

# **PRODUCCIÓN DE BIOETANOL COMBUSTIBLE A PARTIR DE BONIATO**

**Tesis de Maestría en Biotecnología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de la República  
Diciembre 2011**

**Tesista: Mairan Guigou**

**Orientadores de Tesis:**

**Dra. Claudia Lareo y Msc. Mario Daniel Ferrari**

**Tribunal:**

**Dra. Matilde Soubes**

**Dra. Silvana Vero**

**Dra. Soledad Gutiérrez**

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos:

A mis tutores: Claudia Lareo y Daniel Ferrari, por el apoyo brindado durante todo el postgrado, por los conocimientos invaluable que supieron transmitirme para poder concretar este trabajo y por su dedicación y paciencia.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por el apoyo económico brindado que me permitió llevar a cabo este postgrado.

Al Proyecto de Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria por el financiamiento otorgado a través del Proyecto FPTA 266.

A Paco Vilaró, quien suministró la materia prima (boniato) para que este trabajo fuese posible y por su participación en la creación del proyecto.

A todos los compañeros y ex compañeros del Departamento de Bioingeniería por incentivar me a realizar la Maestría, por su amistad, por su paciencia, apoyo y solidaridad. Principalmente a Guadalupe, Lucía y Valeria por su colaboración durante la realización de esta investigación.

A Rudi, Mauro, Lorena y Natalia, por su cariño, paciencia y apoyo.

Y especialmente se lo dedico a mi madre, mi padre y mi abuela, que siempre creyeron en mí, me estimularon y me apoyaron en forma incondicional.

A todos, muchas gracias y este trabajo no podría existir sin ustedes.

## RESUMEN

El boniato es una materia prima atractiva para la producción nacional de bioetanol combustible debido a su alto contenido de azúcares, se cuenta con un programa de mejoramiento genético nacional, tiene bajo requerimientos de nutrientes y de riego, resistencia a plagas, baja erosión, y alto rendimiento agrícola.

Se evaluó la producción de bioetanol a partir de una variedad de boniato (*Ipomea batatas*) K 9807.1. La misma fue seleccionada por el INIA-Las Brujas, para su uso en la producción de bioenergía.

Se estudiaron las condiciones operativas del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación de boniato para la producción de bioetanol, a escala de matraces agitados y de biorreactor de laboratorio. Se evaluó la hidrólisis enzimática con  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa (AMG) comerciales y la fermentación con levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, en etapas separadas y simultáneas. Se evaluó también el uso de la energía consumida para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso de producción de etanol a partir de boniato utilizando un modelo de simulación desarrollado con el programa SuperPro Designer®.

El boniato K 9807.1 presentó un alto contenido de almidón y azúcares solubles fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa) que alcanzaron el 76 % de su materia seca (expresados como equivalentes de glucosa).

La fermentación y sacarificación simultánea mostró un comportamiento similar a la hidrólisis previa y separada de la fermentación en términos de concentración final de etanol y rendimiento global.

Con la relación materia seca a agua 1:5 se obtuvieron los mejores desempeños (rendimiento, velocidad y manipulación). Un aumento en la cantidad de materia seca por volumen de agua agregado, si bien permitió aumentar la concentración final de etanol, el rendimiento fue bajo, la fermentación incompleta, tuvo baja velocidad y dificultad en la homogeneización y transferencia de las suspensiones debido a la alta viscosidad. Para esta relación materia seca a agua se obtuvo el siguiente desempeño: concentración de etanol 68 g/L, eficiencia global 92 %, rendimiento industrial 0.46 L de etanol por kg de boniato seco, rendimiento agrícola 4460 L/ha.

Se elaboró un modelo de simulación de un proceso industrial desarrollado en el software referido, que puede ser utilizado para evaluar otras materias primas amiláceas. Se diseñó un proceso semi-continuo para una capacidad de 90.000 m<sup>3</sup> de etanol anual. El consumo energético del proceso dependió mayoritariamente de la concentración de materia seca en el medio de fermentación y de la eficiencia de fermentación. El uso de materia prima seca presentó un consumo de energía del proceso global que superó el contenido energético del bioetanol producido.

## ÍNDICE

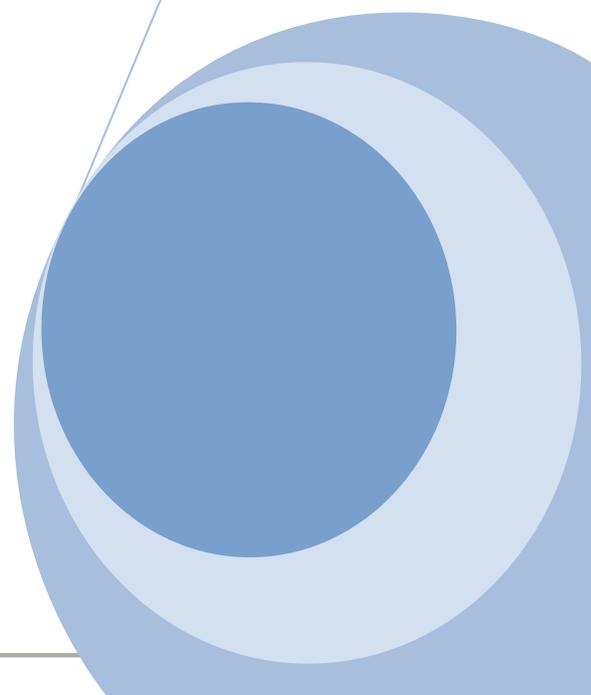
AGRADECIMIENTOS .....	2
RESUMEN .....	3
ÍNDICE.....	4
CAPÍTULO I: .....	7
INTRODUCCIÓN .....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Bioetanol .....	8
1.2 Boniato como materia prima para la producción de bioetanol.....	15
1.3 Almidón.....	17
1.4 Hidrólisis enzimática del almidón .....	20
1.5 Fermentación alcohólica .....	24
1.6 Fermentaciones con alto contenido de sólidos/azúcares (VHG) .....	29
1.7 Modalidad de fermentación .....	30
1.8 Integración de las etapas de sacarificación y fermentación .....	30
1.9 Proceso de separación del etanol .....	32
1.10 Simulación de procesos.....	32
CAPÍTULO II: .....	34
OBJETIVOS .....	34
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos específicos .....	35
Parte 1:.....	36
Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato .....	36
CAPÍTULO III: .....	37
Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
3.1 Caracterización físico química del boniato.....	38
3.1.1 Materia prima .....	38
3.1.2 Determinación de la distribución del tamaño de partícula de la harina.....	40
3.1.3 Determinación de la humedad .....	40
3.1.4 Determinación de cenizas.....	40
3.1.5 Determinación de proteínas, lípidos y fibras .....	41
3.1.6 Determinación de azúcares libres .....	41
3.1.7 Determinación del almidón .....	42
3.1.8 Cuantificación del contenido de azúcares .....	44

3.2	Ensayos de licuefacción, sacarificación y fermentación de boniato .....	45
3.2.1	Enzimas utilizadas .....	45
3.2.2	Microorganismo .....	45
3.2.3	Recuento de microorganismos .....	45
3.2.4	Desarrollo del inóculo .....	46
3.2.4.1	Desarrollo del inóculo para fermentaciones en matraces .....	46
3.2.4.2	Desarrollo del inóculo para fermentaciones en reactor .....	46
3.2.5	Gelatinización y licuefacción del almidón en matraces .....	47
3.2.6	Ensayos de sacarificación y ensayos de fermentación en matraces .....	48
3.2.7	Ensayos de sacarificación y fermentación a distintas relaciones de materia seca a agua total del medio en reactor .....	49
3.2.8	Cálculos .....	51
3.2.9	Análisis estadístico de los resultados .....	54
CAPÍTULO IV: .....		55
Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato .....		55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		55
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
4.1	Caracterización físico química del boniato .....	56
4.2	Sacarificación y fermentación en matraces .....	58
4.3	Sacarificación y fermentación a distintas relaciones materia seca a agua total del medio en reactor .....	64
Parte 2: .....		74
Estudio del uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso utilizando un modelo de simulación a través de un software específico .....		74
CAPÍTULO V: .....		75
Estudio del uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso utilizando un modelo de simulación a través de un software específico .....		75
MATERIALES Y MÉTODOS .....		75
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	76
5.1	Simulación del proceso de obtención de etanol con sacarificación y fermentación simultánea .....	76
5.2	Definición del proceso simulado .....	76
5.3	Definición de de condiciones operativas estudiadas .....	77
5.4	Descripción del proceso .....	78
CAPÍTULO VI: .....		81
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		81
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	82
6.1	Simulación del proceso de obtención de etanol a partir de boniato .....	82
6.2	Descripción de las etapas del proceso simulado .....	89
6.3	Estudio de sensibilidad para el boniato fresco .....	93

6.3.1	Estudio de sensibilidad para boniato fresco.....	93
6.3.2	Estudio de la variabilidad en el contenido de azúcares del boniato fresco .....	102
6.3.3	Estudio de sensibilidad para la harina y comparación con el boniato fresco .....	105
	CAPÍTULO VII:.....	111
	CONCLUSIONES .....	111
7	CONCLUSIONES.....	112
8	BIBLIOGRAFIA.....	113
9	NOMENCLATURA .....	121
10	ANEXO.....	123
10.1	ANEXO 1: Determinación de la humedad.....	123
10.2	ANEXO 2: Determinación de cenizas .....	123
10.3	ANEXO 3: Curvas de patrones.....	123
10.4	ANEXO 4: Determinación de almidón.....	127
10.5	ANEXO 5: Distribución del tamaño de partícula.....	127
10.6	ANEXO 6: Análisis ANOVA con los distintos momentos de dosificación de la enzima AMG, en fermentaciones a escala de matraces.....	127
10.7	ANEXO 7: Biomasa en reactor, relación 1:5 .....	133
10.8	ANEXO 8: Determinación de la curva de mejor ajuste para los tiempos de fermentación.....	134
10.9	ANEXO 9: Verificación del modelo global.....	135
10.10	ANEXO 10: Modelo específico para cada relación materia seca a agua total.....	136
10.11	ANEXO 11: Curvas de energía comparando respecto un proceso particular .....	143
10.12	ANEXO 12: Curvas de energía variando el contenido de azúcares y las relaciones de materia seca a agua en el medio para las distintas eficiencias de fermentación.....	146
10.13	ANEXO 13: Curvas de energía variando el contenido de azúcares del boniato y las eficiencias de fermentación para las distintas relaciones de materia seca a agua en el medio .....	149

# **CAPÍTULO I:**

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Bioetanol

Las tendencias actuales del suministro y consumo de energía mundiales son claramente insostenibles, tanto desde el punto de vista ambiental como del económico y social. Los principales desafíos son: asegurar un suministro de energía fiable y asequible, y pasar rápidamente a un nuevo sistema de suministro de energía con bajas emisiones de carbono, eficiente y respetuoso del medio ambiente (IEA, 2008).

Los biocombustibles pueden representar una muy buena alternativa a los combustibles fósiles, para combatir el cambio climático, mejorar el empleo rural e implica desafíos para el desarrollo sostenible, tanto a nivel mundial como nacional (Dufey, 2006; Demirbas, 2009). Un biocombustible es una fuente de energía renovable producida con un material natural (planta), la cual puede ser utilizada como sustituto de combustibles derivados de petróleo. El bioetanol es el biocombustible más utilizado en el sector transporte en todo el mundo (Dufey, 2006; Demirbas, 2011; He y Zhang, 2011; Zhang et al., 2011).

El CO<sub>2</sub> es uno de los gases de efecto invernadero más importante (GEI). El uso continuado de combustibles fósiles para satisfacer la demanda energética del mundo ha provocado una creciente concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, razón por la cual hay una creciente preocupación sobre el calentamiento global. La combustión de combustibles fósiles es responsable del 73 % de la producción de CO<sub>2</sub> (Yu et al., 2003; Wildenborg y Lokhorst, 2005; Demirbas et al., 2004).

El uso de biocombustibles permite reducir la emisión de los gases de efecto invernadero que se asocian a la combustión del petróleo (GEI). Esto ayudaría a los países a combatir parte de los problemas ambientales, a minimizar el cambio climático y cumplir con los compromisos del Protocolo de Kyoto. El uso de biomasa para producir bioetanol permitiría reducir las emisiones de GEI, ya que al crecer absorben CO<sub>2</sub> que luego se libera durante la combustión del biocombustible, no contribuyendo a emisiones de carbono nuevas, sino que la emisión formaría parte del ciclo del carbono fijado. Koonin (2006) evaluó seis estudios sobre la reducción de gases de efecto invernadero debido al uso de bioetanol producido a partir de maíz y encontraron una disminución del 33 % al 20 %, con un promedio de una reducción del 13 % de las emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con la gasolina. Así, la utilización de biomasa para producir biocombustibles podría ahorrar la energía no renovable y reducir los gases de efecto invernadero (Koonin, 2006; Kim y Dale, 2005).

El etanol anhidro fue utilizado como combustible en algunos motores de combustión interna en el siglo XIX. En la década de 1930, el bioetanol fue utilizado como fuente de combustible para los coches. Después de la Segunda Guerra Mundial, sin embargo, pasa

a tener poco interés el uso de cultivos agrícolas para la producción de bioetanol a causa de la oferta abundante y barata de petróleo y gas natural (Bothast y Schlicher, 2005).

Como componente de combustible, el etanol se quema de forma limpia y aumenta el octanaje de la gasolina. Debido a que el etanol tiene un mayor contenido de oxígeno que el metilterbutileter (MTBE), se requiere la mitad del volumen para producir el mismo nivel de oxígeno en la gasolina.

Por lo tanto, el bioetanol presenta ciertas ventajas frente a la gasolina: tiene un número mayor de octanaje, los límites de inflamabilidad en el aire son mayores y más extensos y posee mayor calores de vaporización. Estas propiedades le permiten una mayor relación de compresión, menor tiempo de encendido del motor y un menor tiempo de inyección de alcohol, dado por la rápida velocidad de vaporización del etanol, lo que conduce a ventajas en la eficiencia teórica en un motor de combustión interna (Balat, 2007).

El bioetanol se puede mezclar con gasolina en cualquier proporción hasta un 10 % sin necesidad de modificaciones en el motor. Mezclas de 5 % o 10 % de bioetanol en la gasolina se denominan B5 y B10, respectivamente (Dufey, 2006). El bioetanol también puede utilizarse en concentraciones más altas como el E85 o E95 (95 % bioetanol y 5 % gasolina). La mezcla más popular para los vehículos ligeros que se conoce como E85 (85 % bioetanol y 15 % gasolina). En Brasil el bioetanol como combustible es derivado de la caña de azúcar y se utiliza puro o mezclado con gasolina en una mezcla de 24 % bioetanol y 76 % gasolina. En los Estados Unidos, mayoritariamente se utiliza la mezcla E85 pero varios estados utilizan E10 (10 % bioetanol v/v) (Balat et al., 2007). En la Tabla 1.1 se muestran los típicos usos del bioetanol combustible y los materiales a partir de los cuales se obtiene a nivel mundial.

**Tabla 1.1.** Tipo de producción global de bioetanol.

País	Típico uso	Materia prima
Brasil	E26	Caña de azúcar
Estados Unidos	E10, E85	Maíz, sorgo
China	E10	Maíz, mandioca, caña de azúcar, boniato, arroz
India	E5	Caña de azúcar
Colombia	E10	Caña de azúcar
Tailandia	E10	Caña de azúcar, tapioca, mandioca
Perú	E7.8	Caña de azúcar
Suiza	E5, E85	Forestal, trigo
Uruguay	E5	Caña de azúcar, sorgo dulce

Fuente: Dufey, 2006.

La necesidad de obtener alcohol deshidratado con el fin de ser usado como aditivo oxigenante de la gasolina, impuso una serie de retos a la industria y a los centros de investigación, a fin de reducir los costos energéticos de la recuperación de etanol cumpliendo los correspondientes estándares de calidad. Adicionalmente, el impacto ambiental que presentan algunas tecnologías tradicionales de separación hizo que la

investigación sobre esquemas alternativos y no convencionales sea mucho más intensa (Montoya et al., 2005; Sánchez y Cardona, 2005).

Las necesidades de promover el desarrollo de zonas rurales deprimidas, reducir la dependencia de combustibles fósiles agotables y generalmente importados y de disminuir las emisiones, en particular de dióxido de carbono, han conducido a diferentes respuestas mundiales de países o de bloques regionales, el desarrollo de políticas y programas de promoción de fuentes renovables de energía (IEA, 2008; CEPAL – GTZ, 2003; CEPAL, OLADE, GTZ, 2003; Dufey, 2006).

Teniendo en cuenta que el costo de la producción de biocombustibles es más alto que los de los combustibles convencionales, se requiere de políticas públicas para apoyar y subsidiar la producción de biocombustibles competitivos en las primeras etapas de desarrollo industrial. El uso de instrumentos de política tales como el establecimiento de objetivos nacionales para la mezcla de biocombustibles con combustibles estándares, los beneficios fiscales, subvenciones y garantías de préstamos para fomentar una mayor producción y consumo a través de la normativa se encuentra detrás del desarrollo de este mercado (Dufey, 2006).

Desde 1975, el Programa Nacional de Alcohol de Brasil ha utilizado la sacarosa, obtenida directamente de la caña de azúcar, como sustrato para la fermentación. El gobierno de Estados Unidos, que es el segundo mayor productor de alcohol del mundo luego de Brasil, aprobó la Ley de Seguridad Energética en 1980, que incluyó la Energía de la Biomasa y la Ley de Alcohol Combustible, para otorgar préstamos y garantías de préstamos para el alcohol y otros proyectos de energía a partir de biomasa. El objetivo de estos programas era apoyar el agregado de bioetanol a la gasolina (Glazer y Nikaido, 2007).

El bioetanol es el biocombustible más usado para el transporte de todo el mundo. La producción mundial alcanzó los 33 millones de metros cúbicos en 2004. Alrededor del 60 % de la producción global de bioetanol proviene de la caña de azúcar y 40 % de otros cultivos. Brasil suministra alrededor del 50 % de la demanda internacional de bioetanol (Dufey, 2006). En el año 2008 fue 64 millones de metros cúbicos, incrementándose la producción un 94 %, en tan solo 4 años (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Producción global de bioetanol.

País / Región	Producción (millones de m <sup>3</sup> )	
	Año 2004	Año 2008
Estados Unidos	12.9	33.8
Brasil	14.6	26.1
China	3.5	3.9
India	1.2	2.3
Francia	0.8	1.5
Canadá	0.2	1.0
Alemania	0.2	0.8
Tailandia	2.5	0.6
Rusia	0.8	0.6
España	0.3	0.5
Sur África	0.4	0.4
Reino Unido	0.3	0.4
Restantes países	5.1	5.3
Mundo	40.7	77.1

Fuente: Demibras, 2011.

Uruguay presenta una alta dependencia energética de los combustibles fósiles importados. Aproximadamente el (50 - 70) % de la energía primaria utilizada en los últimos diez años corresponde a combustibles fósiles, básicamente petróleo y en menor proporción gas natural y carbón. El resto corresponde a energía renovable de origen nacional, básicamente energía hidráulica y biomasa. Los valores referidos dependen fuertemente de la disponibilidad de energía hidráulica. Desde 1994, el sector transporte ha sido el de mayor participación en el consumo final energético (32 % en 2007). Sin embargo, en el 2008 el sector industrial pasó al primer lugar debido principalmente al gran aumento en el consumo de residuos de biomasa (33 % sector industrial y 29 % sector transporte) (DNETN).

En Uruguay, la respuesta a la incorporación de etanol combustible se puede resumir de la siguiente manera.

1) La Ley de Agrocombustibles (N°18.195) aprobada a fines del 2007. Tiene por objeto el fomento y la regulación de la producción, comercialización y utilización de biocombustibles, establece horizontes de sustitución de combustibles fósiles por combustibles nacionales (en el caso de etanol la incorporación de hasta el 5 % en las gasolinas de uso automovilístico y a partir del 2015 ese porcentaje será el mínimo obligatorio) y requisitos medioambientales para la producción, entre otros.

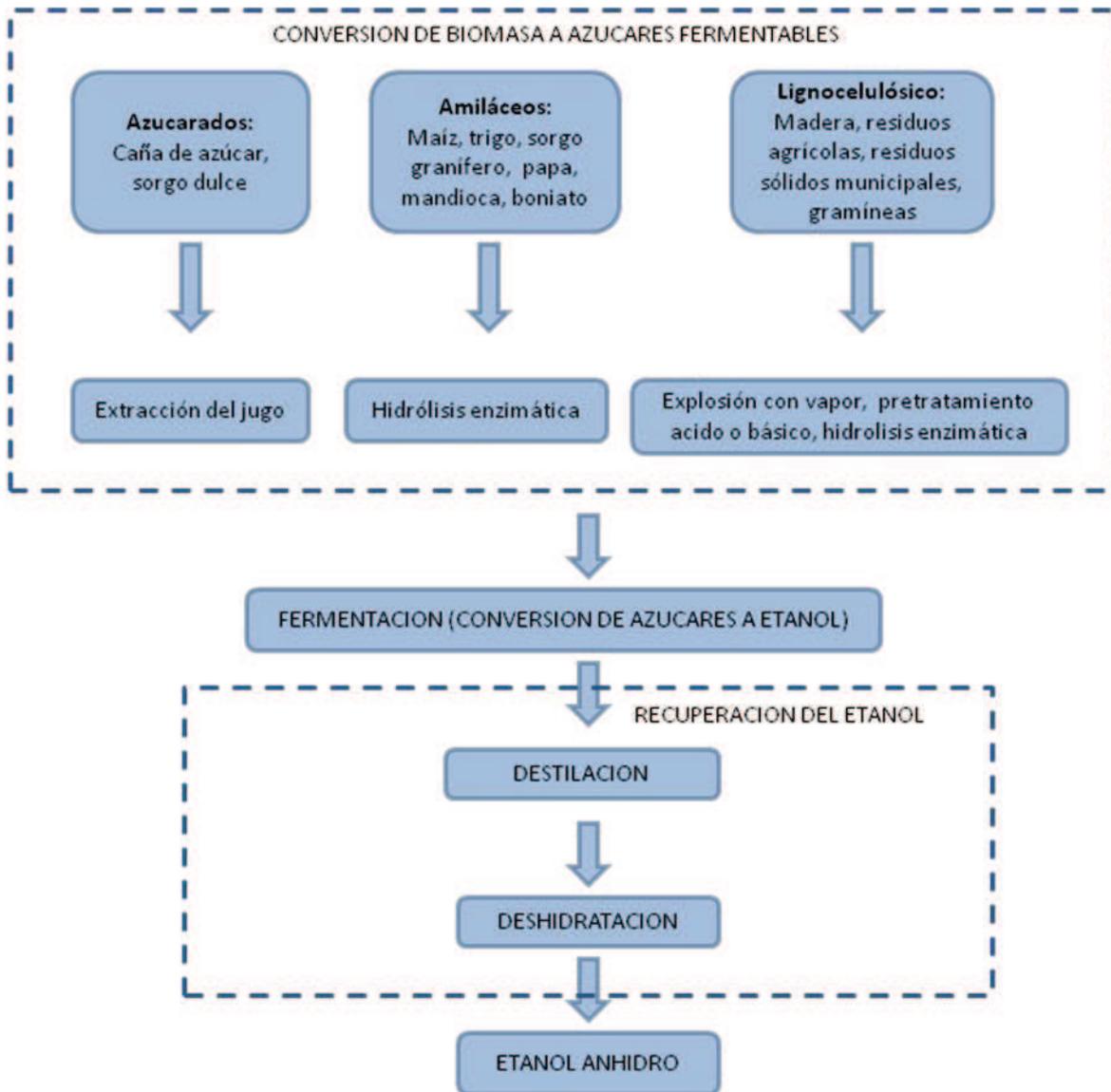
2) El Programa de Biocombustibles de la Administración Nacional de Combustibles Alcohol y Portland (ANCAP) propuesto en 2006 tiene como objetivos principales: a) la reducción de las cuentas de petróleo mediante la sustitución progresiva de combustibles de gasolinas y gasoil por etanol y biodiesel respectivamente; b) crear puestos de trabajo rural en especial en áreas deprimidas social y económicamente; c) diversificar la matriz energética; d) contribuir a la reducción de contaminación ambiental. El emprendimiento

de ALUR-Bella Unión ha comenzado a producir etanol de caña de azúcar en 2009, actualmente produce azúcar, bioetanol, electricidad y ración animal y prevé procesar sorgo dulce. Se prevé una producción de 18.000 m<sup>3</sup> anuales de etanol que corresponden aproximadamente al 5 % de consumo anual de gasolina (Errea y Sader Neffa, 2006). El Programa prevé la producción de etanol usando otras materias primas (sorgo, boniato). Actualmente en ALUR Paysandú se produce etanol de calidad industrial y potable a partir de sorgo grano y melaza de caña. Este año se comenzó con la construcción del nuevo complejo de ALUR en Paysandú, donde se producirán 70.000 m<sup>3</sup> anuales de etanol, 50.000 toneladas de alimento animal y 12 megavatios/hora de electricidad, en una obra que implicará la inversión de unos 100 millones de dólares (ALUR, disponible online).

3) Aprobación de normas técnicas nacionales de calidad para etanol combustible: normas UNIT 1122:2009 (etanol anhidro) y 1124:2007 (etanol hidratado).

La cadena productiva de la obtención de etanol incluye la obtención de la materia prima (producción vegetal), su transporte hasta el centro de transformación (usina, ingenio, destilería, planta industrial), transformación en la forma de energía final, distribución y uso final. Durante la cadena productiva, se utilizan combustibles derivados del petróleo, hay emisiones gaseosas, incluyendo gases de efecto invernadero y vertidos de efluentes líquidos, puede haber erosión y agotamiento de suelo agrícola. La producción de bioenergía no necesariamente implica menor consumo neto de petróleo, menor emisión neta de gases de efecto invernadero o buenas condiciones laborales en las zonas rurales. Se tiene el riesgo de comprometer la disponibilidad de suelo para la producción de alimentos y de fibras, provocando escasez y aumento de precios en los mismos. El costo elevado de la bioenergía, ha llevado en el pasado a aplicar subsidios y créditos que pueden no ser sostenibles por el sistema tributario y financiero (DSD, 2001; Smeets et al., 2006).

El bioetanol se produce por fermentación, generalmente usando levaduras, de un mosto preparado a partir de azúcares de materiales azucarados (caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha azucarera, suero de leche), amiláceos (cereales o raíces como maíz, sorgo grano, boniato) o celulósicos (residuos forestales, paja, plantas perennes). Los materiales azucarados tienen azúcares simples solubles directamente fermentables (sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa). En cambio los materiales con almidón o celulosa, requieren etapas previas de hidrólisis o sacarificación para la obtención de los azúcares simple fermentables. El etanol producido por fermentación se separa por destilación y eventual posterior deshidratación, según la calidad requerida del producto sea hidratado o anhidro. La Figura 1.1 esquematiza las distintas etapas involucradas en el proceso de conversión de la biomasa en azúcares fermentables y producción de etanol.



**Figura 1.1.** Proceso de conversión de biomasa a etanol.

En la elección, tanto de la materia prima como del proceso industrial de transformación deben tenerse en cuenta criterios de desarrollo sostenible (“sustentabilidad”) (Chidiak y Stanley, 2009):

- Uso de nuevos cultivos que no compitan con alimentos: no uso como alimento, no uso de cereales que formen parte de la dieta básica humana.
- Modelos productivos de integración no de sustitución.
- Uso de cultivos con: mínimo arado, bajo uso de fertilizantes, mínimo uso de agua, baja erosión.
- Cultivos de crecimiento rápido, alta productividad.
- Procesos industriales flexibles para el procesamiento de diversas materias primas.
- Alto rendimiento de transformación: uso de enzimas con alta especificidad y actividad, mejores microorganismos fermentadores y resistentes a inhibidores.

- Bajo uso de energía no renovable en el proceso: reducción en el uso de agua en el proceso industrial, uso de residuos agrícolas como fuente de energía.

En la Tabla 1.3 se comparan la producción potencial de etanol de varios posibles sustratos.

**Tabla 1.3.** Diferentes materias primas para la producción de bioetanol y su producción potencial.

Materia prima	Producción potencial de bioetanol (L/t)
Caña de azúcar	70
Remolacha azucarera	110
<b>Boniato</b>	<b>125</b>
Papa	110
Mandioca	180
Maíz	360
Arroz	430
Cebada	250
Trigo	340
Sorgo dulce	60
Bagazo y otras biomásas celulósicas	280

Fuente: Linoj Kumar et al., 2006.

Actualmente el etanol combustible se produce mayoritariamente a partir de materiales azucarados (caña de azúcar y remolacha) y amiláceos (maíz). En los materiales azucarados, el azúcar se extrae mediante molienda y se fermenta a etanol usando microorganismos apropiados, generalmente levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En el caso de los materiales amiláceos, se debe procesar la materia prima (moler, cortar), e hidrolizar el almidón (en forma enzimática o química) previa para producir azúcares directamente fermentables (glucosa) por los microorganismos.

Mientras que para la producción de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas, es necesario un pretratamiento físico y químico severo que permita romper la estructura del material y poder liberar los azúcares que pueden ser fermentables.

Materiales como la remolacha o el maíz requieren una fuente energética externa para su industrialización. Como beneficio, dejan una material residual (coseta o sólidos de la destilación) que se usa para ración animal permitiendo la integración de sistemas de producción de energía y alimentos. La harina de soja utilizada en la alimentación animal puede ser sustituida por los residuos secos y solubles de la destilación de granos (DDGS), es decir, el producto alternativo para la harina de soja utilizado es el DDGS (Kim y Dale, 2005).

En el proceso de molienda seca, el maíz se muele y se mezcla con agua para formar un puré. La masa se cocina y se le agregan enzimas para convertir el almidón en glucosa.

A continuación, se añade la levadura y se procede a fermentar. La mezcla producto de esa fermentación se destila y deshidrata para producir etanol combustible. Los sólidos que quedan después de la destilación se secan para producir granos de destilería secos con proteínas (DDG) y se venden como un suplemento de ración animal. Para que sea económicamente viable, las plantas de producción de etanol a partir de maíz deben comercializar tanto el etanol resultante del proceso como los co-productos generados (Bothast y Schlicher, 2005; de Blas et al., 2007).

En el caso del maíz el proceso de molienda húmeda es más rentable y energéticamente más intensivo, ya que el grano debe ser separado en sus componentes, incluido el almidón, fibra, gluten y germ. El gluten también se separa para convertirse en harina de gluten de maíz, un alimento para animales alto en contenido de proteínas (Bothast y Schlicher, 2005).

La papa, el boniato y la mandioca requieren un proceso de hidrólisis por ser amiláceos. Estos cultivos ofrecen como gran ventaja un rendimiento mucho más alto de almidón por hectárea de tierras cultivada, pero tienen un problema de almacenamiento y transporte ya que contienen gran cantidad de agua (Maiorella et al., 1981).

El dióxido de carbono es un subproducto útil de la fermentación alcohólica. Se utiliza principalmente por la industria de alimentos para la producción de bebidas carbonatadas y agua de soda (Bothast y Schlicher, 2005; Tasić y Veljković, 2010).

Algunas materias primas como la caña de azúcar dejan un residuo lignocelulósico (bagazo) que se quema en caldera para producir el vapor y la electricidad requeridos para los procesos, permitiendo alcanzar la autonomía energética de la planta industrial. El exceso de bagazo producido permite la generación de electricidad que bien se vierte a la red pública o se usa en emprendimientos locales. Pero otras materias primas como las amiláceas, requiere el uso de energía externa (fuel oil, gas natural, residuos lignocelulósicos). A efectos de optimizar el funcionamiento de una planta de producción de bioetanol, se requiere saber cómo afectan en el costo final variaciones en la materia prima, condiciones operativas, incorporación de nueva tecnología o en el combustible usado (Kim y Dale, 2005; Kwiatkowski et al., 2006).

## 1.2 Boniato como materia prima para la producción de bioetanol

El boniato (*Ipomea batatas*) ha sido considerado una buena materia prima para la producción de etanol por fermentación por su alto rendimiento en contenido de almidón por unidad de área cultivada (Kim y Hamdy, 1985; Srichuwong et al., 2009; Ziska et al., 2009). Se ha reportado que cultivos de maíz, remolacha azucarera y de sorgo dulce, tendrían rendimientos en alcohol por unidad de superficie, alrededor de la mitad del boniato (Vilaró et al., disponible on line; Ziska et al. 2009). La mayor parte de su materia seca corresponde a almidón (Zhang et al., 2002; De Souza et al., 2007). Contiene además azúcares simples solubles como glucosa, fructosa y sacarosa, cantidades menores de fibras y proteínas. En la bibliografía hay pocos estudios sobre la producción de etanol

usando boniato como materia prima (Kim y Hamdy, 1985; Yu et al., 1996; Reddy y Basappa, 1997; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011).

El cultivo de boniato tiene varias características que determinan su buena adaptación local y elección por productores de tipo familiar (Fallé et al., 2005). Al igual que la mayoría de los cultivos de raíz, el boniato tradicionalmente ha crecido como cultivos de subsistencia, ya que son capaces de tolerar condiciones marginales de suelo (Osundahunsi et al., 2003). Tiene bajo costo de producción, se cuenta con un programa de mejoramiento genético nacional desde hace dos décadas, tiene facilidad de manejo y escasa incidencia de enfermedades y plagas, no precisa riego y es poco erosivo porque cubre rápidamente el suelo, protegiendo del efecto de las lluvias, además de controlar malezas problema. La producción local cubre el consumo nacional. El tamaño de este mercado limita el aumento del área y el desarrollo del cultivo. El período de cosecha de boniato en el sur es de febrero a mayo inclusive. En el norte empieza un mes antes y la cosecha puede extenderse hasta junio inclusive. Ésta se puede realizar en cualquier momento del ciclo, una vez alcanzado un rendimiento favorable. En el norte, con cultivares precoces es posible obtener dos cosechas por temporada (Vilaró et al., disponible on line).

Debe destacarse que el boniato tradicional no forma parte de la dieta básica uruguaya y además en la zona sur existe un descarte de 6.500 toneladas, cuyo destino es la alimentación animal o se desperdicia sin un uso valioso (Encuesta Hortícola, 2006). Este descarte podría destinarse a la producción de etanol pero dicha cantidad no justifica por sí solo un emprendimiento industrial. Sin embargo, las variedades mejoradas presentan mayor potencial de rendimiento de obtención de etanol y amplia adaptación a las condiciones agroecológicas locales. Este cultivo se adapta a productores de cualquier escala por ser fácilmente mecanizable y a diferencia de otros cultivos alternativos utilizados en la producción de bioetanol, la cosecha y procesamiento de dicha materia prima puede realizarse de acuerdo a la demanda industrial (Vilaró et al., disponible on line).

La transformación previa del boniato (chips o harina) puede facilitar el transporte y/o conservación (Vilaró et al., disponible on line).

En los países en desarrollo, donde existe una escasa infraestructura de transporte, la harina es una alternativa a las dificultades asociadas con el almacenamiento y transporte dichas raíces en forma fresca (Yadav et al., 2007). El material seco tiene menor cantidad de agua disponible (actividad de agua menor al fresco) por lo que sufre menos degradación debido al crecimiento microbiano con el tiempo. Además este proceso mejora la estabilidad del boniato, minimizando los cambios químicos y físicos durante su almacenamiento (color, textura, forma y algunas propiedades funcionales tales como la rehidratación y la porosidad). En el proceso de secado debe observarse la prevención del oscurecimiento de las materias primas por procesos enzimáticos y no enzimáticos durante el proceso; preservar la estructura celular de boniato; el contenido de azúcares; y evitarse la oxidación del producto. El secado al sol es el método más común de secado de los cultivos en los países en desarrollo (Hatamipour et al., 2007).

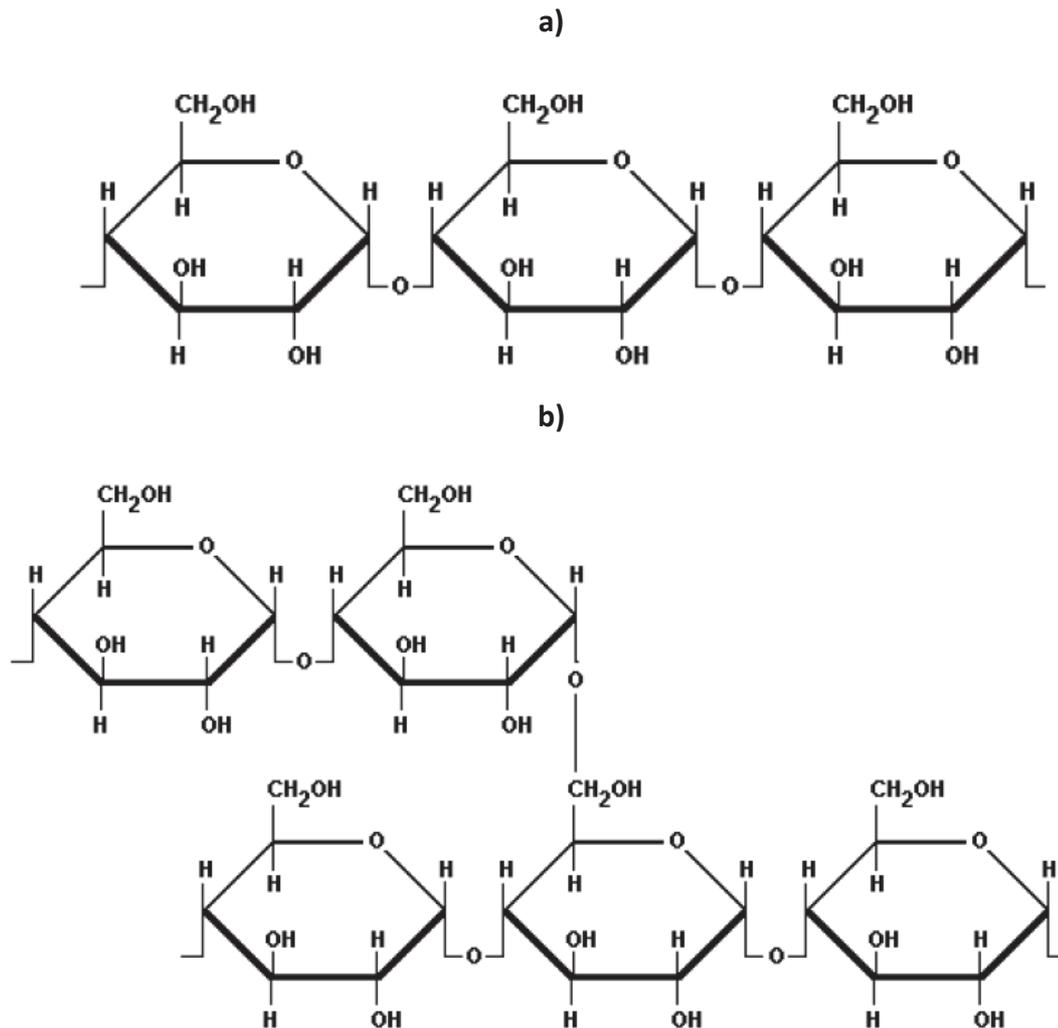
En general, el secado de boniato podría ser útil para: (i) reducir el costo de transporte, ya que se podría transportar mayor cantidad de material útil (almidón y azúcares fermentables) en cada viaje de traslado a la planta, (ii) conseguir altas concentraciones de etanol, al poder preparar mezclas con mayor contenido de material seco (y por tanto de azúcares fermentables) que el boniato fresco, (iii) mejorar la flexibilidad de la planta ya que se puede conservar el material por largo tiempo y ocupa menos espacio que el fresco, (iv) mejorar potencialmente el desempeño de la hidrólisis a altas relaciones materia seca a agua debido a una mayor accesibilidad de las enzimas al almidón.

### 1.3 Almidón

La mayor parte de la materia seca del boniato corresponde a almidón (puede alcanzar 60 - 70 % del material seco) (Zhang et al., 2002; Ziska et al., 2009). El almidón es un polímero de glucosa de alto peso molecular, insoluble en agua y parcialmente cristalino. Está formado por dos tipos de polímeros bien diferentes, la amilasa y la amilopectina (Klass y Dale, 1998; Bothast y Schlicher 2005).

La amilosa se trata básicamente de un polímero lineal, cuyas unidades de glucosa están unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4). La amilopectina es un polisacárido ramificado de unidades de glucosa, cuyas ramas se localizan entre el C6 de una glucosa de la cadena principal y el C1 de la primera glucosa que participa de la ramificación. Por ello, se dice que la amilopectina se trata de un polímero ramificado que contiene glucosas unidas mediante enlaces glucosídicos en la posición  $\alpha$  (1-4) y algunas uniones  $\alpha$  (1-6) encargadas de formar dichas ramificaciones (Coulate, 1998).

La amilosa es soluble en agua caliente, mientras que la amilopectina no lo es. La amilosa es un polímero más pequeño que la amilopectina, se cree que contienen muchos miles de unidades de glucosa. La amilopectina es una molécula mucho más grande, que consta de alrededor de  $10^6$  unidades de glucosa por molécula. Como en la amilosa, las uniones entre las moléculas de glucosa son enlaces  $\alpha$  (1-4), pero alrededor del 4 - 5 % de las unidades de glucosa están también unidas en enlaces  $\alpha$  (1-6), generando puntos de ramificación (Figura 1.2 y 1.3) (Coulate, 1998).

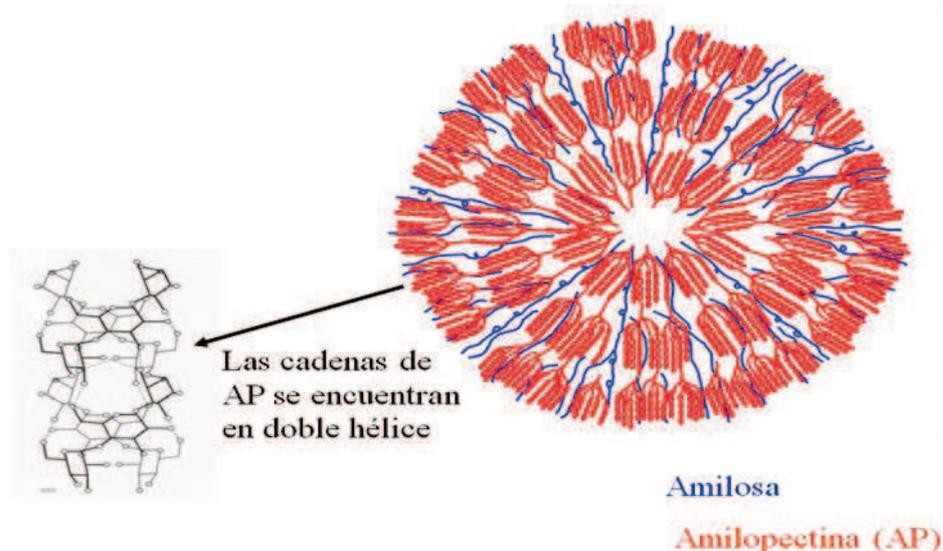


**Figura 1.2.** Estructura de: a) la amilosa, formada por cadenas de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidos por enlaces  $\alpha$  (1-4), y b) la amilopectina, con ramificaciones en la cadena de glucosas producidas por enlaces  $\alpha$  (1-6) (Coulate, 1998).

Las variedades boniato muestran diferentes patrones cristalinos, y contenidos de amilosa que van desde 8.5 hasta 38 %, con temperaturas de gelatinización de (63 - 74) $^{\circ}$ C. Parte de esta variabilidad puede atribuirse a la variación genética. Las condiciones de crecimiento también pueden afectar a las propiedades físicas de los almidones de boniato. Algunos investigadores observaron un incremento en el contenido de amilosa, temperatura de gelatinización y tamaño de los gránulos al aumentar la temperatura del suelo. En ambas variedades (boniato rojo y boniato blanco), el tamaño del gránulo osciló entre unos pocos micrómetros a 40  $\mu$ m. Estos cultivares tenían un contenido alto de amilosa (32 - 34 %). Se detectaron temperaturas de inicio de gelatinización de 67 $^{\circ}$ C y que la variedad de boniato blanco tenía tendencia más baja de retrogradación (insolubilización y precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente y reaccionan entre sí). La combinación del alto contenido de amilosa en el almidón con las temperaturas de gelatinización relativamente bajas no es común, debido a que el alto contenido de

amilosa se asocia generalmente con altas temperaturas de gelatinización. Ambos cultivares presentaron baja capacidad de absorción de agua (Osundahunsi et al., 2003).

Las propiedades físico-químicas de los almidones son dependientes de su composición, estructura de polisacáridos y organización supramolecular (formación de fase cristalina y fase amorfa, sus interacciones, el grosor). El almidón tiene ciertos tipos de embalaje cristalino de sus hélices dobles de la amilopectina (A o B) y el aumento de la temperatura del suelo durante el desarrollo del boniato promueve la transformación de tipo C (mezcla de la estructura polimórfica, tipo A y tipo B). El calentamiento del almidón húmedo a una temperatura mayor a 100°C a menudo resulta en la transformación de la estructura B menos estable termodinámicamente (con empaquetamiento hexagonal de dobles hélices y cerca de 36 moléculas de agua dentro de cada célula) a una estructura monoclinica más estable de tipo A (con cerca de seis moléculas de agua dentro de las hélices). El aumento de la temperatura de gelatinización es más pronunciada en estructuras menos ordenadas (tipo C). Pero variaciones en la temperatura ambiental durante la biosíntesis, puede resultar en una conversión total de C (temperatura del suelo de crecimiento bajo, aprox. 15°C) a estructura pura de tipo A (correspondiente a altas temperaturas, 27 - 33°C) (Genkina et al., 2004). Igualmente para cualquiera de las estructuras la viscosidad aumenta en forma significativa cuando se calienta una suspensión de almidón.



**Figura 1.3.** Estructura adoptada por la amilosa y estructura ramificada de la amilopectina adoptada en un material amiláceo (Jane, 2009).

El almidón también puede ser subdividido en almidón de cereales, legumbres, palma y los almidones de tubérculos o raíces, por su grado de complejidad en su hidrólisis. El almidón de tapioca y de boniato son ejemplos de almidón derivado de los tubérculos o raíces. Los gránulos de almidones de tubérculos y de raíces son de forma ovalada, esféricas y también existen formas poligonales e irregulares (Shariffa et al., 2009).

Para la producción de bioetanol a partir de un material amiláceo por fermentación con *Sacharomyces cerevisiae*, debe hidrolizarse previamente el almidón a unidades de

glucosa. La hidrólisis se puede realizar de dos maneras: hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida (Yoosin y Sorapipatana, 2007; Tasić y Velijković, 2010).

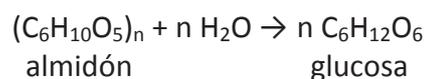
La hidrólisis catalizada por ácido no se utiliza mucho en la actualidad debido principalmente a la necesidad de la neutralización del hidrolizado antes de la fermentación y a que se requiere mayor inversión en el equipamiento, ya que el material debe ser adecuado para trabajar en condiciones ácidas. El método enzimático ha recibido mayor atención en las últimas décadas (Tasić y Velijković, 2010).

#### 1.4 Hidrólisis enzimática del almidón

La hidrólisis enzimática de almidón, generalmente se realiza en dos etapas. Primero se realiza una etapa de licuefacción en presencia de  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar el almidón en oligosacáridos con varias unidades de glucosa (dextrina), y luego se realiza la sacarificación con el agregado de amiloglucosidasa (AMG) que hidroliza los oligosacáridos a glucosa (Tasić y Velijković, 2010; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Las enzimas amilolíticas que se utilizan para la sacarificación del almidón provienen de bacterias y hongos (Chou et al., 2008). Varios microorganismos son conocidos por producir amilasas para digerir almidón crudo, sin embargo la mayoría de estos microorganismos son eficaces para los almidones de cereales. Almidones de raíz o tubérculos son más resistentes a la reacción de estas enzimas. La susceptibilidad de los gránulos de almidón a la digestión por la amilasa depende de la fuente de almidón y duración del tratamiento con la enzima. Se ha seleccionado una cepa de *Aspergillus niger* AM07 capaz de hidrolizar almidón en glucosa, tanto en cereales, tubérculos y raíces que puede ser utilizada directamente en la producción de etanol (Omemu et al., 2004).

La hidrólisis del almidón implica la ruptura de enlaces glucosídicos y la adición de una molécula de agua por cada enlace roto



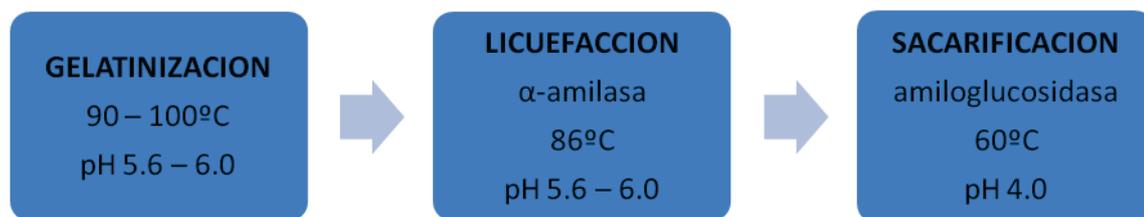
La reacción dada por las amilasas es irreversible. Las amilasas se pueden subdividir en tres grupos:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y glucoamilasa.

La enzima  $\alpha$ -amilasa es una endoamilasa que hidroliza al almidón en polímeros más cortos de glucosa. Puede atacar los gránulos intactos de almidón e hidroliza tanto a la amilosa como a la amilopectina, generando al comienzo huecos al azar en los granos de almidón. La  $\alpha$ -amilasa hidroliza los enlaces  $\alpha$  (1-4) en zonas aleatorias de la cadena principal, incluso a ambos lados de los enlaces  $\alpha$  (1-6). Sin embargo, no hidroliza los enlaces 1-6 que se encuentran en los puntos de ramificación de la amilopectina. Las otras dos ( $\beta$ -amilasa y AMG) actúan sobre los productos liberados en la reacción con la  $\alpha$ -amilasa (Polakovič y Bryjak., 2003; Bravo et al., 2006).

La  $\beta$ -amilasa o maltasa es una exoamilasa que hidroliza ordenadamente unidades de maltosa a partir de extremos no reductores. La enzima detiene su actividad dos unidades antes de un enlace  $\alpha$  (1-6). La enzima hidroliza únicamente enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4), con inversión en la configuración del C1 en el glicósido, pasando de la forma  $\alpha$  a la  $\beta$  (Tucker y Woods, 1991).

La amilopectina es degradada parcialmente únicamente por la amiloglucosidasa. La glucoamilasa o amiloglucosidasa (AMG) ataca los extremos no reductores del sustrato, formando en mayor cantidad glucosa y en menor cantidad oligosacáridos. La acción de la enzima causa inversión en la configuración, produciendo  $\beta$  glucosa.

