor precio relativo, así como por su fácil acceso y menor impacto negativo en el medio ambiente, en la actualidad se utiliza diferentes metodologías y empleo de diferentes sustratos es por ello que el costo de los alimentos ha aumentado como el caso del maíz y yuca.

Desde esta perspectiva la vituca representa una alternativa de estudio para la producción de bioetanol con el fin de sustituir a productos como yuca, maíz, caña, papa, etc., debido a que es apta para todo tipo de cultivo, producción todo el año y presenta un rendimiento de 72% de almidón superior a los demás cultivos (Braide, Nwaogulkpe, 2011).

Para la obtención de glucosa a partir de almidón de vituca debe someterse a un proceso de hidrólisis como licuefacción y sacarificación utilizando enzimas α -amilasa, pectinasa y glucoamilasa con el fin de convertir los azúcares complejos en azúcares simples y posteriormente realizar el proceso de fermentación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se pueda obtener bioetanol.

El método de hidrólisis enzimática presenta un sin número de ventajas frente a otros métodos aplicados; no genera gran corrosión, bajo consumo de enzima y baja toxicidad de los hidrolizados, también son menores los costos de equipamiento (debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental), los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%.

La α -amilasa es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α 1 \rightarrow 4 presentes en el almidón y empleando la enzima glucoamilasa para hidrolizar los enlaces glucosídicos α 1 \rightarrow 6; las enzimas mantienen una actividad alta a las condiciones de pH y temperatura requeridas para favorecer a la levadura en el proceso fermentativo; produce glucosa continuamente durante todo el proceso de hidrólisis y no requiere activadores como sales de calcio o sodio para mantener su carga, su estructura y aumentar su actividad.

Con el presente estudio se buscó fomentar investigaciones para la producción de bioetanol a partir del almidón de vituca variedad esculenta; para ello se optó por el método de hidrólisis enzimática, partiendo del licuado de almidón de vituca como sustrato, teniendo como variables independientes: concentración de almidón, enzimas α -amilasa, pectinasa, y glucoamilasa, lo cual permitió obtener una concentración de bioetanol superior a 50 g/L luego de 72 horas de fermentación anaeróbica. Para su evaluación se optó por el programa estadístico Desing expert versión 7.0, empleando un modelo lineal de superficie respuesta para el análisis de significancia.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Situación problemática

El mundo afronta el agotamiento continuo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables, lo cual ha provocado la disminución de la oferta de petróleo en el mundo, asociado al constante incremento de su precio e impacto negativo sobre el medioambiente (Murgas y Vásquez, 2012).

En la actualidad existen estudios para obtener combustible a partir de biomasa, pero debido a la inexistencia de métodos que procesen de forma rentable la producción no ha resultado económica a escala industrial; uno de los métodos para la obtención de etanol es por medio de hidrólisis ácida pero tiene muchas desventajas debido a la formación de productos no deseables, los cuales pueden afectar al microorganismo encargado de realizar la posterior fermentación, siendo necesario neutralizar los hidrolizados antes de la fermentación. Así mismo es necesario que el equipo donde se realiza a fermentación resista el ácido y las temperaturas requeridas durante el proceso. (Tejeda y Cols., 2011).

Durante la producción de bioetanol se viene utilizando bacterias para el proceso de fermentación una de estas bacterias es la *Zymomonas mobilis*, pero posee limitaciones puesto que tiene una capacidad de reutilización menor con respecto a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; además de ello no cumple con todos los parámetros de operación ya que esta cepa necesita un pH más elevado aumentando el riesgo de contaminación, además de que su rango de sustratos es restringido a glucosa, fructosa y sacarosa (Garzón y Hernández, 2009); así mismo estudios mencionan que la utilización de la enzima α -amilasa sola provoca una lenta reacción al momento de hidrolizar el almidón (Murgas y Vásquez, 2012).

Hoy en día se viene utilizando diferentes productos para la obtención de bioetanol por lo cual el costo de ciertos alimentos ha aumentado, como es el caso del maíz, debido a que es comúnmente utilizado en la producción de etanol. Así mismo estudios confirman que la caña de azúcar puede ser utilizada como fuente de biocombustible pero tiene ciertas desventajas respecto a su cultivo, entre estas desventajas se encuentra su baja resistencia a la sequía y su poca adaptación a diversos tipos de suelo (Cortés y Cols., 2009).

Debido a que el material celulósico es poco accesible ya que se encuentra mezclado en una sólida matriz con otros compuestos como la lignina (material lignocelulósico) el aprovechamiento del material requiere de métodos de pretratamiento o fraccionamiento que son complejos por ende presentan bajos rendimientos, también modifican y degradan al producto (Barroso, 2010).

Así mismo la obtención de bioetanol a través de microalgas presenta deficiencias debido a la concentración de biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos; cuanto mayor sea la cantidad de lípidos deseada, mayor es el coste del cultivo, además que el cosechado de la biomasa de microorganismos requiere de métodos de alto coste energético y/o de mantenimiento (centrifugación y filtración, entre los habituales). (Martínez, 2014).

A nivel mundial la producción de biocombustibles ha generado un desbalance en el sector alimentario, debido a que los países desarrollados no cuentan con suficientes hectáreas para cultivar y se ocupan espacios que antes eran dedicados para cultivar alimentos. Esto provoca un alza en el costo de los alimentos al no satisfacer la demanda (De la Cruz, 2009).

El hecho de que actualmente nos encontramos frente a un cambio en el modelo energético mundial es innegable, corresponde a una realidad y no solamente a un momento oportuno muchas de las que existen hoy en día se encuentran ubicadas en regiones de inestabilidad o conflicto político, como

los países del medio oriente y de la antigua Unión Soviética. (De la Cruz, 2009)

En Colombia existen empresas dedicadas a producir alcohol carburante a partir de yuca, pero en la actualidad se ha detenido su producción, debido a que los proyectos que se desarrollaron presentaron algunos inconvenientes, puesto que utilizaban como materia prima yuca dulce destinada al consumo.

Pero en la Costa del Caribe y los Llanos Orientales no tenían un abastecimiento continuo, además el agricultor prefería venderlo como alimento pues tenía más ingresos que al venderlo como producto industrial.

Otro problema que presentó es el elevado costo de producir el biocombustible, debido a que los derivados almidonosos necesitan dos etapas más para convertirse en glucosa (De la Cruz, 2009).

En la Amazonía peruana existe el cultivo de la palma aceitera destinada a la producción de Biodiesel. Son tres instalaciones las que a la fecha están implementadas para la producción de Biodiesel, cuyos operadores son Industrias del Espino S.A., Heaven Petroleum Operador S.A. y Pure Biofuels del Perú S.A.C., respectivamente, sin embargo debido a que no existe producción nacional de materia prima (oleaginosas y aceites) en volumen suficiente para cubrir el volumen obligatorio de Biodiesel establecido en el país (5% en volumen), para mezcla con Diésel, teniéndose como único productor integrado a la empresa Industrias del Espino S.A. (actualmente produce y comercializa Biodiesel), se debe recurrir a la importación de Biodiesel (Osinermin, 2010). Así mismo el cultivo de vituca tiene poca “utilidad comercial por falta de investigaciones, no se ha valorado su utilidad comercial orientadas a su composición bioquímica y aprovechamiento a nivel biotecnológico y agroindustrial” (Asturizaga y Bocanegra, 2008).

Debido al agotamiento de los combustibles hay un alza con respecto a los precios en la mayoría de los grifos de la región Lambayeque; el gasohol de 84 octanos está entre 10.38 y 10.90 soles el galón. Sin embargo, también hay estaciones de servicio que lo pueden expender a 11.89 soles (El Comercio, 2015). Es por ello que se viene fomentando la producción de piñón blanco por un grupo de empresarios para la obtención de biodiesel (Andina, 2008); pero investigaciones mencionan que el piñón blanco presenta problemas al momento de la producción de biodiesel como aumento de viscosidad con las altas temperaturas, presentar restos de glicerina y metales como el sodio, potasio, magnesio, así como restos de catalizadores (Gutiérrez y Cols., s.f).

1.2. Formulación del Problema

¿Es posible obtener bioetanol por hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (*Colacasia esculenta*), utilizando como factores de estudio la concentración de almidón, la concentración de enzimas (α -amilasa, pectinasa y glucoamilasa) y la concentración de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)?

1.3. Delimitación de la investigación

La ejecución del presente estudio fue realizado en el laboratorio de Química de la Universidad Señor de Sipán, puesto que se contó con equipos necesarios para el eficiente desarrollo de cada una de las variables que implica el estudio, contó con una duración de 4 meses. Fue financiada por los autores de esta investigación.

1.4. Justificación e importancia de la investigación

Los combustibles fósiles en la actualidad se están agotando debido a la gran demanda que tiene en el mercado mundial es por ello la necesidad de búsqueda de alternativas para contrarrestar el agotamiento de los

combustibles mediante la sustitución de combustibles renovables como la biomasa distinguido por su menor precio relativo, así como por su fácil acceso y menor impacto negativo en el medio ambiente.

Debido a los problemas ocasionados en la producción de etanol hidrólisis enzimática ha llevado a investigar nuevas técnicas de proceso; por tal motivo que el presente proyecto abordó el tema de hidrólisis enzimática, partiendo del licuado de almidón de vituca como sustrato; no genera gran corrosión, bajo consumo de enzima y baja toxicidad de los hidrolizados, también son menores los costos de equipamiento (debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental), los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%.

Estudios mencionados declaran que la bacteria *Zymomonas mobilis* no cumple con todos los requisitos de producción de bioetanol es por ello que se optó por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a que es de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior.

Se utilizó la enzima pectinasa, para complementar a la enzima α -amilasa para una reacción enzimática oportuna sobre el almidón en la hidrólisis y así obtener mayores resultados, y altas concentración en cuanto a la conversión de azúcares reductores que garantizan mayor producción de alcohol.

Perú tiene posibilidades de participar en este mercado que es liderado por Estados Unidos y Brasil, puesto que cuenta con alternativas de inversión que en pocos años se harán realidad para la exportación.

Con el presente estudio se buscó fomentar investigaciones que generen mayor información sobre las bondades que presenta la vituca, como producción todo el año, colaborando así con la permanencia de las mismas, destacando su ejecución en el proceso de obtención de bioetanol en periodos donde los productos como yuca, maíz, caña, etc. son escasos, mejorando la calidad de vida de las personas con escasos recursos económicos además de incentivar la creación de microempresas lo cual contribuirá a generar más puestos de trabajo y el desarrollo en el país.

1.5. Limitaciones de la Investigación

Debido a la gran cantidad de mucílago presente en el fruto de la vituca fue dificultoso la sedimentación en la obtención de almidón es por ello que los frutos fueron cortados y sumergidos en agua durante 24 horas.

1.6. Objetivos:

1.6.1. Objetivo general

Obtener bioetanol por hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (*Colocasia esculenta*).

1.6.2. Objetivos específicos

Determinar la concentración de almidón de vituca (*Colocasia esculenta*) para la obtención de bioetanol por hidrólisis enzimática.

Determinar las concentraciones óptimas de las enzimas α -amilasa, pectinas y glucoamilasa para obtener un mayor rendimiento de bioetanol.

Evaluar la fermentación utilizando la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de estudio

En la Universidad de Antioquia en Colombia, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación- fermentación simultánea (SSF); por los autores Castaño & Mejía, (2008) quienes en el resumen mencionaron:

Para el desarrollo del presente estudio se ha tomado como sustrato almidón de yuca con las siguientes condiciones de operación: licuefacción (T 83°C, pH 5.5, dosis de enzima 0.5 ml/l Liquozyme® = α -amilasa, agitación 400 rpm); sacarificación (T 60 °C, pH 4.5, dosis de enzima 1.5 ml/l Spirizyme fuel® = glucoamilasa, agitación 400 rpm); fermentación alcohólica (T 30 °C, pH 4.5, inóculo 8 g/l en peso seco, agitación 400 rpm).

La estrategia de proceso de SSF se realiza bajo las siguientes condiciones de operación: la etapa previa de licuefacción se realiza en las mismas condiciones de operación descritas previamente para el proceso de SHF; temperatura 30 °C, pH 4.5, concentración de azúcares reductores según diseño de experimentos, dosis de enzima spirizyme fuel® según diseño de experimentos, inóculo 8.0 g/l peso seco de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (0.8% p/v) y agitación 400 rpm.

Del anterior trabajo de investigación se concluye que los parámetros adecuados para la obtención de bioetanol para la enzima α -amilasa (T 83°C, pH 5.5) y para glucoamilasa (60 °C, pH 4.5) ,además de ello el proceso de sacarificación y fermentación simultanea reduce los tiempos de proceso puesto que conforme se produce glucosa la levadura va consumiendo y transformando a bioetanol.

En la Universidad de San Buenaventura Cartagena en Colombia, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Evaluación de la obtención de bioetanol a partir del almidón de ñame (*Dioscórea rotundata*, *Dioscórea alata* y *Dioscórea trifida*) mediante la hidrólisis enzimática y posterior fermentación; por los autores Murgas & Vásquez, (2012) quienes en el resumen mencionaron:

En esta investigación realizada se evaluó a las diferentes variedades de ñame (*Dioscórea alata*, *Dioscórea trifida* y *Dioscórea rotundata*) para la obtención de bioetanol mediante el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación utilizando las enzimas α -amilasa, amiloglucosidasa y *Saccharomyces cerevisiae*, para ello se ha tomado concentraciones de 10.5, 13.5 y 15 en %m/v (68.25, 87.5 y 97.5 en 650ml) obteniéndose los siguientes resultados:

Producción de etanol en las concentraciones de 10.5; 13,5%; 15% v/v se obtuvo los siguientes resultados 3,22% v/v; 3,64% v/v y 3,27% v/v respectivamente v/v para la variedad de *Dioscórea alata*; para la variedad de *Dioscórea trifida* fue de 3,53% v/v; 4,43% v/v; 3,4% v/v y para la variedad de *Dioscórea rotundata* se obtuvo 3,62% v/v; 3,7% v/v; 4,55% v/v.

Durante la etapa de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) los azúcares reductores y °Brix aumentan significativamente, alcanzándose máximos valores al final del proceso de 78.82g/L en concentración de 15%m/v en la variedad *Dioscórea rotundata*, 73.84g/L en la concentración de 13.5% en la variedad *Dioscórea trifida*; mientras que para la variedad *Dioscórea alata* e obtuvieron valores de 61.68g/L a la concentración de 13.5%m/v.

Al calcular los parámetros cinéticos, los valores mínimos obtenidos de azúcares reductores al final de la fermentación fueron de 4.34g/L para la concentración de 15% en la variedad *Dioscórea rotundata*, 9.18g/L en la concentración de 13.5% m/v y para la variedad *Dioscórea trifida*

valores mínimos 3.32g/L y el crecimiento de microorganismos presento valores máximos al final de la etapa exponencial en la variedad *Dioscórea rotundata* de 1.90×10^7 UFC/ml en la concentración de 15% m/v, en la variedad *Dioscórea trifida*, fue de 1.69×10^7 UFC/ml en la concentración de 15% y en la variedad *Dioscórea alata*, el valor fue de 1.25×10^7 UFC/ml.

Se puede observar de acuerdo a estos datos que los grados °Brix son directamente proporcional a los de azúcares reductores llegándose a encontrar valores máximos de 16 °Brix y mínimos de 2.2 °Brix.

Con respecto al rendimiento de etanol (10.5; 13.5; 16 m/v) se obtuvo los siguientes resultados 0.408; 0.450; 0.456 respectivamente para *Dioscórea alata*; mientras que para *Dioscórea Trífida* fue de 0.471; 0.483; 0.408; y para variedad *Dioscórea rotundata* 0.438; 0.453; 0.475.

Con estos resultados se puede concluir que es posible obtener bioetanol con cualquier de las especies de ñame (*Dioscórea rotundata*, *Dioscórea alata* y *Dioscórea trifida*).

Del anterior trabajo de investigación se concluye que durante el proceso de licuefacción se obtiene mayor rendimiento en cuanto a la concentración de azúcares reductores; además de ello que los grados Brix son directamente proporcionales a los azúcares reductores.

En la Universidad de Rajshahi en Bangladesh, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Condiciones óptimas para el bioetanol. Producción de papa de Bangladesh; por los autores Abul, Nilufa, Shanjit, Abdus & Rezaul, (2014) quienes en el resumen mencionaron:

El presente estudio se llevó a cabo para encontrar las condiciones óptimas para la producción de bioetanol a partir de patatas de Bangladesh. Se observó un crecimiento óptimo de la levadura

(*Saccharomyces cerevisiae* CCD) a pH 6,0 y la temperatura 31 °C. Se encontró adición de una pequeña cantidad de enzima α -amilasa a la solución de patata para mejorar la degradación del almidón de patata y hace el proceso de fermentación más rápida. Este estudio observó que 1750 unidad de alfa-amilasa es suficiente para degradar el almidón en 15% de 500 ml de papa solución de almidón. A partir de estudios de tiempos de fermentación, se encontró que el tiempo de incubación de 6 días a ser suficiente para completar el proceso de fermentación y la producción óptima de almidón forma de bioetanol de papa. La concentración adecuada de papa en proceso de fermentación se determinó a través de cinco diferentes papa soluciones (5%, 10%, 15%, 20% y 30%). Una mayor producción de bioetanol se encontró en tratamiento de papa 20%. Por lo tanto, se recomienda una solución de patata 20% para la producción a gran escala de bioetanol a partir de fécula de papa. La medición de la pureza del alcohol producido.

El porcentaje de pureza de bioetanol producido a partir de la papa se midió utilizando un medidor de alcohol (Jiujiangnongduji, China). Este medidor puede medir la pureza alcohol de 0 a 100 por ciento.

Del anterior trabajo de investigación se concluye que el medio adecuado para que la levadura (*Saccharomyces cerevisiae* CCD) pueda tener un crecimiento óptimo es de pH 6,0 y la temperatura 31 °C.

En la Universidad Industrial de Santander, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca por medio de hidrólisis enzimática, para ser usados como sustrato en la producción de bioetanol; por la autora Ruiz Camacho, (2009) quien en el resumen mencionó:

Se evaluaron a nivel de laboratorio los parámetros de la hidrólisis enzimática del almidón, para la producción de jarabes de glucosa. Se compararon las enzimas de Novozymes y Genecor International. Se

evaluaron la α -amilasa del *Bacillus licheniformis* (Liquozyme® SC DS, de Novozymes), en un rango de pH 5,7-6,0, de temperatura 82-86°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,013-0,025; igualmente, la glucoamilasa del *Aspergillus niger* (Spirizyme® Fuel, de Novozymes), en un rango de pH 3,5-5,5, de temperatura 32-70°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,04-0,06; y finalmente la mezcla enzimática fúngica α -amilasa del *Aspergillus kawachi* y glucoamilasa del *Aspergillus niger* (STARGEN™ 001, de Genecor International), en un rango de pH 3.0-4.5, temperatura de fermentación de 20°C-40°C, dosificación de enzima 1.0-2.5 kg/MT de grano seco. Se utilizaron los métodos analíticos del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), glucosa oxidasa y Bradford, para medir y determinar los valores de equivalentes de dextrosa (ED) y actividad enzimática, concentración de glucosa y concentración de proteína, respectivamente.