En la Figura 1.4, se muestra un esquema de las condiciones que se utilizan generalmente en la hidrólisis enzimática de almidón de boniato (Zhang et al., 2011).



**Figura 1.4.** Esquema de las etapas de la hidrólisis del almidón.

Además del contenido de amilasa y amilopectina, la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático está influenciado por varios factores como: tamaño de partícula, estructura cristalina, la presencia de inhibidores enzimáticos y características de la suspensión (viscosidad, la resistencia a la retrogradación o grado de gelatinización, pH temperatura, relación sustrato/enzima). También depende de las propiedades fisicoquímicas del almidón y se ve influida por el procesamiento y condiciones de almacenamiento. Entre estos factores, la estructura granular se cree que es el más importante. Entre los almidones que no provienen de cereales, el almidón de tapioca tiene susceptibilidad hacia la enzima relativamente más alta que la de otros almidones como la papa y el boniato. El boniato muestra una mayor resistencia a la  $\alpha$ -amilasa y al ataque de la glucoamilasa (López et al., 2005; Noda et al., 2008; Shariffa et al., 2009). Gránulos de almidón grandes tienen una menor superficie de contacto que los más pequeños, y por lo tanto, menor área para la absorción de la amilasa. Noda y colaboradores (2008) demostraron que los gránulos de almidón grandes se digieren más lentamente que los pequeños gránulos.

El proceso de sacarificación representa un sistema muy complejo y se han propuesto muchos modelos matemáticos. Se ha encontrado un modelo que describe la hidrólisis del almidón mediante seis parámetros sobre la base de una ecuación cinética tipo Michaelis-Menten, que tiene en cuenta a los productos de la reacción y las condiciones de inhibición por sustrato (Polakovič et al., 2003). Otros autores encontraron que la cinética de la hidrólisis enzimática se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten, considerando que la desactivación térmica de la enzima sigue una cinética de segundo orden (Bravo et

al., 2006). Un aspecto importante a destacar con estas enzimas es que pueden presentar inhibición por sustrato y/o producto (glucosa) (Mojović et al., 2006).

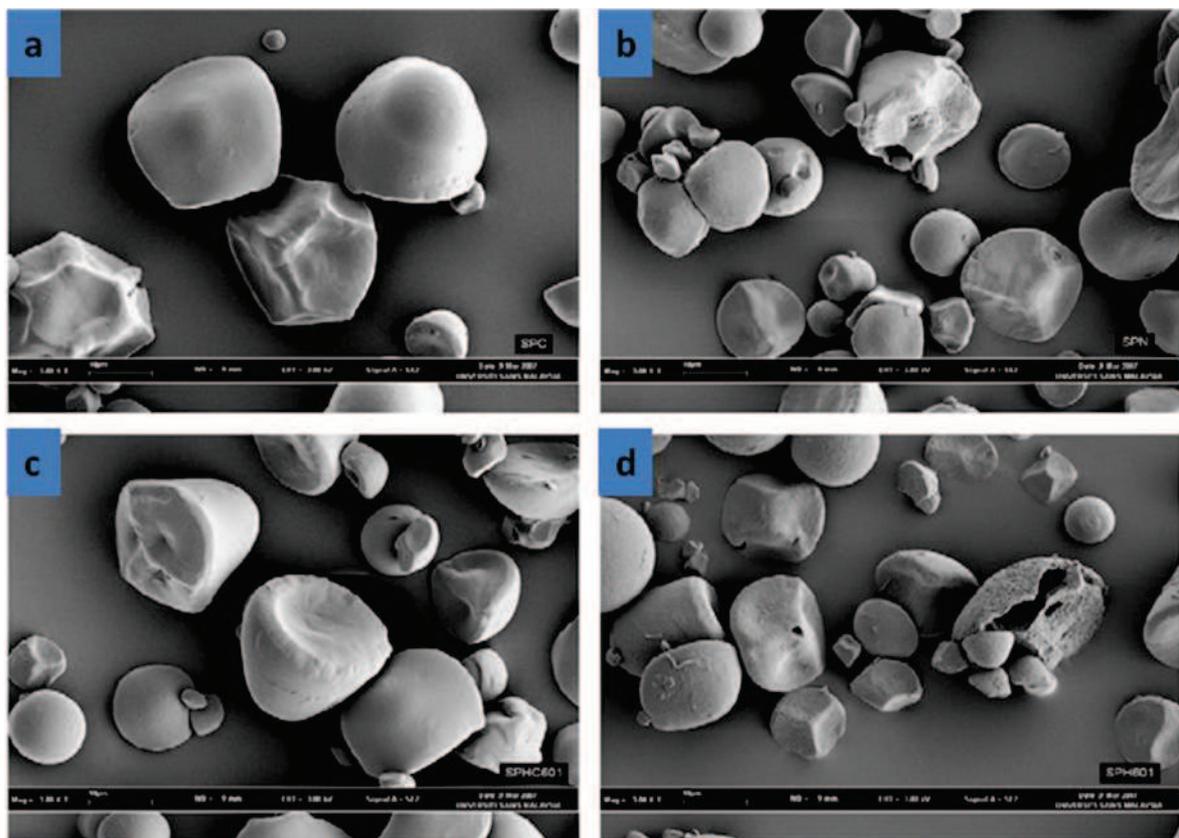
Algunos investigadores demostraron que el proceso de hidrólisis puede mejorarse mediante la realización de un solo paso, porque existe una acción sinérgica entre las dos enzimas ( $\alpha$ -amilasa y AMG), cuando se trabaja con sistemas mixtos enzimáticos en la primera fase de la hidrólisis del almidón, acelerando de esta manera la velocidad de formación del producto final. Sin embargo, después de que el peso molecular del sustrato alcanza un valor cercano a 5000, disminuye la acción sinérgica y la  $\alpha$ -amilasa puede dejarse de lado, dependiendo la velocidad de formación de la glucosa sólo de la glucoamilasa. La acción sinérgica se retrasa no sólo por la disminución del peso molecular del sustrato, sino también por el aumento de la concentración del sustrato (Fujii y Kawamura, 1985; López et al., 2004). Utilizando una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa a 70°C y una relación de enzima: papa deshidratada de 6 U/g<sub>sustrato</sub>, se obtuvo un rendimiento de hidrólisis del almidón de 82 % (Delgrado et al., 2009). Otros investigadores apoyan la existencia del efecto sinérgico entre la amilasa y la amiloglucosidasa mediante un modelo empírico desarrollado para describir la cinética de las enzimas actuando sobre puré de castaña, considerando la desactivación térmica, la inhibición por sustrato y por producto (López et al., 2005).

El almidón proveniente de diferentes cultivos puede tener diferentes proporciones de amilosa/amilopectina. La biodisponibilidad del almidón depende de la estructura del mismo. Esta puede afectar la velocidad de conversión (digestibilidad enzimática) y el rendimiento final de etanol (Moorthy, 2002; Srichuwong et al., 2005). Almidones con altos contenidos en amilosa pueden necesitar altas temperaturas de gelatinización y presentar problemas de resistencia a la acción de la  $\alpha$ -amilasa, utilizada para hidrolizar el material (Wu et al., 2007).

Para poder entender mejor el comportamiento de un sistema particulado (como el caso de una harina de un material amiláceo), se deben realizar un análisis de la granulometría. Las propiedades fisicoquímicas de estos productos dependen del tamaño y de la superficie de las partículas, ya que afectan las fuerzas controladoras y la reactividad del sólido a participar en ciertas reacciones químicas o biológicas (como oxidación de lípidos, reacciones de Maillard y reacciones enzimáticas). Un fenómeno físico importante es el grado de humectabilidad del material, lo que le permite tener un mejor acceso al disolvente (agua) y evitarse la formación de gránulos de almidón en la suspensión acuosa de la harina. Cuando se trata de interacciones entre partículas con un tamaño inferior a los 40  $\mu\text{m}$  y casi secas predominan las fuerzas de interacción electrostáticas y Van der Waals. Sin embargo para un tamaño por encima de las 100  $\mu\text{m}$  predominan las fuerzas gravitatorias (Barbosa-Canovas et al., 2005).

En general, la acción de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas en los gránulos de almidón nativo no es muy eficaz. En los últimos años, se encontró una nueva generación de enzimas, como la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus kawachi* y la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, que actúan de forma sinérgica para hidrolizar almidones granulares, pudiendo hidrolizar directamente el almidón crudo en un solo paso a moderada temperatura muy por debajo de la temperatura de gelatinización (Shariffa et al., 2009).

El calentamiento de almidón en agua provoca la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, debilitando así los gránulos. De esta manera, la enzima puede penetrar y degradar el almidón fácilmente. La temperatura de gelatinización del almidón es superior a los 60°C. El tratamiento de almidón por el calentamiento por debajo de la temperatura de gelatinización (37°C, por ejemplo) a un pH menor resultó en un incremento en la capacidad de la enzima para digerir el almidón granulado durante el tratamiento de hidrólisis (licuefacción). La erosión enzimática se produjo principalmente en la superficie de gránulos de almidón. Sin embargo, este tratamiento no se utiliza debido a que aun está en estudio y al largo tiempo que lleva (24 h). Cualitativamente, la superficie rugosa y los gránulos más erosionados se observaron en el hidrolizado de almidón con tratamiento térmico (Figura 1.5 d) en comparación con el almidón nativo hidrolizado (Fig. 1.5 b), que muestran superficies rugosas con erosión limitada y menos agujeros.



**Figura 1.5.** SEM micrograph (3000x) a) Control nativo de boniato, b) hidrolizado del boniato nativo, c) control tratamiento térmico del boniato, d) hidrolizado con tratamiento térmico del almidón de boniato luego de hidrolizado a temperatura subgelatinización, 35°C, 24 h. (Shariffa et al., 2009).

Durante el tratamiento térmico, los agujeros en los gránulos de almidón expandido hacen a los gránulos de almidón más susceptibles al ataque enzimático. El grado de hidrólisis del almidón se mejoró al realizar el tratamiento previo del almidón con calor suave por debajo de su temperatura de gelatinización antes de ser sometida a la hidrólisis enzimática (Shariffa et al., 2009). Sin embargo, Fajardo (2010) encontró que no

hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de hidrólisis del almidón de boniato alcanzado utilizando enzimas comerciales, si la etapa de licuefacción se realizaba en forma posterior o en forma simultánea a la etapa de gelatinización.

Otro aspecto interesante en el almidón son los enlaces covalentes que puede formar con los grupos fosfatos que le cambian sustancialmente las características de la pasta que se forma al hidratar el almidón. Las enzimas amilolíticas son incapaces de romper los enlaces glucosil fosforilado. Por lo tanto, un mayor contenido de fósforo en el almidón puede reducir la digestibilidad enzimática del almidón gelatinizado así como del almidón crudo. El fósforo en particular, aumenta la viscosidad del material y un incremento en la viscosidad tiende a disminuir la digestibilidad enzimática del almidón (Noda et al., 2008).

## 1.5 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso en el cual microorganismos obtienen energía mediante la transformación de compuestos orgánicos (ej. azúcares). No ocurre una oxidación-reducción neta; los electrones del sustrato se distribuyen entre los productos (Glazer y Nikaido, 2007).

Los microorganismos usados en la industria para la producción de etanol se seleccionan de forma que tengan las siguientes características:

- Habilidad de fermentar un amplio rango de carbohidratos rápidamente
- Producción de altas concentraciones de etanol
- Tolerancia al etanol
- Producción de bajos niveles de sub-productos, tales como ácidos y glicerol
- Alto rendimiento de etanol por unidad de sustrato consumido
- Tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar (osmotolerancia)
- Elevada viabilidad celular (para recirculación celular)
- Tolerancia a bajos pH
- Buenas características de floculación y sedimentación para facilitar la recirculación celular
- Elevada productividad de etanol

Las fermentaciones alcohólicas a escala comercial generalmente son llevadas a cabo por levaduras que transforman azúcares en etanol y  $\text{CO}_2$ . El microorganismo más utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es usada como agente leudante en la panificación y en la producción de bebidas alcohólicas desde aproximadamente 2600 AC (Madigan et al., 1999; Ferreira et al., 2010). Pocas bacterias pueden fermentar azúcares a etanol cumpliendo con las condiciones descritas más arriba. Una bacteria conocida por su alto rendimiento y productividad de etanol es *Zymomonas mobilis*.

*Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar un metabolismo aerobio o anaerobio para la producción de energía. El tipo de metabolismo predominante depende principalmente de la concentración de oxígeno y de glucosa en el medio. Generalmente a altas concentraciones de glucosa predomina el metabolismo fermentativo (represión de la respiración por altas concentraciones de glucosa). Este es el denominado efecto Crabtree. A bajas concentraciones de glucosa, se activa la ruta fermentativa en ausencia de oxígeno (efecto Pasteur) y en presencia de oxígeno la levadura utiliza la ruta metabólica aerobia y no produce etanol.

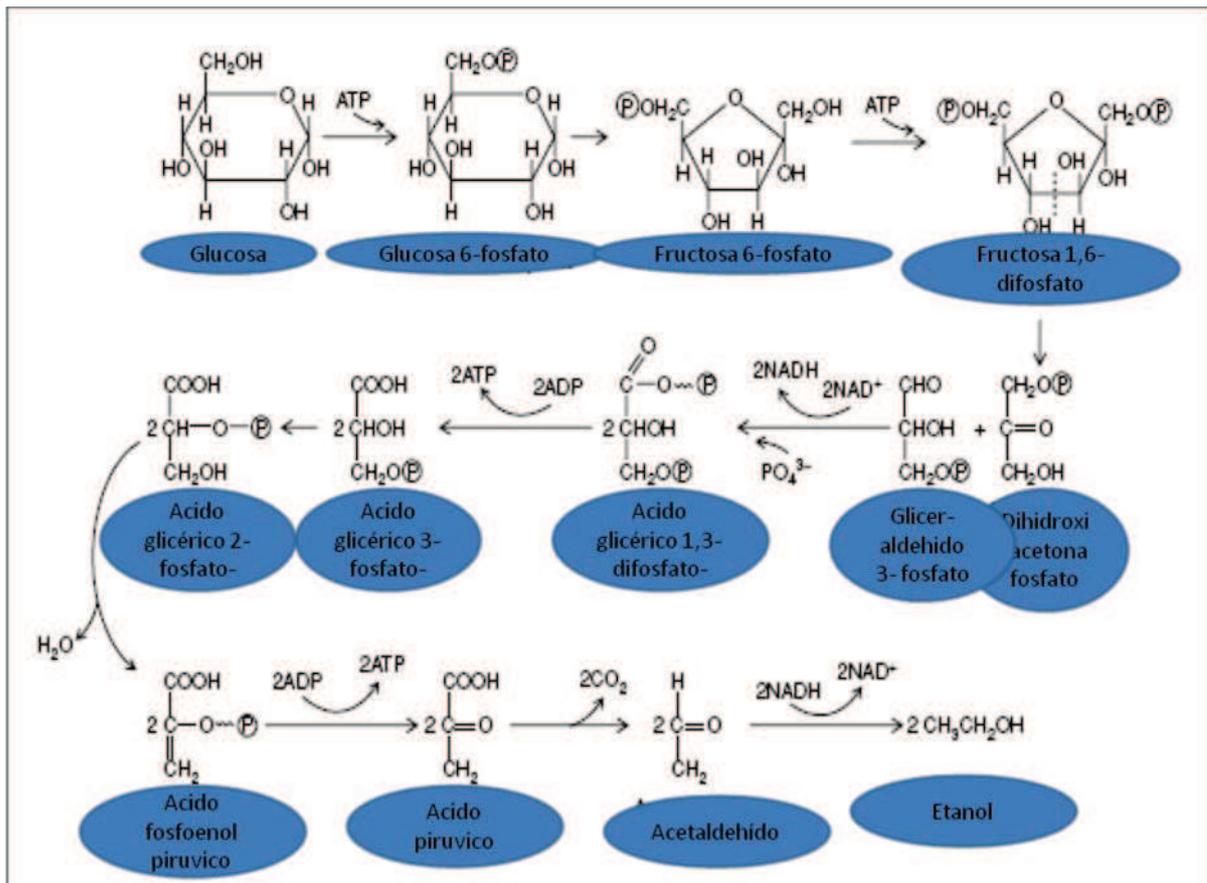
Reacción aeróbica:



Fermentación etanólica:



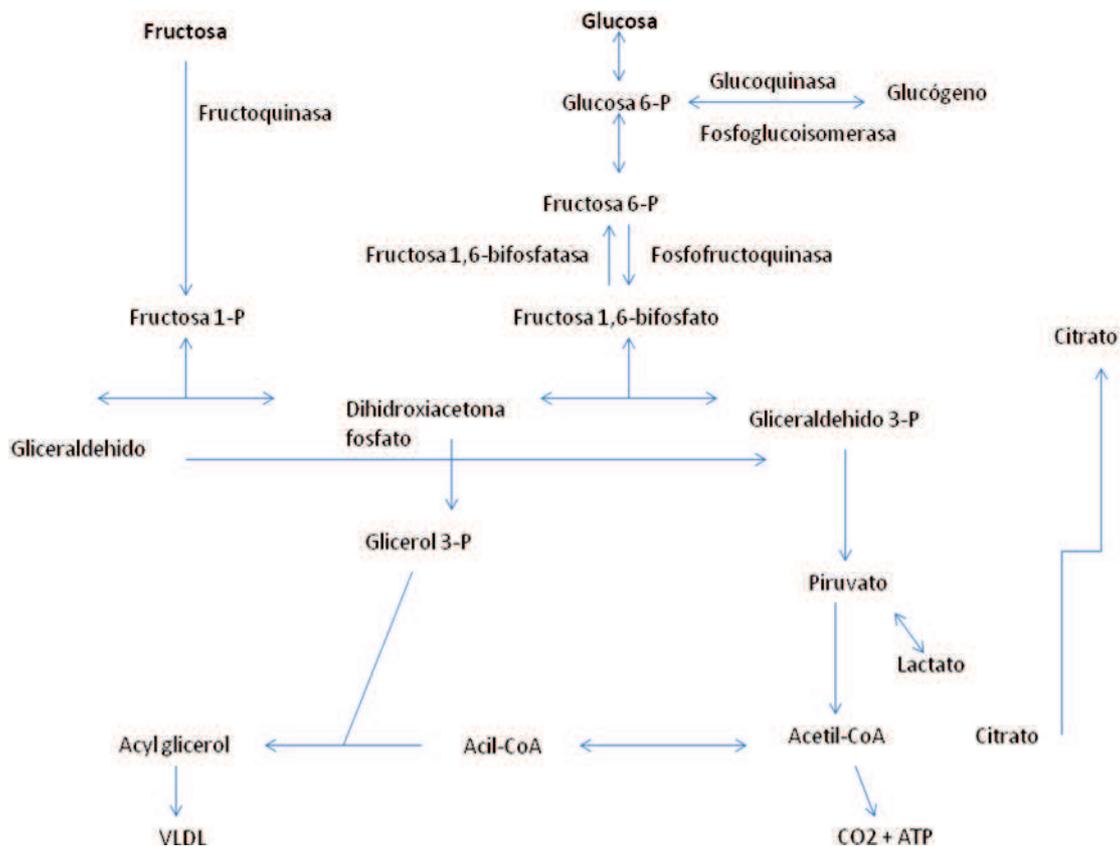
*Saccharomyces cerevisiae* convierte la glucosa por la vía fermentativa a etanol y dióxido de carbono produciendo sólo 2 ATP por mol de glucosa metabolizada (Figura 1.6). En la práctica, obtienen rendimientos de etanol en un 90 - 95 % del rendimiento teórico ( $0.511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ ), ya que parte del sustrato se utiliza para otras funciones celulares. El rendimiento teórico se determina como la relación másica estequiométrica entre el etanol producido y la glucosa consumida. Cada gramo de glucosa teóricamente puede producir 0.51 g de etanol.



**Figura 1.6.** Formación de etanol a partir de glucosa por la vía glucolítica (Embden – Myerhoff) (Glazer et al., 2007).

*Saccharomyces cerevisiae* sintetiza glicerol como un metabolito osmoregulador en respuesta a la elevada presión osmótica debida a elevadas concentraciones de azúcares presentes en el medio (generalmente mayor a 150 - 200 g/L). En general, se produce al inicio de la fermentación, cuando la concentración de azúcares es elevada. En fermentaciones industriales se produce hasta 5 g de glicerol por 100 g de etanol. El glicerol se forma por la reducción de dihidroxiacetona fosfato (intermediario de la glucólisis) en glicerol 1-fosfato, que luego es desfosforilado a glicerol (Figura 1.7) (Klass, 1998; Glazer y Nikaido, 2007).

La pérdida de viabilidad de las levaduras es un problema grave en las fermentaciones con altas concentraciones de azúcar (Limtong et al., 2007; Breisha, 2010). Para mejorar las condiciones fisiológicas de la levadura se ha estudiado la adición de distintas fuentes de nitrógeno, vitaminas e iones metálicos como  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$  al medio de fermentación (Alfenore et al., 2002; Alferone et al., 2003; Kim y Hanh-Vu, 2008). Sin embargo, un exceso de nitrógeno aumenta la producción de ácido acético, etilcarbamato y alcoholes superiores. La suplementación con extracto de levadura junto con tiamina, ayudó a dirigir hacia la vía fermentativa para la producción de etanol y aumentó el número de células viables (Bafrcová et al., 1999; Breisha, 2010).



**Figura 1.7.** Conversión de dihidroxiacetona fosfato a glicerol (Glazer y Nikaido, 2007).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de fermentar otros azúcares además de la glucosa, monosacáridos como fructosa, galactosa y disacáridos como sacarosa y maltosa. La levadura no fermenta el almidón ni la mayoría de los oligosacáridos formados durante la hidrólisis del mismo. Estos compuestos incluyen maltodextrinas más largas que la maltotriosa y la isomaltosa (dímero de glucosa  $\alpha$ -1.6).

El uso de levaduras que sean capaces de fermentar en forma directa el almidón es una alternativa no convencional para el proceso. Esto requiere seleccionar una cepa que además de hidrolizar el almidón, sea capaz de alcanzar altos rendimientos de fermentación. Se han desarrollado cepas de levaduras modificadas genéticamente. Kosugi et al. (2009) desarrollaron una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una glucoamilasa. Esta cepa fermentó pulpa de mandioca directamente a etanol. Toksoy et al. (2005) desarrollaron una cepa de *S. cerevisiae* que tiene el gen de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis* y de glucoamilasa de *Aspergillus awamori*. También se ha insertado el gen de glucoamilasa de *Aspergillus awamori* SG1 en la bacteria *Zymomonas mobilis* (que fermenta azúcares a etanol) para convertir el almidón de boniato directamente al etanol (He et al., 2009).

Cuando se dispone de una mezcla de sustratos su consumo se produce en un orden determinado por los mecanismos de regulación en el ámbito de la expresión génica. La glucosa es el sustrato preferido. Como resultado, estas sustancias se metabolizan en forma secuencial y no simultánea. Di y trisacáridos, una vez interiorizado, son

hidrolizados por la amiloglucosidasa. La fermentación debe ser en un plazo suficiente para permitir la inducción de los sistemas enzimáticos y la plena utilización de los diferentes sustratos (Glazer y Nikaido, 2007).

Si bien la levadura produce etanol para obtener energía, éste es tóxico en concentraciones en el rango 8 % a 18 % en peso, dependiendo de la cepa de levaduras y el estado metabólico del cultivo. A altas concentraciones de etanol se ha observado: inhibición del crecimiento, tamaño celular reducido, menor viabilidad, reducido consumo de glucosa, inactivación enzimática, modificación de los lípidos de membrana, pérdida de la fuerza motriz de protones a través de la membrana, aumento de la permeabilidad de la membrana, entre otros. Algunas levaduras muestran una mayor resistencia que otras a altas concentraciones de etanol. En algunos casos, la estructura de la membrana celular se estabiliza por la presencia de largas cadenas de hidrocarburos en las moléculas lipídicas. En otros casos, alto contenido de esteroides en la membrana, ya que los esteroides disminuyen la permeabilidad de la misma. Muchas levaduras que crecen en presencia de etanol, aumentan el largo de sus cadenas de los ácidos grasos de la membrana. Se necesitan pequeñas cantidades de oxígeno para mejorar la tolerancia al etanol, para la producción de esteroides (ej. ergosterol). El crecimiento bajo condiciones sin oxígeno en presencia de etanol requiere la adición de ácidos grasos de cadena larga, insaturados al medio, tal como el ergosterol (Glazer y Nikaido, 2007; Breisha, 2010; Pereira et al., 2011). También se ha reportado que los iones Mg tienen un efecto positivo sobre la tolerancia del etanol de la levadura (Dombek e Ingram, 1986).

Pereira et al. (2011) obtuvieron concentraciones elevadas de etanol (> 19 % (v/v)) con una cepa industrial aislada y se observó que ésta acumuló más esteroides, glucógeno y de trehalosa, que una cepa de laboratorio. Estos compuestos, así como también glicerol, pueden constituir mecanismos de adaptación al medio. Trehalosa y glucógeno constituye una fuente de carbono y de reservas de energía de la levadura. Por otra parte, la acumulación intracelular de glicerol se sabe que juegan un papel esencial para contrarrestar el estrés hiperosmótico.

En la actualidad se utilizan cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a escala industrial. Las cepas aisladas de entornos industriales de destilería son una fuente notable de cepas de levadura robustas para los procesos de fermentación (Pereira et al., 2010). En los últimos 15 años, Brasil ha llevado a cabo un programa de selección de la levadura industriales dirigido a la selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* adecuadas para la fermentación de la caña de azúcar (Basso et al., 2008).

La concentración de células típicas al final de una fermentación es del orden de sólo 5 a 10 g/L. Experimentos realizados en reactores continuos han obtenido hasta 120 g/L y se observaron aumentos en la productividad total de etanol. Con densidades celulares mayores, se tiene una máxima densidad de empaquetamiento de 200 g/L, limitaciones de transporte e inhibición de celulares (Maiorella et al., 1981).

Investigadores encontraron que un aumento en el volumen del inóculo de levadura del 3 % ( $\sim 3 \times 10^8$  células/mL) al 6 % mostró efectos positivos sobre la fermentación de un

medio sintético conteniendo 25 % sacarosa y en la reducción del tiempo de fermentación de 72 horas (3 %) a 48 h (6 %) (Breisha, 2010).

Una estrategia que se utiliza en el proceso industrial, es la recirculación de la biomasa con el fin de imponer una presión selectiva sobre la población de levaduras indígenas y que se seleccionen las cepas de *S. cerevisiae* en fermentaciones sucesivas con altos rendimientos de etanol (Basso et al., 2008). Una vez terminada la fermentación, se separan las levaduras y se lavan con soluciones ácidas con el fin de remover bacterias contaminantes. Las células son reutilizadas un número finito de veces. Este proceso genera un estrés en las levaduras que las debilita, pudiendo llegar a perder su viabilidad, comprometiendo la productividad de la fermentación (Gibson et al., 2007). Esta práctica se puede utilizar siempre y cuando se pueda separar la levadura del medio de fermentación. En el caso de medios con alto contenido de sólidos esto no es posible.

Las levaduras crecen bien en valores de pH en el rango de 4 a 6. Por otro lado, el trabajar con pH por debajo de 5.0 ayuda a controlar la contaminación bacteriana. Un contaminante frecuente de las fermentaciones alcohólicas es el *Lactobacillus*. Estas bacterias fermentan glucosa para producir ácido láctico.

## 1.6 Fermentaciones con alto contenido de sólidos/azúcares (VHG)

Es importante agregar la menor cantidad posible de agua al proceso de producción de etanol, ya que luego hay que removerla para separar el producto al final del proceso. La destilación es una de las etapas de mayor consumo de energía y el mismo aumenta cuando mayor es la cantidad de agua a eliminar, esto es cuando menor es la concentración final de etanol alcanzada en la fermentación. Se pueden obtener altas concentraciones de etanol si el medio de fermentación tiene un alto contenido de azúcares fermentables, y por lo tanto, alto contenido de sólidos. En la bibliografía internacional, este tipo de medio se denomina VHG (en inglés: very high gravity). En general, tienen concentraciones mayores a 270 g/L de azúcares iniciales.

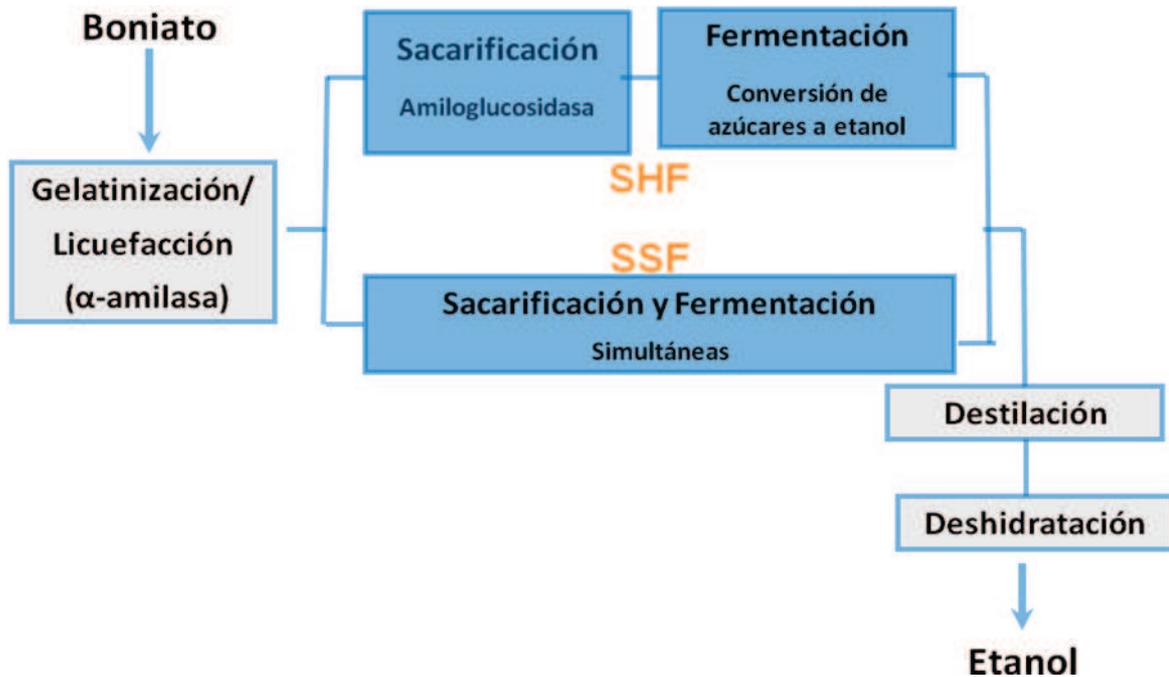
Este tipo de tecnología (VHG) ha sido utilizada en fermentaciones de cereales; sin embargo, su aplicación es poco conocida en tubérculos. Para lograr altas concentraciones de azúcares, se debe agregar una mínima cantidad de agua a la materia prima para preparar la suspensión previa a la hidrólisis del almidón. El medio así preparado usando raíces o tubérculos como materia prima, tiene generalmente elevada viscosidad. Estas propiedades del medio producen grandes dificultades en el manejo durante el proceso, y puede llevar a una hidrólisis incompleta del almidón a azúcares fermentables (Zhang et al., 2010) e incluso una fermentación incompleta, ya que las levaduras son expuestas a condiciones de estrés debida a la alta presión osmótica producida por la elevada concentración de sólidos disueltos. Por otro lado, las altas concentraciones de etanol alcanzadas pueden llegar a ser tóxicas para las levaduras, tal como se discutió en la sección 1.5 (Bafrcová et al., 1999; Srichuwong, 2009; Shen et al., 2011; Breisha, 2010; Zhang et al., 2010; Pereira et al., 2010, Zhang et al., 2011).

## 1.7 Modalidad de fermentación

Existen diferentes tipos de modalidades de fermentación que se utilizan en los procesos de producción de etanol. Las formas más conocidas son: discontinuo (por lotes, tachadas, batch), lote alimentado (fed-batch), y continuo. La modalidad más simple es la discontinua, donde se carga inicialmente todo el medio de cultivo y se inocula. En el modo fed-batch, se carga medio de cultivo y nutrientes en forma continua o intermitente (por incrementos) durante la fermentación; el volumen de líquido varía durante la fermentación. En la modalidad continua se carga el medio de cultivo y nutrientes en forma continua y se retira en forma continua. La modalidad utilizada depende de la materia prima a partir de la cual se obtiene el bioetanol (si requiere pretratamiento o no antes de la fermentación, propiedades del material), controles que se requiera hacer para satisfacer los diversos requerimientos del proceso, mantenimiento de los equipos entre otros (Maiorella, 1981). El proceso fed-batch es muy utilizado para la producción de etanol ya que ayuda a disminuir el estrés osmótico al que se ven sometidas las levaduras cuando se parte de altas concentraciones de azúcares. Durante este proceso, se va adicionando medio concentrado al fermentador en forma gradual, y al final se obtienen altas concentraciones de etanol. Este tipo de modalidad de fermentación es difícil de implementar con materias primas muy viscosas, ya que es muy complicada la homogenización del cultivo luego de cada agregado de medio y la manipulación/manejo del material, sobre todo a escala industrial.

## 1.8 Integración de las etapas de sacarificación y fermentación

La integración de varias operaciones en un mismo equipo permite mejorar el desempeño global del proceso y compactar la situación edilicia de la planta. En el caso de procesos de materiales amiláceos, la etapa de sacarificación se puede realizar antes de la fermentación (SHF) o en forma simultánea (SSF) como muestra la Figuras 1.8.



**Figura 1.8.** Proceso de producción de etanol a partir de un material amiláceo con hidrólisis previa (SHF) y con sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

Cuando el proceso es SHF, el sustrato amiláceo es expuesto a altas temperatura con  $\alpha$ -amilasas (etapa de licuefacción), donde se obtiene una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos de glucosa. Se realiza la etapa de sacarificación, llevando la mezcla a (60 - 70) °C, con agitación constante en presencia de AMG, hasta que se complete la hidrólisis del almidón a glucosa (Klass, 1998). La mezcla luego se enfría a (30 - 32) °C y se transfiere a los fermentadores donde se añade la levadura para comenzar la fermentación.

En la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) se integra la etapa de sacarificación con el proceso fermentativo. La ventaja de este proceso es el rápido consumo de la glucosa a medida que aparece disponible en el medio de fermentación, no permitiendo que se acumulen grandes cantidades que puedan resultarle inhibitorias a la levadura y a la enzima (generalmente presentan inhibición por producto (Uribelarra et al., 1999; Berson et al., 2006; Chaabane et al., 2006; Shen et al., 2011, Zhang et al., 2011). El proceso se realiza en condiciones óptimas para la fermentación pero no para la acción de la AMG. Este tipo de tecnología ha dado buenos resultados en fermentaciones de trigo (Montesinos y Navarro, 2000), grano de maíz (Bothast y Schlicher, 2005), papa (Srichuwong et al., 2009), y boniato (Shen et al., 2011).

La utilización del sistema SSF puede también reducir las inversiones de capital de las instalaciones para el proceso de producción de bioetanol, ya que el proceso utiliza un reactor menos que en el caso del modo SHF, y se ahorra tiempo y energía, ya que no se realiza la etapa de calentamiento del medio a 60°C (Zhang et al., 2011).

## 1.9 Proceso de separación del etanol

La separación y recuperación del etanol para las diferentes materias primas es prácticamente la misma, lo que facilita la utilización de diferentes sustratos en la fermentación en la planta industrial de acuerdo a su disponibilidad en el mercado, ya que la mayoría de los cultivos son zafrales.

La concentración de alcohol en los caldos de cultivos resultantes de los procesos de fermentación oscila entre 2.5 y 10 % (m/m). El etanol anhidro (de calidad superior al 99 % (v/v)), se obtiene por destilación y deshidratación. Se requiere de etanol deshidratado cuando se utiliza el alcohol como aditivo en la gasolina, ya que en presencia de agua, la combustión del etanol puede traer fallas en el motor (Wyman, 1994; Sánchez y Cardona, 2005).

Para obtener la calidad de etanol anhidro, se debe someter al mosto fermentado a dos etapas de destilación. En la primera destilación se obtiene alrededor del 55 % (v/v) de etanol en la parte superior, y en el fondo la vinaza. En la segunda destilación se obtiene una mezcla etanol-agua del (95 - 96) % (v/v) en etanol, que corresponde al azeótropo.

La vinaza contiene residuos de la materia prima utilizada y levadura. En una destilería la vinaza puede producirse en una relación de 20 L por litro de etanol obtenido. Es un material con alta carga orgánica pero rico en nutrientes como magnesio, calcio, potasio, entre otros. Una manera de disponerlo puede ser como riego de suelos, alimento para animales o aplicarle un tratamiento a este efluente antes de realizar su disposición. En el caso de producción de etanol a partir de granos, la vinaza puede ser procesada y vendida como subproducto con alto contenido de proteínas (DDG).

La operación unitaria más utilizada para la última etapa de deshidratación del etanol es la adsorción. Las plantas modernas de etanol anhidro utilizan un sistema de tamiz molecular (Bothast y Schlicher, 2005; Kwiatkowski et al., 2006; Kumar et. al., 2011; Dias et al., 2011). Los tamices moleculares son materiales granulares rígidos de formas esféricas o cilíndricas elaborados a partir de aluminosilicatos de potasio. La molécula de agua tiene un tamaño menor al de los caminos intersticiales de los tamices, mientras que el etanol no. De esta manera el agua se adsorbe en la superficie interna de los tamices, separando la mezcla etanol-agua que resulta de la destilación convencional (Sánchez y Cardona, 2005). También se puede realizar otra destilación azeotrópica, utilizando como agente azeotrópico otros compuestos como benceno, ciclohexano, heptano, o la gasolina. Estos agentes eliminan el agua restante en un azeótropo ternario que contiene un poco de alcohol, el agente, y el agua. Dietil éter se utiliza también como un agente azeotrópico para eliminar el agua en un azeótropo binario (Klass, 1998).

## 1.10 Simulación de procesos

Los simuladores de procesos son herramientas de software que representan y analizan procesos industriales integrados. Permiten minimizar tiempos, costos y

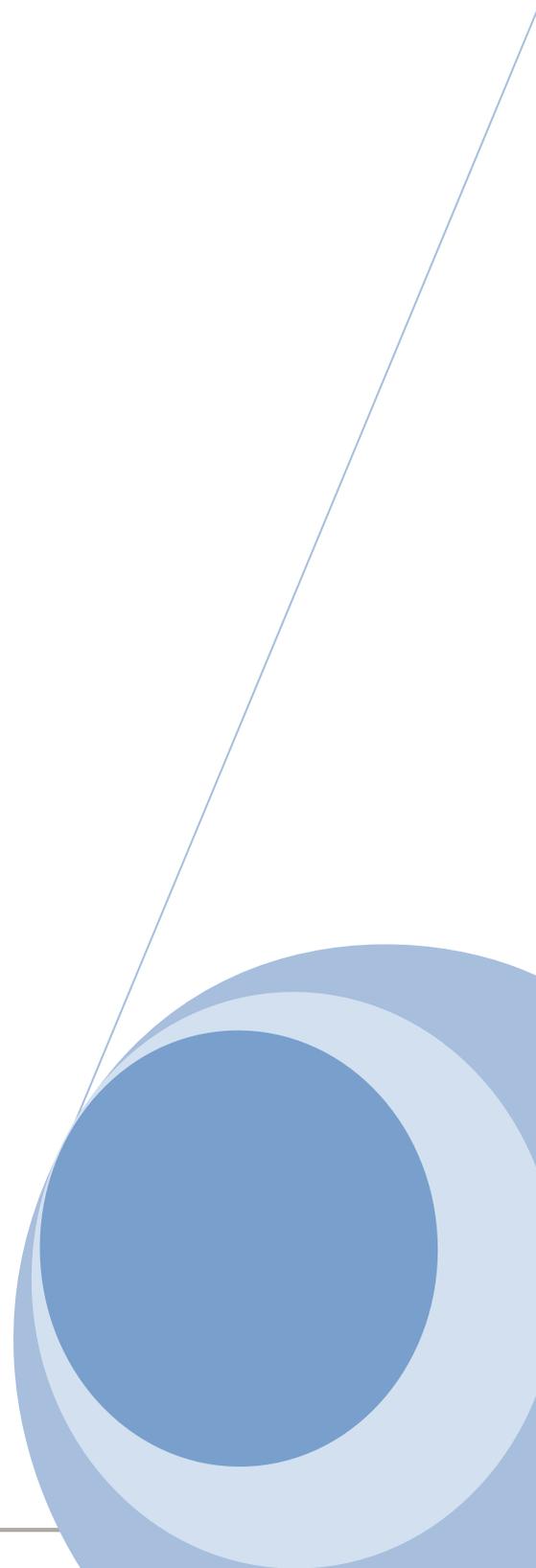
experimentación en el diseño de bioprocesos (Cardona et al., 2005), y generan información muy valiosa que puede ser utilizada en la toma de decisiones para conseguir la optimización del proceso. Este tipo de programas permiten estudiar distintas configuraciones del proceso desde el punto de vista del consumo energético, realizar una evaluación económica, y evaluar los impactos ambientales. Han sido utilizados en la industria petroquímica desde el comienzo de la década del 60. Dentro de los distintos programas que se encuentran en el mercado se incluyen: SuperPro Designer® (Intelligen Inc.) y Aspen Plus® (Aspen Technology Inc.) (Demetri, 2003; Bassetto y Andrietta, 2004; Cardona et al., 2005; Kwiatkowski et al., 2006; Tasić y Velijković, 2010; Dias et al., 2011; Kumar et al., 2011; Lin et al., 2011)

La integración energética de las distintas etapas del proceso de obtención de etanol busca la mejor utilización de los flujos de energía generados y consumidos en forma ya sea de calor, energía eléctrica o mecánica. De esta manera se busca minimizar el consumo de fuentes externas de energía en el proceso, como por ejemplo, energía eléctrica, consumo de combustibles para la generación de vapor, agua de enfriamiento. La integración térmica de procesos se ha perfilado como una de las directrices de la integración de procesos que más puede aportar en la síntesis de esquemas tecnológicos (Ríos et al., 2004).

Se han realizado varios trabajos de simulación del proceso completo de producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas, como caña de azúcar (Cardona et al., 2005; Dias et al., 2011), maíz (McAloon et al., 2000; Taylor et al., 2000; Bothast y Schlicher, 2005; Kwiatkowski et al., 2006; Lin et al., 2011), papa (Tasić y Velijković, 2010) y material lignocelulósico (Cardona et al., 2005; Dias et al., 2011; Kumar et al., 2011). En la bibliografía internacional no se han encontrado trabajos de simulación del proceso de producción de etanol a partir de boniato.

## **CAPÍTULO II:**

# **OBJETIVOS**



## **2 OBJETIVOS**

Este trabajo está enmarcado dentro de un objetivo general de promover la producción de bioetanol combustible a partir de materias primas nacionales no tradicionales como por ejemplo el boniato.

### **2.1 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar experimentalmente las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación de boniato para la producción de bioetanol.
2. Estudiar el uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso de producción de etanol a partir de boniato utilizando un modelo de simulación a través de un software específico.

## **Parte 1:**

**Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato**

### **CAPÍTULO III:**

**Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Caracterización físico química del boniato

##### 3.1.1 Materia prima

Se trabajó con una variedad de boniato (*Ipomea batatas* K 9807.1), la cual fue seleccionada y suministrada por el INIA-Las Brujas, Canelones, para su uso en la producción de bioetanol en base al contenido de materia seca por hectárea. En la Figura 3.1 se muestra una fotografía del boniato utilizado en este trabajo.



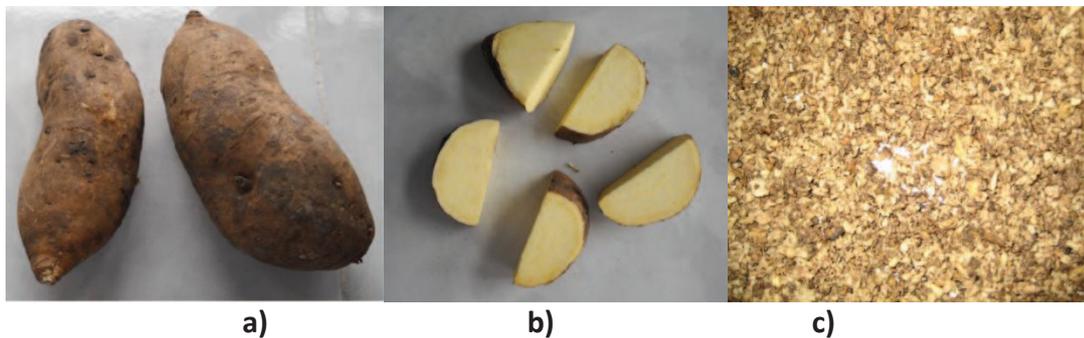
**Figura 3.1.** Boniato *Ipomea batatas* K 9807.1.

La materia prima se utilizó en dos formas, como boniato fresco y como harina de boniato (Figura 3.2). El boniato fresco se conservó a temperatura ambiente en bolsas de malla que permitían tener el material aireado y la harina de boniato en cámara de frío a 4°C, en recipientes de polipropileno.



**Figura 3.2.** Boniato K 9807.1: a) fresco y lavado, b) en forma de harina.

En el caso de boniato fresco, se realizó un pre-tratamiento físico de la muestra. El boniato se limpió mediante un cepillado para retirar el polvo y tierra de la superficie. Se cortó en trozos pequeños con una cuchilla y luego se trituró con una procesadora de alimentos. El boniato triturado tenía una consistencia pastosa (Figura 3.3 y 3.4). Para que la muestra fuese lo más representativa posible del lote de boniatos, se eligieron varios boniatos con diferentes características de tamaño, formas y ubicación dentro de la bolsa que los contenía.



**Figura 3.3.** Procesamiento del boniato fresco: a) lavado, b) cortado y c) triturado.



**Figura 3.4.** Resultado de distintas etapas del procesamiento del boniato fresco.

La harina de boniato fue preparada por el INIA-Las Brujas, Canelones. Para obtener la harina se chipeó el boniato y se secó a 55°C en estufa.

### **3.1.2 Determinación de la distribución del tamaño de partícula de la harina**

La distribución del tamaño de partículas de la harina de boniato se obtuvo mediante la técnica de tamizado. Se determinó el porcentaje de paso de los diferentes tamaños (fino) de la harina y se construyó una curva granulométrica. El análisis se hizo por duplicado. Para ello se utilizó una serie de tamices con distinto tamaño de apertura: 595  $\mu\text{m}$ , 177  $\mu\text{m}$ , 149  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$ , 74  $\mu\text{m}$ , y 44  $\mu\text{m}$ , correspondientes a los números de Mesh N° 30, N° 80, N° 100, N° 140, N° 200, y N° 325.

Una muestra representativa del material previamente pesada (~ 100 g) se hizo pasar por una serie de tamices de distinta porosidad estandarizados. Los tamices se colocaron en forma consecutiva, en orden decreciente de tamaño de orificios (595 a 44  $\mu\text{m}$ ), localizándose en la parte superior el tamiz con mayor abertura. Los tamices se colocaron sobre un agitador de tamices para laboratorio (Ro-tap, Testing sieve shaker, WS Tyler Company) durante media hora.

Se pesó el material retenido en cada tamiz para determinar qué fracción de la muestra tenía un tamaño de partícula mayor a la apertura del tamiz utilizado. De esta manera se determinó la distribución de tamaños de partículas de la harina.

### **3.1.3 Determinación de la humedad**

Se determinó la humedad por secado de la muestra en estufa a  $(60 \pm 1)$  °C hasta peso constante. Por más detalle ver ANEXO 1. Se decidió trabajar a esa temperatura para asegurar que la disminución de masa fuera solo debido a la pérdida de agua y no debido a la degradación del material, como por ejemplo degradación parcial de los azúcares. Se trató de evitar posibles reacciones de Maillard y oxidaciones del material. Se realizaron entre 4 y 8 réplicas de los ensayos.

### **3.1.4 Determinación de cenizas**

El contenido de cenizas se determinó según la técnica de NREL (Sluiter et al., 2008), mediante calcinación en mufla a  $(550 \pm 25)$  °C hasta peso constante. Los ensayos se realizaron por triplicado. Por mayores detalles ver ANEXO 2.

### 3.1.5 Determinación de proteínas, lípidos y fibras

Las proteínas se determinaron por Kjeldahl siguiendo la técnica de AOAC 984.13, 16ª edición, 1995. Los lípidos analizados como grasas y aceites se hallaron por el método de Soxhlet (AOAC 948.16, 16ª edición, 1995) y las fibras por el método de AOAC 962.09, 16ª edición, 1995. Estos análisis fueron realizados por técnicos del laboratorio de Dexin Grupo Químico. Por el método Kjeldahl se determinó el nitrógeno total de la muestra y se utilizó un coeficiente de 6.25 para obtener el contenido de proteínas.

### 3.1.6 Determinación de azúcares libres

El contenido de azúcares libres se determinó suspendiendo 1 g de boniato en base seca (en forma de harina o fresco) en 40 mL de etanol al 80 % (amilosa y amilopectina son insolubles en etanol 80 %), en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El matraz se agitó durante media hora a temperatura ambiente en un agitador orbital a 100 rpm (New Brunswick Scientific Co. Inc.). Una vez finalizado el tiempo, la solución fue centrifugada durante 5 min a 4000 rpm (2683 g). El sobrenadante se separó y la muestra se lavó con agua destilada. Se juntaron las soluciones de lavado y el líquido centrifugado en un matraz aforado de 100 mL, completando con agua calidad milliQ hasta el aforo. Se determinó la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa de la solución por cromatografía (HPLC) (Sección 3.1.8).

Para determinar la concentración de sacarosa y maltosa cuando sólo se disponía de la columna del equipo de cromatografía (HPLC), Shodex KS-801 (no separa sacarosa de maltosa), se realizó la hidrólisis ácida de estos compuestos y se determinó su concentración por diferencia de las concentraciones de glucosa y fructosa iniciales y finales de la muestra. La hidrólisis de una molécula de sacarosa da como resultado una molécula de glucosa y una de fructosa, y la maltosa dos moléculas de glucosa. Se tomaron 50 mL de la solución anterior y se agregó 5 mL de HCl concentrado. Se colocó en un baño de agua a 70°C por 5 min. Luego se agregó NaOH 6 M hasta neutralizar la solución. Se determinó el contenido de glucosa y fructosa utilizando la técnica de HPLC. Se calculó la sacarosa libre como la diferencia entre la fructosa total de la muestra hidrolizada y sin hidrolizar. La maltosa se determinó por la diferencia entre la glucosa total luego del hidrolizado y la suma entre la glucosa antes de hidrolizar la muestra más la obtenida por la hidrólisis de la sacarosa.