Adicionalmente se estandarizaron y validaron las condiciones, por tamizaje y estudio estadístico (ANOVA) de los datos obtenidos por medio del programa estadístico STATGRAPHIC Centurión XV. Se encontró que las mejores condiciones de hidrólisis enzimática de almidón de yuca fueron: α -amilasa (Liquozyme® SC DS) a pH 5,0, temperatura de 80°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,0280; con glucoamilasa (Spirizyme® Fuel) pH 4,5, temperatura 70°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,0631; y finalmente la mezcla enzimática α -amilasa y glucoamilasa (STARGEN™ 001) pH 4,5, temperatura de 46 °C, dosificación de enzima 0,023% (p/p).

Del anterior trabajo de investigación se concluye que la mejor condición de hidrólisis enzimática de almidón de yuca fueron: α -amilasa (pH 5,0-80°C), dosificación de enzima % (p/p) 0,0280; con glucoamilasa (pH 4,5 70°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,0631.

En la Universidad Federal de Tecnología en Nigeria, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Producción de etanol a partir de la vituca (*Colocasia esculenta*); por los autores Braide & Nwaogulkpe, (2011) quienes en el resumen mencionaron:

El alto porcentaje de almidón que posee la vituca es de aproximadamente de 72% lo cual lo convierte en una excelente materia prima para la producción de alcohol. El método de sacarificación utilizado fue la hidrólisis de la enzima que participa dos etapas. La primera etapa implicó el uso de α -amilasa bacteriana (un agente de licuación) que se degradan con almidón, mientras que la segunda etapa; α -amilasa fúngica (un agente sacarificante) completó el proceso. Se añadieron 900 ml de agua para hacer la suspensión de la muestra gelatinizado para dar 20% (w / v) de solución. En la primera etapa, se añadió 1 ml de solución 0,1 N de α -amilasa bacteriana (Amylitic-TS) a la suspensión y el pH (controlado mediante la adición de algunas gotas de ácido sulfúrico diluido) y la temperatura se ajustó a 6,0 y 95 a 100 ° C respectivamente. Se obtuvo una solución parcialmente licuado en agitación continua durante 45 min.

En la segunda etapa, la solución se enfrió a 60°C-64°C y el pH se ajustó a 5,4 para favorecer las actividades de α -amilasa fúngica. Se añadieron 2 ml de solución 0,1 N de α -amilasa fúngica (AMG) a esta suspensión. La solución se agitó en un baño de agua durante 45 minutos para obtener la licuefacción completa de suspensión. Con el fin de detener la acción de la enzima y para esterilizar el mosto, la suspensión se calentó adicionalmente durante 10 minutos a 100 ° C. El licor sacarificado se enfrió a 30 °C y el pH se ajustó a 4.2 a 4.5. El nivel de Brix y la gravedad específica se determinó por métodos estándar (A.O.A.C, 1990). El licor hidrolizado se inoculó con células de levadura viables, *Saccharomyces uvarum*, y se obtuvieron 12,9% de etanol después de 7 días de fermentación. El nivel de pH y Brix (sólidos solubles totales) del caldo de fermentación se redujo significativamente desde 4.50 hasta 3.82 y 15.0 a 2.0 respectivamente. Esto sugiere que

el proceso de sacarificación fue eficaz. El pH reducido proporciona un entorno propicio para la actividad óptima de la levadura. El nivel de azúcar disminuyó apreciablemente como el contenido de etanol pasaron de 0 a 12,9%. La disminución en la gravedad específica 1.0000-0.9830 se podría atribuir a la disminución en el nivel Brix como el azúcar en el caldo se convirtió en etanol.

Del anterior trabajo de investigación se concluye que la vituca es una alternativa de sustitución frente a otros productos para obtener bioetanol puesto que posee apropiadamente el 72 % de almidón; así mismo para un óptimo rendimiento de bioetanol es necesario la utilización de enzimas α -amilasa bacteriana y α -amilasa fúngica.

En la Universidad Jahangirnagar, North South, Yamaguchi, Dhaka: Japan en Bangladesh, se desarrolló el trabajo de investigación titulado: Producción de bioetanol en la alta temperatura de Tari; por los autores Talukder, Sujon, Hossain, Gomes & Yamada, (2015) quienes en el resumen mencionaron:

Muchos microorganismos pueden tolerar rangos de alta temperatura de 37°C - 45°C se denominan termotolerantes microorganismos. Se recogieron dieciocho tales cepas que contienen diversos microorganismos a partir de los productos naturales fermentados de Bangladesh en el verano para la producción de bioetanol.

Los análisis culturales, morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos se llevaron a cabo bajo diversas condiciones fisiológicas. Entre ellos, dos cepas termotolerantes Tari-6, aislado del Tari (una noche fermentados naturales, jugo de palma en torno a 33°C - 40 ° C) y Pvt-1, aislado del Pantavat (un arroz fermentado naturales durante la noche empapado con agua del grifo a alrededor de 35 °C -37°C), produce gran cantidad de bioetanol, 7,5% (v / v) y 6,5% (v / v), respectivamente a 37°C. Además, un parcial de resultados de la

secuenciación 26S rDNA confirmó que el Tari-6 y Pvt-1 *Pichia* codificado *galeiformi* y *Pichia guilliermondii*, respectivamente, y más tarde se podría crecer bien en los medios que contiene xilosa.

Del anterior trabajo de investigación se concluye estas dos cepas de levadura son los candidatos potenciales para la producción de bioetanol.

2.2. Estado del Arte

La idea de obtener bioetanol empleando biomasa nace por iniciativa del programa PROALCOHOL, iniciado en 1975 por el gobierno brasileño a raíz de la crisis del petróleo, cuyo objetivo era reducir la dependencia del país respecto a las importaciones del combustible fósil (Murgas y Vásquez, 2012).

Se conoce como biomasa natural a cultivos energéticos que se modifican genéticamente, se plantan y se cultivan de forma específica para la producción de energía. Su funcionamiento es capturar la radiación solar, transformar y almacenar en su interior para luego de ser combustionados liberar energía (Díaz, 2015).

Para obtener etanol a partir de almidón se requiere romper las cadenas de este polisacárido para la obtención de jarabe de glucosa y maltosa, el cual se puede convertir en etanol mediante las levaduras. Por ello se debe incluir una etapa adicional de hidrólisis (rompimiento, degradación) de este biopolímero. De cada 100 gramos de almidón se puede obtener teóricamente 111 g de glucosa, lo que implica una relación estequiometría de 9:10 (Sánchez y Cardona, 2008).

El proceso de fermentación generalmente toma cerca de 40 a 50 horas, durante esta parte del proceso, la masa es agitada y mantenida fría para facilitar la actividad de la levadura. Después de la fermentación es transferido a las columnas de destilación donde el etanol es separado de la

“vinaza” remanente. El etanol es concentrado a 190 proof usando destilación convencional y entonces deshidratado a aproximadamente 200 proof en un sistema de filtrado molecular (Díaz y Herrera, 2008).

Los microorganismos que presentan actividad amilolítica natural generalmente tienen bajos rendimientos en la producción de etanol. Con los desarrollos de la técnica de recombinación genética se han creado microorganismos con la capacidad de biotransformar el almidón a etanol, mejorando los rendimientos. Ejemplo de ello es la transformación de levaduras que expresan los genes que codifican para las enzimas α -amilasas y glucoamilasas, permitiendo que las levaduras utilicen el almidón como fuente de carbono.

La *Zymomonas mobilis* presenta un buen número de ventajas para su aplicación en la fermentación de biomasa, tiene la tolerancia osmótica a concentraciones superiores de azúcares con un máximo de 400 g/l. En el caso de la levadura su límite máximo de concentración de azúcar es de 1 g/l. Esto hace que el proceso sea más rentable ya que si hay más sustrato hay más producción de etanol y más rápido crecimiento celular, tiene una tolerancia mayor al etanol, con un máximo en 130 g/l. El etanol actúa como un producto inhibitorio para la actividad de las levaduras y de las bacterias. (Garzón y Hernández, 2009).

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* IFI 256 cumple todas estas características de forma eficiente, resistiendo pH comprendidos entre 4,5 – 4,0. Su temperatura óptima de trabajo es de 32°C. Resiste altas concentraciones de azúcares, 22%v/v. También soporta altas cantidades de alcohol. La levadura del tipo *Saccharomyces cerevisiae* permite una conversión aproximada del 85% al cabo de 32 horas y del 90% al cabo de 75 horas en la producción de etanol. Su porcentaje en peso de carbono es del 45%, de oxígeno el 30,6%, de hidrógeno el 6,8% y de nitrógeno el 9%.

La reducción en el tiempo del proceso permite aumentar la capacidad instalada de las plantas, mejorando la productividad y reduciendo los costos de producción (Castaño y Mejía, 2008).

En la producción de etanol a partir de sustratos como harina integral de trigo y harina integral de maíz, desarrollando los procesos de sacarificación fermentación simultáneos, encontraron rendimientos de 87-89% de valor teórico, además de reducir en 5 horas el tiempo de proceso, lo que aumentó la productividad, así mismo se alcanzó concentraciones de 8% en volumen de etanol al cabo de 35 horas de proceso, partiendo de un hidrolizado de harina de maíz 1:3 (harina/agua), 85 °C, pH 6.0 y 1 hora de proceso como condiciones de la licuefacción (Castaño y Mejía, 2008).

2.3. Sistemas teórico conceptuales

2.3.1. Definición de Vituca

La vituca (*Colocasia esculenta*) está entre los primeros cultivos domesticados por el hombre y es posible trazar su historia hasta las culturas neolíticas más primitivas del sureste de Asia entre India y Indonesia. Es nativa de las áreas boscosas del centro-sur de Asia, probablemente de la India y de allí fue llevada a África. Hoy es el principal cultivo en África Occidental (Fernández, 1970)

La vituca es una planta comestible muy importante en Asia tropical, donde se cultiva por sus tubérculos, ricos en almidón (Raven y Cols., 1992).

En el Perú a esta raíz se le conoce como «vituca» variando en algunos departamentos como «aratríma» en Huánuco, «taro» en Moyobamba, «michutsi» en lugares de selva alta, «witina» en el bajo Amazonas (Núñez, 1989).

Tabla 1

Nombres de la Vituca

PAIS	NOMBRE
Venezuela	Ocumo, Culin, Danchi
Cuba	Málaga, guagua
Brazil	Taiboa
Perú	Vituca
Japón	Imo

Fuente: Nuñez, 1989

La vituca pertenece a la familia de las Aráceas comprendiendo más de 100 géneros y 1500 especies.

Botánicamente ha recibido varias variaciones diferentes, pero hoy en día se considera que la correcta es *Colocasia esculenta schotr.*

Tabla 2

Clasificación taxonómica

Tipo	Angiospermeae
Clase	Monocotiledóneas
Orden	Aroideas
Familia	Aráceas
Genero	<i>Colocasia</i>
Especie	<i>Colocasia esculenta</i>
Nombre común	Vituca, Taro, Malango, etc.

Fuente: Morín, 1983



Figura 1: Frutos de Vituca (*Colocasia esculenta*)

Fuente: SelvaNet



Figura 2: Planta de Vituca (*Colocasia esculenta*)

Fuente: SelvaNet

a. Clima y suelo

La vituca es una planta esencialmente tropical, requiere altas precipitaciones (1800- 2500 mm) bien distribuidos en temperaturas entre 25 °C – 30 °C y una buena luminosidad.

Algunas variedades de vituca crecen en suelos donde el agua es suministrada por irrigación (cultivos secos) mientras que otras crecen bajo agua (irrigación) (Morín, 1983).

b. Cultivo

La vituca es más productiva en suelos bien abonados, para el buen desarrollo de los cornos, los fosfatos estimulan el vigoroso desarrollo de la raíz (Fernández, 1970).

Se propaga el cultivo solo por materiales vegetativos. Con estos se forma una planta herbácea, constituida por un corno simple o ramificado de cuya parte superior brotan de 10 a 20 hojas formando una macolla, del ápice del corno brotan también las inflorescencias (León, 2000).

c. Variedades de vituca

En nuestro medio se ha podido reconocer tres variedades de *Colocasia esculenta*, llamándose negra si la variedad que tiene en la base del limbo y fusil de caquis una coloración rosada, mientras que la variedad blanca tiene esta porción del casquis color amarillento claro. La variedad Japonesa se distingue por la coloración pigmentada azul morado en su corno (Morín, 1983).

d. Usos de la vituca

La vituca (*Colocasia esculenta*), es una planta de rápido desarrollo vegetativo, aprovechable en su totalidad, difundida en todas las zonas del país, de fácil propagación y aceptable valor nutricional (Ferreira y Cols., 1990).

Utilizando tecnologías sencillas, es posible aprovechar este recurso agrícola obteniendo almidón de vituca, que sirve como materia prima para la elaboración de diversos productos alimenticios (Aguilar y Villalobos, 2013). Debido a sus altas cantidades de almidón, superiores al 80 %, la vituca puede ser utilizada para remplazar materias primas convencionales como maíz, ñame, yuca y papa en la industria alimentaria (Torres y Cols., 2013).

La preparación y elaboración de la vituca depende mucho de los conocimientos locales acerca de la toxicidad y de las cualidades específicas de cada cultivar (FAO, 1990).

e. Composición química

Tabla 3

Contenido de Carbohidratos en la vituca (base seca)

Carbohidrato	Por ciento
Almidón	77.9
Pentosas	2.6
Dextrina	0.5
Azúcares reductores	0.5
Sacarosa	0.1

Fuente: Coursey (1968) y Oyenuga (1968)

Tabla 4*Composición química de los tubérculos de vituca (base fresca)*

Ítem	Por ciento
Humedad	69.1
Cenizas	0.87
Fibra dietética	1.46
Almidón	24.5
Azúcares simples	1.01
Grasa	0.10
Proteína, Nx6.25	1.12
Energía, Kjoule/100 g	480

Fuente: Bradbury y Holloway (1988)

Los cornos de la vituca son reconocidos como una fuente barata de carbohidratos en relación a los cereales u otros cultivos de tubérculos (Caicedo, 2013). La producción por hectárea de vituca es más bajo en comparación con las otras raíces y tubérculos. No obstante su superioridad en términos de digestibilidad del almidón (98,8%) (Caicedo, 2013).

2.3.2. Bioetanol

El bioetanol es obtenido a partir de materiales vegetales muy diversos como almidón contenido en semillas de papa, yuca, camote, vituca, trigo, maíz, azúcares contenidos en la caña de azúcar o remolacha y celulosa contenida en la paja de cereales, en la madera y en residuos agrícolas, urbanos e industriales (Bardales y Cols, 2011).

a. Producción de bioetanol

Llamado alcohol etílico o etanol, obtenido a partir de la fermentación de los azúcares presentes en los productos vegetales.

De manera general, el proceso de obtención de bioetanol se realiza cuando los azúcares contenidos en la biomasa se transforman

en etanol por acción de determinados microorganismos, en un medio con pH entre 4 y 5.

El esquema de la reacción para la producción de bioetanol es el siguiente:



b. Costos de Producción

Los costos de producción para los principales países productores oscilan entre 32 y 87 USD/barril. Estudios mencionan que entre el 47% y el 58% de este costo corresponde a la materia prima, entre 13% y 24% a insumos, entre 6% y 18% a costos de operación y mantenimiento y entre 11% y 23% a costos de capital. La variación de los costos de producción se debe a factores agroclimáticos, disponibilidad de tierras y costo de mano de obra. (Carriazo y Cols., 2012)

c. Métodos de obtención de Bioetanol

Licuefacción

El proceso de licuefacción consiste en convertir los gránulos de almidón de la suspensión concentrada a glucosa. La temperatura a la cual debe de ser calentada la solución para la licuefacción depende de la fuente de enzima; la enzima comúnmente utilizada es la α -amilasa (Morales y Sánchez, 2004).

La sacarificación

Convierte la solución licuada de la etapa de licuefacción a glucosa en rendimientos tan altos como sea posible. Usando la glucoamilasa es posible una conversión prácticamente total del

almidón a glucosa puesto que hidroliza los enlaces glucosídicos $\alpha 1 \rightarrow 6$ que presenta la amilopectina. (Morales y Sánchez, 2004).

Fermentación

Es una reacción de oxidación-reducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía (donador de electrones) se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel sustrato. Una ruta bioquímica muy usada para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también denominada vía de Embden-Meyerhof en atención a sus descubridores.

El proceso, simplificado, de la fermentación es la siguiente:
Azúcares + levaduras \longrightarrow Alcohol etílico + CO_2 + calor + otras sustancias (Giron y Funes, 2013).

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 (Murgas y Vásquez, 2012).

2.3.3. Almidones

El almidón es la sustancia que sirve a casi todas las plantas como reserva de carbohidratos para uso metabólico, para el embrión vegetal de las semillas y para la hibernación natural o los periodos de sequía (Allinger y Lopez, 1970-1972).

Los granos de almidón están constituidos de amilopectina (alrededor del 80%) como sustancia externa y de amilosa (alrededor del 20%) como sustancia interna.

Ambos polisacáridos se diferencian por sus propiedades físicas y químicas (Hans y Walter 1987).

Los gránulos de almidón se hidratan cuando se suspenden en agua fría; si la suspensión se calienta se produce un hinchamiento mayor, que rompe el gránulo y provoca que la amilosa y la amilopectina salgan fuera produciendo una suspensión viscosa (Gil, 2010).

a. Propiedades físicas del almidón

El almidón se presenta en forma de polvo o masas angulares irregulares, de color blanco, pero se observan muy ligeras diferencias del tono según su origen.

El almidón es insoluble en solventes orgánicos y en agua fría pero forma una solución coloidal al hervirse con 15 veces su peso en agua, debido a que los granos se hinchan y finalmente se rompen. Esta solución al enfriarse produce una jalea firme y transparente.

Tiene gran densidad, que varía de 1,62 a 1,65, y la suspensión en agua da un color azul con una solución de yodo, que desaparece al calentarse a 93 °C pero reaparece por enfriamiento (Salama, 2005).

b. Usos de almidón

El almidón, debido a su relativa abundancia en las plantas, ha sido la fuente primaria de energía en la dieta humana y ha acompañado la alimentación del hombre desde sus inicios. El uso de almidones en los alimentos floreció con el surgimiento de la industria

de alimentos procesados y la disponibilidad del almidón puro. El almidón, por sus características nutricionales y sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, es el carbohidrato más importante, además de su relevancia en el comercio (Torres y Cols., 2013).

Tabla 5

Características de algunos almidones comunes

Características de algunos almidones comunes			
Tipo	Amilopectina (%)	Amilasa (%)	Tamaño (micras)
Maíz	73	23	5-25
Maíz amiláceo	20-45	55-80	5-25
Papa	78	22	5-100
Arroz yuca	83	17	2-55
Yuca	82	18	5-35
Maíz céreo	99-100	0-1	5-25
Sorgo	99-100	0-1	5-45
Trigo	76	24	11-41
Oca	71	29	20-29
Mashua	73	27	5-10
Vituca	75	25	4-11

Fuente: Morales (2012)

La Tabla 5 muestra las Composiciones de los dos componente del almidón: la amilopectina y la amilosa, por lo cual hacemos comparación con otros almidones dando los siguientes resultados de las composiciones de la vituca con 75% de amilopectina y 25% de amilosa.

c. Estructura y composición

Todos los almidones tienen fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ n. el factor n tiene por lo menos un valor igual a 4; llegándose a encontrar fórmulas con 100 a más átomos de carbono.

La diferencia entre la celulosa y el almidón radica en que en el almidón, los restos de glucosa están unidos entre sí por uniones glucosídicas 1-4, con orientación α , mientras que la celulosa tiene uniones 1-4 glucosídicas con orientación β . Además de esto se sabe que el almidón contiene alrededor del 20 % de una fracción soluble en agua llamado amilosa y el 80% de una solución insoluble conocida como amilopectina (Murgas y Vásquez, 2012).

d. Enzimas utilizadas en la obtención de almidón

La α -amilasa

Es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α 1 \rightarrow 4 de amilosa y amilopectina (almidón). Entre los valores aceptados para la amilosa están entre 1,1 y 1,9 millones de daltons (Murgas y Vásquez, 2012).

La α -amiloglucosidasa

La α -amiloglucosidasa es un enzima de origen fúngico (procede de hongo *Aspergillus niger*) que hidroliza el glucógeno, almidón y las dextrinas, liberando moléculas de glucosa. Por ello, se puede emplear en sustitución de la α -amilasa. La α -amiloglucosidasa es capaz de hidrolizar los enlaces glucósidos α 1 \rightarrow 4 y α 1 \rightarrow 6, aunque la velocidad de reacción es mucho mayor para los enlaces α 1 \rightarrow 4.

Las condiciones óptimas son de pH \approx 4.0 y T = 75 °C, aunque también es activa a T = 37 °C (González, 2012).

Pectinasa

Las enzimas pectinasas son catalizadores proteicos sintetizados por sistemas vivos (por células animales, vegetales o microbiológicas), cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

En una reacción enzimática, la sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada centro activo, este comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción. Una vez formados los productos la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción. (Beltrán y Cols., 2007)

2.3.4. Microorganismos utilizadas para la fermentación de bioetanol

Saccharomyces cerevisiae

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiende a formar colonias de color crema, blancas y húmedas en mosto agar. En cultivos jóvenes las células presentan forma redonda, ovalada o poliforme y un tamaño de 4 a 14 micras de longitud por 3-7 micras de grueso forma ascosporas redondas y lisas. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. No utiliza nitratos, y tolera pH: 3.5-4.0

La pared celular exterior de *Saccharomyces cerevisiae* consiste principalmente en un complejo de fosfomanan, en tanto que las zonas exteriores de las mismas, estarán formadas por manana y glucana (Giron y Funes, 2013).

Es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo , tolera altas concentraciones de etanol , en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2007)

2.3.5. Concentración de bioetanol

El grado alcohólico es determinado en la práctica mediante un aerómetro expresamente graduado, llamado alcoholímetro, alcoholómetro o aerómetro. El más utilizado es el alcoholímetro de Gay Lussac, el cual se encuentra graduado a 15°C, y expresa el grado alcohólico en volúmenes (centímetros cúbicos de alcohol etílico en 100 centímetros cúbicos de líquido a 15°C) (Giron y Funes, 2013).

2.3.6. Concentración de azúcares reductores

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina. El original procedimiento de Dahlquist ha sido modificado en un proceso automatizado para análisis de azúcares totales producidos por la hidrólisis de polisacáridos que no contengan almidón. Para este se requiere tener estándares similares a la muestra (UNAM, 2007- 2008).

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

Reacción de hidrólisis de azúcares

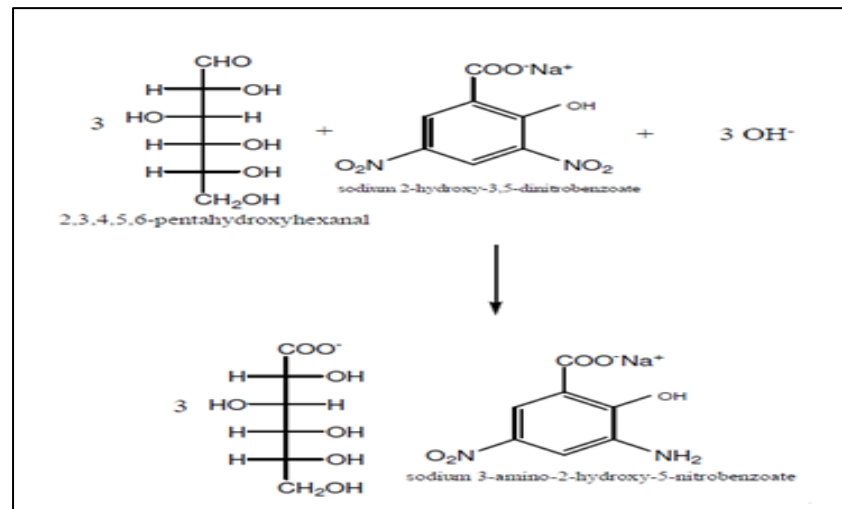


Figura 3: Reacción de hidrólisis de azúcares en disolución alcalina produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto.

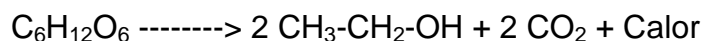
Fuente: UNAM (2007- 2008)

2.3.7. Grados °Brix

Los grados Brix (°Bx) indican la cantidad de sólidos solubles, es decir, la consistencia del producto. Se determina mediante el índice de refracción el cual se basa en la dirección que toma un rayo de luz cuando incide en un medio de diferente densidad que el aire (Giron y Funes, 2013).

2.3.8. Rendimiento de bioetanol

Es la relación entre el alcohol producido y el azúcar puesto a disposición de la levadura.



Según esta reacción, de 100 kg de glucosa se obtienen 51,1 kg de etanol y 48,9 kg de dióxido de carbono. En la práctica, el rendimiento real en etanol es menor que el valor teórico, ya que aproximadamente un 5% de glucosa es utilizado por el

microorganismo para producir nuevas células y otros productos de su metabolismo (Ribeiro y Seravalle, 2004).

2.3.9. Uso de biocombustibles en el Perú

Marco legal, políticas y estrategias del sector biocombustibles

Marco legal

En abril del 2007 se aprobó el Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles, el cual, si bien no reemplaza totalmente al Reglamento de la Ley N° 28054 descrito anteriormente, sí mejora substancialmente varios puntos críticos que dificultaban iniciativas y emprendimientos, derogando y reemplazando artículos específicos del mismo. Este nuevo Reglamento establece:

Nuevas normas que regulan la comercialización y distribución de biocombustibles puros y sus mezclas con combustibles líquidos derivados de los hidrocarburos.

Normas técnicas de calidad específicas que se deberán cumplir hasta que se desarrollen las Normas Técnicas Peruanas respectivas.

Normas para el registro de las mezclas de biocombustibles con combustibles derivados de los hidrocarburos ante la Dirección General de Hidrocarburos.

Un nuevo cronograma para la comercialización de los biocombustibles y sus mezclas.

Las principales novedades y mejoras que incorpora este Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles son: Porcentajes de mezcla: para el caso del biodiésel, se contempla la comercialización de mezclas que contengan 2% de biodiésel en 98% de diesel (Diesel B2), 5% de biodiésel en 95% de diesel (Diesel B5),

20% de biodiésel en 80% de diesel (Diesel B20). No está permitida la comercialización de mezclas en proporciones diferentes.

Para el etanol, el porcentaje de mezcla sigue fijo en 7,8% (gasohol) (Castro y Cols., 2008).

Políticas y estrategias

Las políticas y estrategias relacionadas con el desarrollo de los biocombustibles en el Perú están dadas, principalmente, por el marco legal descrito en los párrafos anteriores. La Ley de Promoción del Mercado de los Biocombustibles intenta establecer una política para la promoción del mercado de biocombustibles y para la diversificación del mercado de combustibles, fomento del desarrollo agropecuario y agroindustrial, generación de empleo, disminución de la contaminación ambiental (Castro y Cols., 2008).

2.3.10. Etanol – Producción

Actualmente, la empresa Sucroalcolera del Chira S.A. es el único productor de Alcohol Carburante a partir de caña de azúcar, cuenta con una capacidad de producción de 350,000 lt/día. Esta planta entró en producción a fines del tercer trimestre del año 2009.

Para el cumplimiento del volumen de mezcla Alcohol-Gasolina que establece la normativa legal peruana (7,8% en volumen de etanol), se requiere 8000 has de cultivo de caña, contando a la fecha con el 75% aproximadamente (Osinermin, 2010).

2.4. Definición de términos básicos

Alcoholes

Un alcohol es un compuesto que posee el grupo –OH unido a un átomo de carbono que puede pertenecer a un grupo alquilo (alcohol alifático) o aun grupo aromático (Aldabe y Cols., 2004).

Mezcla azeotrópica

Son los resultados de mezclar dos sustancias de la misma naturaleza química con la condición de que no reaccionen entre sí, tanto en el momento de la mezcla como a largo plazo, y de tal manera que las características del producto resultante dependen de las características de los elementos que la constituyen (Franco, 2006).

ATP

Coenzima nucleótica adenosintrifosfato representa la forma de almacenamiento de energía química más importante en las células vivas (Koolman y Röhm, 2004).

Glucosa

Es el monosacárido más común, de importancia central entre la química de la vida; se conoce también como azúcar simple (Campbell y Reece, 2005).

Enzima

Las enzimas son proteínas que participan en lograr cambios y transformaciones de otras sustancias (Suárez, 2008).

Polisacáridos

Son moléculas formadas por la unión de muchas moléculas de monosacáridos entre sí (Peña y Cols., 2004).

Oligosacáridos

Son compuestos que consisten de un número relativamente pequeño de monosacáridos, se encuentran unidos entre sí por enlaces glicosídicos (Eyzaguirre, 1974)

Monosacáridos

Azúcares simples los cuales no pueden ser fraccionados en moléculas más pequeñas por hidrólisis (Mora, 2002).

Dextrinas

Son subproductos de almidón obtenidos mediante temperatura alta pero aplicada por poco tiempo que convierte el almidón en una pasta con mayor adhesividad (Arroyo, 1988).

Espectrofotometría

Consiste en medir el porcentaje de transmitancia (%T) de la luz monocromática que pasa a través de una disolución que absorbe la luz comparando con la cantidad que atraviesa un blanco que contiene todo en el medio menos el constituyente que se busca (100%) (Manahan, 2007).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación

Descriptivo: La presente propuesta de estudio se ubica en una investigación de tipo descriptiva, ya que se señaló las particularidades que presentó el almidón de vituca durante el proceso de reacción de la hidrólisis con las enzimas α -amilasa, pectinasa, glucoamilasa y fermentación con levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de bioetanol.

3.1.2. Diseño de la investigación

Experimental: Puesto que se manipuló las variables independientes como son concentración de almidón de vituca en la solución, concentración de enzima α -amilasa, pectinasa, glucoamilasa, concentración de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuyo fin fue garantizar la acción efectiva de estos complejos en los proceso de hidrólisis y fermentación.

3.2. Población y muestra

Población: Producción de vituca del distrito de San Andrés de Cutervo

Muestra: 6 Kg de vituca de variedad blanca procedente del distrito de San Andrés de Cutervo.

3.3. Hipótesis

H_i = La hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (*Colacasia esculenta*); permite obtener un rendimiento de bioetanol superior a 50 % luego de 72 horas de fermentación anaeróbica.

H_o = La hidrólisis enzimática y fermentación a partir de almidón de vituca (*Colacasia esculenta*); no permite obtener un rendimiento de bioetanol superior a 50 % luego de 72 horas de fermentación anaeróbica.

3.4. Variables

V. Independiente

Concentración de almidón de vituca
Concentración de enzima α -amilasa y pectinasa
Concentración de enzima pectinasa
Concentración de enzima glucoamilasa

V. Dependiente

Concentración de bioetanol
Concentración de azúcares reductores
Grados °Brix
Rendimiento de bioetanol

3.5. Operacionalización

Tabla 6

Operacionalización de las variables

V. Independiente	Dimensiones	Indicador	Instrumento
Concentración de almidón de vituca	80 a 160	g/L	Probeta, balanza y varilla de agitación
Concentración de enzima α-amilasa	0.1 a 1	g/L	Balanza, probeta y varilla de agitación
Concentración de enzima pectinasa	0.02 a 0.04	g/L	Balanza y probeta y varilla de agitación
Concentración de enzima glucoamilasa	0.05 a 0.1	ml/L	Micropipeta, Probeta y varilla de agitación
V. Dependiente			
Concentración de bioetanol		Gay Lussac (°GL)	Alcoholímetro
Concentración de azúcares reductores		g/L	Espectrofotómetro
Grados °Brix		°Brix	Refractómetro
Rendimiento de bioetanol		%	Probeta y alcoholímetro

Fuente: Elaboración propia

3.6. Abordaje Metodológico, técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.6.1. Técnicas de recolección de datos

a. Determinación concentración de bioetanol

La concentración de bioetanol se determinó mediante un alcoholímetro graduado en unidades de Gay Lussac, el cual se encuentra calibrado a 15°C, y expresa el grado alcohólico en volúmenes (centímetros cúbicos de alcohol etílico en 100 centímetros cúbicos de líquido a 15°C) (Giron y Funes, 2013).

Metodología

Se procedió a colocar 100 mL del destilada en una probeta de 100 mL.

Se limpió y secó con papel tisú el alcoholímetro luego se sumergió dentro de la probeta que contiene la muestra, asegurando que la muestra cubra por completo el alcoholímetro.

Se realizó la lectura y anotó el valor del grado alcohólico de la muestra.

b. Determinación de azúcares reductores

La determinación de los azúcares reductores se realizó mediante la técnica del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) después de la licuefacción y sacarificación.

Se trata de determinar el contenido de azúcares reductores, estableciendo como máximo permitido un porcentaje de azúcares

reductores del 0.1-0.2% cuyo contenido fue calculado mediante fórmula (UNAM, 2007-2008).

Metodología

Se procedió a diluir 1ml de muestra hidrolizada con 9 ml de agua destilada en un tubo de ensayo para cada una de las muestras. Los tubos de ensayo fueron puestos a ebullición por 5 minutos, posteriormente se procedió a enfriar hasta una temperatura de 5 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos con la finalidad de separar partículas de almidón o enzimas que se encuentren inmersas en la muestra (líquida).

Luego de haber centrifugado se prepara en un tubo de ensayo 1 ml de muestra centrifugada y 2 ml de DNS; paralelamente se preparó el blanco para la lectura en el espectrofotómetro con 1 ml de agua destilada y 2 ml de DNS.

A continuación se procedió a colocar las muestras en baño maría por espacio de 5 minutos agitando constantemente y dejando reposar por 10 minutos dejando reposar con la finalidad de enfriar.

Se introdujo en el espectrofotómetro el blanco y se midió a la longitud de onda de 546 nm. Por último, se procedió a la medida de las muestras a la misma longitud de onda.

Cálculo

Se aplicó la relación existente entre la absorbancia y el porcentaje en azúcares según curva patrón obtenida en el programa (Microsoft Excel), según los datos obtenidos de absorbancias mediante el espectrofotómetro, se reemplaza en la ecuación para determinar el % de azúcares.

$$\% \text{ Azúcares} = (\text{Absorbancia} + 0.2255) / 1.8386$$

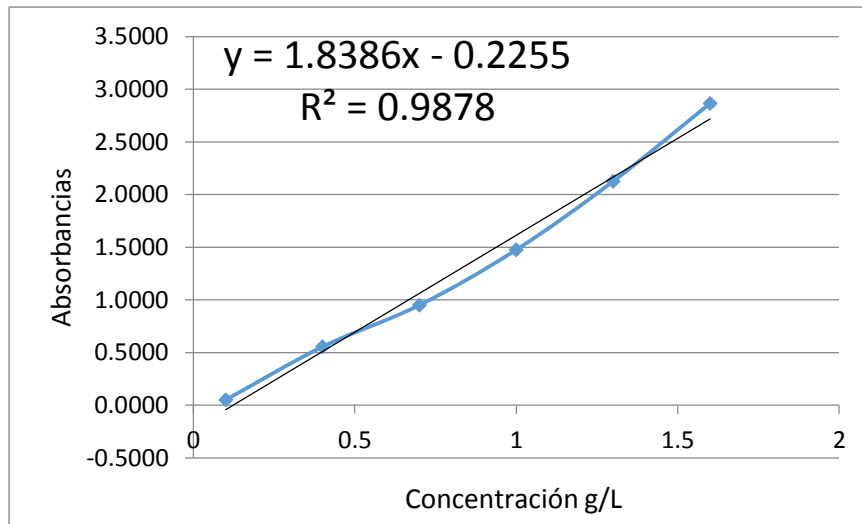


Figura 4

Curva patrón para determinar la ecuación del % de azúcares reductores

Fuente: Elaboración propia

c. Determinación de Grados °Brix

Se determinó mediante el índice de refracción el cual se basa en la dirección que toma un rayo de luz cuando incide en un medio de diferente densidad que el aire (Giron y Funes, 2013).

Metodología

Se procedió a limpiar el prisma del brixómetro con agua destilada.

Se calibró el brixómetro con una gota de agua destilada y llevó a cero en la escala.

Luego se depositó una gota de muestra sobre el prisma del brixómetro.

Posteriormente se tomó la lectura orientando el brixómetro hacia la luz para observar la escala en el instrumento.

d. Determinación del rendimiento de bioetanol

El rendimiento se determinó mediante la relación entre el alcohol producido y el azúcar puesto a disposición de la levadura.

Teóricamente por 100 kg de glucosa se obtienen 51,1 kg de etanol (Ribeiro y Seravalle, 2004).

Cálculo

$$\rho = m/v$$

$$m = \rho * v$$

ρ = Densidad del etanol puro (789 g/L)

m = Masa del soluto (g)

v = Volumen de etanol obtenido (L)

$$Y_{p/s} = \frac{p - p_0}{-(s - s_0)}$$

$Y_{p/s}$ = Rendimiento producto- sustrato

p = Concentración de etanol final (g/L)

p_0 = Concentración de etanol inicial (g/L)

s = Concentración de glucosa final (g/L)

s_0 = Concentración de glucosa inicial (g/L)

3.6.2. Instrumentos de recolección de datos

a. Materia prima

Vituca de variedad esculenta producida en San Andrés de Cutervo.

b. Equipos e instrumentos

Espectrofotómetro, Espectrophometer N 203; espectro UV visible 400-700 nm; lámpara de Litio tungsteno de 200 watts; (Servicio externo).