El porcentaje de sacarosa y maltosa en la muestra de boniato en base seca se calcularon como:

$$Sacarosa_{bs} (\%) = \left( [C_{Ff} (g/L) - C_{Fi} (g/L)] \cdot 0.1 (L) \frac{PM_{sacarosa}}{PM_{fructosa}} \frac{1}{Masa_{muestra} (g)} \right) \times 100$$

$$Maltosa_{bs} (\%) = \left( \frac{(C_{Gf} (g/L) - [C_{Gi} (g/L) + C_{G\text{ sacarosa}} (g/L)]) PM_{maltosa}}{Masa_{muestra} (g) PM_{glucosa}} V(L) \right) \times 100$$

siendo:

- $C_{Ff}$  = concentración de fructosa luego de la hidrólisis (g/L);
- $C_{Fi}$  = concentración de fructosa antes de hidrolizar (g/L);
- $PM_{sacarosa}$  = peso molecular de sacarosa (342.29 g/mol);
- $PM_{fructosa}$  = peso molecular de la fructosa (180.15 g/mol);
- $PM_{maltosa}$  = peso molecular de la maltosa (180.15 g/mol);
- $C_{Gf}$  = concentración de glucosa luego de la hidrólisis (g/L);
- $C_{Gi}$  = concentración de glucosa antes de hidrolizar (g/L);
- $V$  = volumen de la solución analizada (L);
- $Masa_{muestra}$  = masa inicial de la muestra seca (g);
- $C_{G\text{ sacarosa}}$  = concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa (g/L).

La concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa se determinó como:

$$C_{G\text{ sacarosa}} (g/L) = [C_{Ff} (g/L) - C_{Fi} (g/L)] \left( \frac{PM_{glucosa}}{PM_{fructosa}} \right)$$

Se realizaron múltiples réplicas de los ensayos (4 a 9), dada la complejidad de la muestra del boniato fresco. La cuantificación de los azúcares requirió de una curva de calibración con 5 puntos como mínimo conteniendo los 4 patrones de azúcares calidad puro para análisis. Se determinó el rango de linealidad de las concentraciones de cada uno de los azúcares. En el ANEXO 3 se muestran las curvas de los patrones obtenidas.

### 3.1.7 Determinación del almidón

El contenido de almidón del boniato se determinó por la técnica de NREL (Sluiter y Sluiter, 2005) modificado. Este se basa en la hidrólisis enzimática del almidón, utilizando dos enzimas:  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa (AMG). El contenido de almidón se determinó por diferencia entre la concentración de glucosa final alcanzada luego de la hidrólisis y la glucosa inicial (antes de la hidrólisis). La técnica original se modificó para trabajar en las condiciones de temperatura y pH óptimas de enzimas comerciales que se utilizaron en este trabajo ( $\alpha$ -amilasa (Liquozyme® SC) y amiloglucosidasa (AMG, Spirizyme® Fuel), Novozymes, Brasil). Los buffers necesarios para la técnica (MOPS y tampón de acetato de sodio) se prepararon según se detalla en el ANEXO 4.

Se colocó el equivalente de muestra a 100 mg de material seco en un tubo de centrífuga. Se agregaron 0.2 mL de etanol 95 % y se agitó vigorosamente en vortex. Inmediatamente se añadió 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Mallinckrodt Chemicals). Los tubos se taparon y se colocaron por 5 min en un baño de agua hirviendo. Inmediatamente se agregaron 2.9 mL del buffer MOPS y 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa. Se agitaron

los tubos en vortex y se incubaron en un baño a 86°C durante 90 min. Se enfriaron a 60°C. Se agregó 4 mL de buffer acetato de sodio y 10 µL de AMG. Los tubos se mantuvieron un baño a 60°C por 30 min. Mientras las muestras se encontraban en los baños de agua, se mezclaron fuertemente cada 5 min en vortex, para mantener la homogeneidad de las mismas. Finalmente, las muestras se centrifugaron por 8 min a 4500 rpm (3396 g) y se determinó el contenido de glucosa en el sobrenadante utilizando un cromatógrafo (HPLC).

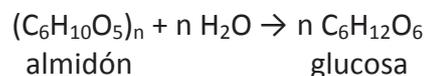
Las muestras se analizaron por triplicado. Se realizó un duplicado del patrón de almidón de papa (Sigma) como referencia para estimar el porcentaje de recuperación de esta técnica. Como blanco, se utilizó agua destilada. También se realizó el análisis de una muestra a la que no se le agregó enzimas, para determinar el contenido de glucosa libre (que no provenía de la hidrólisis del almidón). Asimismo, se confirmó que los extractos enzimáticos utilizados no contenían azúcares libres y que no aportaban glucosa a la muestra, mediante el análisis de los mismos utilizando la técnica de HPLC.

El contenido de almidón se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Almidón (\%)} = \left( \frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \left( \frac{V_{\text{solucion}}}{\text{Masa}_{\text{muestra}}} \right)}{1.11 \times \left( \frac{R}{100} \right)} \right) \times 100$$

siendo:  $C_{\text{HPLC}}$  = concentración de glucosa de la muestra proveniente de la hidrólisis de la glucosa (concentración de glucosa final luego de la hidrólisis enzimática – concentración de glucosa sin agregado de enzimas) (g/L);  
 $V_{\text{solución}}$  = volumen de la solución ( $9.3 \times 10^{-3}$  L);  
 $\text{Masa}_{\text{muestra}}$  = masa de la muestra seca (g);  
 $R$  = porcentaje de recuperación.

El factor 1.11 corresponde a los gramos de glucosa que pueden ser obtenidos a partir de 1 g de almidón ( $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ ) según la estequiometría de la reacción:



El porcentaje de recuperación se determinó como:

$$R(\%) = \left( \frac{C_{\text{HPLC, patrón}} \cdot V_{\text{solucion}}}{1.11 \times \text{Masa}_{\text{patrón}}} \right) \times 100$$

siendo:  $C_{\text{HPLC, patrón}}$  = concentración de glucosa del patrón (g/L);  
 $V_{\text{solución}}$  = volumen de la solución ( $9.3 \times 10^{-3}$  L);  
 $\text{Masa}_{\text{patrón}}$  = masa del patrón (g).

Se realizaron entre 5 y 10 réplicas del ensayo para determinar almidón. Se informó el valor promedio de las mismas.

### 3.1.8 Cuantificación del contenido de azúcares

La concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, y maltosa en los ensayos de caracterización de boniato, así como también para los ensayos de hidrólisis y fermentación, se determinó utilizando un equipo de cromatografía de HPLC (Shimadzu) con un detector de índice de refracción (RID-10A). El mismo equipo se utilizó para la determinación de etanol y glicerol.

Las muestras antes de ser inyectadas en el cromatógrafo (HPLC) recibieron el siguiente tratamiento. Se precipitaron las proteínas con ácido sulfosalísílico al 20 %. Luego se centrifugaron y se filtraron, utilizando filtros Millipore de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Se utilizaron las siguientes columnas con sus respectivas pre-columnas: columna Shodex SUGAR KS-801 con la pre-columna Shodex KS-G y Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide con la precolumna Carbo-Pb, AJO-4492. Con ambas columnas se utilizó como fase móvil agua milliQ y se inyectó 20  $\mu\text{L}$  de muestra. Con la pre-columna y la columna Shodex se trabajó con un flujo de la fase móvil de 0.7 mL/min, temperatura del horno de 55°C y un tiempo total de corrida de 20 min. Esta columna permitió cuantificar el contenido de glucosa, fructosa, etanol y glicerol. La columna Shodex no permite separar sacarosa de maltosa. Para la determinación del contenido de sacarosa y maltosa, se utilizaron la pre-columna Carbo-Pb, AJO-4492 y la columna Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide. Esta columna también permitió cuantificar fructosa, glucosa y etanol. Las condiciones de trabajo de esta columna fueron: flujo de la fase móvil 0.3 mL/min, temperatura del horno de 70°C y un tiempo total de corrida de 60 min. En el ANEXO 4 se muestran curvas de calibración típicas.

## 3.2 Ensayos de licuefacción, sacarificación y fermentación de boniato

### 3.2.1 Enzimas utilizadas

En la hidrólisis del almidón se utilizaron enzimas comerciales,  $\alpha$ -amilasa (Liquozyme® SC) y amiloglucosidasa (AMG, Spirizyme® Fuel), donadas por Novozymes, Brasil.

### 3.2.2 Microorganismo

Se utilizó levadura seca de panadería comercial, *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann).

### 3.2.3 Recuento de microorganismos

El recuento de microorganismo se hizo por observación directa al microscopio en cámara de Neubauer. La muestra se filtró sobre gasa para retener parte de los sólidos suspendidos en el medio y facilitar la observación en el microscopio. Se lavó la gasa con parte del agua estéril con la cual se preparó la dilución de la muestra para arrastrar las levaduras que pudieron quedar retenidas en ella. Se incorporó a la dilución un volumen conocido de una solución acuosa de azul de metileno complementada con sales y glucosa para poder distinguir las levaduras vivas de las muertas. Las células vivas permanecen incoloras y las levaduras muertas se tiñen de color azul. Durante el recuento se puede observar además el estado de la levadura (tamaño, forma, gemación) y ausencia o presencia de posibles contaminaciones bacterianas.

La fracción de células viables en el medio de fermentación se determinó como:

$$Fraccionviables = \frac{C_{bv}}{C_{bT}}$$

siendo:  $C_{bv}$  = concentración de biomasa viable (células/mL);  
 $C_{bT}$  = concentración de biomasa total (células/mL) =  $C_{bv} + C_{bm}$ .

### 3.2.4 Desarrollo del inóculo

El inóculo se desarrolló en una única etapa en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con tapón de algodón o de polifón, para los ensayos a escala de matraces y de reactor de laboratorio.

#### 3.2.4.1 Desarrollo del inóculo para fermentaciones en matraces

El desarrollo del inóculo a escala de matraces se trabajó con un contenido de materia seca de boniato a agua de 1:10. En el caso de fermentaciones con harina de boniato, para la preparación del inóculo la levadura se cultivó en un medio conteniendo 30 g de harina de boniato en 300 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se suplementó con:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.24 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g/L (Lareo et al., 2011). Cuando se trabajó con boniato fresco se adicionaron 102 g de boniato triturado con aproximadamente 200 mL de agua destilada y las mismas sales utilizadas para la harina (en las mismas concentraciones).

En ambos casos el pH se ajustó a (5.7-6.0) y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca). Se mantuvo la temperatura a 90°C durante 90 min. La suspensión se enfrió a 60°C, el pH se ajustó a 4.0, y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de AMG. Ésta permaneció a 60°C en baño de agua durante 30 min. El medio se pasteurizó a 100°C durante 30 min. Luego de ser enfriada a temperatura ambiente el pH se ajustó a 4.5 y se inoculó con 5 g de levadura seca de panadería en banco de flujo laminar. Una vez inoculados todos los matraces se colocaron en un agitador orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc.) a 150 rpm, 30°C, durante (12-16) h, tiempo suficiente para obtener la biomasa necesaria para iniciar la fermentación.

#### 3.2.4.2 Desarrollo del inóculo para fermentaciones en reactor

A escala de fermentador de laboratorio se trabajó a distintas relaciones de materia seca de boniato a agua total (agua proveniente del boniato + agua agregada al medio). El medio utilizado para el desarrollo del inóculo se preparó con un menor contenido de boniato que el medio de fermentación, para ir adaptando a las levaduras al medio y así disminuir el tiempo de fase lag en la fermentación. Para las fermentaciones que se realizaron con una relación de materia seca a agua de 1:5 y 1:8, el inóculo se desarrolló en un medio con una relación de materia seca a agua de 1:10. Para la fermentación con una relación de materia seca a agua de 1:2.7, el inóculo se desarrolló en un medio de relación de 1:5.4.

El medio con una relación materia seca a agua de 1:10 se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL al cual se agregaron: (i) 102 g de boniato fresco, 200 mL de agua destilada; o (ii) 30 g de harina de boniato en 300 mL de agua destilada. El medio del

inóculo para la fermentación con harina de boniato en relación materia seca a agua, 1:2.7 se preparó con 30 g de harina de boniato, 147 g de agua destilada agregada al medio. Los medios se complementaron con las siguientes sales:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.29 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g/L.

En todos los casos el pH se ajustó a (5.7 - 6.0) y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca). Se mantuvo la temperatura a 90°C durante 90 min. La suspensión se enfrió a 60°C, el pH se ajustó a 4.0, y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de AMG. Ésta permaneció a 60°C durante 30 min. El medio se pasteurizó a 100°C durante 30 min, luego de ser enfriada a temperatura ambiente el pH se ajustó a 4.5 y se inoculó con 5 g de levadura seca de panadería.

Una vez inoculados todos los matraces se colocaron en un shaker orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc.) a 150 rpm, 30°C, durante (12 - 16) h, tiempo suficiente para obtener la concentración celular necesaria para iniciar la fermentación. Al cumplirse el tiempo se hizo un recuento celular en cámara de Neubauer para obtener el volumen del medio a inocular en los matraces o reactor de fermentación, de manera de llegar a una concentración inicial en los mismos de  $1 \times 10^8$  células/mL. Dicho volumen se centrifugó en tubos estériles a 2683 g, 8 min, 5°C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados resuspendiendo la biomasa en 10 mL de agua destilada estéril y centrifugando para retirar los restos del medio de inóculo. Finalmente se resuspendió la biomasa en 10 mL de medio de fermentación y se adicionó a los matraces de fermentación o al reactor según corresponda.

### 3.2.5 Gelatinización y licuefacción del almidón en matraces

En todos los ensayos de licuefacción se utilizó una suspensión de boniato (fresco o en forma de harina) con una relación de materia seca a agua de 1:5 (Figura 3.5).

Se suspendieron 60 g de harina de boniato en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 300 mL de agua destilada. El pH se ajustó a (5.7-6.0) y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca). La suspensión se mantuvo a 90°C en baño de agua durante 90 min bajo agitación. La dosis de  $\alpha$ -amilasa que se utilizó fue la recomendada por el fabricante.

Para el caso de los ensayos con boniato fresco, se mantuvo la misma relación materia seca a agua y se adicionó 204 g de boniato fresco triturado en un Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 150 mL de agua destilada. La manipulación en las siguientes etapas (ajuste de pH, dosificación de enzima, temperaturas y tiempo de exposición) fue la misma que para el caso de la harina de boniato.



**Figura 3.5.** Matracas conteniendo boniato fresco (izquierda) y harina (derecha), luego del proceso de gelatinización y licuefacción.

### 3.2.6 Ensayos de sacarificación y ensayos de fermentación en matracas

Luego de cada ensayo de gelatinización y licuefacción (Sección 3.2.5), se agregó AMG en la cantidad recomendada por el fabricante (dosis de enzima en exceso según Fajardo, 2010). La sacarificación se realizó antes (SHF) y durante (SSF) la fermentación utilizando boniato fresco y harina de boniato. En la Figura 3.6 se muestra un matraz procesado en la modalidad SHF para harina de boniato en una relación 1:5.

Cuando se realizó la sacarificación antes de la fermentación (SHF), la suspensión se mantuvo a 60°C, se ajustó el pH a 4.0, y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de AMG (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca). La suspensión se mantuvo a 60°C durante 30 min. Se ajustó el pH a 4.5, se pasteurizó a 100°C durante 30 min, y luego de enfriada la suspensión a temperatura ambiente, se inoculó.

Para los ensayos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), luego de la licuefacción, se enfrió la solución a 30°C, se ajustó el pH a 4.5, y se pasteurizó a 100°C por 30 min. Inmediatamente luego de la inoculación se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de AMG (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca).

También se realizó un ensayo con doble agregado de enzima AMG (previa y durante la fermentación) con harina de boniato (SHF+SSF). En este caso, el medio obtenido según lo indicado en (SHF) se utilizó para la fermentación, pero se agregaron otros 300  $\mu\text{L}$  de AMG (5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca de AMG), inmediatamente después de la inoculación (AMG se usó para la preparación del medio y durante la fermentación).

Los ensayos de fermentación se realizaron en matracas Erlenmeyer de 500 mL con un tapón de goma, en un agitador orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc.) a 30°C y 100 rpm durante 24 h. La concentración inicial de levaduras fue  $1 \times 10^8$  células/mL. Los

ensayos se realizaron por duplicado a quintuplicado, dependiendo de la condición estudiada y del material trabajado.

Se tomaron muestras de 8 mL cada 2 h con jeringas estériles de 10 mL y se centrifugaron a 2683 g, 8 min, 5°C. Al sobrenadante se le determinó las concentraciones de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), glicerol extracelular y etanol por cromatografía, técnica de HPLC (según se describió en la sección 3.1.8). También se realizó recuento de células vivas y muertas en cámara de Neubauer a la muestra pre-filtrada con gasas y teñida con colorante (según se describió en la sección 3.2.3).

Al culminar las fermentaciones, se midió el volumen final de fermentación, pH del medio y se observó la muestra al microscopio para comprobar que la fermentación se hubiera desarrollado libre de contaminación.



**Figura 3.6.** Fermentación de harina de boniato en matraz para una relación materia seca a agua de 1:5.

### **3.2.7 Ensayos de sacarificación y fermentación a distintas relaciones de materia seca a agua total del medio en reactor**

Se realizaron ensayos de sacarificación y fermentación simultánea en un fermentador de laboratorio con 1.5 L de volumen útil con suspensiones de boniato fresco y en forma de harina. Se estudiaron distintas relaciones de materia seca de boniato a agua. Se realizó un ensayo con boniato fresco con una relación de 1:8, y tres ensayos con harina de boniato con relaciones 1:2.7, 1:5 y 1:8. La relación 1:8 fue la suspensión más diluida. La relación 1:2.7 corresponde a un medio preparado con el boniato fresco sin agregado de agua.

Cuanto mayor es la relación, mayor es el contenido de azúcares en suspensión, pudiéndose conseguir mayores concentraciones de etanol al final de la fermentación. Sin embargo, a menor relación, aumenta en forma significativa la viscosidad de la suspensión, dificultando mucho su manipulación y el análisis de las muestras. En vista de los buenos resultados obtenidos en los ensayos con boniato fresco y una relación de 1:8, posteriormente se realizaron ensayos con otras relaciones más concentradas en materia seca. Se decidió trabajar con harina de boniato porque el comportamiento con respecto al boniato fresco fue muy similar en los ensayos en matraces y se disponía de cantidad suficiente de harina preparada del mismo lote de boniatos. De esta manera, se esperaba evitar la variabilidad en la composición de la materia prima en los ensayos, ya que para la preparación de la harina se utilizó una gran cantidad de boniatos.

En la fermentación con boniato fresco se suspendieron 493 g de boniato en 707 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 2 L y se homogeneizó bien la mezcla. Luego se distribuyó la suspensión en cuatro matraces Erlenmeyer de 500 mL y se prosiguió con la etapa de licuefacción. Se realizó la gelatinización y licuefacción en idénticas condiciones que los ensayos en matraces (pH 4.0, 60°C por 90 min, adicionándole 300  $\mu\text{L}$  de la enzima  $\alpha$ -amilasa a cada matraz que corresponde a 5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca). Luego los matraces se pasteurizaron por 30 min a 100°C, a presión atmosférica. Se enfriaron a temperatura ambiente, se ajustó el pH del medio a 4.5, y se agregó al reactor estéril. Se agregaron en forma simultánea el inóculo y 1200  $\mu\text{L}$  de AMG. La concentración inicial de levaduras fue  $1 \times 10^8$  células/mL. La SSF se desarrolló a 30°C, 200 rpm, durante 36 h. En la Figura 3.7 se muestra el reactor de laboratorio, realizando una fermentación con boniato fresco en relación 1:8.



**Figura 3.7.** Fermentación en reactor de boniato fresco para una relación materia seca a agua de 1:8.

Para los ensayos con harina de boniato, se preparó el medio en cuatro matraces Erlenmeyer de 500 mL. Para la relación 1:8 se agregó 36 g de harina y 264 mL de agua destilada en cada matraz. En el caso de la relación 1:2.7 se agregaron 134 g de harina en 322 g de agua y para la relación 1:5 a 68 g se le adicionaron 307 g de agua destilada por matraz. La gelatinización y licuefacción de la muestra se realizó a pH entre (5.7-6.0),

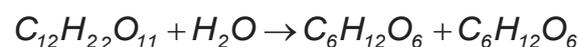
dosificación de enzima  $\alpha$ -amilasa de 5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca de AMG por matraz, temperatura de 90°C durante 90 min. Posteriormente la suspensión se pasteurizó durante 30 min y una vez enfriada se ajustó el pH a 4.5. El medio de fermentación se colocó en el reactor. Se inoculó y se agregaron 5.4  $\mu\text{L}$  por gramo de materia prima en base seca de AMG. Las SSF se desarrollaron a 30°C y 200 rpm. Se hizo seguimiento de la fermentación durante 22 a 36 h dependiendo de la relación materia seca a agua trabajada, retirando muestras a distintos tiempos.

Los análisis practicados a las distintas muestras del reactor fueron: recuento de células en cámara de Neubauer (exceptuando para la condición más concentrada, 1:2.7) y determinación de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa), etanol y glicerol por cromatografía (HPLC). Para la relación 1:2.7, fue imposible realizar el recuento en forma directa debido a la elevada cantidad de sólidos suspendidos en el medio. Por dicha razón, al culminar la fermentación se plaqueó en placas Petri conteniendo medio sólido YPD<sup>1</sup> para determinar las células viables.

### 3.2.8 Cálculos

#### Rendimiento de hidrólisis de almidón

El rendimiento de hidrólisis de almidón de boniato se determinó haciendo un balance de glucosa, ya que el almidón es un polímero de unidades de glucosa únicamente. Para determinar cuál fue el grado de hidrólisis del almidón, se calculó cuánta glucosa provenía solamente de la hidrólisis del almidón y se relacionó con la glucosa que se obtendría si todo el almidón fuera hidrolizado. Así, al contenido de glucosa encontrado al final de la hidrólisis se le restó la glucosa inicial y la proveniente de la hidrólisis de la sacarosa presente en el boniato. Para estimar esta última, se determinó el término  $(C_{Ff} - C_{Fi})$ , donde  $C_{Ff}$  es la concentración de fructosa final y  $C_{Fi}$  la concentración de fructosa inicial. Como la sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) es un dímero de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), y fructosa ( $C_6H_{12}O_6$ ):



y el peso molecular de la glucosa y fructosa es el mismo, el término  $(C_{Ff} - C_{Fi})$  representa la concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa.

Por lo tanto, el rendimiento de hidrólisis de almidón se determinó como:

$$Rendimiento_{hidrolisis}(\%) = \left( \frac{C_{Gf} - (C_{Gi} + (C_{Ff} - C_{Fi}))}{1.11 \times C_A} \right) 100$$

siendo:  $C_{Gf}$  = concentración final de glucosa en el medio (g/L);  
 $C_{Gi}$  = concentración inicial de glucosa en el medio (g/L);  
 $C_{Ff}$  = concentración final de fructosa en el medio (g/L);

<sup>1</sup> Componentes del medio YPD agar en g/L: extracto de levadura 10, peptona 20, dextrosa 20, agar 20.

$C_{Fi}$  = concentración inicial de fructosa en el medio (g/L);  
 $C_A$  = concentración de almidón teórica en el medio calculada en base a la composición del boniato (g/L).

El término  $(1.11 \times C_A)$  representa la concentración de glucosa que debería obtenerse si todo el almidón fuera hidrolizado. El factor 1.11 corresponde a los gramos de glucosa que pueden ser obtenidos a partir de 1 g de almidón tal como se indicó en la sección 3.1.7. La concentración de almidón se obtuvo a partir de la caracterización de boniato:

$$C_A = \frac{Masa_{boniato} \cdot (C_{Am} / 100)}{V_F}$$

siendo:  $C_{Am}$  = composición másica de almidón de boniato en base seca (%);  
 $H$  = humedad del boniato (g agua/g muestra);  
 $Masa_{boniato}$  = masa de muestra agregada al medio en base seca (g);  
 $V_F$  = volumen del medio (L).

### Eficiencia global del proceso de hidrólisis y fermentación

Se determinó la eficiencia global del proceso de hidrólisis y fermentación como:

$$Eficiencia_{global}(\%) = \left( \frac{etanol_{experimental}}{etanol_{teórico}} \right) \times 100$$

El etanol experimental se determinó a partir de la concentración de etanol alcanzada en los ensayos una vez considerada la fermentación culminada por las inexistencias de más azúcares en el medio de fermentación (exceptuando para la relación 1:2.7):

$$etanol_{experimental}(g) = C_{Ef} \cdot V_{Ff}$$

siendo:  $C_{Ef}$  = concentración final de etanol en el medio (g/L);  
 $V_{Ff}$  = volumen final de fermentación (L).

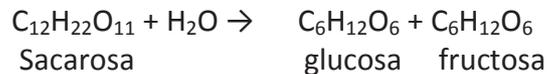
El etanol teórico se calculó considerando la conversión completa de los azúcares teóricos fermentables de la harina de boniato:

$$etanol_{teórico}(g) = Masa_{boniato} (\% \text{ azúcares}_{totales}) \times 0.511$$

El valor de 0.511  $g_{etanol}/g_{glucosa}$  es el rendimiento de etanol teórico que corresponde a la conversión estequiométrica de una molécula de glucosa en etanol:



El porcentaje de azúcares totales se determinó como la suma de los gramos de glucosa, fructosa, almidón y sacarosa presentes en 1 g de harina de boniato en base seca, expresados como equivalentes de glucosa. Para expresar la sacarosa en equivalentes de glucosa, se multiplicó el contenido de sacarosa por el factor 1.05 (g equivalentes de glucosa/g sacarosa). Este factor corresponde a los gramos de glucosa que pueden ser obtenidos a partir de 1 g de sacarosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>):



### Rendimiento global (L<sub>etanol</sub>/kg<sub>boniato seco</sub>)

El rendimiento global expresado en litros de etanol por kg de boniato seco se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento}_{\text{global}} (\text{L}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{boniato seco}}) = \frac{1000 C_{\text{Ef}} V_{\text{Ff}}}{\rho_{\text{etanol}} \text{Masa}_{\text{boniato}}}$$

siendo: C<sub>Ef</sub> = concentración final de etanol en el medio (g/L);  
 V<sub>Ff</sub> = volumen final de fermentación (L);  
 ρ<sub>etanol</sub> = densidad del etanol a 20°C (0.7894 g/L);  
 Masa<sub>boniato</sub> = masa de boniato fresco o harina agregada al reactor en base seca (g).

### Rendimiento agroindustrial (L<sub>etanol</sub>/ha)

El rendimiento agroindustrial se determinó, considerando un rendimiento agrícola promedio de 10 toneladas de boniato en base seca por hectárea y una eficiencia en el proceso de destilación y deshidratación del etanol del 98 %:

$$\text{Rendimiento}_{\text{agroindustrial}} (\text{L}_{\text{etanol}} / \text{ha}) = \frac{1 \times 10^7 C_{\text{Ef}} V_{\text{Ff}} 0.98}{\rho_{\text{etanol}} \text{Masa}_{\text{boniato}}}$$

### Productividad volumétrica (g<sub>etanol</sub>/(L.h))

La productividad volumétrica se determinó como:

$$\text{Productividad}_{\text{volumétrica}} (\text{g}_{\text{etanol}} / \text{L.h}) = \frac{C_{\text{Ef}}}{t_f}$$

siendo: C<sub>Ef</sub> = concentración final de etanol en el medio (g/L);  
 t<sub>f</sub> = tiempo final de fermentación (h).

### 3.2.9 Análisis estadístico de los resultados

Los errores para cada variable fueron estimados como la desviación estándar de los ensayos replicados.

Se realizaron análisis de ANOVA (análisis de varianza y test de Tukey) con los datos experimentales obtenidos de concentración de etanol final, rendimientos y eficiencias globales, para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos para los distintos procesos ensayados (SHF y SSF) y las materias primas (harina y boniato fresco) eran estadísticamente significativas. Para ello se utilizó el programa KaleidaGraph™, Synergy Software. Diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **CAPÍTULO IV:**

**Estudio experimental de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis y fermentación del boniato**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización físico química del boniato

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de boniato fresco y de harina de boniato. La gran variabilidad en los resultados obtenidos para el boniato fresco, llevó a hacer un número mayor de réplicas para reducir el valor de la incertidumbre. La harina presentó menor variabilidad que el boniato fresco dado a que se disponía de un único lote preparado con muchas unidades de boniatos que fueron secados y molidos, y por lo tanto, su composición fue más homogénea. Para el análisis de material fresco, se tomó un número discreto de boniatos con diferentes formas y tamaños.

**Tabla 4.1.** Composición del boniato K 9807.1.

Composición		Muestra	
		Boniato fresco	Harina de boniato
Proteínas (% bs)		3.5 ± 0.8	6.6 ± 0.1
Grasas (% bs)		0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1
Fibra cruda (% bs)		1.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Ceniza (% bs)		4.1 ± 0.3	3.2 ± 0.1
Almidón (% bs)		56.3 ± 6.2	51.1 ± 3.7
Azúcares libres	Glucosa (% bs)	2.4 ± 2.1	2.2 ± 0.1
	Fructosa (% bs)	2.6 ± 1.6	1.6 ± 0.1
	Sacarosa (% bs)	8.0 ± 0.4	15.6 ± 4.0
	Maltosa (% bs)	ND	ND
Azúcares totales (% bs)		76.0 ± 6.2	76.1 ± 4.0
Humedad (% bh)		73 ± 0.1	8.0 ± 0.1

ND = no detectado, el límite de detección corresponde a un valor del 0.1 %.

bs: base seca

bh: base húmeda

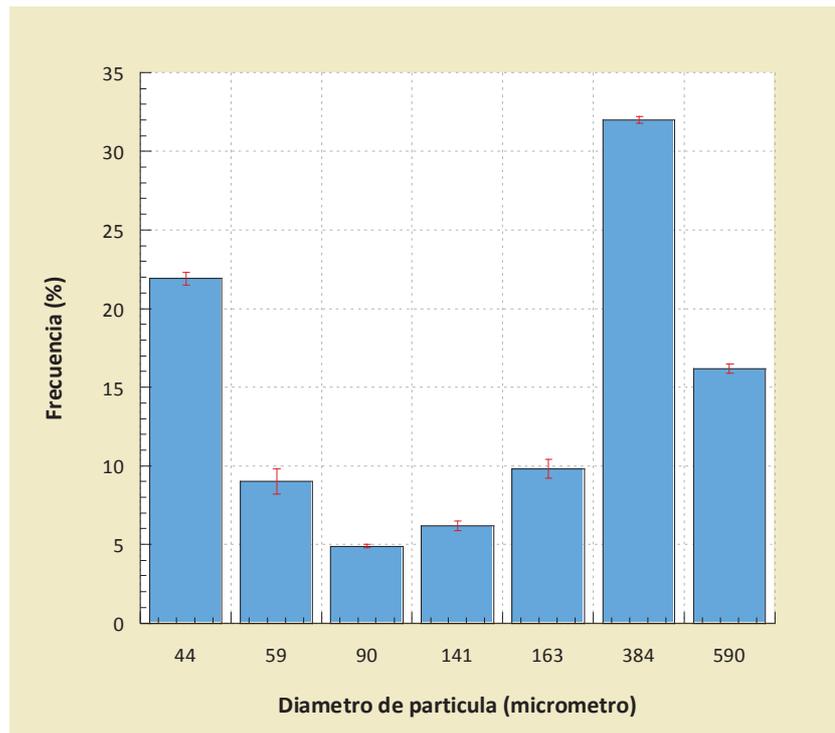
Por otra parte, no se observó una variación importante en la composición, inferior al 5 % expresado en azúcares totales, durante el tiempo de conservación (3 años para la harina y 10 meses el boniato fresco) bajo las condiciones mencionadas en materiales y métodos. No obstante, otros investigadores hallaron que la harina de boniato cambió su composición con el tiempo de almacenamiento a 4, 21 y 25°C luego de 5 meses de almacenaje (Yadav et al., 2007).

En adición al almidón, se observó que el boniato tenía un alto contenido de azúcares libres simples solubles directamente fermentables por las levaduras comunes, glucosa, sacarosa y fructosa. Se encontró que el boniato en forma de harina tenía una cantidad de azúcares libres expresados como glucosa (20.4 % bs) superior al del boniato fresco (13.4 % bs), debido a la diferencia hallada en el porcentaje de sacarosa entre ambas

muestras. En cuanto a los valores promedios de almidón, el boniato fresco presentó un 10.2 % más que la harina. Considerando la incertidumbre de estos valores, el contenido de almidón fue prácticamente el mismo para ambos materiales. A pesar de la diferencia que se observó en el almidón, el contenido total de azúcares promedio fue el mismo (cerca al 76 %, expresado como equivalentes de glucosa en base seca) para la harina y el boniato (Tabla 4.1).

Algunos investigadores estudiaron la variación del contenido de almidón durante el proceso de reducción de tamaño y secado (Olmos y Ajibola, 2003). No se observó pérdida significativa ni en almidón, ni en azúcares libres luego del secado de boniato a 55 y a 95°C en trabajos realizados en el Departamento de Bioingeniería (Lareo C. et al, 2011). Estudios con mandioca relacionando los factores que afectan el contenido de almidón durante la operación de producción de chips y de secado, obtuvieron pérdidas de almidón (27.2 % en la harina y 40 % en los chips). La recuperación del almidón en la harina fue mayor cuando la harina tuvo un procesamiento de rallado y secado (Olmos y Ajibola, 2003).

Se determinó la distribución de tamaño de partículas de la harina de boniato según se puede observar en la Figura 4.1. En el ANEXO 5 (Tabla A.5.1) se pueden encontrar más detalles de los resultados obtenidos. Se obtuvo un tipo de distribución bimodal, con dos tamaños medios de partículas representativas del lote ( $< 44 \mu\text{m}$  y  $380 \mu\text{m}$ ) como se puede observar en la curva de frecuencia (Figura 4.1). Cuando se trabaja con material particulado, se prefiere tener en general un tamaño de partícula promedio único con un pico de distribución angosto, es decir que la mayoría de las partículas se encuentre en un rango chico, próximo al promedio. En este caso se tienen dos promedios de partículas con tamaños muy diferentes ( $> 100 \mu\text{m}$  y  $< 44 \mu\text{m}$ ), que se conoce se comportan totalmente diferente y pueden dificultar su manipulación (Barbosa-Canovas et al., 2005). Esta distribución bimodal podría impactar en el manejo de la suspensión de la muestra con agua, ya que se observó una mayor dificultad que con el boniato fresco en la extracción y transferencias de muestras durante los ensayos de caracterización y fermentación. Por lo cual, el comportamiento de las distintas granulometría es un elemento a estudiar en el futuro.

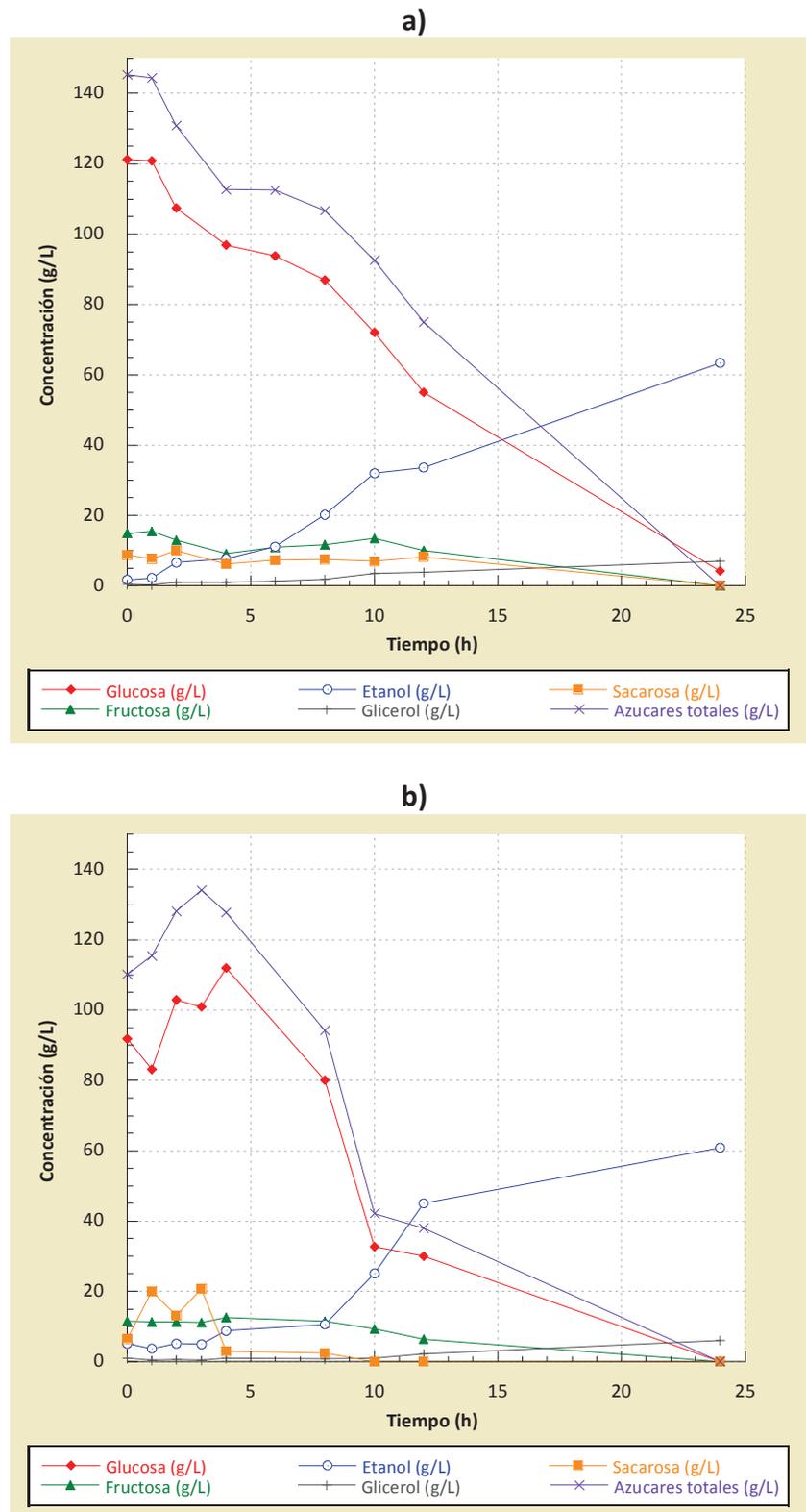


**Figura 4.1.** Distribución de diámetro de partícula para la harina de boniato.

## 4.2 Sacarificación y fermentación en matraces

Se realizaron ensayos en matraces para evaluar qué modalidad de fermentación era más adecuada para la producción de etanol a partir de boniato fresco y en forma de harina. Se realizaron experimentos de fermentación e hidrólisis simultánea (SSF) y se compararon con las fermentaciones donde el medio fue hidrolizado previo a la inoculación con la levadura (SHF), para una relación de materia seca de boniato a agua de 1:5.

En los ensayos con boniato fresco no se observó diferencia en los perfiles de la fermentación para las condiciones experimentales estudiadas: SHF y SSF. Las Figuras 4.2 a y b se muestran un perfil típico de concentración de azúcares, etanol y glicerol para la fermentación del boniato SHF y SSF, respectivamente. Por razones de claridad se excluyen las barras de errores de los gráficos. Las incertidumbres expresadas como desviaciones estándares se presentan junto con los parámetros presentados en la Tabla 4.2.



**Figura 4.2.** Perfiles típicos de la fermentación de boniato fresco correspondientes al ensayo de fermentación: a) con hidrólisis previa (SHF) y b) con sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), para una relación de materia seca a agua 1:5.

Después de 24 h de fermentación, prácticamente no quedaron azúcares residuales en el medio, y se alcanzó la máxima concentración de etanol. Se obtuvieron 11 g de glicerol por cada 100 g de etanol cuando la hidrólisis fue previa a la fermentación y 10 g de glicerol cuando la sacarificación se hizo en forma simultánea. El glicerol es un subproducto de la fermentación alcohólica. Se produce a partir de un intermediario de la glucólisis, en condiciones de alta presión osmótica debida a la alta concentración de azúcares en la fermentación. Por lo tanto, la mayor proporción de glicerol debería producirse al inicio de la fermentación, que es cuando se dan estas condiciones (Pirt y Kurowski, 1970; Glazer y Nikaido, 2007). Sin embargo, el contenido de glicerol a lo largo de la fermentación va incrementándose (Figuras 4.2 a) y b)). También se esperaba encontrar una menor concentración de glicerol en la SSF que en la SHF, ya que en esta última, al realizarse la hidrólisis previa a la fermentación, la levadura se ve expuesta a altas concentraciones de glucosa al inicio de la fermentación.

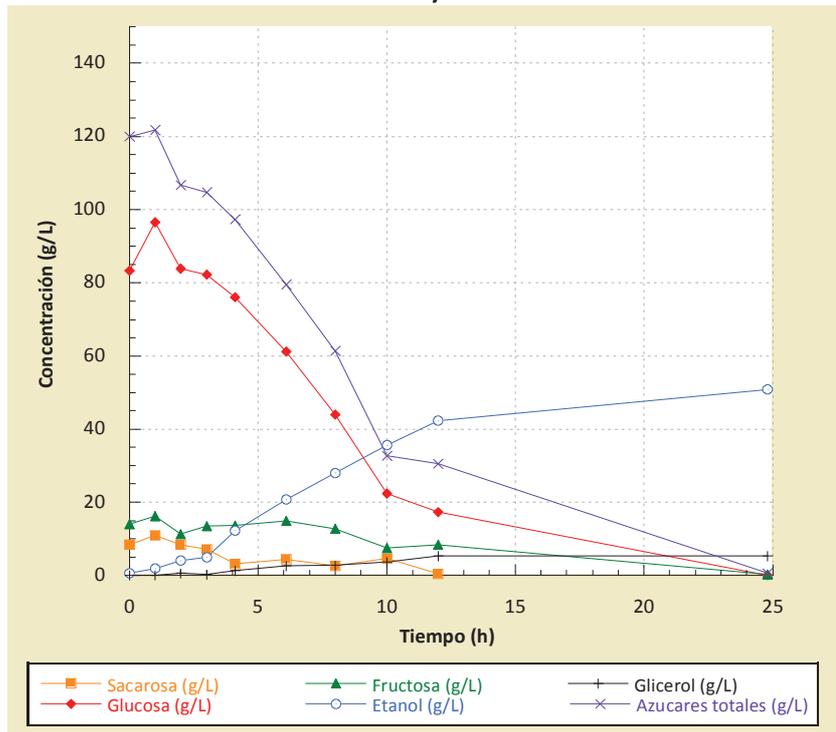
El pH al finalizar la fermentaciones estuvo para todos los casos cercanos a 4.2 dentro del rango óptimo de la fermentación y de la actividad de la AMG cuyo pH óptimo era 4.0 y ayuda a controlar la contaminación bacteriana del medio de fermentación.

En la Figura 4.2 b) se puede apreciar la alta concentración de glucosa en el tiempo inicial en el ensayo SSF con un valor similar al encontrado en la SHF, donde se realizó la hidrólisis previa del almidón. Esto indica que la enzima AMG actúa rápidamente (en los primeros minutos de la fermentación), a pesar de que la reacción enzimática se realizó a una temperatura mucho menor que la óptima de la enzima (a 30°C en lugar de 60°C) y el pH a 4.5 en lugar de 4.0 (óptimo para la enzima).

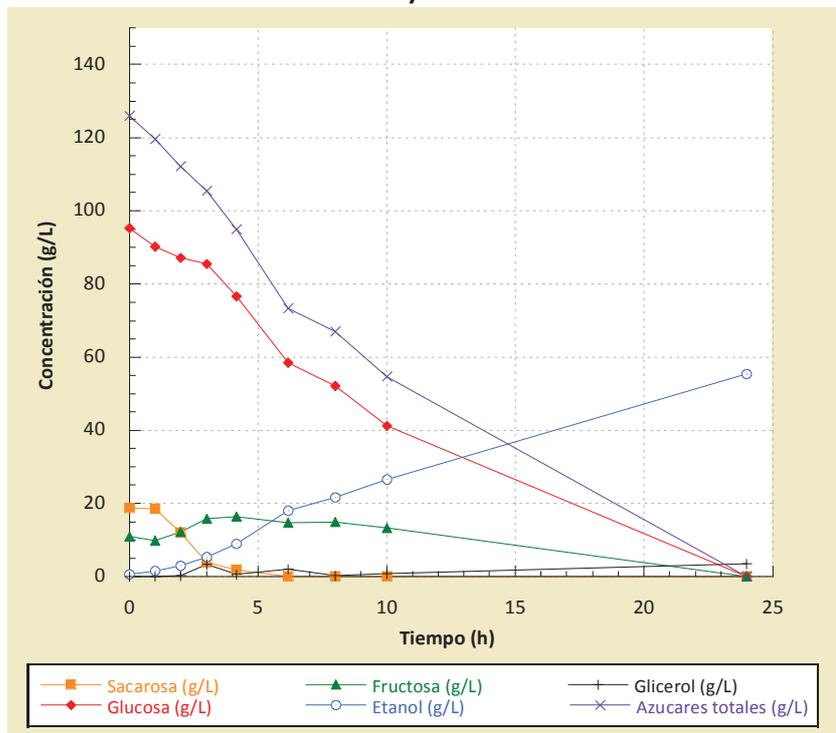
No se observó una fase lag pronunciada en las fermentaciones, lo cual puede ser atribuido al buen estado del inóculo. Para su desarrollo se usó el mismo tipo de medio que el de fermentación (ver Materiales y Métodos). La producción de etanol comenzó en las primeras horas de fermentación. La concentración total de células permaneció casi constante durante todas las fermentaciones en el orden de  $1.4 \times 10^8$  células/mL y la fracción viable varió en un rango entre 0.85 y 0.91.

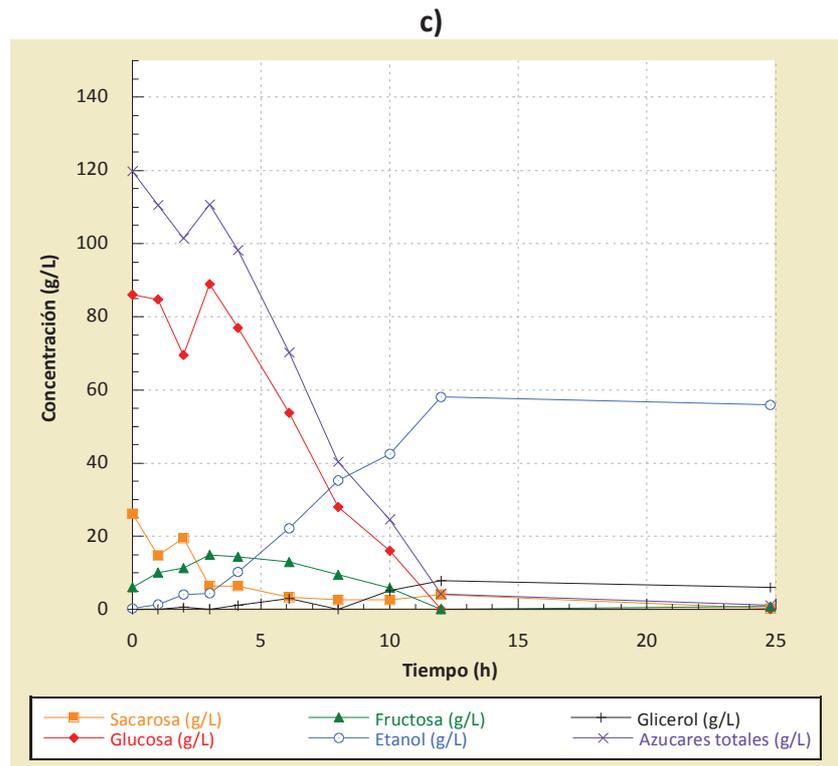
También se realizaron ensayos con harina de boniato a escala de matraces. En la Figura 4.3 se muestran perfiles típicos. La conversión de los azúcares fermentables fue completa después de 24 h de fermentación para todas las condiciones experimentales estudiadas y se obtuvo en promedio 10, 6 y 11 g de glicerol por cada 100 g de etanol para los ensayos SHF, SHF + SSF y SSF, respectivamente. Para las tres situaciones hubo una hidrólisis del almidón casi en forma inmediata al agregado de la enzima AMG.

a)



b)





**Figura 4.3.** Perfiles típicos de la fermentación de harina de boniato correspondientes al ensayo de: a) SHF, b) SHF + SSF y c) SSF para una relación 1:5.

La Tabla 4.2 muestra los resultados obtenidos para los distintos ensayos con boniato fresco y en forma de harina. Las enzimas comerciales ( $\alpha$ -amilasa y AMG) utilizadas en la licuefacción y sacarificación del boniato, hidrolizaron en promedio entre 72 y 96 % del almidón de boniato bajo condiciones experimentales recomendadas por el fabricante. Los valores encontrados están dentro del rango reportado por otros autores para materiales amiláceos. Se han reportado valores de hidrólisis de 76 % para harina de maíz usando una combinación similar de amilasa y glucoamilasa, y otros obtuvieron hasta un 80 % de conversión para almidón de cebada, maíz y de arroz, mientras que la conversión para el almidón de papa fue menos eficiente. Por otro lado, se ha reportado conversiones muy altas de almidón de maíz (mayores al 90 %) (Mojović et al., 2006).

El boniato fresco alcanzó los valores más altos de rendimientos de hidrólisis del almidón, siendo cercanos al 100 % de hidrólisis. En el caso de la harina, se observó un mayor grado de dispersión de los resultados, que se reflejó en mayores valores de la desviación estándar (Tabla 4.2). La harina puede presentar este complejo comportamiento frente a las enzimas por las diferencias en la granulometría hallada en la propia harina. Al aumentar la humedad de las partículas, tienden a adherirse a las superficies internas del equipamiento y a apelmazarse, dificultando las operaciones de manejo y transferencia de la suspensión. El acceso al sustrato, las interacciones entre partículas, la relación área/volumen tan variable del sistema particulado y el grado de humectación de la harina podrían estar influyendo en la dispersión de los resultados (Barbosa-Canovas et al., 2005; Noda et al., 2008; Shariffa et al., 2009). Sin embargo, tanto

para boniato en forma de harina como fresco, la sacarificación y la fermentación simultáneas mostraron un desempeño global final de fermentación muy similares e incluso algo superiores a los de hidrólisis previa con ambas enzimas (tal como se discute más adelante; Tabla 4.2).