Centrífuga, modelo: 0408-1; velocidad: 4000 rpm; tiempo: hasta 30 minutos. Para separar partículas de almidón o enzimas durante el proceso de medición de azúcares reductores totales; (laboratorio de Química Industrial de la USS)

Baño de María, modelo CDK-224; voltaje de red: 220V 50 Hz; Consumo de energía: 1000 W; temperatura: ± 0.5 °C- 99 °C. Utilizado para conferir temperatura uniforme de las muestras obtenidas luego de haber puesto a centrifugar para una correcta lectura del espectrofotómetro; (laboratorio de Química Industrial de la USS).

Agitador orbital, modelo: KJ201BS marca: oscilador orbital shaker; velocidad: 210 rpm. Con el propósito de remover constantemente las muestras para que haya una distribución uniforme de levadura y enzimas; (Servicio externo).

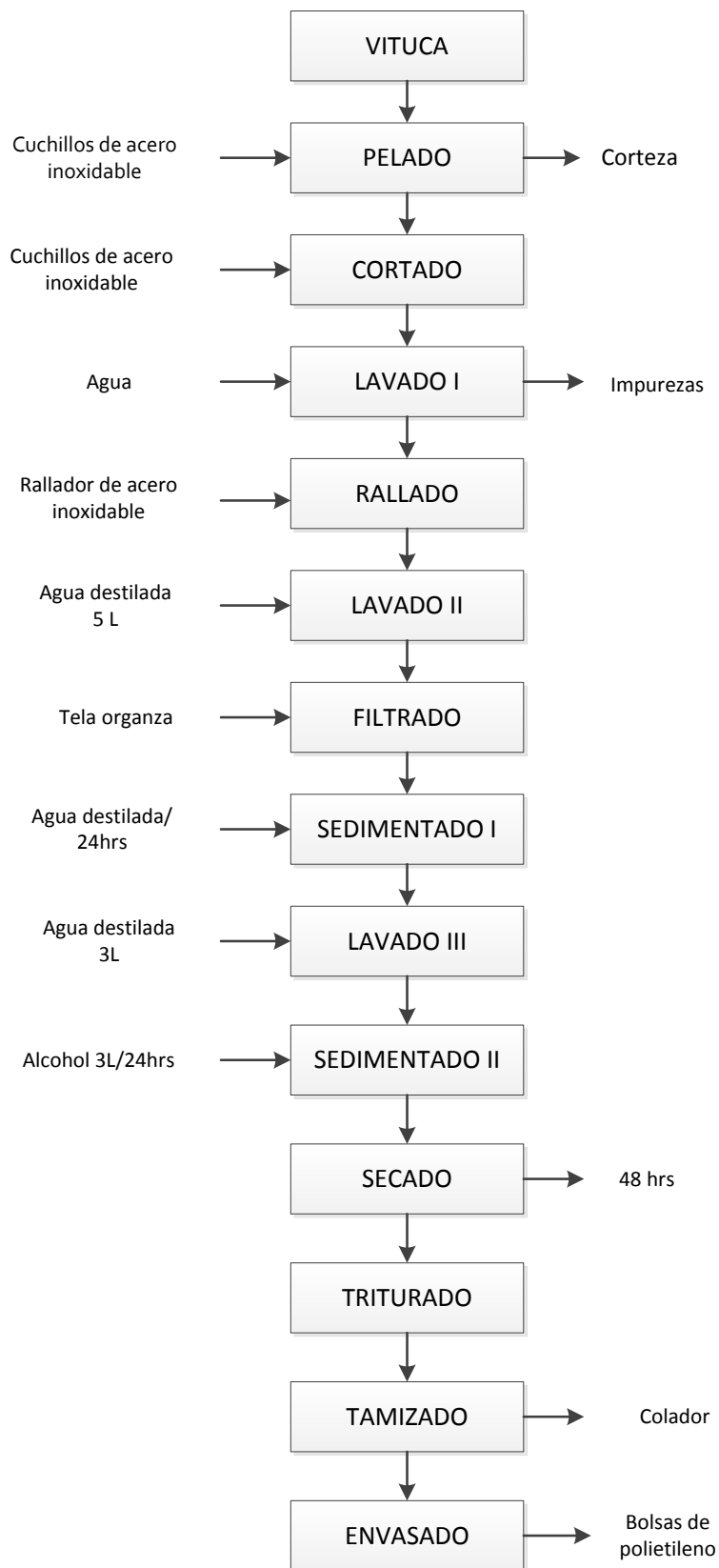
Balanza analítica Typ U3600, Sartorius: equipo que arroja datos exactos al realizar el pesado de almidón, enzimas y levadura; (Planta Piloto de Procesos Agroindustriales).

c. Reactivos e insumos

- almidón
- agua
- DNS (Ácido dinitrosalicílico); Denominación: Acido 3,5-Dinitrosalicílico; Fórmula: $C_7H_4N_2O_7$ M.=228,12 CAS [609-99-4] Número CE (EINECS): 210-204-3.
- α -amilasa; Marca: Spectrum.
- pectinasa; Marca: Endozym.
- glucoamilasa; Marca: NS22035 glucoamylase.
- levadura: *Saccharomyces cerevisiae* (cepa de vino)

3.7. Procedimiento para recolección de datos.

Diagrama de bloques para la obtención de almidón de vituca



Descripción del diagrama de flujo

Materia prima

La vituca utilizada para la obtención de almidón fue acarreada del distrito de San Andrés (Cutervo-Cajamarca).

Pelado:

Los frutos se pelaron manualmente con cuchillos de acero inoxidable. Fue necesario pelar profundamente pues si se hacía superficial iba a quedar residuos de cascaras lo cual provocaría la alteración del almidón.

Cortado:

Se procedió a cortar los frutos por la mitad con la finalidad de facilitar la rápida eliminación del mucilago al momento del remojo.

Lavado I:

Se procedió a retirar las impurezas adheridas en la cascarilla y materiales no deseados en el proceso empleando agua clorada; luego fue puesto a remojar por 24 horas para eliminar el mucílago presente en el fruto que dificultaba la rápida sedimentación del almidón.

Rallado:

El rallado se realizó en seco con un rallador de acero inoxidable para reducir en partículas pequeñas y así poder separar la merma del almidón.

Lavado II:

Se procedió a lavar la vituca rallada con 5 litros de agua destilada con el propósito de obtener el almidón.

Filtrado:

Para este proceso se utilizó tela organza para evitar el paso de la merma.

Sedimentado I:

El proceso de sedimentación se realizó en recipientes de plástico con agua destilada por un tiempo de 24 horas.

Lavado III:

Trascurrido el proceso de sedimentación se procedió a retirar el agua tratando de que la muestra de vituca permanezca en los recipientes para luego ser lavada con 3 L de agua destilada.

Sedimentado II:

El proceso de sedimentación se realizó en recipientes de plástico por un tiempo de 24 horas con 3 L de alcohol con la finalidad de eliminar pigmentos y grasas presentes en el almidón.

Secado

El almidón húmedo se secó a temperatura ambiente por un tiempo de 48 horas.

Triturado

El almidón seco se pulverizó con un mortero de porcelana para reducir el tamaño de las partículas.

Tamizado

El producto final se tamizó con un colador con el propósito de reducir el tamaño para que haya una mejor disolución en la muestra preparada.

Envasado

El almidón se envasó en bolsas de polietileno de alta densidad y sellado para su conservación.

Proceso para licuefacción

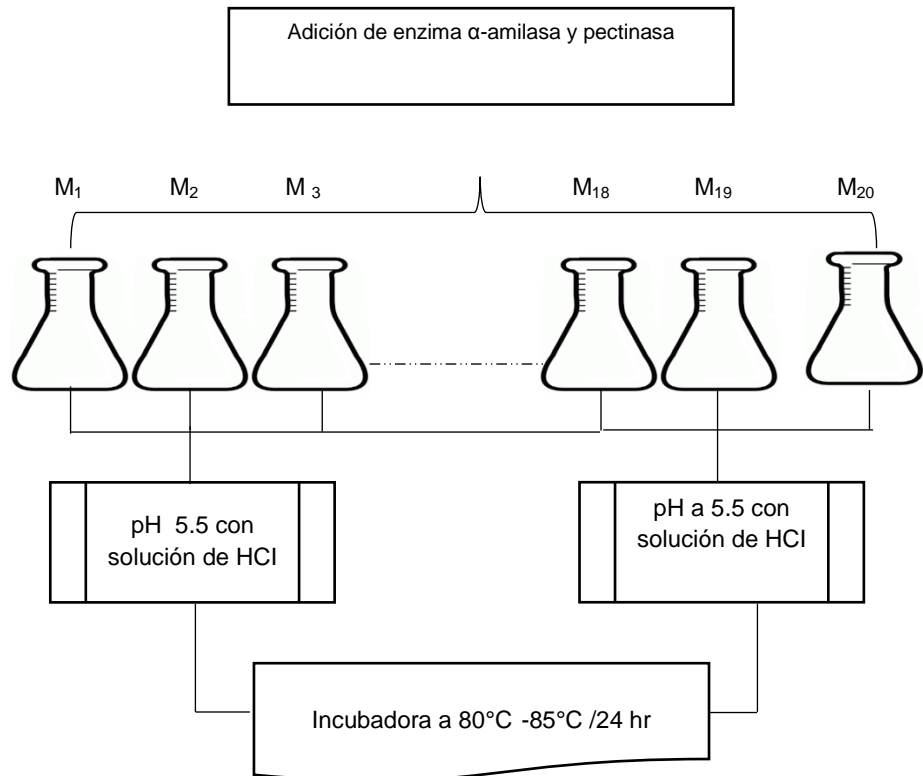


Figura 5: Proceso de licuefacción de enzimas α -amilasa y pectinasa, para la ruptura de enlaces glucosídicos α 1 \rightarrow 4.

Fuente: Elaboración propia

Para el proceso de licuefacción y sacarificación se tomó como referencia estudios que mencionan que las concentraciones adecuadas para obtener bioetanol están en el rango de 100 y 160 g diluidos en un litro de agua (Murgas, Vásquez, 2012). La cantidad de almidón de vituca que se utilizó estuvo entre los rangos de 80 y 160 g diluido en un litro de agua según datos obtenidos del programa Desing -expert, software de la versión 7 (DX7); para esta etapa de licuefacción se utilizó la enzima α -amilasa (α -amylase, From Malt Spectrum) complementada con enzima pectinasa.

En el proceso de hidrólisis las soluciones preparadas se colocaron en frascos de vidrio de 500 ml con un volumen de

reacción de 300 ml, se realizó 20 muestras cada una con diferentes concentraciones de almidón así como de enzimas utilizadas.

Luego se procedió a medir el pH con la finalidad de bajar a 5.5 con una solución de HCl (ácido clorhídrico).

Para el proceso de hidrolizado se construyó una incubadora con la finalidad de mantener la temperatura del medio entre 80°C – 85°C por 24 hr; además de ello se utilizó un agitador orbital a 160 rpm con el propósito de remover constantemente las muestras para que haya una distribución uniforme de levadura y enzimas. Posterior al proceso de licuefacción se realizó mediciones de grados °Brix, y azúcares reductores.

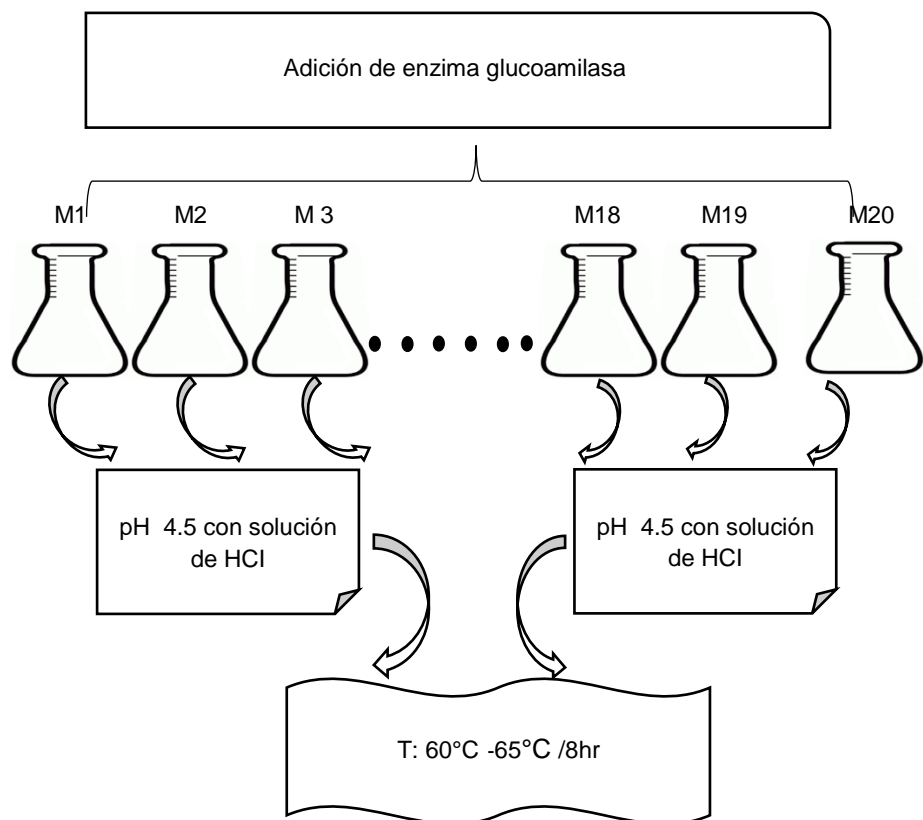


Figura 6: Procesos de sacarificación en la hidrólisis enzimática.

Fuente: Elaboración propia

Para el proceso de sacarificación se procedió a enfriar y bajar el pH a las siguientes condiciones de la enzima glucoamilasa según antecedentes: pH 4.5 con solución de HCl manteniendo la temperatura del medio entre 60°C - 65 °C por un tiempo de 8 horas; se realizaron mediciones Brix y azúcares reductores.

Proceso de fermentación

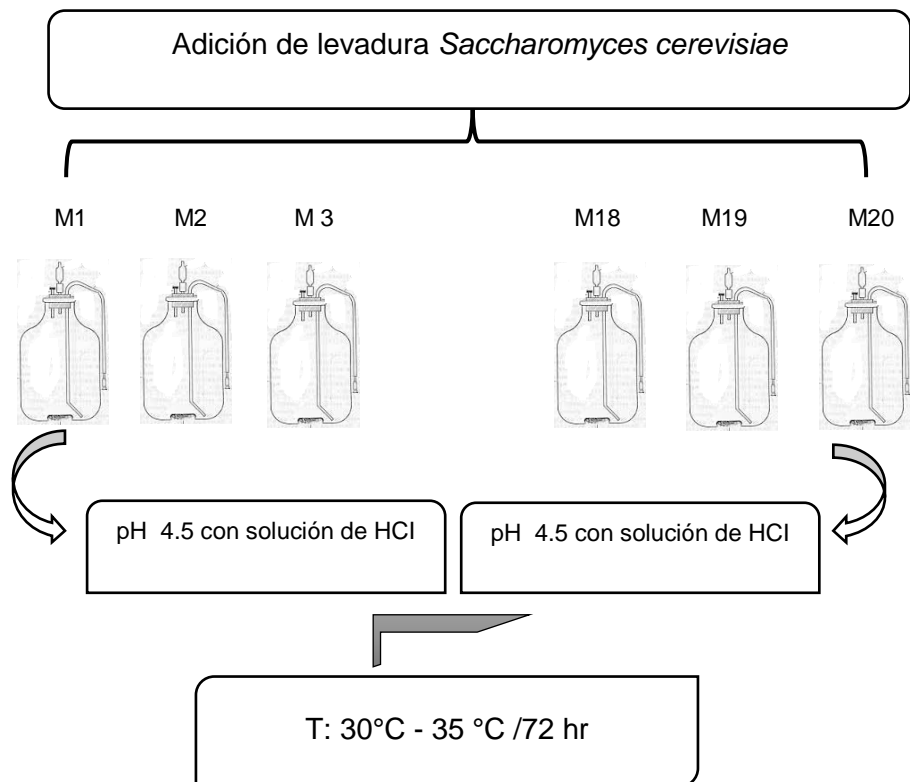


Figura 7: Proceso de fermentación

Fuente: Elaboración propia

Luego de realizar la hidrólisis enzimática por un tiempo de 32 horas se realizó el proceso de fermentación cuyas condiciones de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue: pH 4.5 y T° entre: 30°C - 35 °C durante 72 horas.

En la fermentación se utilizaron frascos sellados herméticamente para lo cual fue necesario hacer agujeros en las tapas así poder ubicar los dos conductos que se utilizaron para realizar el proceso de respiración (botellas con agua destilada) y tomar muestras de pH y Brix mediante una válvula de triple vía. Terminado el proceso fermentativo se tomó muestras para lectura de azúcares reductores.

Se utilizó 0.8 gramos de levadura de vino para todas las muestras realizadas.

Proceso para destilación

Trascurrido las 72 horas de proceso fermentativo se procedió a destilar 100 ml de fermento por cada muestra con la finalidad de tomar medidas con el alcoholímetro de Gay Lussac.

3.8. Plan de análisis estadístico de datos

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del paquete estadístico Desing-expert, software de la versión 7 (DX7), puesto que es un potente y programa fácil de usar para el diseño de experimentos se puede configurar rápidamente un experimento, analizar los datos, y representar gráficamente los resultados.

Tabla 7

Elaboración de variables según paquete estadístico Desing-expert, software de la versión 7 (DX7)

TRATAMIENTOS	VARIABLES (X _i)			
	A: Almidón g/L	B: Pectinasa g/L	C:Alfa- amilasa g/L	D: Glucoamilasa ml/L
1	160	0.02	1	0.05
2	80	0.04	1	0.1
3	80	0.03	0.1	0.1
4	160	0.03	1	0.1
5	120	0.03	0.55	0.075
6	160	0.03	0.55	0.075
7	80	0.02	0.1	0.05
8	160	0.04	0.55	0.1
9	160	0.04	0.1	0.075
10	80	0.04	0.1	0.05
11	80	0.02	1	0.1
12	120	0.04	0.1	0.1
13	120	0.02	0.55	0.075
14	120	0.03	1	0.075
15	120	0.03	0.1	0.075
16	80	0.03	1	0.05
17	160	0.02	0.1	0.1
18	80	0.03	0.55	0.075
19	160	0.04	1	0.05
20	160	0.03	0.1	0.05

Fuente: Elaboración propia

3.9. Criterios éticos

a. Respeto a la propiedad intelectual

En el presente estudio se procedió a cumplir con los requerimientos establecidos por OMPI (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual) según nociones básicas sobre derecho de autor y derechos conexos, que protege los intereses de los creadores dándoles derechos de propiedad sobre sus creaciones, por lo cual

cada texto extraído de libros, tesis, artículos, que hemos tomado para redactar el mencionado estudio ha sido citado debidamente.

b. Beneficencia

El propósito de indicado estudio se fundamentó en el aporte y beneficios que trae consigo la producción de bioetanol a nivel ambiental y económico y social. Desde el punto de vista ambiental beneficiará a la disminución del efecto invernadero ocasionado por las emisiones de CO₂, a nivel social ayudará a reducir los problemas de desempleo y hambre que se presenta en el ciertos sectores; nivel económico contribuirá a aliviar las finanzas de los países consumidores y productores de biocombustibles. Así mismo personalmente ayudó a afianzar nuestro desarrollo profesional debido a que se aplicó las bases y conocimientos prácticos adquiridos a lo largo del proceso de aprendizaje en la Universidad Señor de Sipán.

c. Respeto a la dignidad humana

Para el desarrollo del propuesto estudio se tomó en cuenta el respeto a cada una de las personas que participaron en el proceso, además se cumplió con todos los deberes estipulados según los reglamentos de la Universidad Señor de Sipán.