**Tabla 4.2** Rendimientos de hidrólisis y fermentación de boniato para la relación 1:5.

	Boniato fresco		Harina de boniato		
	SHF	SSF	SHF	SHF + SSF <sup>***</sup>	SSF
Rendimiento de hidrólisis previo a la fermentación (%)	96 ± 6	**	72 ± 23	88.3	**
Concentración final de etanol (g/L)	68 ± 7	71 ± 14	51 ± 4	55.4	57 ± 2
Rendimiento global (L <sub>etanol</sub> /kg <sub>boniato bs.</sub> )	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.10	0.38 ± 0.03	0.42	0.43 ± 0.02
Eficiencia Global* (%)	88 ± 1	91 ± 10	78 ± 5	85	87 ± 4
Rendimiento agroindustrial (L <sub>etanol</sub> /ha)	4530 ± 440	4710 ± 950	3780 ± 260	4120	4220 ± 180

SHF: la etapa de sacarificación fue previa a la fermentación.

SHF+SSF: se realizó un doble agregado de AMG: antes de la fermentación y al inicio de la misma.

SSF: sacarificación y fermentación simultánea.

\* Eficiencia Global: calculada como el etanol obtenido sobre el etanol teórico que se debería producir.

\*\* La etapa de sacarificación se realizó solo durante la fermentación, ver la sección de Sacarificación del Almidón y Ensayos de Fermentación por más detalles.

\*\*\* Ensayo único.

No se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los resultados de etanol, rendimiento y eficiencia global en los ensayos de SHF y SSF con boniato fresco (Tablas A.6.1 a A.6.3 del ANEXO 6). Las concentraciones finales de etanol para los ensayos fueron en promedio 68 g/L y 71 g/L, y las eficiencias globales 88 % y 91 % para los ensayos SHF y SSF respectivamente. Los datos sugieren que el etanol producido durante la fermentación no tuvo un gran efecto de inhibición durante la hidrólisis enzimática. Mojović et al., 2006 encontraron resultados similares para la fermentación del maíz. Sin embargo, otros investigadores encontraron un valor correspondiente a la inhibición de sustrato para la levadura de 25 % en concentración de sacarosa (Breisha, 2010).

En cuanto al rendimiento global, se obtuvieron valores promedios de 0.46 y 0.48 L de etanol por kilogramo de boniato seco para la sacarificación previa y simultánea respectivamente, cercanos al valor teórico (0.49 L/kg, determinado a partir de la composición teórica promedios del boniato) en tiempos de fermentación de 24 h. Montesinos y Navarro (2000) obtuvieron rendimientos de 0.46 L<sub>etanol</sub>/kg<sub>trigo</sub> y eficiencias globales de 90 %, luego de 36 h para condiciones experimentales similares de sacarificación y fermentación simultáneas. Kim y Dale (2005) estudiando la producción de etanol a partir de granos de maíz, informaron una producción de 0.38 L de etanol por cada kg de grano de maíz seco.

Con la harina de boniato se evaluaron tres formas de agregado de AMG: previa a la fermentación (SHF), junto con el inóculo (SSF) y doble agregado (antes de fermentar, con una segunda dosis en el momento de inoculación del medio con la levadura, SHF + SSF). El ensayo con doble agregado de enzima AMG (antes y después de la inoculación), se realizó con la finalidad de evaluar si era posible hidrolizar el almidón residual de la etapa de sacarificación previa a la fermentación, y de esta manera obtener un 100 % de hidrólisis. Se agregó una nueva dosis de enzima junto con el inóculo, ya que luego de la etapa de sacarificación previa a la fermentación, el medio fue pasteurizado a 100°C, y por tanto, la AMG puede haber sido desnaturalizada en esta operación. Se observó que el segundo agregado de enzima (AMG) no mejoró el grado de hidrólisis del almidón (Ensayo SHF + SSF, Tabla 4.2) respecto al ensayo SSF.

La Tabla 4.2 presenta los resultados obtenidos con harina de boniato. No se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los resultados de etanol, rendimiento y eficiencia global en los ensayos de SHF, SSF y SHF + SSF con harina de boniato (Tablas A.6.4 a A.6.11 del ANEXO 6). Las concentraciones de etanol luego de 24 h de fermentación fueron similares para las tres condiciones experimentales estudiadas (en el rango de 51 a 57 g/L en promedio), así como también los rendimientos globales (en el orden de 0.38 a 0.43 L etanol/kg de boniato en base seca). Los valores promedios de eficiencias globales estuvieron en el rango: 76 % a 87 %. Mojović et al. (2006) encontraron resultados similares para la fermentación del maíz.

En base a los resultados obtenidos a escala de matraces, donde no se observaron mayores diferencias en entre los resultados obtenidos para una modalidad de sacarificación y fermentación SHF y SSF, tanto para boniato fresco como harina de boniato, se puede concluir que el tratamiento previo a la fermentación con AMG no sería necesario. Esto ahorra tiempo pues se realiza una etapa menos, y reduce el consumo de energía del proceso ya que se elimina el calentamiento a 60°C.

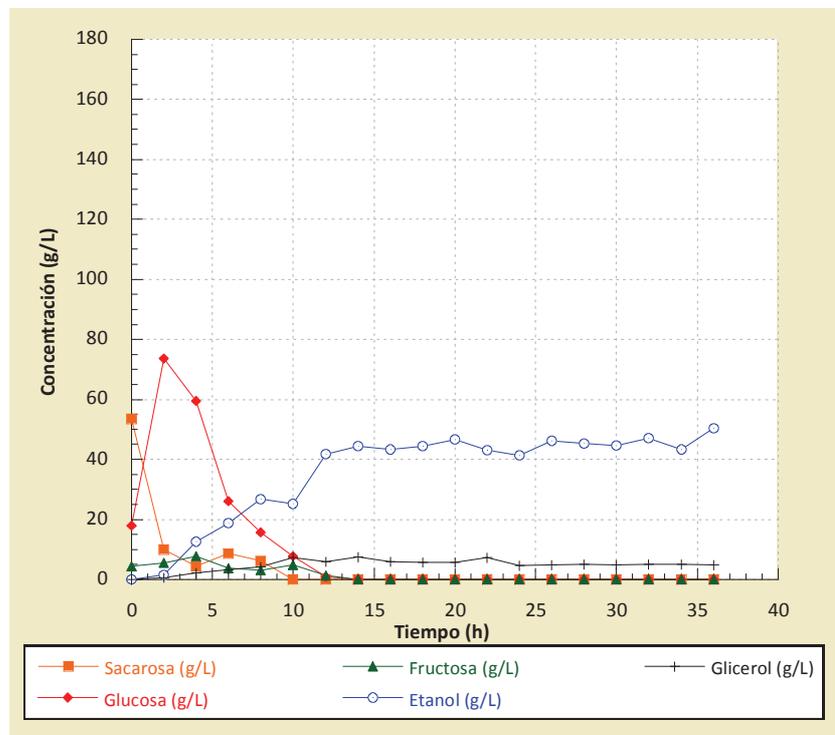
Sin embargo, un análisis ANOVA mostró que hay diferencia significativa con respecto a la concentración final de etanol cuando se utiliza boniato fresco o harina y se trabaja realizando la hidrólisis del almidón previa a la fermentación (Tabla A.6.12 del ANEXO 6).

### **4.3 Sacarificación y fermentación a distintas relaciones materia seca a agua total del medio en reactor**

A efectos de evaluar el incremento de materia seca en el medio, se hicieron ensayos en un fermentador de laboratorio, más similar a un equipo industrial de modo de mejorar las condiciones operativas. Se estudiaron mayores relaciones de materia seca de boniato a agua para conseguir una concentración final de etanol superior. Cuanto mayor es la concentración de etanol obtenida menor es el consumo energético en la etapa de destilación y deshidratación del alcohol a escala industrial. Los ensayos se realizaron haciendo la sacarificación y fermentación en forma simultánea, ya que a escala de matraces se obtuvieron resultados equivalentes de eficiencia y rendimientos de etanol entre los ensayos SSF y SHF, y además, la modalidad de fermentación SSF presenta

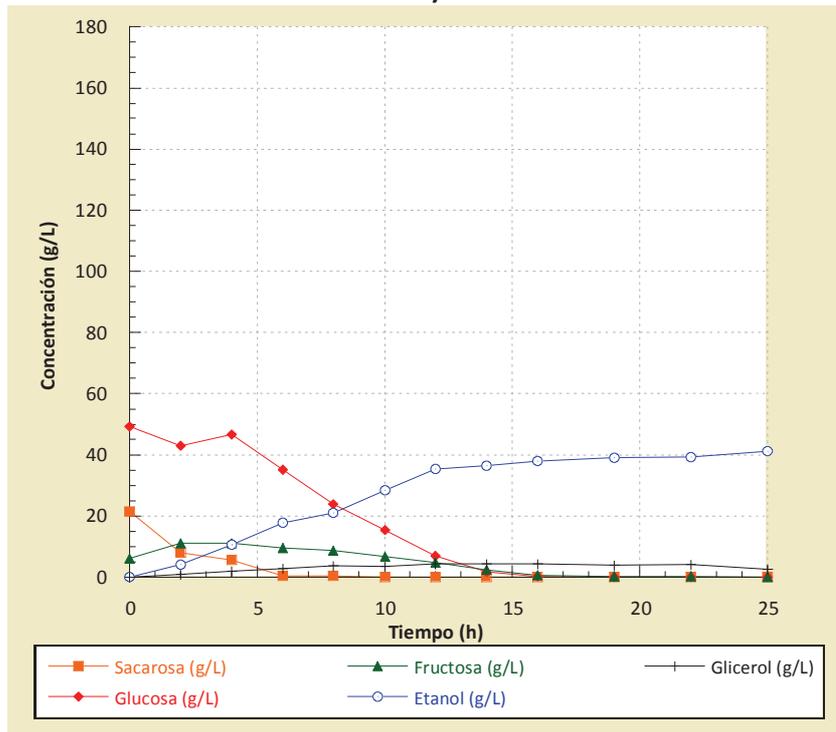
ventajas sobre todo desde el punto de vista energético frente a SHF. Se utilizó harina de boniato como materia prima, ya que no se disponía de más boniato fresco del mismo lote en buenas condiciones. Se realizó un ensayo con boniato fresco como control (relación materia seca a agua 1:8).

Las Figuras 4.4 y 4.5 a) muestran los perfiles de glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol y etanol para boniato fresco y en forma de harina, para la relación materia seca a agua 1:8. En el ensayo con boniato fresco se obtuvo una concentración final de etanol similar a la de harina de boniato, y el tiempo final de fermentación (cuando la concentración de azúcares totales residuales en el medio fue despreciable y se alcanzó la mayor concentración de etanol) fue el mismo (Tabla 4.3, Figuras 4.4 y 4.5 a)). Sin embargo, se obtuvieron mejores valores en el rendimiento, eficiencias globales y agroindustriales con el boniato fresco 0.46 y 0.41 L/kg *boniato seco*, 95 y 83 %, y 4560 y 4020 L *etanol/ha*, para boniato fresco y harina, respectivamente.

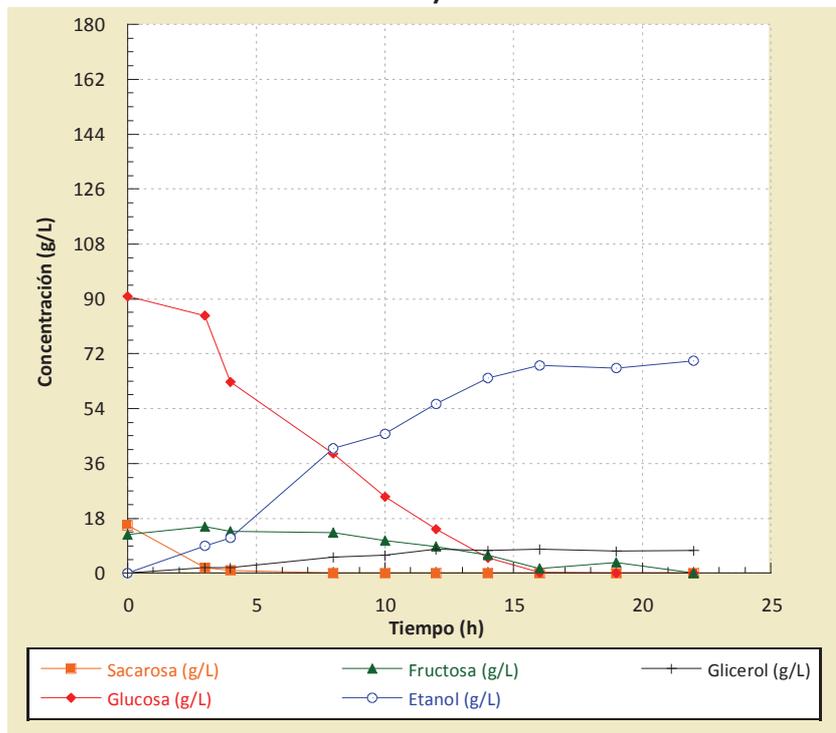


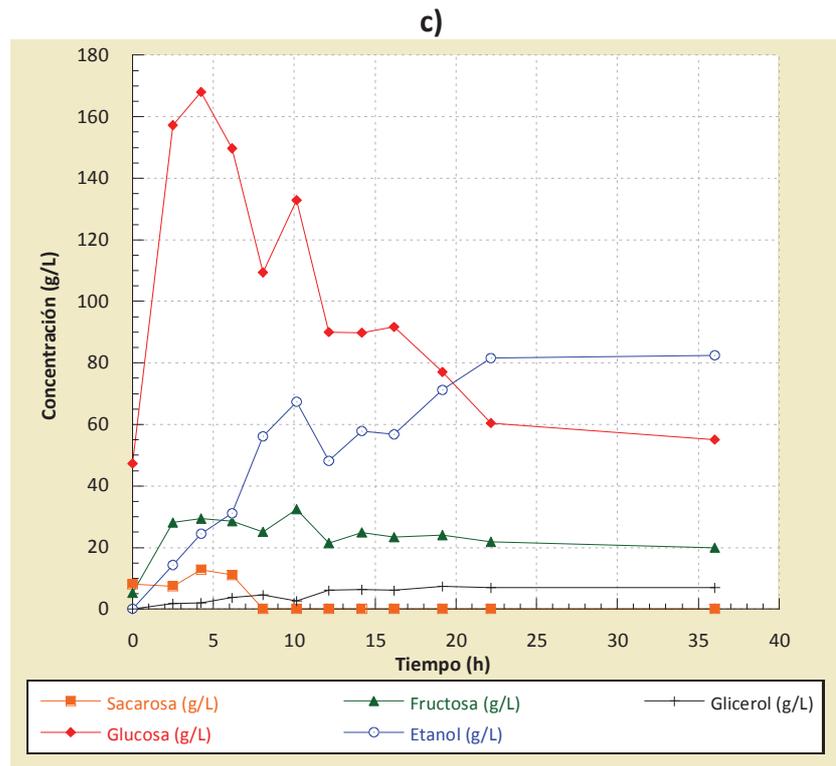
**Figura 4.4.** Perfiles de fermentación del boniato en fermentador de laboratorio en modalidad SSF, con una relación materia seca a agua total de 1:8.

a)



b)





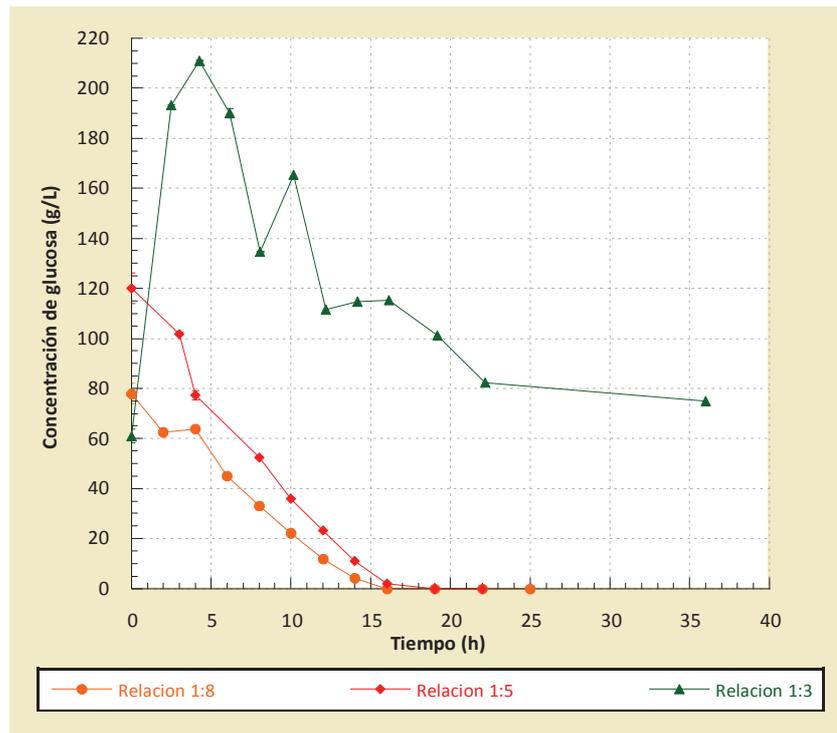
**Figura 4.5.** Perfiles de fermentación de harina de boniato en fermentador de laboratorio en modalidad SSF, con una relación materia seca a agua total: a) 1:8; b) 1:5; c) 1:2.7.

Para fermentaciones con harina de boniato y relaciones de materia seca a agua 1:8 y 1:5, se pudo observar un consumo total de los azúcares fermentables del medio luego de 14 y 16 h de fermentación (Figura 4.5 a) y b)). Sin embargo, para la relación 1:2.7 (que correspondería a una suspensión de boniato fresco sin agregado de agua), no se consumieron todos los azúcares. La concentración de glucosa aumentó en las primeras 4 h de fermentación y luego disminuyó lentamente hasta un valor residual de 55 g/L a las 36 h de fermentación (Figura 4.5 c)). Esto indica que en las primeras horas la velocidad de hidrólisis del almidón fue mayor que la velocidad de consumo de sustrato por la levadura, razón por la cual se empezó a acumular glucosa en el medio. La fructosa no fue consumida por la levadura en este ensayo. Se puede concluir que hubo inhibición de la fermentación en este ensayo. La fermentación fue incompleta y más lenta que los ensayos con medios más diluidos (16 h para 1:5 y 14 h para 1:8) (Figura 4.5, Tabla 4.3). La presencia de ciertos azúcares (fructosa y glucosa) luego de las 22 h de fermentación puede estar relacionada al estrés al cual fueron sometidas las células de *Saccharomyces cerevisiae* por la alta concentración de etanol en el medio. Para mejorar el desempeño de la fermentación se requiere de investigación adicional, por ejemplo evaluar la aplicación de distintas fuentes de nitrógeno, magnesio, suministro adecuado de oxígeno (microaireación), ergosterol y ácido oleico, ya que juegan un rol esencial en la estructura y funciones metabólicas del crecimiento celular y tolerancia al etanol (Srichuwong et al., 2009; Breisha, 2010). También se podría seleccionar otras levaduras capaces de tolerar mayores concentraciones de etanol (mayores a 100 g/L). Pereira et al. (2011) trabajaron con tres cepas industriales en las cuales los efectos inhibitorios no se observaron para una concentración de etanol por encima de 140 g/L para un medio sintético en base

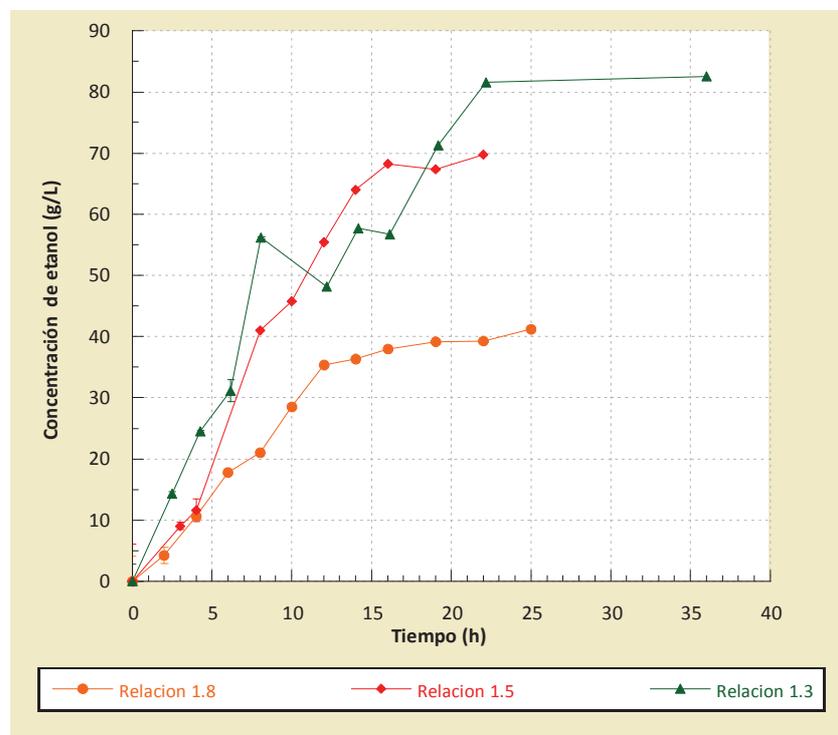
glucosa y puré de maíz, suplementado con sales. Zhang et al. (2011) informaron una concentración máxima de etanol alcanzada, productividad y rendimiento de etanol a escala de laboratorio de 128 g/L, 4,76 g/L.h y 91.4 % para una relación materia seca de boniato a agua de 1:3.2 a 1:2.2 en un proceso SSF luego de 72 h de fermentación, utilizando una levadura *S. cerevisiae* CCTCC M206111 seleccionada del vino en un medio suplementado con sulfato de amonio.

Es interesante destacar que en el caso de la fermentación con una relación 1:2.7 no se observó inhibición de la AMG por altas concentraciones de glucosa, tal como ha sido reportado por algunos investigadores (Chouvel et al., 1983; De Mot y Verachtert, 1987; Reilly, 1999; Montesinos y Navarro, 2000). A las 2 h de comenzada la fermentación, la concentración de azúcares totales expresado como glucosa es aproximadamente 195 g/L, y se corresponde con un porcentaje de hidrólisis del almidón del 95 %. Este valor se obtuvo de un balance de azúcares en el reactor para ese tiempo, considerándose un consumo de 29 g/L de glucosa para la producción del etanol (~ 15g/L de etanol) y un contenido teórico de azúcares agregado al medio, dado por la composición promedio de la harina, de 237 g/L (Figura 4.6). Lo cual, afirma que la actividad de la enzima fue casi completa para las primeras dos horas. Al finalizar la fermentación, los azúcares residuales se corresponden a un 100 % de hidrólisis con un consumo de azúcares de 160 g/L en la obtención de bioetanol (Tabla 4.3).

Las Figuras 4.6 y 4.7 muestran los perfiles de concentración de azúcares totales y etanol para las fermentaciones con harina de boniato para las tres relaciones de materia seca a agua estudiadas. Tanto en los perfiles de azúcares como en el de etanol, se observó una mayor dispersión de los resultados para la fermentación con relación 1:2.7. Esto podría deberse a la gran dificultad en la manipulación del medio de fermentación el cual tenía una viscosidad muy elevada. No se observó una fase lag en las fermentaciones para las tres relaciones estudiadas. Además, la velocidad de producción de etanol no se vio disminuida al aumentar el contenido de sólidos en el medio, contrario a lo que se podría esperar por efecto de inhibición por sustrato o producto (alto estrés osmótico).



**Figura 4.6.** Perfiles de la concentración de azúcares totales expresados como glucosa para las fermentaciones con harina de boniato en distintas relaciones materia seca a agua total.



**Figura 4.7.** Perfiles de la concentración de etanol obtenido en las fermentaciones con harina de boniato en distintas relaciones de materia seca a agua total.

En la Tabla 4.3 se observan los resultados obtenidos para harina de boniato. Se puede observar que al aumentar la relación materia seca a agua, aumentó la concentración final de etanol como era de esperar debido al mayor contenido de azúcares fermentables en el medio para relaciones más bajas, y el tiempo necesario para alcanzar la mayor concentración de etanol. Al disminuir la relación materia seca a agua de 1:8 a 1:5, se incrementó el contenido de azúcares en el medio de fermentación (50 %), y se produjo un aumento en la concentración de etanol final de un 74 % y de los rendimientos de un 11 %. El incremento en la concentración de etanol fue tan solo de un 20 % al pasar de una relación 1:5 a 1:2.7. En cuanto a la eficiencia y el rendimiento global, así como también el rendimiento agronómico, presentaron un valor máximo para la relación intermedia (1:5). En el caso del medio de fermentación más concentrado en materia seca (relación 1:2.7), la disminución del rendimiento global puede deberse a la existencia de inhibición por sustrato (altas concentraciones iniciales de azúcares) y por producto (alto contenido de etanol) ya que no se consumieron todos los azúcares (Figura 4.5 c), Tabla 4.3).

Con respecto a los valores de rendimiento de etanol, en el año 2003 más de  $12.5 \times 10^9$  L de etanol se produjeron en Estados Unidos con un rendimiento de alrededor de 0.37 L de etanol por kilo de granos de maíz seco (con una humedad del 12 al 15 %), (Glazer y Nikaido, 2007). En todas las relaciones materia seca a agua utilizadas con boniato se obtuvieron valores por encima a los  $0.37 \text{ L}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{sustrato seco}}$ , exceptuando para la relación 1:2.7 que se corresponde al 73 % de dicho valor (0.27 L/kg), donde la fermentación fue incompleta. A pesar de ello, en la Tabla 4.3 se considera un rendimiento de etanol potencial cuando la materia prima se trata de boniato de 125 L/t, valor ampliamente superado hasta para la peor condición (270 L/t). Esto nos indica que el boniato K 9807.1 tiene un gran potencial para la producción de bioetanol comparado con el boniato promedio que fue reportado en la revisión realizada por Linoj Kumar et al., (2006).

**Tabla 4.3.** Valores promedios de concentraciones de azúcares y etanol final con sus respectivos rendimientos para las fermentaciones con harina y boniato fresco.

	Relaciones de materia seca a agua			
	Boniato fresco	Harina de boniato		
	1:8	1:8	1:5	1:2.7****
Tiempo de fermentación (h)	14	14	16	36
Azúcares iniciales* (g/L)	86	90	135	237
Azúcares residuales (g/L)	0	0	0	75
Etanol final (g/L)	44 ± 1	39 ± 2	68 ± 1	82
Glicerol final (g glicerol/100 g etanol producido)	14.6 ± 2.2	10.1 ± 2.2	11.1 ± 0.4	8.48
Productividad volumétrica (g etanol/L.h)	3.17 ± 0.09	2.76 ± 0.19	4.28 ± 0.06	2.28
Rendimiento global (L etanol/kg boniato seco)	0.46 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.27
Eficiencia global* (%)	95 ± 3	83 ± 5	92 ± 2	55
Rendimiento agroindustrial (L etanol/ha)***	4560 ± 140	4020 ± 240	4460 ± 80	2670

\* Calculados en base a la composición de almidón y azúcares del material utilizado.

\*\* Eficiencia global: calculada como el etanol obtenido sobre el etanol teórico que se debería producir.

\*\*\* Rendimiento agroindustrial: calculado considerando un rendimiento agrícola promedio de 10 t/ha (base seca) y eficiencia de destilación del 98 %.

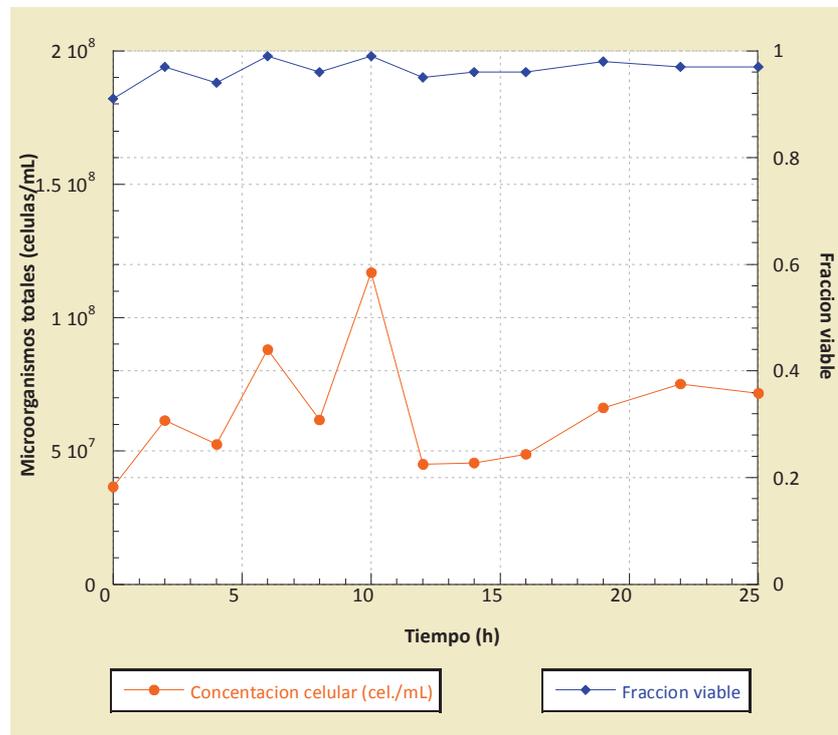
\*\*\*\* Ensayo único.

En las fermentaciones alcohólicas es importante monitorear la concentración de glicerol producido, ya que representa sustrato (glucosa) que fue consumida para producir este compuesto en lugar de etanol. La presencia de altas concentraciones de glicerol en el medio puede explicar un bajo rendimiento de etanol. Asimismo, la levadura utiliza sustrato para su propio crecimiento y mantenimiento celular, y por lo tanto, no es posible alcanzar el rendimiento teórico de glucosa a etanol (dada por la relación estequiométrica de conversión). La concentración final glicerol promedio fue muy similar en todos los ensayos, siendo baja tanto en la fermentación con boniato fresco, (15 ± 2) g de glicerol por cada 100 g de etanol producido, como para la harina (10 ± 2) g, ((10 ± 2) g, (11 ± 1) g y 8 g de glicerol por 100 g de etanol producido, para la relación 1:8, 1:5 y 1:2.7 respectivamente). Por lo tanto, la producción de glicerol no explicaría los bajos rendimientos obtenidos para las relaciones 1:2.7.

El pH final del medio estuvo en todos los casos cercanos a 4.5 y no se observó contaminación microbiana.

Tanto para boniato fresco como para harina de boniato, la concentración y viabilidad celular se mantuvo prácticamente constante durante las fermentaciones. La Figura 4.8 muestra un perfil típico de concentración y fracción viable para la fermentación con harina de boniato en relación 1:8. La viabilidad en promedio para ambos sustratos se mantuvo cercana al 95 %. En el caso del ensayo con harina de boniato en relación 1:5, la fracción viable estuvo alrededor de 0.96 y el número de células se mantuvo constante en  $6.3 \times 10^7$  células/mL (ver ANEXO 7). En la fermentación más concentrada (relación 1:2.7)

fue imposible realizar recuento directo en cámara de Neubauer por el alto contenido de sólidos en suspensión y por lo tanto, se realizó recuento en placa en medio PDA. Se obtuvo una concentración final de  $6 \times 10^7$  células viables/mL.



**Figura 4.8.** Variación de la concentración total de levaduras y su fracción viable en la fermentación que utilizó como materia prima harina de boniato en una relación materia seca a agua, 1:8.

Los ensayos realizados en fermentador dieron rendimientos promedios mayores que los observados en matraces en las mismas condiciones experimentales: harina de boniato, sacarificación simultánea a la fermentación y relación materia seca a agua 1:5. Se obtuvo:  $0.43 \text{ L}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{boniato}}$  y  $4220 \text{ L}_{\text{etanol}}/\text{ha}$  en escala de matraces frente a  $0.46 \text{ L}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{boniato}}$  y  $4460 \text{ L}_{\text{etanol}}/\text{ha}$  en fermentador de laboratorio. Esto puede deberse a menores pérdidas evaporativas en el fermentador y durante la manipulación (toma de muestras durante la fermentación).

Los efectos de inhibición observados en la fermentación con alto contenido de sólidos y por tanto, altas concentraciones de azúcares iniciales, podría ser contrarrestado cambiando la modalidad de fermentación a un proceso tipo fed-batch con recirculación celular. Este tipo de procesos es muy empleado en la producción de bioetanol en Brasil a partir de jugo de caña de azúcar. Además, sería recomendable utilizar cepas productoras de etanol capaces de resistir altas concentraciones de producto, tal como se comentó más arriba en el texto. El alto nivel de biomasa garantizado por este modo de operación, permite la reducción de los efectos de deterioros celular por inhibiciones por sustrato y/o producto y la minimización de los costos asociados a la etapa de preparación del inóculo (Converti et al., 2003). Sin embargo, para el caso del boniato no es posible la recirculación de células pues quedan muchos sólidos en suspensión al final de la fermentación (fibras y

otros materiales del boniato) que no se pueden separar de las levaduras. La recirculación de este material para fermentar, aumentaría en forma significativa la concentración de sólidos en suspensión. Por otro lado, el agregado de suspensión de boniato en forma gradual durante la fermentación (para realizar la modalidad fed-batch) puede ser muy complicado ya que altas concentraciones de sustrato implican altas relaciones de materia seca a agua y por lo tanto, altas viscosidades, haciendo muy difícil la homogenización del medio después de cada agregado y la transferencia.

Dadas las altas viscosidades de estos materiales y la alta concentración de sólidos en el medio resulta más efectivo trabajar con una relación media próxima a 1:5 donde se obtuvieron los muy buenos resultados. La elevada viscosidad de las suspensiones por encima de esta relación dificultó mucho la manipulación, incluyendo la tomas de muestras del reactor y el análisis de las mismas.

## **Parte 2:**

**Estudio del uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso utilizando un modelo de simulación a través de un software específico**

## **CAPÍTULO V:**

**Estudio del uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso utilizando un modelo de simulación a través de un software específico**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Simulación del proceso de obtención de etanol con sacarificación y fermentación simultánea

El análisis del proceso de producción de bioetanol combustible a partir de boniato se estudió con la herramienta de software SuperPro Designer®, Intelligen Inc. versión 8.0. Fue posible simular el proceso a escala comercial, obteniéndose como resultado un diagrama de flujo que describe los balances de masa, el dimensionamiento de los equipos involucrados y su consumo de energía.

Se evaluó el consumo de energía en la producción de etanol a partir de boniato fresco y en forma de harina, utilizando diferentes configuraciones de procesos y valores de parámetros operativos. Para este estudio se utilizaron los resultados experimentales obtenidos y discutidos en el Capítulo IV. La etapa de sacarificación se consideró en forma simultánea a la fermentación.

### 5.2 Definición del proceso simulado

Se estableció como caso base de estudio una producción anual de bioetanol anhidro de 90.000 m<sup>3</sup>. Esta capacidad corresponde a la ampliación prevista en la producción nacional de bioetanol combustible en los próximos años (aproximadamente 18000 m<sup>3</sup>/año de ALUR en Bella Unión y 70000 m<sup>3</sup>/año en Paysandú). La calidad del bioetanol a obtener, 99.2 % (v/v) se definió en base a la especificación vigente para el producto anhidro (UNIT 1122:2009). Se supuso que la planta trabaja las 24 horas del día, durante 320 días al año (~ 7680 h), destinando los restantes 45 días para abastecimiento, limpieza, mantenimiento y reparaciones de equipos. La capacidad nominal de la planta corresponde a 130 t/h de boniato. Los datos del caso base tomado se resumen en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Datos del caso base de producción industrial de boniato.

Parámetros	Valores
Capacidad (m <sup>3</sup> /d) (*)	282
Producción anual (m <sup>3</sup> /año) (*)	90000
Tiempo de operación de la planta (días)	320
Capacidad nominal de la planta (t/h)	130
Etanol (%)	> 99.2

(\*) Expresado en etanol al 100 %

### 5.3 Definición de de condiciones operativas estudiadas

Se estudió el efecto de la variabilidad del contenido de azúcares de las materias primas, de la eficiencia de fermentación y de la relación materia seca a agua sobre el consumo energético del proceso. Para el caso de harina de boniato, se incluyó el consumo de energía del proceso de secado, considerando diferentes humedades finales. Los rangos estudiados para cada materia prima se muestran en las Tabla 5.2. Se estudió un parámetro por vez, dejando fijos los valores de los demás parámetros cuando la materia prima a fermentar se trataba de harina. En la Tabla 5.3 se muestran los valores que se mantuvieron constantes.

**Tabla 5.2.** Rango de valores de los parámetros estudiados.

Materia prima	Rango estudiado				
	Contenido de azúcares totales (%) <sup>*</sup>	Relación materia seca a agua	Relación materia seca a agua <sup>**</sup> (kg sólido seco/kg agua total)	Eficiencia de fermentación (%)	Humedad final (%)
Boniato fresco	69 – 81	1:2.7 - 1:8	0.13 – 0.37	70 – 92	-----
Harina de boniato	69 – 82	1:2 - 1:8	0.13 – 0.50	70 – 92	8 – 20

\* Azúcares totales expresados como glucosa.

\*\* Los valores límites de relación materia seca 0.13 kg/kg se corresponde con la relación 1:8 y la relación de 0.37 kg/kg con la relación materia seca a agua, 1:2.7.

**Tabla 5.3.** Condiciones estudiadas para los distintos parámetros evaluados usando harina de boniato.

Parámetro evaluado	Azúcares totales (%)	Relación materia seca a agua	Eficiencia de fermentación (%)	Humedad harina (%)
Contenido de azúcares	-----	1:5	90	8.0
Relación de materia seca a agua	76	-----	90	8.0
Eficiencia fermentación	76	1:5	-----	8.0
Humedad final harina	76	1:5	90	----

Los tiempos de fermentación utilizados en la simulación para cada una de las relaciones de materia seca a agua estudiadas se muestran en la Tabla 5.4. Los valores para las relaciones 1:2.7, 1:5 y 1:8 con harina de boniato fueron determinados experimentalmente (Capítulo IV). Para poder estimar los tiempos de fermentación para otras relaciones de materia seca a agua, se ajustó una ecuación de segundo grado a los datos experimentales, obteniéndose un valor de  $R^2$  de 1.00 (por más detalle ver ANEXO 8):

$$Tiempo_{fermentación} (h) = 371.15.R^2 - 93.908R + 19.936$$

siendo R = relación materia seca a agua total ( $\text{kg}_{\text{materia seca}}/\text{kg}_{\text{agua total}}$ ).

**Tabla 5.4.** Tiempos de fermentación para las distintas relaciones materia seca a agua.

Relación de materia seca a agua (en peso)	Contenido de materia seca ( $\text{kg}_{\text{sólido seco}}/\text{kg}_{\text{agua total}}$ )	Tiempo de fermentación (h)
1:8	0.13	14
1:6	0.17	15
1:5	0.20	16
1:4	0.25	20
1:2.7	0.37	36
1:2	0.50	48

## 5.4 Descripción del proceso

El simulador dimensiona y cuantifica los requerimientos energéticos del proceso considerando el consumo de cada equipo. El consumo de energía fue calculado considerando tanto el consumo eléctrico de los equipos, como el consumo de vapor. Al ingresar al programa se debe decidir la manera de operación de la planta: discontinuo (batch), semi-continuo, o continuo. En este trabajo se utilizó un proceso semi-continuo, las primeras operaciones unitarias se realizan en forma discontinua (etapas de molienda, licuefacción, sacarificación, fermentación) y las etapas finales en continuo (etapas de separación y purificación del etanol). Para la selección de los equipos se integró procesos, recirculando flujos para reducir el consumo de materiales y de energía.

Para el dimensionamiento de los equipos se ingresó al programa para cada materia prima (boniato fresco y en forma de harina), sus composiciones y propiedades fisicoquímicas, los flujos másicos de entradas, volúmenes máximos, áreas máximas de intercambio de calor, coeficientes de transferencia de calor y masa, entre otros parámetros propios de cada equipo. El procesamiento de harina de boniato tuvo dos etapas más que el boniato fresco: un proceso de secado y molienda previo a la etapa de licuefacción. El secado es una operación energéticamente intensiva siendo su eficiencia

energética baja. Por lo cual se tomó una eficiencia de 70 % (Prof. Jorge Martínez, Comunicación personal, Departamento de Operaciones Unitarias, IIQ, FI, UDELAR, 2011).

Para los reactores de licuefacción y fermentación se consideró un volumen útil de 83 % (Kwiatkowski et al., 2006), y para el resto de los equipos se consideró un volumen de trabajo del 90 % del total. Para la etapa de deshidratación se asumió el uso de una columna de tamices moleculares, en lugar de destilación ternaria azeotrópica con benceno como se utilizaba en el pasado, debido a las restricciones ambientales y de seguridad relativas al uso de dicho solvente.

En el diagrama de flujo del proceso, al posicionarse con el cursor sobre cada línea de flujo se pudo observar una descripción completa del fluido que circula por dicha línea. El programa permite identificar los volúmenes, la composición y propiedades físico química de los flujos de entrada y de salida a cada equipo. Igualmente con el cursor sobre cada equipo del proceso se pudo apreciar la información que lo describe.

Se utilizó información disponible en la base de datos de SuperPro Designer para la preparación de los distintos materiales en el proceso como agua, ácido sulfúrico concentrado, glucosa, hidróxido de sodio, dióxido de carbono, etanol, amoníaco, aire, cenizas, almidón, fibras, proteínas, entre otros. Fue necesario crear una biblioteca con los datos de otros insumos como las enzimas ( $\alpha$ -amilasa, AMG), reactivos químicos (diluciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , NaOH), y sales ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

En la Tabla 5.5 se presenta la composición usada de distintos lotes de boniato fresco y en la Tabla 5.6 la composición de distintos lotes de harina de boniato con diferentes humedades, utilizados en la simulación. La harina se obtendría secando un lote de boniatos frescos con la misma composición que el boniato fresco utilizado en los experimentos discutidos en el Capítulo IV (Tabla 4.1). Dicha composición coincide con el lote Boniato 3 de la Tabla 5.5.

La cantidad de material a alimentar a la planta varió de acuerdo a la situación analizada y según la materia prima utilizada. Dependiendo de las distintas situaciones planteadas, se modificaron los flujos de entradas de las materias primas, algunos de los equipos utilizados, su número, agentes de transferencia de calor, número de tachadas por año, número de tachadas en la secuencia de tachadas múltiples, tiempos de fermentación, volúmenes útiles máximos, entre otros, para poder lograr los valores de los parámetros fijados que se presentan en la Tabla 5.1. Se trabajó con tachadas múltiples para variar la velocidad del proceso y poder cumplir con los parámetros fijados (Tabla 5.1). Los distintos tipos de equipos fueron seleccionados dentro de un banco de datos que tiene el propio programa, eligiendo los más utilizados dentro de la industria de producción de bioetanol para una escala similar ( $90000 \text{ m}^3$  de etanol anuales). A cada uno de los equipos se le ingresaron los datos de las operaciones (ciclo de limpieza en el lugar (cleaning-in-place, CIP), ciclo de esterilización en el lugar (sterilization-in-place, SIP), transferencias de fluidos de equipo a equipo, cargas y descargas, venteo, fermentación, almacenamiento, etc.), los tiempos que insumen cada tarea, especificaciones de los equipos (coeficientes de transferencias, material del equipo, presión y temperatura de trabajo entre otros).

**Tabla 5.5.** Composiciones de boniato fresco usadas para la simulación (en base seca).

Composición en base seca (%)	Boniato 1	Boniato 2	Boniato 3	Boniato 4	Boniato 5
Proteína soluble	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Proteína insoluble	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
No-fermentables *	34.0	30.9	27.3	24.7	22.1
Almidón	51.7	54.8	56.3	54.8	63.8
Glucosa	1.4	1.4	2.4	5.8	1.3
Fructosa	1.2	1.2	2.6	4.0	1.2
Sacarosa	8.3	8.3	8.0	7.3	8.2
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Azúcares totales (expresados como glucosa)</b>	<b>69</b>	<b>72</b>	<b>76</b>	<b>78</b>	<b>82</b>

\* Se considera como no fermentables a las grasas, fibra cruda, cenizas y los restantes no caracterizado del boniato.

**Tabla 5.6.** Composiciones de la harina de boniato usada en la simulación de la etapa de licuefacción (en base húmeda).

Composición en base húmeda (%)	Harina 1	Harina 2	Harina 3	Harina 4	Harina 5
Proteína soluble	1.6	1.6	1.5	1.5	1.4
Proteína insoluble	1.6	1.6	1.5	1.5	1.4
No-fermentables	25.1	24.4	24.1	23.0	21.8
Almidón	51.8	50.6	49.5	47.8	45.0
Glucosa	2.2	2.2	2.1	2.1	1.9
Fructosa	2.4	2.4	2.3	2.3	2.1
Sacarosa	7.3	7.2	7.0	6.8	6.4
Humedad	8.0	10.0	12.0	15.0	20.0
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Azúcares totales (expresados como glucosa)</b>	<b>76</b>	<b>76</b>	<b>76</b>	<b>76</b>	<b>76</b>

\* Se considera como no fermentables a las grasas, fibra cruda, cenizas y los restantes no caracterizado del boniato.

## **CAPÍTULO VI:**

**Estudio del uso de la energía para las distintas condiciones y configuraciones operativas del proceso utilizando un modelo de simulación a través de un software específico**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Simulación del proceso de obtención de etanol a partir de boniato

En la Tabla 6.1 se describe los principales equipos diseñados, para cada una de las etapas: pretratamiento de la materia prima, gelatinización y licuefacción, sacarificación y fermentación, procesamiento del bioetanol, tanto para el boniato fresco como para la harina. El material de los equipos fue de acero inoxidable o acero al carbono.

En las Figuras 6.1 a 6.5, se muestran a modo de ejemplo, los diagramas de flujos de un proceso modelo de producción etanol anhidro a partir de boniato fresco (relación materia seca a agua 1:5, eficiencia de fermentación 90 %, 0.40 L/kg boniato, azúcares totales 76 %), elaborado con el programa. Las etapas de sacarificación, fermentación y separación de alcohol son comunes para las dos materias primas trabajadas (Figuras 6.2 a 6.4). En los casos que se utiliza para fermentar harina de boniato se requiere de una operación de secado y de molienda fina, previa a la etapa de licuefacción como se muestra en la Figura 6.5.