3.10. Criterio de rigor científico

a. Credibilidad, valor de la verdad/autenticidad

La información requerida para el desarrollo de este trabajo ha sido tomada de estudios validados científicamente, así mismo los resultados obtenidos en el estudio fueron plasmados tal y como se obtuvieron y no fueron modificados, permitiendo generar confianza y credibilidad en la investigación.

b. Transferibilidad, aplicabilidad

La transferibilidad a favorecer con este estudio fue dirigido a estudiantes, profesionales y aquellas personas que busquen no solo el desarrollo personal sino también de su comunidad para ello se ofreció una descripción densa que permita al lector manejar la información necesaria y suficiente que facilite establecer comparaciones y transferir dichos resultados.

c. Consistencia, dependencia / Replicabilidad

Se contrastó los resultados obtenidos por los diferentes métodos aplicados, entre los que podemos citar: Alcoholímetro de Gay Lussac (determinación de concentración de bioetanol), técnica del ácido 3,5 DNS (determinación de azúcares reductores), brixómetro (determinación de grados °Brix), relación entre el alcohol producido y el azúcar puesto a disposición de la levadura (determinación del rendimiento de bioetanol), además de ello se utilizó diagramas de flujos y ficha de trabajo lo cual constituyó un adecuado método que justificó una vez más la consistencia durante el desarrollo del presente trabajo, pues a través de él se pudo establecer pistas de revisión, donde se reflejaron los procesos seguidos para la recogida de datos, análisis e interpretaciones de los datos, lo que ayudó a considerar el modo en que los resultados dependen de los contextos y sujetos estudiados.

d. Confirmabilidad o reflexividad, neutralidad / objetividad

Concluida la investigación se procedió hacer un análisis comparativo entre los datos aportados en el desarrollo del proyecto y los obtenidos, dando mayor confiabilidad al estudio, cabe mencionar que a la medida que avance la investigación, la comprensión de la

realidad objeto de estudio permitió desvelar indicios y nuevos caminos a recorrer más, que presentar absoluta certeza.

e. Relevancia

Se realizó las conclusiones del trabajo resaltando la relación que existe con los objetivos y validando la hipótesis planteada.

CAPITULO IV: ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Resultados en tablas y gráficos

4.1.1. Concentración de Azúcares reductores Totales

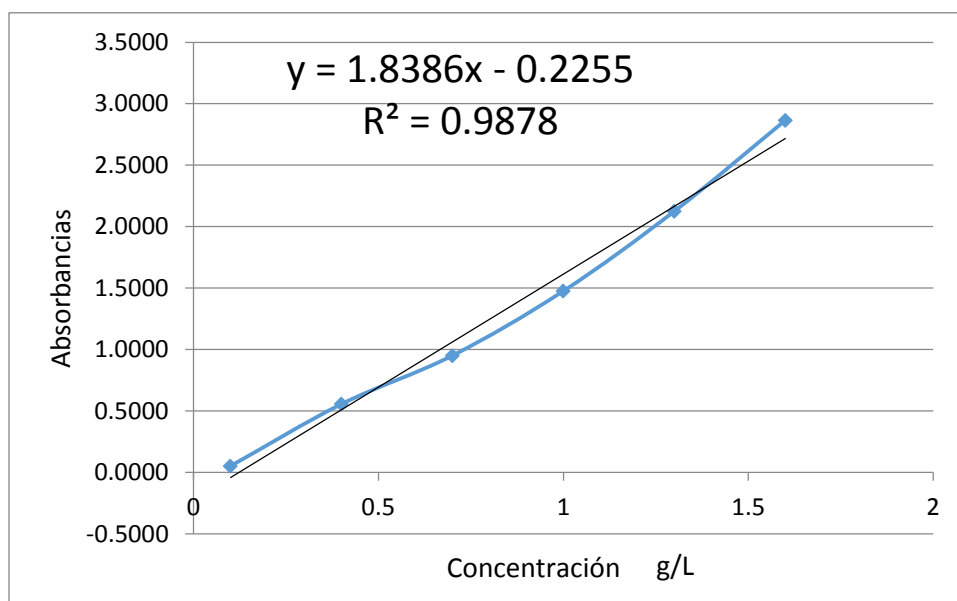


Figura 8

Curva patrón para determinar la ecuación del % de azúcares reductores

Fuente: Elaboración propia

En la figura 10 se puede visualizar la ecuación de la curva patrón construida a partir de la relación existente entre las concentraciones glucosa y absorbancias. La ecuación obtenida permitió realizar los cálculos de azúcares reductores para las diferentes muestras; el $R^2=0.9878$ representa la aproximación a un ajuste lineal perfecto puesto que es cercano a 1.

Tabla 8

Porcentaje de azúcares reductores obtenidos al durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)

Azúcares licuefacción	
Muestras	24 hr (g/L)
M1	68.8078
M2	68.4651
M3	41.9341
M4	67.0293
M5	52.8826
M6	59.1319
M7	36.8106
M8	62.8848
M9	33.8899
M10	46.4049
M11	57.1087
M12	52.1321
M13	64.9244
M14	69.4768
M15	50.2393
M16	47.1391
M17	42.7662
M18	54.6612
M19	62.1832
M20	38.8469

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 8 se observa los resultados obtenidos durante el proceso de hidrólisis (licuefacción), se puede apreciar que transcurridas 24 hr de hidrólisis la reacción de las enzimas mostró resultados de 69.4768 ART como valor máximo en la muestra 14 la cuál trabajo con concentraciones de almidón 120 g/L, pectinasa 0.03 g/L y α -amilasa 1.0 g/L, pudiendo concluir que a mayor concentración de α -amilasa hay una mejor reacción en el proceso.

Tabla 9

Porcentaje de azúcares reductores obtenidos a las 8 horas de la hidrólisis enzimática (sacarificación) y después de 72 horas de fermentación

Muestras	Azúcares	Azúcares
	sacarificación	fermentación
	(g/L)	(g/L)
M1	77.2599	3.5734
M2	74.1597	3.1002
M3	56.2112	5.3845
M4	80.0337	2.0559
M5	69.1015	4.0139
M6	77.7494	2.9533
M7	52.4584	5.4824
M8	72.2017	3.8508
M9	51.3162	5.6619
M10	56.0481	5.3356
M11	73.0175	3.1981
M12	62.2484	5.1724
M13	76.2809	2.8228
M14	75.3019	4.1445
M15	59.9641	4.6829
M16	58.3324	4.9439
M17	57.1903	4.3076
M18	65.3486	4.2587
M19	76.7704	3.4755
M20	50.6635	4.2097

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se muestra los resultados de azúcares reductores luego de 8 horas de hidrólisis enzimática (sacarificación) con la enzima glucoamilasa obteniendo un mayor rendimiento en la muestra 4 con concentraciones de almidón 160 g/L y enzimas pectinasa 0.03 g/L y α -amilasa 1.0 g/L obteniendo como resultado 80.034 comparando con los resultados obtenidos en el proceso de licuefacción se puede apreciar que la glucoamilasa es una variable significativa para obtener un mayor

rendimiento de ART; asimismo se puede visualizar los resultados de ART transcurrido 72 hrs del proceso de fermentación.

Análisis de ART (Azúcares Reductores Totales) utilizando el programa Desing-expert 7.0

Tabla 10

Resultados de ART (azúcares reductores totales) en el proceso de hidrólisis enzimática

Muestras	almidón g/L	pectinasa g/L	α -amilasa g/L	Glucoamilas a ml/L	ART (hidrólisis enzimática) g/L
1	160	0.02	1	0.05	77.259
2	80	0.04	1	0.1	74.159
3	80	0.03	0.1	0.1	56.211
4	160	0.03	1	0.1	80.034
5	120	0.03	0.55	0.075	69.101
6	160	0.03	0.55	0.075	77.749
7	80	0.02	0.1	0.05	52.458
8	160	0.04	0.55	0.1	72.202
9	160	0.04	0.1	0.075	51.316
10	80	0.04	0.1	0.05	56.048
11	80	0.02	1	0.1	73.018
12	120	0.04	0.1	0.1	62.248
13	120	0.02	0.55	0.075	76.281
14	120	0.03	1	0.075	75.3021
15	120	0.03	0.1	0.075	59.964
16	80	0.03	1	0.05	58.332
17	160	0.02	0.1	0.1	57.190
18	80	0.03	0.55	0.075	65.349
19	160	0.04	1	0.05	76.770
20	160	0.03	0.1	0.05	50.664

Fuente: Desing Expert 7.0

A partir de la matriz experimental denominada Tabla 10 y de la respuesta ART (azúcares reductores totales) en el proceso de hidrólisis enzimática, construidas con el Desing-expert 7.0, se prepararon las pruebas experimentales que arrojaron 20 muestras para la aplicación del tratamiento con enzimas a diversas concentraciones, una vez ingresados los datos de las variables independientes se construyeron las superficies de respuesta, que permitió a la vez un análisis simultáneo de la influencia de estas enzimas en la obtención de ART (azúcares reductores totales), las cuales se determinaron después del tratamiento mediante un espectrofotómetro el cual identifica la presencia de azúcares simples en este caso glucosa.

Tabla 11

Modelo Secuencial de suma de cuadrados (Tipo I)

Source	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Valor F	Valor -p prob >F	
Media vs Total	87338.96	1	87338.96			
Lineal vs Media	1438.04	4	359.51	10.53	0.0003	<u>Suggested</u>
2FI vs Lineal	189.42	6	31.57	0.88	0.5453	
Cuadrático vs 2FI	248.99	4	62.25	4.22	0.0730	
Cubico vs cuadrático	73.71	5	14.74			Aliased
Residual	0	0				
Total	89289.12	20	4464.46			

Fuente: Desing expert 7.0

En la presente investigación se hizo la evaluación estadística utilizando el Desing Expert 7.0, en el cual al ingresar las variables independientes, nos recomienda el modelo lineal como se muestra en la Tabla 11 ya que el programa lo sugiere para la evaluación.

ANOVA

Tabla 12

Análisis de varianza para la respuesta ART hidrólisis enzimática (%)

Source	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Valor F	Valor p Prob > F	
Modelo	1438.04	4	359.51	10.53	0.0003	<i>Significante</i>
A-almidón	115.35	1	115.35	3.38	0.0859	
B-pectinasa	2.20	1	2.20	0.06	0.8030	
C- α -amilasa	1197.55	1	1197.53	35.08	< 0.0001	
D-glucoamilasa	108.23	1	108.23	3.17	0.0953	
Residual	512.12	15	34.14			
Cor Total	1950.16	19				

Fuente: Desing Expert 7.0

En la Tabla 12 se presenta el análisis de varianza para la respuesta porcentaje de ART obtenida en el proceso de hidrólisis enzimática. En el primer renglón podemos observar el resumen global del modelo completo donde la suma de cuadrados del modelo es 1438.04 [suma de cuadrados] y su valor F es 10.53 [valor F], Se visualiza también que el modelo es Significativo [significant] al 95% de confiabilidad, debido a que el valor estadístico p [p-value, Prob>F], es mucho menor a 0.05, El valor p del modelo es 0.0003 lo que implica que el modelo es significativo. Los valores de “Prob>F” menores que 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos y los valores Mayores que 0.1000 indican que los términos del modelo no son significativos. En este caso C (α -amilasa) es un término significativo en el modelo, porque ejerce un efecto sobre la variable dependiente (ART)

Tabla 13*Tabla de comportamiento de variables estadísticas*

Desviación estándar	5.84
Media	66.08
Coefficiente de Variabilidad %	8.84
R2	0,7374

Fuente: Design Expert 7.0

En la Tabla 13 el modelo de superficie respuesta presenta un $R^2 = 0.7374$ y es razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado (0.6674).

El modelo predicho para la concentración de ART (azúcares reductores totales) en función de las variables independientes nos da como resultado la ecuación final en cuanto a los factores reales:

$$ART \text{ (hidrólisis enzimática)} = +39.60337 + 0.069627 * \text{almidón} - 44.83694 * \text{pectinasa} + 19.94189 * \alpha\text{-amilasa} + 115.99158 * \text{glucoamilasa}$$

A partir del resumen de datos estadísticos se obtuvieron las siguientes gráficas:

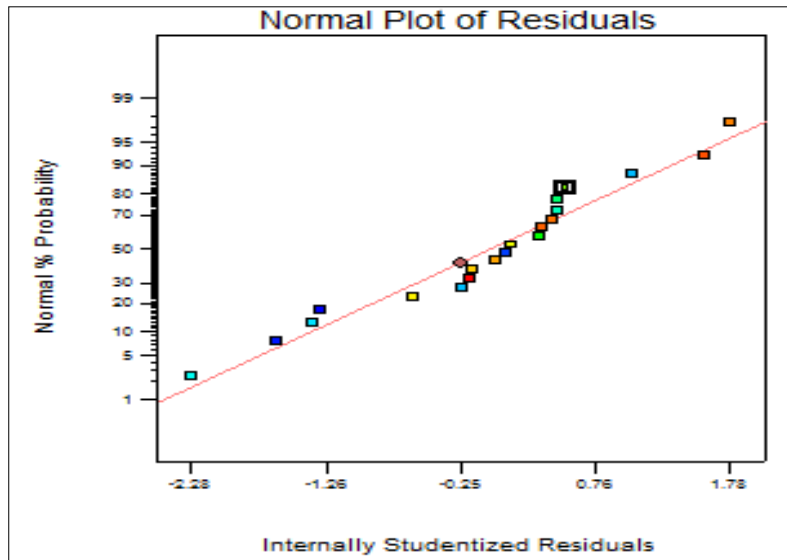


Figura 9

Gráfica de probabilidad normal de los residuos estudentizados de la concentración de ART (azúcares reductores totales)

Fuente: Design Expert 7.0

En la Figura 9 probabilidad normal de los residuos estudentizados nos permite analizar la normalidad de los errores, lo que se busca es que los puntos estén lo más próximo a la línea de la normal, los tratamientos que más se alejan son: Tratamiento: 3, 5, 12, 13 y 20 ya que los errores no se distribuyen normalmente y presentan valores negativos siempre y cuando el valor actual sea menor que el valor predicho.

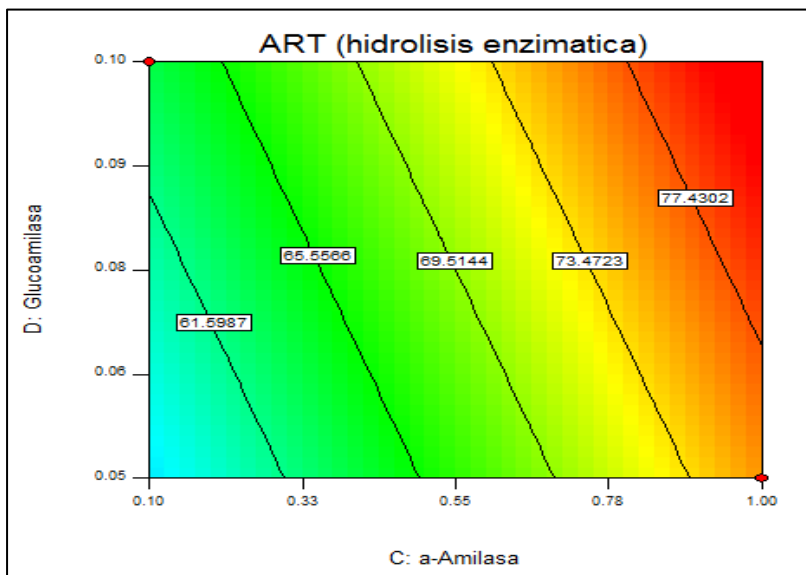


Figura 10

Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variables almidón-pectinasa

Fuente: Design Expert 7.0

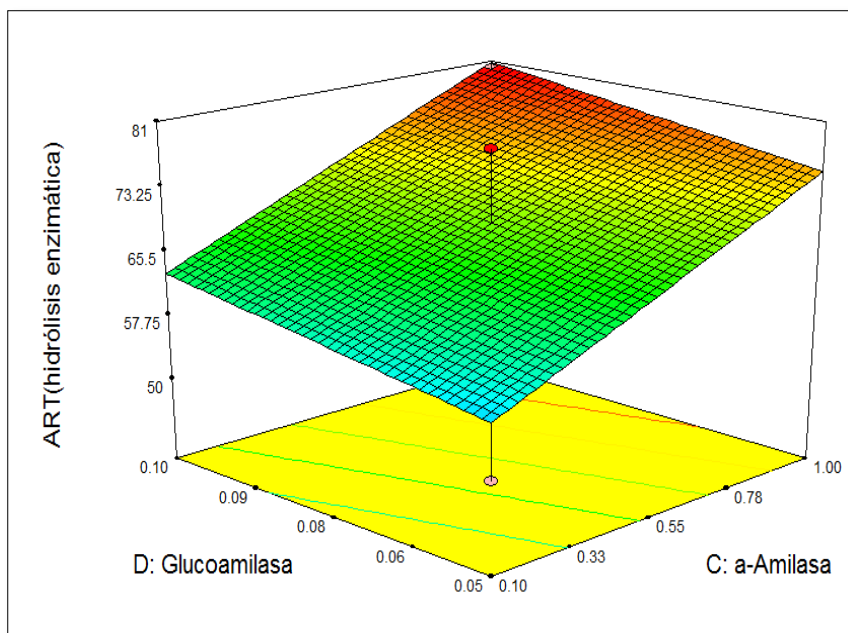


Figura 11

Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables almidón-pectinasa

Fuente: Design Expert

La Figura 11 nos muestra los resultados obtenidos de ART (%) respecto a la variable almidón – pectinasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (80.0337%), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l, pectinasa de 0.03 g/l.

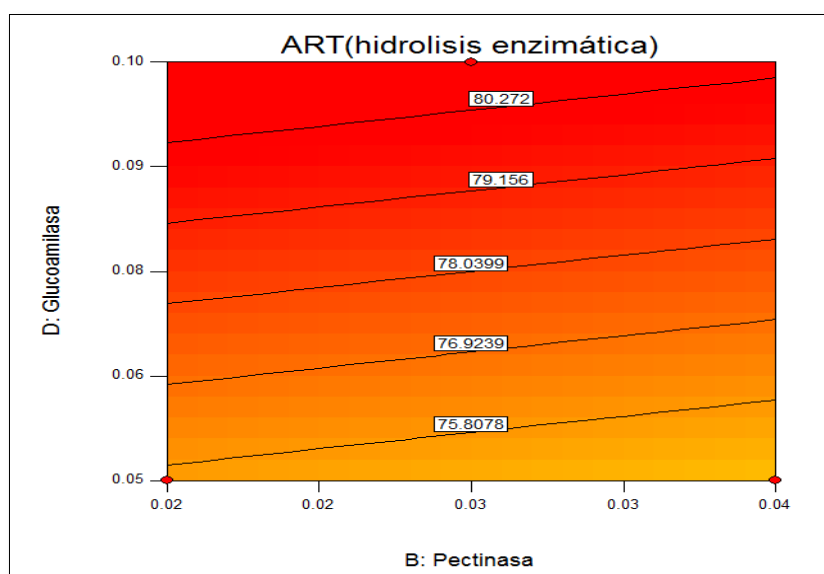


Figura 12

Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variables almidón-alfa-amilasa

Fuente: Design Expert 7.0

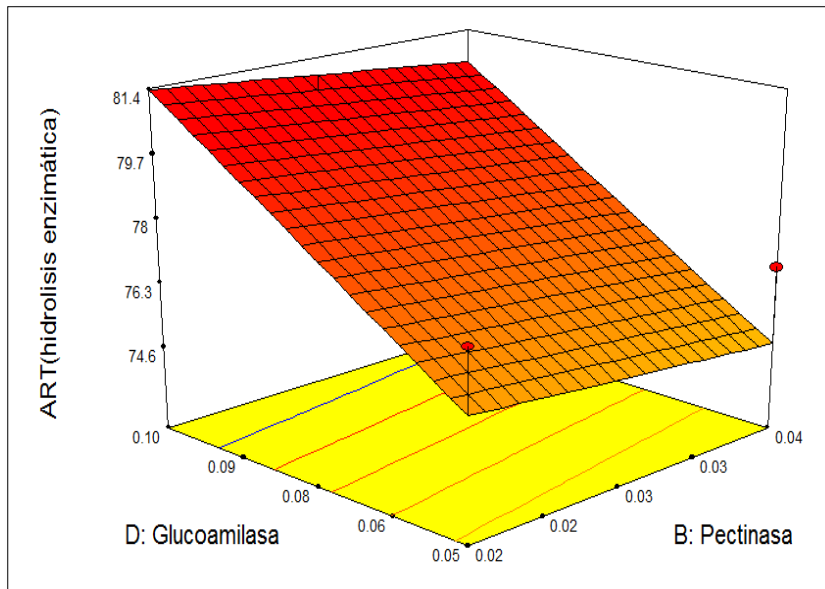


Figura 13

Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables almidón-alfa-amilasa.

Fuente: Design Expert

La Figura 13, nos muestra los resultados obtenidos de ART (%) respecto a las variables almidón – alfa-amilasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (80.0337%), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l y 1.0 g/l de alfa-amilasa.

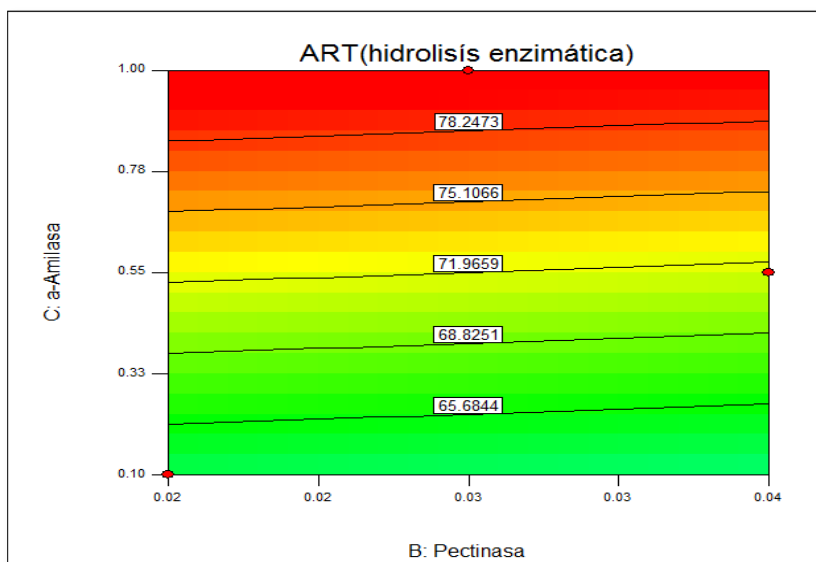


Figura 14

Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variables almidón-glucoamilasa.

Fuente: Design Expert 7.0

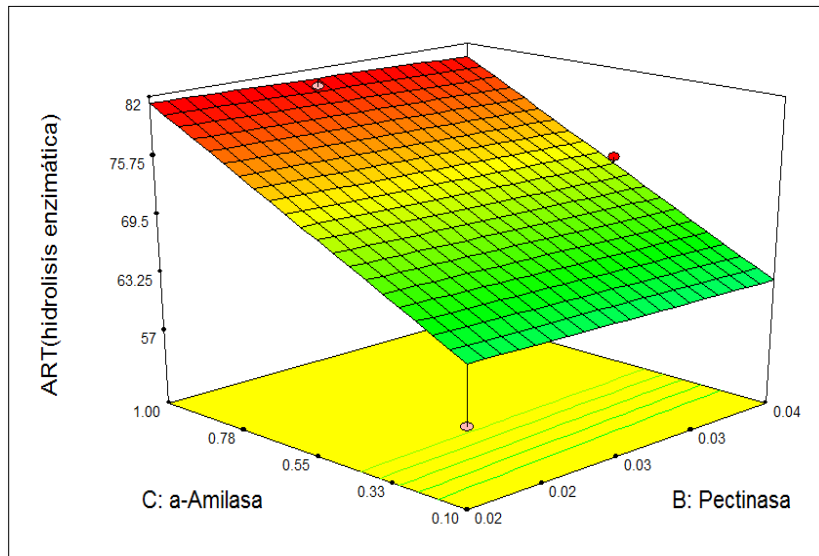


Figura 15
 Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables almidón-glucoamilasa.
Fuente: Design Expert

La Figura 15, nos muestra los resultados obtenidos de ART (%) respecto a las variables almidón – glucoamilasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (80.0337%), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l y glucoamilasa de 0.10 g/l.

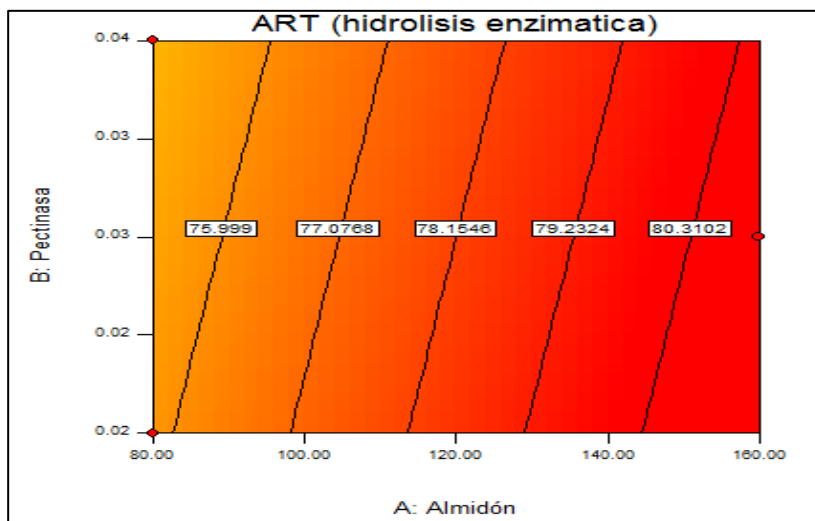


Figura 16
 Gráfica de contorno para la respuesta ART (%) con respecto a las variable α -amilasa – glucoamilasa
Fuente: Design Expert 7.0

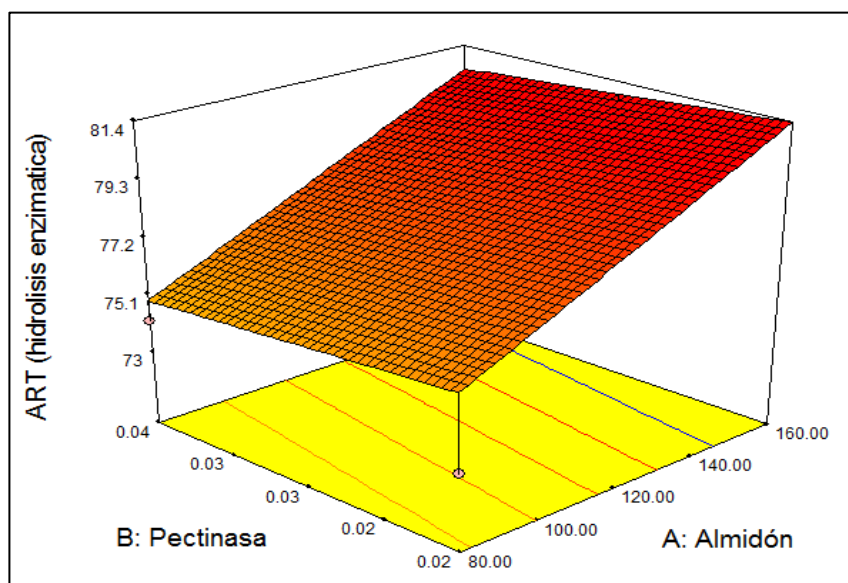


Figura 17

Gráfica de superficie de respuesta en 3D ART (%) con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa

Fuente: Design Expert 7.0

La Figura 17, nos muestra los resultados obtenidos de ART (%) respecto a la variables α -amilasa – glucoamilasa, la superficie superior que presenta una coloración más roja, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (80.0337%), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de α -amilasa de 1.00 g/l y glucoamilasa de 0.10 g/l.

4.1.2. Concentración de bioetanol

Tabla 14

Concentración de bioetanol, después de la destilación.

Muestras	Concentración de bioetanol (GL)
M1	4.5
M2	4.0
M3	2.0
M4	6.0
M5	3.0
M6	5.5
M7	1.5
M8	3.5
M9	1.0
M10	2.0
M11	4.0
M12	2.0
M13	5.0
M14	3.5
M15	2.5
M16	2.0
M17	2.0
M18	2.5
M19	4.0
M20	2.5

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 14 muestra los resultados de concentraciones de bioetanol obtenidas en el proceso de destilación, se realizó mediante el alcoholímetro de Gay Lussac, la máxima concentración de bioetanol fue en la muestra 4 debido a la mayor concentración de enzimas que hubo en los fermentos: almidón 160 g/L, pectinasa 0.03 g/L, α -amilasa 1.0 g/L y glucoamilasa 0.1 g/L correspondientemente.

Análisis de la Concentración de bioetanol utilizando el programa Desing-expert 7.0

Tabla 15

Resultados de la concentración de bioetanol después de la destilación de las muestras.

Muestras	almidón g/L	pectinasa g/L	α -amilasa g/L	glucoamilasa g/L	Concentración de bioetanol GL
1	160	0.02	1	0.05	4.5
2	80	0.04	1	0.1	4.0
3	80	0.03	0.1	0.1	2.0
4	160	0.03	1	0.1	6.0
5	120	0.03	0.55	0.075	3.0
6	160	0.03	0.55	0.075	5.5
7	80	0.02	0.1	0.05	1.5
8	160	0.04	0.55	0.1	3.5
9	160	0.04	0.1	0.075	1.0
10	80	0.04	0.1	0.05	2.0
11	80	0.02	1	0.1	4.0
12	120	0.04	0.1	0.1	2.0
13	120	0.02	0.55	0.075	5.0
14	120	0.03	1	0.075	3.5
15	120	0.03	0.1	0.075	2.5
16	80	0.03	1	0.05	2.0
17	160	0.02	0.1	0.1	2.0
18	80	0.03	0.55	0.075	2.5
19	160	0.04	1	0.05	4.0
20	160	0.03	0.1	0.05	2.5

Fuente: Desing Expert 7.0

En la Tabla 15, se muestran los datos de concentración de bioetanol obtenidos a partir de la matriz experimental construida en el Desing-expert en las cuales dió como resultado 6.0 GL, según la muestra 4 que es la que obtuvo el mayor rendimiento, esto dependió de la cantidad de almidón (160 g/L) y enzimas pectinasa, α –amilasa, glucoamilasa (0.03, 1, 0.1 g/L), a partir

de esto podemos concluir que las enzimas α –amilasa y glucoamilasa han dependido para obtener el mayor rendimiento.

Tabla 16
Modelo Secuencial de suma de cuadrados (Tipo I).

Source	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Valor F	Valor –p prob >F	
Media vs Total	198.45	1	198.45			
Lineal vs Media	22.71	4	5.68	6.15	0.0039	<u>Suggested</u>
2FI vs Lineal	6.49	6	1.08	1.32	0.3384	
Cuadrático vs 2FI	3.14	4	0.78	0.93	0.5150	
Cubico vs cuadrático	4.22	5	0.84			Aliased
Residual	0.00	0				
Total	235.00	20	11.75			

Fuente: Desing -expert 7.0

En la Tabla 16, se hizo la evaluación estadística utilizando el Desing Expert 7.0, en el cual al ingresar las variables independientes, nos recomienda el modelo lineal, ya que el programa lo sugiere para la evaluación.

Tabla 17
Análisis de varianza para la respuesta concentración de bioetanol

Source	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	Valor F	Valor p Prob > F	
Modelo	22.71	4	5.68	6.15	0.0039	<i>Significante</i>
A-almidón	4.38	1	4.38	4.74	0.0458	
B-pectinasa	1.13	1	1.13	1.22	0.2863	
C-a-amilasa	15.60	1	15.60	16.90	0.0009	
D-glucoamilasa	1.30	1	1.30	1.41	0.2529	
Residual	13.84	15	0.92			
Cor Total	36.55	19				

Fuente :Design Expert 7.

ANOVA

En la Tabla 17 se presenta el análisis de varianza para la respuesta porcentaje de concentración de bioetanol obtenido después de la destilación de las muestras. En el primer renglón podemos observar el resumen global del modelo completo donde la suma de cuadrados del modelo es 22.71 [suma de cuadrados] y su valor F es 6.15 [valor F], Se visualiza también que el modelo es Significativo [significant] al 95% de confiabilidad, debido a que el valor estadístico p [p-value, Prob>F], es mucho menor a 0.05, El valor p del modelo es 0.0039 lo que implica que el modelo es significativo. Los valores de “Prob>F” menores que 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos y los valores Mayores que 0.1000 indican que los términos del modelo no son significativos. En este caso A (almidón) y C (α -amilasa) son términos significativo en el modelo, porque ejerce un efecto sobre la variable dependiente (rendimiento de bioetanol).

Tabla 18

Tabla de comportamiento de variables estadísticas

Desviación estándar	0.96
Media	3.15
Coefficiente de Variabilidad %	30.50
R2	0,6213

Fuente: Desing Expert 7.0

En la Tabla 18 el modelo de superficie respuesta presenta un $R^2 = 0.6213$ y es razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado (0.5203).

El modelo predicho para la concentración de bioetanol en función de las variables independientes nos da como resultado la ecuación final en cuanto a los factores reales:

$$\text{Rendimiento de Bioetanol} = + 0.31046 + 0.01356 * \text{Almidón} - 32.09057 * \text{Pectinasa} + 2.27575 * \alpha\text{-Amilasa} + 12.73440 * \text{Glucoamilasa}$$

A partir del resumen de datos estadísticos se obtuvieron las siguientes gráficas:

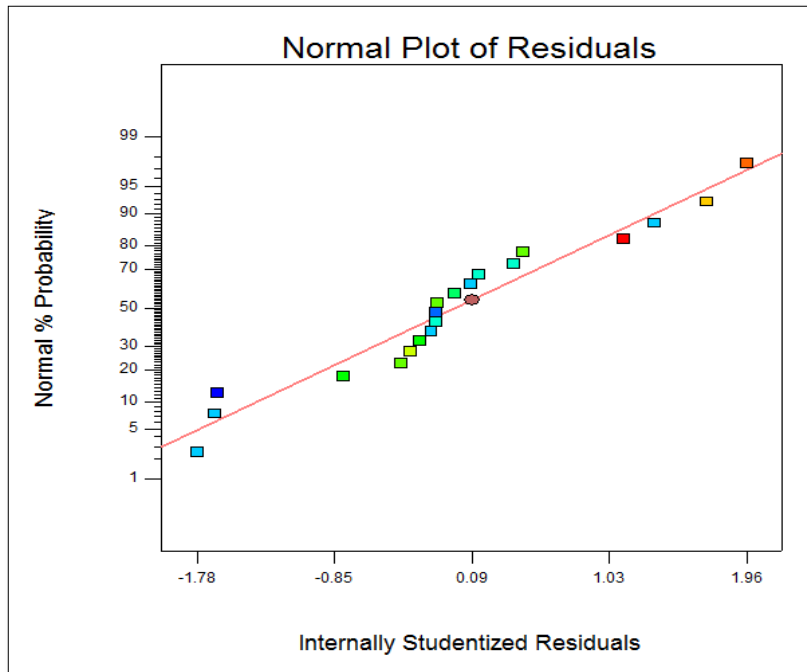


Figura 18

Gráfica de probabilidad normal de los residuos estudentizados de la concentración de bioetanol

Fuente: Design Expert 7.0

En la Figura 18 probabilidad normal de los residuos estudentizados nos permite analizar la normalidad de los errores, lo que se busca es que los puntos estén lo más próximo a la línea de la normal, los tratamientos que más se alejan son: Tratamiento: 1, 2, 8, 9, 11, 12, 17 y 20 ya que los errores no se distribuyen normalmente y presentan valores negativos siempre y cuando el valor actual sea menor que el valor predicho.