**Tabla 6.1.** Descripción de los equipos principales de la planta de producción de bioetanol.

Etapa	Equipo	Descripción	Detalle
Pretratamiento de la materia prima	HP-101	Pesaje del boniato	Tiempo de residencia 15 min
	P17 / WSH-101	Lavado del boniato	Caudal de agua 3.2 m <sup>3</sup> /h Capacidad 3000 t/h
	P25 / RDR 101	Secador rotatorio	Capacidad 1100 t/h Potencia 0.01 kW/(kg/h) Velocidad de evaporación 30 (kg/h)/m <sup>3</sup> Requerimiento de aire 5 kg/kg evaporado
	P26 / GR101	Molienda	Tiempo 45 min Capacidad 500 t/h, Potencia 0.01 kW/(kg/h)
	P17 / SR-102	Trituradora	Tiempo 30 min Capacidad 1000 t/h Potencia 400 HP
Gelatinización y licuefacción	P7 / V-103	Tanque de licuefacción	Volumen 300 m <sup>3</sup> Volumen útil 90 % Tiempo del proceso 2.4 h
Sacarificación y fermentación simultánea	P14 / HX-101	Intercambiador de calor	Coefficiente de transferencia 1500 W/m <sup>2</sup> K Área de transferencia 100 m <sup>2</sup> Temperatura salida del medio 76°C
	405E	Intercambiador de calor	Coefficiente de transferencia 1000 W/m <sup>2</sup> K Área de transferencia 1300 m <sup>2</sup> Eficiencia 95 % Temperatura de salida del medio 30°C

Etapa	Equipo	Descripción	Detalle
	P10 / FR-101	Tanque sacarificación y fermentación	Volumen 300 m <sup>3</sup> Volumen útil 83 %
Recuperación del bioetanol	501V	Desgasificador	Temperatura de operación 81°C Volumen 65 m <sup>3</sup> Volumen útil (15-90) % Volumen trabajo 50 % Tiempo de residencia 0.1 h Eficiencia de transferencia de calor 90 %
	507E	Condensador	Coeficiente de transferencia de calor 450 W/m <sup>2</sup> K Eficiencia de la transferencia 85 % Temperatura de operación 38°C Remueve el 99 % etanol (m/m)
	502TT	Columna destilación	Eficiencia por plato 36 % Velocidad lineal por vapor 1.6 m/s Temperatura de operación del condensador 104 °C Temperatura operación del reboiler 115°C
	503TT	Columna rectificadora	Eficiencia del plato 40 % Velocidad lineal del vapor 0.069 m/s Número de platos 39 Temperatura condensador 90°C Temperatura reboiler 114°C
	504TT	Stripping	Eficiencia 80 % Número de etapas 14 Temperatura condensador 90°C Temperatura reboiler 114-°C
	517 U	Tamices moleculares	Capacidad 15 t/h Remueve agua restante 97 %
	P21 / AB-101	Pileta de tratamiento	Difusión del aire 1.7 STD m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> <sub>liq</sub> /min Potencia 120 kW

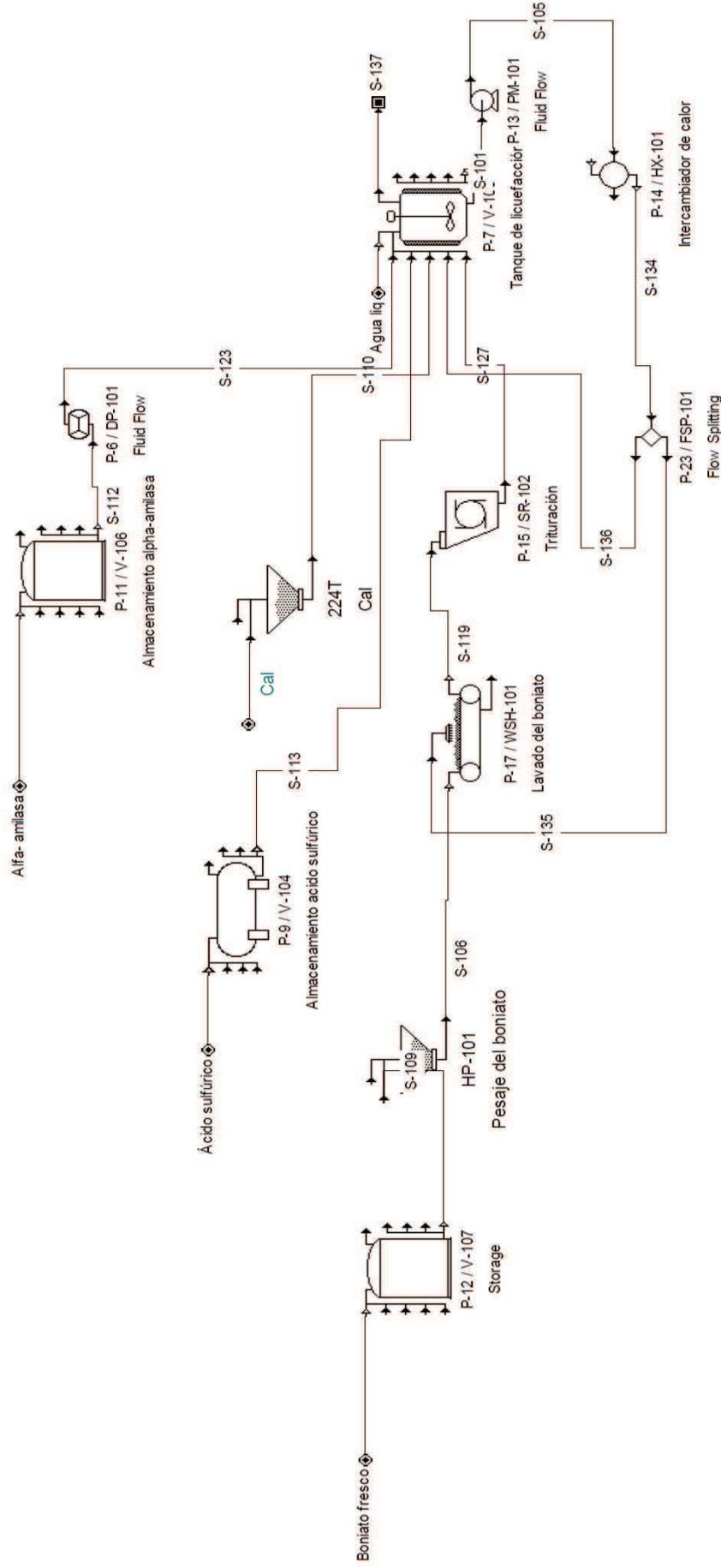
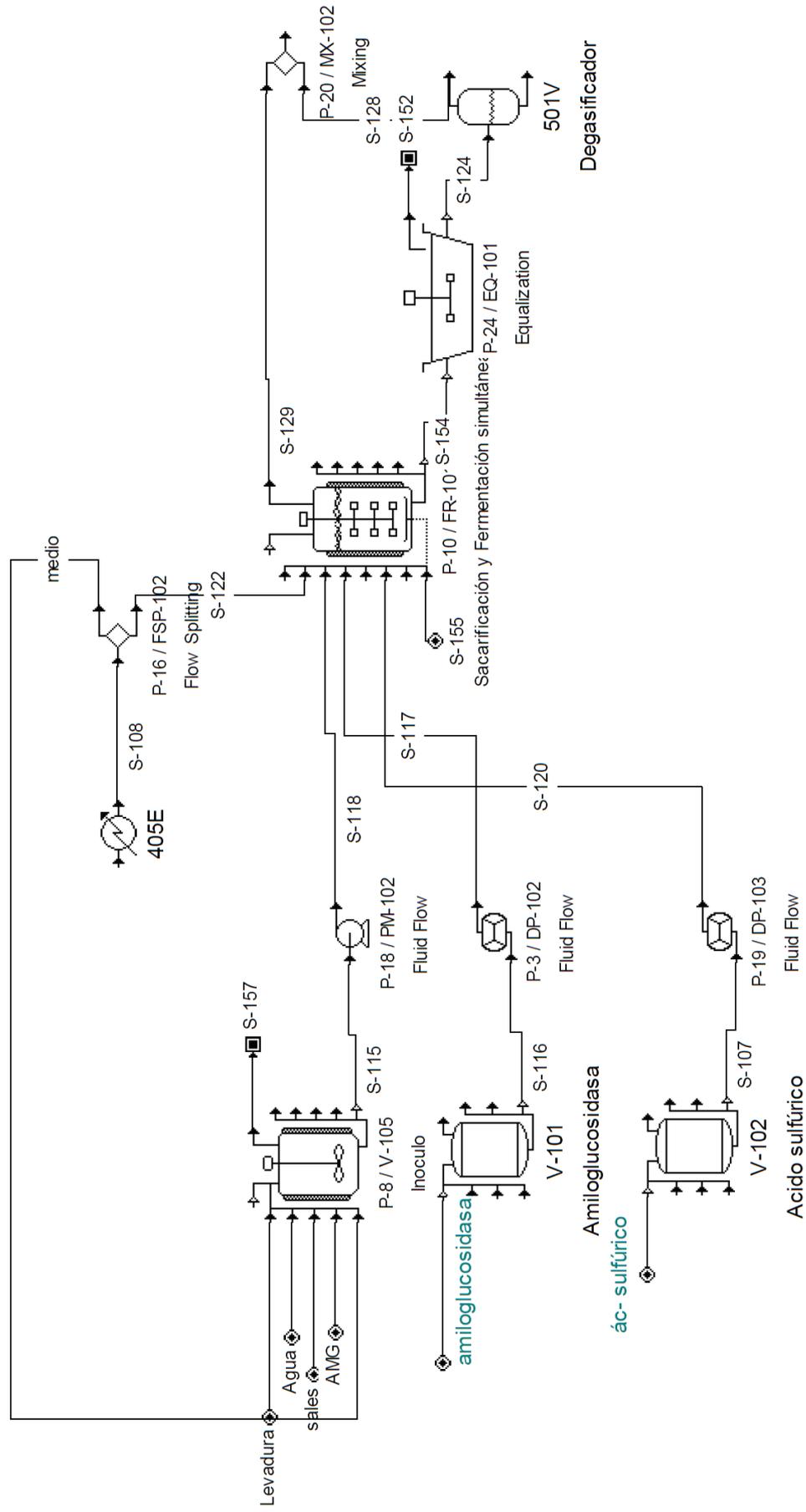


Figura 6.1. Diagrama de flujo desde el ingreso del boniato fresco a la planta hasta la etapa de licuefacción.



**Figura 6.2.** Diagrama de flujo para la etapa de sacarificación y fermentación simultánea.

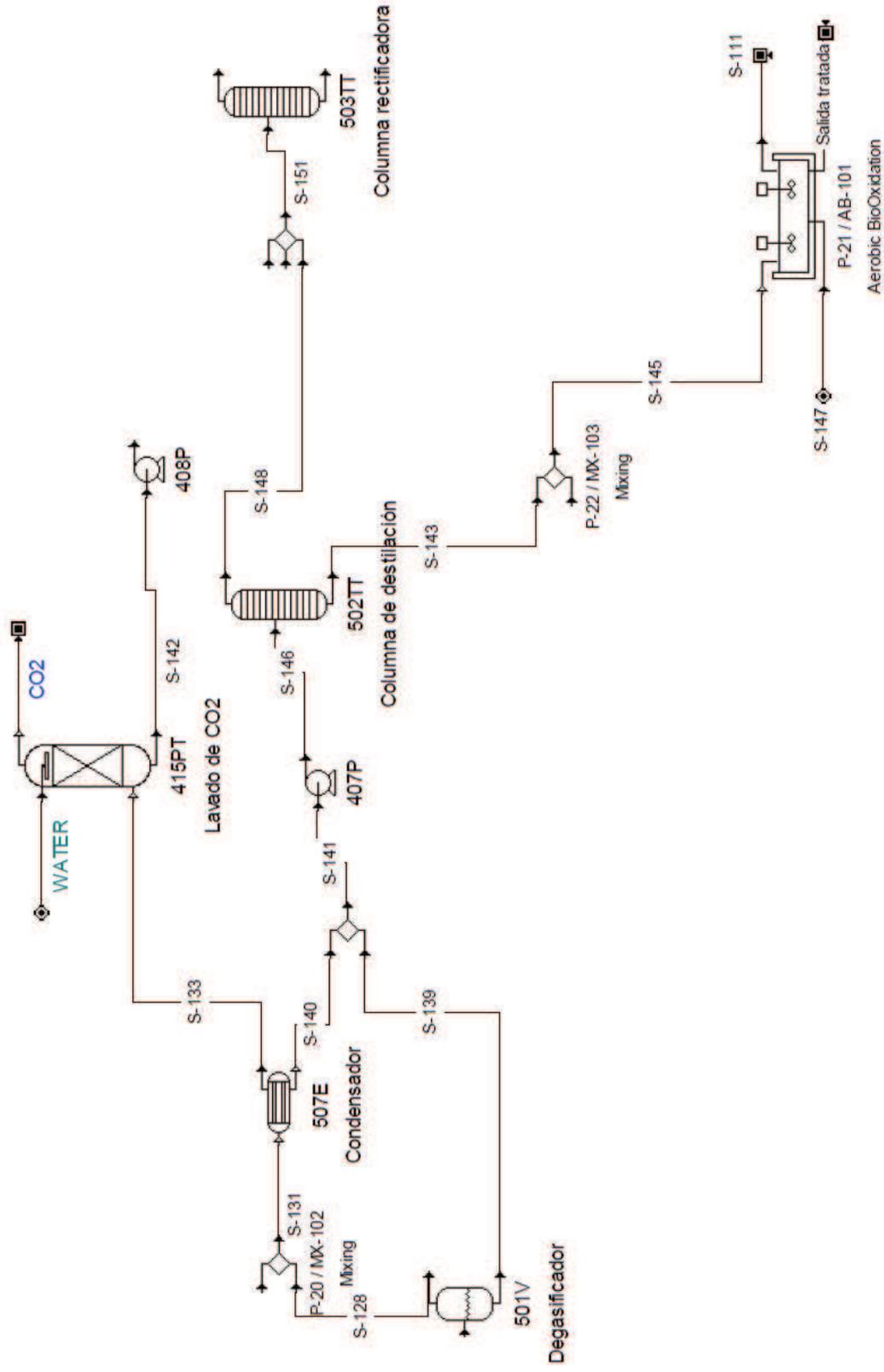


Figura 6.3. Diagrama de flujo para la etapa de destilación y tratamiento de efluentes.

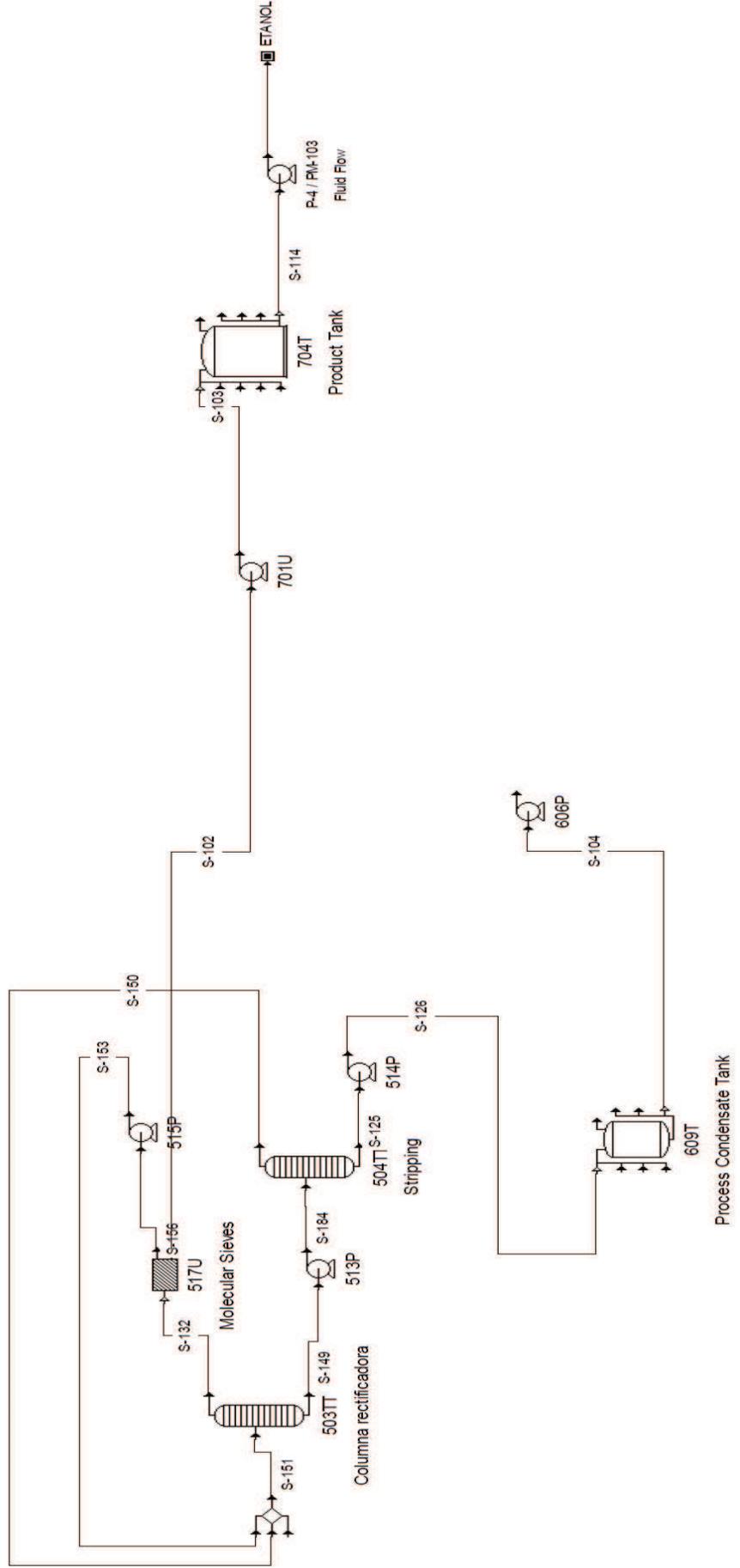


Figura 6.4. Diagrama de flujo para la etapa de destilación y obtención de etanol combustible.

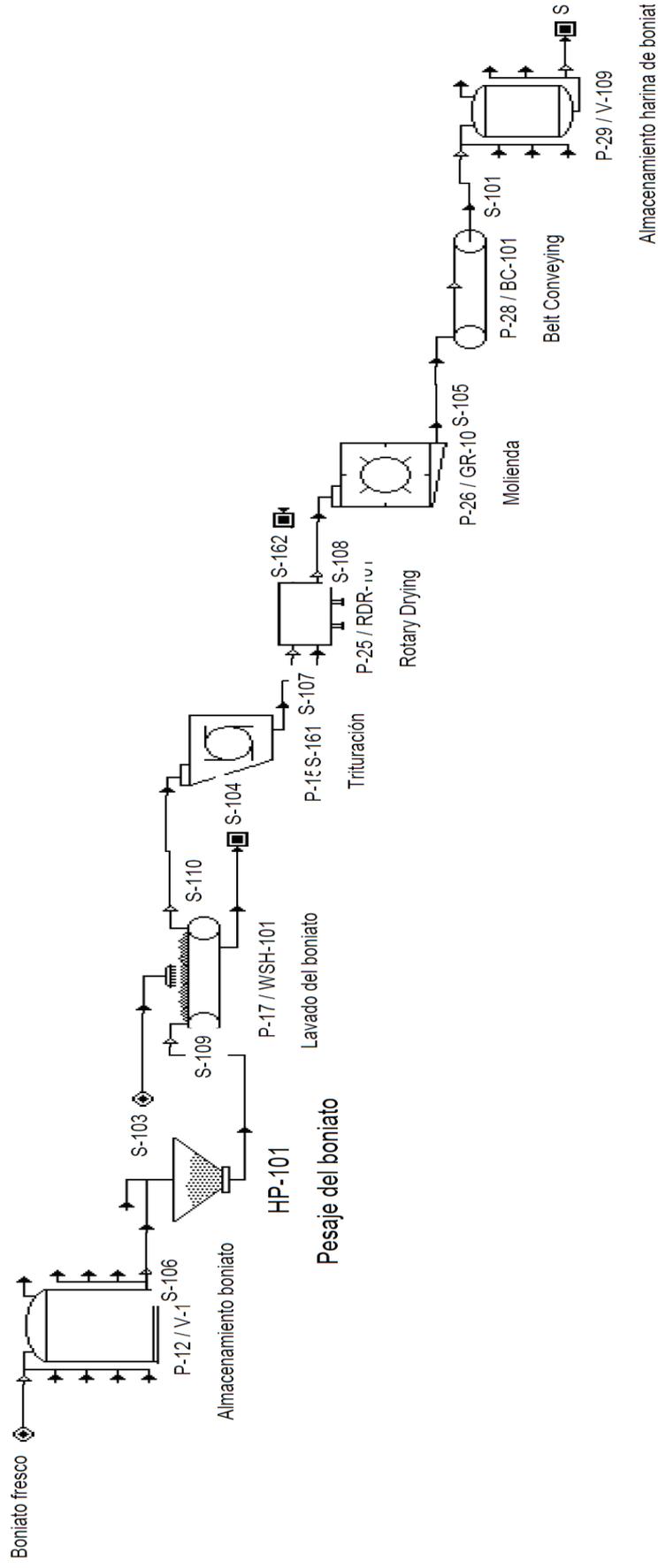
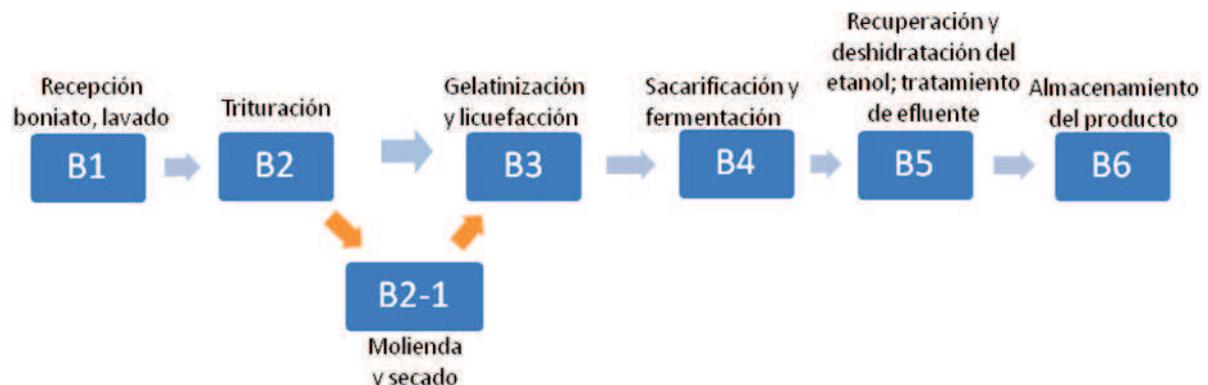


Figura 6.5. Diagrama de flujo del secado de boniato fresco, molienda y almacenamiento de la harina.

## 6.2 Descripción de las etapas del proceso simulado

Las etapas del proceso de simulación para obtención de etanol a partir de boniato se pueden dividir en: pretratamiento que incluye la recepción de la materia prima, lavado (B1) y trituración (B2); gelatinización y licuefacción (B3); sacarificación y fermentación (B4); procesamiento del bioetanol considerando la recuperación del etanol y su deshidratación (B5), y el almacenamiento del alcohol (B6). El sistema de tratamiento de efluente de todas las etapas se consideró dentro de B5 y el desarrollo de inóculo se incluyó en B4. El procesamiento de harina de boniato tuvo otra etapa de secado y molienda fina (B2-1) para la preparación de la harina. En la Figura 6.6 se muestra un diagrama de bloques para la producción de etanol a partir de boniato.



**Figura 6.6.** Diagrama de bloques para la obtención de etanol combustible utilizando como materia prima boniato.

### Pretratamiento

#### **B1 - Recepción de la materia prima, lavado**

El boniato se coloca en un depósito hasta ser ingresado en la línea de procesado. El área de almacenamiento incluye la estación de pesaje (HP-101) y de lavado del boniato (P-17/WSH-101). Primeramente se pesa en una “tolva balanza” y se realiza una limpieza para retirar objetos extraños (basura) y la mayor parte de las impurezas (tierra). El lavado consiste en trasladar los boniatos (flujo S-106) por una cinta transportadora rociando agua a través de aspersores. El agua utilizada en el lavado (flujo S-135) es agua recuperada de la corriente proveniente del tanque de condensados (S-104). Previamente el agua de reciclaje circuló por el intercambiador de calor (P14/HX-101) como fluido de intercambio para ayudar a enfriar el medio de fermentación. El agua resultante del lavado del boniato y los residuos extraños (corriente S-138) son enviados a las piletas de tratamiento de efluentes (P-21/AB-101).

## **B2, B2-1 - Trituración, secado y molienda**

El boniato limpio se trata inicialmente en un triturador giratorio (P-15/SR-102). El material triturado puede tener dos destinos, uno descarga en el tanque de licuefacción para continuar en el proceso de producción de bioetanol como boniato fresco (B3), o el otro pasa a un secador rotatorio y continúa en el proceso como harina de boniato (B2-1). En el secador (P-25/RDR-101) se lleva al boniato triturado a la humedad final deseada, que puede variar entre el 8 y 20 %. El boniato secado continúa en la línea de procesamiento (corriente S-108), yendo a una etapa de molienda más fina a través de un molino de martillos (P-26/GRD-101) y finalmente como harina puede ser almacenado (P-29/V-10). La harina deshidratada está pronta para ingresar a la etapa de licuefacción, en la cual la harina será suspendida en agua para formar una especie de puré.

### Gelatinización y licuefacción

#### **B3 - Gelatinización y licuefacción**

En los tanques de licuefacción verticales con agitación se mezclan la materia prima (boniato fresco, harina) con  $\alpha$ -amilasa (S-123), agua recuperada (S-136) y de reposición. El agua recuperada provenía del tanque de condensados (609-T) y se dividió en dos líneas en un split (P-23/FSP-101): la línea hacia el lavado o hacia el tanque de licuefacción (P-7/V-103). Se seleccionó el porcentaje de agua distribuida para cada línea en función de la relación de agua necesaria y la cantidad de boniato utilizada en el proceso. La cantidad de agua total agregada al tanque depende de la relación masa materia seca a agua estudiada y del flujo de materia prima ingresado. Al preparado se le ajusta el pH a 5.8 agregando cal (flujo S-110) o ácido sulfúrico (S-113) según corresponda. La suspensión se calienta a 86°C y una vez alcanzada la temperatura se incorpora la enzima en una proporción de 3.6 mL/kg <sub>boniato seco</sub>. La dosificación utilizada fue menor que en el caso de los ensayos experimentales discutidos en el Capítulo IV (5.4 mL/kg <sub>boniato seco</sub>), en base a estudios posteriores del Departamento de Bioingeniería, en los cuales se encontró que una dosificación de 3.6 mL/kg <sub>boniato seco</sub> era suficiente para obtener los mismos resultados de hidrólisis de boniato (Fajardo, 2011). El medio se deja a 86°C durante 1 h. En la etapa de gelatinización aumenta bruscamente la viscosidad de la suspensión del medio que se reduce al actuar la  $\alpha$ -amilasa hidrolizando el almidón a oligosacáridos en un proceso llamado licuefacción.

### Sacarificación y fermentación

#### **B4 - Sacarificación y fermentación**

La sacarificación y fermentación se realizan en forma simultánea en varios fermentadores (P-10/FR-101) de 300 m<sup>3</sup> (3 a 6 dependiendo de la cantidad de medio a ser fermentado). El medio antes de ingresar al reactor se enfría a 30°C con dos intercambiadores de tornillo en serie (P14/HX-101 y 405E). La suspensión parcialmente hidrolizada y ya diluida con agua se alimenta a los fermentadores (S-122). A la suspensión se añade AMG (S-117) y se inocula con la suspensión de cultivo de la levadura (S-118). El proceso de licuefacción reduce considerablemente el tamaño del polímero de almidón y

durante el proceso de sacarificación los oligosacáridos son convertidos a glucosa por hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa (AMG) y en la fermentación los azúcares pasan a dióxido de carbono y etanol (nuestro producto de interés).

Se agrega ácido sulfúrico (S-120) para reducir el pH del medio a 4.5. La dosis de AMG es de 3.6 mL/kg *sólido seco*. La dosis fue menor que la utilizada en el Capítulo IV por las mismas razones expuestas en la descripción de B3. La relación materia seca a agua en el reactor de fermentación varió según la situación estudiada. El medio de cultivo se inoculó con un 10 % del volumen del fermentador, con una suspensión de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* proveniente del desarrollo de inóculo con una concentración de 0.0233 kg *levadura*/L.

El desarrollo de inóculo se realizó en un prefermentador (P-8/V-105) con un medio conteniendo la mitad de los azúcares iniciales de la etapa de fermentación y añadiéndole sales de magnesio (0.12 g/L) y amonio (0.24 g/L). Se añadieron al prefermentador la suspensión de boniato (medio), los nutrientes (sales), agua, AMG y la levadura seca (23.3 g/L).

Una vez agregados todos los componentes del medio y ser inoculado el fermentador (P-10/FR-101), la suspensión tuvo un tiempo de residencia en el fermentador entre 14 y 48 h dependiendo del sustrato y la situación simulada (Tabla 5.4) a 30°C.

Se tomó un valor del 100 % para los porcentajes de conversión de sacarosa a glucosa y fructosa, y de almidón a glucosa de acuerdo con los datos experimentales discutidos en el Capítulo IV. La eficiencia de fermentación varió en el rango 70 y 92 %. La corriente de salida fermentador (S-154) tiene entre 3 y 10 % de etanol (m/m).

La mezcla de reacción se vacía en un tanque de retención (P-24/EQ-101). El fermentador se limpia y se prepara para otro ciclo del proceso. Varios fermentadores se operan a intervalos escalonados para proporcionar una alimentación continua con el sistema de destilación.

Posteriormente el medio fermentado se envía a través de un desgasificador (501V) para separar los componentes volátiles. La corriente de salida de gases en el fermentador es principalmente dióxido de carbono, etanol y agua. Estos se llevan a un condensador (507E) para separar el agua y el etanol, que se unen con la corriente líquida que llega al destilador. El dióxido de carbono se envía a una torre de lavado de gases (415PT).

### Procesamiento del etanol

#### **B5 - Recuperación del etanol y su deshidratación, tratamiento de efluentes**

El medio fermentado (flujo S-124) se precalienta a 81°C en el desgasificador (501V) antes de entrar en la columna de destilación (502TT). El líquido que sale por el fondo (flujo S-146) que contiene etanol, agua, levadura, sólidos disueltos y suspendidos principalmente, ingresa posteriormente a la columna de destilación. Los gases que escapan por la parte de arriba del equipo (S-128), que contiene dióxido de carbono y algo

de agua y etanol, se juntan con el flujo S-129 proveniente de los gases de salida del fermentador para ingresar al condensador (507E). En el condensador se remueve el 99 % etanol que estaba con los gases, al bajar la temperatura hasta unos 38°C y continua en el proceso para ser destilado (flujo S-140). Los gases que no condensaron, principalmente CO<sub>2</sub> (S-133), continúan hacia la torre de lavado de gases (415PT). La columna tiene una eficiencia global del 99.9 %. El flujo del fondo de la columna (corriente S-142) se lleva al tanque de depósito de los condensados (609T).

La diferencia en las temperaturas de ebullición del etanol (78°C) y el agua (100°C) permite que el agua se separe del etanol por calentamiento en las columnas de destilación. La destilación se realiza en dos grandes etapas, utilizándose una columna de destilación para la primera etapa y una columna rectificadora para la segunda. En la columna de destilación (502TT) se recupera etanol del medio fermentado. Se obtiene una mezcla de etanol y agua, en una relación de aproximadamente 1:1. El agua de esta mezcla se separa en la etapa de rectificación, y posterior tratamiento con tamices moleculares. La columna de destilación tiene una eficiencia por plato de 36 % y una eficiencia global del 88 %. La parte inferior de la columna se encuentra a una temperatura de 115°C. Por el fondo de la columna de destilación (corriente S-143) se retira la mayor parte del agua y materiales no fermentables y se envía a las piletas de tratamientos de residuos. En la parte superior sale una mezcla de etanol-agua (flujo S-148) que se mezcla con las corrientes que recuperan parte del etanol de la corriente gaseosa del Stripping (504T) y de los tamices moleculares (flujo S-153) para ingresar en la torre de rectificación.

La columna de rectificación (503TT) tiene una eficiencia por plato del 40 % y se opera con una temperatura de reboiler de 114°C. El destilado (flujo S-132) que contiene principalmente el etanol se envía a los tamices moleculares (517U). El sistema de columnas de destilación/rectificación puede producir 95 % de pureza del etanol. En este punto, el etanol y el agua forman un azeótropo, lo que significa una mayor separación por el calor no puede ocurrir. La corriente S-149 que sale del fondo de la columna rectificadora sigue hacia la columna de stripping (504T) para recuperar el etanol que pudo quedar sin evaporarse. Esta columna tiene una eficiencia global del 80 %.

Para obtener etanol anhidro (mayor al 99.2 % (v/v)) se utilizan tamices moleculares. Estos están compuestos de sustancias microporosas, diseñados para separar pequeñas moléculas de las de mayor tamaño, y capturan la última cantidad de agua remanente. Los tamices moleculares son regenerados por calentamiento, para eliminar el agua.

Todas las aguas residuales del proceso (corriente del fondo de la columna de destilación, S-143 y agua de lavado, S-138) ingresaron a la pileta de tratamiento (P-21/AB-101) para ser tratadas por digestión aeróbica. Se generan aproximadamente (540-1960) t/h en la corriente S-143 y (20-500) t/h en la de S-138 de aguas residuales. La pileta fue diseñada para tener 14 horas de tiempo de retención.

## Producto final

### **B6 - Almacenamiento del etanol**

La simulación del proceso se realizó para obtener 282 m<sup>3</sup> de etanol combustible por día, que corresponde a 90.000 m<sup>3</sup>/año, obteniéndose tanto para el boniato fresco como para la harina entre 0.34 a 0.48 L/kg <sub>boniato seco</sub> dependiendo de las condiciones del proceso. El etanol anhidro permanece en un tanque (704T) hasta su transporte para la venta como combustible añadido.

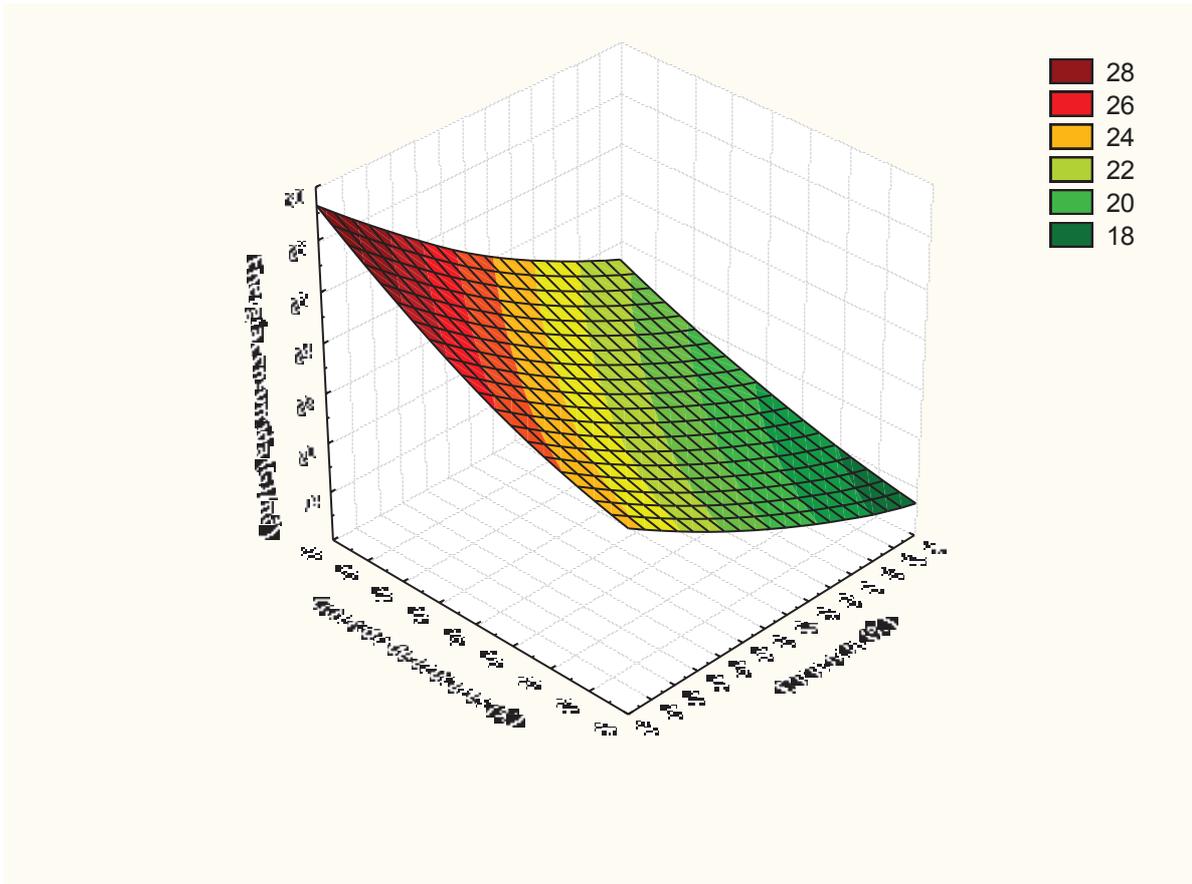
## **6.3 Estudio de sensibilidad para el boniato fresco**

### **6.3.1 Estudio de sensibilidad para boniato fresco**

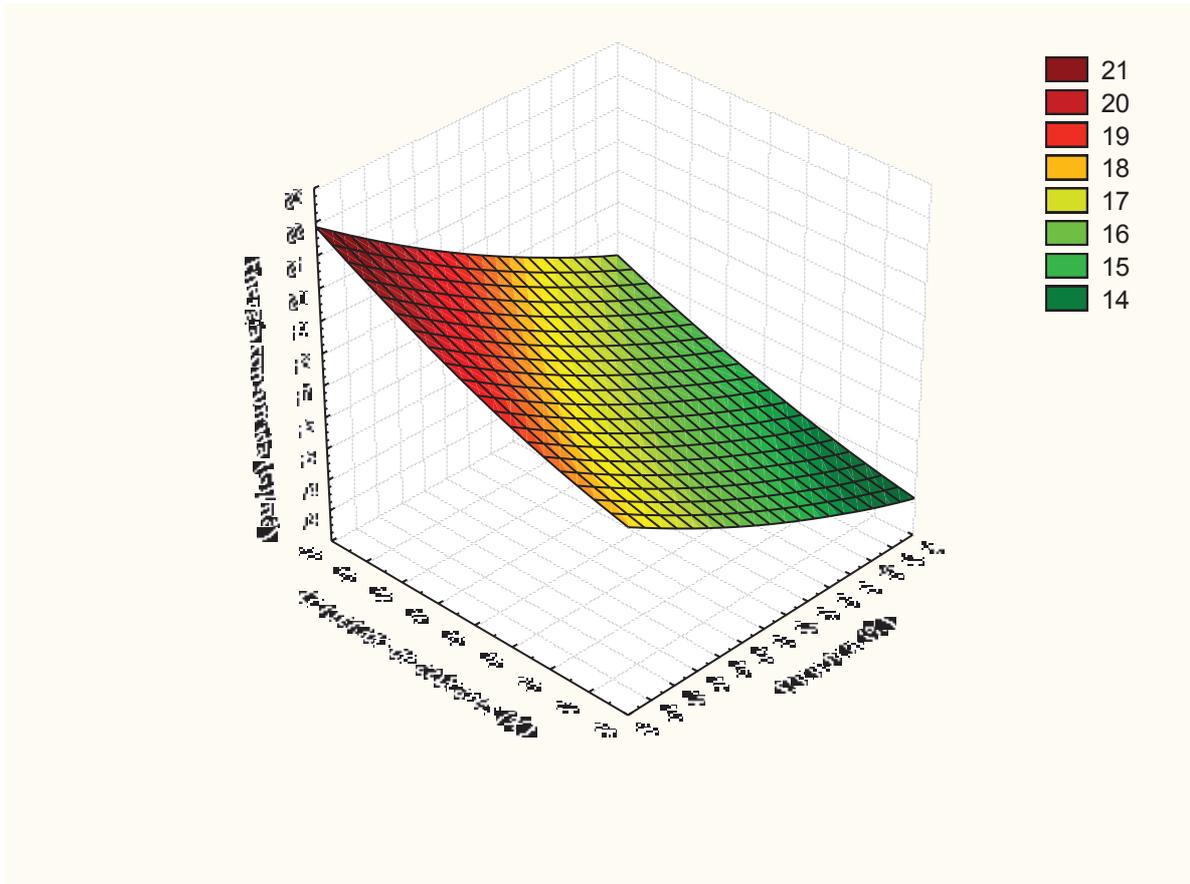
Para que un balance de energía sea viable se debe tener que la energía necesaria para producir una unidad de biocombustible sea menor que la energía que sale del sistema (energía que se obtendría en la combustión del etanol producido: 21 GJ/m<sup>3</sup><sub>etanol</sub>). Si esto no se da, hay que ver qué tipo de energía se utiliza para satisfacer las necesidades energéticas, a efecto de asegurar una real sustitución de la fuente fósil por energía renovable.

En las Figuras 6.7 a 6.11 se muestran las curvas de consumo de energía del proceso global de etanol expresados como GJ/m<sup>3</sup> para las distintas relaciones materia seca a agua total en función del contenido de azúcares totales del boniato expresados como equivalentes de glucosa y la eficiencia de fermentación. Se obtuvieron consumos energéticos inferiores a 21.1 GJ/m<sup>3</sup><sub>etanol</sub> para las relaciones 1:6, 1:5, 1:4 y 1:2.7 que hacen que el sistema energético sea viable para todas las condiciones estudiadas de eficiencia y contenido de azúcares de boniato. Para la relación 1:8, el balance energético es más favorable cuando el contenido de azúcares del boniato es mayor al 72 % y la eficiencia de fermentación supera el 90 %. También se consigue un proceso favorable cuando la eficiencia es de 85 % y los azúcares superan el 76 % o si la eficiencia es 80 % solo para un contenido de azúcar del 82 %.

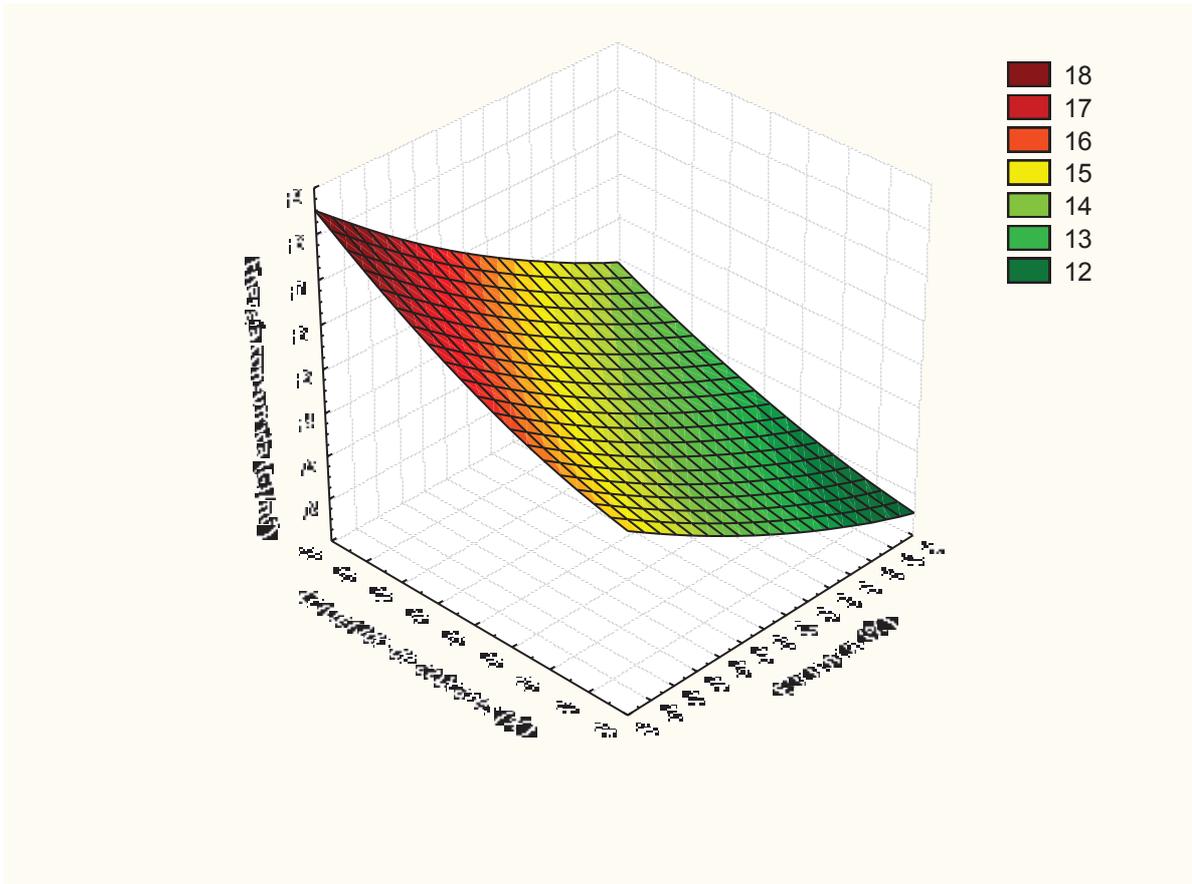
Dadas las distintas relaciones materia seca a agua total estudiadas en esta simulación se obtuvo un rendimiento entre 0.31 a 0.47 L <sub>etanol</sub>/kg <sub>boniato seco</sub>, donde el valor de 0.31 corresponde a la eficiencia y contenido de azúcares del boniato más bajos (70 % y 69 %, respectivamente) y el 0.47 a los más altos (0.92 % y 82 % de azúcares respectivamente). Estos valores están dentro de los niveles reportados para las tecnologías actuales para maíz, 0.42 L etanol por kg base seca con el proceso de molienda húmeda (Bothast y Schlicher, 2005).



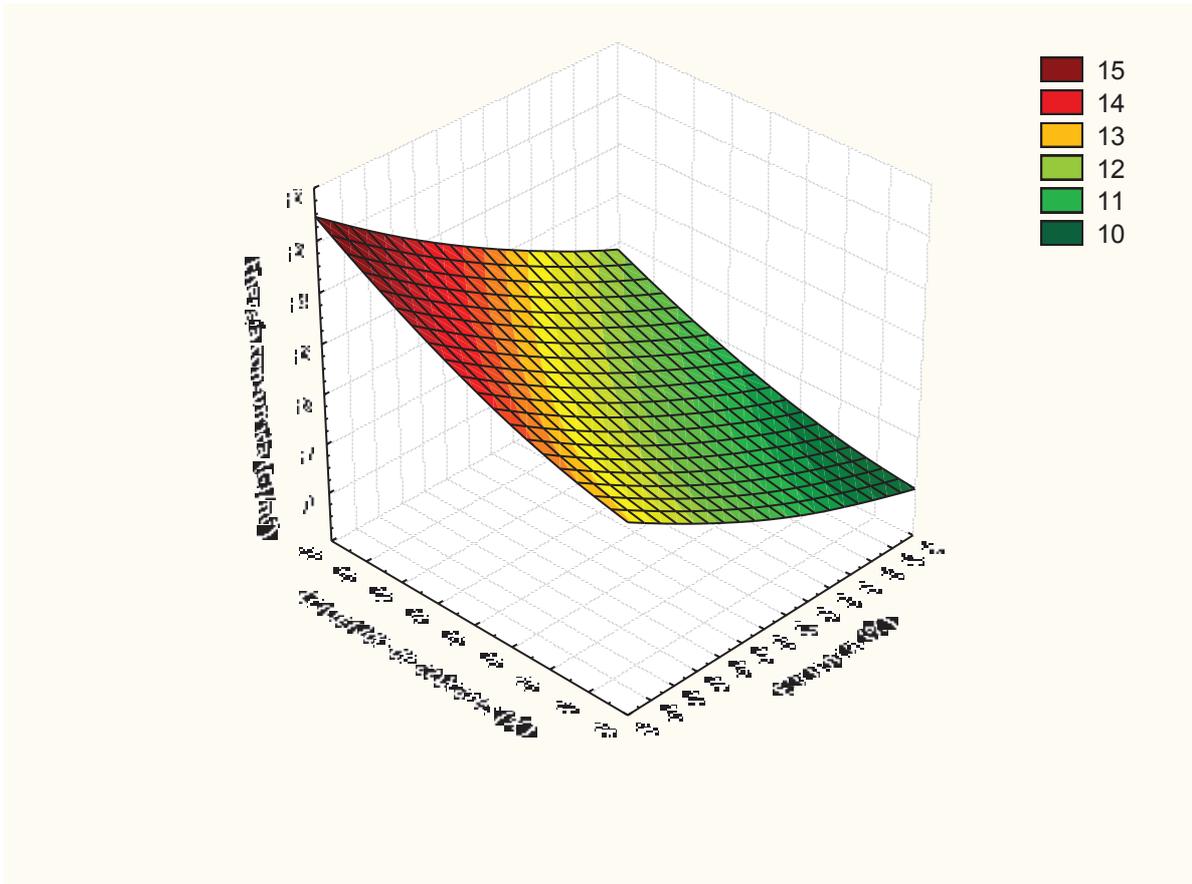
**Figura 6.7.** Curva de superficie obtenida a partir de valores de energía consumida en el proceso que utiliza boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:8 en función de las eficiencias de fermentación y del contenido de azúcares del boniato (expresados en equivalentes de glucosa).



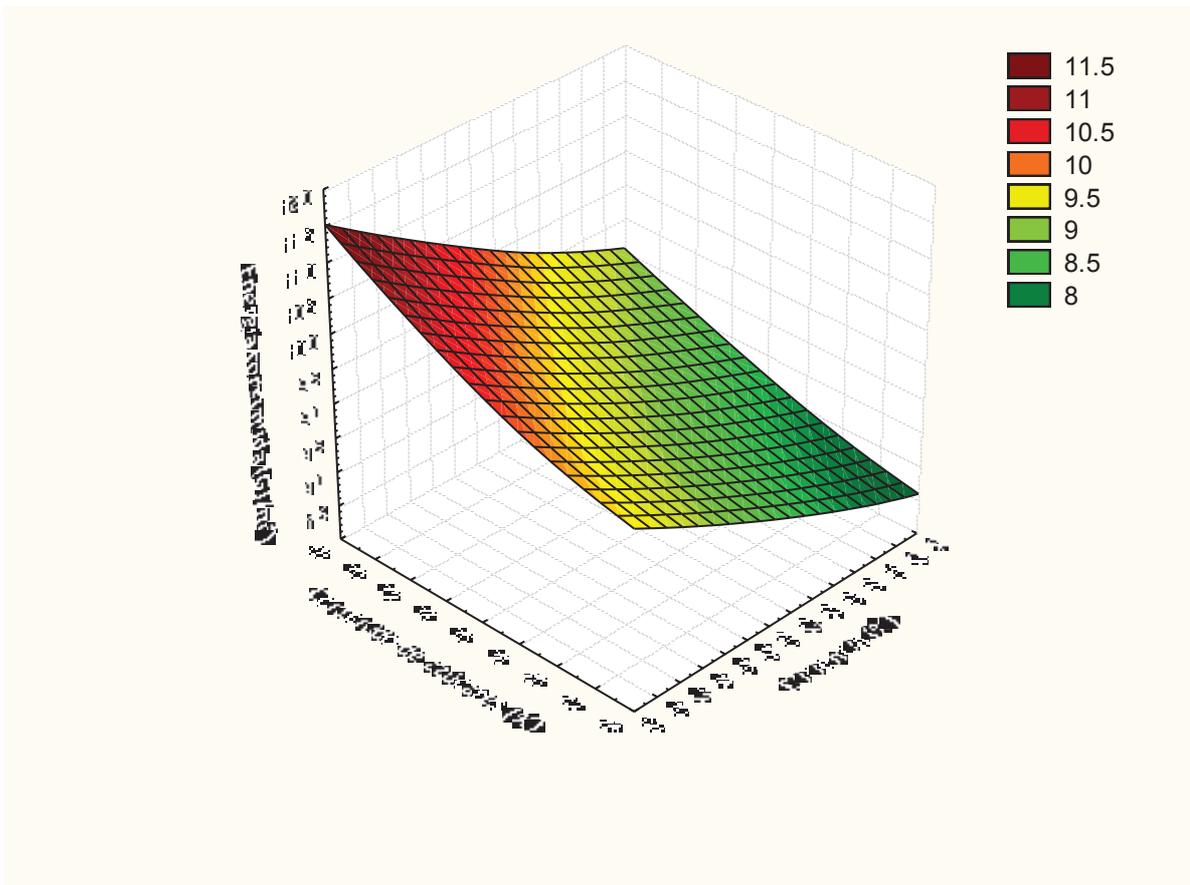
**Figura 6.8.** Curva de superficie obtenida a partir de valores de energía consumida en el proceso que utiliza boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:6 en función de las eficiencias de fermentación y del contenido de azúcares del boniato (expresados en equivalentes de glucosa).



**Figura 6.9.** Curva de superficie obtenida a partir de valores de energía consumida en el proceso que utiliza boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:5 en función de las eficiencias de fermentación y del contenido de azúcares del boniato (expresados en equivalentes de glucosa).



**Figura 6.10.** Curva de superficie obtenida a partir de valores de energía consumida en el proceso que utiliza boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:4 en función de las eficiencias de fermentación y del contenido de azúcares del boniato (expresados en equivalentes de glucosa).



**Figura 6.11.** Curva de superficie obtenida a partir de valores de energía consumida en el proceso que utiliza boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:2.7 en función de las eficiencias de fermentación y del contenido de azúcares del boniato (expresados en equivalentes de glucosa).

Se utilizó el siguiente modelo polinómico de segundo orden para encontrar una relación entre el consumo energético y las variables: relación de materia seca a agua, eficiencia de fermentación y contenido de azúcares totales del boniato:

$$\text{Energía} = aR^2 + bE^2 + cA^2 + dR + eE + fA + gRE + hAE + iAR + j$$

siendo: Energía = energía consumida en el proceso global (GJ/m<sup>3</sup><sub>etanol</sub>);  
 R = relación materia seca a agua (kg sólidos secos/kg agua total);  
 E = eficiencia de fermentación (%);  
 A = azúcares totales expresados como equivalentes de glucosa en base seca (% m/m).

Se estimaron los coeficientes del modelo haciendo un ajuste no lineal de los resultados con el software Statistica (versión 7; Stats oft, Inc. 2004, Tulsa, OK, USA). Se utilizaron los valores obtenidos en la simulación del proceso y sus valores normalizados. La Tabla 6.2 y 6.3 presentan los valores de los coeficientes obtenidos y datos estadísticos relevantes. Se obtuvo un buen ajuste del modelo a los datos simulados con un R<sup>2</sup>= 0.99.