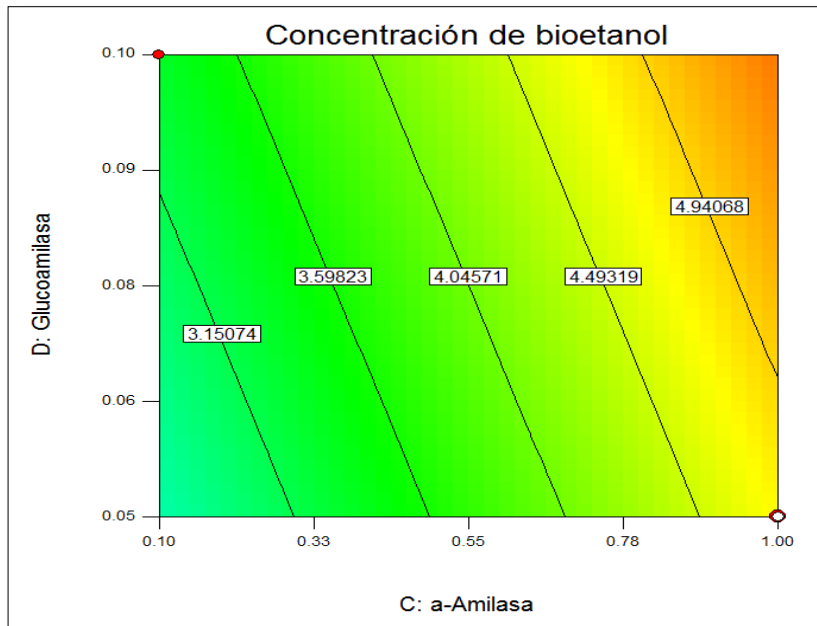


Figura 19

Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-pectinasa

Fuente: Design Expert 7.0

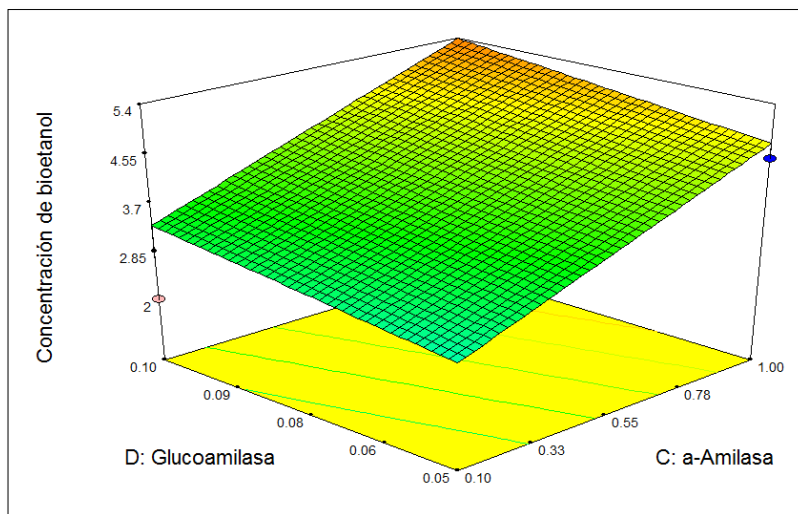


Figura 20

Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-pectinasa

Fuente: Design Expert 7.0

La Figura 20, nos muestra los resultados obtenidos de concentración de bioetanol respecto a la variable almidón – pectinasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor

rendimiento que se ha obtenido (4.5 GL), siendo esta el Tratamiento 1 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l, pectinasa de 0.02 g/l.

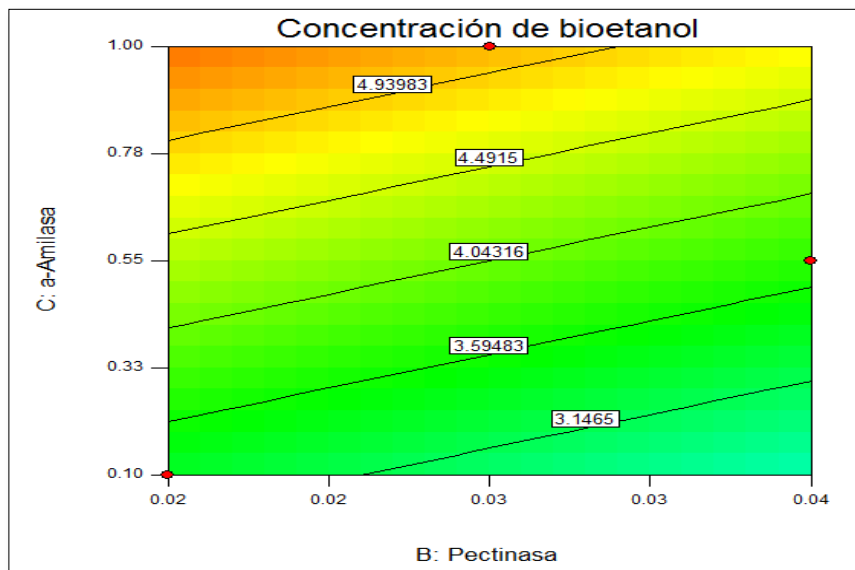


Figura 21
Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-glucoamilasa
Fuente: Design Expert 7.0

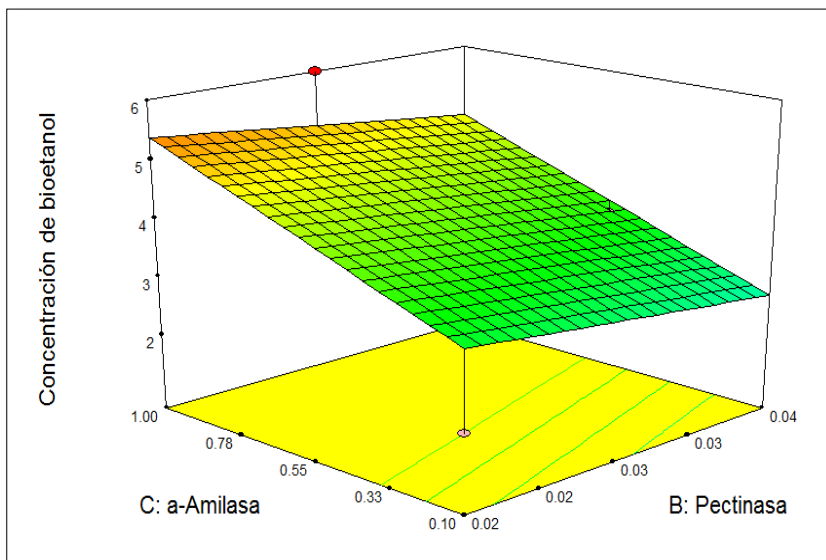


Figura 22
Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-glucoamilasa
Fuente: Design Expert 7.0

La Figura 22, nos muestra los resultados obtenidos de concentración de bioetanol respecto a la variables almidón- glucoamilasa, la superficie

superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (6.0 GL), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l y glucoamilasa de 0.10 g/l.

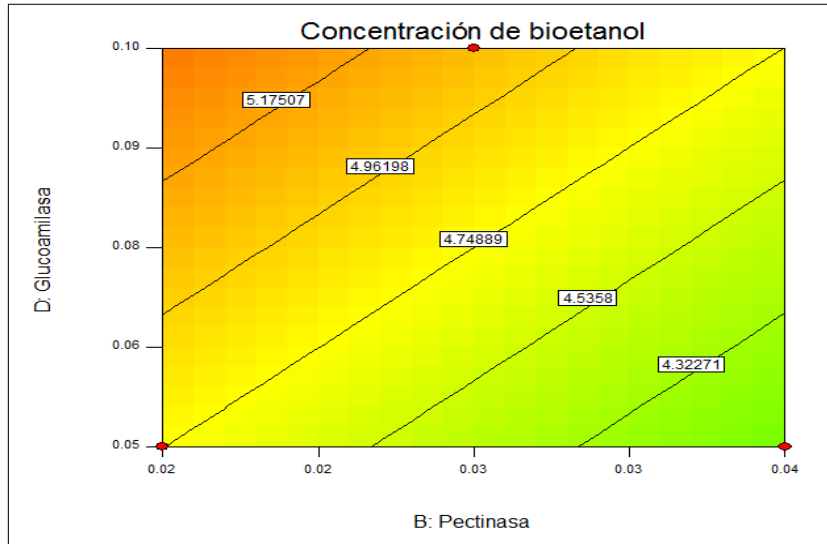


Figura 23

Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-a-amilasa

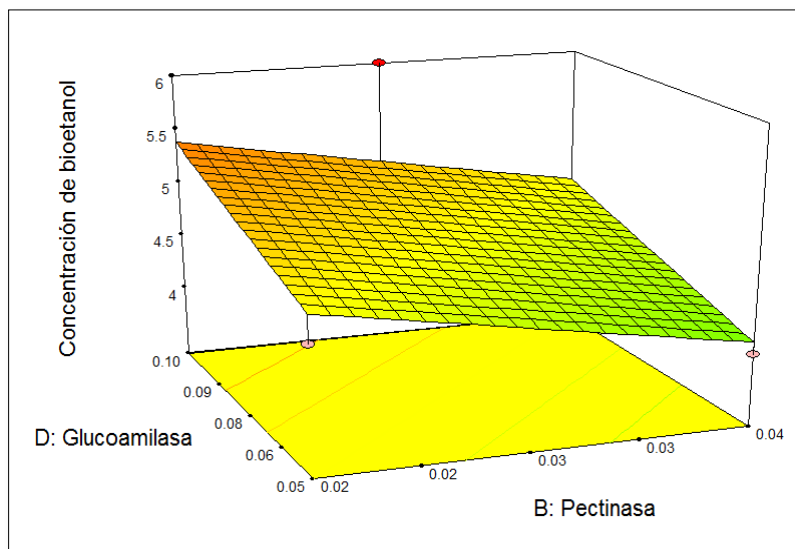


Figura 24

Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables almidón-a-amilasa

Fuente: Design Expert 7.0

La Figura 24, nos muestra los resultados obtenidos de concentración de bioetanol respecto a la variables almidón- α -amilasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (6.0 GL), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de almidón de 160 g/l y α -amilasa de 1.00 g/l.

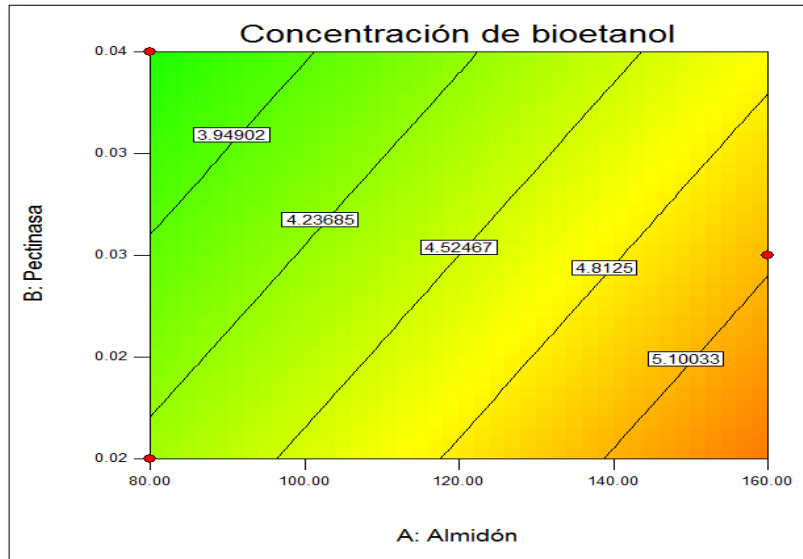


Figura 25

Gráfica de contorno para la respuesta concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa –glucoamilasa

Fuente: Design Expert 7.0

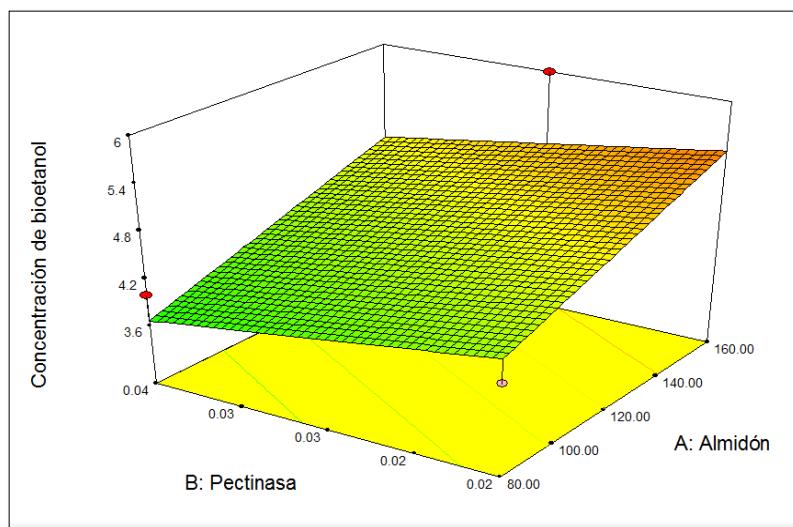


Figura 26

Gráfica de superficie de respuesta en 3D concentración de bioetanol con respecto a las variables α -amilasa – glucoamilasa

Fuente: Design Expert 7.0

La Figura 26, nos muestra los resultados obtenidos de concentración de bioetanol respecto a la variables α -amilasa – glucoamilasa, la superficie superior esta de color rojo, lo que nos indica que en esa zona se encuentra el mayor rendimiento que se ha obtenido (6.0 GL), siendo esta el Tratamiento 4 donde se empleó concentraciones de α -amilasa de 1.00 g/l y glucoamilasa de 0.10 g/l.

4.1.3. Concentración de °Brix

Tabla 19

Brix obtenidos durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)

Muestras	Brix (licuefacción 24 hrs) (°Bx)
1	7.5
2	7.3
3	4.4
4	7.2
5	5.4
6	6.2
7	3.9
8	6.5
9	3.5
10	5.0
11	5.9
12	5.6
13	6.7
14	8.1
15	5.2
16	4.9
17	4.5
18	5.7
19	6.7
20	4.2

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 19 se observa la concentración de ° Brix obtenidos durante el proceso de hidrólisis (licuefacción), pudiendo comparar con la tabla 8 de concentraciones de ART obtenidas durante el proceso de licuefacción, se aprecia la relación existente entre estas dos variables, ya que al contener

mayor concentración de azúcares reductores se obtiene mayor concentración de °Brix.

Tabla 20

Brix obtenidos durante el proceso de la hidrólisis enzimática (licuefacción)

Muestras	Brix sacarificación (° Bx)	Brix fermentación (°Bx)
1	9.3	1.3
2	9.0	2.8
3	6.1	2.2
4	10.2	1.2
5	7.8	2.3
6	9.4	3.5
7	5.5	2.7
8	8.1	3.1
9	5.1	1.9
10	5.9	2.3
11	8.3	2.1
12	7.2	3.4
13	8.7	2.3
14	8.5	2.4
15	6.7	3.2
16	6.3	5.2
17	6.1	3
18	7.5	3.8
19	8.9	2.6
20	4.9	2

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 20 muestra las concentraciones de °Brix durante el proceso de sacarificación, y transcurrido 72 hrs de fermentación, pudiendo visualizar que en la muestra 4 la levadura utilizada obtuvo un comportamiento satisfactorio puesto que consumió gran parte de los azucares, obteniendo un mayor rendimiento de bioetanol correspondiente al 60.7%

4.1.4. Rendimiento de bioetanol

Rendimiento de bioetanol

Densidad del etanol puro: 789 g/L

$$\rho = m/v$$

$$m = \rho * v$$

ρ = Densidad del etanol puro (789 g/L)

m = Masa del soluto (g)

v = Volumen de etanol obtenido (L)

$$Y_{p/s} = \frac{p - p_0}{-(s - s_0)}$$

$Y_{p/s}$ = Rendimiento producto- sustrato

p = Concentración de etanol final (g/L)

p_0 = Concentración de etanol inicial (g/L)

s = Concentración de glucosa final (g/L)

s_0 =Concentración de glucosa inicial (g/L)

Tabla 21

Rendimiento de bioetanol obtenido mediante la relación etanol-ART

Muestras	p	p_0	s	s_0	Rendimiento de bioetanol
1	35.505	0	3.573	77.259	0.482
2	31.56	0	3.100	74.159	0.444
3	15.78	0	5.385	56.211	0.310
4	47.34	0	2.056	80.034	0.607
5	23.67	0	4.014	69.101	0.364
6	49.39	0	2.953	77.749	0.580
7	11.84	0	5.482	52.458	0.252
8	15.78	0	1.923	62.248	0.404
9	7.89	0	5.662	51.316	0.173
10	15.78	0	5.336	56.048	0.311
11	31.56	0	3.198	73.018	0.452
12	15.78	0	5.172	62.248	0.276
13	39.45	0	2.823	76.281	0.537
14	27.62	0	4.144	75.302	0.389
15	19.73	0	4.683	59.964	0.357
16	15.78	0	4.944	58.332	0.296
17	15.78	0	4.308	57.190	0.298
18	19.73	0	4.259	65.349	0.323
19	31.56	0	3.475	76.770	0.431
20	19.76	0	4.209	50.664	0.425

Fuente: Elaboración Propia

4.2. Discusiones de resultados

En la tesis desarrollada por Murgas y Monterrosa (2012) denominada, Evaluación de la obtención de bioetanol a partir del almidón de ñame (*Dioscórea rotundata*, *Dioscórea alata* y *Dioscórea trifida*) mediante la hidrólisis enzimática y posterior fermentación describe que durante la etapa de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) los azúcares reductores aumentan significativamente, alcanzándose máximos valores al final del proceso de 78.82g/L en concentración de 150 g/L en la variedad *Dioscórea rotundata*, 73.84g/L en la concentración de 135 g/L en la variedad *Dioscórea trifida*; mientras que para la variedad *Dioscórea alata* se obtuvieron valores de 61.68g/L a la concentración de 105 g/L, en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio Durante el proceso de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) se obtuvieron resultados de 80.0337 g/L con respecto a ART (Azúcares reductores totales) al final del proceso como máximo valor en concentración de 160 g/L para la variedad *esculenta*, este resultado se obtuvo debido a que se complementó con la enzima pectinasa en el proceso de licuefacción, para que haya una oportuna reacción enzimática sobre el almidón con el fin de obtener mayores resultados, según menciona (Murgas y Vásquez, 2012)

En el artículo científico denominado, Condiciones óptimas para la producción de bioetanol de papa de Bangladesh, desarrollada por Kalam y Cols. (2014) Tuvieron como resultados para concentraciones de almidón de papa 5%(0.8 GL) ,10%(1.5 GL), 15% (4.5 GL) ,20 % (6.5 GL) ,30%(0.94 GL); así mismo en el estudio realizado por Murgas y Monterrosa (2012) para las concentraciones de almidón de las variedades *Dioscórea alata* (10.5% ,3.22 GL; 13.5%, 3.65 GL; 15%, 3.27 GL), *Dioscórea trifida*; (10.5%, 3.53 GL; 13.5%, 4.43 GL; 15%, 3.43 GL) y *Dioscórea rotundata*; (10.5%, 3.62 GL; 13.5%, 3.69; 15%, 4.55 GL), comparando con los resultados obtenidos en el estudio respecto a las concentraciones establecidas de almidón de *Colacasia esculenta* (vituca) 8 % (1.5, 2, 2.5, 4) GL, 12% (2, 2.5, 3, 3.5, 5) GL y 16 % (1, 2, 3.5, 4, 4.5, 5.5, 6) GL; se observa que la

variación de resultados no es tan significativa puesto que se trabajó con los rangos adecuados para la producción de bioetanol propuestos por Castaño y Mejía (2008).

Según el estudio realizado por Braide y Nwaogulkpe (2011), Producción de etanol a partir de la vituca (*Colocasia esculenta*), en el proceso de sacarificación se obtuvo 15.0 °Brix como valor máximo y 2.0 °Brix después de 7 días de fermentación; para el estudio se obtuvo 10.2 °Brix en la sacarificación y 1.2°Brix luego de 72 horas de fermentación, debido a que la levadura va consumiendo azúcares y reduce su cantidad en el medio (Braide y Nwaogulkpe, 2011).

Se obtuvo 60.7 % como óptimo rendimiento de bioetanol y como valor mínimo 17.3 % como, luego de 72 horas de fermentación Según el artículo desarrollado por Castaño y Mejía (2008), Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultánea (SSF) se obtuvieron resultados de 80.7 % de rendimiento de bioetanol en 72 horas de fermentación esto se fue debido a que la levadura va transformando la glucosa en bioetanol a medida que este se produce; Con respecto al estudio realizado por Murgas y Monterrosa (2012) muestra resultados de 48.3 % y 40.8% como valor máximo y mínima respectivamente para la variedad Dioscórea trifida luego de 52 horas de fermentación .

En el software Design-expert, los valores óptimos de las variables significativas y el porcentaje máximo de ART, determinados por el modelo lineal, fueron los siguientes: almidón y enzimas α -amilasa, pectinasa y glucoamilasa 160 g/l, 1.0 g/l, 0.03g/l y 0.10 g/l obteniendo un porcentaje máximo de ART de 80.034 este valor obtenido se aproxima de manera satisfactoria al valor estimado por el modelo experimental; por lo tanto se puede afirmar que el experimento fue conducido de manera acertada.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se obtuvo bioetanol a partir de almidón de vituca de la variedad esculenta por hidrólisis enzimática posterior a 72 horas de fermentación a concentraciones de 80 g/L, 120 g/L y 160 g/L.

La concentración de almidón de vituca para la obtención de un máximo rendimiento según el estudio realizado fue de 16 % peso seco de almidón equivalente a 160 g/L.

Las concentraciones óptimas para las enzimas α -amilasa, pectinas y glucoamilasa fueron 1.0 g/L, 0.03 g/L, 0.5g/L de glucoamilasa cuyo rendimiento fue de 60.7 %.

Durante el proceso de fermentación se hicieron mediciones de brix y azúcares reductores comprobando que la levadura utilizada en la presente investigación (cepa de vino) obtuvo un comportamiento satisfactorio ya que consumió gran parte de los azúcares simples encontrándose concentraciones de bioetanol de 6 GL.

5.2. Recomendaciones

En cuanto a la cascara del vituca está también se puede utilizar para la producción de etanol o de compostaje y así aprovechar los residuos de cualquier proceso en donde se trabaje con vituca, este estudio se recomienda para futuros investigadores en donde le darían un valor agregado a este prometedor tubérculo.

Se sugiere trabajar con concentraciones mínimas de enzima pectinasa ya que a que a menores concentraciones se hace más eficiente el proceso, además se obtienen los mejores rendimientos de bioetanol

Referencias Bibliográficas

- Aguilar, P. y Villalobos, D. (2013). Harinas y almidones de yuca, ñame, camote y ñampí: propiedades funcionales y posibles aplicaciones en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 26(1), 37-45.
- Aldabe, S., Bonazzola, C., Aramendía, P. y Lacreu, L. (2004). *Química 2. Química en acción*. (1era edición). Buenos Aires: Colihue.
- Allinger, N., y López, E. (1970-1972). *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté.
- Andina : Agencia Peruana de noticias. (6 de Junio de 2015). Proyectan siembra de cinco mil hectáreas de piñón para biodiésel en Lambayeque. *Andina*.
- Arroyo, G. (1988). *Biotecnología: ¿una salida para la crisis agroalimentaria?*. (1era edición). México: Plaza y Valdés.
- Asturizaga, Y. y Bocanegra, C. (2008). *Evaluación de los rendimientos en el proceso de obtención de alcohol a partir de harina de ñame (Dioscorea bulbifera, trifida) por vía enzimática* (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre, Sincelejo.
- Azam, A., Islam, S., Maqsd, M., James D., Yamada, M. (2015). Production of bioethanol at high temperature from Tari. *Advances in Microbiology*, 5, 325-335.
- Bardales, C., León, C., Mostacero, J., Arellano, J., Nomberto, C., ..., Barrena, M. (2011). Producción de bioetanol del desecho lignocelulósico “peladilla” de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” por *Candida utilis* var. *major*. CECT 1430. UCV - *Scientia*, 3(2), 206.
- Barroso, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Beltrán, A., Fonseca, O. y Guerrero, Y. (2007). *Evaluación de la aplicación de la enzima pectinasa obtenida a partir de Aspergillus niger, en el proceso de producción de pulpa de arazá (Eugenia stipitata sororia) concentrada al vacío* (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Bogotá.
- Bradbury, D y Holloway, W. (1988). *Chemistry of tropical root crops*. ACIAR, Canberra.

- Braide, W. y Nwaoguikpe, R. (2011). Production of ethanol from cocoyam (*Colocasia esculenta*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(3), 64-66.
- Caicedo, W. (2013). Tubérculos de papa china (*Colocasia esculenta (L.) schott*) como una fuente energética tropical para alimentar cerdos. . *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 20(1), 279.
- Campbell, N., Reece, J. (2005). *Biología* . (7ma edición). Madrid: Panamericana.
- Carriazo, K.,Tarras, P. y Sarmiento, M. (2007). *Estudio de factibilidad para una planta de bioetanol a partir del aprovechamiento de cascaras de plátano en la empresa Colombian Biofuel S.A.S* (Tesis de pregrado). Universidad de Cartagena, Colombia.
- Castaño, H. y Mejía, C. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación- fermentación simultaneas (SSF). *Vitae*, 15(2), 251.
- Castro, P., Sevilla, S., Coello, J. (2008). *Estudio sobre la situacion de los biocombustibles en el Perú*. Soluciones Prácticas – ITDG , Lima.
- Cortés, S., Chavarriaga, P. y López, C. (2009). Biocombustibles y biotecnología: la yuca (*Manihot esculenta*) como modelo de investigación. *UNAL*, 15(1) .
- Coursey, D. (1968). The Edible Aroids. *World Crops*, p 25-30.
- De la Cruz, M. (2009). *Evaluación tecnico-economica de la obtencion de etanol apartir de la yuca m – thai 8 (Manihot esculenta, crantz)*.(Tesis de pregrado) Universidad Autonoma de Occidente, Santiago de Cali.
- Díaz, J. y Herrera, F. (2008). Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas. *BioTecnología*, 13(3), 11.
- Díaz, J. (2015). *Sistemas de energías renovables*. (1ra edición). Madrid: Paraninfo S.A.

- El Comercio. (2015). *Refinerías subieron precios de combustibles hasta en 3,1*. consultado en <http://elcomercio.pe/economia/peru/opecu-refinerias-suben-precios-combustibles-hasta-31-noticia-1797017>
- Emadfa, I., Muskat, E., Fritzche, D. (2009). *Tabla de aditivos. Los números E*. Hispano Europea.
- Eyzaguirre, J. (1974). *Química de los hidratos de carbono*. Santiago: Andres Bello
- Fajardo, E. y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para producción de Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de grado). Pontificia universidad Javeriana, Bogotá.
- FAO. (1990). *Utilización de alimentos tropicales: raíces y tubérculos*. Roma: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- FAO. (2007). *Material de propagación de calidad declarada: Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente*. Lima : Copyright.
- Fernández Lancho, Manassés, F. (1970). *Importancia de la pituca para la alimentación humana*. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal.
- Ferreira, S., Ortiz, E. y Pardo, C. (1990). Estudio Químico Bromatológico de la *Colocasia esculenta* (Taro). *Rev Col de Ciencias Químicas Farmacéuticas*, 18, 53-59.
- Franco, J. (2006). *Manual de refrigeración*. Barcelona: Reverté S.A.
- Garrido, A. y Teijón, J. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. (2da edición). Madrid: Tébar
- 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*. (Tesis de grado). Universidad tecnológica de Pereira.
- Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos*. Madrid: Editorial Medica Panamericana .

- Giron, M. y Funes, L. (2013). *Obtención de alcohol etílico por medio de fermentación alcohólica de las cascaras de Musa paradisíaca (plátano) utilizando como microorganismo productor Saccharomyces cerevisiae (levadura)* (Tesis de pregrado). Universidad de el Salvador, San Salvador.
- Gonzales, V. (2012). *Hidrólisis enzimática y cuantificación del glucógeno hepático*. Universidad de Salamanca, España.
- Gutiérrez, A., Jaramillo, M., y Mora, E. (s.f.). *Elaboración de Biocombustible a partir del Jatropha curcasa " Piñon"*. Universidad San Francisco de Quito: Recuperado el 10 de Abril del 2015 de <http://es.slideshare.net/Nathaly08/elaboracin-de-biocombustible-a-partir-del-pin>.
- Hans, B., y Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona: Reverté S.A.
- Kalam, A., Yesmin, N., Kumar, S., Sattar, A., Kari, R. (2014). Optimum conditions for bioethanol production from potato of Bangladesh. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 501-507.
- Koolman, J., Röhm, K. (2004). *Bioquímica. Texto y atlas* . (3ra edición). Madrid: Panamericana
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*.(3ra edición). Costa Rica: Agroamerica del IICA.
- Manahan, S. (2007). *Introducción a la química ambiental*. (1era edición). México: Reverté, S.A.
- Martinez, C. (2014). *Biodiesel a partir de microalgas: ventajas y desventajas*. AINEnergía.
- Mora, R. (2002). *Soporte nutricional especial*. (3ra edición). Bogotá: Panamericana.
- Morales, A. (2012). Fitogeografía e industrialización del almidón de pituca (*Colocasia esculenta*). *Espacio y Desarrollo*, 24.
- Morales, Y. y Sánchez, I. (2004). *Diseño conceptual y comparación técnica de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática para la producción de glucosa a partir del almidón de yuca* (Tesis de pregrado).Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

- Moreno, S., Bayo, J. (1996). *Diseño de biorreactores y enzimología. Texto y atlas*. (4ta edición). Universidad de Murcia.
- Morín L., Charles (1983). *La pituca o taro: información acerca de su cultivo*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Murgas, J., y Vasquez, 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* (Tesis de pregrado). Universidad de San Buenaventura, Cartagena.
- Núñez, R. (1989). *Sustitución parcial de la harina de trigo por la harina de pituca en la elaboración de panes enriquecidos con hidrolizado de pescado*. Tesis. Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima.
- Osinergmin, (2010). *Uso de Biocombustibles en el Perú, Perú*.
- Oyenuga, V. 1968. *Nigeria's Foods and Feeding Stuffs*. (3era edición). Ibadan University.
- Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., Tapia, R.. (2004). *Bioquímica*. (2da edición). México: Limusa.
- Raven, P., Evert, R., Eichhorn, R. (1992). *Biología de las plantas*. Barcelona : Reverté S.A .
- Ribeiro, E. y Seravalle, E. (2004) *Química de Alimentos*. Sao Paulo: Eggard Blucher, 184p
- Ruiz, M. (2009). *Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca por medio de hidrólisis enzimática, para ser usados como sustrato en la producción de bioetanol*. (Tesis de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Salama, A. (2005). *Manual de farmacognosia. Análisis microscópico y fitoquímico, y usos de plantas medicinales*. (1ra edición). Bogotá: Universidad nacional de Colombia.
- Sánchez, O., Cardona, C. (2008). *Síntesis de esquemas tecnológicos integrados para la producción biotecnológica de alcohol carburante a partir de tres materias primas colombianas* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
- Suarez, F. (2008). *El Poder del Metabolismo*. Doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02414.x.

Tejeda, L., Quintana, J., Pérez, J., y Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *SciELO*, 14(1), 111 - 116.




Torres, A., Montero, P. y Duran, M. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*) *Lasallista de Investigación*, 10(2), 53.

UNAM. (2007-2008). *Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos*. México.

<http://selvanet20.blogspot.pe/2010/10/la-pituca-o-tarocolocasia-esculenta.html>

I.ANEXOS

Ficha tecnica de la enzima α -amilasa

		Product Information	
GRM638		α-Amylase, From Malt	
Product Number		Packing	
GRM638		: 100G	
GRM638		: 500G	
Product Information			
Product Code		: GRM638	
Product Name		: α -Amylase, From Malt	
Synonym		: 1,4- α -D-Glucan-glucanohydrolase; Diastase	
CAS No.		: 9001-19-8	
EC No.		: 232-588-1	
HS Code		: 3507 90 62	
EC Index No.		: 647-016-00-X	
Shelf Life		: 3 years	
Technical Specification			
Appearance		: Cream to light brown coloured hygroscopic powder	
Solubility		: 10 mg soluble in 10 mL of water	
Loss on drying (at 105°C; 1 hr)		: \leq 5.0%	
Assay		: min. 1 : 2000 I.P. Units	
Definition of assay		: It has activity not less than 2000 units which represents the number of grams of dry, soluble maize or corn starch digested by 1.0 g alpha-amylase under specified conditions	
GHS Safety Information			
Hazard Statement(s)		: H334	
Precautionary Statement(s)		: P261-P342+P311	
Signal Word		: Danger	
Hazard Pictogram(s)			
Risk and Safety Information			
R-Phrase(s)		: 42	
S-Phrase(s)		: 22-24-36/37	
WGK		: 1	
Storage Temperature(°C)		: Store at 2 - 8°C	
Hazard Symbol(s)			
Transport Information			

Ficha tecnica de la enzima glucoamilasa

NS22083	Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22118	β -glucosidase	<ul style="list-style-type: none"> - Also known as cellobiase; hydrolyzes cellobiose to glucose - Can be used to supplement NS22086 in order to increase the yield of fermentable sugars - Addition should be approximately 0–4% (w/v) of the amount of NS22086 for complete hydrolysis of the available cellulose
NS22119	Enzyme complex	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a wide range of carbohydrases, including arabinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase - Can break down cell walls for the extraction of useful components from plant tissue - Able to liberate bound materials and degrade a variety of nonstarch polysaccharides - Can be used to supplement NS22086 for substrates containing pectin
NS22002	β -glucanase Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a mixture of β-glucanase and xylanase enzyme activities - Possesses additional side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22035	Glucoamylase	<ul style="list-style-type: none"> - Used on liquefied starch-containing substrates to produce sugars for fermentation - Works in dedicated saccharification stages as well as simultaneous saccharification and fermentation - Glucoamylases hydrolyze both 1,4- and 1,6-alpha linkages to liberate glucose for subsequent fermentation by the yeast

Table 1. Descriptions of enzymes contained in Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit.

Enzyme classification	Activity ¹	Density ² (g/ml)	pH	Temperature (°C)	Dosage ³ (% w/w (TS))
NS22086 Cellulase complex	1,000 BHU/2Yg	1.15	5.0–5.5	45–50	1–5%
NS22083 Xylanase	2,500 FXU-S/g	1.09	4.5–6.0	35–55	0.05–0.25%
NS22118 β-glucosidase	250 CBU/g	1.2	2.5–6.5	45–70	0.2–0.6%
NS22119 Enzyme complex	100 FBG/g (~ 13,700 PGU/g)	1.19	4.5–6.0	25–55	0.05–0.4%
NS22002 Hemicellulase	45 FBG/g (~ 470 FXU/g)	1.20	5.0–6.5	40–60	0.4–2%
NS22035 Glucoamylase	750 AGU/g	1.15	4.5–5.5	60–70	0.01–0.06%

Table 2. Enzyme activity, density, pH, temperature, and recommended dosage.

1) EGU = Endo-Glucanase Unit, CBU = Cellobiase Unit, FBG = Fungal Beta-Glucanase Unit, PGU = PolyGalacturonase Unit, FXU-S = Fungal Xylanase Unit, and AGU = AmyloGlucosidase Unit. See Appendix A for further information on activity units.

2) Density values are approximate.

3) The required dosage is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly.

Pretreatment conditions must be optimized to achieve the maximum conversion of polysaccharides to fermentable sugars while minimizing the enzyme requirement. It is essential to evaluate the pretreated biomass for cellulose digestibility at an appropriate solids concentration.



If the solids concentration in a hydrolysis experiment is too high, nonenzymatic factors can be introduced that will interfere with the interpretation of the results. A range of 2–5% total solids (TS) loading is suggested for determining the efficacy of the pretreatment system. Results can be compared by evaluating the required enzyme dosage per mass of cellulose in the feedstock (cellulose content can be determined chemically) in order to give an indication of the enzymatic digestibility of the pretreated substrate (i.e., the efficiency of the pretreatment technology).

Note: Inhibition of enzymatic hydrolysis

The pretreatment method can create inhibiting products that can reduce the performance of the enzyme, resulting in lower cellulose conversion and/or increased enzyme dosage. Lignin and xylo-oligomer released during the pretreatment process can interfere with enzymatic performance by binding irreversibly to the enzymes or by blocking enzyme access to the substrate. An optimal degree of pretreatment does exist where the carbohydrate enzyme accessibility is maximized while the enzyme (and microorganism) inhibition is minimized.

From a cost perspective, it is normally advantageous to perform hydrolysis at the highest possible total solids in

II. ANEXOS

A.1. Acondicionamiento de la materia primas para la obtención de almidón de vituca



Pelado y lavado del fruto de la vituca (Colocasia esculenta)



Cortado del fruto de la vituca en mitades

Rallado



Lavado y Filtrado de la vituca rallada



Sedimentado, Secado, Tamizado y envasado del almidón

A.2. Preparación de las muestras para realizar el proceso de hidrólisis enzimática (licuefacción)



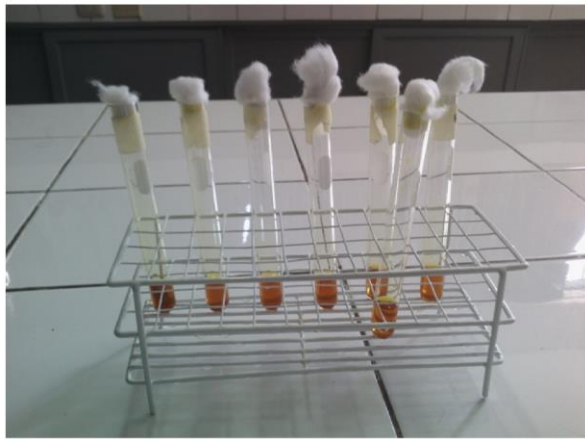
Pesado del almidón y las enzimas (α -amilasa y pectinasa)



Adición del almidón y enzimas en frascos contenidos de 300 ml de agua destilada



Hidrolizado de las muestras en una incubadora a T° entre 85°C – 90°C por 24 hr.



Preparación de blanco, muestras de DNS y lectura de absorbancias con espectrofotómetro para determinación de azúcares reductores



A.3. Preparación de las muestras para realizar el proceso de hidrólisis enzimática (sacarificación)



Pesado y adición de la enzima glucoamilasa, pasado un tiempo de 8 hr, adición de levadura Saccharomyces cerevisiae



Fermentación de las muestras durante un tiempo de 72 hr y posterior destilación