Los valores de la variable R son mucho más pequeños (0.125 - 0.37) que los valores de las variables restantes, eficiencia (70 - 92) y contenido de azúcares (69 - 82). Para poder evaluar el peso relativo de cada una de ellas a través de la comparación de los parámetros; se normalizaron. La normalización es una medida de estandarizar los distintos valores de las variables independientes, de manera que cada valor de la variable x del proceso, puede ser convertido en un valor z (con media cero y desviación estándar uno), el cual depende de la media y de la desviación estándar de la distribución original (López, 2009):

$$z = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

El valor de la media para cada variable se determinó como:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Y la desviación estándar se calculó como:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

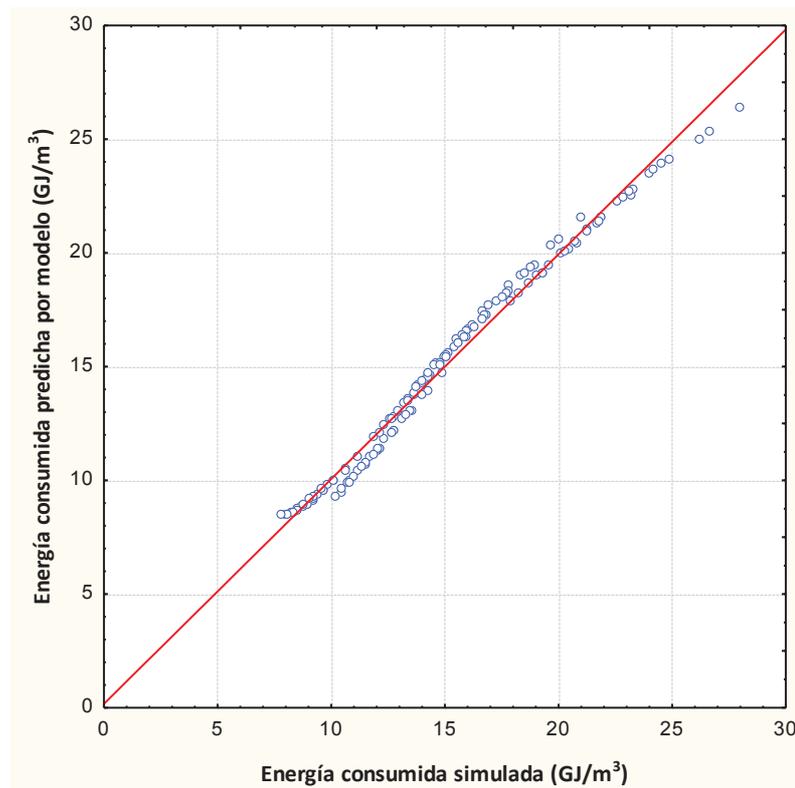
**Tabla 6.2.** Coeficientes del modelo y datos estadísticos relevantes, calculados a partir de los valores obtenidos.

	<b>Coeficiente del modelo</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
a	251	7	38.3	0.0000
b	0.0020	0.0009	2.5	0.015
c	0.005	0.002	2.4	0.018
d	-285	10	-28.3	0.0000
e	-0.9	0.2	-5.2	0.0000
f	-1.4	0.4	-3.9	0.0001
g	0.67	0.06	10.9	0.0000
h	0.003	0.001	2.3	0.021
i	0.7	0.1	6.9	0.0000
j	153	16	9.6	0.0000
$R^2$	0.99			

**Tabla 6.3.** Coeficientes del modelo y datos estadísticos relevantes, calculados a partir de los valores normalizados.

	<b>Coefficiente del modelo</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
a	1.81	0.05	37.3	0.0000
b	0.13	0.05	2.4	0.019
c	0.11	0.05	2.3	0.022
d	-5.29	0.05	-97.0	0.0000
e	-1.25	0.04	-28.9	0.0000
f	-0.87	0.04	-20.7	0.0000
g	0.44	0.04	10.5	0.0000
h	0.10	0.04	2.3	0.025
i	0.28	0.04	6.7	0.0000
j	12.8	0.1	131.3	0.0000
$R^2$	0.99			

Para confirmación del modelo se muestra gráficamente en las Figuras A.9.1 (ANEXO 9) y 6.12, donde se comparan los valores de energía obtenidos experimentalmente con los dados por el modelo global simple y el modelo global normalizado, respectivamente.



**Figura 6.12.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos con el modelo global normalizado.

Todos los coeficientes asociados a las variables fueron significativos ( $p < 0.05$ ). Todos los factores evaluados tienen un efecto significativo sobre el consumo de energía. Los

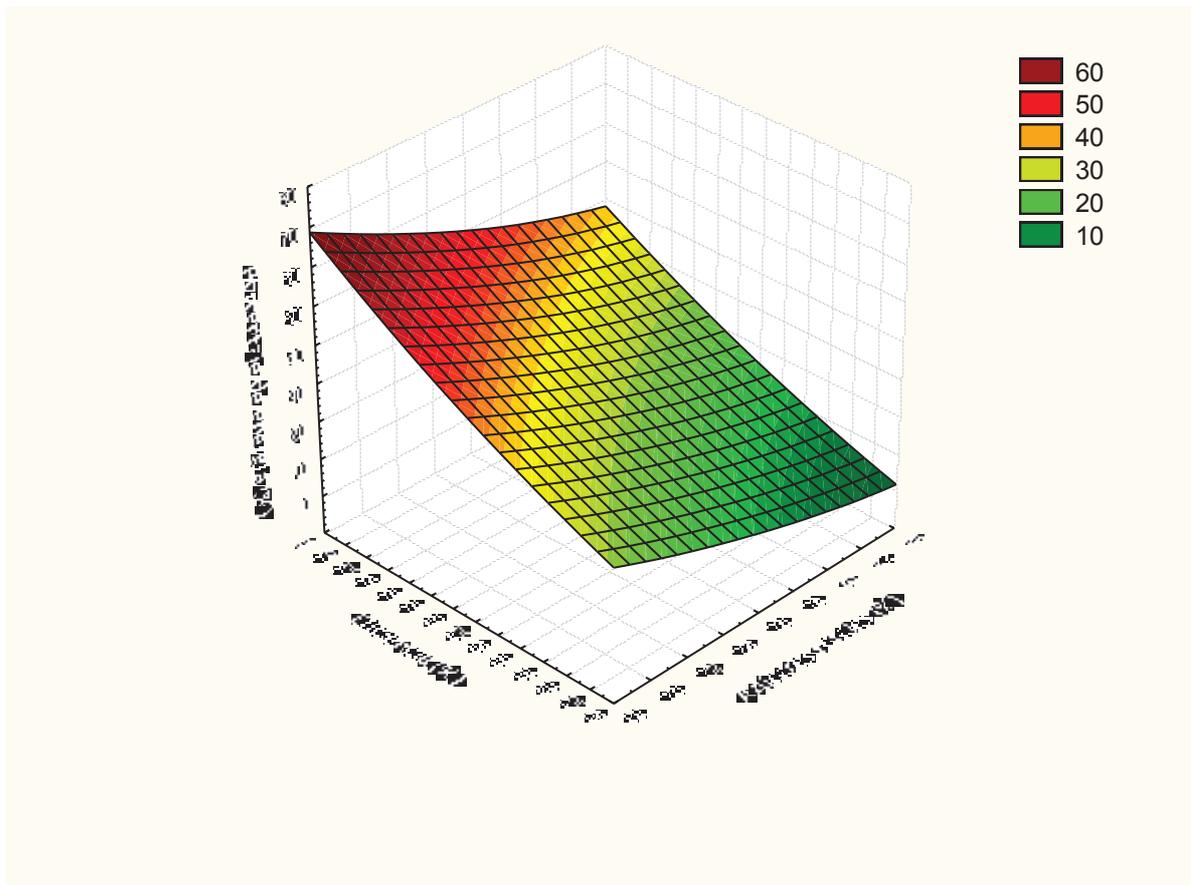
efectos de primer orden, coeficientes d, e, f, fueron los más importantes y de valor negativo, al aumentar los niveles de dichos factores disminuye el consumo de energía. Este impacto es menor al aumentar dichos factores debido a que los efectos de segundo orden, coeficientes a, b, c, son positivos. Los efectos de interacción fueron todos significativos (coeficientes g, h, i). Por lo tanto, el valor a partir del cual un factor dado tiene un impacto menor sobre el consumo de energía dependió del valor de los factores restantes. Esto se discute más adelante en el manuscrito.

De análisis de los coeficientes del modelo polinómico se puede concluir que el parámetro más influyente es la relación materia seca a agua, ya que en la ecuación normalizada se observa que los mayores coeficientes están acompañando a esta variable. A la relación materia seca le sigue en orden de importancia, la eficiencia de fermentación y finalmente el contenido de azúcares en el medio.

En el ANEXO 10 se muestra el desarrollo de un modelo específico para cada relación materia a agua total, tomando como parámetros independientes la eficiencia de fermentación y el contenido de azúcares.

En Estados Unidos el bioetanol consume 13.7 GJ de energía por m<sup>3</sup> de etanol producido in situ a partir de maíz (Bothast y Schlicher, 2005). Se obtuvieron con esta simulación valores similares o incluso inferiores para las relaciones más concentradas, a partir de la relación 1:5. Dada las grandes dificultades de manipulación de la suspensión de boniato se considera más aceptable trabajar con relación materia seca a agua total de 1:5.

En las fermentaciones con boniato fresco se consiguieron valores de eficiencias entre 90 y 93 %, por lo cual se compararon los porcentajes de consumo energético respecto al proceso con relación 1:5, eficiencia del 90 % (conservadora) y azúcares promedio (76 %) en las Figuras A.11.1 a A.11.4 del ANEXO 11. A modo de ejemplo se muestra la curva para la relación 1:6 que posee valores más favorables (negativos) y menos favorable (positivos) de porcentaje de comparación de energías consumidas en la Figura 6.13.



**Figura 6.13.** Curva de superficie obtenida a partir del porcentaje de energía necesaria para obtener etanol a partir de boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:6 respecto a la energía consumida en el proceso que cumple las siguientes condiciones: relación 1:5, azúcares totales 76 % y eficiencia de fermentación de 90 %.

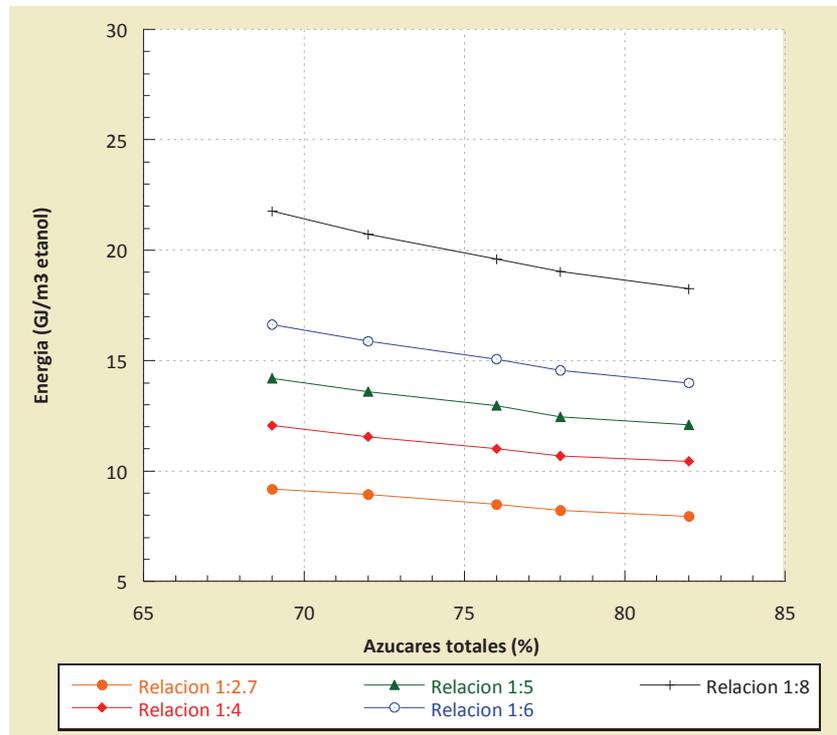
### 6.3.2 Estudio de la variabilidad en el contenido de azúcares del boniato fresco

Se estudió el efecto del contenido de azúcares en el boniato y la relación materia seca a agua sobre el consumo energético del proceso, para cada eficiencia de fermentación (Figuras A.12.1 a A.12.5 de ANEXO 12).

En la Figura 6.14 se observan los perfiles de consumo energético en el proceso global cuando se producen variaciones en el contenido de azúcares del material y de la relación materia seca a agua en el medio para una eficiencia de fermentación de 90 %. El gasto energético disminuye al aumentar el contenido de azúcares en el boniato. La simulación muestra que para una variación de azúcares en el rango 82 a 69 %, el consumo de energía cambia tan sólo entre 11 y 18 % dependiendo de la relación materia seca a agua estudiada.

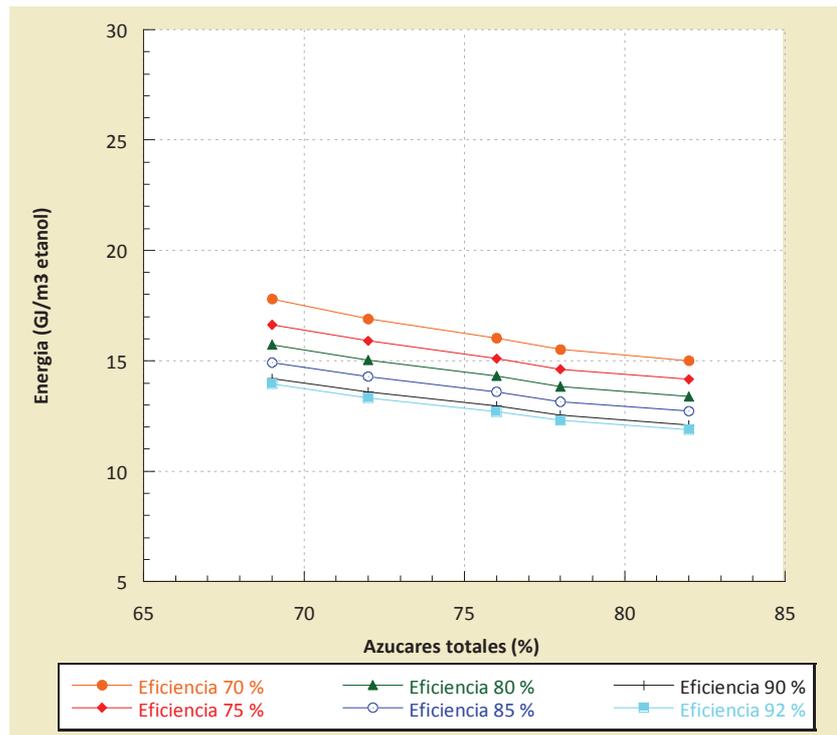
Para una relación materia seca a agua de 1:5 y asumiendo un 90 % de eficiencia de fermentación (aproximada a las obtenidas experimentalmente), al aumentar el

contenido de azúcares del boniato un 10 % (de 69 a 76 %, por ejemplo), el consumo energético del proceso disminuye en una misma cantidad (~ 10 %).



**Figura 6.14.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 90 %.

En la Figura 6.15 se observan los perfiles de consumo de energía en el proceso global cuando se producen ciertas variaciones en la composición del material y en la eficiencia de fermentación cuando la relación materia seca a agua total en el medio es 1:5. Se puede observar que el gasto energético disminuye al aumentar los valores del contenido de azúcares expresados en equivalentes de glucosa y sus perfiles son similares entre sí. Cuando la eficiencia de fermentación se incrementa en un 31 % (de 70 a 92 %), el consumo energético decrece aproximadamente en un 20 % para todos los contenidos de azúcares. En las Figuras A.13.1-A.13.4 del ANEXO 13 se muestran los perfiles para las otras relaciones.



**Figura 6.15.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la eficiencia de fermentación para una relación materia seca a agua de 1:5.

**Tabla 6.4.** Influencia de la composición del boniato en el consumo energético del proceso global de producción de bioetanol.

Parámetro estudiado			Energía consumida (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )	Porcentaje de incremento en valor energético en el rango (%)
Composición de azúcares totales (%)	Eficiencia de fermentación (%)	Relación masa seca a agua		
69	70 - 92	1:8 - 1:2.7	9.05 – 27.95	209
72	70 - 92	1:8 - 1:2.7	8.73 – 26.61	205
76	70 - 92	1:8 - 1:2.7	8.34 – 24.84	198
78	70 - 92	1:8 - 1:2.7	8.06 – 24.01	198
82	70 - 92	1:8 - 1:2.7	7.82 – 23.15	196

En la Tabla 6.4 se estudia la variación en el contenido de azúcares del boniato fresco respecto a los cambios de eficiencias de fermentación y relación de sólidos en el medio. La simulación realizada con los valores encontrados experimentalmente de contenido de azúcares en el rango 69 – 82 %, recibe tan sólo un 13 % de incremento en el consumo energético para cada composición y entre un 16 – 21 % en el proceso global.

En la Tabla 6.5 se fijaron los valores de eficiencias de fermentación y se dejó variar libremente las demás variables, observándose una variación en los porcentajes de incrementos energéticos del 64 % entre la eficiencia del 70 % al 92 %. Y la energía consumida se modificó entre un (5 – 31) % en los valores límites.

**Tabla 6.5.** Influencia de la eficiencia de fermentación en el consumo energético del proceso global de producción de bioetanol.

Parámetro estudiado			Energía consumida (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )	Porcentaje de incremento en valor energético en el rango (%)
Composición de azúcares totales (%)	Eficiencia de fermentación (%)	Relación masa seca a agua		
69 – 82	70	1:8 - 1:2.7	9.55 – 27.95	193
69 - 82	75	1:8 – 1:2.7	10.59 – 26.19	147
69 – 82	80	1:8 – 1:2.7	10.07 – 24.21	140
69 – 82	85	1:8 – 1:2.7	9.54 – 21.85	129
69 - 82	90	1:8 – 1:2.7	9.19 – 21.75	137
69 – 82	92	1:8 – 1:2.7	9.05 – 21.27	135

En la Tabla 6.6 se variaron los porcentajes de azúcar y las eficiencias dejando fijo los valores de materia seca a agua para obtener los valores de energía consumida para cada relación. Esto condujo en un incremento entre el (129 - 152) % en la energía consumida al pasar de una relación 1:2.7 a 1:8. Y la variación en el incremento en cada relación fue del 14 %, paso de un 42 % a 56 %.

**Tabla 6.6.** Influencia de la relación de solutos en el medio de fermentación en el consumo energético del proceso global de producción de bioetanol.

Parámetro estudiado			Energía consumida (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )	Porcentaje de incremento en valor energético en el rango (%)
Composición de azúcares totales (%)	Eficiencia de fermentación (%)	Relación masa seca a agua		
69 – 82	70 - 92	1:2.7	7.82 – 11.11	42
69 - 82	70 - 92	1:4	10.20 – 14.87	46
69 – 82	70 - 92	1:5	11.89 – 17.79	50
69 – 82	70 - 92	1:6	13.69 – 20.98	53
69 - 82	70 - 92	1:8	17.91 – 27.95	56

Dado los valores obtenidos de incrementos para cada situación se puede observar que la relación de sólidos afecta más el consumo de energía del proceso como se obtuvo en el modelo matemático.

### 6.3.3 Estudio de sensibilidad para la harina y comparación con el boniato fresco

Se analizaron los porcentajes de consumo energético de cada una de las etapas del proceso de obtención de etanol combustible para una relación intermedia 1:5. Para boniato fresco, las etapas que presentaron mayor consumo fueron la conversión de azúcares y fermentación, y el procesamiento del bioetanol (destilación y deshidratación), que tuvieron un gasto del 16.1 y 83.7 %, respectivamente (Tabla 6.7). La etapa de secado para la harina, representa un 68.1 % del consumo total de energía del proceso y le sigue la etapa de destilación y deshidratación del etanol con un 31.6 %, las restantes resultan

insignificativas. El consumo energético para el proceso que utiliza harina para la fermentación alcohólica (~ 36 GJ) supera 181.4 veces el gasto insumido cuando se utiliza boniato fresco como materia prima (~ 13 GJ).

**Tabla 6.7.** Influencia del proceso de secado y molienda en el consumo energético del proceso global de producción de bioetanol para boniato con 76 % de azúcares totales, eficiencia de fermentación del 90 %, relación sólido a agua de 1:5.

Etapas del proceso	Boniato fresco		Harina de boniato	
	Consumo energético (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )	Porcentaje en el proceso global (%)	Consumo energético (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )	Porcentaje en el proceso global (%)
Manipulación y molienda	0.02	0.2	0.11	0.3
Secado	----	----	24.45	68.1
Conversión azúcares, desarrollo de inóculo y fermentación	2.06	16.1	0.01	< 0.1
Procesamiento de bioetanol	10.68	83.7	11.34	31.6
<b>Total</b>	<b>12.76</b>	<b>100</b>	<b>35.91</b>	<b>100</b>

La etapa de secado y molienda para obtener la harina de boniato representa un gasto energético alto (60 - 81) % en el proceso global (Tabla 6.7). Dado un PCI de etanol anhidro de 6400 kcal/kg, la energía contenida en el combustible sería de 21.1 GJ/m<sup>3</sup><sub>etanol</sub>, valor inferior a la energía consumida en la etapa de secado. Por lo tanto, no sería recomendable secar el boniato ya que el gasto energético que implica el proceso de secado supera a la energía que sería capaz de dar la combustión del etanol producido.

**Tabla 6.8.** Influencia del proceso de secado y molienda en el consumo energético del proceso global de producción de bioetanol para la harina de boniato.

Composición de Azúcares totales (%)	Parámetro estudiado			Porcentaje de energía consumida del proceso global secado y molienda (%)	Energía consumida en secado y molienda (GJ/m <sup>3</sup> <sub>etanol</sub> )
	Eficiencia de fermentación (%)	Relación masa seca a agua	Humedad final de la harina (%)		
69 - 82	90	1:5	8	68.4 - 70.0	23.0 - 27.6
76	70 - 92	1:5	8	69.0 - 69.4	24.4 - 30.8
76	90	1:8 - 1:2	8	60.2 - 80.9	24.6 - 24.8
76	90	1:5	8 - 20	67.8 - 68.7	23.1 - 24.6

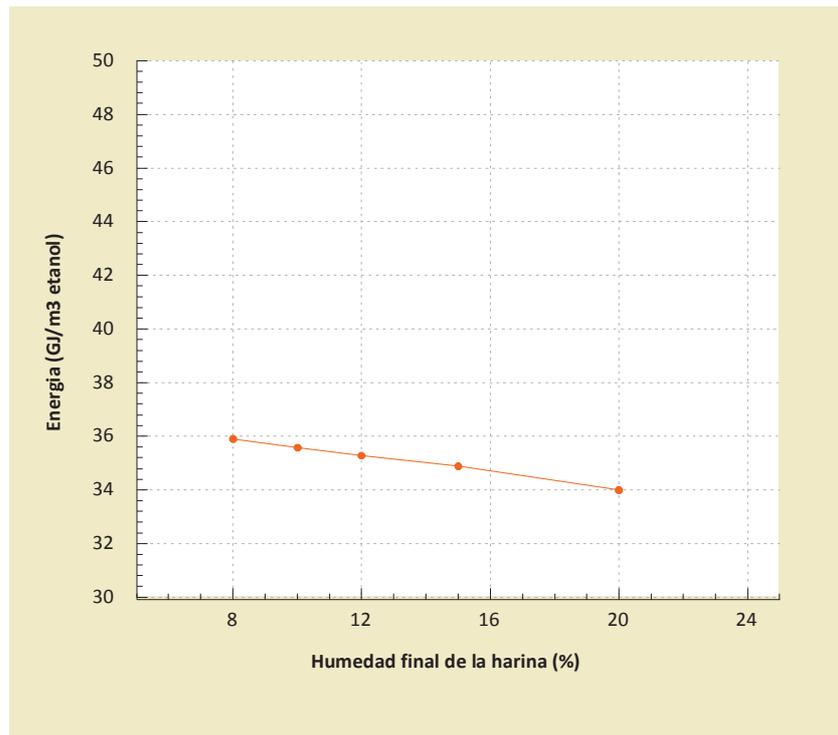
Como muestra la Tabla 6.8, para todas las condiciones estudiadas para la harina la energía global del proceso superó los 21.1 GJ. A pesar de ello, analizaremos las grandes tendencias para la harina de boniato. La variación de la eficiencia de fermentación no afecta el porcentaje de consumo en las etapas de pretratamiento. Sin embargo, se ve incrementado en un 26.2 % la energía consumida por m<sup>3</sup> de etanol producido al pasar de una eficiencia del 92 a 70 %. Al contrario de lo anterior, la relación materia seca a agua en el medio de fermentación influye sobre el porcentaje de consumo de energía en el

pretratamiento, pero no respecto a los  $\text{GJ}/\text{m}^3_{\text{etanol}}$ . Pasar de una relación 1:8 a una 1:2 representa un aumento del 34.4 % en la influencia del secado en el proceso global.

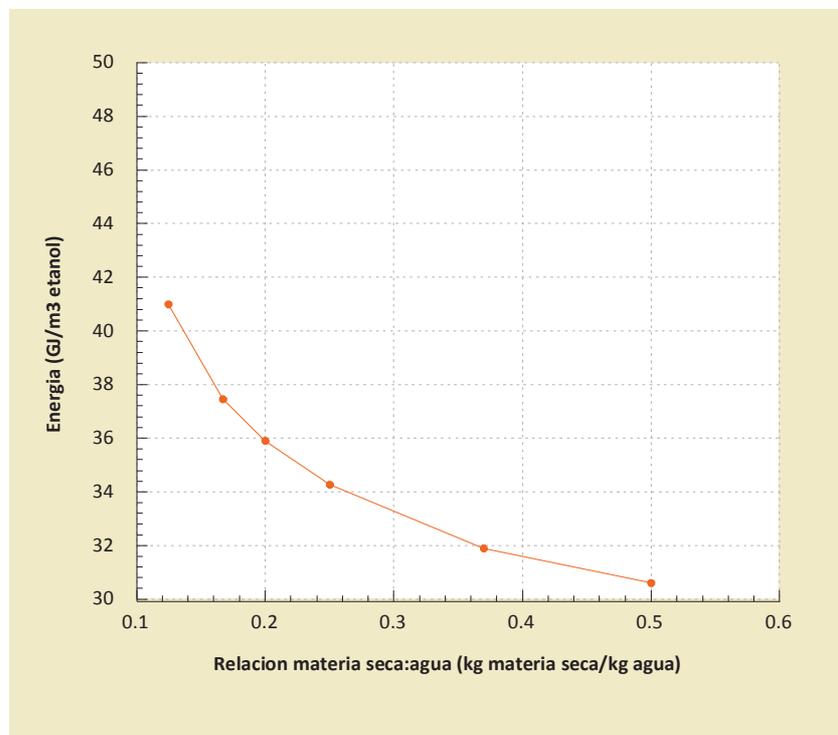
En cuanto al contenido de azúcares del boniato fresco a secar, una variación de (82 a 69) % en los azúcares totales incrementa en un 20 % el consumo de la energía de secado, mientras que el peso del secado en el proceso no cambia. Al variar la humedad final alcanzada por la harina de un 20 % a un 8 % los valores de energía consumida por metro cúbico de etanol producido y la influencia en el proceso global se ven aumentados apenas en un 6.5 y 1.3 % respectivamente. Estos valores tan bajos nos dan a entender que el mayor consumo energético se da para llevar a la harina a una humedad final de 20 % que se corresponde con la evaporación de aproximadamente el 50 % del agua contenida en el boniato fresco (~ 73 % de humedad inicial).

En general, el consumo en todo el proceso, tuvo mayor incidencia en los cambios de eficiencia de fermentación (26 %) y en la concentración de sólidos en el medio (34 %). Esta tendencia es seguida por la composición del boniato fresco (20 %) y humedad final de la harina (6.5 %). Los valores antes mencionados corresponden al incremento porcentual entre el consumo de energía para los puntos extremos, analizados en cada situación referidos al valor de mínimo gasto energético.

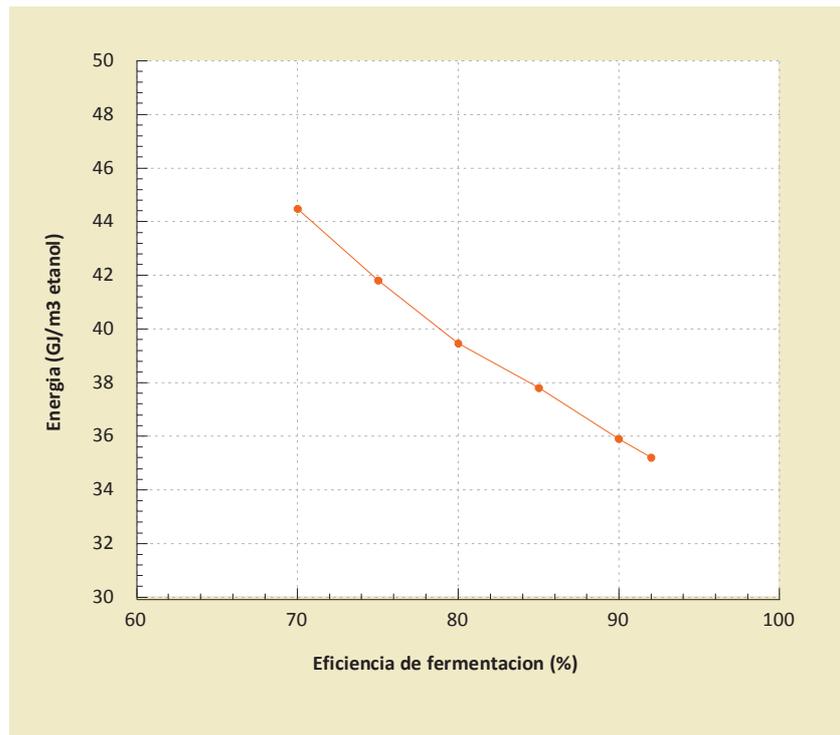
En las Figuras 6.16 a 6.19 se observan las tendencias del consumo energético para las situaciones analizadas: humedad final, relación de sólidos en el medio, eficiencia de fermentación y contenido de azúcares de la harina. En la Tabla 5.3 se detallan las condiciones del proceso fijadas para cada parámetro analizado.



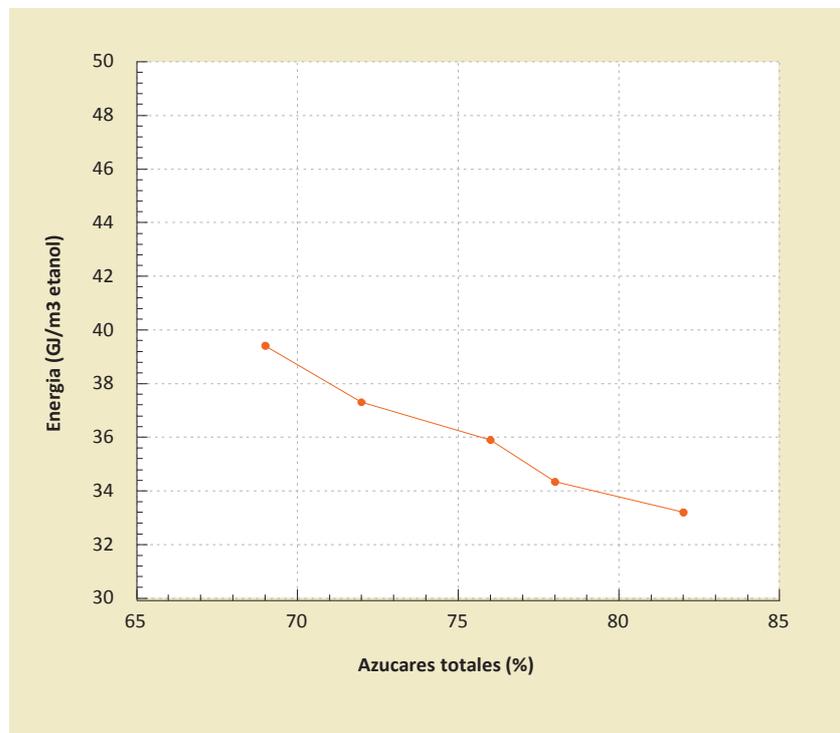
**Figura 6.16.** Representación de la energía consumida en el proceso global de obtención de etanol a partir de harina de boniato para una relación materia seca 1:5, un contenido de azúcares promedio de 76 % y eficiencia de fermentación del 90 %, en función de la humedad final alcanzada en el proceso de secado del boniato fresco.



**Figura 6.17.** Representación de la energía consumida en el proceso global de obtención de etanol a partir de harina de boniato (8 % de humedad), contenido de azúcares promedio de 76 % y eficiencia de fermentación del 90 %, en función de la relación materia seca a agua.



**Figura 6.18.** Representación de la energía consumida en el proceso global de obtención de etanol a partir de harina de boniato para una relación materia seca 1:5 y contenido de azúcares promedio de 76 %, en función de la eficiencia de fermentación.

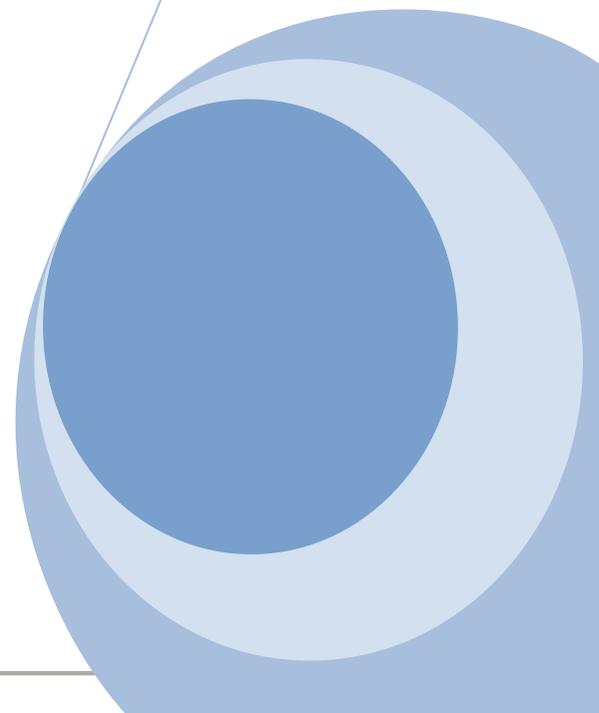


**Figura 6.19.** Representación de la energía consumida en el proceso global de obtención de etanol a partir de harina de boniato para una relación materia seca a agua de 1:5 y una eficiencia de fermentación del 90 %, en función del contenido de azúcares.

Como era de esperarse en las Figuras se observa una caída en el consumo total de energía al aumentar los azúcares totales, la eficiencia de fermentación, el porcentaje de humedad final de la harina y la relación de sólidos en el medio. Las curvas poseen concavidad positiva exceptuando la Figura 6.16 que no se ve afectada la energía por la humedad final en el rango estudiado (8-20 %). El perfil de la Figura 6.17 muestra una tendencia a permanecer constante el valor de gasto energético a partir de una relación de  $0.37 \text{ kg}_{\text{sólido seco}}/\text{kg}_{\text{agua total}}$  (1:2.7) en adelante.

# **CAPÍTULO VII:**

# **CONCLUSIONES**



## 7 CONCLUSIONES

El boniato *Ipomea batatas* K 9807.1 posee un alto contenido de almidón y azúcares solubles fermentables (76 % en base seca). Por lo tanto es una materia prima muy promisorio para la producción de bioetanol combustible pudiéndose obtener cerca de 5000 litros por hectárea.

La fermentación y sacarificación simultánea (SSF) mostró un comportamiento similar a la hidrólisis previa y separada de la fermentación (SHF) en término de concentración final de etanol y rendimiento global. Dos adiciones de AMG, antes y después de la inoculación, no mejoraron significativamente la concentración final de etanol y el rendimiento. No se observó un efecto de inhibición de AMG por glucosa. Por tanto se recomienda la modalidad de operación SSF ya que reduce el tiempo y los requerimientos energéticos del proceso total.

Las enzimas comerciales utilizadas en este trabajo, mostraron un buen desempeño en la hidrólisis del almidón de boniato, tanto en la forma fresca como en la harina.

En la relación materia seca a agua 1:5 se obtuvieron los mejores desempeños (rendimiento, velocidad y manipulación). Un aumento en la cantidad de materia seca por volumen de agua agregado, si bien permite aumentar la concentración final de etanol, el rendimiento fue bajo, la fermentación incompleta, tuvo baja velocidad y dificultad en la homogenización y transferencia de las suspensiones debido a la alta viscosidad.

Se dispone de un modelo de simulación de un proceso industrial desarrollado en el software SuperPro Designer que puede ser utilizado para evaluar otras materias primas amiláceas. Se diseñó un proceso semi-continuo que permite obtener 90.000 m<sup>3</sup> de etanol anuales a partir de boniato fresco y en forma de harina con un proceso que incluye sacarificación y fermentación simultáneas. El uso de materia prima seca presentó un consumo de energía del proceso global que superó el contenido energético del bioetanol producido.

El consumo energético de la planta industrial, se ve afectado en primer lugar por la concentración de materia seca en el medio y en segundo lugar por la eficiencia de fermentación para las condiciones analizadas. Los valores obtenidos afirman la importancia de trabajar a altas concentraciones de materia seca en el medio y con una eficiencia de fermentación alta. Por lo tanto, es importante desarrollar un proceso de transformación a etanol con alta eficiencia y que reduzca los problemas de manipulación derivados de la alta viscosidad del material.

Un aumento en el contenido de azúcares del boniato en un 10 % redujo el consumo energético en un valor equivalente, lo cual pone de manifiesto la importancia de un programa de mejoramiento vegetal.

## 8 BIBLIOGRAFIA

Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S.E., Uribelarrea J., Goma G., Benbadis L., 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology Biotechnology*, **60**: 67-72.

Alfenore S., Cameleyre X., Benbadis L., Bideaux C., Uribelarrea J. L., Goma G., Molina-Jouve C., Guillouet S.E., 2003. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology Biotechnology*, **63**: 537-542.

ALUR (Alcoholes del Uruguay S.A.). En cinco meses comenzarían las obras de la nueva planta de etanol. Disponible online: <http://www.alur.com.uy/articulos-prensa.html>

Balat M., 2007. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Exploration and Exploitation*, **25**: 195-218.

Balat M., Balat H., Oz C., 2007. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**: 551-573.

Barbosa-Canovas G.V., Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan H., 2005. *Food powers: Physical Properties, Processing, and Functionality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Bassetto N. Z., Andrietta S, 2004. R. SEPPA-Sistemas Especialistas para la Planta de Producción de Alcohol, pp. 1-9.

Basso L.C., de Amorim H.V., de Olivera A.J., Lopes M.L., 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, **8**: 1155-1163.

Berson R.E., Young J.S., Hanley T.R., 2006. Reintroduced solids increase inhibitor levels in a pretreated corn stover hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **129-136**: 612-620.

Bothast R.J., Schlicher M.A., 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology Biotechnology – Review*. **67**: 19-25.

Bravo V., Jurado E., Martínez J.F., Reyes A., García A.I., 2006. Enzymatic hydrolysis of soluble starch with an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology*, **22**: 718-722.

Bafrcova P., Šmogrovicova D., Sláviková I., Patkova J., Dömeny Z., 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, **21**: 337–341.

Breisha G., 2010. Production of 16 % ethanol from 35 % sucrose. *Biomass and Bioenergy*, **34**: 1243-1249.

CEPAL, OLADE, GTZ, 2003. *Energía y Desarrollo Sustentable en América Latina y el Caribe. Guía para la formulación de Políticas Energéticas*. Primera Edición, Comisión Económica para América Latina y el Caribe de las Naciones Unidas (CEPAL), Organización Latinoamericana de Energía (OLADE), Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ).

CEPAL – GTZ, 2003. Sostenibilidad Energética en América Latina y el Caribe: el aporte de las fuentes renovables. CEPAL – GTZ, Comisión Económica para América Latina y el Caribe de las Naciones Unidas (CEPAL), Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ), 8 de octubre de 2003.

Chaabane F.B., Aldiguiet A.S., Alfenore S., Cameleyre X., Blanc P., Bideaux C., Guillouet S.E., Roux G., Molina-Jouve C., 2006. Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess Biosystem Engineering*, **29**: 49-57.

Chidiak M. y Stanley L., 2009. “Tablero de comando” para la promoción de los biocombustibles en Argentina. CEPAL – GTZ, Naciones Unidas, Colección Documento de proyectos, febrero 2009.

Chou H.N., Lee W.S., Yang S.S., 2008. Bioethanol production with sweet potato (*Ipomea batatas Lam*). World Renewable Energy Congress (WRECX), pp. 31-35.

Coultate T.P., 1998. Manual de química y bioquímica de los alimentos. 2<sup>da</sup> ed, ed. E. Acribia, Zaragoza (España), pp. 29-36.

Chouvel H., Chay P.B., Cheftel J.C., 1983. Enzymatic hydrolysis of starch and cereal flours at intermediate moisture contents in a continuous extrusion reactor. *LWT Food Science and Technology*, **16**: 346-353.

Converti A., Saleh A., Sunao S., Monteiro de Carvalho J.C., Aquarone E., 2003. Simplified modeling of fed-batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses. *Biotechnology and Bioengineering*, **84**: 88-95.

De Blass C., Mateos G.G., Rebollar P.G., 2007. DDGS de maíz (granos de destilería, DDG, y solubles, DDS). Universidad Politécnica de Madrid, España ([www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)).

De Mot R., Verachtert H., 1987. Purification and characterization of extracellular alphaamylase and glucoamylase from the yeast *Candida antartica CBS 6678*. *European Journal of Biochemistry*, **164**: 643-654.

De Souza F., da Silveira M.A., Pereira N.Jr., 2007. Producto de alcohol combustible de hidrolizado enzimático de batata-doce (*Ipomoea batatas (L.) LAM*). VI SINAFERM – XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, Brasil, 29 de julio – 1<sup>o</sup> de agosto.

Delgado R., Castro A.J., Vázquez M., 2009. A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Science and Technology*, **42**: 797-804.

Demetri P., 2003. *Bioprocess Design and Economics*. Bioseparations Science and Engineering. Oxford University Press, pp. 11-60. ISBN: 0-19-512340-9. ([www.oup-usa.org/isbn/0195123409.html](http://www.oup-usa.org/isbn/0195123409.html)).

Demirbas F., Bozbas K., Balat M., 2004. Carbon dioxide emission trends and environmental problems in Turkey. *Energy Exploration Exploit*, **22**: 355-365.

Demirbas A., 2009. Biofuels securing the planet’s future energy needs. *Energy Conversion and Management*, **50**: 2239-2249.

Demirbas A., 2011. Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, **88**: 14-28.

- Dias M.O.S., Cunha M.P., Jesus C.D.F., Rocha G.J.M., Pradella J.G.C., Rossell C.E.V., Filho R.M., Bonomi A., 2011. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production?. *Bioresource Technology*, **102**: 8964-8971.
- Dirección Nacional de Energía y Tecnología Nuclear (DNETN), Ministerio de Industria, Energía y Minería, Balance Energético Nacional ([www.dnetn.gub.uy](http://www.dnetn.gub.uy)).
- Dombek K.M., Ingram LO, 1986. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**(5): 975-981.
- Dufey A., 2006. Biofuels production, trade and sustainable markets. Sustainable Markets Discussion paper No. 2. International Institute for Environment and Development, London, pp. 1-56.
- DSD, 2001. Indicators of sustainable development: guidelines and methodologies, Division for Sustainable Development, United Nation Department of Economic and Social Affairs. (<http://www.un.org/esa/sustdev/publications/publications.htm#indicators>)
- Encuesta Hortícola 2006, Montevideo Rural, IMM.
- Errea E., Sader Neffa M., 2006. Política sucroalcoholera. Anuario 2006, OPYPA, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay, Disponible online.
- Fajardo L., 2010. Tesina de grado: Producción de bioetanol a partir de boniato.
- Fallé L.M., Gomes Barreto H., de Cassia Cunha R., Gomes Momenté V., Nunes de Souza J.P., Veloso V., 2005. Avaliação de duas cultivares comerciais de batata-doce quanto a produtividade nas condições do assentamento vale verde-to. CT-AGRO y CT-HIDRO 019/2005.
- Ferreira I.M., Pinho O., Vieira E., Tavela J.G., 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trend in Food Science & Technology*, **21**: 77-84.
- Fujii M., Kawamura Y., 1985. Synergistic action of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on the hydrolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 260-265.
- Genkina N.K., Wasserman L.A., Noda T., Testerc R.F., Yuryeva V.P., 2004. Effects of annealing on the polymorphic structure of starches from sweet potatoes (*Ayamurasaki* and *Sunnyred* cultivars) grown at various soil temperatures. *Carbohydrate Research*, **339**: 1093-1098.
- Glazer A.N., Nikaido H., 2007. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. 2<sup>a</sup> Edición. Cambridge University Press, Capítulo, 13, pp. 458-486.
- Hatamipour M. S., Kazemi H. H., Nooralivand A., Nozarpoor A., 2007. Drying characteristics of six varieties of sweet potatoes in different dryers. *Food and Biproducts Processing*, **85 (3)**: 171-177.
- He M.X., Feng H., Bai F., Li Y., Zhang Y.Z., 2009. Direct production of ethanol from raw sweet potato starch using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *African Journal of Microbiology Research* **3 (11)**: 721-726.

- He J., Zhang W., 2011. Techno-economic evaluation of thermo-chemical biomass-to-ethanol. *Applied Energy*, **88**: 1224–1232.
- IEA, 2008. World Energy Outlook 2008, International Energy Agency, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).  
[http://www.worldenergyoutlook.org/docs/weo2008/WEO2008\\_es\\_english.pdf](http://www.worldenergyoutlook.org/docs/weo2008/WEO2008_es_english.pdf)
- Jane J.L., 2009. Fundamentals of Starch Chemistry. Department of Food Science and Human Nutrition. Intensive Program in Biorenewables, Iowa State University. Ames.
- Kim K., Hamdy M.K., 1985. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 316-320.
- Kim K., Hanh Vu V., 2008. Production of high concentration of ethanol from uncooked rice wine cake by simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Biotechnology*, **1365**: 5402-5438.
- Kim S., Dale B.E., 2005. Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel. *Biomass and Bioenergy*, **29**: 426-439.
- Klass D., 1998. Biomass for renewable energy, fuel and chemicals. Elsevier, Capítulo 11, pp. 410-429.
- Koonin S., 2006. Getting serious about Biofuels. *Science* **311**: 435.
- Kosugi A., Kondo A., Ueda M., Murata Y., Vaithanomsat P., Thanapase W., Arai T., Mori Y., 2009. Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renewable Energy*, **34**: 1354-1358.
- Kumar D., Murthy G.S., 2011. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, **4**(27): 1-19.
- Kwiatkowski J.R., McAloon A.J., Taylor F., Johnston D.B., 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, **23**: 288-296.
- Lareo C., Ferrari M.D., Guigou M., Larnaudie V., Fajardo L., Ramírez M.B., 2011. Informe final FPTA 266 (2011). Mejora de la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación de materiales amiláceos para la producción de bioetanol combustible. Departamento de Bioingeniería.
- Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, **98**: 3367-3374.
- Lin T., Rodríguez L.F., Eckhoff S., 2011. Process modeling of Quick-germ/Quick-fiber Process: Energy, water and economics. *Industrial Crops and Products*, **34**: 986-993.
- Linoj Kumar M.A., Dhavala P., Goswami A., Maithel S., 2006. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. *Asian Biotechnology Development Review*, **8**: 31-49.

- López E.A., 2009. Estadística, Texto universitario. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Área Tecnológica, Subárea de Métodos de Cuantificación e Investigación. Guatemala, enero 2009.
- López C., Torrado A., Fuciños P., Guerra N.P., Pastrana L., 2004. Enzymatic hydrolysis of chestnut puree: Process optimization using mixtures of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2907-2914.
- López C., Torrado A., Fuciños P., Guerra N.P., Pastrana L., 2005. Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylases mixture. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 252-258.
- Maiorella B., Wilke Ch.R., Blanck H.W., 1981. Alcohol production and recovery. *Advance in Biochemical Engineering*, **20**: 43-92.
- McAloon A., Taylor F., Yee W., 2000. Determination the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks, NREL reporte TP-58028893. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., 1999. Brock Biología de los Microorganismos. 8ª edición, ed. I. Prentice Hall, Madrid (España), pp. 126-130.
- Mojović L., Nikolić S., Rakin M. and Vukasinović M., 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*, **85**: 1750-1755.
- Montesinos T., Navarro J.M., 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 362-370.
- Montoya M.I., Quintero J.A., Sánchez O.J., Cardona C.A., 2005. Efecto del esquema de separación del producto en la producción biotecnológica de alcohol carburante. II Simposio sobre Biofábricas. Avances de la Biotecnología en Colombia. Medellín: Colombia.
- Moorthy S.N., 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch*, **54**: 559-592.
- Noda T., Takigawa S., Matsuura-Endo C., Suzuki T., Hashimoto T., Kottearachchi N.S., Yamauchi H., Zaidul I.S.M., 2008. Factors affecting the digestibility of raw and gelatinized potato starches. *Food Chemistry*, **110**: 465-470.
- Olomo V., Ajibola O., 2003. Processing factor affecting the yield and physicochemical properties of starch from cassava chips and flour. *Starch/Stärke*, **55**: 476-481.
- Omemu A.M., Akpan I., Bankole M.O., Teniola O.D., 2004. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *African Journal of Biotechnology*, **4**(10): 19-25.
- Osundahunsi O.F., Fagbemi T.N., Kesselman E., Shimoni E., 2003. Comparison of the physicochemical properties and pasting characteristics of flour and starch from red and white sweet potato cultivars. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **51**: 2232-2236.

- Pereira F., Guimaraes P. M. R., Texeira J. A., Domingues L., 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation process. *Biotechnology Letter*, **32**: 1655-1661.
- Pereira F., Guimaraes P. M.R., Texeira J.A., Domingues L., 2011. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**(2): 130-136.
- Pirt S.J., Kurowski W.M., 1970. An extension of the theory of the chemostat with feedback of organisms. It a experimental realization with a yeast culture. *Journal Gen Microbiology*, **63**: 357-366.
- Polakovič M., Bryjak J., 2003. Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucomaylase. *Biotechnology Engineering Journal*, **18**: 57-63.
- Reddy O.V.S., Basappa S.C., 1997. Preparation of sweet potato flour and its fermentation to etanol. *Journal Food Science and Technology*, **34**: 108-112.
- Reilly P.J., 1999. Protein engineering of glucoamylase to improve industrial performance – a review. *Starch*, **51**: 269-274.
- Ríos C.M., Grisales R., Cardona C.A., 2004. Integración térmica de procesos a través de tecnología pinch. *Revista Noos*, **18**: 25-32.
- Sánchez O.J., Cardona C.A., 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante II: integración de procesos. *Interciencia*, **30** (11): 679-686.
- Shariffa Y.N., Karim A.A., Fazilah A., Zaidul I.S.M., 2009. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, **23**: 434-440.
- Shen Y., Zhang H., Zheng X., Zhang X., Guo J., Chen Y., 2011. Very high gravity fermentation using sweet potato for fuel ethanol production. *Advanced Materials Research*, **236-238**: 59-62.
- Smeets E., Junginger M., Faaij A., Walter A., Dolzan P., 2006. Sustainability of Brazilian Bio-Ethanol. Report NWS-E-2006-110, Department of Science, Technology and Society, Copernicus Institute, Universiteit Utrecht, State University of Campinas, Agosto 2006.
- Sluiter, A., Sluiter, J., 2005. NREL Biomass Program: Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC. Biomass Analysis Technology Team, Laboratory Analytical Procedure LAP-016. Department of Energy, United States of America.
- Sluiter, A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter, J., 2008. NREL Biomass Program: Determination of Ash in Biomass. Department of Energy, United States of America.
- Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X., Seyama T., Shiroma R., Arakane M., Mukojima N., Tokuyasu K., 2009. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass and Bioenergy*, **33**: 890-898.

- Srichuwong S., Sunarti T.C., Mishima T., Isono N., Hisamatsu M., 2005. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers*, **60**: 529-538.
- Tasić M.B., Veljković V.B., 2010. Simulation of fuel ethanol production from potato tubers. *Computers and Chemical Engineering*, **35**(11): 2284-2293.
- Taylor F., Kurantz M.J., Goldberg N., McAllon M.J., Craig J. C., 2000. Dry grind process for fuel ethanol by continuous fermentation and stripping. *Biotechnology Progress*, **16**: 541-547.
- Toksoy E., Oliver S.G., Kirdar B., 2005. Production of ethanol from starch by respiration-deficient recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, **71**(10): 6443-6445.
- Tucker G.A. y Woods L.F.J. Eds., 1991. *Enzymes in Food. Processing*. Blackie and Son LTD. London.
- Uribelarrea J.L., Goma G., Benbadis L., 1999. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Biotechnology Letters* **21**:337-341.
- Vilaró F., Vicente E., Pereira G., Rodríguez G. Investigación para producción de etanol a base de boniato. Disponible online. <http://www.iica.org.uy/data/documentos/262468.doc>
- Wildenborg T., Lokhorst A., 2005. Introduction on CO<sub>2</sub> geological storage-classification of storage options. *Oil Gas Science Technology. Review*, **60**: 513-515.
- Wu X., Zhao R., Wang D., Bean S.R., Seib P.A., Tuinstra M., Campbell M., O'Brien A., 2007. Effects of amylose, corn protein, and corn fiber contents on production of ethanol from starch-rich media. *Cereal Chemistry*, **83**(5): 569-575.
- Wyman C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*, **50**: 3-16.
- Yadav A.R., Guha M., Reddy S.Y., Tharanathan R.N., Ramteke R.S., 2007. Physical Properties of Acetylated and Enzyme-Modified Potato and Sweet Potato Flours. *Journal of Food Science*, **72**(5): 249–253.
- Yoosin S., Sorapipatana C., 2007. A study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its compositiveness. *Thammasat International Journal Science Technology*, **12**: 69-80.
- Yu B., Zhang F., Zheng Y., Wang P., 1996. Alcohol fermentation from the mash of dried sweet potato with its dregs using immobilized yeast. *Process Biochemistry*, **31**(1): 1-6.
- Yu J., Corripio A.B., Harrison, O.P., Copeland R.J., 2003. Analysis of the sorbent energy transfer system for power generation and CO<sub>2</sub> capture. *Advance Environmental*, **7**: 335-345.
- Zhang Z., Wheatley Ch.C., Corke H., 2002. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. *Postharvest Biology and Technology*, **24**: 317-325.
- Zhang L., Zhao H., Gan M., Jin Y., Gao X., Chen Q., Guan J., Wang Z., 2011. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato

for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, **102**: 4573-4579.

Zhang Z., Chen Q., Jin Y., Xue H., Guan J., Wang Z., Zhao H., 2010. Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potatoe at very high gravity (VHG). *Fuel Processing Technology*, **91**: 1845-1850.

Ziska L.H., Runion G.B., Tomecek M., Prior S.A., Torbet H.A., Sicher R., 2009. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. *Biomass and Bioenergy*, **33**: 1503-1508.

## 9 NOMENCLATURA

**Tabla 9.1.** Abreviaciones utilizadas en este trabajo.

Abreviación	Nombre
A	azúcares totales expresados como glucosa bs
AC	antes de Cristo
AMG	amiloglucosidasa
ATP	adenosin trifosfato
$a_w$	actividad de agua
azúcares <sub>totales</sub>	porcentaje de azúcares totales en base seca encontrados en la materia prima expresados como equivalentes de glucosa
bh	base húmeda
bs	base seca
$C_A$	concentración de almidón teórica en el medio
$Ca^{++}$	cati3n calcio
$C_{Am}$	composici3n mástica de almid3n de la harina de boniato en bs
$C_{bm}$	concentraci3n biomasa muerta
$C_{bv}$	concentraci3n biomasa viable
$C_{bT}$	concentraci3n de biomasa total
$C_{Ef}$	concentraci3n final de etanol en el medio
$C_{Ff}$	concentraci3n final de fructosa en el medio
$C_{Fi}$	concentraci3n inicial de fructosa en el medio
$C_{Gf}$	concentraci3n final de glucosa en el medio
$C_{Gi}$	concentraci3n inicial de glucosa en el medio
$C_G$ sacarosa	concentraci3n de glucosa proveniente de la hidr3lisis de la sacarosa
$CH_3CH_2OH$	etanol
$C_6H_{12}O_6$	fructosa, glucosa
$C_{HPLC}$	concentraci3n obtenida por HPLC
CIP	cleaning-in-place
DDGS	s3lidos secos y soluble residuales del proceso de la destilaci3n del etanol a partir de grano
DMSO	dimetilsulf3xido
E	eficiencia de fermentaci3n
E5	gasolina conteniendo 5 % de etanol
E10	gasolina conteniendo 10 % de etanol
E85	gasolina conteniendo 85 % de etanol
E95	gasolina conteniendo 95 % de etanol
$FADH_2$	forma reducida de flav3n aden3n dinucle3tido
g	aceleraci3n de la gravedad
GHG	gases de efecto invernadero
H	humedad
5-HMF	5-hidroximetilfurfural

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
M	molaridad
Masa <sub>muestra</sub>	masa de la muestra
Masa <sub>patrón</sub>	masa del patrón
MBTE	metil ter-butil éter
ppa	puro para análisis
PCI	poder calorífico inferior
PM <sub>fructosa</sub>	peso molecular de fructosa
PM <sub>glucosa</sub>	peso molecular de glucosa
PM <sub>sacarosa</sub>	peso molecular de sacarosa
PVDF	difluoruro de polivinilideno
R	recuento de levaduras en 10 cuadrados en cámara de Neubauer
R	relación materia seca a agua
$\rho_{\text{etanol}}$	densidad del etanol
$\sigma$	desviación estándar
SHF	proceso con sacarificación y fermentación separadas
SHF+SSF	doble dosificación de AMG, proceso con sacarificación previa y simultánea a la fermentación
SIP	sterilization-in-place
SSF	proceso con sacarificación y fermentación simultánea
$t_f$	tiempo final de fermentación
V	volumen
$V_F$	volumen de fermentación
$V_{Ff}$	volumen final de fermentación
VHG	medio con alta concentración de sólidos
$V_{\text{solución}}$	volumen de la solución
$X_f$	concentración final de biomasa en el medio
YPD	medio conteniendo, extracto de levadura, peptona y glucosa

## 10 ANEXO

### 10.1 ANEXO 1: Determinación de la humedad

Para determinar la humedad de las muestras se realizó el secado del material a 60°C hasta peso constante. Inicialmente se colocaron las cápsulas necesarias para el ensayo en estufa a 60°C durante 1 h. Se dejaron enfriar en desecador media hora y luego se pesaron en balanza analítica (masa de las cápsulas).

Luego se adicionó a las cápsulas aproximadamente 1 g de harina de boniato o 3 g de boniato fresco (masa inicial) y se llevaron nuevamente a la estufa por 3 h. Una vez transcurrido el tiempo, las cápsulas con las muestras se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador por media hora. Se midieron en balanza analítica las masas de las respectivas muestras.

Las operaciones de secado, enfriado y pesada se repitieron hasta obtener peso constante (diferencia menor a 0.5 mg entre pesadas consecutivas). Se tomó como masa final este último valor.

### 10.2 ANEXO 2: Determinación de cenizas

Las cápsulas de porcelana vacías se colocaron en la mufla a 550°C durante 1 h. Se dejaron enfriar las cápsulas en un desecador durante 1 h y se pesaron en balanza analítica.

A las cápsulas se agregaron aproximadamente 1.5 g de muestra (ya sea boniato en forma de harina o fresco). Luego las cápsulas con su contenido se pusieron a calcinar en la mufla. La temperatura se incrementó gradualmente hasta alcanzar los 550°C.

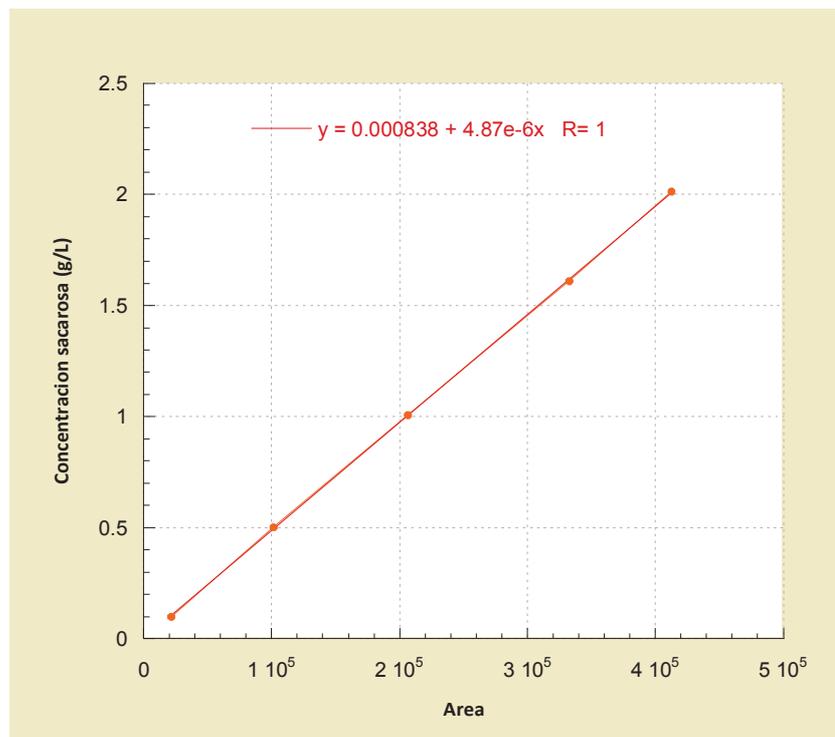
La muestra fue incinerada en la mufla por 4 h, se dejó enfriar una hora en desecador y luego se pesó. Se repitió el procedimiento de calcinar, enfriar y pesar hasta conseguir peso constante con una variación entre valores de pesadas de 0.5 mg. Las cápsulas se colocaron en la mufla por intervalos de 1 h. Se aseguró que la ceniza fuese de color blanco o pardo y se trabajó en campana. El ensayo se realizó por triplicado 2 veces.

### 10.3 ANEXO 3: Curvas de patrones

Las curvas de calibración utilizadas con la técnica de HPLC se construyeron con cinco puntos en un rango de concentración de 0.1 a 2.0 g/L para la sacarosa (Merck kGaA), maltosa (Supelco), D (-) fructosa (Merck kGaA) y D-glucosa (Mallinckrodt Chemicals) y de 0.001 a 0.05 g/L para el alcohol etílico (Dorwil SA) y glicerol (Merck kGaA).

Específicamente las diluciones utilizadas para determinar la curvas de calibración fueron: 0.1, 0.5, 1.0, 1.6, 2.0 g/L para los azúcares y 0.001, 0.005, 0.007, 0.01, 0.05 g/L para el etanol y glicerol que se corresponden con la linealidad de las curvas dadas por el cromatógrafo (HPLC). Las mismas se prepararon como una mezcla para simular las posibles interacciones en la materia prima. Se pesó una masa de 1 g de cada patrón y se prepararon las diluciones pertinentes para conseguir las concentraciones antes mencionadas en matraces aforados de 50, 100 y 200 mL, utilizando como solvente agua calidad milliQ.

En las Figuras A.3.1 a A.3.5 se encuentran curvas típicas obtenidas con la columna Shodex SUGAR KS-801 de los patrones de sacarosa, glucosa, fructosa, glicerol y etanol, respectivamente. Los rangos de linealidad hallados para las condiciones trabajadas en la columna fueron a concentraciones de 0.1 a 2.0 g/L para los azúcares, glicerol y etanol. Por lo cual, para el análisis de los datos se debió llevar mediante diluciones con agua milliQ a concentraciones comprendidas en este rango, para poder realizar las interpolaciones correspondientes con las curvas obtenidas para cada uno de los patrones.



**Figura A.3.1.** Curva de calibración para los patrones de sacarosa.

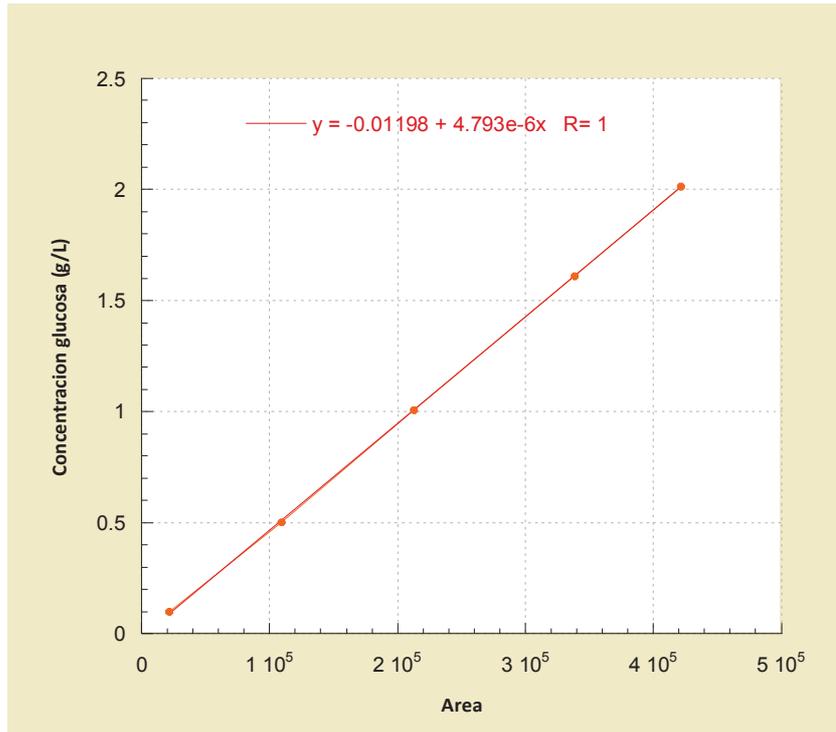


Figura A.3.2. Curva de calibración para los patrones de glucosa.

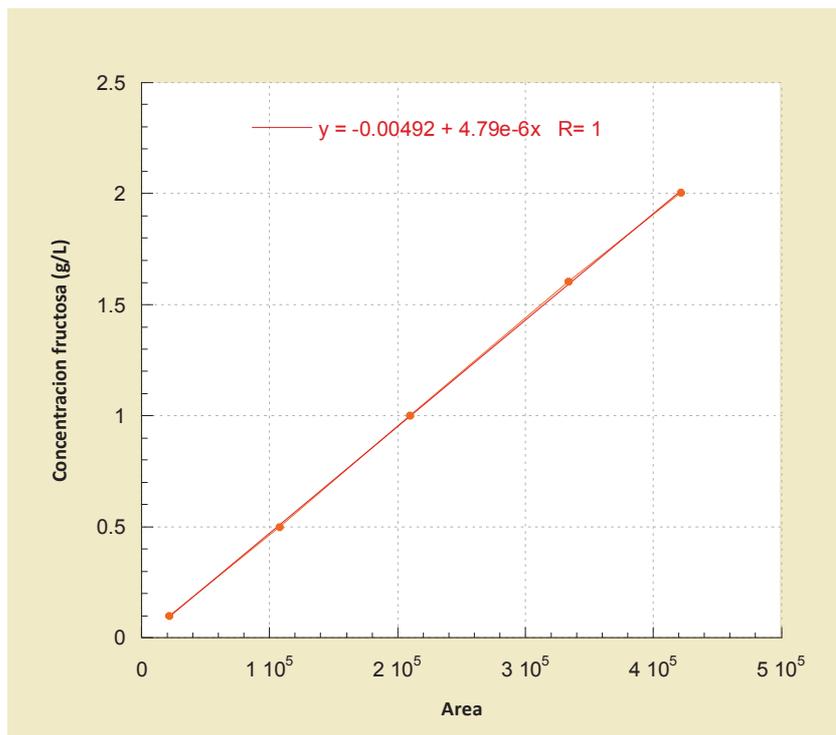


Figura A.3.3. Curva de calibración para los patrones de fructosa.

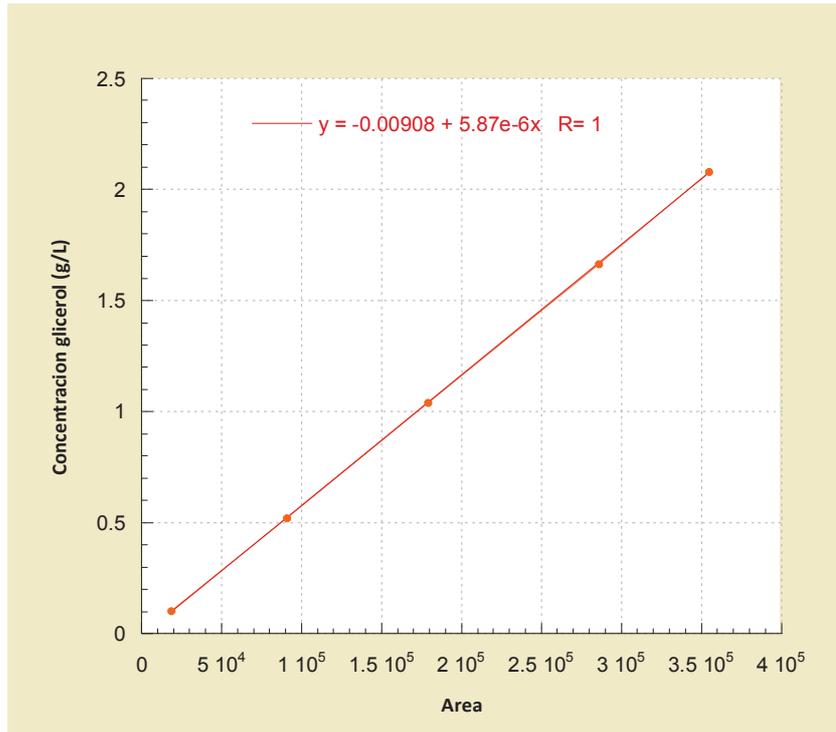


Figura A.3.4. Curva de calibración para los patrones de glicerol.

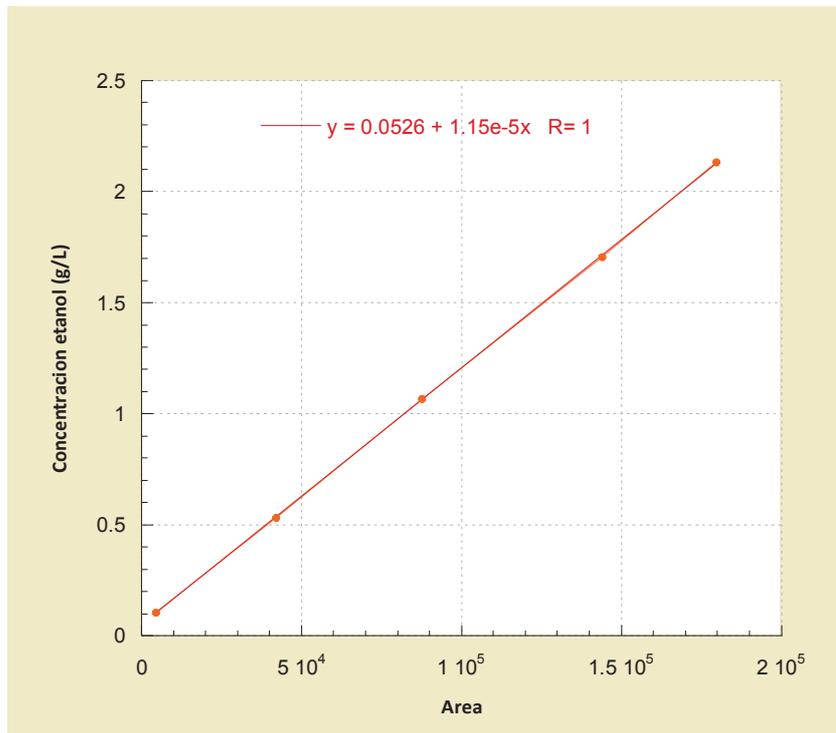


Figura A.3.5. Curva de calibración para los patrones de etanol.

## 10.4 ANEXO 4: Determinación de almidón

Para determinar almidón se utilizaron dos buffers: MOPS y acetato. El buffer MOPS, se preparó con 11.55 g de MOPS en 900 mL de agua milliQ y se ajustó el pH a 7.0 usando NaOH 5 M. Se agregó 0.74 g de cloruro de calcio dihidratado y se llevó con agua milliQ a 1 L en material aforado. El buffer acetato consiste en 11.8 mL de ácido glacial en 900 mL de agua milliQ. Se ajustó el pH a 4.5 con hidróxido de sodio 1 M y luego se agregó agua milliQ hasta completar 1 L.

## 10.5 ANEXO 5: Distribución del tamaño de partícula

En la Tabla A.5.1 se detalla la distribución de partículas obtenidas por tamizado para la harina de boniato. El 22 % de la harina cae en un tamaño de partícula inferior a las 40  $\mu\text{m}$  y el 64.2 % por encima de las 100  $\mu\text{m}$ , lo cual significa que en el sistema particulado predominan las fuerzas gravitacionales. Pero igualmente, el comportamiento puede ser muy variable porque se tienen dos tamaños muy distintos y que se comportan de forma muy diferente.

**Tabla A.5.1.** Distribución de tamaño de partículas de la harina de boniato K 9807.1.

Diámetro de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Fracción peso (%)
$d > 590$	$16.2 \pm 0.3$
$177 < d \leq 590$	$32.0 \pm 0.2$
$149 < d \leq 177$	$9.8 \pm 0.6$
$105 < d \leq 177$	$6.2 \pm 0.3$
$74 < d \leq 105$	$4.9 \pm 0.1$
$44 < d \leq 74$	$9.0 \pm 0.8$
$d \leq 44$	$21.9 \pm 0.4$

## 10.6 ANEXO 6: Análisis ANOVA con los distintos momentos de dosificación de la enzima AMG, en fermentaciones a escala de matraces

En las Tablas A.6.1 a A.6.19 se muestran los análisis de varianzas realizados para comparar los resultados obtenidos experimentalmente (concentración de etanol final, rendimientos y eficiencias globales) a distintos momentos de dosificación para las distintas materias primas (boniato fresco y harina).

Desde la Tabla A.6.1 a A.6.3 se trabajó con los resultados obtenidos en las fermentaciones con boniato fresco, comparando dos grupos: hidrólisis previa vs sacarificación y fermentación simultánea. Para el caso de trabajar con el boniato fresco tampoco se encontró una diferencia significativa de hacerlo con hidrólisis previa o

simultánea. Los valores estudiados de concentración de etanol final, rendimiento agronómico, rendimiento expresado como litros de etanol por kilogramo de boniato fresco y la eficiencia global no se vieron afectados estadísticamente.

Desde la Tabla A.6.4 a A.6.11 se presentan los resultados utilizando harina de boniato, con tres grupos a comparar (hidrólisis previa, doble dosificación y sacarificación simultánea a la fermentación). Las interacciones entre los pares de grupos se estudiaron por Tukey. De aquí, se encontró que no existen diferencias significativas entre los momentos de dosificación de la enzima AMG, considerando un valor de  $\alpha$  del 5 %, ya que todos los valores de  $p$  obtenidos fueron superiores a 0.05.

Se realizó una tercera comparación entre los materiales utilizados: harina vs boniato fresco, que se observan en la Tablas A.6.12 a A.6.19. En esta situación no se halló diferencia significativa para los procesos de hidrólisis previa y simultánea en cuanto a los valores de rendimientos y eficiencias. Sin embargo comparando la concentración final de etanol para el proceso de hidrólisis previa, si existiría diferencia significativa entre ambos materiales, harina y boniato fresco ( $p < 0.05$ ).

**Tabla A.6.1.** Análisis de ANOVA para el rendimiento ( $L_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{boniato bs}}$ ) obtenido con boniato fresco, considerando dos grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa o hidrólisis simultánea a la fermentación).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	$p$
Muestra de los 2 grupos	1	0.00040	0.00040	0.069	<b>0.82</b>
Error	2	0.012	0.0058		
Total	3	0.012	0.0040		

**Tabla A.6.2.** Análisis de ANOVA para la eficiencia global obtenida con boniato fresco, considerando dos grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa o hidrólisis simultánea a la fermentación).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	$p$
Muestra de los 2 grupos	1	10	10	0.22	<b>0.68</b>
Error	2	92	46		
Total	3	103	34		

**Tabla A.6.3.** Análisis de ANOVA para el rendimiento agronómico obtenido con boniato fresco, considerando dos grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa o hidrólisis simultánea a la fermentación).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	1	34782	34782	0.06	<b>0.82</b>
Error	2	1084029	542014		
Total	3	1118811	372937		

**Tabla A.6.4 y A.6.5.** Análisis de ANOVA para concentración final de etanol en la harina, considerando tres grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa, hidrólisis simultánea a la fermentación y doble agregado de AMG).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 3 grupos	2	55.7	27.9	3.2	<b>0.15</b>
Error	4	35.2	8.8		
Total	6	91.0	15		

Tukey (comparación de todos los pares comparativos)				
Comparación	Diferencia de las medias	lqi	p	95 % CL
Simultánea vs Hidrólisis previa	6.0	3.5	0.14	-2.7 a 14.6
Simultánea vs Doble dosis AMG	1.3	0.6	0.92	-10.9 a 13.5
Doble dosis AMG vs Hidrólisis previa	4.6	1.9	0.44	-7.6 a 16.8

**Tabla A.6.6 y A.6.7.** Análisis de ANOVA para el rendimiento ( $L_{\text{etanol/kg boniato bs}}$ ) obtenidos con la harina, considerando tres grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa, hidrólisis simultánea a la fermentación y doble agregado de AMG).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 3 grupos	2	0.0034	0.00088	3.7	<b>0.12</b>
Error	4	0.0018	0.00047		
Total	6	0.0052	0.00088		

Tukey (comparación de todos los pares comparativos)				
Comparación	Diferencia de las medias	lqi	p	95 % CL
Simultánea vs Hidrólisis previa	0.047	3.7	<b>0.12</b>	-0.016 a 0.11
Simultánea vs Doble dosis AMG	0.010	0.56	<b>0.92</b>	-0.079 a 0.099
Doble dosis AMG vs Hidrólisis previa	0.037	2.1	<b>0.39</b>	-0.052 a 0.13

**Tabla A.6.8 y A.6.9.** Análisis de ANOVA para la eficiencia global obtenida con la harina, considerando tres grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa, hidrólisis simultánea a la fermentación y doble agregado de AMG).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 3 grupos	2	129	65	3.2	<b>0.15</b>
Error	4	82	20		
Total	6	211	35		

Tukey (comparación de todos los pares comparativos)				
Comparación	Diferencia de las medias	lqi	p	95 % CL
Simultánea vs Hidrólisis previa	9.1	3.5	<b>0.14</b>	-4.1 a 22.3
Simultánea vs Doble dosis AMG	2.1	0.56	<b>0.92</b>	-16.5 a 20.7
Doble dosis AMG vs Hidrólisis previa	7.0	1.9	<b>0.45</b>	-11.6 a 25.6

**Tabla A.6.10 y A.6.11.** Análisis de ANOVA para el rendimiento agronómico obtenido con la harina, considerando tres grupos de acuerdo al momento de dosificación de la AMG (hidrólisis previa, hidrólisis simultánea a la fermentación y doble agregado de AMG).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	2	309011	154505	3.2	<b>0.15</b>
Error	4	195551	48888		
Total	6	504562	84094		

Tukey (comparación de todos los pares comparativos)				
Comparación	Diferencia de las medias	IqI	p	95 % CL
Simultánea vs Hidrólisis previa	444	3.5	<b>0.14</b>	-199 a 1088
Simultánea vs Doble dosis AMG	100	0.55	<b>0.92</b>	-810 a 1009
Doble dosis AMG vs Hidrólisis previa	345	1.9	<b>0.44</b>	-565 a 1254

**Tabla A.6.12.** Análisis de ANOVA para la concentración de etanol final obtenida realizando hidrólisis previa, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	1	358	358	16	<b>0.028</b>
Error	3	67	22		
Total	4	426	106		

**Tabla A.6.13.** Análisis de ANOVA para el rendimiento ( $L_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{boniato bs}}$ ) obtenido realizando hidrólisis previa, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	1	0.0071	0.0071	6.9	<b>0.079</b>
Error	3	0.0031	0.0010		
Total	4	0.010	0.0025		

**Tabla A.6.14.** Análisis de ANOVA para la eficiencia global obtenida realizando hidrólisis previa, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	1	123	123	6.6	<b>0.082</b>
Error	3	56	19		
Total	4	179	45		

**Tabla A.6.15.** Análisis de ANOVA para el rendimiento agronómico obtenido realizando hidrólisis previa, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	<i>p</i>
Muestra de los 2 grupos	1	666328	666328	6.2	<b>0.089</b>
Error	3	324799	108266		
Total	4	991127	247782		

**Tabla A.6.16.** Análisis de ANOVA para la concentración de etanol final obtenido realizando sacarificación y fermentación en forma simultánea, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	<i>p</i>
Muestra de los 2 grupos	1	239	239	3.4	<b>0.16</b>
Error	3	213	71		
Total	4	452	113		

**Tabla A.6.17.** Análisis de ANOVA para el rendimiento ( $L_{\text{etanol/kg boniato bs}}$ ) obtenido realizando sacarificación y fermentación en forma simultánea, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	<i>p</i>
Muestra de los 2 grupos	1	0.0030	0.0030	0.87	<b>0.42</b>
Error	3	0.010	0.0035		
Total	4	0.013	0.0034		

**Tabla A.6.18.** Análisis de ANOVA para la eficiencia global obtenida realizando sacarificación y fermentación en forma simultánea, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	<i>p</i>
Muestra de los 2 grupos	1	22	22	0.54	<b>0.51</b>
Error	3	119	40		
Total	4	140	35		

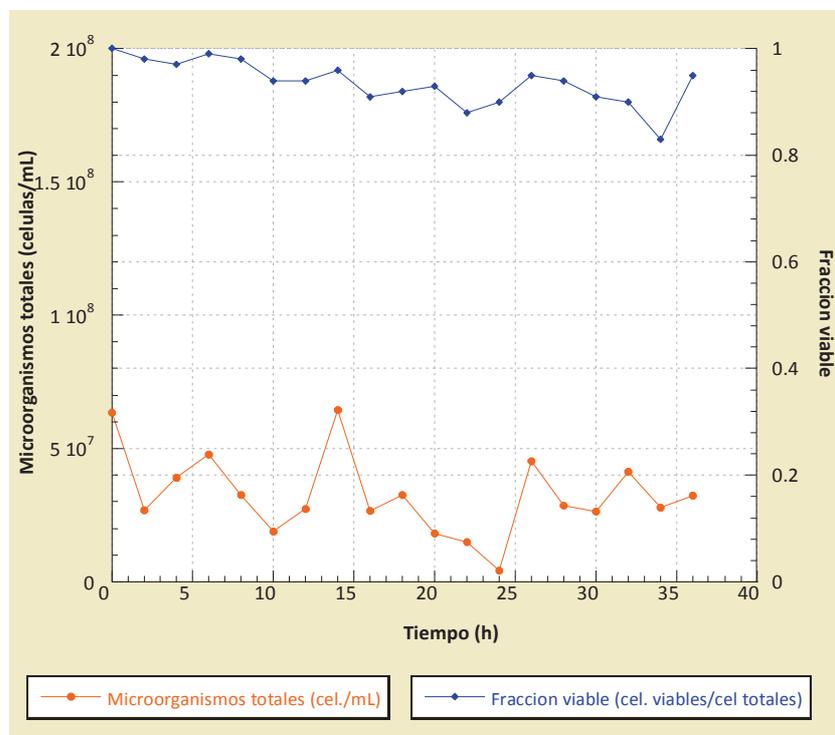
**Tabla A.6.19.** Análisis de ANOVA para el rendimiento agronómico obtenido realizando sacarificación y fermentación en forma simultánea, considerando dos grupos (boniato fresco y harina de boniato).

Análisis de varianza					
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	p
Muestra de los 2 grupos	1	284993	284993	0.90	<b>0.41</b>
Error	3	954781	318260		
Total	4	1239773	309943		

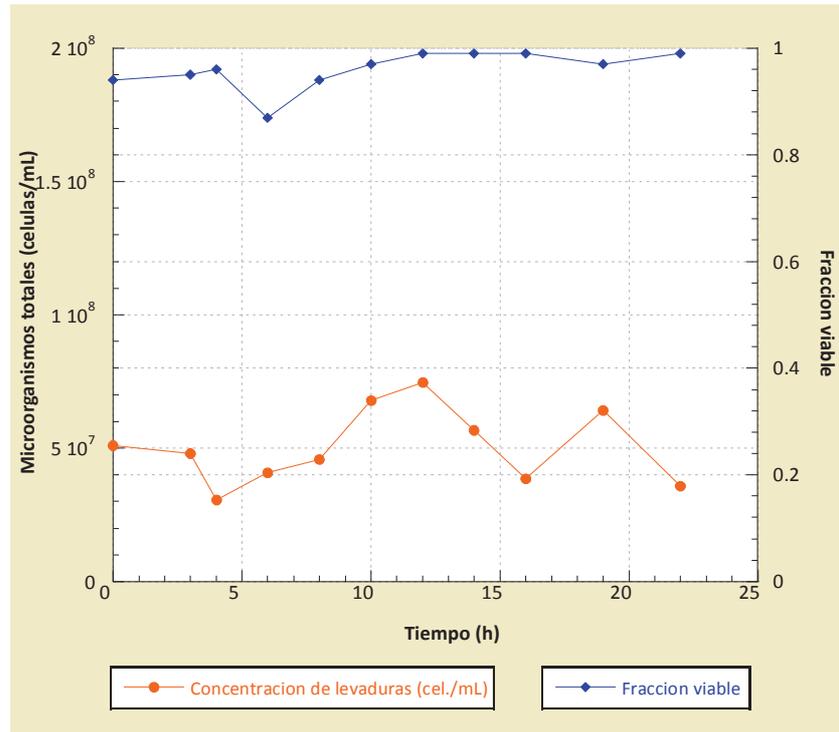
### 10.7 ANEXO 7: Biomasa en reactor, relación 1:5

En las Figuras A.7.1 y A.7.2 se puede apreciar la evolución de la concentración de levadura en el fermentador de laboratorio para la condición de relación masa seca a agua, 1:8 con boniato fresco y relación 1:5 con harina de boniato, respectivamente.

La concentración en general para la harina, permaneció constante durante la fermentación en un valor cercano a  $6.30 \times 10^7$  células/mL. En cuanto a la fracción de células viables siempre estuvo por encima de 0.90, con un promedio de 0.96 células vivas/células totales.



**Figura A.7.1.** Variación de la concentración total de levaduras y su fracción viable en la fermentación que utilizó como materia prima al boniato fresco en una relación materia seca a agua, 1:8.



**Figura A.7.2.** Variación de la concentración total de levaduras y su fracción viable en la fermentación que utilizó como materia prima harina de boniato en una relación materia seca a agua, 1:5.

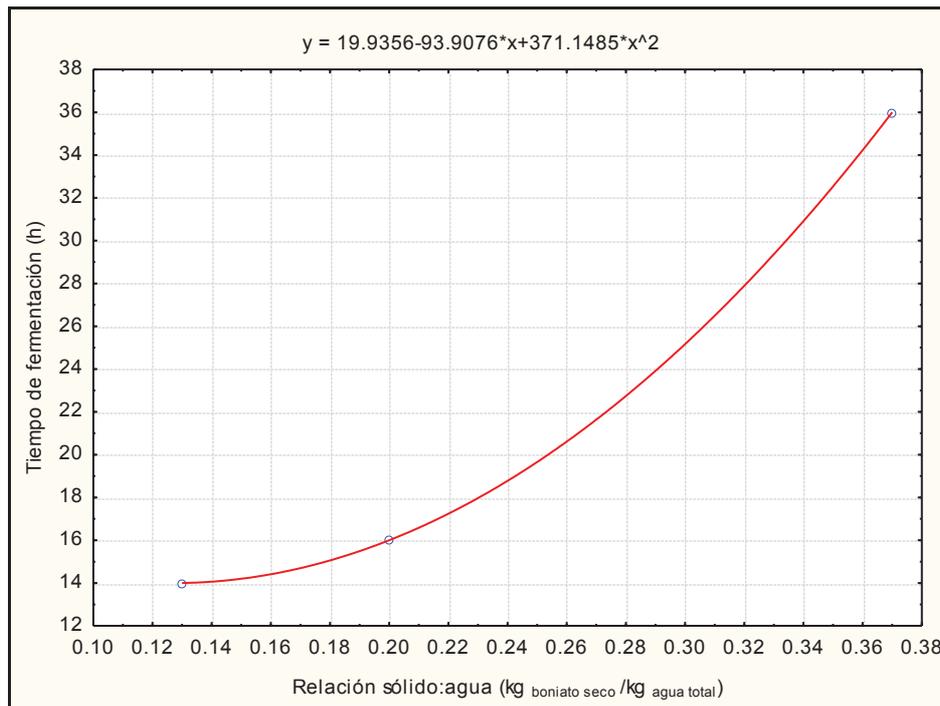
### 10.8 ANEXO 8: Determinación de la curva de mejor ajuste para los tiempos de fermentación

Para determinar los tiempos de fermentación para los medios con distintas relaciones sólido a agua se halló la curva de mejor ajuste obtenida para los datos experimentales disponibles (Tabla A.8.1):

**Tabla A.8.1.** Tiempos de fermentación experimentales para las distintas relaciones materia seca a agua.

Relación sólido a agua (kg sólido seco/kg agua total)	Tiempo de fermentación (h)
0.13	14
0.20	16
0.37	36

En la Figura A.8.1 se apreciar la tendencia de los valores de tiempos de fermentación y la ecuación polinómica que mejor lo representa.



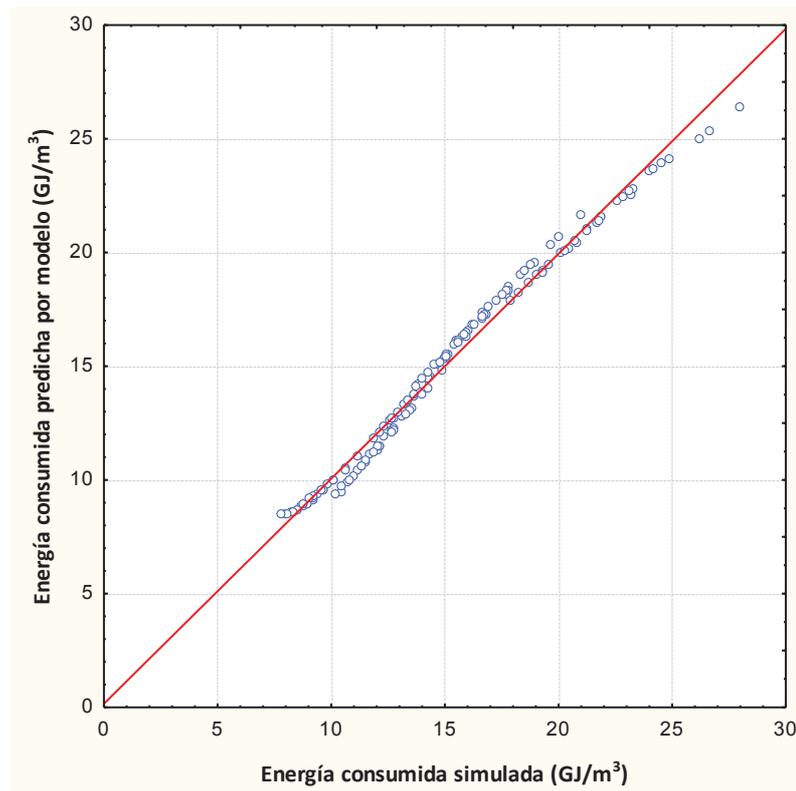
**Figura A.8.1.** Tiempos de fermentaciones para las distintas relaciones sólido seco a agua del medio de fermentación con harina de boniato.

### 10.9 ANEXO 9: Verificación del modelo global

La Tabla A.9.1 muestra los valores de los coeficientes obtenidos para el modelo global y el normalizado. La Figura A.9.1 se muestra la verificación del modelo global, que contiene las tres variables (relación materia seca a agua, contenido de azúcares y eficiencia de fermentación).

**Tabla A.9.1.** Coeficientes del modelo y datos estadísticos relevantes, calculados a partir de los valores obtenidos y normalizados.

Coeficiente del modelo	Estimación ± desviación	
	Modelo global	Modelo global normalizado
a	251 ± 7	1.81 ± 0.05
b	0.0021 ± 0.0009	0.13 ± 0.05
c	0.005 ± 0.002	0.11 ± 0.05
d	-284 ± 10	-5.29 ± 0.05
e	-0.9 ± 0.2	-1.25 ± 0.04
f	-1.4 ± 0.4	-0.87 ± 0.04
g	0.67 ± 0.06	0.44 ± 0.04
h	0.003 ± 0.001	0.10 ± 0.04
i	0.7 ± 0.1	0.28 ± 0.04
j	153 ± 16	12.8 ± 0.1
R <sup>2</sup>	0.99	0.99



**Figura A.9.1.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos con el modelo global.

### 10.10 ANEXO 10: Modelo específico para cada relación materia seca a agua total

Se hizo un modelo específico para cada relación materia seca a agua, dado por la ecuación:

$$Energia = bE^2 + cA^2 + eE + fA + hEA + j$$

Los resultados para cada una de las relaciones se detallan en la Tabla A.10.1. Y en las Figuras A.10.1 a A.10.10 se encuentran las verificaciones de dichos modelos.

En las Figuras A.10.1 a A.10.5 se graficaron las concordancias entre los valores obtenidos por simulación para las distintas relaciones materia seca a agua y los modelos matemáticos encontrados para explicar el gasto energético de una planta de producción de etanol a partir de boniato, variando las eficiencias de fermentación y el contenido de azúcares de la materia prima. En las Figuras A.10.6 a A.10.10 se representan la comparación con el modelo creado a partir de variables normalizadas.

**Tabla A.10.1.** Descripción de los parámetros y sus errores para los modelos de cada relación materia seca a agua total.

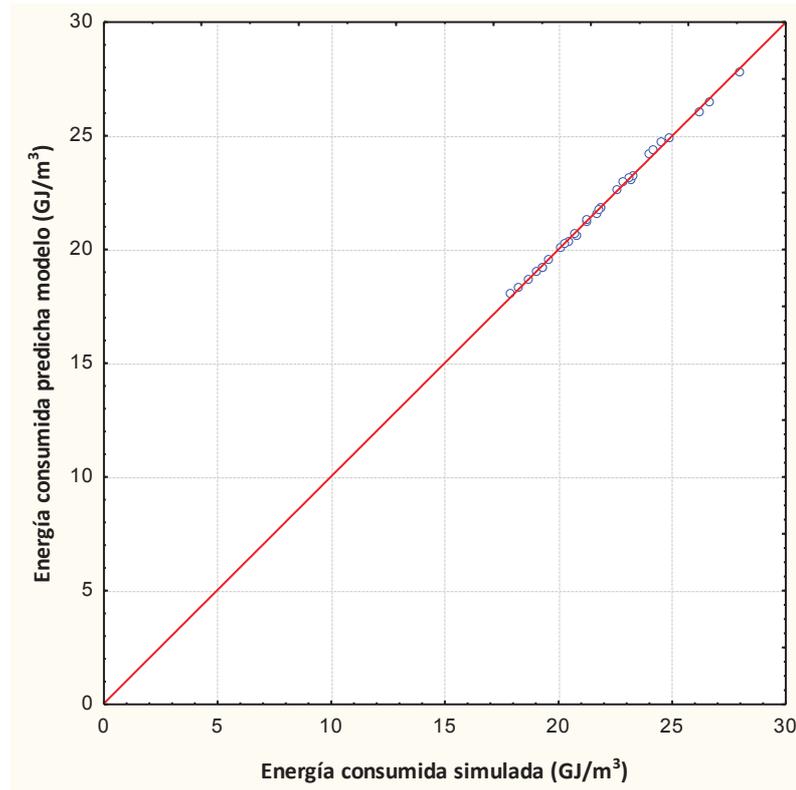
Coeficientes	Relaciones materia seca a agua				
	1:8	1:6	1:5	1:4	1:2.7
b	0.0038 ± 0.0005	0.0022 ± 0.0002	0.0019 ± 0.0002	0.0016 ± 0.0002	0.0009 ± 0.0002
c	0.009 ± 0.001	0.0054 ± 0.0006	0.0054 ± 0.0006	0.0049 ± 0.0005	0.0029 ± 0.0005
e	-1.28 ± 0.09	-0.74 ± 0.04	-0.65 ± 0.04	-0.52 ± 0.03	-0.33 ± 0.04
f	-2.0 ± 0.2	-1.24 ± 0.09	-1.20 ± 0.09	-1.04 ± 0.07	-0.65 ± 0.08
h	0.0025 ± 0.0003	0.0025 ± 0.0003	0.0024 ± 0.0003	0.0020 ± 0.0002	0.0012 ± 0.0005
j	173 ± 9	110 ± 4	99 ± 4	83 ± 3	54 ± 4
R <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

**Tabla A.10.2.** Descripción de los parámetros y sus errores para los modelos de cada relación materia seca a agua total normalizados.

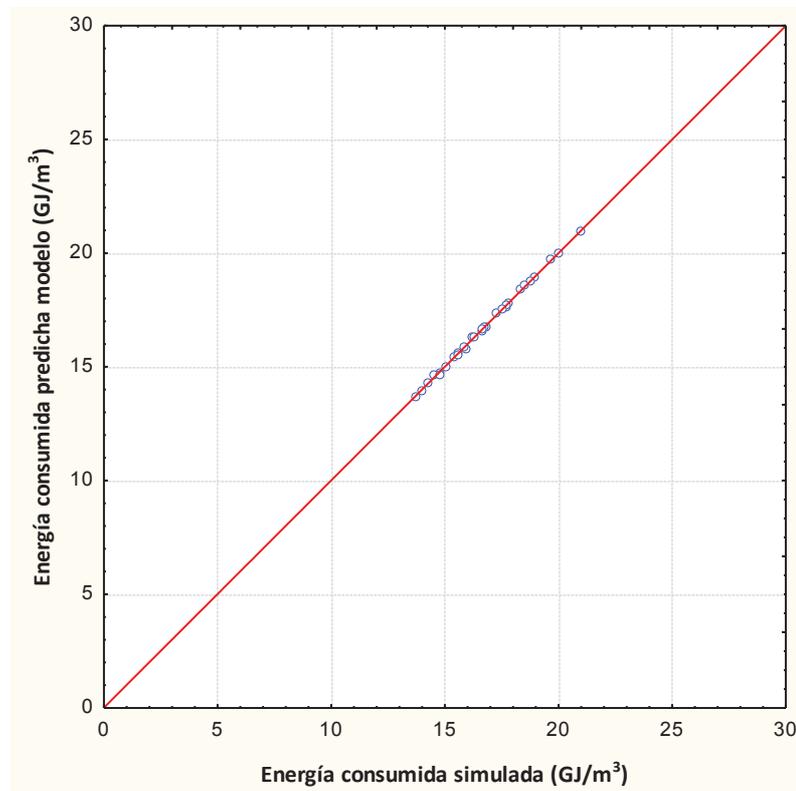
Coeficientes	Relaciones materia seca a agua				
	1:8	1:6	1:5	1:4	1:2.7
b	0.23 ± 0.03	0.014 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.01
c	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.100 ± 0.009	0.06 ± 0.01
e	-2.01 ± 0.02	-1.49 ± 0.01	-1.18 ± 0.01	-0.946 ± 0.008	-0.644 ± 0.009
f	-1.38 ± 0.2	-1.01 ± 0.01	-0.82 ± 0.01	-0.666 ± 0.008	-0.60 ± 0.01
h	0.19 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.071 ± 0.008	0.043 ± 0.009
j	21.50 ± 0.04	16.49 ± 0.02	14.05 ± 0.02	11.89 ± 0.02	9.07 ± 0.02
R <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

En la Tabla A.10.2 se describen los parámetros para el modelo con las variables normalizadas a distintas concentraciones de solutos en el medio.

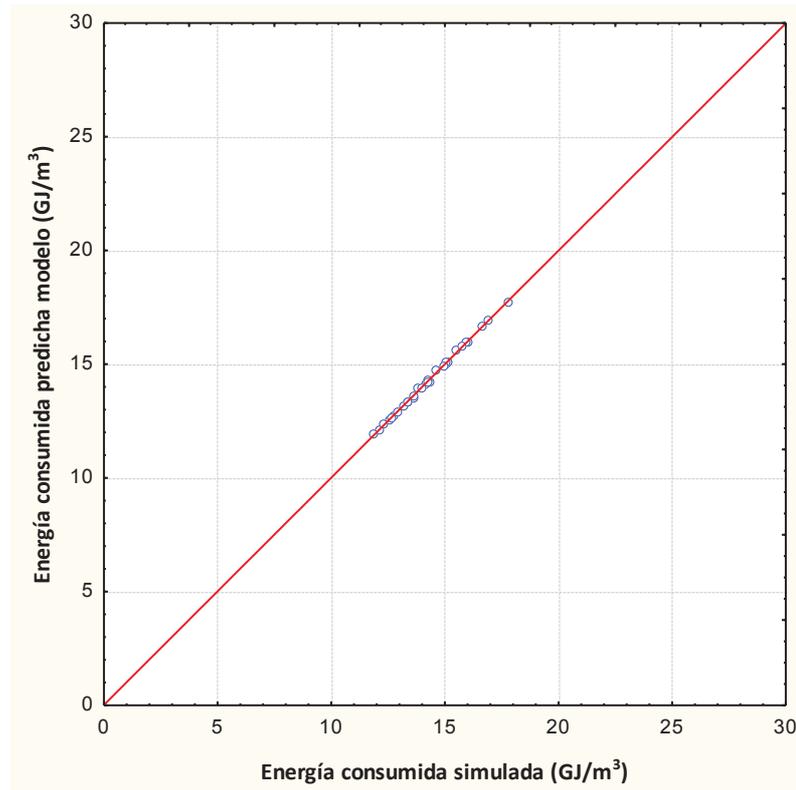
Los mayores valores de coeficientes en las ecuaciones se encuentran afectando a la eficiencia de fermentación. Entonces, la eficiencia representa la variable que más incide en el valor de la energía consumida por el proceso para todas las relaciones materia seca a agua estudiadas. Esto nos indica que conviene estudiar el comportamiento del boniato como materia prima para la producción de etanol en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, de manera de maximizar el rendimiento para cada una de las relaciones. Al aumentar el grado de dilución del medio de fermentación (de 1:2.7 hacia 1:8), el contenido de azúcares tiende a afectar más en la ecuación de energía, ya que la relación entre los coeficientes que acompañan a la variable A y la variable E disminuye. Entonces, trabajar en conseguir altos porcentajes de azúcares a nivel agronómico puede incidir en el consumo energético para la producción a escala industrial de etanol para una relación materia seca concentrada (1:2.7 o menos).



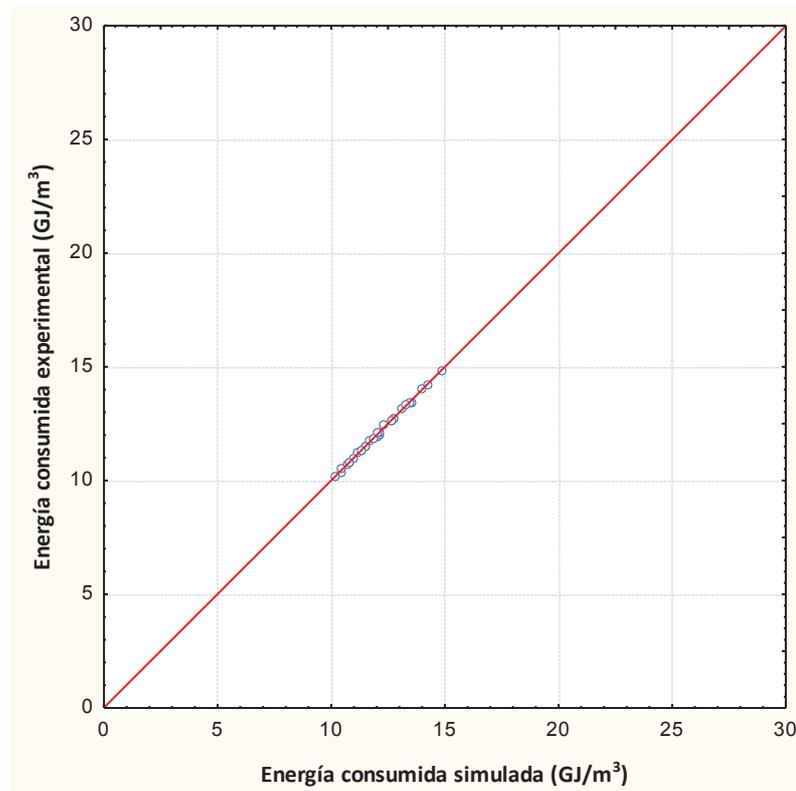
**Figura A.10.1.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo que se corresponde a la relación 1:8.



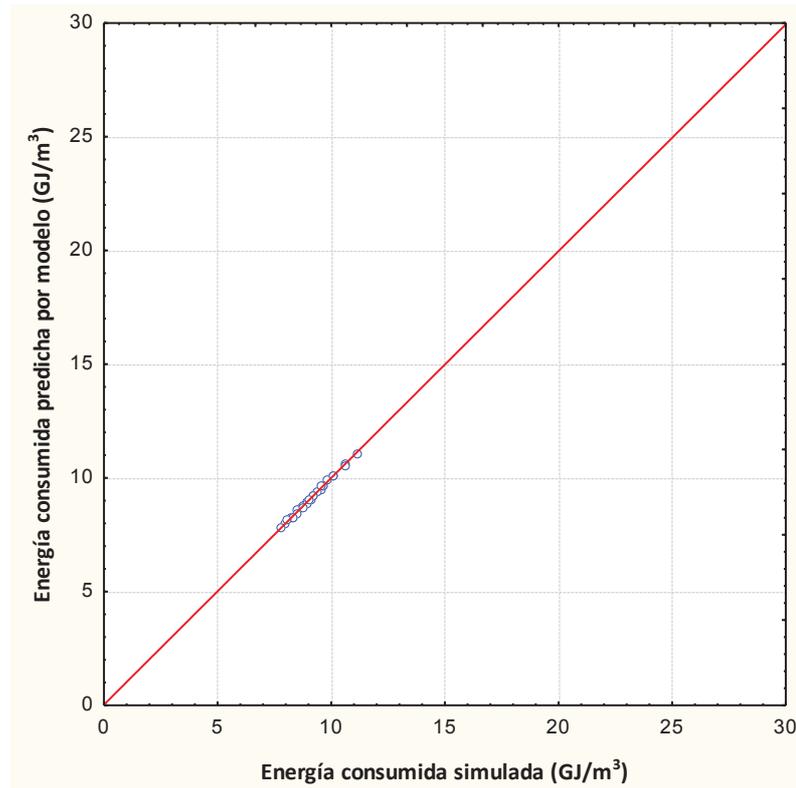
**Figura A.10.2.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo que se corresponde a la relación 1:6.



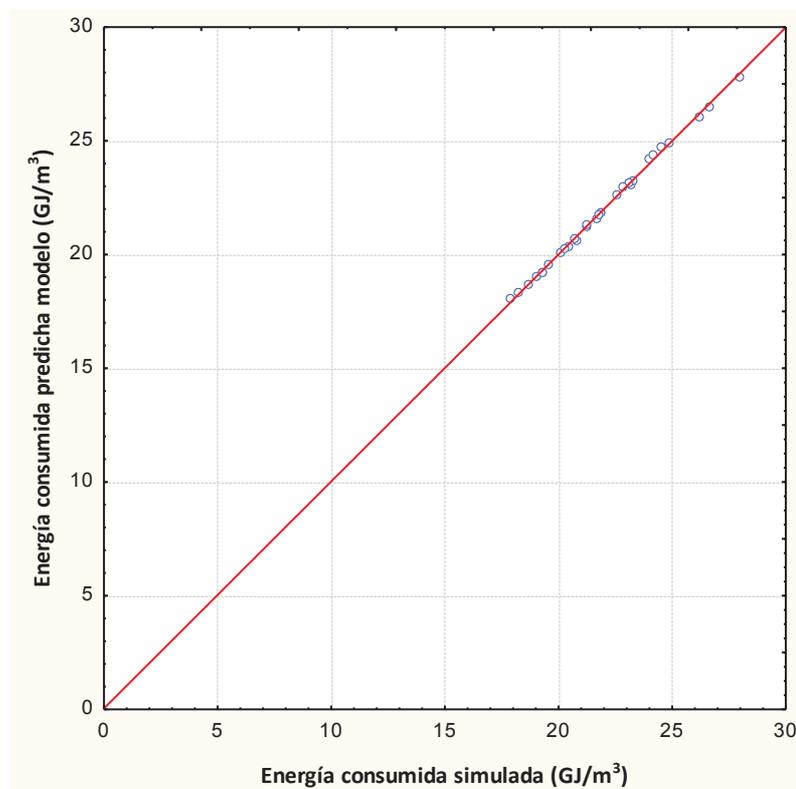
**Figura A.10.3.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo que se corresponde a la relación 1:5.



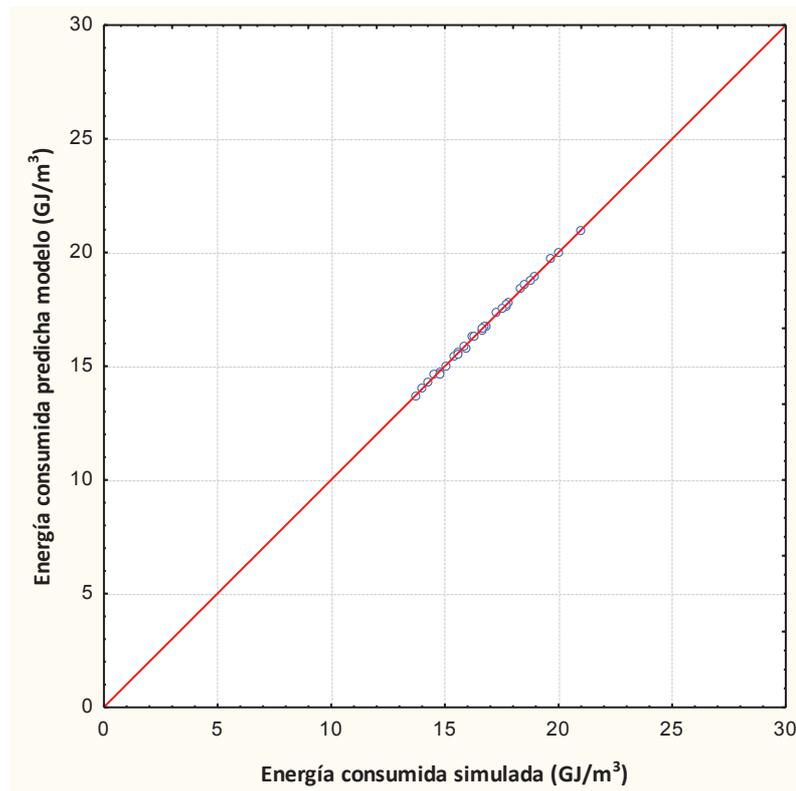
**Figura A.10.4.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo que se corresponde a la relación 1:4.



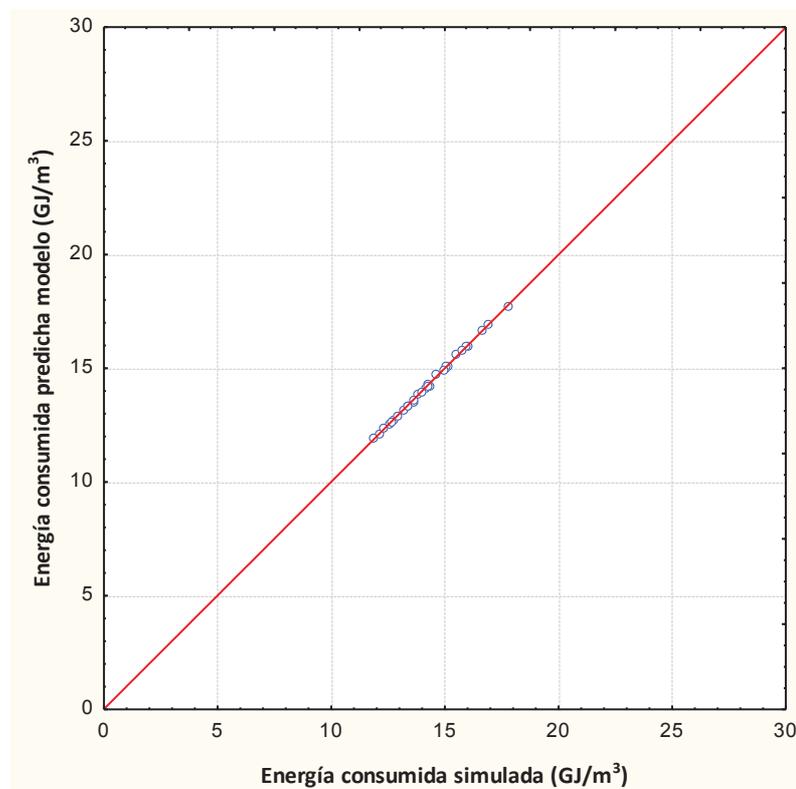
**Figura A.10.5.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo que se corresponde a la relación 1:2.7.



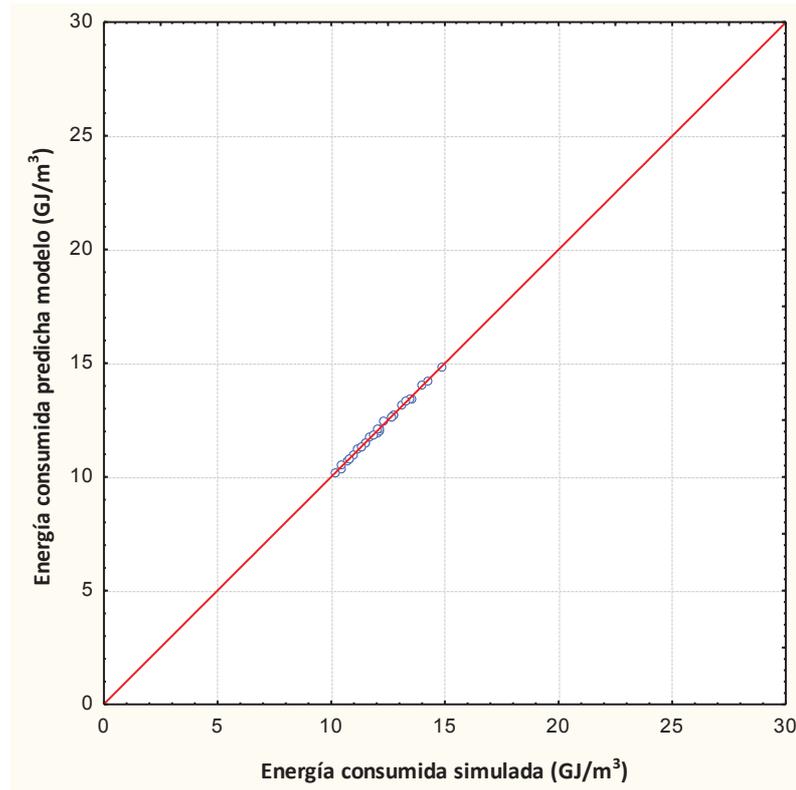
**Figura A.10.6.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo con las variables normalizadas que se corresponde a la relación materia seca a agua 1:8.



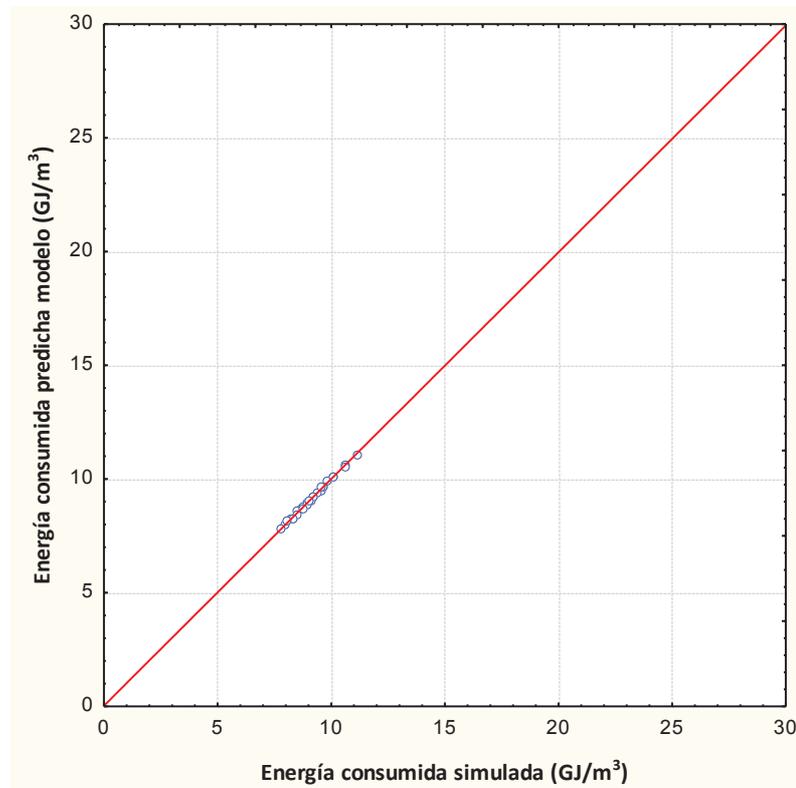
**Figura A.10.7.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo con las variables normalizadas que se corresponde a la relación materia seca a agua 1:6.



**Figura A.10.8.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo con las variables normalizadas que se corresponde a la relación materia seca a agua 1:5.



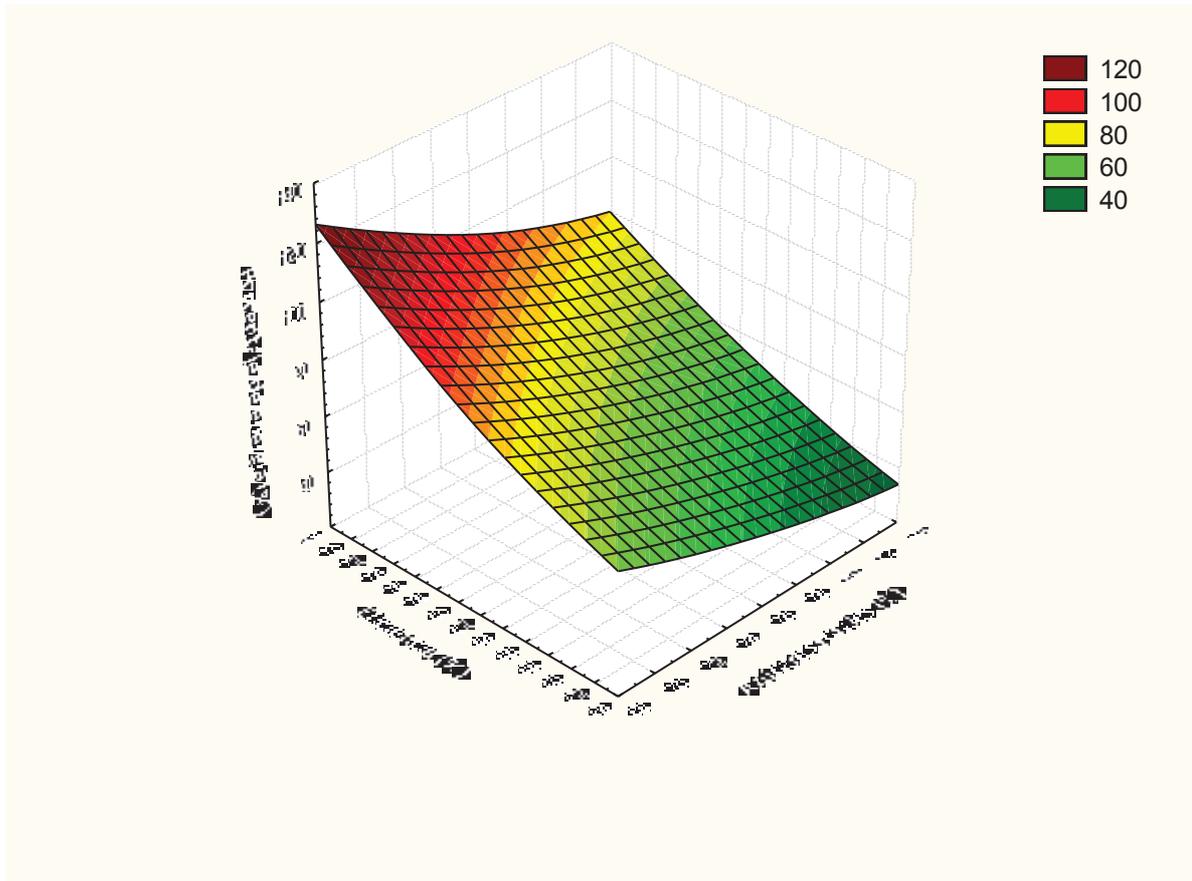
**Figura A.10.9.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo con las variables normalizadas que se corresponde a la relación materia seca a agua 1:4.



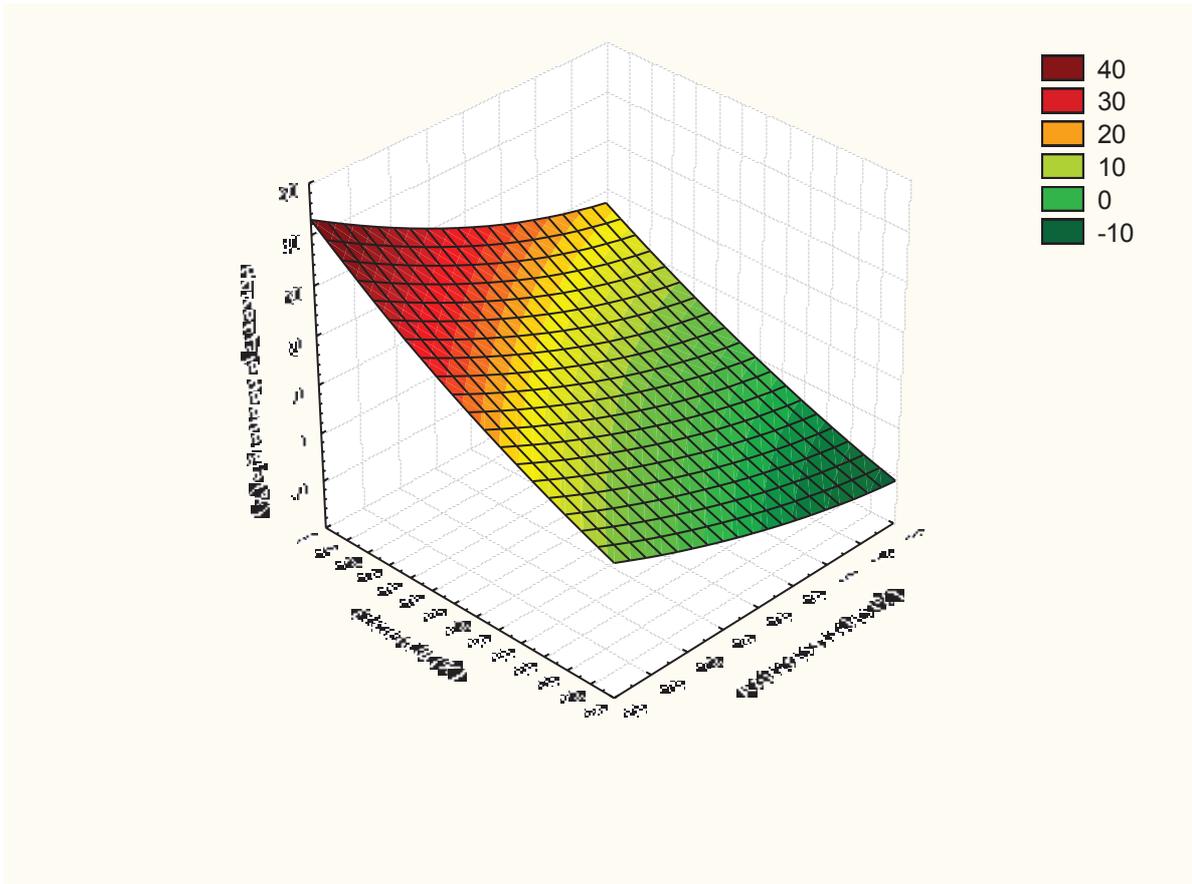
**Figura A.10.10.** Relación entre los valores de energía consumida simulada con los obtenidos para el modelo con las variables normalizadas que se corresponde a la relación materia seca a agua 1:2.7.

## 10.11 ANEXO 11: Curvas de energía comparando respecto un proceso particular

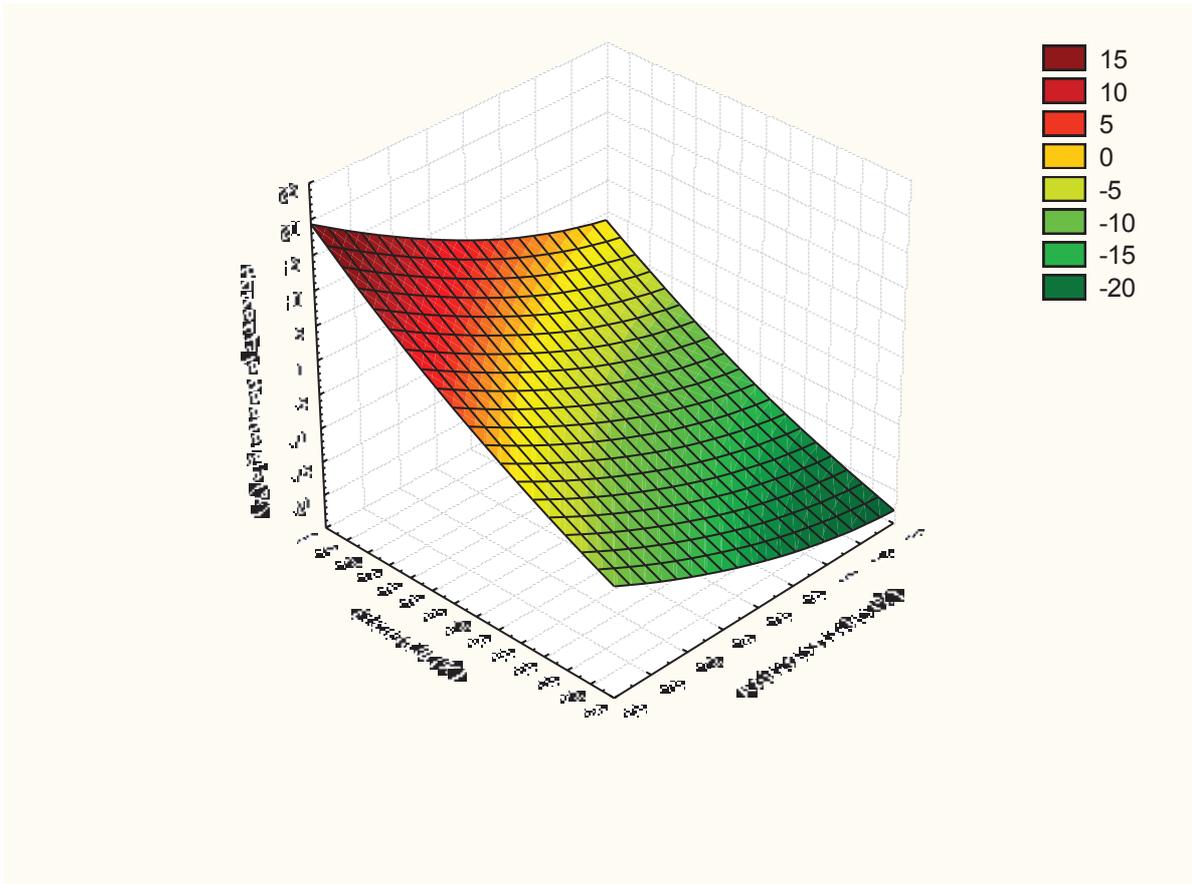
En las Figuras A.11.1 a A.11.4 se comparan las energías consumidas por los procesos a cada relación materia seca a agua, respecto a la situación de contenido de azúcares promedios, eficiencia del 90 % (valor encontrado en promedio experimentalmente para estas condiciones) y relación 1:5. Los valores de porcentajes positivos representan un gasto energético mayor al obtenido para el punto comparado ( $12.9 \text{ GJ/m}^3$ ).



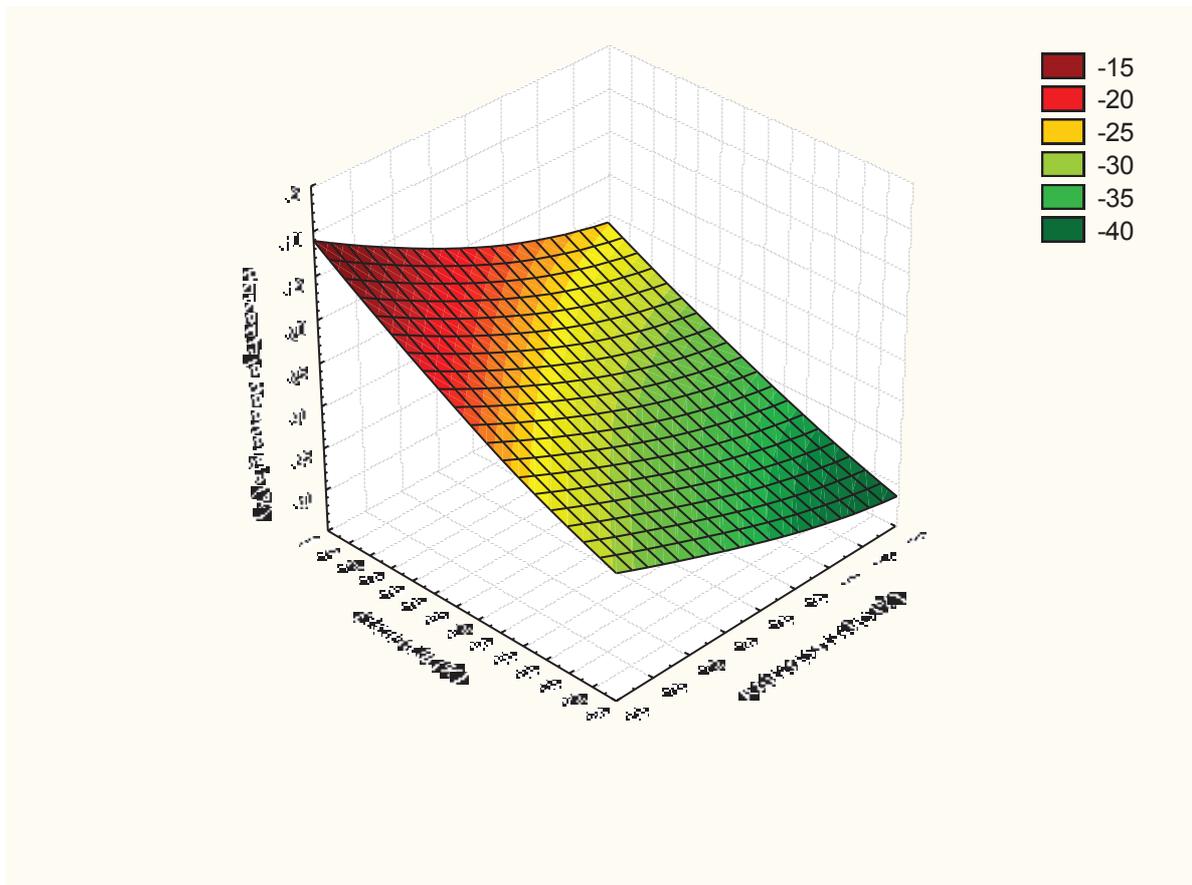
**Figura A.11.1.** Curva de superficie obtenida a partir del porcentaje de energía necesaria para obtener etanol a partir de boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:8 respecto a la energía consumida en el proceso que cumple las siguientes condiciones: relación 1:5, azúcares totales 76 % y eficiencia de fermentación de 90 %.



**Figura A.11.2.** Curva de superficie obtenida a partir del porcentaje de energía necesaria para obtener etanol a partir de boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:5 respecto a la energía consumida en el proceso que cumple las siguientes condiciones: relación 1:5, azúcares totales 76 % y eficiencia de fermentación de 90 %.



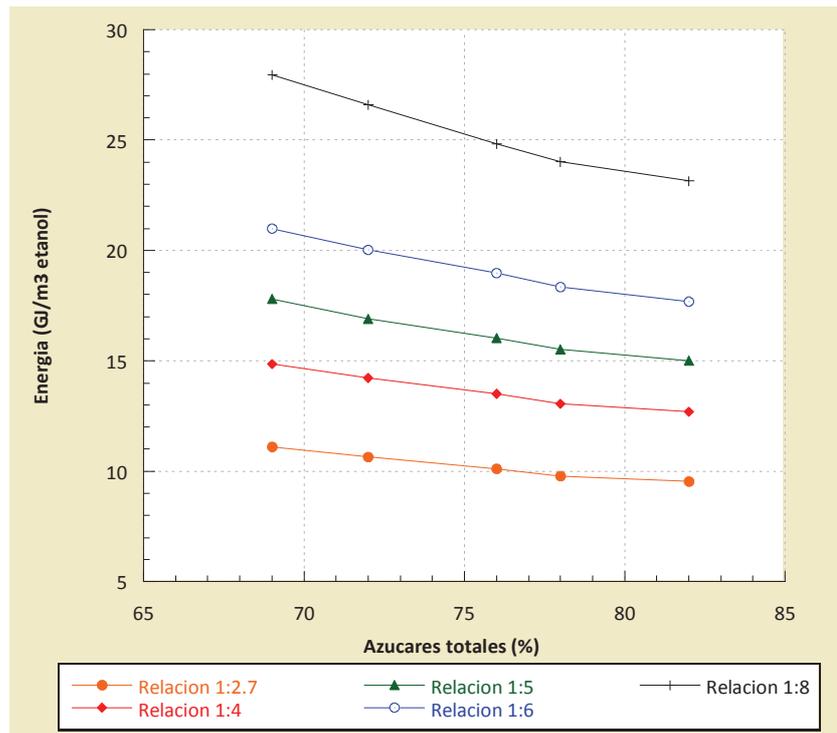
**Figura A.11.3** Curva de superficie obtenida a partir del porcentaje de energía necesaria para obtener etanol a partir de boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:4 respecto a la energía consumida en el proceso que cumple las siguientes condiciones: relación 1:5, azúcares totales 76 % y eficiencia de fermentación de 90 %.



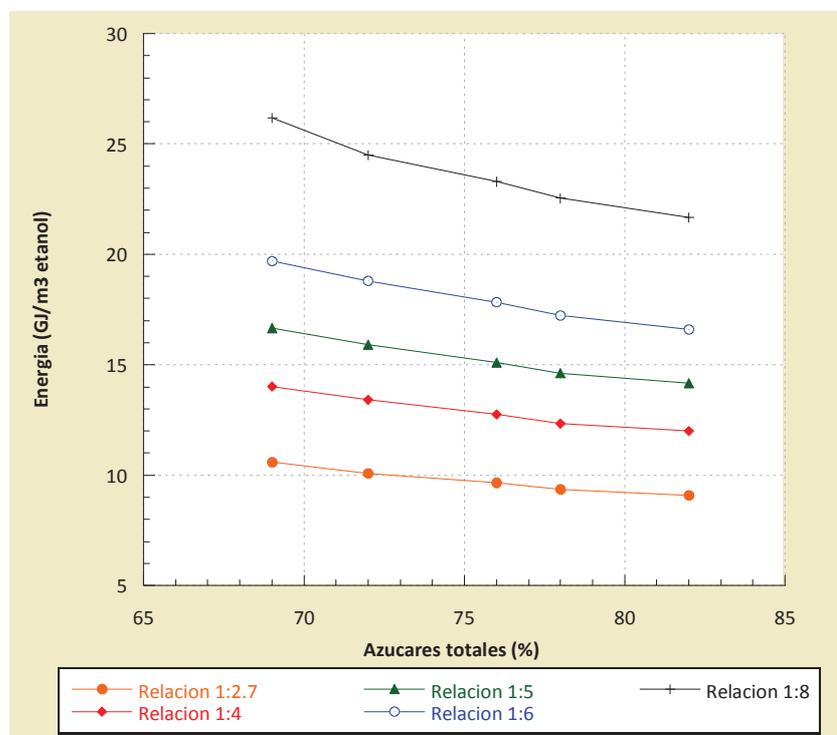
**Figura A.11.4.** Curva de superficie obtenida a partir del porcentaje de energía necesaria para obtener etanol a partir de boniato fresco en relación materia seca a agua total, 1:2.7 respecto a la energía consumida en el proceso que cumple las siguientes condiciones: relación 1:5, azúcares totales 76 % y eficiencia de fermentación de 90 %.

### 10.12 ANEXO 12: Curvas de energía variando el contenido de azúcares y las relaciones de materia seca a agua en el medio para las distintas eficiencias de fermentación.

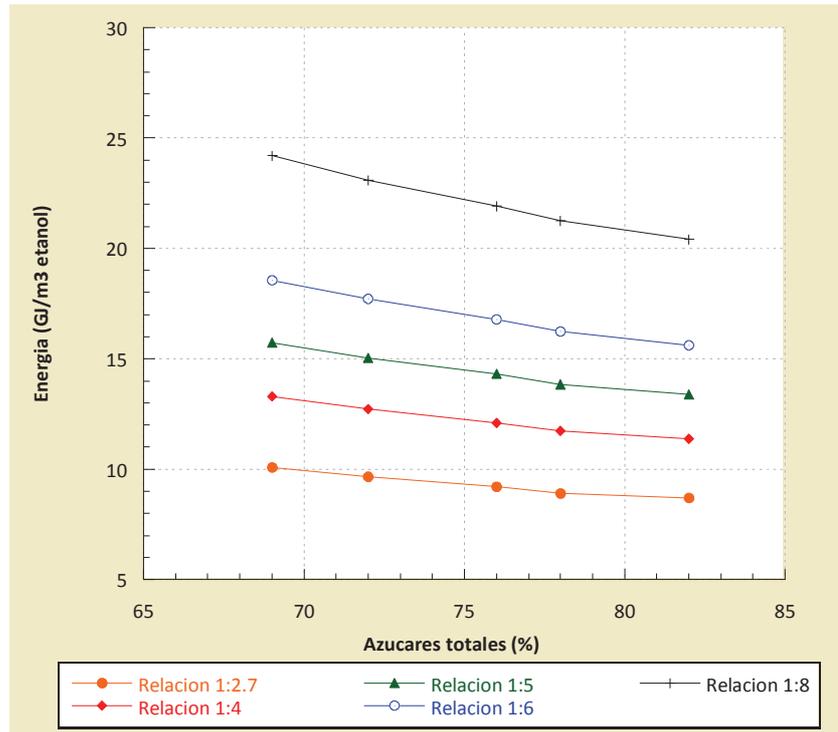
En las Figuras A.12.1 a A.12.5 se muestran las variaciones de los consumos energéticos respecto al contenido de azúcares variando la relación materia seca a agua para las distintas eficiencias de fermentación.



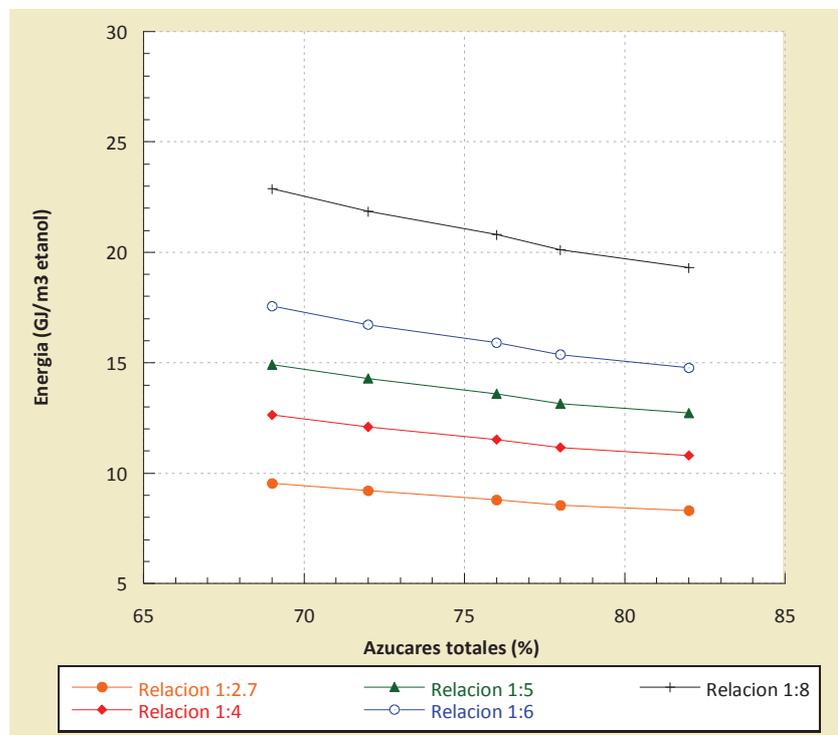
**Figura A.12.1.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 70 %.



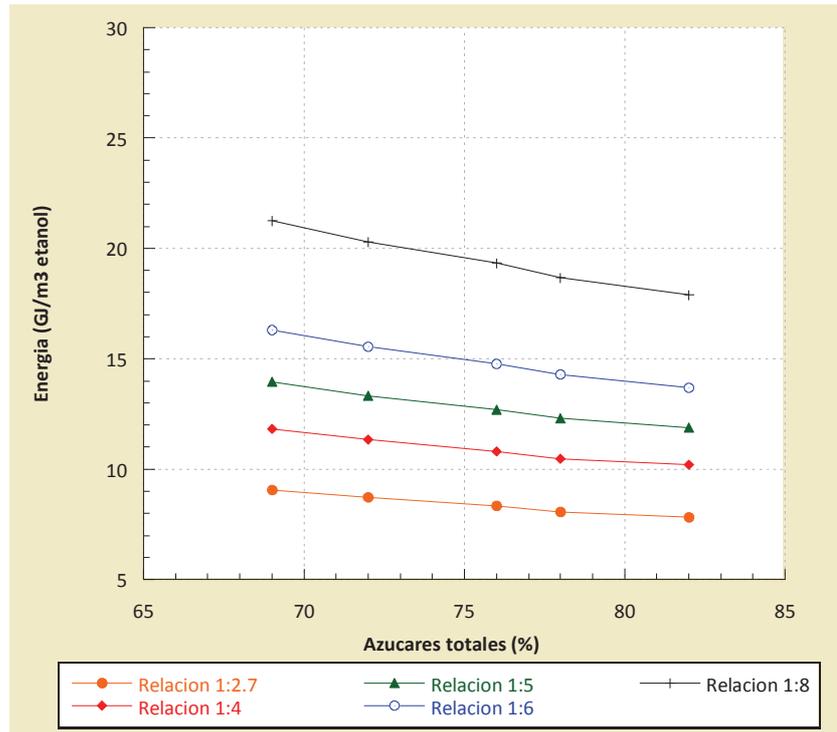
**Figura A.12.2.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 75 %.



**Figura A.12.3.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 80 %.



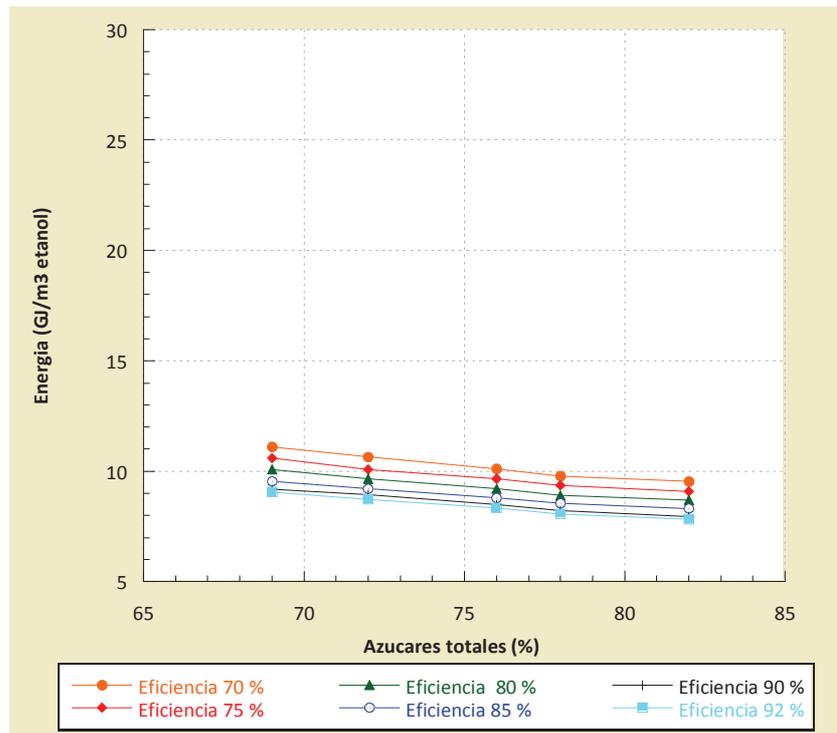
**Figura A.12.4.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 85 %.



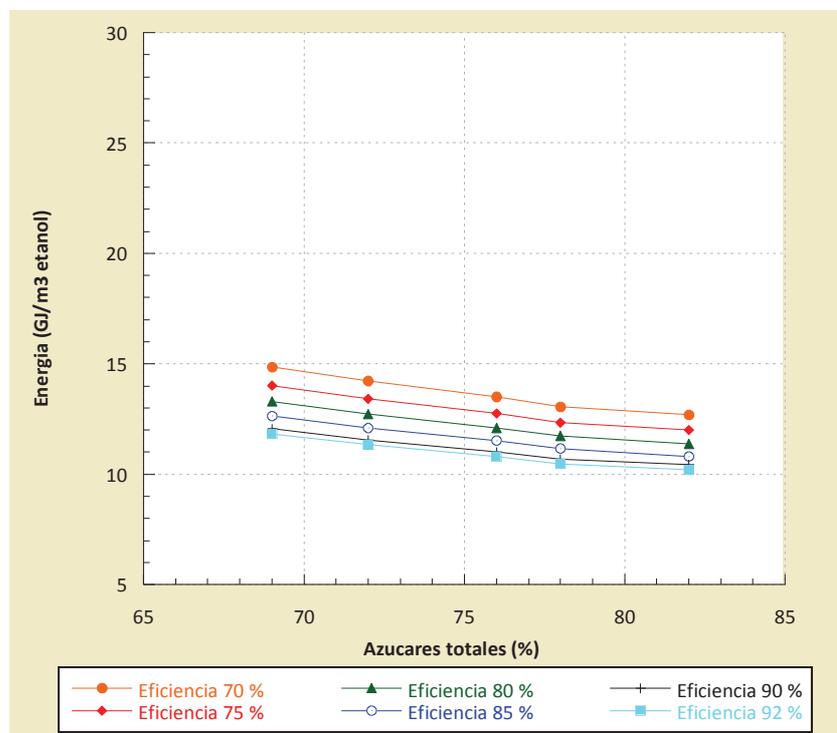
**Figura A.12.5.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la relación materia seca a agua, considerando una eficiencia de fermentación del 92 %.

### 10.13 ANEXO 13: Curvas de energía variando el contenido de azúcares del boniato y las eficiencias de fermentación para las distintas relaciones de materia seca a agua en el medio

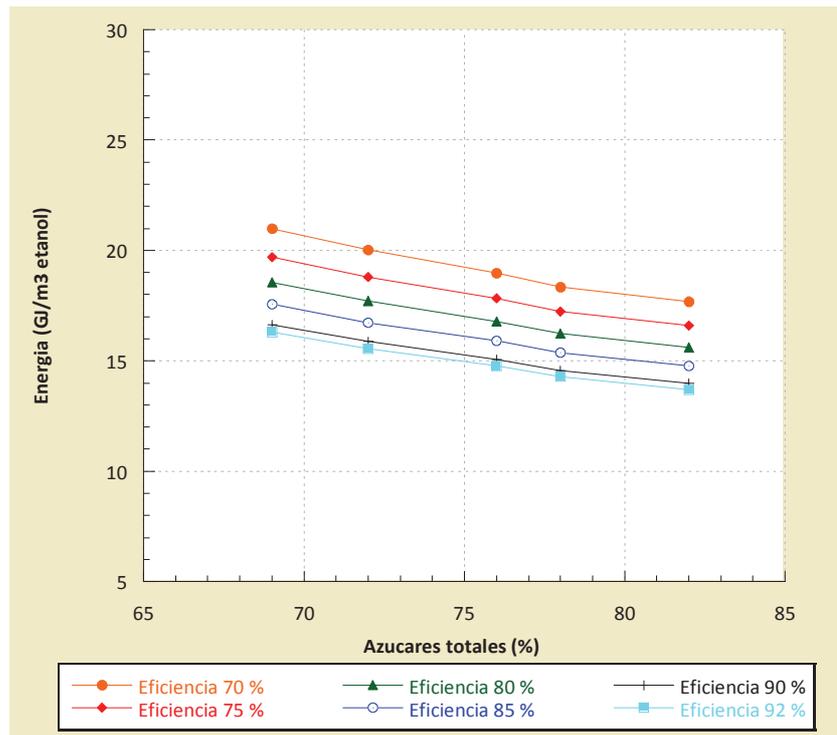
En las Figuras A.13.1 a A.13.4 se muestran las variaciones del consumo de energía respecto al contenido de azúcares, variando las eficiencias de fermentación para cada relación materia seca a agua.



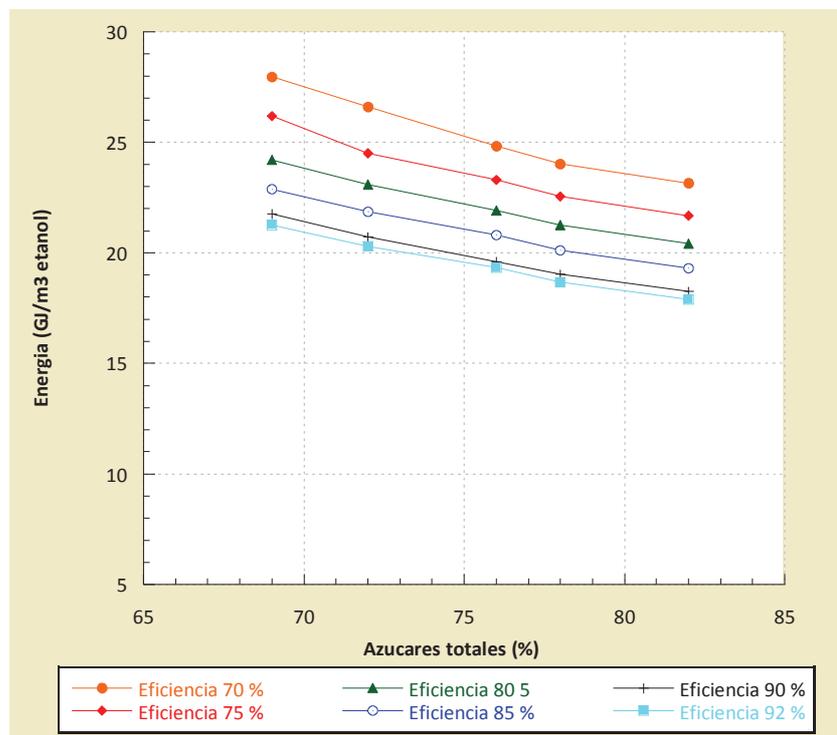
**Figura A.13.1.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la eficiencia de fermentación para una relación materia seca a agua de 1:2.7.



**FiguraA.13.2.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la eficiencia de fermentación para una relación materia seca a agua de 1:4.



**Figura A.13.3.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la eficiencia de fermentación para una relación materia seca a agua de 1:6.



**Figura A.13.4.** Variación del consumo energético con respecto al contenido de azúcares del boniato y la eficiencia de fermentación para una relación materia seca a agua de 1:8.